

# 海洋热带假丝酵母产角鲨烯发酵工艺研究\*

## Study on Fermentation Process for Squalene Production by Marine *Candida tropicalis*

雷 富,陈小玲,李检秀,孙 靛,彭 元,何小英\*\*

LEI Fu, CHEN Xiao-ling, LI Jian-xiu, SUN Liang, PENG Yuan, HE Xiao-ying

(广西科学院 广西近海海洋环境科学重点实验室,广西南宁 530007)

(Guangxi Key Laboratory of Coastal Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**【目的】为了从海洋热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)菌株中获取高产量的角鲨烯活性物质。【方法】研究不同碳源、氮源、培养温度、培养基初始 pH 值、培养时间、光照和氧气等条件对海洋热带假丝酵母菌株产角鲨烯的影响。【结果】确定最优培养基为(W/V)1%酵母膏+2%蛋白胨+2%蔗糖,最佳摇瓶发酵条件:有氧条件下,初始 pH 值为 5.0,培养温度 25℃,经 48 h 培养,角鲨烯产量可达 2.25 mg/g 干重。【结论】采用优化后工艺条件进行发酵,获得的角鲨烯产量明显提高。

**关键词:**热带假丝酵母 海洋菌株 培养条件 优化

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2015)03-0346-04

**Abstract:**【Objective】Optimization experiment was performed in order to obtain high yield of squalene active substances from marine *Candida tropicalis* strain. 【Methods】This study compared the influence of different carbon source, nitrogen source, culture temperature, initial pH, incubation time, the illumination and oxygen condition on the yield of squalene from marine *Candida tropicalis* strain. 【Results】The optimal medium (W/V) was 1% yeast extract, 2% peptone and 2% sucrose. The best conditions for fermentation in shaking flask were the optimal initial pH at 5.0 and the optimal temperature at 25℃. Under aerobic conditions, the squalene content from the strain reached up to 2.25 mg/g(dry weight) after 48 hours of culture. 【Conclusion】This strain can produce higher content of squalene active substance on the conditions obtained from the optimal fermentation process.

**Key words:** *Candida tropicalis*, marine strain, culture condition, optimization

## 0 引言

【研究意义】角鲨烯是一种昂贵的物质,通常情况下,角鲨烯大量存在于深海鲨鱼肝脏中<sup>[1]</sup>,属于稀有资源,为了解决角鲨烯资源缺稀问题,研究人员探索了多种化学合成途径<sup>[2]</sup>,但效果均不太理想。而利用微生物发酵获取优质而廉价的角鲨烯成为目前国际上的一个新研究领域。【前人研究进展】Takahira 等<sup>[3]</sup>利用紫外线诱变镰胞菌,获得一株产角鲨烯的抗烟酸突变体 5-128B,印度学者利用酿酒酵母和从糖

收稿日期:2015-01-13

修回日期:2015-02-15

作者简介:雷 富(1975-),男,副研究员,主要从事海洋环境科学和海洋活性物质研究。

\* 广西自然科学基金项目(2011GXNSFA018108, 2011GXNSFE018003)资助。

\*\* 通讯作者:何小英(1970-),女,经济师,主要从事科研管理工作, E-mail:331680481@qq.com。

蜜分离得到的一株酵母发酵生产角鲨烯<sup>[4]</sup>,韩国光州大学报道,在研究海洋微生物价值物时分离得到一株能产生角鲨烯和多种高度不饱和脂肪酸的假丝酵母(*Pseudozyma*)JCC207<sup>[5]</sup>。在国内研究方面,雷富等<sup>[6]</sup>从红树林白骨壤生长的高潮带土壤中分离得到一株热带假丝酵母,经过发酵检测发现其含角鲨烯成份。【本研究切入点】利用分离得到的海洋菌株中含角鲨烯的特点,进行角鲨烯生产发酵工艺的研究探索。【拟解决的问题】以本实验室保存的热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)为菌种,采用单因素试验对其发酵培养基和培养条件进行优化,通过发酵工艺的优化提高菌株的角鲨烯产量,为采用微生物发酵法工业化生产角鲨烯奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试菌株为本实验室从红树林白骨壤(*Avicennia reacecosa*)生长土壤中分离获得,经鉴定为热带假丝酵母(*Candida tropicalis*);主要仪器为Agilent 6890N气相色谱仪和Agilent 5975C质谱仪;正己烷为色谱纯。

