

原生质体紫外诱变选育可利用廉价碳源的高产油新菌株

胡艳丽^{1,2} 钟添华^{1*} 产竹华¹ 刘润忠² 骆祝华¹ 叶德赞¹

(1. 国家海洋局第三海洋研究所 福建 厦门 361005)

(2. 厦门大学 生命科学学院 福建 厦门 361005)

摘要:【目的】研究并建立利用原生质体紫外诱变技术选育可利用廉价碳源发酵的高产油新菌株的方法。【方法】采用 1.5% 蜗牛酶和 1.0% 纤维素酶混合液水解去除细胞壁得到 2A00015 (近平滑假丝酵母, *Candida parapsilosis*) 的原生质体, 将其放于紫外灯下诱变及再生壁培养, 筛选获得可利用廉价碳源发酵的高产油酵母, 并采用气相色谱质谱联用法(GC-MS)测定其脂肪酸组成。【结果】突变效果最好的突变菌株 2A00015/25 用葡萄糖发酵培养 7 d 后, 其生物量、油脂产率和产油量分别为 17.77 g/L、58.12% 和 10.32 g/L, 较原始菌株分别提高了 12.45%、23.32% 和 38.68%; 利用废糖蜜发酵培养, 其生物量、油脂产率和产油量分别为 18.54 g/L、49.44% 和 9.17 g/L, 较原始菌株分别提高了 9.09%、21.16% 和 32.18%。利用废糖蜜培养其产油效率虽低于利用葡萄糖培养, 但从环境保护及原材料成本的角度考虑, 用废糖蜜作为碳源发酵培养产生油脂更具优势。诱变菌株利用废糖蜜发酵后产生油脂经检测含有 8 种脂肪酸, 其脂肪酸组成与植物油近似, 其中不饱和脂肪酸含量占脂肪酸总量的 82.4%。【结论】通过利用原生质体紫外诱变技术, 成功选育出一株新的可利用廉价碳源的高产油海洋菌株, 产油率达到 49.4%, 提高了 21.2%。

关键词: 海洋菌株, 原生质体, 紫外诱变, 廉价碳源, 废糖蜜

Breeding high-yield oil-producing strain to use cheap carbon source by UV induced protoplast mutagenesis

HU Yan-Li^{1,2} ZHONG Tian-Hua^{1*} CHAN Zhu-Hua¹ LIU Run-Zhong² LUO Zhu-Hua¹
YE De-Zan¹

(1. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, Fujian 361005, China)

(2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: [Objective] We used UV induced protoplast mutagenesis to study breed a new high-yielding lipid-producing strain which could use cheap carbon source. [Methods] Get the 1.5% glusulase and 1.0% cellulose solution. Hydrolyze to remove the cell wall and obtain the protoplast of 2A00015 (*Candida parapsilosis*). Put it under the ultraviolet lamp for mutagenesis and cultivate regenerated wall. Then screen to get the high oil generated yeast which could be fermented by low-cost

基金项目: 深海(微)生物资源勘探与资源潜力评价项目(No. DY125-15-R-01)

*通讯作者: Tel: 86-592-2195679; 信箱: zth23-1980@163.com

收稿日期: 2013-03-18; 接受日期: 2013-05-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

carbon source. Determine its fat acid components by gas chromatography with mass spectrometric (GC-MS). **[Results]** Cultivated the mutant strain with best mutation 2A00015/25 in the glucose. We found that the biomass, oil yield rate and oil production are separately 17.77 g/L, 58.12% and 10.32 g/L, which are separately 12.45%, 23.32% and 38.68% higher than the original strain. We have also cultivated the mutant strain in the waste molasses and found the biomass, oil yield rate and oil production are separately 18.54 g/L, 49.44% and 9.17 g/L, which are separately 9.09%, 21.16% and 32.18% higher than the original strain. The oil yield rate is lower in the waste molasses cultivation than that in glucose cultivation. However, in consideration of environment protection and cost of raw materials, the waste molasses is of much more advantages. It is tested that the fat generated from the waste molasses fermentation consists of eight kinds of fat acid. Its fat acid components are similar to the vegetable oil, in which the content of unsaturated fatty acid comprised 82.4% of the total fatty acid. **[Conclusion]** Basing on UV induced protoplast mutagenesis, we have successfully bred a new high-yielding oil strain which can make use of the low-cost carbon source, with its oil production rate 49.4% which has increased by 21.2%.

Keywords: Marine strain, Protoplast, UV mutagenesis, Cheap carbon source, Waste molasses

微生物油脂(Microbial oils)又称单细胞油脂(Single cell oil, SCO),是由酵母、霉菌、细菌和藻类等微生物在一定条件下,利用碳水化合物、碳水化合物或普通油脂为碳源,在菌体内产生的大量油脂^[1]。微生物油脂除主要含有甘油三酯外,与一般植物油脂相比,还含有大量其它脂质成分^[2]。

早期对微生物油脂研究和开发主要集中在利用微生物生产高附加值的特殊用途功能性油脂方面。近年来,由于能源问题日益突出,同时原料成本较高,经济可行性差等因素制约着动植物油脂生产生物柴油等传统工艺的发展,使得利用资源丰富且具有高产油脂潜力的微生物生产油脂的新型工艺成为开发油脂资源的一个新方向^[3]。目前,研究较多的主要是酵母、霉菌和微藻^[4]。但是,筛选并获得高产优良菌株仍是国内油脂工业大规模工业化生产的最大限制性因素之一。

