

合成油脂的微生物的研究

I. 培养条件对根霉油脂形成的影响

張憲武 韓靜淑 朱鳳琳

(中国科学院林业土壤研究所)

油脂在国民經济中占有重要地位。它是国家建設和人民生活中不可缺少的重要物質。随着人民生活水平不断的提高和在工业上用途的扩大,食用油脂和工业用油脂的需要量无疑将进一步增加。因此,为了满足日益增长的需要,除注意动植物性油脂的增产外,同时亦应注意对新的油脂来源的开辟。在真菌中的麴霉、青霉、毛霉、根霉等的菌絲体中,发现有折光性的油滴存在^[1]。菌絲所含油粒的多寡,常因微生物种的不同而有显著差异。另外,菌体代謝及培养条件,亦为重要的影响因素。直接使用微生物合成油脂的工作,远在1937年即已进行^[2]。这对满足当时油脂的需要,甚有效果。此后,各研究者对有关产油菌株的研究,范围更見广闊。高油量菌株的选择培养,遂成为微生物合成油脂研究的对象。P. Lindner 首先使用产脂内孢霉(*Endomyces vernalis*)在亚硫酸废液中培养以合成脂肪,得到了优良結果^[3]。繼后, D. Damm 用废糖蜜培养絲状菌,也获得优良的产脂結果。尤以应用鐮刀菌,得到突出成績;能利用各种不同的碳源来合成脂肪,所得油脂的成分和花生油、橄欖油等高等油料甚为相似,可供食用及工业用油^[4,5]。因而,微生物合成油脂的工作,在生产实践和理論探討方面,愈加引起研究者的广泛注意。目前,辰己忠次等对其他的含油菌株,已有較为系統的研究結果发表^[6]。并企图为其大規模的生产应用提供依据。我們分別地对根霉及紅酵母的油脂形成条件,进行了研究。企图利用此等合成油脂的微生物来合成油脂,为国家的經济建設服务。

絲状菌有这样的优点:菌株的种属繁多,易于选出含油量較高菌株;生长的菌垫和菌絲易于收集,可以簡化設備与操作过程。对扩大繁殖培养、搜集大量菌絲体十分有利。在生产实践上具有现实意义。我們將所选出的含油量較高的 *Rhizopus*-280, *Rh.*-277 两菌株,进行了培养条件对油脂形成影响的試驗。茲將試驗結果报告于下。

一、試驗方法和結果

試驗采用的菌株,为我所保藏的菌种 *Rhizopus*-280, *Rh.*-277 号。經油脂含量分析,含油量較高,选为本試驗菌种。进行試驗时,先在麴汁斜面上培养三天,将已产生孢子的菌株,加入灭菌水約5毫升,用白金耳将孢子和菌絲由培养基表面剥离,使之悬浮,繼續加入灭菌水,制成50毫升的均匀孢子、菌絲悬浮液,作为种菌。分別对培养液的 pH、培养温度、氮、碳源种类、磷酸盐用量、氮源用量、C:N 和糖浓度、醋酸鉀及稻草水解液的培养

等进行了试验。种菌接种量除不同接种量的试验外,均为 1%。并以Bernhauer等(1948)^[7] 培液为基础培养基。其成分为:葡萄糖 1.0%; (NH₄)₂SO₄ 0.01%; KH₂PO₄ 0.05%; MgSO₄ · 7H₂O 0.025%。于 1000 毫升锥形瓶中装入 200 毫升培养液。灭菌后,接入一定量的种菌,30℃ 培养 10 天。培养后的菌丝体,置入 100℃ 蒸汽锅中灭菌 30 分钟。取出用水洗涤,并使之脱水干燥(用电风扇吹干,或置于室温中 2—3 天)。将干燥之菌体,加入 1N HCl 水解 2 小时。过滤,风干。将此材料置入索氏脂肪抽出器中,以乙醚为抽出溶剂,抽出 10 小时,测定油脂的含量。培液所含葡萄糖,采用 Shaffer 和 Hartman 方法测定^[8]。

1. 不同接种量对油脂形成的影响

表 1 不同接种量对油脂形成的影响

| 菌 株 | 接种量 (毫升/100毫 升培养液) | 葡萄糖浓度 (克/100毫升) | 糖利用率 (%) | 菌丝体收率 (克/消耗100克糖) | 脂 肪 (克/100克风 干菌丝体) |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|-------------|----------------------|--------------------------|
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 1 | 0.92 | 96.3 | 6.2 | 46 |
| | 5 | | 100.0 | 6.2 | 42 |
| | 10 | | 100.0 | 4.0 | 39 |
| <i>Rhizopus</i> - 277 | 1 | 1.04 | 100.0 | 4.8 | 58 |
| | 5 | | 100.0 | 5.2 | 45 |
| | 10 | | 100.0 | 3.8 | 39 |

由表 1 结果可以看出,用 1—5% 之接种量均可。1% 种量,脂肪之含量较高。种量至 10% 时,菌体收率及脂肪含量均有降低。

2. 培养液的 pH 对油脂形成的影响

表 2 培液 pH 对油脂形成影响的试验

| 菌 株 | 培 养 液 | 葡萄糖浓度 (克/100毫升) | 糖利用率 (%) | 菌丝体收率 (克/消耗100克糖) | 脂 肪 (克/100克风 干菌丝体) |
|--------------------------|-------|--------------------|-------------|----------------------|--------------------------|
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 5 | 0.92 | 92.9 | 11.4 | 49 |
| | 6 | 0.90 | 94.4 | 9.8 | 48 |
| | 7 | 0.88 | 96.5 | 10.0 | 57 |
| | 7.5 | 0.88 | 95.6 | 9.5 | 43 |
| <i>Rhizopus</i> - 277 | 5 | 1.92 | 92.9 | 5.3 | 35 |
| | 6 | 1.92 | 96.0 | 6.1 | 34 |
| | 7 | 0.92 | 64.6 | 8.7 | 30 |
| | 7.5 | 0.92 | 96.0 | 5.2 | 30 |

