

学校代码: 10251  
学 号: 010120117

# 華東理工大學 博 士 学 位 论 文

论文题目: 皮状丝孢酵母纤维素油脂发酵

及抑制物耐受机制研究

学科专业: 生物化学与分子生物学

研究方向: 生物炼制

论文作者: 王娟

指导教师: 张惠展 教授

定稿日期: 2016年 09 月 29 日



分类号: Q936 密级: \_\_\_\_\_

U D C: \_\_\_\_\_

# 华东理工大学 学位论文

皮状丝孢酵母纤维素油脂发酵  
及抑制物耐受机制研究

王娟

指导教师姓名: 张惠展、教授、生物工程学院

鲍杰、教授、生物工程学院

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物化学与分子生物学

论文定稿日期: 2016. 9. 29 论文答辩日期: 2016. 11. 29

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: \_\_\_\_\_

答辩委员会主席: 刘荣厚 研究员

评阅人: 杨晟 教授

孙润仓 教授

金明杰 教授

赵宗宝 研究员

池振明 教授



## 华东理工大学研究生学位论文提交要求

根据校学位评定委员会要求，研究生学位论文全文（含纸质版和电子版）必须提交档案馆保存。

研究生学位论文全文电子版由档案馆按\_\_\_\_①\_\_\_\_（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ①  可以公开
- ②  3年后公开
- ③  10年后公开
- ④  不公开

注：选择②、③或④的需经学校国家技术转移中心备案，以为学校技术转移提供服务。

学位论文作者签名：王娟

2016年12月13日

指导教师签名：张惠展

2016年12月15日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日



## 作者声明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：王娟

2016年12月13日



## 皮状丝孢酵母纤维素油脂发酵及抑制物耐受机制研究

### 摘要

利用可再生的生物质资源发酵微生物油脂是解决生物柴油的油脂原料的重要途径。皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)作为一种典型的油脂微生物,不但能够利用多种木质纤维素来源的单糖进行高效油脂发酵,而且对木质纤维素来源发酵抑制物具有良好的耐受性,适合于利用木质纤维素原料以生物炼制方式进行微生物油脂的发酵生产。

本文中首先对 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用木质纤维素原料通过干法生物炼制方法生产微生物油脂和合成生物柴油的最大潜能进行了实验研究,分析了该菌株对木质纤维素来源抑制物的耐受能力及降解特性。其次,通过全基因组测序,对其高油脂积累、高抑制物耐受性的分子生物学机制进行了预测,推测了其中心碳代谢、油脂合成及抑制物降解等完整的代谢路径。最后,尝试了以微生物油脂发酵的方式,在利用废水中残糖和其它有机物为底物获得微生物油脂的同时,降低纤维素乙醇发酵废水中的化学需氧量(COD)浓度。此外,还对 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的特性进行了分析,探究了 *T. cutaneum* 菌株对菊糖水解和油脂发酵的整合加工发酵微生物油脂的能力。

木质纤维素生物质预处理过程中生成的抑制物对后续的纤维素酶活性,以及油脂微生物的活性和代谢都会产生严重的抑制,导致后续的生物转化无法正常进行。因此,寻找具有高抑制物耐受性的油脂微生物是纤维素油脂生产的首要问题。本文首先以实验手段对 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用木质纤维素原料经过干法生物炼制加工后的油脂发酵最大潜能进行了评价。玉米秸秆原料经过干法稀酸预处理和生物脱毒后,在不同秸秆固体含量的条件下进行纤维素酶水解以获得富含葡萄糖、木糖等可发酵单糖的玉米秸秆水解液。*T. cutaneum* ACCC 20271 在玉米秸秆水解液中表现出了优良的生长、油脂累积等性能。以干法生物炼制技术获得的玉米秸秆水解液为原料,菌体干重及油脂产量分别达到 31.31 g/L 和 8.57 g/L。