制约微生物油脂产业化生产的关键因素是原料成本问题,选用环境适应能力强、生长周期短、产油量高的菌株以及廉价的有机碳源是解决微生物油脂生产可持续发展的根本。因此,在筛选获得高产油菌株基础上进行菌株诱变、优化发酵工艺,以及降低发酵底物成本是解决微生物油脂生产可持续发展的两个重要途径。邢大辉等^[5]在研究深黄被孢霉利用不同碳源产油脂能力时得出,菌株能够

利用葡萄糖、木糖、阿拉伯糖和甘露糖进行生长和油脂积累,菌株以6%糖浓度的玉米皮渣水解液为底物发酵培养,油脂微生物生物量达18.2 g/L,干菌体油脂含量45.7%,单位体积发酵液油脂产量为8.3 g/L。希腊学者 Fakas S.等^[6]利用木糖培养 *Cunninghamella echinulata*,产油率为57.7%,产油量为6.7 g/L,其中GLA含量为1119 mg/L。Pnaikolaou S.等^[7]利用 *Yarrowia lipolytica* 以废弃动物油脂作为碳源合成油脂,油脂含量达50%–70%,其中棕榈酸占15%–20%,油酸占7%–20%,亚油酸占2%–7%。

实验室在海洋产油菌株筛选的前期工作中,筛选获得一株可利用廉价有机碳源废糖蜜生产微生物油脂的近平滑假丝酵母2A00015,本研究通过去其细胞壁提取原生质体,然后用紫外灯照射使其诱变,最后在再生培养基上培养使其产生细胞壁这样的处理过程,进一步提高油脂产量,并从中筛选出一株油脂产量较高的菌株,并用气相色谱质谱联用法(GC-MS)测定了其菌体油脂的脂肪酸组成及含量,为该菌株的进一步开发、利用提供了依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 酵母2A00015由中国大洋协会环境项目DY115-19航次采集分离获得,经鉴定为近平

滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*), 由国家海洋局第三海洋研究所海洋遗传重点实验室叶德赞实验室分离、保藏。

1.1.2 主要试剂: 蜗牛酶、纤维素酶, 日本 Solarbio 公司; PC: 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.2; 高渗溶液 PCS: PC+15%蔗糖; 酶液: 1.5%蜗牛酶+1.0%纤维素酶混合+0.8 mol/L KCl (PC 配制), 过滤除菌(0.22 μm 的过滤除菌膜过滤); 原生质体保存液: PCS+0.01 mol/L CaCl₂ (质膜稳定剂); 预处理液: 50 mmol/L EDTA (乙二胺四乙酸)。

1.1.3 主要仪器: 荧光显微镜(型号: Nikon Eclipse 50i), Nikon 公司; 多功能酶标仪(型号: SpectraMax M5), Molecular Devices 公司; 微型台式高速离心机(型号: MINI-SPIN), Eppendorf 公司; 高速冷冻离心机(型号: J2-MI), Beckman 公司; 高压灭菌器, 美国 ZEALWAY 公司; 培养摇床, 江苏太仓医疗仪器厂; 电热恒温培养箱, 江苏太仓医疗仪器厂; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 超净工作台, 上海淀山湖净化设备厂; 气相色谱-质谱联用仪(型号: QP2010), 日本岛津公司; DB-5MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 安捷伦科技有限公司。

1.1.4 培养基: PYG 培养基^[8]; 种子培养基^[8]; 基础产脂培养基^[8]; 再生培养基: 基本培养基+15%蔗糖(渗透稳定剂); 均 103 kPa 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化与扩大培养: 冷藏菌种需活化 1-2 代, 方法为接入 YEPD 斜面, 28 °C 培养 48 h, 然后转接入种子摇瓶中, 28 °C、150 r/min 振荡培养 40 h; 取上述培养物 10 mL 接入新鲜的 YEPD 液体(100 mL/500 mL 装量)培养基中, 同上培养, 使细胞同步生长, 培养 16 h, 细胞数约为(1.0-3.0)×10⁷ 个/mL, 终止培养, 用于制备原生质体。

1.2.2 原生质体的制备和再生: 将菌液倒入离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, PC 液洗两次, 收集菌体。收集的菌体中加入预处理剂, 用吸管混合均匀, 置于 30 °C 恒温处理 30 min, 3 000 r/min 离心

5 min, 弃上清, 无菌水洗涤 2 次。按 1:30 (菌体干重 g:酶液总体积 mL)的比例加入酶液酶解, 用吸管混合均匀, 放入 30 °C 摇床以 110 r/min 的速度振荡, 每隔 15 min 用吸管吹吸几次, 使形成的原生质体从菌丝上脱落下来, 每隔 30 min 取样镜检酶解程度, 约处理 1-2 h 即可停止酶解处理(即停止 30 °C 水浴振荡), 3 000 r/min 离心 5 min, 弃酶液, 收集原生质体及未酶解细胞, 用高渗溶液 PCS 洗涤, 用 4 层擦镜纸过滤于无菌含有原生质体保存液离心管中(以滤去未被酶解的菌丝片段), 冷冻保存。原生质体高渗溶液梯度稀释, 然后接到低渗和再生培养基平板(双层平板法接种), 于 28 °C 倒置遮光培养, 约 3-5 d 可见再生菌落。

