

弯曲隐球酵母 N-11 合成微生物油脂的代谢调控研究

于泽权, 孟莉, 张慧敏, 姚日生, 马晓静

(合肥工业大学 生物与医学工程学院, 合肥 230009)

摘要: 通过摇瓶发酵实验考察不同调控方式对弯曲隐球酵母 N-11 菌体生长和积累油脂的影响。主要从改变培养基组成中的小分子限制性因素(氮、磷、硫)、调控脂质合成关键酶(苹果酸酶)的酶活性以及采取不同发酵模式(分批培养与补料培养)研究影响微生物积累油脂的因素并对其进行优化。结果表明:当碳氮比为 180.2:1、碳磷比为 61:1、碳硫比为 2 413.4:1 时,酵母菌油脂产量及含油率达到最高,分别为 5 g/L、68.30%, 5 g/L、65.99% 及 5.53 g/L、67.11%;培养基中苹果酸酶抑制剂——芝麻酚的添加可以显著降低酵母积累油脂的能力;补料培养不仅可以显著提高油脂产量(由 4.25 g/L 增加至 9.17 g/L),含油率也从 65.28% 增加至 74.92%。

关键词: 弯曲隐球酵母;微生物油脂;代谢调控;苹果酸酶;补料发酵

中图分类号:Q81;Q939.97

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)05-0100-04

Metabolic regulation of microbial oil production of *Cryptococcus curvatus* N-11

YU Zequan, MENG Li, ZHANG Huimin, YAO Risheng, MA Xiaojing

(School of Biological and Medical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: The effects of different regulation methods on the growth and oil accumulation of *Cryptococcus curvatus* N-11 were investigated by shake flask fermentation experiment. The small molecular limiting factors (nitrogen, phosphorus and sulfur) in the medium composition were changed, and the enzyme activity of the key enzyme (malic enzyme) were regulated, and different fermentation modes (batch culture and fed culture) were adopted to study the factors that affected the accumulation of microbial oil and optimize these factors. The results showed that under the conditions of C/N 180.2:1, C/P 61:1 and C/S 2 413.4:1, the oil production and oil content in the yeast cells reached the highest, which were 5 g/L and 68.30%, 5 g/L and 65.99% and 5.53 g/L and 67.11% respectively. The addition of sesamol, a malic enzyme inhibitor, in the culture medium could significantly reduce the ability of yeast to accumulate oil. Fed culture could not only significantly improve the oil production from 4.25 g/L to 9.17 g/L, but also increase the oil content from 65.28% to 74.92%.

Key words: *Cryptococcus curvatus*; microbial oil; metabolic regulation; malic enzyme; fed fermentation

目前,人们主要通过菌种筛选、基因工程改造^[1]等手段获得微生物油脂高产菌株,通过代谢通路调控^[2-5]提高微生物油脂的产量。在代谢通路调控方面,Papanikolaou等^[6]考察刺孢小克银汉霉

Cunninghamella echinulata 和深黄被孢霉 *Mortierella isabellina* 在多种营养元素限制培养基中油脂积累情况时发现,培养基中碳氮比(C/N)从 83.5:1 增加到 133.5:1 时,*C. echinulata* 和 *M. isabellina* 的含油率分别从 36% 和 50% 提高到 47% 和 56%。

苹果酸酶^[7-8](ME)是胞内启动脂肪酸合成的关键酶之一,苹果酸酶活性的有无以及活性高低都与细胞内脂质积累的程度密切相关。柏大林^[9]在研究产油微生物时发现芝麻酚可以通过抑制依赖型苹果酸酶达到调控油脂产生的目的。此外,赖婧等^[10]采用摇瓶分批补料发酵方式研究了长孢被孢

收稿日期:2017-10-31;修回日期:2018-02-12

基金项目:国家自然科学基金青年基金(31400049);中央高校基本科研业务费专项资金(JZ2014HGBZ0035)