微生物对抑制物的耐受性主要是体现在其对抑制物的降解性能。本文首次分析、推测了 *T. cutaneum* ACCC 20271 对木质纤维素来源抑制物的耐受能力、降解能力和降解机制。木质纤维素预处理过程中产生的抑制物主要包括有机弱酸、呋喃醛和酚醛三种类型。本文选取甲酸、乙酸、乙酰丙酸作为有机弱酸的代表性抑制物,糠醛、羟甲基糠醛作为呋喃醛的代表性抑制物,以香草醛、丁香醛、4-对羟基苯甲醛作为酚醛的代表性抑制物。这些抑制物对各类油脂微生物具有明显的抑制作用,限制其生长及后续的发酵生产。研究发现 *T. cutaneum* ACCC 20271 可耐受 6 g/L 甲酸、25 g/L 乙酸、10 g/L 乙酰丙酸、5 g/L HMF、2 g/L 香草醛、2.5 g/L 丁香醛;该菌株对糠醛最为敏感,低含量的糠醛(0.5 g/L)

即可显著抑制其生长；4-羟基苯甲醛次之(2.5 g/L)。 *T. cutaneum* ACCC 20271 可以完全将有机弱酸中的甲酸、乙酸完全转化，并将糠醛、HMF，以及丁香醛、香草醛、4-羟基苯甲醛通过先还原为相应的醇，再通过氧化反应生成低浓度醛和酸的方式将高毒性的抑制物转化为低毒性的酸，其中而 4-羟基苯甲醛和香草醛可以实现完全转化进入中心碳代谢，而糠醛、HMF、丁香醛只能以其相应的醇和酸的形式存在而不能实现终极降解。通过长期适应性培养得到驯化菌株 *T. cutaneum* 277，该驯化菌株于 15% 未脱毒玉米秸秆水解液中的油脂产量为 5.17 g/L，而原始菌株仅为 0.15 g/L。

在对抑制物降解实验基础上，本文采用 Illumina-Miseq 测序平台对 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行全基因组测序和相应的基因注释，并根据全基因组测序数据对 *T. cutaneum* ACCC 20271 的高油脂积累和高抑制物耐受性的机制进行了分析。*T. cutaneum* ACCC 20271 的基因组全长 30.45 Mb，预测到 5704 个蛋白编码基因，925 个非编码 RNA 基因。依据基因组注释对 *T. cutaneum* ACCC 20271 的中心碳代谢、油脂合成路径进行了推测。该菌株中含有完整的糖酵解、三羧酸循环(TCA)、戊糖磷酸途径(PPP)、脂肪酸合成路径、磷脂及甘油三酯合成、脂肪酸  $\beta$ -氧化、乙醛酸循环等代谢路径。根据实验结果、基因组注释及已有的相关研究报道，首次完成了 *T. cutaneum* ACCC 20271 的木质纤维素来源抑制物生物转化和脱毒的代谢路径推测。对呋喃醛、酚醛代谢路径上的功能基因进行了收集和整理，并与圆红冬孢酵母(*Rhodosporidium toruloides* NP11)、耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica* CLIB122)、油脂丝孢酵母(*Trichosporon oleaginosus* IBC0246)三株油脂酵母进行了比对分析。*T. cutaneum* ACCC 20271 中的醇脱氢酶、醛还原酶、醛脱氢酶、氧化酶编码基因共计 101 个，这可能是其对抑制物高耐受性的重要生物学基础。

最后，对利用油脂酵母发酵的方式以降低纤维素乙醇发酵废水的化学需氧量(COD)的方法进行了实验分析和可行性评估。纤维素乙醇发酵醪精馏后得到的塔底出料，再经过固液分离后的废水中含有大量可以被油脂酵母利用的单糖和有机组分，COD 值高达 112.41 g/L。本文以 *T. cutaneum* ACCC 20271 为发酵菌株在纤维素乙醇发酵废水中进行油脂发酵，培养 120 h 后废水中的 COD 值降低至 53.31 g/L，同时菌体干重及油脂产量分别达到 16.20、2.16 g/L。脂肪酸组分分析结果表明，*T. cutaneum* ACCC 20271 利用纤维素乙醇发酵废水累积得到的油脂与植物油相似，可作为生物柴油生产的原料。这一方法在获得微生物油脂的同时，COD 值降低了 55.05%，部分实现了以油脂发酵方式进行纤维素乙醇发酵废水处理以降低 COD 的目标。