1.2.3 原生质体紫外诱变过程: 将制备好的原生质体用高渗溶液稀释至 5×10³ 个/mL, 取 20 个已灭菌的 5 cm 培养皿, 每皿分别装有新制备的原生质体悬液 5 mL, 每 3 个平皿为一组, 共分为 7 组。照射前先打开紫外线光管(15 W)预热 20 min, 使光波稳定^[9]。诱变过程应在黑暗条件下进行, 照明采用红色灯泡预热完成后, 对每组平皿于距紫外灯 30 cm 处分别照射 0、1、2、3、4、5、6 min, 然后每皿取 0.1 mL 适当稀释后涂布于再生培养基上用黑布包裹后置于黑暗闭光的 28 °C 恒温箱培养 4-5 d 待平板长出菌落后, 对每个平皿菌落计数。每组以 3 个平皿菌落数的平均值作为该组的菌落数, 并计算其致死率^[10]。

致死率(%)=

$$\frac{0 \text{ min时原生质体再生率} - T \text{ min时原生质体再生率}}{0 \text{ min时原生质体再生率}} \times 100$$

1.2.4 原生质体诱变株的初筛: 以原生质体半致死率时的照射剂量诱变原生质体, 将诱变后的原生质体稀释后涂布平板, 优先选取生长速度快、直径最大、生长最旺盛的菌落, 接入斜面, 准备进行下面的精筛。

将上面所选出的诱变株分别发酵培养, 取其菌悬液, 将菌悬液光密度值控制在 1.20 以内, 尼罗

红浓度为 0.5 mg/L, 染色时间 5 min, 用酶标仪测量其在激发波长 488 nm、发射波长 570 nm 处的相对荧光强度^[8]。

1.2.5 原生质体诱变株的精筛^[11-12]: 将初筛选出的诱变株分别发酵培养, 将培养好的菌体于 3 000 r/min 离心 15 min, 去除上清液, 得到湿菌体, 称湿重。于 80 °C 恒温烘箱烘干至恒重, 称其干重, 以(干菌体) g/L 发酵液表示菌体生物量。准确称取适量菌体, 加入适宜浓度盐酸混合均匀浸泡 1 h, 而后沸水浴处理 5 min, -20 °C 快速冷却, 加入 10 mL 氯仿: 甲醇(1:1, 体积比), 充分振荡, 3 000 r/min 离心 15 min, 取氯仿层, 加入 10 mL 质量分数为 0.1% 的氯化钠溶液, 混匀, 3 000 r/min 离心 15 min, 用已知重量试管收集氯仿层, 挥发掉氯仿层, 称重, 得油脂产量和油脂产率。

产油率计算公式:

$$\text{产油率}(\%) = \frac{\text{油脂重量}(\text{g})}{\text{菌体重量}(\text{g})} \times 100。$$

计算每个诱变株的菌粉得率、油脂产量及油脂产率, 综合以上三项数据, 从初筛过的诱变株中选出一株综合性状最好的诱变株, 进行遗传稳定性试验。

1.2.6 遗传稳定性实验: 选取诱变后得到的油脂得率及脂肪含量较高的变异菌株连续传代 5 次, 每代分别进行摇瓶发酵培养, 测定其油脂得率及脂肪含量, 含量稳定的则其遗传性能稳定。

1.2.7 油脂的甲酯化及脂肪酸甲酯的鉴定^[13-14]:

(1) 油脂的甲酯化: 取油脂 100 mg, 加 0.6 mol/L KOH-甲醇溶液 2 mL 和正己烷 2 mL 后, 剧烈振荡 2 min, 在 30 °C 放置 15 min, 加水 5 mL, 静置分层, 取己烷层分析脂肪酸。(2) 气相色谱-质谱联用(GC-MS)色谱条件: 色谱柱(DBP5-MS), 毛细管石英柱(50 m×0.25 mm, 0.25 μm); 载气: He; 进样口温度: 280 °C; 界面温度: 250 °C; 柱子程序升温: 120 °C 停 2 min, 升温速率 20 °C/min 升至 250 °C, 保持 15 min; 分流比: 5:1; 柱流量: 1 mL/min; 扫描质量范围: 33-400 amu; 检测电压: 1.36 kV。(3) 定性分析: 通过 GC-MS solution 工作站, 检索

NIST05 和 NIST05s 图谱库, 结合相关文献进行人工图谱解析, 确定样品中的各种化合物; 定量分析: 通过 GC-MS solution 工作站, 采用面积归一化法进行定量分析, 确定各化合物的相对含量。

2 结果与讨论

2.1 2A00015 原生质体紫外诱变效应曲线及诱变剂量的选择

将制备好的原生质体悬液稀释至 5×10^3 个/mL, 用紫外线对原生质体分别进行不同时间的照射处理, 处理物经过黑暗闭光的 28 °C 恒温箱培养 3-4 d 后, 对平皿内的菌落数进行计算, 以照射时间为横坐标, 以再生菌落数的致死率为纵坐标, 画出原生质体紫外诱变剂量效应曲线, 如图 1 所示。由图 1 可以看出, 原生质体经紫外线照射后, 再生菌落数开始减少, 致死率明显提高。从致死率与诱变剂量的关系中可以看出, 随着诱变剂量的增加, 致死率也增加, 但并不呈现明显的正比关系。在 0-2 min 照射时间内, 曲线的变化比较缓慢; 2-4 min 以后, 曲线急剧上升, 表明致死率变化显著, 达到 80% 以上; 在 4-6 min 之间, 致死率在 80%-90% 左右浮动不大, 在 6 min 死亡率达到近 100%。有研究表明, 较低的诱变剂量容易出现正突变, 一般采用致死率为 80% 左右^[15] 作为较合适的诱变剂量。因此, 最合适的诱变剂量为距离 15 W 紫外灯 30 cm 处照射 4 min, 此时致死率为 82%。