作者简介:于泽权(1994),男,硕士研究生,研究方向为微生物次级代谢产物的应用(E-mail)zequanyu@163.com。

通信作者:马晓静,副教授(E-mail)maxj@hfut.edu.cn。

霉(*Mortierella elongate*)的发酵产油过程,通过考察起始补料时间及补料基质对长孢被孢霉合成微生物油脂的影响,得出补料可以大幅度提高油脂产量的结论。弯曲隐球酵母(*Cryptococcus curvatus*)是工业和学术界广泛关注的微生物油脂高产菌株,调控隐球酵母脂肪酸的生物合成,具有广阔的工业化应用前景^[11]。

本文考察了不同代谢调控方式对实验室筛选所得产油弯曲隐球酵母 N-11 (*Cryptococcus curvatus* N-11)合成微生物油脂的影响。研究主要从调控培养基组成(碳氮比、碳磷比、碳硫比)、调控苹果酸酶活性(添加酶抑制剂——芝麻酚)和改变发酵培养模式(分批培养和补料培养)3个方面探讨调控方式对 *C. curvatus* 积累油脂的影响,并进行优化,以期为进一步提高该菌株产油脂能力奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与试剂

实验菌株 *Cryptococcus curvatus* N-11 现保存于本实验室,分离自江苏某奶牛养殖场粪便储备池周围土壤。分子生物学鉴定,为弯曲隐球酵母属(*Cryptococcus curvatus*)菌株。芝麻酚标准品,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.1.2 仪器与设备

LDZM-60KCS 立式压力蒸汽灭菌器, Centrifuge 5417R、5804R 冷冻离心机(德国 Eppendorf), SBA-40C 生物传感器, QP-MS 2010 气质联用仪(日本 Shimadzu), 台式离心机(日本三洋), C-3018R 型高速冷冻离心机。

1.1.3 培养基

种子培养基:葡萄糖 2.0%, 蛋白胨 1.0%, 酵母粉 1.0%。

基础发酵培养基:葡萄糖 6.0%, 无机盐溶液 1.0%, 酵母粉 0.075%, pH 自然。 $n(C):n(N) = 180.2:1$, $n(C):n(P) = 61:1$, $n(C):n(S) = 653.6:1$ 。

限氮发酵培养基 1:葡萄糖 6.0%, 无机盐溶液 1.0%, 酵母粉 1.0%, 蛋白胨 1.0%, pH 自然, $n(C):n(N) = 10.9:1$;限氮发酵培养基 2:葡萄糖 3.0%, 无机盐溶液 1.0%, 酵母粉 0.075%, pH 自然, $n(C):n(N) = 90.1:1$;限氮发酵培养基 3:葡萄糖 6.0%, 无机盐溶液 1.0%, 酵母粉 0.02%, pH 自然, $n(C):n(N) = 313.2:1$;限氮发酵培养基 4:葡萄糖 12.0%, 无机盐溶液 1.0%, 酵母粉 0.02%, pH 自然, $n(C):n(N) = 626:1$;其他限制发酵培养基:分别在基础发酵培养基的配方上改变相应无机

盐溶液添加量获得,其余组分不变。

酶抑制剂发酵培养基:葡萄糖 6.0%, 无机盐溶液 1.0%, 酵母粉 0.075%, 芝麻酚母液(分别添加 87、130、175、218 μL);酶抑制剂发酵培养基(乙醇对照):葡萄糖 6.0%, 无机盐溶液 1.0%, 酵母粉 0.075%, 加入 218 μL 70% 的乙醇溶液。

补料发酵培养基(对照 1):葡萄糖 6.0%, 无机盐溶液 1.0%, 酵母粉 0.075%, pH 自然, $n(C):n(N) = 180.2:1$;补料发酵培养基(对照 2):葡萄糖 6.0%, 无机盐溶液 1.0%, 酵母粉 0.02%, pH 自然, $n(C):n(N) = 313.2:1$ 。

无机盐溶液:磷酸二氢钾 2.0 g, 磷酸氢二钠 8.0 g, 七水硫酸镁 3.0 g, 二水氯化钙 0.2 g, 六水氯化铁 0.02 g, 七水硫酸锌 0.02 g。

芝麻酚母液:称量 0.8 g 芝麻酚,用 70% 的乙醇溶液溶解,定容到 100 mL 的容量瓶中,备用。

葡萄糖母液:称取 5 g 葡萄糖,溶解于 100 mL 蒸馏水中,备用。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