此外，本文对以菊粉为原料的 *T. cutaneum* 油脂发酵进行了旨在实现酶水解和油脂发酵整合生物加工方式的过程研究。发现 *T. cutaneum* ACCC 20271 可以直接利用菊粉进行生长及油脂累积，证明了细胞中菊粉水解酶的存在。分析了 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的最适 pH 及最适温度等酶学特性，结果表明在 30-70℃ 范围内，随温度升高该酶的稳定性降低，而在 pH 3.5-6.5 的范围内其稳定性没有显著变化。结合基因组注释等信息，推测 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶为  $\beta$ -果糖苷酶。

通过上述研究，发现 *T. cutaneum* ACCC 20271 可将木质纤维素来源抑制物完全降解

或转化为低毒的醇、酸，具有高效利用木质纤维素来源单糖发酵油脂的能力；首次推测出 *T. cutaneum* ACCC 20271 酵母中典型抑制物的生物转化与脱毒的代谢路径；利用 *T. cutaneum* ACCC 20271 可显著降低纤维素乙醇发酵废水的 COD 浓度，并可累积一定量可作为生物柴油原料的油脂；菊粉水解酶的存在是 *T. cutaneum* ACCC 20271 整合生物加工菊粉生产微生物油脂的重要生物学基础。这些研究结果将为皮状丝孢酵母生产微生物油脂的深入研究、基因工程改造、产业化生产等奠定理论基础。

**关键词：**皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum* ACCC 20271)；微生物油脂；木质纤维素；抑制物；代谢路径；纤维素乙醇发酵废水；整合生物加工



## Cellulosic Lipid Fermentation by *Trichosporon cutaneum* and Inhibitors Tolerance Mechanism Study

### Abstract

Microbial lipid derived from renewable biomass feedstock for the biodiesel production is an important way to solve the shortage of oil resources. *Trichosporon cutaneum*, one typical oleaginous microbe, possesses both of the capabilities of metabolism various monosaccharides derived from lignocellulose for lipid accumulation and excellent tolerance to lignocellulose derived inhibitors, that it is considered to be a microbial lipid production strain using lignocellulosic biomass in biorefinery way.

Firstly, the highest potential of microbial lipid production of *T. cutaneum* using lignocellulose material in biorefinery way was analyzed, and biodiesel was synthesized. The tolerance and degradation of *T. cutaneum* to lignocellulose derived inhibitor were studied. Secondly, with genome sequencing, the molecular biological mechanism of high lipid accumulation capability and robust inhibitor tolerance was predicted, central metabolism, lipid accumulation and inhibitors degradation pathways were speculated. Thirdly, explored to reduce the COD concentration of cellulosic ethanol fermentation wastewater by *T. cutaneum* in fermentation way, and accumulate lipid simultaneously. Moreover, the characteristics of inulin hydrolysis enzyme, the possibility of inulin hydrolysis and consolidated microbial lipid production by *T. cutaneum* using inulin were studied.

The inhibitors generated during lignocellulose process exhibit the subsequent enzyme hydrolysis, the activity and metabolism of oleaginous microbe, that the biotransformation could not be carried out normally. Therefore an ideal oleaginous fermenting strain should accumulate high lipid content, and also tolerate the toxic inhibitors when lignocellulose is used as feedstock. The maximum potential of lipid accumulation capacity of *T. cutaneum* ACCC 20271 was investigated using lignocellulosic biomass in dry biorefinery way firstly. Dry dilute acid pretreated corn stover was hydrolyzed by cellulase in different solid loading to obtain the corn stover hydrolysate which was rich in glucose, xylose and other fermentable sugars. *T. cutaneum* ACCC 20271 exhibited excellent performance in growth and lipid production within corn stover hydrolysate. The dry cell weight and the lipid titer of *T. cutaneum* ACCC 20271 cultured in corn stover hydrolysate obtained in dry biorefinery way, were 31.31 g/L, 8.57 g/L respectively.