表 2 试验结果表示,适于两菌株生长的 pH 的范围较大,在 pH5—7.5 间均能生长。在采用的两菌株间,各有其较适的 pH。在 pH7 时, *Rhizopus*-280 菌体收率和脂肪含量较高, *Rhizopus*-277 则在 pH5 时油脂含量较高,菌丝体之收率略低。至 pH7 时,油脂含量略低,菌丝体的收率却较高。至 pH7.5 时,两菌株的菌体收率和油脂含量均见降低。

3. 培养温度对油脂形成的影响

由表 3 之结果看出,25℃,30℃ 均为菌株生长形成油脂的较适温度。两者油脂的含

表 3. 培养温度对油脂形成的影响

| 菌 株 | 培养温度 (°C) | 葡萄糖浓度 (克/100毫升) | 糖利用率 (%) | 菌丝体收率 (克/消耗100克糖) | 脂 肪 (克/100克风 干菌丝体) |
|--------------------------|--------------|--------------------|-------------|----------------------|--------------------------|
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 25 | 0.97 | 83.0 | 8.3 | 48 |
| | 30 | | 81.0 | 9.2 | 46 |
| | 35 | | 74.1 | 5.4 | 43 |
| <i>Rhizopus</i> - 277 | 25 | 0.97 | 87.0 | 4.9 | 39 |
| | 30 | | 68.0 | 5.6 | 39 |
| | 35 | | 64.5 | 4.9 | 31 |

量异常接近。30℃ 菌体收率较高。在 35℃ 的较高温度培养时, 菌体收率和油脂含量均降低。

4. 不同氮源对油脂形成的影响

表 4 各种氮源培养试验

| 菌 株 | 氮源种类* | 葡萄糖浓度 (克/100毫升) | 糖利用率 (%) | 菌丝体收率 (克/消耗100克糖) | 脂 肪 (克/100克风 干菌丝体) |
|--------------------------|-------|--------------------|-------------|----------------------|--------------------------|
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 硫酸铵 | 0.97 | 93.8 | 8.9 | 53 |
| | 醋酸铵 | 0.98 | 86.5 | 9.1 | 51 |
| | 硝酸铵 | 0.97 | 83.9 | 7.9 | 50 |
| | 尿 素 | 0.97 | 100.0 | 12.1 | 49 |
| | 氯化铵 | 0.97 | 92.9 | 8.9 | 49 |
| | 蛋白胨 | 0.96 | 71.8 | 6.2 | 45 |
| | 硝酸钠 | 0.97 | 生 | 长 | 痕 迹 |
| <i>Rhizopus</i> - 277 | 醋酸铵 | 0.98 | 66.3 | 9.1 | 41 |
| | 硝酸铵 | 0.97 | 94.9 | 4.7 | 40 |
| | 蛋白胨 | 0.96 | 47.3 | 9.8 | 39 |
| | 硫酸铵 | 0.97 | 93.6 | 5.2 | 35 |
| | 氯化铵 | 0.97 | 94.3 | 5.4 | 34 |
| | 尿 素 | 0.97 | 100.0 | 9.6 | 32 |
| | 硝酸钠 | 0.97 | 生 | 长 | 痕 迹 |

* 氮源用量 1 克/1,000 毫升。

表 4 之结果表明, 两菌株均能广泛利用各种氮源。对酰胺氮($-\text{CONH}_2$), 蛋白质氮都能利用。其中酰胺氮对菌体收率有显著的提高。硫酸铵, 硝酸铵和醋酸铵的培养, 油脂含量均较高。两菌都不能利用硝酸钠, 生长痕迹。

5. 不同碳源对油脂形成的影响

由表 5 结果看出, 两菌株均能利用各种碳源。其中以可溶性淀粉, 对菌体收率、油脂含量所得结果最优。此外, 麦芽糖、果糖、葡萄糖均为油脂形成的良好碳源。两菌株在利用此类碳源时, 均有相同的趋势。仅在油脂含量的顺序上有所区别。如 *Rhizopus*-280 的试验结果, 油脂含量的顺序为: 果糖 > 麦芽糖 > 葡萄糖。 *Rhizopus*-277 则为: 麦芽糖 > 果糖 > 葡萄糖。此外, 对五碳糖中的木糖及醇类碳源(甘油, 甘露蜜醇)等均能利用, 但油脂含量均较低。乳糖和阿拉伯糖不能利用, 生长痕迹。

表 5 各种碳源培养试验

| 菌 株 | 碳源种类* | 菌丝体收率 (克/消耗100克糖) | 脂 肪 (克/100克风干菌丝体) |
|--------------------------|---------|----------------------|----------------------|
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 可溶性淀粉 | 8.5 | 52 |
| | 果 糖 | 6.8 | 48 |
| | 麦 芽 糖 | 6.3 | 42 |
| | 葡 萄 糖 | 4.8 | 38 |
| | 蔗 糖 | 2.0 | 27 |
| | 甘 油 | 4.3 | 24 |
| | 木 糖 | 4.0 | 22 |
| | 甘露蜜醇 | 3.5 | 18 |
| | 醋酸 钠 | 4.8 | 16 |
| | 醋酸 钾 | 6.8 | 12 |
| | 阿 拉 伯 糖 | 生 长 痕 迹 | 生 长 痕 迹 |
| | 乳 糖 | | |
| <i>Rhizopus</i> - 277 | 麦 芽 糖 | 4.5 | 40 |
| | 可溶性淀粉 | 6.5 | 39 |
| | 果 糖 | 4.8 | 32 |
| | 葡 萄 糖 | 2.5 | 31 |
| | 木 糖 | 5.0 | 22 |
| | 甘 油 | 3.8 | 19 |
| | 甘露蜜醇 | 5.0 | 18 |
| | 蔗 糖 | 4.5 | 16 |
| | 醋酸 钠 | 5.1 | 12 |
| | 醋酸 钾 | 5.1 | 9 |
| | 阿 拉 伯 糖 | 生 长 痕 迹 | 生 长 痕 迹 |
| | 乳 糖 | | |

