

粘红酵母 CA815 固态发酵废弃烟梗产油脂的 Plackett-Burman 优化

尚 兵^{1,2,3}, 司敬沛^{1,2,3}, 殳建英^{1,2,3}, 荆唤芝^{1,2,3}, 李淑芳^{1,2,3}, 王 盼^{4*}

(1. 河南省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 郑州 450002; 2. 河南省粮食质量安全与检测重点实验室, 郑州 450002; 3. 农业部农产品质量安全风险评估实验室(郑州), 郑州 450002; 4. 河南蓝天药业有限公司, 郑州 450016)

摘 要: **目的** 资源化利用废弃烟梗(waste tobacco stem, WTS)并获取微生物油脂的廉价发酵基质。**方法** 以一株粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)CA815 为出发菌株, 采用摇瓶方式固态发酵 WTS, 发酵后加入适量生理盐水并混合均匀, 双层纱布过滤获得固态发酵的酵母生物量, 采用酸热法提取酵母细胞油脂; 采用 Plackett-Burman (PB)实验设计法对影响微生物油脂产生的相关因素进行方差及贡献率分析。**结果** PB 试验结果统计学分析表明: 在选择的 11 个相关因素中, 酵母粉、蛋白胨和培养时间是影响酵母油脂产量的 3 个关键供试因素, 粘红酵母 CA815 生物量最高值可达 79.00 mg/g, 油脂的最高产量可达 4.633 μg/g。**结论** 粘红酵母 CA815 以 WTS 为主要基质, 通过添加适量酵母粉和蛋白胨、优化培养时间, 既可资源化利用 WTS, 又可通过固态发酵的方式获得微生物油脂。

关键词: 烟梗; 固态发酵; 油脂; Plackett-Burman 设计; 粘红酵母

Optimization of lipid production from *Rhodotorula glutinis* CA815 under solid-state fermentation with waste tobacco stems by Plackett-Burman design

SHANG Bing^{1,2,3}, SI Jing-Pei^{1,2,3}, ZU Jian-Ying^{1,2,3}, JING Huan-Zhi^{1,2,3}, LI Shu-Fang^{1,2,3}, WANG Pan^{4*}

(1. Research Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Techniques, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory of Grain Quality, Safety and Inspection of Henan Province, Zhengzhou 450002, China; 3. Risk Assessment Lab for Agro-products (Zhengzhou), Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China; 4. Henan blue sky Pharmaceutical Co., Ltd., Zhengzhou 450016, China)

ABSTRACT: Objective To realize the resource utilization of waste tobacco stem (WTS) and obtain cheap fermentation substrate of microbial oil. **Methods** *Rhodotorula glutinis* CA815 was used as the starting strain, and solid-state fermentation of WTS was performed by shake flask method. After fermentation, a proper amount of normal saline was added and mixed evenly, and the biomass of *Rhodotorula glutinis* CA815 was obtained by double layer gauze filtration. The yeast cell lipid was extracted by acid-heating method. Plackett-Burman (PB) design was employed to evaluate some variables which were relevant to lipid production of *Rhodotorula glutinis* CA815 under solid-state fermentation of WTS. **Results** The PB design results showed that among eleven selected variables,

*通讯作者: 王盼, 助理工程师, 主要研究方向为药物分析。E-mail: lnd721611@126.com

*Corresponding author: WANG Pan, Assistant Engineer, Henan Blue Sky Pharmaceutical Co., Ltd., No.1073, Hanghai Road, Jingkai District, Zhengzhou 450016, China. E-mail: lnd721611@126.com

peptone, yeast powder and culture time, as three key factors, were found to significantly influence lipid production, the highest biomass of *Rhodotorula glutinis* CA815 could reach 79.00 mg/g, and the maximum production of lipid could reach 4.633 $\mu\text{g/g}$. **Conclusion** Under PB design conditions, WTS is used as the main substrate of *Rhodotorula glutinis* CA815. By adding appropriate amount of yeast powder, peptone and optimizing culture time, the lipid can be produced by solid-state fermentation from WTS.