Microbial inhibitor tolerance is mainly reflected in its performance of degradation inhibitor. The tolerance, degradation potential and metabolism mechanism of *T. cutaneum* ACCC 20271 to lignocellulose derived inhibitors were firstly systematically analyzed. Weak acids, furan aldehydes and phenolic aldehydes were the major inhibitors generated during the

pretreatment process of lignocellulose. Formic acid, acetic acid, levulinic acid, were representative of weak acid; furfural, 5-hydroxymethylfurfural, were representative of furan aldehyde; and 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, syringaldehyde, were representative of phenolic aldehyde. These inhibitors would inhibit various microorganisms, in the way of inhibiting their growth and subsequent fermentation. It was found that *T. cutaneum* ACCC 20271 exhibited the capability of tolerance to 6 g/L of formic acid, 25 g/L of acetic acid, 10 g/L of levulinic acid, 5 g/L of 5-hydroxymethylfurfural, 2 g/L of vanillin, 2.5 g/L of syringaldehyde, while it was sensitive to furfural which was obviously inhibited the cell growth in low concentration (0.5 g/L), followed by 4-hydroxybenzaldehyde (2.5 g/L). Formic acid, acetic acid could ultimately converted by *T. cutaneum* ACCC 20271, furfural, HMF, vanillin, syringaldehyde and 4-hydroxybenzaldehyde could transform into corresponding alcohols followed by less toxic acids which were reverse transformed into low concentration of aldehydes and corresponding acids. Vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde could be ultimately degraded by *T. cutaneum* ACCC 20271. While the degradation of furfural, HMF and syringaldehyde stop in the corresponding alcohols and acids instead of ultimate degradation. The lipid titer of the adapted strain *T. cutaneum* 277 which obtained after long term adaptation culture was 5.17 g/L in 15% freshly pretreated corn stover hydrolysate, while the original strain was only 0.15 g/L.

Based on the inhibitor metabolism experiments, the genome of *T. cutaneum* ACCC 20271 was sequenced on Illumina-Miseq platform to reveal the mechanism of inhibitor tolerance and degradation. The central metabolism and lipid biosynthesis pathways were studied based on genome annotation. The genome length of *T. cutaneum* ACCC 20271 was 30.45 Mb. A number of 5704 protein-coding genes and 925 non-coding RNA genes were predicted. The central metabolism and lipid accumulation pathways were speculated according to the genome annotation. Glycolysis, tricarboxylic acid (TCA) cycle, pentose phosphate pathway (PPP), fatty acid synthesis, phospholipids and triglyceride synthesis,  $\beta$ -oxidation of fatty acid, glyoxylate cycle, were involved. The metabolic pathways of the lignocellulose derived inhibitor bioconversion and biodegradation in *T. cutaneum* ACCC 20271, which was a representative of oleaginous yeasts, were firstly constructed based on experiment results, the genome annotation and previous relative reports. Putative genes involved in the biodegradation of furan aldehydes and phenolic aldehydes in *T. cutaneum* ACCC 20271 were collection and compared with other three oleaginous yeasts: *R. toruloides* NP11, *Y. lipolytica* CLIB122 and *T. oleaginous* ICB0246. Perhaps the rich source of alcohol dehydrogenase, aldehyde reductase, aldehyde dehydrogenase and oxidases genes totally in 101 in *T. cutaneum* ACCC 20271 was one of the reasons of high tolerance to inhibitors than these three oleaginous yeasts.