* 碳源用量 10 克/1,000 毫升。

6. 磷酸盐的浓度对油脂形成的影响

表 6 磷酸二氢钾对油脂形成的影响

| 菌 株 | (NH ₄) ₂ SO ₄ 添加量 (克/100毫升) | KH ₂ PO ₄ 添加量 (克/100毫升) | 葡萄糖浓度 (克/100毫升) | 糖利用率 (%) | 菌丝体收率 (克/消耗 100克糖) | 脂 肪 (克/100克风 干菌丝体) |
|--------------------------|---|---|--------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 0.01 | 0 | 0.98 | 87.9 | 4.3 | 40 |
| | | 0.05 | 1.01 | 96.8 | 5.4 | 40 |
| | | 0.10 | 0.96 | 86.6 | 5.2 | 28 |
| | | 0.15 | 1.00 | 85.4 | 5.0 | 23 |
| <i>Rhizopus</i> - 277 | 0.01 | 0 | 0.92 | 53.2 | 3.4 | 29 |
| | | 0.05 | 0.97 | 100.0 | 3.8 | 31 |
| | | 0.10 | 0.91 | — | 4.0 | 31 |
| | | 0.15 | 1.00 | 88.9 | 4.2 | 28 |

由表 6 的结果看出,磷酸盐的浓度为 0.05% 时,油脂的形成良好。随着浓度的增加,反而使油脂的含量有所减少。两菌株均出现相同的趋势。

7. 硫酸铵的浓度对油脂形成的影响

表 7 硫酸铵浓度对油脂生成的影响

| 菌 株 | KH ₂ PO ₄ 之 加入量 (克/100毫升) | (NH ₄) ₂ SO ₄ 之 加入量 (克/100毫升) | 葡萄糖浓度 (克/100毫升) | 糖利用率 (%) | 菌丝体收率 (克/消耗 100克糖) | 脂 肪 (克/100克风 干菌丝体) |
|--------------------------|---|---|--------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 0.05 | 0.01 | 0.97 | 98.9 | 4.8 | 49 |
| | 0.05 | 0.02 | 0.97 | 96.9 | 23.7 | 47 |
| | 0.05 | 0.05 | 0.97 | 100.0 | 18.5 | 28 |
| | 0.05 | 0.10 | 0.97 | 100.0 | 18.5 | 22 |
| <i>Rhizopus</i> - 277 | 0.05 | 0.01 | 0.91 | 91.0 | 5.3 | 40 |
| | 0.05 | 0.02 | 0.91 | 95.3 | 9.1 | 30 |
| | 0.05 | 0.05 | 0.91 | 100.0 | 10.8 | 27 |
| | 0.05 | 0.10 | 0.91 | 90.3 | 17.0 | 21 |

从表 7 的试验结果中可以看到，当 KH₂PO₄ 的用量为 0.05 克，(NH₄)₂SO₄ 之量为 0.01 克/100 毫升时，油脂之含量较高。当 (NH₄)₂SO₄ 量增加至 0.1 克/100 毫升时，油脂之含量显著降低，但菌体的收率却显然增长。表现出氮量的大小，对于脂肪的形成有显著影响。当氮量增大时，对菌丝体的形成有利，菌体收率较高。反之，低氮量时，油脂含量较高，菌体收率较低(图 1)。

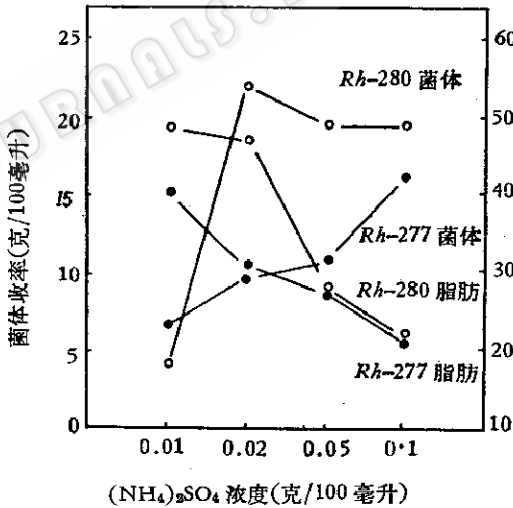


图 1 (NH₄)₂SO₄ 浓度对油脂生成的影响

8. 葡萄糖的浓度 C:N 比对油脂形成的影响

表 8 的试验结果指出，两菌株于 C:N 比小时，所得油脂含量低，菌体收率高。C:N 比大时，油脂含量高，菌体收率低。其中 *Rhizopus*-280 对 C:N 比的变化，较为敏锐。

从试验结果中还可以看到，糖浓度的增加和油脂含量的关系并不呈相关的增长。同时，培液含糖量若到 4% 的高糖浓度时，油脂含量反而有所降低。糖的利用率均在 50% 以下，培液中剩余的残糖较多。从菌体收率和油脂含量两者联系起来看，以采用 2% 糖浓度较为适宜(图 2)。较适的 C:N 值为 45。

