

基于酶标仪测定的斯氏油脂 酵母发酵产油脂条件优化研究

李 艾, 郝玉翠

(唐山学院 环境与化学工程系, 河北 唐山 063000)

摘要:以斯氏油脂酵母为研究对象,利用苏丹黑 B 染色和全自动酶标仪分光光度法测定细胞内油脂含量。通过监测发酵过程中苏丹黑 B 染色后的 $OD_{\text{最大吸收峰}}$ 值、菌体密度、发酵液还原糖含量的变化,探讨氮源、碳氮比和接种量对斯氏油脂酵母发酵产油脂量的影响。结果表明,发酵产油脂的最佳氮源为硫酸铵,最佳碳氮比为 66 : 1,最佳接种量为 10%。

关键词:斯氏油脂酵母;油脂含量;氮源;碳氮比;接种量

中图分类号:TQ929 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-349X(2021)06-0050-06

DOI:10.16160/j.cnki.tsxyxb.2021.06.009

Research on the Conditions Optimization of Lipid Production Through *Lipomyces Starkeyi* Fermentation by Spectrophotometry with Enzyme-Labeled Instrument

LI Ai, HAO Yu-cui

(Department of Environmental and Chemical Engineering, Tangshan University, Tangshan 063000, China)

Abstract: With *Lipomyces starkeyi* as the research object, the lipid content is determined by staining with the Sudan black B and spectrophotometry with enzyme-labeled instrument. By monitoring the changes of the peak absorption value of OD, density of the bacterial strain, reducing sugar content in the fermentation broth after the Sudan black B staining during the fermentation process, the effects of nitrogen source, carbon-nitrogen ratio and inoculation quantity on the lipid production of *Lipomyces starkeyi* is studied. The results show that the best nitrogen source of fermentation is ammonia sulfate, the best carbon to nitrogen ratio is 66 : 1, and the best inoculation quantity is 10%.

Key Words: *Lipomyces starkeyi*; lipid content; nitrogen source; carbon-nitrogen ratio; inoculation quantity

微生物油脂是指产油微生物在碳源充足而其他营养成分缺乏的条件下,将过量碳源转化成为甘油三酯,并储存于微生物细胞内的一种单细胞油脂^[1]。微生物油脂主要由十六碳和十八碳的饱和及不饱和的长链脂肪酸组成,其

脂肪酸组成与棕榈油、菜籽油、大豆油等植物油相似,是生物柴油的潜在理想替代原料^[2-3]。产油微生物中尤以酵母和霉菌类积累的油脂与常规植物油有更相似的脂肪酸^[4]。

苏丹黑 B 是一种脂溶性的偶氮染料,当产

作者简介:李艾(1981—),女,河北唐山人,讲师,硕士,主要从事微生物发酵研究。

油微生物菌株加入染液后,苏丹黑 B 便离开染液而溶于微生物细胞内的脂质中,此时产油微生物细胞内的油脂着色而呈现出一种蓝黑色。所形成的蓝黑色物在特定波长下吸收峰值的大小与微生物细胞内油脂含量显著相关,利用该关系可检测产油微生物细胞内油脂的质量分数^[5]。

显色物质的传统测定方法为紫外可见分光光度计法,但该方法操作繁琐、测定时间长,对样品均一性、稳定性要求严格;而且经过染色处理后的产油微生物其细胞壁结构遭到破坏,稳定性下降,细胞更易下沉,均一性很差,因此,利用紫外可见分光光度计对其进行测定时效性短,产生的误差较大。而全自动酶标仪使用垂直光路检测,受细胞下沉聚集影响较小,对样品的均一性要求较低。

产油微生物产油率的高低与碳源、氮源、温度、培养基碳氮比、接种量等因素有直接关系。赵人俊等^[6]在研究被孢霉 M14 菌株产油脂的条件时,发现有机氮源有利于细胞增殖,而无机氮源有利于油脂的积累。一些产油微生物在碳源充足而其他营养成分缺乏情况下,特别是在氮源限制下油脂会过量积累,因此,碳氮比是决定油脂含量和生物量的一个关键因素。有研究表明,提高培养基的碳氮比,有利于细胞内油脂含量的增加^[7-8]。在限氮条件下,生物量及油脂含量均随着碳氮比的提高而增大,但油脂含量达到最大值时,随着碳氮比的继续提高,油脂含量却会有所下降^[9]。接种量的大小影响菌株在发酵过程中生长繁殖的速度,接种量较大可缩短菌株繁殖期,使其快速到达稳定期,尽快合成产物,并减少杂菌的污染。但接种量过大会引起溶氧不足,影响产物合成;过小会导致培养时间延长,降低发酵的生产率。