KEY WORDS: tobacco stem; solid-state fermentation; lipid; Plackett-Burman design; *Rhodotorula glutinis*

1 引言

随着不可再生化石资源的紧缺和不断扩大的环境污染状况, 人类对油脂资源的需求矛盾日益突出, 开发和利用新型微生物油脂愈加显现出它的重要性。目前发现的产油脂微生物主要集中在酵母、霉菌、微藻、细菌等, 鉴于多数细菌产量低, 科研实践中所用菌株以酵母^[1-3]、霉菌^[4]类真核微生物居多。一般产油脂微生物菌体油脂含量远远优于单纯利用大豆、玉米等农作物生产油脂的产率, 使微生物油脂开发成为研究热点。此外, 利用微生物发酵生产油脂具有周期短、不受季节和气候变化影响、成本低、可无限生产等优点, 能有效缓解工农业对油脂需求的增加, 开发微生物油脂用于生物柴油的制备亦成为近几年研究的热点^[5-9]作为卷烟工业的一种废弃资源, 烟梗中含有大量的可溶性糖和氮类等物质^[10], 相关报道中多用来提取烟碱、果胶、茄尼醇, 制备烟草薄片、发酵制备乳酸等物质^[11,12], 然而利用酵母发酵废弃烟梗(waste tobacco stem, WTS)产微生物油脂研究较少。

本实验以一株分离的富含油脂的粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)CA815 为出发菌株, 以 WTS 为主要基质, 对影响菌株 CA815 发酵生产油脂的主要因素利用 PB 设计法(Plackett-Burman, PB)进行综合考察, 旨在为 WTS 的资源化利用和酵母菌产油脂廉价原材料的开发提供新思路。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 材料和试剂

WTS 由河南天昌国际烟草有限公司提供。

酵母粉和蛋白胨(英国 OXOID 公司); 琼脂粉(美国 Sanland 公司); 葡萄糖(天津市风船化学试剂科技有限公司); 蔗糖(广州化学试剂二厂); 柠檬酸(天津市科密欧化学试剂开发中心); 硫酸铵(天津市永大化学试剂中心); 硫酸锌(北京市平谷双燕化工厂); 硫酸锰和磷酸二氢钾(中国宿州化学试剂公司)。所有实验用试剂均为国产分析纯。

2.1.2 仪器与设备

JJ300 型精密电子天平(常熟双杰仪器厂); 101 型电热

鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司); SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司); YXQ-LS-30SII 型高压灭菌器(上海博迅实业有限公司); Avanti J-25 低温恒温离心机(美国贝克曼库尔特有限公司); 台式恒温振荡器(泰昌市实验设备厂); GHP-9160 隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); PHS-3C 雷磁精密 pH 计(上海精密仪器有限公司); HWS-20 恒温水浴箱(江苏太仓市实验设备厂); AA3 自动连续流动分析仪(德国布朗卢比公司)。

2.2 菌株及培养基

粘红酵母 CA815 保藏于郑州大学生命科学学院。菌种保藏和种子液制备均采用烟梗提取液(tobacco stem extraction, TSE)培养基。

2.3 试验方法

2.3.1 烟梗预处理、成分分析及 TSE 培养基制备

WTS 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中烘干 2 h, 去除较粗和较长烟梗后过 16 目标准筛除尘备用。处理后采用 AA3 连续流动分析仪进行主要成分分析。TSE 培养基制备方法: 称取 10 g 烟梗, 加入 100 mL 自来水, 室温放置 10 h, 双层纱布过滤, 滤液即为 TSE, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min 备用, 其中固体培养基琼脂含量为 2.0%。

2.3.2 种子液制备

从保藏的菌种斜面挑取一环培养物接种到含有 80 mL 种子培养液的 250 mL 三角瓶中, 置于恒温摇床 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 180 r/min 条件下培养 36 h, 获得的培养物作为固态发酵的种子液。

2.3.3 固态发酵

分别称取一定量的 WTS 置于 250 mL 三角瓶中, 按照

2.3.4 实验设计加入对应编号的添加物, 称取 10 g WTS, 加入 40 mL 自来水混匀室温浸泡 10 h, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。冷却后无菌操作分别取 5 mL 种子液接种到上述三角瓶中, 恒温 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 每 24 h 轻摇 1 次。

