

著影响。

3.2 电镜照片的分析研究表明:黄原胶的生物合成是一个递增的反馈型代谢合成过程。

参考文献:

- [1] 赵大健, 刁锐. 黄原胶及其在食品工业上的应用[J]. 食品与发酵工业, 1986, 69(3): 48-54.
- [2] Thomas R A. American Chemical Society Symposium, 1977, 45:231-241.
- [3] Mochi A C, Scamparini A R P. Xanthan gum production from Brazilian strains. Food Hydrocolloids [Proc Int Conf Ind Exhib], Meeting Date, 1992, 147-150.
- [4] Luis I, Roberto O C, Marcelo A D. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the Xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*[J]. J Bacterial, 1993, 175(9): 2490-2500.
- [5] US Patent 5987803. Merck 3 COIPC Kelco Div.
- [6] Lewis M J. Physical Properties of Foods and Food Processing Systems. New York: Ellis Horwood Ltd, 1987, 117.
- [7] 刁虎欣, 郑双诚. 黄原胶和半乳糖寡糖分子间的增粘协同性及其应用[J]. 食品与发酵工业, 1992, (1): 69-72.
- [8] 梁凤来. 黄原胶的性能及其在食品中的应用[J]. 食品科学, 1990, (9): 34-39.
- [9] Sandford P A. Adv Carbohydr. Chem Biochem, 1979, 36:265-313.
- [10] E I Sandvik, J M Maerker. "Extra-cellular Microbial Polysaccharides" P A. Sandford and A Laskin eds, 1977, 242-264.
- [11] Sandford P A, Baird J. The polysaccharides. Academic Press. Inc N Y, 1983, (2): 411-490.
- [12] 吉武科. 我国食品级黄原胶生产现状与发展前景[J]. 食品与发酵工业, 1990, (4): 76-78.
- [13] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学试验指导[M]. 高等教育出版社, 1980. 20-22.
- [14] 刘秀芳, 王修. 野油菜黄单胞菌 L4 生产黄单胞菌多糖的适宜条件[J]. 微生物学报, 1993, 33(1): 40-47.
- [15] 姚仕义, 王金生. 野油菜黄单胞菌重组克隆 pXU9278 对黄原胶生物合成的影响[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(1): 36-40.
- [16] 储炬, 李友荣. 现代发酵调控学[M]. 化学工业出版社, 2002.

粘红酵母 GLR₅₁₃ 生产油脂最佳小型 工艺发酵条件的探讨

施安辉¹, 周波²

(1. 山东大学生命科学学院微生物学系, 济南 250100)

(2. 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

摘要: 以 GRL₅₁₃ 粘红酵母 (*Rhodorule glutinis*) 的突变株为出发菌株进行小试生产, 确定其发酵生产油脂的最佳小型工艺条件为: 葡萄糖为碳源, (NH₄)₂SO₄ 为氮源, 碳氮比为 70:1, 发酵初始 pH 5.5, 发酵过程回调 pH 值, 接种量为 20%, 温度为 30℃, 通过后期补加碳源方式培养 72h, 最终油脂产量可达菌体干重的 67.2%, 对该变异菌株产生的油脂进行气相色谱和质谱分析, 确定油脂中棕榈油酸含量为 33.31%, 油酸 3.80%, γ -亚油酸 0.20%, EPA 2.60%, DHA 3.60%, 总计 56.61%。

关键词: 粘红酵母; 发酵条件; 油脂组成与含量

Abstract: We obtained a *Rhodorule glutinis* mutant GLR₅₁₃ by protoplasts mutagenization (UV- and EMS) to be put into small scale lipid production. The best minitype fermentation conditions as to use glucose as carbon source, (NH₄)₂SO₄ as nitrogen source, C/N as 70:1, starting pH as 5.5, inoculative amount as 20% and temperature as 30℃. The yield of lipid production could reach 67.2% of dry thallus weight by replenishing carbon source in anaphase for 72h. We confirmed the component of lipid by gas-liquid chromatography and mass spectrum:

收稿日期: 2002-07-08

作者简介: 施安辉(1940-), 男, 教授, 从事微生物学研究。

palmitoleic acid 33.31%, oleic acid 3.80%, γ -linoleic acid 0.20%, EPA 2.60% and DHA 3.60% with the amount as 56.61%.