本文以斯氏油脂酵母为研究菌株,基于被苏丹黑 B 染色后其吸光度值与油脂含量的正比关系,利用此吸光度值快速反映油脂含量的方法,优化斯氏油脂酵母发酵过程中的氮源、碳氮比(C/N)和接种量三个发酵条件,探讨三个因素在发酵过程中对斯氏油脂酵母生长及油脂

积累的影响,以便更好地提高此微生物的油脂产率。

1 材料与方法

1.1 菌株

斯氏油脂酵母(*Lipomyces Starkeyi*, CICC 1809),购自中国农业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 主要仪器设备

3H16RI 高速冷冻台式离心机;M2 全自动酶标仪;DMI8 Leica 倒置荧光显微镜;SGD-IV 全自动还原糖测定仪。

1.3 培养条件

YEPD 固体斜面培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母膏 10 g/L,琼脂 20 g/L。

种子培养基:葡萄糖 20 g/L,酵母膏 10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 7 g/L, MgSO_4 1.5 g/L。

限氮发酵培养基:葡萄糖 80 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, MgSO_4 5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L。在此培养基的基础上,对氮源、碳氮比和接种量三个单因素进行优化,以得到斯氏油脂酵母发酵产油脂的最佳条件。

将保藏的菌株接种至 YEPD 固体斜面培养基,28 ℃培养 3~4 d。取适量活化后的菌体接种于种子培养基,28 ℃培养 3~4 d。然后取一定量的种子液按一定的接种量接种于限氮发酵培养基中,28 ℃,120 r/min 摇床培养。

1.4 分析方法

1.4.1 苏丹黑 B 染液的配制

在 100 mL 70%乙醇中加入准确量取的苏丹黑 B 0.6 g,室温下放置 6~7 d,待其充分溶解后过滤,将滤液放入棕色密闭瓶于 4 ℃冰箱中冷藏备用。

1.4.2 斯氏油脂酵母苏丹黑 B 染色后吸收光谱的测定

取 2 支试管,加入 5 mL 发酵液。一支作为实验管加入苏丹黑 B 染液 0.3 mL,另一支作为对照管加入无水乙醇 0.3 mL。将两支试管振荡混匀,沸水浴加热 6 min,待冷却离心弃去上清液后分别用 50%的乙醇洗涤菌泥,再三次

离心后弃去上清液,然后用 70%乙醇溶液混匀菌泥,取 96 孔板,每孔加入 200 μL 菌液,用全自动酶标仪测定其特征吸收峰。

1.4.3 斯氏油脂酵母苏丹黑 B 染色后油脂含量标准曲线的绘制

采用酸热-有机溶剂法测定斯氏油脂酵母细胞内油脂含量^[10]。取发酵 9 d 后的发酵液放入离心管,离心得到湿菌泥,称重后按每克湿菌泥加入 15 mL 盐酸溶液(4 mol/L)的比例加入盐酸,混匀,然后沸水浴中加热 10 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 速冷 30 min。冷却后往离心管内加入等体积的氯仿和甲醇混合液(氯仿和甲醇体积比为 1:2),混匀、离心、取氯仿层,重复上述步骤,合并氯仿层。 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘至恒重,冷却后计算细胞内总油脂量。然后分别取 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL 的上述发酵液,稀释至 6 mL。按上述苏丹黑 B 染色方法对各个梯度的酵母细胞进行染色,绘制吸光度 $\text{OD}_{\text{最大吸收峰}}$ 与对应油脂质量分数之间的相关性曲线。按照上述酸热-有机溶剂法测得的酵母总油脂量,换算出各个梯度下酵母所含油脂量。

1.4.4 发酵液残糖的测定

利用 SGD-IV 全自动还原糖测定仪直接测量^[11]。

2 结果与分析

2.1 斯氏油脂酵母苏丹黑 B 染色前后对比图

用显微镜观察斯氏油脂酵母细胞培养 9 d 时的染色结果,可清楚地观察到斯氏油脂酵母细胞内的脂滴呈明显的蓝黑色(图 1)。

2.2 斯氏油脂酵母苏丹黑 B 染色后特征吸收谱图

绘制斯氏油脂酵母经苏丹黑 B 染色后的特征吸收谱图,如图 2 所示。由图 2 可知,在 600 nm 处有较为明显的吸收峰,因此斯氏油脂酵母细胞内油脂与苏丹黑 B 结合的最大吸收峰为 600 nm。

