

含乙酸玉米芯水解液中四株油脂酵母联产多糖与油脂的研究

熊莲^{1,2}, 黄超², 李小妹², 陈雪芳², 陈新德², 曾新安¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 中国科学院广州能源研究所, 广东广州 510640)

摘要: 为了研究木质纤维素水解液中高浓度乙酸的存在对油脂酵母发酵的影响, 本研究以 4 株油脂酵母 (皮状丝孢酵母、浅白隐球酵母、*Trichosporon dermatis* 与 *Trichosporon coremiiforme*) 为研究对象, 在玉米芯水解液中添加高浓度乙酸 (15 g/L) 作为发酵底物, 研究发酵的底物代谢与产物积累规律。结果表明: 发酵培养基中的糖与乙酸几乎可被皮状丝孢酵母与 *T. dermatis* 完全代谢; 而 *T. coremiiforme* 与浅白隐球酵母对糖与有机酸的代谢效果不佳。皮状丝孢酵母与 *T. dermatis* 在高效降低高底物浓度培养基的 COD 的同时, 可在胞外合成一定浓度的多糖产品。四株油脂酵母的油脂脂肪酸组成以 C16、C18 系列为主, 其中油酸 (C18:1) 比例最高; 除合成微生物油脂外, 它们还能在胞内大量积累多糖类物质以及少量的蛋白质与灰分。本文为油脂酵母利用廉价原料联产酵母多糖与微生物油脂这两种高附加值食品提供参考。

关键词: 油脂酵母; 多糖; 微生物油脂

文章编号: 1673-9078(2016)3-147-151

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.024

Production of Polysaccharides and Lipids by Four Oleaginous Yeasts in Corncob Hydrolysate with Acetic Acid

XIONG Lian^{1,2}, HUANG Chao², LI Xiao-mei², CHEN Xue-fang², CHEN Xin-de², ZENG Xin-an¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou Institute of Energy Conversion, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to study the influence of high-concentration acetic acid in lignocellulosic hydrolysates on fermentation by oleaginous yeast, four oleaginous yeasts (*Trichosporon cutaneum*, *Cryptococcus albidus*, *Trichosporon dermatis*, and *Trichosporon coremiiforme*) were chosen and corncob hydrolysate with the addition of high-concentration acetic acid was used as the fermentation substrate to explore patterns in substrate metabolism and product accumulation during fermentation. Sugars and acetic acid in the fermentation media could be almost completely metabolized by *T. cutaneum* and *T. dermatis*, but *T. coremiiforme* and *C. albidus* showed little metabolism effect on sugars and organic acids. Besides efficiently reducing the chemical oxygen demand (COD) of the medium with high substrate concentration, *T. cutaneum* and *T. dermatis* synthesized a certain concentration of extracellular polysaccharide products. The fatty acids of the four oleaginous yeasts were mainly composed of C16 and C18 series, and the proportion of oleic acid (C18:1) was the highest; in addition to microbial oil, they also accumulated a large amount of polysaccharide and a small amount of protein and ash. This study provides a reference for the production of yeast polysaccharide and microbial oil from low-cost raw materials using oleaginous yeasts.

Key words: oleaginous yeast; polysaccharide; microbial oil

微生物油脂是指微生物在一定条件下合成并储存在菌体内的甘油酯, 在轻工食品、医疗保健、能源

收稿日期: 2015-04-20

基金项目: 广东省科技计划项目 (2013B010404036); 国家自然科学基金资助项目 (51378486); “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAD32B07)

作者简介: 熊莲 (1984-), 女, 博士生, 助理研究员, 主要从事生物炼制研究

通讯作者: 曾新安 (1972-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事食品工程相关研究

化工领域有重要用途。油脂酵母以廉价原料为底物发酵是实现油脂发酵产业化的途径之一, 近年来受到生物化工领域的广泛关注^[1,2]。最近的研究表明木质纤维素水解液与丁醇发酵废水均可作为油脂发酵的理想底物^[3,4], 但上述两类培养基中油脂发酵的产物组成相差较大, 如在木质纤维素水解液的油脂发酵油脂含量可达 40% 以上, 但在发酵有机废水中只有不到 20%, 说明培养基组成对油脂发酵产物组成影响较大。木质纤维素水解液与丁醇发酵废水最大的区别在于前者的碳