表 8 葡萄糖浓度 C:N 比对油脂形成的影响

| 菌 株 | 处 理 | N (克/100 毫升) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (克/100 毫升) | 葡萄糖 浓度 (克/100 毫升) | 糖利用率 (%) | 菌丝体 干重 (克/100 毫升) | 菌丝体收 率(a)(克/ 消耗 100 克糖) | 脂肪(b)(克/ 100 克风 干菌丝体) | 油脂生成 率(a×b /100)* | C:N 比 |
|--------------------------|---------|--------------------|--|----------------------------|-------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------|
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 1 N | 0.020 | 0.10 | 1.0 | 100.0 | 0.18 | 18.5 | 45 | 8.3 | 18 |
| | 1/2.5 N | 0.008 | 0.04 | ” | 96.6 | 0.16 | 16.5 | 55 | 9.0 | 45 |
| | 1/5 N | 0.004 | 0.02 | ” | 100.0 | 0.11 | 11.4 | 70 | 7.9 | 90 |
| | 1/10 N | 0.002 | 0.01 | ” | 94.0 | 0.07 | 7.6 | 80 | 6.0 | 180 |
| | 1/20 N | 0.001 | 0.005 | ” | 79.6 | 0.07 | 7.9 | 78 | 6.1 | 360 |
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 1 N | 0.04 | 0.20 | 2.0 | 62.2 | 0.26 | 22.2 | 46 | 10.2 | 18 |
| | 1/2.5 N | 0.016 | 0.08 | ” | 65.3 | 0.22 | 17.1 | 54 | 9.2 | 45 |
| | 1/5 N | 0.008 | 0.04 | ” | 59.3 | 0.19 | 16.6 | 58 | 9.6 | 90 |
| | 1/10 N | 0.004 | 0.02 | ” | 78.2 | 0.12 | 8.3 | 76 | 6.3 | 180 |
| | 1/20 N | 0.002 | 0.01 | ” | 51.5 | 0.08 | 8.0 | 77 | 6.1 | 360 |
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 1 N | 0.08 | 0.40 | 4.0 | 36.1 | 0.35 | 25.7 | 43 | 11.0 | 18 |
| | 1/2.5 N | 0.032 | 0.16 | ” | 34.6 | 0.29 | 21.3 | 41 | 8.7 | 45 |
| | 1/5 N | 0.016 | 0.08 | ” | 39.8 | 0.30 | 17.4 | 41 | 7.1 | 90 |
| | 1/10 N | 0.008 | 0.04 | ” | 41.5 | 0.26 | 14.7 | 60 | 8.8 | 180 |
| | 1/20 N | 0.004 | 0.02 | ” | 40.7 | 0.15 | 9.4 | 75 | 7.0 | 360 |
| <i>Rhizopus</i> - 277 | 1 N | 0.02 | 0.10 | 1.0 | 100.0 | 0.055 | 5.72 | 67 | 3.8 | 18 |
| | 1/2.5 N | 0.008 | 0.04 | ” | 100.0 | 0.065 | 7.06 | 72 | 5.0 | 45 |
| | 1/5 N | 0.004 | 0.02 | ” | 100.0 | 0.061 | 6.63 | 68 | 4.5 | 90 |
| | 1/10 N | 0.002 | 0.01 | ” | 87.2 | 0.051 | 6.42 | 67 | 4.3 | 180 |
| | 1/20 N | 0.001 | 0.005 | ” | 67.0 | 0.026 | 4.00 | 71 | 2.8 | 360 |
| <i>Rhizopus</i> - 277 | 1 N | 0.08 | 0.40 | 4.0 | 37.6 | 0.25 | 16.4 | 56 | 9.1 | 18 |
| | 1/2.5 N | 0.032 | 0.16 | ” | 33.2 | 0.26 | 20.9 | 57 | 11.9 | 45 |
| | 1/5 N | 0.016 | 0.08 | ” | 40.0 | 0.25 | 14.8 | 51 | 7.5 | 90 |
| | 1/10 N | 0.008 | 0.04 | ” | 34.3 | 0.22 | 18.9 | 55 | 10.3 | 180 |
| | 1/20 N | 0.004 | 0.02 | ” | 33.3 | 0.12 | 8.5 | 68 | 5.7 | 360 |