2.3 斯氏油脂酵母细胞内油脂质量分数标准曲线

按上述方法,建立的斯氏油脂酵母细胞内油脂质量分数标准曲线为 $y = 16.164x - 50.572$

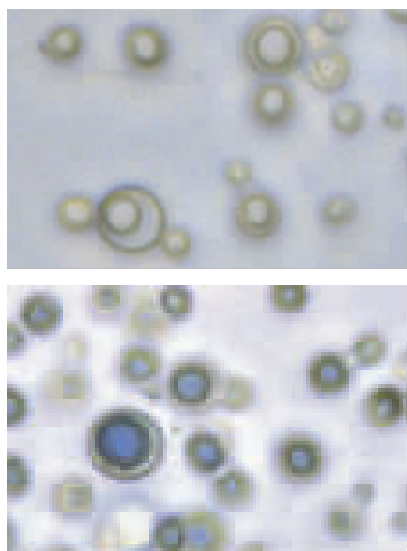


图 1 未染色(上)及培养 9 d 后染色(下)的斯氏油脂酵母细胞

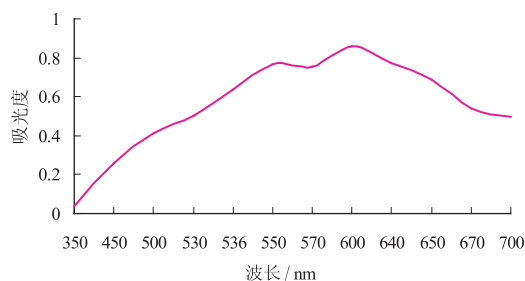


图 2 斯氏油脂酵母经苏丹黑 B 染色后的吸收谱图

($R^2 = 0.9916$),如图 3 所示。结果表明,油脂质量分数和 OD_{600} 值存在良好的线性关系,根据苏丹黑 B 染色后的斯氏油脂酵母细胞的 OD_{600} 值可直接得出斯氏油脂酵母细胞内油脂质量分数(油脂含量)。

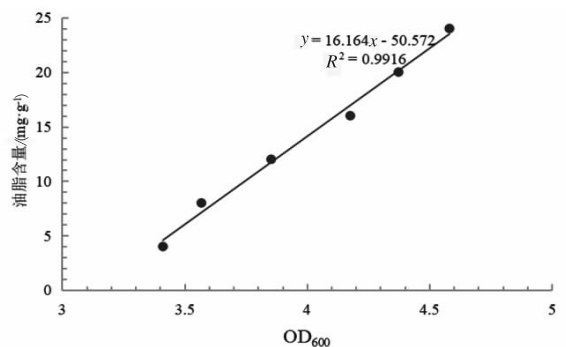


图 3 斯氏油脂酵母细胞内油脂含量与吸光度值的线性关系

2.4 单因素试验

2.4.1 氮源对斯氏油脂酵母积累油脂的影响

按照含氮量大致相等的原则(氮元素含量为 0.582 g/L),分别选择硫酸铵(2.02 g/L)、酵母膏(8.31 g/L)、蛋白胨(4.66 g/L)为氮源,碳氮比为 55 : 1,按 10% 接种量,其他成分均相同,28 ℃,120 r/min 摇床培养。在发酵过程中,定期取样,检测苏丹黑 B 染色后的 OD₆₀₀ 值、菌体密度、发酵液还原糖含量,以实时监测菌株发酵积累油脂的情况,分析不同氮源对其发酵产油脂的影响。测定结果见图 4—6。