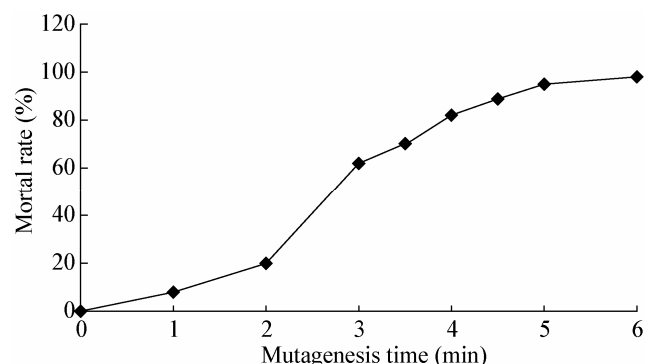


图 1 紫外照射不同时间对酵母 2A00015 原生质体致死率的影响

Figure 1 Effect of UV irradiation time on the death rate of the 2A00015 protoplast

2.2 2A00015 诱变株的初筛

实验中以 4 min 作为照射剂量诱变 2A00015 原生质体, 连续诱变 10 批, 每批稀释后涂 3 个平皿。等原生质体在平皿上再生出菌落后, 进行初筛。经过初筛后, 最终从 30 个平皿中选出 30 株诱变株。

尼罗红能够与脂类物质结合发出很强荧光, 能够有效的将细胞内脂类物质与其他贮藏物区分开来, 因此经常被用于检测动物以及微生物细胞内油脂情况。尼罗红染色荧光定量检测胞内油脂含量由 Greenspan 等^[16]第一次提出, 其准确性已在多种生物中被证明过, 可替代传统称重法; 本文利用尼罗红与油脂成分结合后在紫外光照射下发出荧光特性作为其油脂含量的指标。根据菌体的生物量、相对荧光值两项数据(图 2), 从 30 株诱变株中选出 5

株综合性状相对较优异的突变株, 分别为 3、5、13、5 和 28 号。

2.3 2A00015 诱变株的精筛

将突变菌株和原始菌株一起连续进行 3 批摇瓶发酵试验, 在相同接种量的情况下, 分别检测其生物量、生产油脂量及产油率, 结果如表 1 所示, 从表 1 结果可以看出, 诱变菌株 25 号, 其生物量、生产油脂量及产油率都明显高于其他 4 种突变菌株和原始菌株, 用葡萄糖作为碳源发酵时, 其生物量、生产油脂量和产油率分别提高 12.5%、38.7% 和 23.3%; 用糖蜜作为碳源发酵时, 其生物量、生产油脂量和产油率分别提高 9.1%、32.1% 和 21.2%。因此, 诱变菌株在发酵性状方面比原始菌株有了显著提高, 25 号突变菌株为综合性状最优异的突变株, 命名为 2A00015/25。