* 油脂生成率表示每消耗 100 克糖,油脂收量的克数。

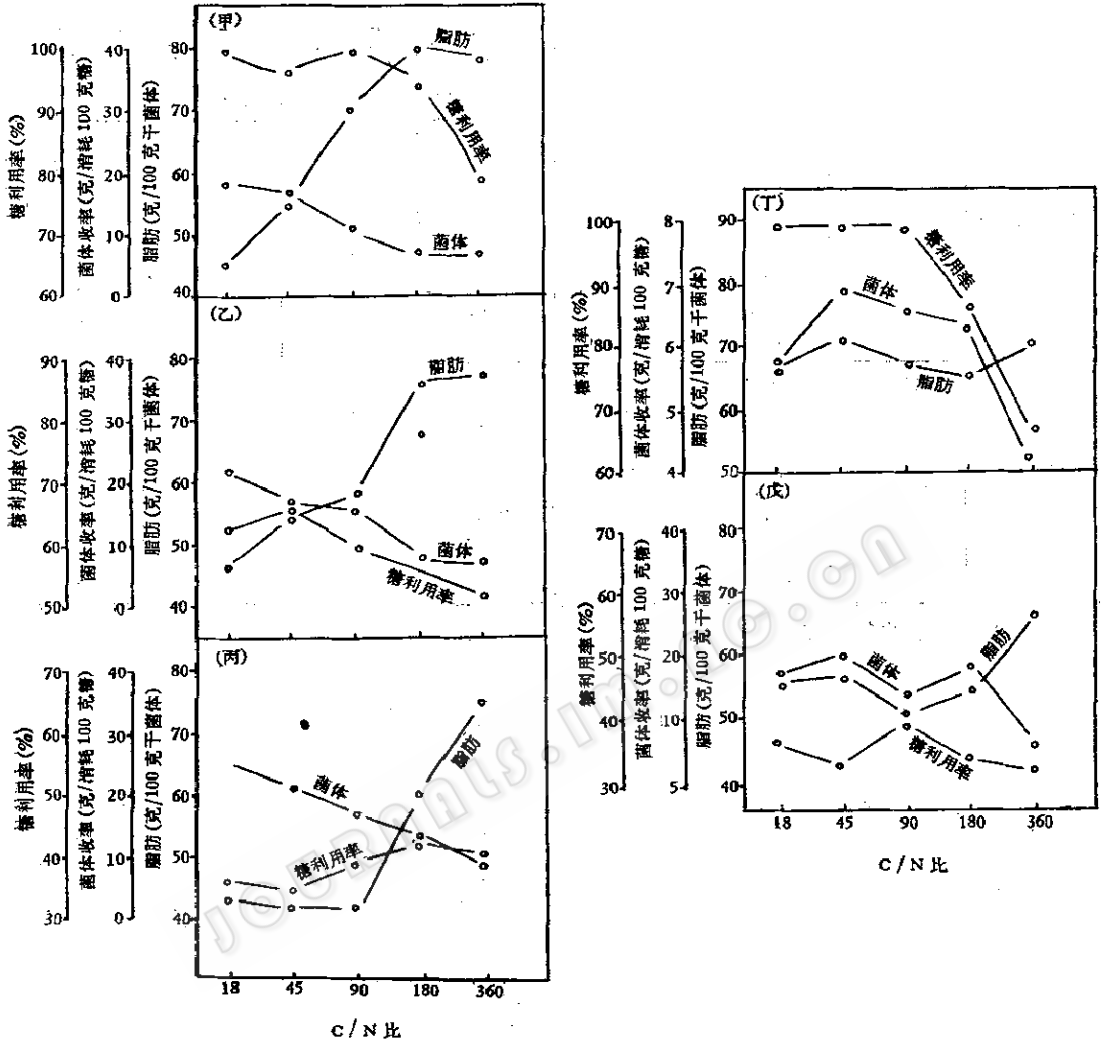


图 2 葡萄糖浓度 C:N 比对油脂形成的影响

- 甲、Rh.-280 菌株 1% 葡萄糖培养;
 乙、Rh.-280 菌株 2% 葡萄糖培养;
 丙、Rh.-280 菌株 4% 葡萄糖培养;
 丁、Rh.-277 菌株 1% 葡萄糖培养;
 戊、Rh.-277 菌株 4% 葡萄糖培养。

9. 醋酸盐对菌体收率和油脂含量的影响

由表 9 的结果中可以看出, 添加醋酸盐可以显著地增加菌体收量, 同时也提高了脂肪的含量。促进了有效氮和糖的利用, 使糖的消耗更为完全, 油脂生成率有显著增加。*Rhizopus*-280 在分别以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4NO_3 为氮源的试验中, 分别加入醋酸盐 1 克, 2 克和 0.5 克, 所得菌体及油脂生成率均高。*Rhizopus*-277 则以分别加入 0.5 克和 0.1 克, 所得油脂生成率较高。以上试验结果于图 3 可以清楚的看出。

表 9 无机态氮和醋酸盐的混合使用对提高菌体收率及脂肪含量的效果试验

| 菌 株 | 氮源种类 及用量 (%) | 醋酸钾浓度 (克/100毫升) | 糖利用率* (%) | 菌丝体干重 (克/100毫升) | 菌丝体收率 (a) (克/供给 100克糖) | 脂肪(b) (克/100克风 干菌丝体) | 油脂生成率 (a×b/100) |
|------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------|
| Rhizopus- 280 | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.08 | 0 | 42.2 | 0.18 | 8.8 | 43 | 3.7 |
| | | 0.1 | 96.9 | 0.30 | 15.1 | 40 | 6.0 |
| | | 0.5 | 100.0 | 0.37 | 18.4 | 40 | 7.3 |
| | | 1.0 | 100.0 | 0.38 | 19.2 | 41 | 7.8 |
| | | 2.0 | 95.7 | 0.34 | 17.1 | 48 | 8.2 |
| | NH_4NO_3 0.08 | 0 | 47.4 | 0.18 | 9.3 | 44 | 4.0 |
| | | 0.1 | 76.0 | 0.31 | 16.3 | 53 | 8.6 |
| | | 0.5 | 100.0 | 0.35 | 18.8 | 55 | 10.3 |
| | | 1.0 | 100.0 | 0.28 | 14.2 | 45 | 6.3 |
| | | 2.0 | 100.0 | 0.31 | 15.9 | 48 | 7.6 |
| Rhizopus- 277 | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.08 | 0 | 48.4 | 0.17 | 8.6 | 30 | 2.5 |
| | | 0.1 | 54.6 | 0.24 | 12.0 | 31 | 3.7 |
| | | 0.5 | 97.8 | 0.30 | 15.0 | 31 | 4.6 |
| | | 1.5 | 98.2 | 0.30 | 14.8 | 31 | 4.5 |
| | | 2.0 | 98.5 | 0.35 | 17.5 | 26 | 4.5 |
| | NH_4NO_3 0.08 | 0 | 47.4 | 0.18 | 9.2 | 31 | 2.8 |
| | | 0.1 | 81.2 | 0.28 | 15.5 | 53 | 8.2 |
| | | 0.5 | 100.0 | 0.29 | 15.5 | 33 | 5.1 |
| | | 1.5 | 100.0 | 0.26 | 13.2 | 35 | 4.6 |
| | | 2.0 | 100.0 | 0.25 | 13.0 | 40 | 5.2 |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