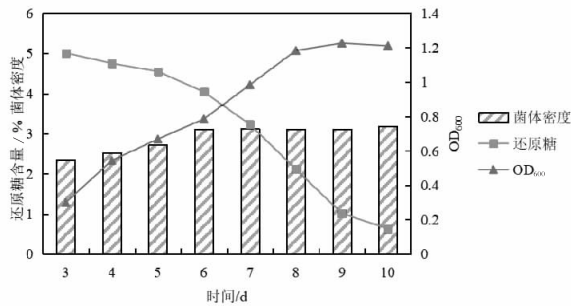


图 4 硫酸铵为氮源时发酵产油脂情况

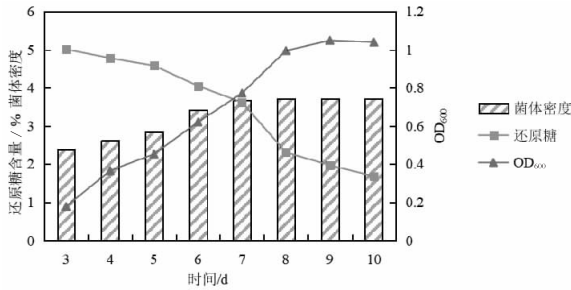


图 5 酵母膏为氮源时发酵产油脂情况

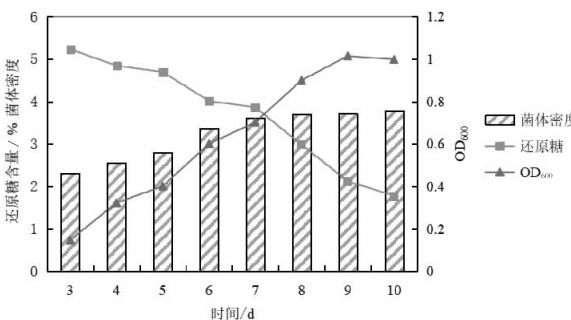


图 6 蛋白胨为氮源时发酵产油脂情况

由图 4 可知,斯氏油脂酵母以硫酸铵为氮源时,还原糖含量从第 7 d 开始迅速下降,但菌

体几乎不再生长,油脂含量在发酵 9 d 时达到最大值。由图 5、图 6 可知,斯氏油脂酵母分别以酵母膏和蛋白胨为氮源时,还原糖含量降低趋势相对平缓,油脂含量增长缓慢,同样在发酵 9 d 时分别达到最大值。

由图 4—6 可知,发酵 9 d,斯氏油脂酵母以硫酸铵为氮源时,油脂含量和还原糖的利用率最高(此时 OD₆₀₀ 为 1.226,还原糖含量为 1.01%;而以酵母膏和蛋白胨为氮源时所对应的指标分别为 1.049,1.014;1.97%,2.12%),适合油脂的积累;而以酵母膏为氮源时,菌体密度最大(3.716,而以硫酸铵和蛋白胨为氮源时所对应的指标分别为 3.116,3.708),适合菌体的生长,但不利于油脂的积累。因此,斯氏油脂酵母发酵产油脂选择硫酸铵作为氮源。

2.4.2 碳氮比对斯氏油脂酵母积累油脂的影响

将活化的斯氏油脂酵母接种于种子培养基中,28 ℃,120 r/min 摇床培养 48 h,按 10% 接种量接种于不同碳氮比(分别为 55 : 1,66 : 1,77 : 1)的以硫酸铵(含量分别为 0.2%,0.168%,0.144%)为氮源的限氮发酵培养基中。在发酵过程中,每 24 h 取上述三种发酵液分别测定苏丹黑 B 染色后的 OD₆₀₀ 值、菌体密度和发酵液还原糖含量,以考察不同碳氮比对菌株发酵产油脂的影响。测定结果见图 7—9。

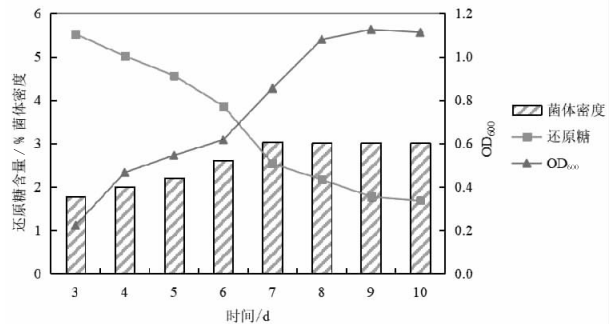


图 7 C/N 为 55 : 1 时发酵产油脂情况

由图 7—9 可知,C/N 分别为 55 : 1,66 : 1 的发酵液在发酵初期菌体密度增加迅速,而对于 C/N 为 77 : 1 的发酵液在发酵初期菌体密度增加缓慢。低 C/N 有利于斯氏油脂酵母菌体的生长;而 C/N 过高、氮含量过少则会减缓菌体的生长。由图 7 可知,C/N 为 55 : 1 时,还