1.2.1.1 种子培养

将超纯水配制的种子培养基置于高压灭菌锅中,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min,灭菌完成后,转移至超净台,静置冷却。按照 2% 的菌种接种量转接,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下,摇床恒温振荡培养 20 h。

1.2.1.2 发酵培养

将活化好的菌种以 8% 的接种量接种于 50 mL 发酵培养基中,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下,摇床振荡培养 72 h。

1.2.1.3 补料发酵培养

将活化好的菌种以 10% 的接种量接种于 50 mL 发酵培养基中,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下,摇床振荡培养 120 h。

1.2.2 检测方法

1.2.2.1 生物量测定

采用干重法测定生物量^[12]。

1.2.2.2 葡萄糖残余量的测定

使用 SBA-40C 生物传感器测定发酵液中残余葡萄糖的含量。

1.2.2.3 油脂产量与含油率的测定

使用酸热-有机溶剂法提取油脂:每 3 g 干菌体中加入 4.0 mol/L HCl 溶液 10.0 mL,旋涡混合 1 min,每 0.5 h 1 次,共混合 5 次。沸水浴 60 min,中间混合 1 次,冰水浴 30 min。将混合液转入分液漏斗,按每 3 g 干菌体 5 mL 的比例加入无水乙醇,

随后按每 3 g 干菌体 15 mL 的比例用乙醚洗试管,合并入分液漏斗,振荡约 1 min,再按每 3 g 干菌体 15 mL 的比例加入石油醚,振荡放气,待分层澄清后将上层液体转移至干净的离心管,放入 50℃ 烘箱,蒸干有机溶剂后即得微生物油脂^[13-14],换算后即得油脂产量。

$$\text{含油率} = \text{油脂产量} / \text{生物量} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 不同 C/N 对微生物生长和积累油脂的影响 (见图 1)

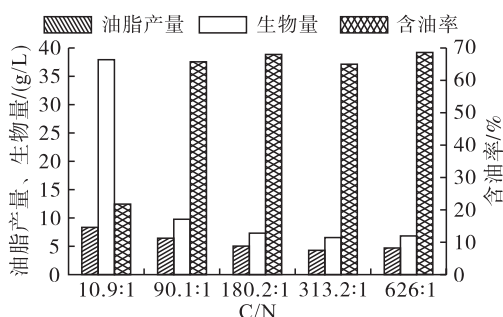


图 1 不同 C/N 对 *C. curvatus* 生长和积累油脂的影响

在 C/P 和 C/S 一致的情况下,由图 1 可以看出,当 C/N 为 10.9:1 时, *C. curvatus* 的生物量 (38.02 g/L) 和油脂产量 (8.30 g/L) 均达到最高,但是由于充足的氮源不利于酵母体内油脂的积累,因此酵母菌体含油率最低,仅为 21.84%;随着 C/N 的增大,含油率随之上升,当 C/N 为 626:1 时含油率达到最高,为 68.88%,说明当碳源充足而氮源匮乏时,酵母转化碳源为油脂的能力最强。综上所述, C/N 是影响含油率的重要因素,一定范围内, C/N 越高,越有利于菌体内的油脂合成,但 C/N 过高或过低均不能达到大量收获微生物油脂的目的,当 C/N 为 180.2:1 时,油脂产量和含油率均较高,因此选择 180.2:1 为最优 C/N,此时生物量、油脂产量和含油率分别达到 7.32 g/L、5 g/L 和 68.30%。

2.2 不同 C/P 对微生物生长和积累油脂的影响 (见图 2)

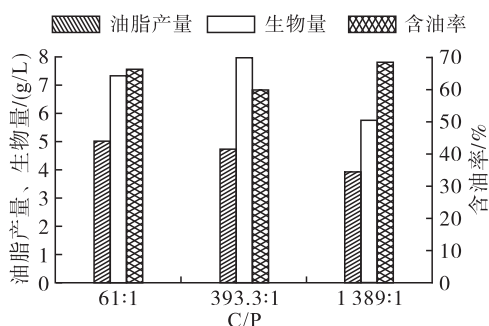


图 2 不同 C/P 对 *C. curvatus* 生长和积累油脂的影响

在 C/N 和 C/S 一致的情况下,由图 2 可知,当

C/P 由 393.3:1 增大到 1389.1:1 时,生物量由 7.94 g/L 降到 5.73 g/L,下降了 27.83%,油脂产量从 4.71 g/L 降到 3.9 g/L,下降了 17.2%,含油率由 59.37% 升至 68.05%,上升了 14.62%。因此, C/P 过高或过低,都不利于微生物的生长,但是 C/P 越低,越有利于油脂的积累。综合考虑,选择 61:1 为最优 C/P。