YPD液体培养基(W/V):1%酵母膏,2%蛋白胨,2%葡萄糖;斜面培养基在液体培养基的基础上添加1.5%的琼脂。

### 1.2 角鲨烯的制备

将冰箱内保存的菌种接种在YPD斜面培养基上,25℃活化培养48 h。将活化后的菌株转接至YPD液体培养基,置25℃,200 r/min摇床培养至菌数 $2 \times 10^8$ 个/mL以上,取菌液于5000 r/min离心15 min,冷冻干燥菌体细胞,称取约2 g加入3 mL正己烷,置200 r/min摇床浸提12 h,取正己烷浸提物,10000 r/min离心10 min,所得上清液即为角鲨烯待测样品。

### 1.3 质谱法条件

色谱柱:HP-5毛细管柱(30 m $\times$ 0.320 mm);升温程序:起始温度为200℃,以40℃/min升至280℃,保持10 min;进样口温度为280℃;载气为高纯氦气;载气流速1.0 mL/min;不分流进样;进样量为1  $\mu$ L。

EMV:1200 V;离子源:230℃;四极杆:150℃;发射电源:34.6  $\mu$ A;电子能量:70.0 eV;全扫描,扫描质量范围为20~450 amu;溶剂延迟3.0 min。

### 1.4 单因素试验

#### 1.4.1 培养基优化

##### 1.4.1.1 不同氮源的影响

将活化好的菌种转接于含有不同氮源(共9种,广西科学 2015年6月 第22卷第3期

见表1)、pH值为5.0的YPD液体培养基中,置200 r/min,25℃摇床培养48 h后,参照第1.2和1.3节制备并测定角鲨烯含量。每组实验重复3次,结果取平均值。

##### 1.4.1.2 不同碳源的影响

以1%酵母膏+2%蛋白胨(W/V)作为氮源,将活化好的菌种转接于含有2%(W/V)不同碳源(葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖、乳糖、甘露糖、木薯、蜜糖、甘蔗糖蜜、蔗渣)、pH值为5.0的YPD液体培养基中,其余操作同第1.4.1.1节。

##### 1.4.2 培养条件优化

###### 1.4.2.1 温度的影响

将活化好的菌种转接于优化后的培养基(初始pH值为5.0)中,分别置温度为15℃、20℃、25℃、30℃和35℃,200 r/min摇床培养48 h后,参照第1.2和1.3节制备并测定角鲨烯含量。每组实验重复3次,结果取平均值。

###### 1.4.2.2 pH的影响

将活化好的菌种分别转接于初始pH值为2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0的优化后的培养基中,置200 r/min,25℃摇床培养48 h,其余操作同第1.4.2.1节。

###### 1.4.2.3 培养时间的影响

将活化好的菌种转接于优化后的培养基(初始pH值为5.0)中,置200 r/min,25℃摇床分别培养12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h,其余操作同第1.4.2.1节。

###### 1.4.2.4 光照和氧气的影响

将活化好的菌种转接于优化后的培养基(初始pH值为5.0)中,200 r/min,25℃,分别在有灯照和完全黑暗、有氧气和无氧气条件下培养48 h,其余操作同第1.4.2.1节。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基的优化

#### 2.1.1 不同氮源的影响

由表1可知,角鲨烯产量大小顺序依次为(酵母膏+蛋白胨)>酵母膏>蛋白胨>(酵母膏+硫酸铵)>(硫酸铵+蛋白胨)>(酵母膏+氯化铵)>(氯化铵+蛋白胨)>硫酸铵>氯化铵,当氮源为1%酵母膏+2%蛋白胨(W/V)时,菌株产角鲨烯含量最高(1.34 mg/g干重),因此,选择1%酵母膏+2%蛋白胨(W/V)作为最佳氮源。此外,实验结果还表明,有机氮源比无机氮源能更好促进菌株产角鲨烯,这与张志军等<sup>[7]</sup>报道的有机氮源比无机氮源更能促进菌株