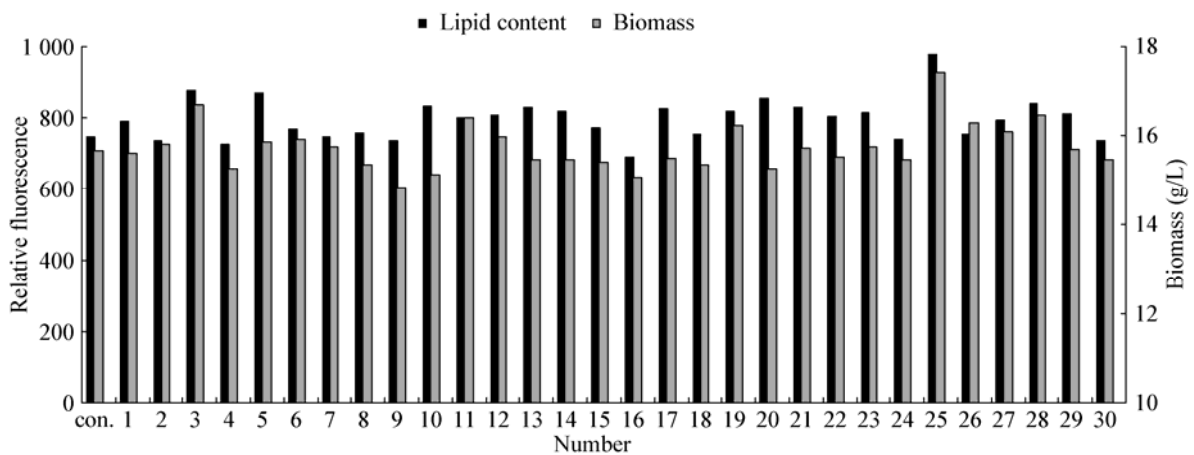


图 2 酵母 2A00015 诱变菌株生长及产油情况

Figure 2 The lipid content and biomass of yeast 2A00015 mutagenic strain

表 1 酵母 2A00015 诱变菌株经发酵培养结果

Table 1 Result of yeast 2A00015 mutagenic strains by fermentation culture

Strain No.	Glucose (70 g/L)			Molasses (70 g/L)		
	Biomass (g/L)	Lipid yield (g/L)	Lipid content (%)	Biomass (g/L)	Lipid yield (g/L)	Lipid content (%)
3	16.393±0.160	8.236±0.120	50.250±0.110	17.563±0.210	6.852±0.120	39.010±0.200
5	15.997±0.210	9.481±0.080	59.264±0.130	18.122±0.150	7.097±0.150	39.166±0.120
13	15.662±0.180	9.116±0.130	58.203±0.210	18.613±0.190	7.863±0.150	42.248±0.140
25	17.762±0.130	10.323±0.090	58.121±0.150	18.539±0.150	9.168±0.180	49.444±0.110
28	16.862±0.090	9.767±0.110	57.925±0.090	17.206±0.180	7.699±0.160	44.748±0.140
2A00015	15.795±0.260	7.444±0.120	47.130±0.180	16.996±0.140	6.936±0.170	40.810±0.130

注: 表中数据为 3 次平行试验的算术平均值±标准差。

Note: The data in the table is the three parallel tests' $\bar{x} \pm s$.

2.4 遗传稳定性实验结果

鉴于诱变菌株的性状常常不稳定,尤其是在连续继代培养时。为了检测所得到的 2A00015/25 诱变菌株是否具有稳定的遗传学性状,实验中将该诱变株在 PYG 斜面上连续转种 5 代,每代均进行摇瓶发酵培养,然后分别检测其生物量、生产油脂量及产油率其遗传稳定性。结果显示,诱变株连续 5 代摇瓶培养的结果中,无论生物量或是生产油脂量,各批次均较稳定,没有大的偏差。

表 2 的遗传稳定性实验结果表明,此菌株具有较稳定的遗传特性。在几次传代中,酵母的生物量都在 18.7 g/L 左右波动,油脂量都达到 9.0 g/L 以上,表明酵母 2A00015/25 诱变菌株产脂稳定性较好。

表 2 酵母 2A00015/25 诱变菌株的遗传稳定性实验结果($n=3$)

Table 2 Genetic stability test of yeast 2A00015/25 mutagenic strains ($n=3$)

The number of generations	Biomass (g/L)	Lipid yield (g/L)
1	18.508 5±0.150 0	9.146 4±0.100 0
2	18.762 0±0.130 0	9.165 0±0.080 0
3	18.676 5±0.090 0	9.082 0±0.120 0
4	18.702 6±0.120 0	9.237 0±0.070 0
5	18.801 2±0.110 0	9.171 0±0.120 0

注:表中数据为 3 次平行试验的算术平均值±标准差。

Note: The data in the table is the three parallel tests' $\bar{x}\pm s$.

2.5 2A00015/25 诱变菌株形态学特征

- (1) 细胞形态:呈圆形;椭圆形;
- (2) 细胞大小:(4-5) $\mu\text{m}\times(5-7)$ μm ;
- (3) 菌体内部:含非常清楚的脂质体,呈透明状,内部包含油脂,易被尼罗红染色(图 3);
- (4) 菌落:白色,呈奶酪状,光滑。

2.6 油脂的提取

2A00015/25 诱变菌株经酸热法^[11]提取的油脂呈黄棕色,透明度较低,流动性也好(图 4)。

2.7 油脂脂肪酸组成

2A00015/25 菌体油脂经甲酯化后,采用 GC-MS 测定其脂肪酸组成,2A00015/25 菌体油脂脂肪酸甲酯的总离子流图(图 5),显示各种脂肪酸甲酯都得到了较好的分离。表 3 列出了 2A00015/25 菌体油脂的脂肪酸组成及相对含量。

由表 3 及图 5 可知,突变菌体油脂中共检测出 8 种脂肪酸,占整个峰面积的 97.38%,脂肪酸组成主要是 C17 和 C19 系列脂肪酸,其中,棕榈酸、油酸和亚油酸占整个脂肪酸含量的 81.86%。突变菌株在发酵过程中既产饱和脂肪酸,也产不饱和脂肪酸,其中不饱和脂肪酸占其脂肪酸总量的 82.4%,表明突变菌株脂肪酸的不饱和程度较高,具有较强的流动性。组成脂肪酸中,油酸、棕榈酸的含量