2.3 不同 C/S 对微生物生长和积累油脂的影响 (见图 3)

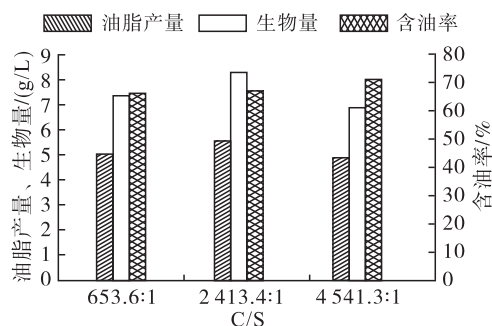


图 3 不同 C/S 对 *C. curvatus* 生长和积累油脂的影响

在 C/N 和 C/P 一致的情况下,从图 3 可以看出,当 C/S 逐渐增大时,含油率逐步升高,由 65.99% 增加至 71.04%,增幅为 7.65%,说明硫限制利于 *C. curvatus* 细胞在胞内积累油脂。但 *C. curvatus* 的生物量却呈现明显的先升后降的趋势, *C. curvatus* 的生物量和油脂产量在 C/S 为 2413.4:1 时达到最高,分别为 8.24 g/L 和 5.53 g/L。原因可能为硫元素为细胞生长和代谢所必需,太低的硫含量通过抑制酵母菌体的生长降低微生物油脂的产量。因此,增大 C/S 有利于微生物积累胞内油脂,但工业生产中还要综合考虑微生物油脂的产量及产率。综合考虑,选择 2413.4:1 为最优 C/S。

2.4 芝麻酚对微生物生长和积累油脂的影响 (见表 1)

表 1 芝麻酚对 *C. curvatus* 生长和积累油脂的影响

芝麻酚浓度/ (mmol/L)	生物量/ (g/L)	油脂产量/ (g/L)	含油率/%
空白对照	5.46	3.60	65.93
乙醇对照	5.20	2.20	42.31
1.0	3.90	1.30	33.33
1.5	3.73	0.99	26.54
2.0	3.30	0.73	22.12
2.5	2.93	0.53	18.09

从表 1 可以看出,培养基中芝麻酚的加入显著影响菌体的生长代谢,菌体生物量、油脂产量、含油率均大幅下降。当芝麻酚浓度为 2.5 mmol/L 时,相比空白对照组,生物量由 5.46 g/L 降至 2.93 g/L,下

降了46.33%,油脂产量由3.6 g/L降至0.53 g/L,下降了85.28%,含油率也由65.93%降至18.09%,下降了72.56%。而乙醇对照组的结果显示,乙醇会抑制菌体的生长和油脂的积累,但影响并没有芝麻酚那么显著,从而进一步证明芝麻酚组油脂产量大幅度下降的原因是芝麻酚对弯曲隐球酵母中的苹果酸酶有很强的抑制作用,而且可以看出随着芝麻酚浓度逐渐增大,对菌体生物量、油脂产量、含油率的影响逐渐增大。因此,初步得出芝麻酚主要通过抑制脂肪酸合成代谢中的关键酶——苹果酸酶的酶活力抑制 *C. curvatus* 在胞内积累油脂。

2.5 不同发酵模式对微生物生长和积累油脂的影响

补料发酵是生产中用以提高微生物产生并积累次级代谢产物的有效途径,初步考察了补料发酵对 *C. curvatus* 生长和积累胞内油脂的影响,结果如表2所示。

表2 补料发酵对 *C. curvatus* 生长和积累油脂的影响

培养基	生物量/(g/L)	油脂产量/(g/L)	含油率/%
对照1	7.32	4.83	65.98
补料1	11.28	8.21	72.78
对照2	6.51	4.25	65.28
补料2	12.24	9.17	74.92