* 加入葡萄糖浓度为 2 克/100 毫升。

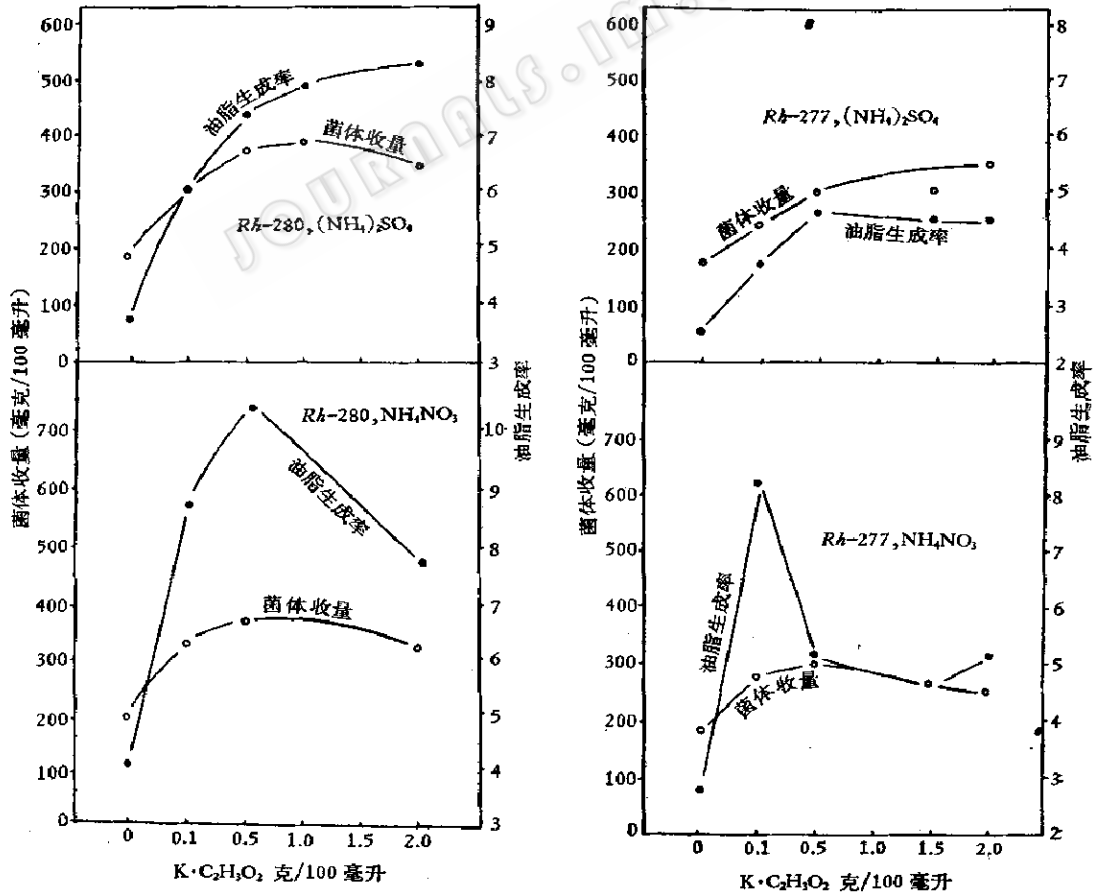


图 3 无机态氮和醋酸盐的混合使用对提高菌体收率及脂肪含量的效果

10. 稻草水解液的培养试验

表 10 2% H_2SO_4 稻草常压水解液的培养试验*

| 菌 株 | 試驗 号数 | 无机营养成分添加量 | | 水解液含还 原糖浓度 (克/100毫升) | 菌丝体干重 (克/升) | 菌丝体收率 (a) (克/供給 100克糖) | 脂 肪 (b) (克/100克风 干菌丝体) | 油脂生成率 (a×b/100) |
|--------------------------|----------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| | | KH_2PO_4 (克/100毫 升水解液) | $(NH_4)_2SO_4$ (克/100毫 升水解液) | | | | | |
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 1 | 0 | 0 | 1.8 | 4.02 | 22.3 | 48 | 10.7 |
| | 2 | 0.05 | 0 | „ | 5.75 | 31.9 | 55 | 17.5 |
| | 3 | 0.10 | 0 | „ | 5.88 | 32.6 | 53 | 17.3 |
| | 4 | 0.15 | 0 | „ | 5.33 | 29.6 | 55 | 16.2 |
| | 5 | 0.20 | 0 | „ | 5.35 | 29.7 | 62 | 18.4 |
| | 6 | 0.25 | 0 | „ | 5.10 | 32.7 | 58 | 19.0 |
| | 7 | 0 | 0.01 | „ | 5.73 | 31.8 | 57 | 18.1 |
| | 8 | 0 | 0.05 | „ | 4.15 | 23.0 | 49 | 11.2 |
| | 9 | 0 | 0.10 | „ | 5.19 | 28.8 | 50 | 14.4 |
| | 10 | 0 | 0.15 | „ | 5.48 | 30.4 | 49 | 14.9 |
| | 11 | 0.05 | 0.01 | „ | 5.34 | 29.6 | 54 | 16.0 |
| | 12 | 0.05 | 0.05 | „ | 5.27 | 29.2 | 49 | 14.3 |
| | 13 | 0.05 | 0.10 | „ | 4.80 | 26.6 | 42 | 11.1 |
| | 14 | 0.10 | 0.01 | „ | 4.43 | 24.6 | 52 | 12.7 |