Thirdly, the method of reducing the chemical oxygen demand (COD) concentration of cellulosic ethanol fermentation wastewater by oleaginous yeast in the way of fermentation was analyzed in experiment and its feasibility was assessed. The wastewater after solid-liquid separation of the bottom discharge of rectifying column for cellulosic ethanol rectification was containing large amount of monosaccharides, organic compounds, and high COD

concentration of 112.41 g/L. *T. cutaneum* ACCC 20271, as the fermentation strain, inoculated into the cellulosic ethanol fermentation wastewater for lipid fermentation. The COD concentration was reduced to 53.31 g/L from 118.58 g/L after 120 h culture, and the dry cell weight and lipid titer reached to 16.20, 2.16 g/L. The composition of microbial lipid produced by *T. cutaneum* ACCC 20271 using cellulosic ethanol fermentation wastewater was similar with vegetable oil indicating that it could be used as raw material for biodiesel production. In this way the microbial lipid accumulated, simultaneously the COD concentration of the wastewater was reduced 55.05%, partly achieved the target of COD reduction of cellulosic ethanol fermentation wastewater in the way of lipid fermentation.

Furthermore, the microbial lipid production by *T. cutaneum* ACCC 20271 using inulin was studied to achieve consolidated bioprocessing inulin hydrolysis and lipid fermentation. It was found that *T. cutaneum* ACCC 20271 could utilize inulin directly for cell growth and microbial lipid accumulation, which proved the existence of inulin hydrolysis enzyme in cellular. The inulin hydrolysis enzyme of *T. cutaneum* ACCC 20271 was characterized in this part. The optimal temperature and pH were analyzed. The stability of the enzyme declined with temperature increase and in the range of 30~70 °C, while it did not obviously affected by pH in the range of 3.5~6.5. Combined with the genome annotation, it was proposed that the inulin hydrolysis enzyme of *T. cutaneum* ACCC 20271 was  $\beta$ -fructofuranosidase.

Conclusively, *T. cutaneum* ACCC 20271 possesses the capability of ultimately degradation or transformation the inhibitors into less toxic corresponding alcohols or acids, and lipid fermentation using monosaccharides derived from lignocellulose. The metabolism pathway of biotransform and biodetoxification of the inhibitors was firstly speculated in oleaginous yeast. The COD concentration of cellulosic ethanol fermentation wastewater could be obviously reduced by *T. cutaneum* ACCC 20271, and obtained certain amount of lipid for biodiesel production. The existence of the inulin hydrolysis enzyme was important biological basis for the consolidated bioprocessing of microbial lipid production by *T. cutaneum* ACCC 20271. All of the theses results will provide a basic theoretical support for the further study of microbial lipid, genetic engineering and industrial production development by *T. cutaneum*.

**Key words:** *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271; Microbial lipid; Lignocellulose; Inhibitor; Metabolic pathways; Cellulosic ethanol fermentation wastewater; Consolidated bioprocessing



## 目录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 能源与环境问题 .....	1
1.2 生物柴油概述 .....	1
1.3 生物航空煤油的制备 .....	3
1.4 油脂微生物.....	3
1.4.1 微藻 .....	4
1.4.2 细菌 .....	4
1.4.3 霉菌 .....	5
1.4.4 酵母 .....	5
1.5 微生物油脂的合成途径 .....	7
1.5.1 脂肪酸的生物合成 .....	7
1.5.2 酰链延长.....	8
1.5.3 甘油三酯(TAG)的合成 .....	8
1.6 微生物油脂发酵原料 .....	9
1.6.1 工业废水.....	9
1.6.2 非粮作物.....	9
1.6.3 木质纤维素.....	11
1.7 木质纤维素微生物油脂的生物炼制技术.....	11
1.7.1 木质纤维素的预处理 .....	11
1.7.2 木质纤维素来源抑制物的形成及对微生物的抑制机制.....	12
1.7.3 木质纤维素来源抑制物的脱毒 .....	14
1.7.4 生物炼制生产微生物油脂.....	15
1.8 组学分析.....	15
1.8.1 高通量测序在油脂微生物研究中的应用.....	16
1.8.2 高通量测序在抑制物代谢研究中的应用.....	16
1.9 本论文的主要研究内容 .....	16
第 2 章 皮状丝孢酵母利用木质纤维素原料生产微生物油脂.....	19
2.1 引言 .....	19
2.2 实验材料.....	20
2.2.1 原材料.....	20
2.2.2 菌种及培养基 .....	20
2.3 实验方法.....	20
2.3.1 种子培养.....	20