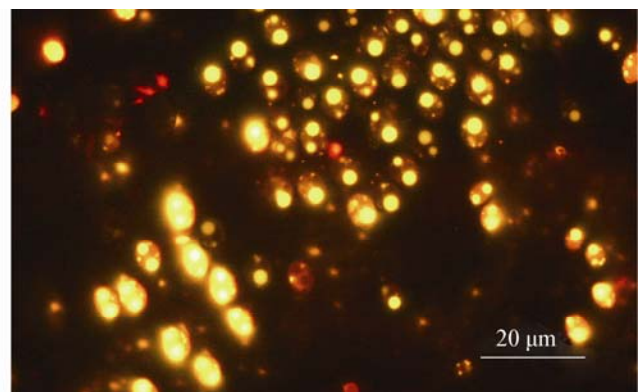
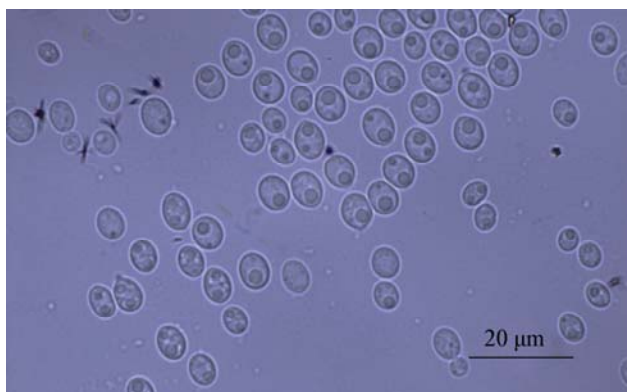


图 3 荧光显微镜下酵母 2A00015 诱变菌株细胞

Figure 3 Yeast 2A00015 mutagenic strain cell under the fluorescence microscope

注: A: 普通光源下不同酵母细胞; B: 蓝光下相对应酵母细胞(波长 420-490 nm, 1 000 \times).

Note: A: Ordinary light; B: Blue light (wavelength 420-490 nm, 1 000 \times).

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>



图 4 酸热法提取的油脂
Figure 4 The lipid is extracted by acid-heating method

分别达到 63.83%和 12.52%，其他依次为 8-十七碳烯酸 5.52%、亚油酸 5.51%、硬脂酸 4.61%、7-棕榈烯酸 2.19%、十七烷酸 1.87%、7-油酸 1.33%，这与大多数真菌油脂的脂肪酸组成一致。

在以往的相关报道中，也有一些产油微生物的脂肪酸组成比较特殊，如网粘菌门(Labyrinthomyces)菌株菌体内的 DHA 占其脂肪酸总量的 43%^[17]；高山被孢霉(Mortierella alpina)菌体内的 ARA 含量可达其脂肪酸总量的 70%^[18]；但脂肪酸组成中油酸含量超过脂肪酸总量 60%及以上的报道尚少，高比例的油酸含量(63.83%)，显示了其高效的油酸生产潜能，使其可作为功能性油脂微生物被开发利用^[19]。

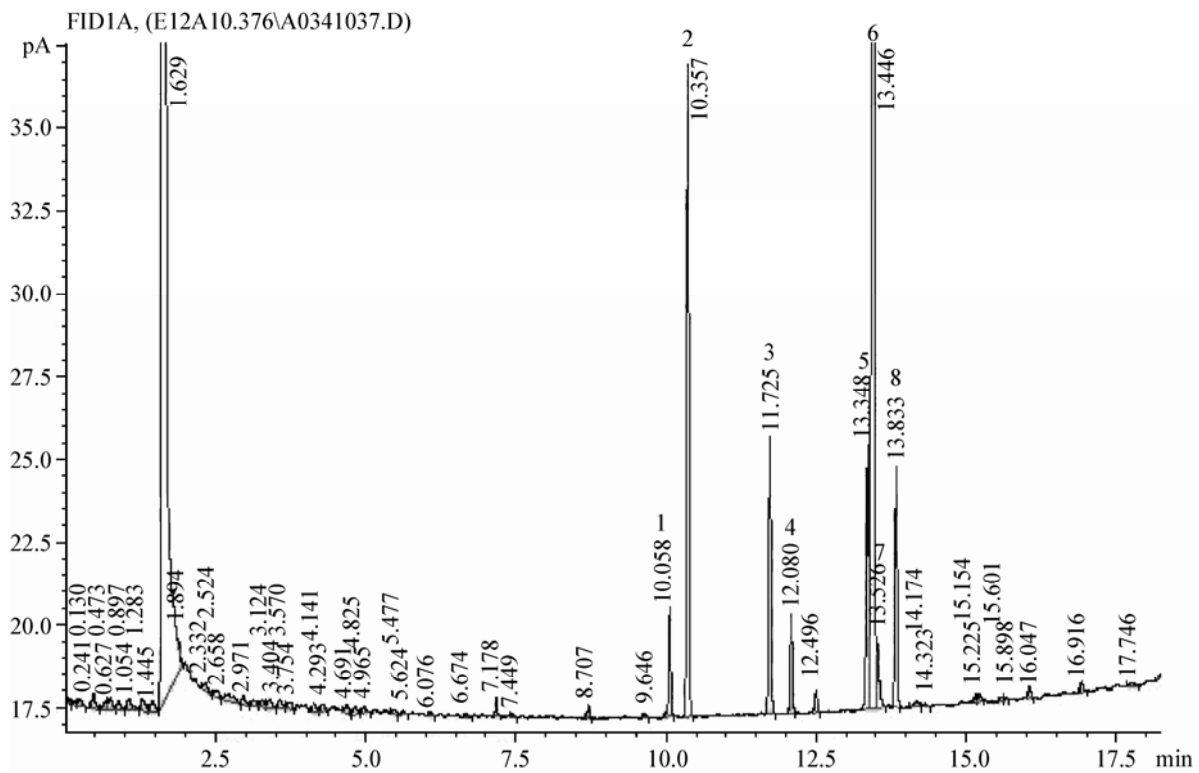


图 5 总离子流图
Figure 5 Total ion chromatogram

表3 生物柴油成分
Table 3 The composition of biodiesel

Peak number	FAME	Molecular formula	Mr	Relative amount (%)
1	7-棕榈烯酸甲酯	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268.45	2.19
2	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.45	12.52
3	8-十七碳烯酸甲酯	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	282.00	5.52
4	十七烷酸甲酯	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	284.48	1.87
5	亚油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294.47	5.51
6	油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296.49	63.83
7	7-油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296.49	1.33
8	硬脂酸甲酯	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298.50	4.61
9	其他未知			2.62