源主要为糖类物质, 后者的碳源主要为有机酸; 特别地, 木质纤维素水解液丁醇发酵后的废水既含丁醇发酵的副产物(有机酸), 也含木质纤维素水解液中的成分(糖与抑制剂), 会对油脂发酵产生一定影响; 木质纤维素水解液因水解工艺的不同也含有一定量的乙酸(0~25 g/L)^[5], 而玉米芯水解液的乙酸浓度可达 4.9 g/L^[3], 乙酸作为上述底物的重要成分, 也会对油脂发酵产生一定影响。

无论是木质纤维素水解液或是丁醇发酵废水, 其中的氮源浓度均很低, 这种限氮的培养基组成十分适合微生物积累油脂^[6]。但事实上, 大量油脂酵母胞内的非油脂成分未被关注, 这些非油产物同样是油脂酵母生物量的重要组成部分。大量研究表明, 在限氮的培养基环境下, 酵母胞内的碳代谢流除了流向油脂合成外也可能流向多糖合成^[7]。酵母多糖具有显著的免疫活性, 及抗肿瘤、抗氧化、抗菌、抗炎、抗辐射、降血压、降血糖等重要的生理作用, 而其作为动物饲料的可行性也被广泛证明, 因此, 酵母多糖现已在医药, 食品、动物营养等方面被广泛应用^[8,9], 市场价值较高(市场价格按不同产品纯度可达数万甚至十几万元/吨以上)。但目前鲜有利用油脂酵母产酵母多糖的研究报道。

为了研究木质纤维素水解液中高浓度乙酸的存在对油脂酵母发酵的影响, 本研究以实验室保藏的 4 株油脂酵母为研究对象, 在玉米芯水解液中添加高浓度乙酸(15 g/L)作为发酵底物, 研究 4 株油脂酵母发酵后胞内产物的组成(油脂、多糖、粗蛋白、灰分等)。本研究可为油脂酵母利用廉价原料联产酵母多糖与微生物油脂这两种高附加值食品提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

皮状孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)、浅白隐球酵母(*Cryptococcus albidus*)、*Trichosporon dermatis* 与 *Trichosporon coremiiforme* 由中国科学院广州能源研究所能源化工实验室提供。玉米芯稀酸水解液由中科(营口)新能源技术开发有限公司提供。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母抽提物 10, pH 6.0。

发酵培养基: 玉米芯稀酸水解液中添加 15 g/L 乙酸作为发酵培养基, 发酵初始 pH 为 8.0。

1.2 主要仪器设备

COD 测定仪: 型号 CH-02, 北京双晖京承电子产

品有限公司; 气相色谱仪: GC-7890, FID 检测器, 美国安捷伦(Agilent)公司; 高效液相色谱仪: 液相色谱仪: Waters 2695s, 配备 Waters 2410 示差检测器、Waters 2489 紫外检测器, 美国 Waters 公司; 元素分析仪: 型号 vario EL cube, 德国 elementar 仪器公司。

1.3 试验方法

1.3.1 油脂酵母培养

油脂酵母首先通过 28 °C, 150 r/min 振荡活化 24 h, 随后以 10% 的接种量接入含乙酸的玉米芯水解液培养基(250 mL 摇瓶装样 50 mL)在 28 °C, 150 r/min 培养一段时间后离心收集菌体。

1.3.2 生物量、油脂含量、油脂脂肪酸组成测定

生物量、油脂含量、油脂脂肪酸组成的测定采用文献报道的方法^[3], 其中生物量通过离心后称量酵母菌体干重获得, 油脂通过在酸热法破碎细胞后利用甲醇/氯仿体系萃取得到进而使用干重法得到油脂含量, 油脂脂肪酸组成通过油脂甲酯化后使用气相色谱分析。