2.3.2	玉米秸秆的预处理 .....	20
2.3.3	预处理后玉米秸秆的生物脱毒 .....	20
2.3.4	玉米秸秆组分测定 .....	21
2.3.5	纤维素酶及水解液制备 .....	21
2.3.6	微生物油脂发酵 .....	21
2.3.7	菌体干重及油脂测定 .....	23
2.3.8	油脂中脂肪酸组分测定 .....	23
2.3.9	抑制物耐受性及降解分析 .....	23
2.3.10	高效液相色谱(HPLC)分析 .....	23
2.3.11	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 的适应性驯化 .....	24
2.3.12	生物柴油的合成 .....	24
2.3.13	生物柴油性能测定 .....	24
2.4	结果与讨论 .....	25
2.4.1	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 利用不同固含量玉米秸秆水解液生产微生物油脂 .....	25
2.4.2	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 利用脱毒玉米秸秆制备的水解液生产微生物油脂 .....	28
2.4.3	生物柴油的合成 .....	28
2.4.4	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 对木质纤维素来源抑制物的耐受性分析 .....	31
2.4.5	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 对木质纤维素来源抑制物的生物转化与脱毒 .....	36
2.4.6	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 在玉米秸秆水解液中长期适应性培养 .....	42
2.5	小结 .....	47
第 3 章 皮状丝孢酵母基因组测序及抑制物代谢路径解析 .....		49
3.1	引言 .....	49
3.2	材料与方法 .....	49
3.2.1	基因组 DNA 提取 .....	49
3.2.2	全基因组测序、组装与拼接 .....	50
3.2.3	蛋白编码基因预测及功能注释 .....	50
3.2.4	进化树分析 .....	50
3.3	结果与讨论 .....	50
3.3.1	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 全基因测序与组装结果 .....	50
3.3.2	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 基因功能预测与分析结果 .....	52
3.3.3	进化树分析 .....	56
3.3.4	中心代谢及油脂合成路径 .....	57
3.3.5	氮代谢路径 .....	61
3.3.6	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 中木质纤维素来源抑制物代谢路径 .....	64
3.4	小结 .....	71

第 4 章 皮状丝孢酵母利用纤维素乙醇发酵废水生产微生物油脂.....	73
4.1 引言.....	73
4.2 实验材料.....	74
4.2.1 种子培养.....	74
4.2.2 纤维素乙醇发酵废水的准备.....	74
4.3 实验方法.....	74
4.3.1 高效液相色谱(HPLC)分析.....	74
4.3.2 废水总糖含量测定.....	74
4.3.3 废水总酚含量测定.....	75
4.3.4 废水中 COD 测定.....	75
4.3.5 不同培养条件对 <i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 处理乙醇发酵废水及微生物油脂累积的影响.....	75
4.3.6 发酵罐实验.....	75
4.3.7 菌体干重及油脂测定.....	75
4.3.8 油脂组分测定.....	75
4.3.9 废水的深度微生物降解.....	75
4.4 结果与讨论.....	75
4.4.1 转速对 <i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 处理乙醇发酵废水及生产微生物油脂的影响..	75
4.4.2 pH 对 <i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 处理乙醇发酵废水及生产微生物油脂的影响....	77
4.4.3 营养盐对 <i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 处理乙醇发酵废水及生产微生物油脂的影响.....	80
4.4.4 发酵罐实验.....	82
4.4.5 与其他油脂微生物处理废水的发酵结果相比较.....	86
4.4.6 废水的深度微生物降解.....	86
4.4.7 乙醇代谢路径.....	87
4.5 小结.....	87
第 5 章 皮状丝孢酵母菊粉水解酶特性分析及整合生物加工菊粉生产微生物油脂.....	89
5.1 引言.....	89
5.2 实验材料.....	90
5.2.1 原材料.....	90
5.2.2 菌种及培养基.....	90
5.3 实验方法.....	90
5.3.1 种子培养.....	90
5.3.2 Bradford 溶液配制.....	90