3 讨论

与菌丝体相比,原生质体由于没有细胞壁的保护使得紫外线更容易进入细胞,因而更易受环境条件的影响而发生性状突变。不同微生物的细胞壁结构与成分不尽相同,其主要包括纤维素、几丁质和葡聚糖等多种成分。因此在微生物制备原生质体时往往使用多种不同的酶,且使用混合酶的效果通常比单一酶好。本实验使用的酶解条件为:1.5%蜗牛酶+1.0%纤维素酶混合酶系统;同时,适当预处理可在一定程度上破坏酵母菌细胞壁外层大分子高级结构,改善通透能力,促进细胞壁水解酶向内壁层扩散,提高原生质体制备效率,并缩短酶作用时间,降低酶液对形成的原生质体损伤,保持高活性,提高再生率和融合率。另外,原生质体的制备和再生过程本身也是一个自然选择和产生遗传变异的过程,有可能达到提高代谢产物产量的目的。因此原生质体诱变技术是一种简便而可行的菌种选育方法,已在其它菌种选育中得到了广泛的应用^[20-22]。

实验采用紫外诱变原生质体及再生细胞壁的双重技术,通过菌种形态和尼罗红染色后测荧光值进行初筛及提取细胞内油脂进行复筛检测获得了高产油菌株 2A00015/25。通过尼罗红与油脂结合发出荧光,用酶标仪检测其荧光值,根据荧光值大

小,可快速有效的比较诱变菌株产油量的高低,并且操作方便。酸热法破碎细胞后提取油脂作为复筛的检测方法,在检测 2A00015/25 油脂含量时,更能科学地反映菌株的产油量和遗传性状的稳定性。

文中以废糖蜜为发酵底物,不仅因为其可为酵母 2A00015/25 产油脂提供碳源,最重要的是可大大降低生产成本,并起到废物综合利用及保护环境的作用。由于葡萄糖的制备工艺复杂,工序繁琐,造成其成本价值较高,市场价格一般在 3 000 元/t 左右。然而,糖蜜原料丰富,甘蔗糖蜜产地主要分布在福建、广东、广西等省份;甜菜糖蜜原产地以华北、东北、西北地区为主;在我国,年产甘蔗 4 900 万 t,年产甜菜 1 300 余万 t,其中以甘蔗、甜菜作为原料制糖后得到的糖蜜每年达到 130 万 t 以上;市场上按照糖蜜品质的不同价格一般在 600-1 000 元/t,其中糖含量在 40%左右。同时,也为废糖蜜的综合利用开辟了一条新的途径,对蔗糖糖业的发展及环境可持续发展意义重大。

海洋产油菌株受其本身的遗传特性、所处生态环境多样性等多方面因素的影响,致使其产油能力、底物适应性和所产脂肪酸种类各不相同。国内外学者对产油微生物及其产脂性能进行了大量研究。毛晓妍等^[23]对高山被孢霉的产油性能进行了研究,在以葡萄糖为碳源发酵 7 d,提取获得生物量 30.65 g/L,其中油脂量 17.142 g/L,相比本研究

中 2A00015/25 以糖蜜为碳源发酵培养的油脂量略高, 显示了其较高产油能力, 但考虑到以葡萄糖为碳源发酵导致的高成本, 本研究更具优势。李建政等^[24]对红酵母(*Rhodotorula glutinis*)以制糖厂废糖蜜为原料进行发酵, 获得其细胞干重和油脂量分别为 2.42 g/L 和 0.8 g/L, 而本文中 2A00015/25 利用糖蜜发酵培养的细胞量和油脂量(分别为 18.54 g/L 和 9.17 g/L)比其有显著提高; 表明 2A00015/25 在利用糖蜜这种廉价碳源为底物发酵产油方面具有较高的产油能力。Papanikolaou S.等^[7]利用 *Yarrowia lipolytica* 以废弃动物油脂作为碳源合成油脂, 油脂含量达 50%–70%, 其中棕榈酸占 15%–20%, 油酸占 7%–20%, 亚油酸占 2%–7%; 加拿大学者 Sandra D.等^[25]报道了 *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* 在最佳条件下得到油脂含量占总生物量的 54.2%, 其中不饱和脂肪酸 84.3%。以上学者的研究展示了不同来源产油菌株所产脂肪酸类型的多样性, 其中不饱和脂肪酸含量较多是不同来源产油菌株的共性。本文中, 2A00015/25 利用糖蜜发酵产物也体现了以上共性, 其油脂含量达到 17.142 g/L, 其中油酸占 63.83%、棕榈酸占 12.52%、亚油酸占 5.51%、硬脂酸占 4.61%, 不饱和脂肪酸占其脂肪酸总量的 82.4%。因此, 筛选获得产高附加值脂肪酸(DHA、EPA 等)的产油菌株, 通过菌种改良和发酵调控增加产量, 以适合工业化生产是本研究的重要方向。