2.3.4 PB 设计实验方案

依据预实验结果, 选取与粘红酵母固态发酵产生物油脂培养过程相关的多种影响因素进行分析, PB 设计($N=12$)对影响 WTS 发酵生产油脂的 11 种因素进行了评估, 11 种因素的编码、单位及水平见表 1。

表 1 PB 设计试验所选因子、水平及编码

Table 1 Levels and codes of variables used in the Plackett-Burman design

变量	因素	单位	因素水平	
			-1	1
X_1	葡萄糖	g/kg	0	10
X_2	蔗糖	g/kg	0	10
X_3	酵母粉	g/kg	0	5
X_4	蛋白胨	g/kg	0	5
X_5	硫酸镁	g/kg	0	1
X_6	磷酸二氢钾	g/kg	0	2
X_7	柠檬酸	g/kg	0	0.5
X_8	硫酸铵	g/kg	0	2
X_9	硫酸锌	g/kg	0	0.5
X_{10}	pH	—	6	7
X_{11}	培养时间	d	5	7

2.4 分析方法

2.4.1 酵母生物量分离及测定

酵母菌固态发酵培养一定时间后, 向含发酵物的三角瓶中加入适量生理盐水, 双层纱布过滤获得菌体滤液后定容 100 mL。取 20 mL 菌体滤液 8000 r/min 离心 5 min, 弃除上清, 收集菌体, 无菌水洗涤 2 次, 105 ℃烘至恒重, 称重并计算干重^[13,14]。

2.4.2 分离菌株油脂的提取

分离菌株油脂的提取采用酸热法提取^[15], 具体步骤如下: 取适量菌体滤液 8000 r/min 离心 3 min。弃上清液获得 1 g 湿菌体, 向湿菌体中加入 4 mol/L 盐酸 10 mL, 振荡

均匀, 室温放置 20 min。沸水浴 10 min, 立即放于-20 ℃于速冷 30 min。分别加入 10 mL 的氯仿和甲醇, 振荡 30 min 后 8000 r/min 离心 3 min。静置分离下层氯仿层至小烧杯中, 70 ℃下干燥 2 h 冷却称重并计算 1 g 湿菌体中油脂含量。

2.4.3 数据分析

实验数据采用 Design-Expert 8.0.6 统计分析软件进行处理。

3 结果与分析

3.1 WTS 成分分析

WTS 中含有大量可溶性糖、烟碱等水溶性物质, 其主要成分见表 2。因此, 经水浸泡后 WTS 可作为一种廉价的固态发酵基质。发酵基质颗粒大小在固态发酵过程中起重要的作用, 小颗粒基质能够提供更大的微生物作用表面, 因此固态发酵中多采用小颗粒基质。鉴于本实验中若采用小颗粒基质, 发酵后酵母细胞很难与基质颗粒分离, 因此采用大颗粒的 WTS 进行发酵, 发酵后通过简单的过滤即可获得高纯度的酵母细胞, 有利于规模化生产过程中油脂及其它高附加值产物的分离和提取。

表 2 预处理烟梗的成分分析

Table 2 Main compositions of WTS

成分	总糖	总氮	烟碱	钾	氯
含量(g/L)	20.35	1.73	0.84	2.53	2.03

3.2 PB 设计方案及结果

PB 设计实验中, 生物量、油脂产量的响应值见表 3。从表 3 可看出, 对生物量而言, 最小的响应值为 61.00 mg/g, 最大响应值为 79.00 mg/g; 油脂产量最小和最大响应值分

表 3 PB 设计试验方案及结果

Table 3 Experiment scheme and results of Plackett-Burman design

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	生物量(mg/g)	油脂产量(μ g/g)
1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	66.00	2.439
2	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	71.50	3.516
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	61.00	1.929
4	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	74.00	2.024
5	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	79.00	0.810
6	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	68.00	3.158
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	70.00	4.198
8	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	67.50	4.633
9	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	72.00	0.351
10	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	76.00	2.033
11	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	78.50	3.896
12	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	73.50	1.327