的生长相似,这可能与有机氮源比无机氮源含有更多的适合菌株产角鲨烯的营养有关。

表 1 不同氮源对菌株产角鲨烯的影响

Table 1 Effect of different nitrogen on squalene content yielded from the strain

种类 Types	浓度 Concentration (W/V, %)	产量 Output (mg/g)
酵母膏 Yeast extract	3	1.23
蛋白胨 Petron	3	1.06
酵母膏+蛋白胨 Yeast extract+petrone	1+2	1.34
硫酸铵 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	0.39
蛋白胨+硫酸铵 Petron+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2+1	0.96
酵母膏+硫酸铵 Yeast extract+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1+2	1.00
氯化铵 NH <sub>4</sub> Cl	3	0.35
蛋白胨+氯化铵 Petron+NH <sub>4</sub> Cl	2+1	0.90
酵母膏+氯化铵 Yeast extract+NH <sub>4</sub> Cl	1+2	0.92

### 2.1.2 不同碳源对菌株产角鲨烯的影响

由表 2 可知,角鲨烯产量大小顺序依次为蔗糖>甘蔗糖蜜>乳糖>葡萄糖>甘露糖>麦芽糖>蜜糖>果糖>蔗渣>木薯,其中,蔗糖对菌株产角鲨烯量的影响最大,产量达到 2.25 mg/g 干重,木薯的影响最少,为 0.96 mg/g 干重,因此,选择 2% (W/V) 蔗糖作为最佳碳源。蜜糖含有海洋酵母生长所需的生长素,但在该试验中蜜糖发酵产角鲨烯的量比麦芽糖少,可能是因为其虽含有多种糖分,但由于灰分和重金属离子含量也较高,可能对酵母的生长产生抑制作用。

表 2 不同碳源对菌株产角鲨烯的影响

Table 2 Effect of different carbon on squalene content yielded from the strain

种类 Types	产量 Output(mg/g)
葡萄糖 Glucose	1.32
蔗糖 Sucrose	2.25
果糖 Fructose	1.06
麦芽糖 Maltose	1.22
乳糖 Lactose	1.52
甘露糖 Mannose	1.25
木薯 Cassva	0.96
蜜糖 Heney sugar	1.16
甘蔗糖蜜 Sugar cane molasses	1.56
蔗渣 Bagasse	1.02

## 2.2 培养条件的优化

### 2.2.1 培养温度影响

从图 1 可以看出,培养温度对菌株产角鲨烯量影响较大,随着温度的升高,角鲨烯产量呈现先升后降的趋势,当温度为 25℃ 时,角鲨烯产量最高,达 2.19 mg/g 干重,表明菌株产角鲨烯的最适温度为 25℃,这和大多数酵母菌株的生长发酵相似<sup>[8]</sup>。

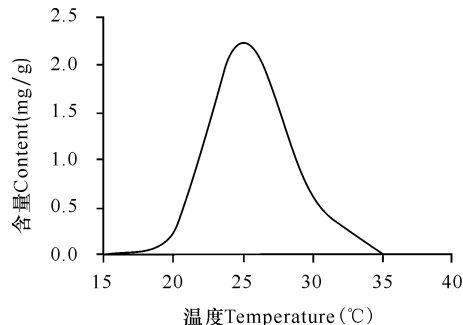


图 1 培养温度对菌株产角鲨烯影响

Fig. 1 Effect of temperature on squalene content yielded from the strain

### 2.2.2 pH 值的影响

从图 2 可以看出,pH 值对菌株产角鲨烯量影响较大,当 pH 值为 2.0~5.0 时,随着 pH 值的升高角鲨烯产量增多;初始 pH 值为 5.0 时角鲨烯产量达到最高值 2.23 mg/g 干重;而 pH 值为 5.0~9.0 时,角鲨烯产量随着 pH 值升高而降低。

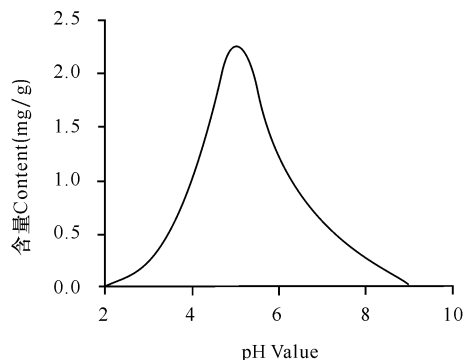


图 2 pH 对菌株产角鲨烯影响

Fig. 2 Effect of pH on squalene content yielded from the strain

### 2.2.3 培养时间影响

从图 3 可以看出,在 24 h 前未检测到角鲨烯,24 h 后角鲨烯含量迅速增加,到 36~48 h 角鲨烯含量上升速度变慢,48 h 达到 2.2 mg/g 干重,此后菌的生长和角鲨烯产量进入衰退期,84 h 时几乎降为零,这可能与糖消耗量有关。由于角鲨烯在培养后期逐渐减少,与大多数菌株产活性物质是个逐渐积累的过程正好相反,其中机理有待探索。