Key words: *Rhodotorula glutinis*; fermentation condition; component and constant of lipid

中图分类号:TS264.2⁴

文献标识码:A

文章编号:1002-6630(2003)01-0048-04

当今无论是食用油脂,还是工业用油脂,国内外均非常短缺,寻求新的油脂来源任务迫切,利用微生物生产油脂具有:不受季节和气候的影响,油脂含量高,生产原料来源广泛,生产周期短;油脂中不饱和脂肪酸含量高,可预防、治疗心血管疾病,促进大脑发育,增进机体的免疫能力,利于身心健康。因此,高产油脂菌株的选育、微生物油脂的研究、生产,引起了国内外的广泛的重视。

本研究的目的在于,在已选育获得的 GLR₅₁₃ 的基础上,探索在实验条件下油脂发酵的最佳工艺条件及油脂中饱和、不饱和脂肪酸的组成及含量。

1 材料与方法

1.1 菌体

为本室采用 EMS 诱变选育的高产油脂的粘红酵母 GLR₅₁₃。

1.2 培养基

1.2.1 YEPD 培养基(%) 葡萄糖,酵母浸膏,蛋白胨,蒸馏水 100ml。

1.2.2 麦芽汁固体培养基(略)

1.2.3 麦芽汁液体培养基 在液体麦芽汁的基础上加入 2% 蛋白胨。

1.2.4 发酵培养基(%) 葡萄糖 4; (NH₄)₂SO₄ 0.2; KH₂PO₄ 0.7; Na₂SO₄ 0.2; MgSO₄ · 7H₂O 0.15; 酵母浸膏 0.15; pH 5.5。

1.3 三角瓶发酵培养

菌株活化(30℃,培养 3d)后,接种于 50ml 发酵液中,30℃ 140r/min,摇床培养 24h,然后移种于 500ml 发酵液,30℃ 140r/min 摇床培养 72h。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体干重的测定 培养后的菌体经镜检后,用滤纸过滤,蒸馏水洗两次,称湿重,取部分湿菌体于 60℃ 烘干,称重,已确定湿菌体内含水量,所得的湿菌体进行油脂的抽提。

1.4.2 菌体的破壁 菌液置于 -50℃ 冷冻过夜,取出后用自来水冲洗三角瓶壁,并用力振荡,菌体细胞在温度骤然升高的情况下,细胞的冰粒发生变化,会冲破菌体细胞壁便于油脂的提取,然后置于离心机中

300r/min 离心,移去上清液,上清液用于测定发酵液中的残糖残氮,下层沉淀加入 0.7 磷酸缓冲液,摇匀,再置于滤纸包中,测定菌体干重,油脂含量和蛋白质含量。

1.4.3 菌体油脂的提取 离心获得的菌体包于滤纸中,移入索氏提取液,用石油醚(60~90℃)反复回流抽提 16h,用滤纸斑点测试,检查是否抽提完全,回收石油醚后 60℃ 烘干,根据瓶抽提前后的测量差,以及滤纸包的重量差,可得菌体油脂含量。

1.4.4 残糖的测定 Somogi。

1.4.5 蛋白质和无机氮源的测定 凯氏定氮法。

1.4.6 pH 值测定 酸度计。

1.5 油脂组成分析的主要分析仪器和工作条件

1.5.1 仪器

岛津 RIA 气相色谱仪(山东医学科学院测试中心); SP-3700 型色谱仪(山东医学科学院测试中心); Finnigan Mat212 型磁质谱仪(山东医学科学院测试中心)。

1.5.2 工作条件

色谱:色谱柱 PFG-20M 子石英弹性毛细管柱(柱长 30m,柱直径 0.25mm); 气体温度 280~230℃,3℃/min; 柱前压 0.5kg/cm²; 分流比 1:10。

质谱:准直杆温度 200℃; 分辨率 500℃; 分离器温度 250℃; 加速电压 3kV。

1.6 样品前处理

1.6.1 菌体油脂的提取 参照 Folch 法,索取提取法。

1.6.2 待测样品的酯化 菌体油脂加入 5% KOH-甲醇溶液封管水解→加 14% BF₃→甲醇溶液封管甲酯化→加饱和 NaCl 溶液分层-以石油醚(bp30~60)提取→无水硫酸钠干燥→挥发溶剂→进样测定。