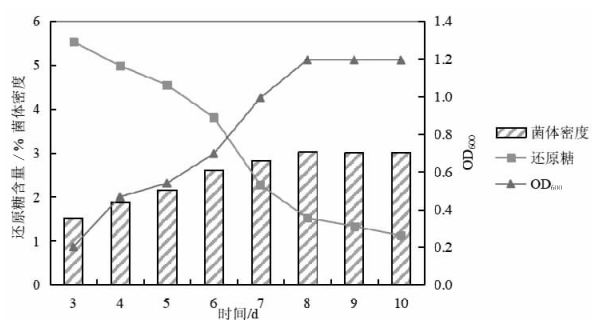


图 8 C/N 为 66 : 1 时发酵产油脂情况

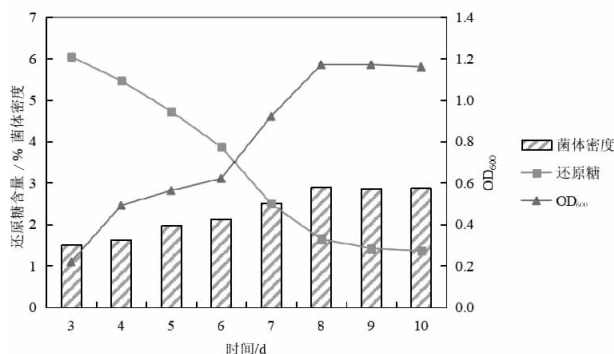


图 9 C/N 为 77 : 1 时发酵产油脂情况

原糖含量从第 7 d 开始下降缓慢,此时菌体密度达到最大值,油脂含量则在第 9 d 时达到最大值。由图 8、图 9 可知 C/N 为 66 : 1 和 77 : 1 时,还原糖含量均从第 8 d 开始下降趋势变缓,此时菌体密度达到最大,油脂含量则都在第 9 d 时达到最大值。

由图 7—9 可知,发酵 9 d, C/N 为 66 : 1 时,油脂含量和还原糖的利用率最高(此时 OD_{600} 为 1.194,还原糖含量为 1.33%;而 C/N 为 55 : 1 和 77 : 1 时所对应的指标分别为 1.126, 1.171; 1.78%, 1.42%),适合油脂的积累;C/N 为 55 : 1 时,菌体密度最大(3.023, 而 C/N 比为 66 : 1 和 77 : 1 时所对应的指标分别为 3.002, 2.867),适合菌体的生长,但不利于油脂的积累;C/N 为 77 : 1 时,由于菌体密度过低,导致油脂含量降低。因此,斯氏油脂酵母发酵产油脂选择最适 C/N 为 66 : 1。

2.4.3 接种量对斯氏油脂酵母积累油脂的影响

将活化的斯氏油脂酵母接种于种子培养基中, 28 °C, 120 r/min 摇床培养 48 h, 按发酵液体积的 5%, 10%, 15% 接种于碳氮比为 66 : 1 的

以硫酸铵为氮源的限氮发酵培养基中。在发酵过程中, 每 24 h 取上述不同接种量的发酵液分别测定苏丹黑 B 染色后的 OD_{600} 值、菌体密度和发酵液还原糖含量, 以考察不同接种量对菌株发酵产油脂的影响。测定结果见图 10—12。