### 2.2.4 光照和氧气的影响

菌株在有光照和完全黑暗的条件下角鲨烯的产量分别为 2.20 mg/g 干重和 2.15 mg/g 干重,表明光照对角鲨烯的产量影响不大;菌株在无氧条件下角鲨烯的产量为 0,有氧条件下为 2.10 mg/g 干重,表

明氧气对该菌株产角鲨烯量影响很大。

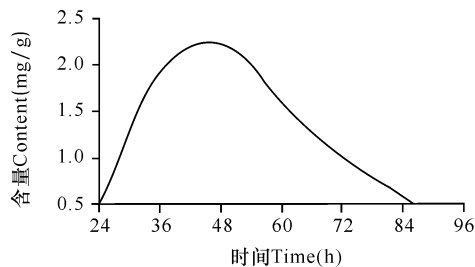


图3 培养时间对菌株产角鲨烯影响

Fig. 3 Effect of time on squalene content yielded from the strain

### 3 结论

本实验对培养基中氮源和碳源,以及发酵条件中的培养基初始 pH 值、培养温度、培养时间、光照和氧气等条件对菌株富集角鲨烯的影响进行研究,结果表明,海洋热带假丝酵母菌株的最佳产角鲨烯培养基(W/V)为 1%酵母膏+2%蛋白胨+2%蔗糖,最适培养工艺为培养基初始 pH 值为 5.0,在 25℃,有氧条件下培养 48 h,角鲨烯产量可达 2.25 mg/g 干重。

#### 参考文献:

[1] 赵振东,孙震. 生物活性物质角鲨烯的资源及其应用研究进展[J]. 林产化学与工业,2004,24(3):107-112.  
Zhao Z D, Sun Z. Research progress on natural resources and application of the bioactive substance-squalene[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2004, 24(3):107-112.

[2] 赵振东,孙震. 化学及生物学方法合成角鲨烯研究现状[J]. 林产化学与工业,2003,23(4):95-98.  
Zhao Z D, Sun Z. Present situation of research on chemical and biological synthesis of squalene[J]. Chemistry

and Industry of Forest Products, 2003, 23(4):95-98.

[3] Takahira O, Ichiro K, Norio T, et al. Microbial production of squalene by a nicotinic acid-resistant mutant derived from *Fusarium* sp. No. 5-128B[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 77(4):436-438.

[4] Bhattacharjee P, Shukla V B, Singhal R S, et al. Studies on fermentative production of squalene[J]. World Journal of Microbiol and Biotechnol, 2001, 17(8):811-816.

[5] Chang Mi-Hee, Hyeon-Jin K, Kwang-Yeop J, et al. The isolation and characterization of *Pseudozyma* sp. JCC 207, a novel producer of squalene[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78(6):963-972.

[6] 雷富,何碧娟,姜发军,等. 海洋热带假丝酵母菌株中角鲨烯的分析与鉴定[J]. 广西科学,2011,18(2):161-163.  
Lei F, He B J, Jiang F J, et al. Analysis and identification of squalene from marine strain of *Candida tropicalis* [J]. Guangxi Sciences, 2011, 18(2):161-163.

[7] 张志军,江晓路,张婷婷,等. 海洋红酵母 *Rhodotorula* sp. 06 产胡萝卜素的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(11):123-125,131.  
Zhang Z J, Jiang X L, Zhang T T, et al. The study on carotenoids production by marine *Rhodotorula* sp. 06[J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(11):123-125,131.

[8] 杨莺莺,陈永清,杨铿,等. 海洋红酵母 RH1 菌株发酵培养条件的研究[J]. 南方水产科学,2012,8(1):67-74.  
Yang Y Y, Chen Y Q, Yang K, et al. Study on fermentation conditions for oceanic red yeast strain RH1 [J]. South China Fisheries Science, 2012, 8(1):67-74.

(责任编辑:陆雁)