2 结果与讨论

2.1 GLR₅₁₃ 粘红酵母在实验条件下产油脂的优化

2.1.1 pH 值对 GLR₅₁₃ 菌株生长和油脂产量的影响 通过初始 pH 值对菌株生长和油脂产量的影响及发酵过程 pH 的变化一系列试验,结果见表 1。

结果表明:在发酵过程中调节 pH 值,可以大大提

表1 发酵过程调节 pH 的变化对菌株生长和产油脂的影响

组分/ 项目	最初 pH 值	最终 pH 值	油脂含量 (%) (W/W)	菌体生物量 (g/50ml)	脂肪 系数
对照	5.5	2.0	21.2	0.31	8.76
调节 pH 值后	5.5	5.2	37.9	0.52	14.1

注:脂肪系数:100g 葡萄糖转化为油脂的克数。

高菌体的得率和优质的产量。

2.1.2 接种量对 GLR₅₁₃ 菌株生长和油脂形成的影响
接种量分别为 10%、20%、30%，结果见表 2。

表2 不同的接种量对菌株生长和油脂形成的影响

接种量 (%)	菌体生物量 (g/50ml)	油脂 (%) (W/W)	脂肪系数
10	0.620	30.4	13.4
20	0.505	47.9	14.5
30	0.414	40.2	14.2

结果表明,菌体生物量以 10% 接种量为最高,而油脂含量以 20% 的接种量为最高,这是因为 10% 的接种量与 20% 的接种量相比,摇瓶培养基的营养成分较为丰富,有助于菌体细胞的繁殖,但油脂产量低。而 30% 的接种量摇瓶中营养就相对不足,菌体细胞的生长发育提前进入半饥饿状态,影响了油脂的合成。

2.1.3 温度对菌株生长和油脂形成的影响

实验温度分别为 20、25、30、33℃,结果见表 3。

表3 温度对菌株生长和油脂形成的影响

温度 (℃)	菌体生物量 (g/500ml)	油脂含量 (%) (W/W)	脂肪系数
20	0.448	34.1	10.9
25	0.446	37.6	11.9
30	0.463	41.5	13.7
33	0.436	28.0	

实验结果表明,在 30℃ 时,菌体细胞生长良好,其菌体生物量和油脂含量最高,对底物的利用率也达到最佳。

2.1.4 不同的氮源对菌株生长和油脂形成的影响

表 4 结果表明,硫酸铵、硝酸钠、酵母膏和蛋白胨均为较好氮源,对底物的利用率则以硫酸铵为最佳,另外,硫酸铵成本较低,便于大生产。

2.1.5 不同碳源对 GLR₅₁₃ 菌株生长和油脂合成的影响

表 5 结果表明,葡萄糖为最佳碳源,木糖为碳源虽

表4 不同氮源对菌株生长和油脂形成的影响

氮源	菌体生物量 (g/50ml)	油脂含量 (%) (W/W)	脂肪系数
硫酸铵	0.57	38.3	14.6
尿素	0.45	18.4	5.5
氯化铵	0.37	18.4	4.6
硝酸钠	0.51	38.9	13.3
硝酸铵	0.44	10.3	3.0
酵母膏	0.55	39.6	14.5
蛋白胨	0.44	47.7	14.0

注:每种氮源浓度均为 0.15% + 0.05% 酵母膏,若以酵母膏为唯一氮源时,则浓度为 0.15%,表中数值均为三次重复平均值。

表5 不同碳源对 GLR₅₁₃ 菌株生长和油脂合成的影响

碳源	C/N	菌体生物量 (g/50ml)	油脂含量 (%) (W/W)	脂肪系数
葡萄糖	32.5	0.57	38.3	14.6
蔗糖	35.6	0.49	31.4	10.3
麦芽糖	35.5	0.42	33.1	6.4
木糖	33.9	0.23	41.4	6.2
可溶性淀粉	32.5	0.38	25.5	9.7

注:每种碳源浓度均为 3%,表中数据均为三次重复平均值。

然得到的菌体含油脂最高,但其菌体生物量和脂肪系数较低,表明对底物利用率较差。

2.1.6 不同的 C/N 对 GLR₅₁₃ 菌株生长和油脂合成的影响

表6 不同的 C/N 对 GLR₅₁₃ 菌株生长和油脂合成的影响

C/N	菌体生物量 (g/50ml)	油脂含量 (%) (W/W)	残糖 (%) (W/W)	脂肪系数
25	0.664	18.1	0.2	8.5
40	0.502	35.8	0.2	12.9
70	0.363	46.1	1.0	16.7