别为 0.351 $\mu\text{g/g}$ 和 4.633 $\mu\text{g/g}$ 。生物量最大时的油脂产量并不是最高值, 生物量和油脂产量的不对应性表明油脂含量在 12 组试验中变化较大。在供试的营养添加物中, 有些物质可促进细胞生长, 有的物质可以促进油脂在细胞中的累积。在第 3 组试验中, 烟梗作为唯一基质时油脂产量为 1.929 $\mu\text{g/g}$, 其中有 9 组试验中油脂产量均高于 1.929 $\mu\text{g/g}$, 表明合适的添加营养物质对 CA815 油脂的累积具有正效应。在 12 组试验中, 生物量、油脂产量变化均较大, 表明 PB 设计中所选因子对响应值影响较大, 因此可选择适当的营养物质用于促进细胞内油脂的累积, 提高油脂的产量。

3.3 PB 设计试验的方差分析

对 PB 设计试验结果进行方差分析, 结果见表 4。结果表明: 在选择 11 个因素中, 葡萄糖、蔗糖、磷酸二氢钾、硫酸锌对实验模型影响不显著, 而酵母粉、蛋白胨、pH 和培养时间对实验模型影响均显著^[16]。

3.4 供试因子对 Plackett-Burman 试验模型的贡献度

供试因子对油脂产量的贡献度见表 5, 试验结果表明: 酵母粉、蛋白胨、pH 和培养时间对模型贡献度相对较大, 而葡萄糖、硫酸镁、柠檬酸、硫酸铵等因子对模型贡献率

相对较小。根据因子的贡献度和 Prob>F 值综合考虑, 培养时间、蛋白胨和酵母粉是影响 CA815 油脂产量的正效应重要因子, 因此可通过响应面进一步优化, 提高油脂产量。

表 4 PB 设计试验结果方差分析
Table 4 Variance analysis of Plackett-Burman design results

因素	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F*
模型	20.41	8	2.55	153.15	0.0008
X_1	0.11	1	0.11	6.78	0.0802
X_2	0.74	1	0.74	44.65	0.0068
X_3	3.48	1	3.48	209.11	0.0007
X_4	6.78	1	6.78	406.74	0.0003
X_6	0.89	1	0.89	53.22	0.0053
X_9	0.63	1	0.63	37.82	0.0086
X_{10}	1.19	1	1.19	71.39	0.0035
X_{11}	6.59	1	6.59	395.45	0.0003

注: *表示 Prob>F 小于 0.05, 表明模型或参数有显著影响; Prob>F 小于 0.01, 表明模型或参数有极显著影响。

表 5 PB 设计试验中供试因子对油脂产量的贡献度
Table 5 Contribution of the tested variables to lipid production in Plackett-Burman design

因素	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
贡献度(%)	0.55	3.64	17.03	33.12	0.046	4.33	0.12	0.076	3.08	5.81	30.20

4 结 论

粘红酵母 CA815 可固态发酵废弃烟梗, 发酵后通过简单的过滤操作即可获得高纯度酵母细胞, 进而通过提取获得低成本的生物油脂。通过营养添加物的 PB 设计优化后, 菌株 CA815 油脂产量有明显的提高, 最大油脂产量可达 4.633 $\mu\text{g/g}$, 比 WTS 为唯一基质发酵油脂产量提高了 2.4 倍。结合 PB 设计试验的方差分析和模型贡献度确定了 11 种供试因子中培养时间、蛋白胨和酵母粉是影响油脂产量的关键因子, 因此仍需进一步通过响应面等方法优化固态发酵的工艺条件, 为廉价发酵原料的开发和微生物油脂的工业应用提供更多的参考和技术支持。

参考文献

[1] Patel A, Arora N, Pruthi V, *et al.* Biological treatment of pulp and paper industry effluent by oleaginous yeast integrated with production of biodiesel as sustainable transportation fuel [J]. J Cleaner Prod, 2017, 142: 2858–2864.