1.3.3 多糖与粗蛋白含量测定

胞内外总糖浓度分析: 准确称取 2 mL 稀释后的胞外多糖(液体)或含一定量胞内多糖(固体)的测定液到 25 mL 具塞比色管中, 加入 6% 苯酚溶液 0.1 mL 以及硫酸溶液 5 mL, 混匀后沸水浴 15 min, 冷却到室温后测定 490 nm 下的吸光度, 通过吸光度换算成对应的胞内外多糖浓度(以葡萄糖浓度对吸光度作图绘制标准曲线)。对于胞内多糖, 其浓度即为所测定的胞内总糖浓度; 对于胞外多糖, 其含量为胞外总糖浓度与还原糖浓度(使用 DNS 法分析)之差。使用元素分析仪获得菌体 N 含量后, 乘以系数 6.25 获得菌体粗蛋白含量。

1.3.4 培养成分测定

采用高效液相色谱(Waters 2695S 系统, Waters Corp., USA)分析糖与有机酸浓度, 色谱柱为 Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm, Bio Rad Corp., USA), 流动相为 0.005 M H₂SO₄, 流速 0.5 mL/min, 柱温箱和检测池温度分别维持在 55 °C 和 50 °C; 糖浓度分析使用示差检测器(Waters 2410), 有机酸含量测定采用紫外检测器(Waters 2489), 紫外检测波长为 210nm。

1.3.5 培养基 COD 测定

利用水分测定仪分析培养基中的 COD。培养基稀释到设备指定测定浓度范围。加入 COD 测试的试剂到测试管中, 振荡混匀后加入消解装置按设备指定时

间消解，消解后在室温下冷却样品，样品通过水分测定仪的吸光度测定装置获得吸光度对应的 COD。

1.3.6 数据分析

试验数据采用Excel 2007进行平均值与标准偏差分析。

2 结果与讨论

2.1 四株油脂酵母发酵底物代谢规律

目前较有产业化前景的生物丁醇制备工艺原料通常为木质纤维素^[10]，以中国科学院广州能源研究所的中试工艺为例，玉米芯（典型的木质纤维素原料）水解后通过脱毒发酵最终得到丙酮丁醇和乙醇产品。无论丁醇发酵后的残糖含量为多少，其碳源最初均是来源于木质纤维素水解液，因此在木质纤维水解液环境中（碳源浓度较高）考察糖与乙酸多种碳源共存情况下上述四株油脂酵母细胞生长与油脂积累的情况。木质纤维素水解液添加乙酸（15 g/L）后最终培养基的糖与酸的浓度经高效液相色谱 HPLC 鉴定为（g/L）：葡萄糖 5.0、木糖 24.2、阿拉伯糖 3.6、乙酸 14.8。为消除培养基因添加乙酸 pH 值下降的影响，所有发酵培养基在发酵前的 pH 值均调节至 8.0。培养基中含有乙酸有一定的缓冲作用，四株油脂酵母发酵后的 pH 值约为 7.4~7.5。

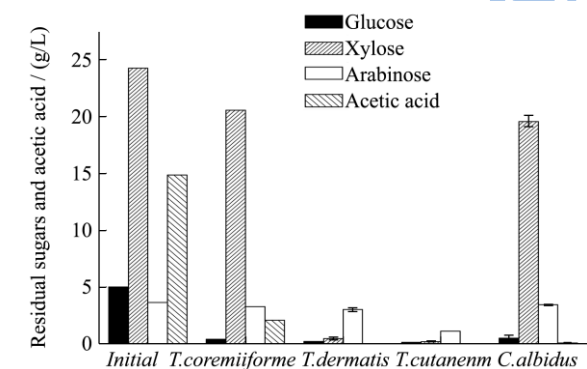


图1 高底物浓度培养基环境中四株油脂酵母发酵8天后对糖与乙酸的利用情况

Fig.1 Sugar and acetic acid utilization of four oleaginous yeasts in a medium with high substrate concentration after eight days of fermentation