表 6 结果表明,C/N 比为 70 时,油脂含量,脂肪系数都较高,但培养液中还原水平较高,说明碳源未充分利用。

2.1.7 培养后期补料对 GLR₅₁₃ 菌株生长和油脂合成的影响

培养基 C/N 从 40 提高到 70,油脂含量大大提高,但菌体得率有所下降,而且,生产周期延长了 12h,为了提高生物量,进一步提高油脂总产量,并缩短生长周期,决定借鉴抗生素生产工艺中后期补料的方法,在菌体生长的后期补加碳源,而在生长的后期采用低的 C/

N, 以促进菌体的生长。结果见表 7。

表 7 培养后期补料对 GLR 菌株生长和油脂合成的影响

条件	C/N	菌体生物量 (g/50ml)	油脂含量 (%)(W/W)	残糖(%)(W/W)	脂肪 系数
未补加碳源	65	0.392	56.5	0.2	15.8
补加碳源	35(前) 65(后)	0.535	67.2	0.5	13.0

实验结果表明, 培养后期补加碳源, 菌体生物量和油脂含量均有提高。

综上所述, 初步确定 GLR₅₁₃ 粘红酵母的摇瓶培养最佳产油脂条件为葡萄糖为碳源; 硫酸铵为氮源, C/N 为 70:1, 初始 pH 值为 5.5; 发酵过程调节 pH 的变化, 发酵结束 pH 为 5.2; 温度为 30℃; 通过培养后期补加碳源的方式培养 72h, 最终油脂产量可达菌体干重的 67.2%。

2.2 GLR₅₁₃ 菌体油脂组成成分分析

表 8 GLR₅₁₃ 菌株油脂组成成分分析及含量

RT(min)	脂肪酸组成	脂肪酸含量(%)
2.446	C _{10:0}	14.30
5.104	C _{12:0}	1.32
7.718	C _{14:0}	5.98
9.198	C _{14:0}	3.97
9.836	C _{14:1}	2.20
10.421	C _{15:0}	2.19
11.803	C _{16:0}	34.31
12.707	C _{16:1}	2.77
13.877	C _{17:0}	0.87
14.933	C _{17:1}	2.43
15.791	C _{18:0}	3.80
16.801	C _{18:1}	2.00
18.874	C _{18:2}	10.20
28.391	C _{18:3}	2.60
41.154	C _{20:5}	3.60
	C _{22:6}	7.46

GLR₅₁₃ 菌体的油脂经津岛 RIA 气相色谱仪, SP-3700 型色谱仪和 Flmigan Mat212 型质谱仪联谱分析, 油脂的组成和含量见表 8。

实验结果表明, GLR₅₁₃ 的菌体油脂中不饱和脂肪酸含量可达 56.51%, 其中棕榈油酸 34.31%, 油酸 3.80%, 亚油酸 2.00%, 亚麻酸 10.20%, 二十五碳五烯酸(EPA)2.60%, 二十二碳六烯酸(DHA)3.60%。其中, 亚麻酸、EPA 和 DHA 总量达 16.40%。

参考文献:

- [1] 施安辉, 谷劲松. 一株高产油脂菌种的选育及代谢产物的分析[J]. 中国酿造, 1996, (6): 23-29.
- [2] 殷蔚申. 食品微生物[M]. 北京: 中国财经出版社, 1990. 269-273.
- [3] 胡瑞卿译. 酵母的特征鉴定手册[M]. 青岛海洋大学出版社, 1993.
- [4] 徐天宇. 利用生物技术生产二十二碳四烯酸[J]. 食品与发酵工业, 1995, 11(4): 361-365.
- [5] 赵人俊. 影响被孢霉产生含 α-亚麻油脂的几种因素[J]. 生物工程学报, 1995, 11(4): 361-365.
- [6] D Paparuskevas et al. Msris Biotechnology Letters, 1992, (5): 397-400.
- [7] L M Granger et al. Biotechnology and Bioengineering, 1993, 42: 1151-1156.
- [8] L M Granger et al. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 38: 748-789.
- [9] W S Park et al. Canada Journal of Microbiology, 1990, 36: 319-326.
- [10] C T Evans C Ralledge. Journal of General Microbiology, 1990, 36: 319-326.
- [11] J Sajbior et al. Biotechnology Letters, 1988, 10: 347-350.
- [12] Gturootta, N Kosaric. Biotechnology Letters, 1988, 11: 637-642.
- [13] S C Prapulla et al. Biotechnology and Biotechnology, 1992, 40: 965-970.
- [14] S HYoon et al. Journal og Germentation Technology, 1982, 60: 243-246.

荟萃食品精华 探索科研动态