油酸是一种重要的精细化工原料, 它广泛应用于多个生产领域, 其中工业级油酸(纯度低于 70%, 可用于塑料、洗涤、选矿、油漆等行业; 纯度高于 80%, 可用于食品、医药、化妆品等行业)的市场需求比较稳定, 随着生物及制药技术的发展, 高纯度油酸的生理、药理作用受到关注, 市场需求量大幅增长, 高纯度油酸备受青睐。本实验中 2A00015/25 菌株生产的油脂经甲酯化后, 采用 GC-MS 测定脂肪酸组成发现油酸含量丰富, 占总油脂含量的 63.83%。由于油酸是不饱和脂肪酸, 容易氧化变质、酸败等导致转化率低, 所以目前还未用于工业化生产, 如何提高转化效率及纯度, 使其适用于工业化生产, 可以成为未来的一个研究方向。

参考文献

- [1] Aggelis G, Komaitis M, Papanikolaou S, et al. A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. I: Lipid accumulation during growth of *Mucor circinelloides* CBS 172-27 on a vegetable oil[J]. *Grasas y Aceites*, 1995, 46(3): 169-173.
- [2] 墨玉欣, 刘宏娟, 张建安, 等. 微生物发酵制备油脂的研究[J]. *可再生能源*, 2007(6): 24-28.
- [3] 赵宗保. 加快微生物油脂研究为生物柴油产业提供廉价原料[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(2): 8-11.
- [4] Mata T, Martins A, Caetano N, et al. Microalgae processing for biodiesel production[A]// Luque R, Melero JA, eds. *Advances in biodiesel production: processes and technologies*[M]. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., 2012: 204-231.
- [5] 邢大辉, 潘安龙, 薛冬桦, 等. 深黄被孢霉利用不同碳源产油脂比较[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(2): 189-193.
- [6] Fakas S, Papanikolaou S, Batsos A, et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2009, 33(4): 573-580.
- [7] Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, et al. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(3): 308-312.
- [8] 林义, 钟添华, 骆祝华, 等. 尼罗红染色法筛选产油酵母及定量检测胞内油脂含量的研究[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(1): 125-137.
- [9] 吴学倩, 汪芳安. 红曲霉菌的原生质体紫外诱变与融合选育及 MonacolinK 检测[J]. *食品与发酵科技*, 2011, 47(6): 44-49.
- [10] 张蓓. 鸟苷产生的原生质体诱变育种及其发酵条件的研究[J]. *天津微生物*, 1994(1): 32-35.
- [11] 孙晓璐, 孙玉梅, 曹芳, 等. 对产油脂酵母的细胞破碎方法及油脂提取效果的比较[J]. *河南工业大学学报: 自然科学版*, 2007, 28(4): 67-69.
- [12] 李植峰, 张玲, 沈晓京, 等. 四种真菌油脂提取方法的比较研究[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(6): 72-75.
- [13] Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids[J]. *MIDI*, 1990: 101.
- [14] 王莉, 孙玉梅, 曲威, 等. 发酵条件对发酵性丝孢酵母脂肪酸组成的影响[J]. *中国酿造*, 2006, 10: 20-22.
- [15] 周群英, 高延耀. *环境工程微生物学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [16] Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1985, 100(3): 965-973.
- [17] Rios SD, Castaneda J, Torras C, et al. Lipid extraction

- methods from microalgal biomass harvested by two different paths: Screening studies toward biodiesel production[J]. *Bioresour Technology*, 2013, 133: 378-388.
- [18] 徐振杰, 杨洲平, 黄乾明. 禾本红酵母 M124 产脂能力及其油脂脂肪酸组成分析[J]. *中国油脂*, 2011, 36(6): 42-44.
- [19] 刘真, 卢义和, 宫素芝, 等. 我国油酸的生产现状及展望[J]. *河北化工*, 2006, 29(9): 18-20.
- [20] Sasvari Z, Kovalev N, Nagy PD. The GEF1 proton-chloride exchanger affects tombusvirus replication via regulation of copper metabolism in yeast[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(3): 1800-1810.
- [21] Zhang S, Haider I, Kohlen W, et al. Function of the HD-Zip I gene *Oshox22* in ABA-mediated drought and salt tolerances in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80(6): 571-585.
- [22] Oakley CE, Edgerton-Morgan H, Oakley BR. Tools for manipulation of secondary metabolism pathways: rapid promoter replacements and gene deletions in *Aspergillus nidulans*[A]//Keller NP, Turner G, eds. *Fungal Secondary Metabolism*[M]. New York: Humana Press, 2012: 143-161.
- [23] 毛晓妍, 陈涛, 田华, 等. 高山被孢霉产花生四烯酸的代谢研究[J]. *中国油脂*, 2011, 36(10): 42-44.
- [24] 李建政, 王茜, 班巧英. *Rhodotorula glutinis* 发酵糖蜜产油脂影响因素研究[J]. *科技导报*, 2010, 28(20): 77-81.
- [25] Dyal SD, Bouzidi L, Narine S. Maximizing the production of γ -linolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation[J]. *Food Research International*, 2005, 38(7): 815-829.

(上接 p.880)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖沓模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达.....

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予以提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>