考察了发酵 8 d 后四株油脂酵母对糖与乙酸共存培养基中底物的利用情况（图 1）。皮状丝孢酵母与 *T. dermatis* 均已把培养基中的乙酸代谢完全，且培养基中的木糖也大部分被上述两株油脂酵母所利用。*T. coremiiforme* 和浅白隐球酵母发酵 8 d 后残余了大量的糖与有机酸，说明在糖与乙酸较高浓度培养基环境中，*T. coremiiforme* 和浅白隐球酵母对底物的代谢能力较

弱。明显地，四株油脂酵母均先利用乙酸，糖的利用是在乙酸代谢之后。培养基中乙酸的存在会影响四株酵母对糖的代谢。对于糖与乙酸多种碳源共存的培养基环境，上述四株油脂酵母中皮状丝孢酵母对底物的代谢能力最强，*T. dermatis* 次之，*T. coremiiforme* 对底物代谢能力最弱。一般在木质纤维素水解液中的油脂发酵大约需要 5 d 左右的时间即可把大部分的底物消耗完全^[3]。由于培养基中乙酸的存在，导致了糖与乙酸共存培养基中的整个油脂发酵的周期变长。

为了进一步说明四株油脂酵母在糖与乙酸共存培养基环境下对底物的代谢能力，考察了发酵 8 天后培养基 COD 的消耗情况(图 2)：对于较高的初始 COD（70000 mg/L 以上），皮状丝孢酵母与 *T. dermatis* 显示出较强的代谢能力，COD 去除率可达 70%左右，另一方面也说明在四株酵母中，皮状丝孢酵母与 *T. dermatis* 对不同 COD 浓度的培养基具有更好的适应性。

分析皮状丝孢酵母与 *T. dermatis* 发酵后培养基中的总糖与还原糖浓度：皮状丝孢酵母发酵后培养基的总糖与还原糖浓度分别为和 14.3 g/L 和 3.9 g/L，*T. dermatis* 发酵后培养基的总糖与还原糖浓度分别为和 18.3 g/L 和 9.0 g/L，说明发酵后培养基中除了发酵残糖（葡萄糖、木糖与阿拉伯糖均为还原糖）外，皮状丝孢酵母与 *T. dermatis* 还生成了高浓度的胞外酵母多糖。真菌胞外多糖是一类重要的多糖类产品，具有相当高的免疫活性，具有抗炎、抗肿瘤、抑菌等生理活性^[11]。与之对比，*T. coremiiforme* 和浅白隐球酵母的培养基中并无胞外多糖生成。

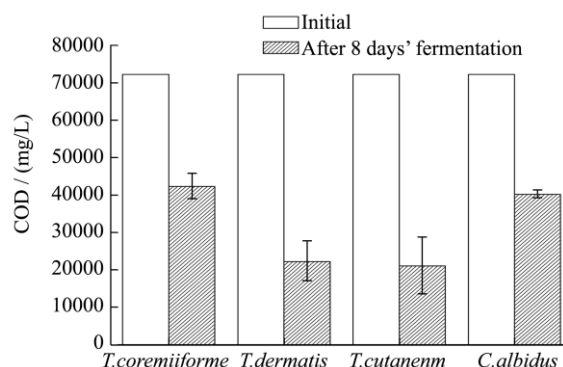


图2 高底物浓度培养基环境中四株油脂酵母发酵8天后对COD的消耗情况

Fig.2 COD consumption of four oleaginous yeasts in a medium with high substrate concentration after eight days of fermentation

在糖与乙酸共存的培养基环境中，特别是初始 COD 较高（70000 mg/L）的培养基环境下，皮状丝孢酵母与 *T. dermatis* 显示出比 *T. coremiiforme* 与浅白隐