* 稻草水解液的制备:将稻草切断,约成1寸长左右,置入烧瓶中。按1:10的液量比,加入一定量的2% H_2SO_4 。瓶上附加冷凝装置,让其回流蒸煮2小时之后,过滤,所得滤液,加入石灰中和至中性。使其沉淀($CaSO_4$),沉降之后吸取其上清液,装入瓶中。然后置入100℃蒸汽锅中,热处理40分钟。取出,即见有黑褐色的胶体絮状物沉淀或附于瓶壁上。过滤,所得的澄清滤液,加入需要的营养成分。调节pH至中性。在高压釜中,0.7气压灭菌20分钟。此培养液所含还原糖浓度约为2%。

由表10看出,用稻草水解液培养,得到了优良的结果。菌体收量和脂肪含量都比较高,油脂生成率高。同时在利用氮量的规律上和合成培养基比较,亦很一致;低氮油脂。含量则高,高氮则较低。若于水解液中添加少量的营养成分,菌体收率,脂肪含量均比对照高。其中以添加0.01% $(NH_4)_2SO_4$ 的结果较为理想,菌体和脂肪含量都较高。

11. 水解对菌体油脂析出的效果

表 11 水解对菌体油脂析出的效果

| 菌 种 | 試料(克) | 酸浓度及用量(毫升) | | 水解时间(时) | 含油量(克/100克风干菌丝体) | |
|--------------------------|-----------------|------------|-------|---------|------------------|-------|
| | | NHCl | 2NHCl | | NHCl | 2NHCl |
| <i>Rhizopus</i> - 280 | 稻草水解液培养 1.00 | 0 | 0 | 0 | 40 | |
| | | 20 | 20 | 1.0 | 57 | 58 |
| | | 20 | 20 | 2.0 | 62 | 64 |
| | | 20 | 20 | 2.5 | 61 | 63 |

由表11试验结果看出,菌体加盐酸水解的处理,其脂肪更易于提取,以1N盐酸水解2小时即可(图4)。

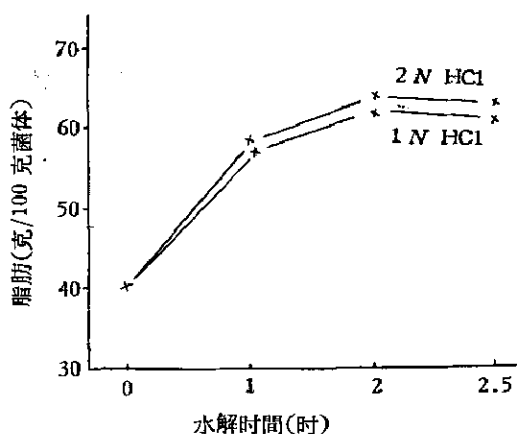


图 4 水解对油脂析出的效果

二、討 論

微生物合成脂肪的因素,除因有机体的种的特征外,应属于多相性的影响关系。从我們的試驗結果可以看到,氮素的供給起着重要作用。氮量大时,可以增加菌体收量,但脂肪含量較低;当氮量小时,脂肪含量有显著的提高,但菌体生长甚少。因之进一步研究增加菌体和提高脂肪含量的培养方法,如最适的 C:N 等,是值得探討的問題。另外,从表 9 的試驗中,我們在同一条件下,添加醋酸鉀后,对菌体收量和油脂生成率,都有显著增加。例如在 *Rhizopus*-280 的試驗里,醋酸鉀用量,随着氮源的种类而不同。对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 須加入 1 克, NH_4NO_3 仅須加入 0.5 克;对 *Rh.*-277 菌株, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 須加入 0.5 克, NH_4NO_3 仅須加入 0.1 克。因而,是否在菌体生长期中,始終維持培液至所需的 pH,对增加菌体收量,提高油脂含量将会更为有效,此問題应作进一步的探討。

稻草水解液的培养,得到突出的結果。这可能是因稻草含有較高的有机酸及无机盐(約 17—20%)特别是鉀盐,为霉菌菌絲組成所需要,仅从培液中供給菌株較多的痕量元素,特别是和脂肪轉化酶有密切关系的 Mg^{++} , Mn^{++} 等金属元素的供給,以致改善了菌体的生理营养。我們認為,水稻在我国南北方,均大量栽种。栽种面积,亦日益扩大,稻草的来源不受拘限。水解后的稻草,因不損害纖維素質量,仍可做造紙原料。因此利用稻草水解液来培养油脂微生物,在生产上具有实践的意义。

三、总 結

1. *Rhizopus*-280, *Rh.*-277 菌株的接种量以 1% 最为适宜,所得脂肪含量較高。种量至 10%,对菌体收率及脂肪含量均見降低。

2. 两菌株在 pH5—7.5 范围内,均能生长。但脂肪含量情况,各有不同。*Rh.*-280 菌株在 pH7 时,菌体收量及脂肪含量均較高。*Rh.*-277 菌株, pH5 时脂肪含量較高,菌体收量較低, pH7 时菌体收量高,脂肪略低。

3. 两菌株的培养温度,均以 30°C 时,菌体收率和脂肪含量最高。

4. 两菌株都可以硫酸銨、硝酸銨、醋酸銨、氯化銨、尿素及蛋白胨为氮源。并以硫酸銨、硝酸銨及醋酸銨的脂肪含量較高。尿素的試驗,所得菌体收率最高。硝酸鈉两菌株都不能利用。