补料培养基与对照组初始葡萄糖含量是一致的,在葡萄糖残余量小于5 g/L时,添加5 mL葡萄糖母液。从表2可以看出,经过补料之后,菌体的生物量、油脂产量和含油率都有了大幅上升。对于两种不同限氮培养基 C/N 180.2:1 和 C/N 313.2:1,补料后菌体生物量分别从7.32 g/L和6.51 g/L增加至11.28 g/L和12.24 g/L,油脂产量也分别从4.83 g/L和4.25 g/L增加到8.21 g/L和9.17 g/L,分别提高了70.0%和115.8%,含油率也分别从65.98%和65.28%增加到72.78%和74.92%,分别提高了10.3%和14.8%。补料发酵模式是提高 *C. curvatus* 油脂产量以及含油率的有效途径。

3 结论

产油微生物 *C. curvatus* N-11 发酵培养基中的小分子限制性因素(氮、磷、硫)的含量、微生物脂质合成关键酶的酶活力以及不同发酵模式均会显著影响 *C. curvatus* 生长和积累油脂。总的来说,培养基中 C/N 越高,越有利于 *C. curvatus* 在菌体内合成和积累油脂;当磷元素为限制因素时,不同 C/P 对菌

体的生长以及积累油脂也有影响;而 C/S 越大,含油率越高,越有利于积累油脂,但高硫限制同时也会抑制菌体生长;芝麻酚抑制和降低 *C. curvatus* 的生长和积累油脂的能力,随着芝麻酚浓度的增加,菌体生物量、油脂产量和含油率均大幅下降;补料发酵可以显著提高 *C. curvatus* 的油脂产量和含油率,具有产业化的应用价值。综合油脂产量和含油率,选择 C/N 为 180.2:1, C/P 为 61:1, C/S 为 2 413.4:1。

参考文献:

- [1] 王冬梅. 酵母菌发酵啤酒生产废水产微生物油脂和菌体蛋白的研究[J]. 中国油脂, 2017, 42(4):108-112.
- [2] KOUTINAS A A, CHATZIFRAGKOU A, KOPSAHELIS N, et al. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production[J]. Fuel, 2014, 116(1):566-577.
- [3] 李丽, 吴雪辉, 倪天瑞, 等. 脂肪酸对基因表达的调控作用[J]. 中国油脂, 2010, 35(8):24-27.
- [4] 谢同舟. 营养胁迫调控粘性丝孢酵母生产油脂的研究[D]. 辽宁大连:大连工业大学, 2016.
- [5] 王雅南. 不同营养元素限制对圆红冬胞酵母油脂生产的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(11):16-22.
- [6] PAPANIKOLAOU S, CHEVALOT M, GALIOTOU-PANAYOTOU M, et al. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica* [J]. Electron J Biotechnol, 2007, 10(3):425-435.
- [7] 史娟, 李方方, 马宏. 不同中间砧对苹果果实苹果酸代谢关键酶活性及其相关基因表达的影响[J]. 园艺学报, 2016, 43(1):132-140.
- [8] WYNN J P, BIN A H A, RATLEDGE C. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi[J]. Microbiology, 1999, 145(8):1911.
- [9] 柏大林. 浑浊红球菌脂质合成底物的代谢调控机理[D]. 江苏无锡:江南大学, 2014.
- [10] 赖婧, 张波, 姚日生. 长袍被孢霉利用淀粉质原料发酵产微生物油脂[J]. 生物加工过程, 2014(4):16-19.
- [11] 陶永佳. 海洋产油酵母菌筛选及油脂提取条件优化[J]. 中国油脂, 2017, 42(4):12-15.
- [12] 王光远. 海洋季也蒙毕赤酵母菌油脂合成调控的研究[D]. 山东青岛:中国海洋大学, 2014.
- [13] 康静, 冯冲. 产油微生物油脂提取技术研究进程[J]. 中国医药指南, 2015(4):51-53.
- [14] 张艳平. 酵母菌油脂含量测定方法的比较研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(11):83-87.