球酵母更加优异的底物代谢能力,而且可合成高附加值胞外多糖,因而这两株菌是处理醇类发酵废水的较为理想的菌株。

2.2 四株油脂酵母发酵产物积累规律

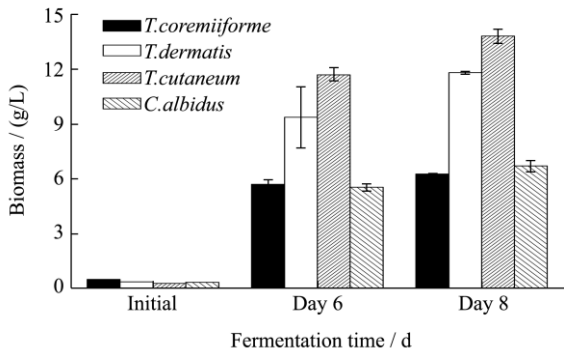


图3 高底物浓度培养基环境中发酵前后四株油脂酵母生物量的变化

Fig.3 Changes in the biomasses of four oleaginous yeasts in a medium with high substrate concentration before and after fermentation

如图3所示,刚接入培养基的时候,四株油脂酵母的生物量均相当低 (<0.5 g/L),经过6~8 d的发酵后,四株油脂酵母的生物量均有显著提升,其中 *T. dermatis* 和皮状丝孢酵母的生物量明显比 *T. coremiiforme* 和浅白隐球酵母的生物量要高,而且 *T. coremiiforme* 和浅白隐球酵母的生物量在6~8 d之间增长很少。因此, *T. dermatis* 和皮状丝孢酵母能适应高COD的糖与乙酸共存的培养基环境,说明该两株油脂酵母在应对碳源浓度波动方面有很好的适应性。

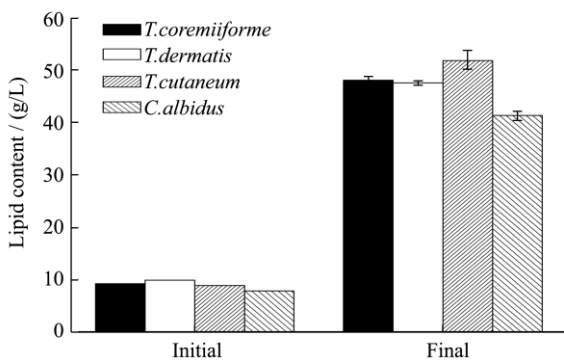


图4 高底物浓度培养基环境中发酵前后四株油脂酵母发酵8 d后油脂含量的变化

Fig.4 Change in the lipid content of four oleaginous yeasts in a medium with high substrate concentration before and after eight days of fermentation

进一步分析发酵初始时与发酵结束后(发酵8 d)四株油脂酵母的油脂含量变化(图4)发现,四株油脂酵母(*T. dermatis*、*T. coremiiforme*、浅白隐球酵母、

皮状丝孢酵母)在发酵后的油脂含量都有显著增加,均达到了40%以上,大大超过丁醇发酵废水中油脂发酵后的油脂含量^[4],说明丁醇发酵废水中油脂酵母油脂含量偏低是因为废水中可发酵底物(尤其是碳源)浓度偏低的缘故。综合生物量与油脂含量,皮状丝孢酵母的油脂产量最高,发酵8 d后可达7.1 g/L, *T. dermatis* 次之,发酵8 d后可达5.6 g/L,但 *T. coremiiforme* 与浅白隐球酵母的油脂产量较少,发酵8天后仅分别有3.0 g/L和2.8 g/L。

油脂产品的脂肪酸结构组成决定了油脂的工业应用及市场前景^[12]。本节考察了高浓度COD(>70000 mg/L)下高底物浓度培养基对四株油脂酵母的油脂脂肪酸组成的影响(图5),研究发现四株油脂酵母在高COD培养基环境中获得的油脂脂肪酸组成与常规的木质纤维水解液获得的微生物油脂脂肪酸组成相似^[3],以C16、C18系列为主,其中油酸(C18:1)比例最高。