5. 可溶性淀粉、麦芽糖、果糖及葡萄糖均为脂肪形成的良好碳源。尤以可溶性淀粉为最好。*Rh.*-280 菌株的含油量顺序为: 可溶性淀粉 > 果糖 > 麦芽糖 > 葡萄糖; *Rh.*-277 菌株为: 可溶性淀粉 > 麦芽糖 > 果糖 > 葡萄糖。两菌株都不能利用乳糖和阿拉伯糖。

6. KH_2PO_4 的用量以 0.05% 最为适宜, 所得的含油量高。浓度高时, 含油量反低。

7. 氮量供给的大小, 对油脂形成有显著影响。0.01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度, 脂肪含量最高。浓度增加至 0.1%, 脂肪含量显著降低。

8. *Rhizopus*-280 菌株, 对 C:N 比较为锐敏。不同糖浓度的培养, 其总的趋势亦甚一致。C:N 比为 18 及 360 时, 脂肪含量为 45% 及 78% (1% 糖液)。*Rh.*-277 菌株的脂肪含量, 则为 67% 及 71%。2% 糖浓度, 对菌体收率及油脂含量较为适宜。

9. 培液中添加醋酸钾, 油脂生成率有显著提高。随氮源的不同, 其用量亦有差异。*Rh.*-280 菌株对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 加入 1 克, NH_4NO_3 加入 0.5 克的结果为佳。*Rh.*-277 菌株对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及 NH_4NO_3 的试验, 分别以加入 0.5 克及 0.1 克的结果为佳。

10. 稻草水解液的培养得到优良结果。加入 0.01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 较为适宜 (因稻草水解液中已有少量的含氮物质与无机成分)。菌体和油脂生成率均较高。

11. 盐酸水解处理菌体, 对抽取油脂更为有利。并以 1N 盐酸 2 小时抽出结果为最好。

12. 菌株 *Rh.*-280, *Rh.*-277 较好的培液组成及培养条件如下: 葡萄糖 2.0%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.08%; KH_2PO_4 0.05%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%; $\text{K} \cdot \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.5% (或 0.1%, *Rh.*-277 菌株) 培液 pH 7.0; 接种量 1%; 培养温度 30°C。

参 考 文 献

- [1] Woodbine, M.: Microbial Fat: Microorganisms as Potential Fat Producers, in Progress in Industrial Microbiology. Vol. I. by D. J. D. Hockenull.
- [2] Fink, H. Haeseler, G. und Schmidt, M.: Z. *Spiritusind*, 60:74, 76—77, 81—82, 1937.
- [3] Lindner, P.: Über Mikrobenverfettung, mit besonderer Berücksichtigung des *Endomyces vernalis*. Chem. Ztg., 46: 855—856, 1922.
- [4] Damm, H.: Chem. Ztg., 67: 47—49, 1943.
- [5] Damm, H.: U. S. Patent No. 2,346,011, 1944.
- [6] 辰己忠次等: 微生物による油脂生产 (第 5 报) 亚硫酸パルプ废液から油脂酵母の生产, 醸酵协会志, 19(8): 21—24, 1961.
- [7] Bernhauer, K., Niethammer, A. and Rauch, J.: Beiträge zur mikrobiologischen Eiweiß- und Fettsynthese II. Mitteilung Vergleichende Untersuchungen über die Eiweiß- und Fettbildung durch verschiedene Mycelpilze in der Submers-Kultur. *Biochem. Z.* 319:94—101, 1948.
- [8] Shaffer, P. A. and Hartmann, A. F.: The Iodometric Determination on Copper and its Use in Sugar Analysis II. Methods for the Determination of Reducing Sugars in Blood, Urine, Milk, and Other Solutions. *J. Biol. Chem.*, 45:365—390, 1920.

STUDIES ON THE FAT SYNTHESIZING MICRO-ORGANISMS

I. EFFECTS OF CULTURAL CONDITIONS ON FAT PRODUCTION BY *RHIZOPUS*

CHANG HSIEN-WU, HAN JING-SHU AND CHU FENG-LIN

(Institute of Forestry and Pedology, Academia Sinica)

1. The optimum amount of inoculum, pH and temperature for a better yield of fat for *Rhizopus*-280, and *Rh.*-277 are found to be 1%, 7, and 30°C respectively.
2. Both strains can use a variety of nitrogen compounds as their nitrogen sources, among which ammonium sulfate, ammonium nitrate and ammonium acetate gave higher fat contents in the mycelium.
3. Both strains can utilize soluble starch, maltose, fructose, and glucose as their carbon sources, among which soluble starch is the best.
4. The addition of 0.05% KH_2PO_4 to the culture medium resulted in a higher fat contents in the mycelium.
5. The optimum concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ for fat production is 0.01%.
6. The optimum C:N for *Rhizopus*-280, and *Rh.*-277 is 360 at which their fat contents are 78% and 71% respectively.
7. The addition of potassium acetate to the culture medium greatly increased the fat contents of the mycelium.
8. Rice straw hydrolysate can be used in cultivating the organism for fat production.
9. Hydrolysis with 1 normal HCl for 2 hours facilitate the extraction of the fat from the mycelium.
10. The composition of the medium and the conditions of cultivation of the organisms for a better yield of fat are as follows:
Glucose 2.0%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.08%; KH_2PO_4 0.05%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%; $\text{K} \cdot \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.5% (or 0.1% for *Rh.*-277); pH 7.0; Inoculum 1%; Temp. 30°C.