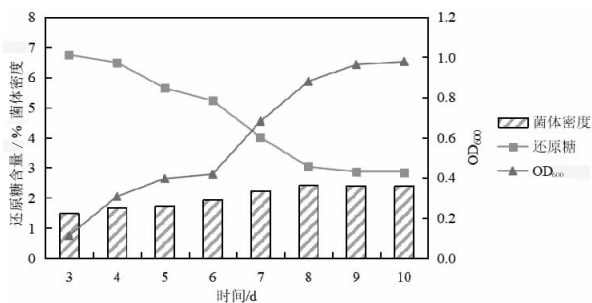


图 10 接种量为 5% 时发酵产油脂情况

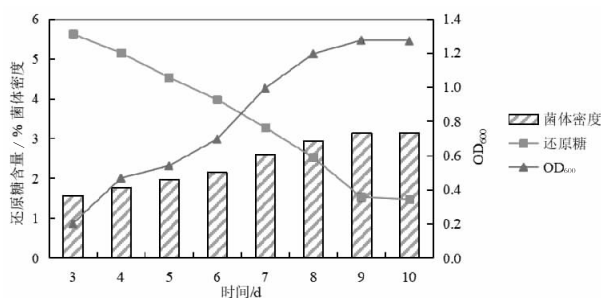


图 11 接种量为 10% 时发酵产油脂情况

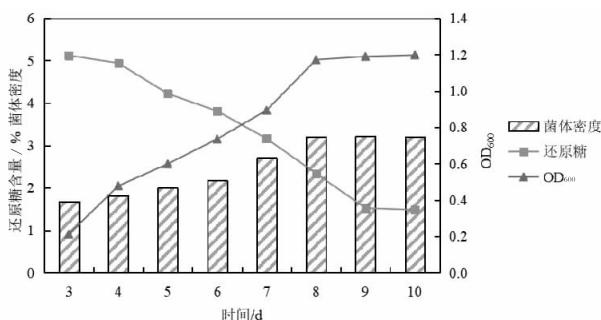


图 12 接种量为 15% 时发酵产油脂情况

由图 10—12 可知, 接种量分别为 10%, 15% 的发酵液在发酵初期菌体密度增加迅速, 分别第 8 d 和第 9 d 时达到最大值; 而接种量为 5% 的发酵液在发酵初期菌体密度增加缓慢, 在第 9 d 达到最大值。

由 10—12 可知, 当接种量为 5% 时, 发酵液中还原糖含量最高(为 2.87%; 而接种量为 10% 和 15% 时所对应的指标分别为 1.53%,

1.52%),菌体密度及油脂含量很低(菌体密度为2.412,OD₆₀₀为1.194),说明发酵液中的菌体细胞数目太少时,营养成分不能被其充分利用,因此导致还原糖含量较高,而菌体密度及油脂含量却都较低。当接种量为10%时,菌体密度(3.140)与油脂含量最大(OD₆₀₀为1.274)。当接种量为15%时其菌体密度(3.214)与10%接种量相差不多,但油脂含量(OD₆₀₀为1.189)比10%要低,可能是发酵液中的溶氧相对不足影响了油脂的合成。因此,选择10%作为最适接种量。

3 结论

通过建立斯氏油脂酵母发酵产油脂含量和OD_{最大吸收峰}的变化曲线可实时监测菌株发酵积累油脂情况。因此,本实验通过监测苏丹黑B染色后的OD₆₀₀值、菌体密度和发酵液中还原糖含量对斯氏油脂酵母发酵产油脂条件进行优化,得到其最佳发酵产油脂的条件:氮源为硫酸铵,碳氮比为66:1,接种量为10%。

通过监测斯氏油脂酵母发酵过程,发现发酵初期以酵母膏为氮源有利于菌体繁殖,菌体生物量多,因此综合考虑,如果要提高油脂产量可在发酵初期添加酵母膏,待菌株数量达到稳定时再添加硫酸铵,以便积累油脂。

在实验过程中发现,虽然斯氏油脂酵母经苏丹黑B染色后的吸光度值与油脂含量之间线性关系显著,但是针对不同批次的菌株建立的标准曲线其线性方程会有一定的差别。因此,在发酵过程中如果需要测定油脂的绝对含量,需要每批菌体都绘制标准曲线。

参考文献:

[1] RATLEDGE C, WYNN J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorgan-

isms[J]. Adv. Appl. Microbiol, 2002, 51: 1-51.

[2] 冯冲,康静,简在荣,等. 新能源微生物柴油的研究进展[J]. 中国油脂, 2011, 37(5): 76-81.

[3] 沈宏伟,杨晓兵,龚志伟,等. 基于消耗碳氮比进行底物分配和油脂得率预测[J]. 化工学报, 2016, 67(1): 324-330.

[4] 赵宗保,胡翠敏. 能源微生物油脂技术进展[J]. 生物工程学报, 2011, 27(3): 427-435.

[5] 李艾. 斯氏油脂酵母细胞内油脂含量的快速检测方法研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(11): 79-82.

[6] 赵人俊,严虹,郑幼霞. 影响被孢霉产生含 γ -亚麻酸油脂的几种因素[J]. 生物工程学报, 1995, 11(4): 361-365.

[7] ANGERBAUER C, SIEBENHOFER M, MITTELBACH M, et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production [J]. Bioresour Technology, 2008, 99(8): 3051-3056.

[8] 沈宏伟,靳国杰,胡翠敏,等. 恒化培养稀释率和碳氮比对圆红冬孢酵母油脂积累的影响[J]. 生物工程学报, 2012, 28(1): 56-64.

[9] SATTUR A P, KARANTH N G. Production of microbial lipids: III. influence of C/N ratio-experimental observations [J]. Biotechnology Bioengineering, 1989, 34(6): 872-874.

[10] 宋安东,冯冲,王凤芹,等. 生物油脂高产菌株筛选方法研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 383-388.

[11] 于鲁浩,马耀宏,杨俊慧,等. 马铃薯块茎中淀粉含量的快速测定方法[J]. 食品科技, 2012, 37(3): 279-283.

(责任编辑:李秀荣)