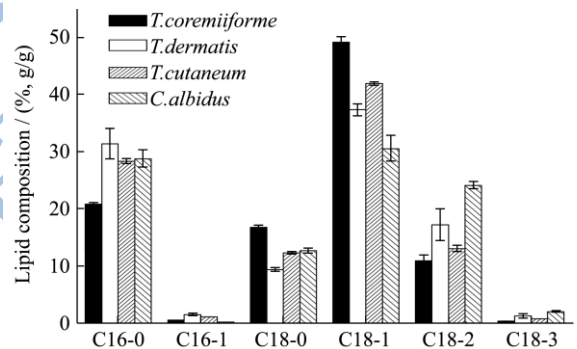


图5 高底物浓度培养基环境中发酵后四株油脂酵母油的脂肪酸组成

Fig.5 Fatty acid composition of four oleaginous yeasts in a medium with high substrate concentration after fermentation

研究表明:四株油脂酵母在高COD糖与乙酸共存培养基环境中,除皮状丝孢酵母外,其余三株油脂酵母(*T. dermatis*、*T. coremiiforme*和浅白隐球酵母)的油脂含量均未超过50%,且皮状丝孢酵母的油脂含量也仅有51.7%。换言之,在发酵过程中四株油脂酵母在胞内还会合成其它物质。

大量的研究表明,在限氮(培养基中碳源浓度远远高于氮源浓度)的培养基条件下,菌体的蛋白质合成较少,而发酵往往转向合成仅含C、H、O的有机化合物如油脂与多糖类产物^[7]。在高COD糖与乙酸共存培养基环境中,四株油脂酵母的细胞其它组分(灰分、蛋白质、多糖)的含量如图6所示:四株油脂酵母均有一定含量的灰分,说明油脂酵母可富集一定量的金属微量元素。事实上,现在很多微生物饲料中会添加一些重要金属元素,从而实现重要的生理功能

[13]。四株油脂酵母中, 浅白隐球酵母细胞中的灰分较多, 说明其积累金属微量元素的能力较强。除灰分外, 四株油脂酵母均积累了一定程度的蛋白质, 粗蛋白含量在 10% 左右, 其中, 浅白隐球酵母的粗蛋白含量略高于其余三株油脂酵母。油脂酵母所积累的蛋白质主要来源于培养基中的氮源物质以及活化培养基中带入的部分氮源, 这些氮源物质的浓度与培养基中的碳源物质相比十分低, 因此发酵后四株油脂酵母的粗蛋白含量都很低。

最后, 考察了高 COD 糖与乙酸共存培养基环境中四株油脂酵母发酵后的多糖含量, 四株油脂酵母发酵后的多糖含量均较高, 可达 40% 左右, 与其油脂含量十分接近, 说明在限氮的培养基条件下, 油脂酵母胞内的碳不仅转化为油脂类物质, 也同时转化为多糖类物质。在四株油脂酵母中, 皮状丝孢酵母的多糖含量最高, *T. coremiiforme* 的多糖含量最低。事实上, 已经有文献报道, 通过培养基组成的调控可以实现油脂微生物胞内油脂与多糖之间的转化^[14]。胞内酵母多糖的生理活性尤其是免疫活性已经被大量文献证实^[18, 9], 而酵母胞内多糖(细胞壁多糖)产品已经上市(如安琪酵母公司的酵母多糖产品), 市场价值很高。

本文所测定的四种胞内组分包括油脂、灰分、粗蛋白、多糖的总含量相加略高于 100%, 这是因为所测定的物质中, 两种含量较大的物质即油脂与多糖在生理上可能存在结合, 形成脂多糖类物质, 因此测定的多糖与油脂的含量比实际值略高。