[2] Taskin M, Ortucu S, Aydogan MN, *et al.* Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast

Rhodotorula glutinis TR29 [J]. Renew Energy, 2016, 99: 198–204.

[3] Arous F, Frikha F, Triantaphyllidou IE, *et al.* Potential utilization of agro-industrial wastewaters for lipid production by the oleaginous yeast *Debaryomyces etchellsii* [J]. J Cleaner Prod, 2016, 133: 899–909.

[4] 谢莹, 刘爽, 吴辰宇, 等. 产油脂霉菌的筛选及其产油条件优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(2): 391–395.

Xie Y, Liu S, Wu CY, *et al.* Screening of lipid-producing mycete and optimizing of its lipid-producing conditions [J]. Genom Appl Biol, 2016, 35(2): 391–395.

[5] Yousuf A. Biodiesel from lignocellulosic biomass—prospects and challenges [J]. Waste Man, 2012, 32(11): 2061–2067.

[6] Subhash GV, Mohan SV. Lipid accumulation for biodiesel production by oleaginous fungus *Aspergillus awamori*: influence of critical factors [J]. Fuel, 2014, 116(1): 509–515.

[7] Schneider T, Graeff-Hönniger S, French WT, *et al.* Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents [J]. Energy, 2013, 61(4): 34–43.

[8] 张国玲, 杜伟, 刘德华. 酵母油脂及用于生物柴油制备研究进展[J]. 化工进展, 2013, 32(4): 791–798.

Zhang GL, Du W, Liu DH. Research progress in biodiesel production from yeast lipid [J]. Chem Ind Eng Prog, 2013, 32(4): 791–798.

[9] Poontawee R, Yongmanitchai W, Limtong S. Efficient oleaginous yeasts

- for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production [J]. *Process Biol*, 2017, 53: 44–60.
- [10] Yong JS, Seo YB. Thermogravimetric study on stem biomass of *Nicotiana tabacum* [J]. *Thermochim Acta*, 2009, 486(1–2): 1–4.
- [11] 朱大恒, 杨增光, 张可可, 等. 干酪乳杆菌发酵废弃烟梗制备L-乳酸操作参数的优化[J]. *烟草科技*, 2015, 48(11): 78–81.
- Zhu DH, Yang ZG, Zhang KK, *et al.* Optimization of operational parameters for preparation of L-lactic acid by fermentation of waste tobacco stems with *Lactobacillus casei* [J]. *Tobacco Sci Technol*, 2015, 48(11): 78–81.
- [12] 张可可, 席宇, 张莉, 等. 干酪乳杆菌 XJL 发酵废弃烟梗产 L-乳酸的 Plackett-Burman 优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(4): 1351–1356.
- Zhang KK, Xi Y, Zhang L, *et al.* Plackett-Burman optimization of L-lactic acid produced by fermentation of waste tobacco stems by *Lactobacillus casei* XJL [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(4): 1351–1356.
- [13] Xiong L, Huang C, Yang XY, *et al.* Beneficial effect of corn cob acid hydrolysate on the lipid production by oleaginous yeast *Trichosporon dermatis* [J]. *Prep Bio B*, 2014, 45(5): 421–429.
- [14] Chen JX, Zhang XL, Yan S, *et al.* Lipid production from fed-batch fermentation of crude glycerol directed by the kinetic study of batch fermentations [J]. *Fuel*, 2017, 209: 1–9.
- [15] 陶永佳, 李根, 薛永常. 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.
- Tao YJ, Li G, Xue YC. Screening of oleaginous yeast from sea and optimization of oil extraction process [J]. *Chin Oil Fat*, 2017, 42(4): 12–15.
- [16] Li SC, Liu HX, Gu SB, *et al.* Screening of lipid high producing mutant from *Rhodotorula glutinis* by low ion implantation and study on lipid extraction technique [J]. *Adv Mater Res*, 2012, 343–344: 1172–1181.

(责任编辑: 姜 珊)

作者简介



尚 兵, 助理研究员, 主要研究方向为农产品质量安全检测。
E-mail: shangbingwl@sohu.com



王 盼, 助理工程师, 主要研究方向为药物分析。
E-mail: lnd721611@126.com