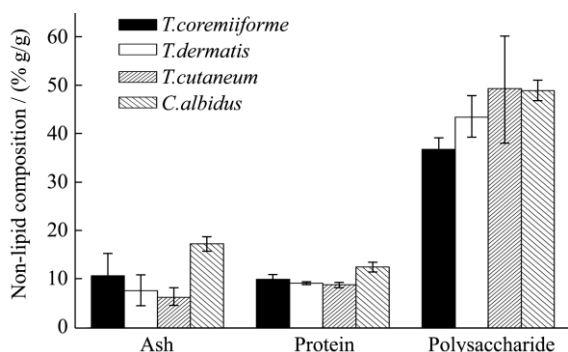


图 6 高底物浓度培养基环境中发酵后四株油脂酵母其它细胞组成

Fig.6 Other cellular components of four oleaginous yeasts in a medium with high substrate concentration after fermentation

3 结论

发酵培养基中的糖与乙酸几乎可被皮状丝孢酵母与 *T. dermatis* 完全代谢; 而 *T. coremiiforme* 与浅白隐球酵母对糖与乙酸的代谢效果不佳。皮状丝孢酵母与 *T. dermatis* 在高效降低高底物浓度培养基 COD 的同

时, 可在胞外合成一定浓度的多糖胞外产品(占剩余 COD 一定比例)。四株油脂酵母的油脂脂肪酸组成以 C16、C18 系列为主, 其中油酸(C18:1)比例最高。四株油脂酵母除合成微生物油脂外, 还能在胞内大量积累多糖类物质以及少量的蛋白质与灰分。综上所述, 油脂酵母利用廉价底物联产多糖与油脂可望成为具有产业化前景的工艺路线。

参考文献

- [1] Huang C, Chen X F, Xiong L, et al. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization [J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(2): 129-139
- [2] Sitepu I R, Garay L A, Sestric R, et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production [J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32: 1336-1360
- [3] Xiong L, Huang C, Yang X Y, et al. Beneficial effect of corn cob acid hydrolysate on the lipid production by oleaginous yeast *Trichosporon dermatis* [J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 45(5): 421-429
- [4] Chen X F, Huang C, Xiong L, et al. Oil production on wastewaters after butanol fermentation by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme* [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 118: 594-597
- [5] Parajo J C, Dominguez H, Dominguez J M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates [J]. *Bioresource Technology*, 1998, 66(1): 25-40
- [6] Ratledge C, Wynn J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2002, 51: 1-44
- [7] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production [J]. *Biochimie*, 2004, 86(11): 807-815
- [8] 艾自明, 任慧霞. 酿酒酵母胞壁多糖研究概述[J]. *中兽药*, 2009, 7(10): 762-765
- [9] AI Zi-ming, REN Hui-xia. Overview of research on *Saccharomyces cerevisiae* cell wall polysaccharides [J]. *Central South Pharmacy*, 2009, 7(10): 762-765
- [9] 董小英, 唐胜球. 酵母多糖在动物营养中的研究与应用[J]. *饲料工业*, 2006, 26(20): 10-13
- [10] DONG Xiao-ying, TANG Sheng-qiu. Research and application of yeast polysaccharide in animal nutrition [J]. *Feed Industry*, 2006, 26(20): 10-13
- [10] LIU Xiao-li, ZAN Deng, YUAN Jing-jue, et al. Effects of

- zymosan on antioxidation and immune fuction in S180 tumor-bearing mice [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2009, 31(4): 60-64
- [11] Qureshi N, Saha B C, Dien B, et al. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I-Use of barley straw hydrolysate [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2010, 34(4): 559-565
- [12] Ravella S R, Quinones T S, Retter A, et al. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82(3): 728-732
- [13] Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011, 113(8): 1052- 1073
- [14] Mahan D, Cline T, Richert B. Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality [J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(8): 2172-2179
- [15] Zhu S, Huang W, Xu J, et al. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis* [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 152: 292-298