5.3.3	DNS 溶液配制 .....	90
5.3.4	菊粉测定方法 .....	90
4.3.5	微生物油脂发酵 .....	91
5.3.6	菌体干重及微生物油脂含量测定 .....	91
5.3.7	微生物油脂组分分析 .....	91
5.3.8	菊粉水解酶粗酶液制备及酶活测定 .....	91
5.3.9	pH 对菊粉水解酶酶活及稳定性的影响 .....	91
5.3.10	温度对菊粉水解酶酶活及稳定性的影响 .....	91
5.3.11	蛋白质含量的测定 .....	91
5.3.12	菊粉水解酶亚细胞分布 .....	91
5.3.13	菊粉水解酶的纯化 .....	92
5.3.14	SDS-PAGE .....	92
5.4	结果与讨论 .....	92
5.4.1	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 菊粉水解酶的发现 .....	93
5.4.2	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 菊粉水解酶生产特性 .....	93
5.4.3	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 菊粉水解酶特性 .....	97
5.4.4	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 利用菊粉生产微生物油脂的条件优化 .....	100
5.5	小结 .....	103
第 6 章	结论与展望 .....	105
6.1	结论与创新点 .....	105
6.1.1	结论 .....	105
6.1.2	创新点 .....	106
6.2	展望 .....	106
	参考文献 .....	109
	附录 I 仪器设备 .....	131
	博士期间研究成果 .....	132
	致谢 .....	133

## 第 1 章 绪论

### 1.1 能源与环境问题

对于经济增长、人们生活水平的提高而言,能源已经成为一个至关重要的部分。根据国际能源署(International Energy Agency, IEA)报告,2030 年全世界能源需求总量要比现在多 50%,而中国和印度所消耗的能源占总量的 45%。中国依旧是能源消耗量最多的国家。到目前为止煤炭依旧是我国能源消耗的主要形式,占全球煤炭消耗总量的 50%。在过去的 30 多年中,交通经历了一个稳定的发展阶段,尤其是全世界范围内汽车的数量猛增。交通能源已成为继工业之后的第二大能源消费领域,占全球总能源消费量的 30%。并且在未来几十年中仍然以稳定的速度在增长,粗略估算从 2005 年至 2035 年全球交通能源使用量将以 1.8% 的速率增长。据国际能源署 2015 年的报道,化石燃料仍将是能源消耗的主要部分。

气候变化是全球最紧迫的环境问题。如果大气温度上升 2℃ 数百万的物种就会面临灭亡,同时数百万的人将失去生命<sup>[1]</sup>。2007 年至 2020 年二氧化碳排量为 41 亿吨,2020 年至 2035 年二氧化碳排放量将达到 86 亿吨。1990 年至 2001 年之间,仅运输燃料排放至大气中的温室气体就提高了 20%<sup>[2]</sup>。

原油价格快速上涨、石油供应的减少、环境问题的日益严峻等诸多问题,促使我们去寻求新能源。为解决这些问题,目前已有越来越多研究团队投入到生物能源的研究中。在诸多生物能源中,生物乙醇技术是研究较早、也是较成熟的。与生物乙醇相比,生物柴油不仅释放的能量多 68%,并且 CO<sub>2</sub> 的排放量减少 30%。所以与生物乙醇相比,生物柴油具有更大的发展潜力。目前生物柴油主要由动植物油脂生产而来。伴随着对生物柴油需求量的日益增多,由可食用的动、植物油脂来生产生物柴油变得不现实。这也推动了基于木质纤维素的第二代生物炼制的发展。

### 1.2 生物柴油概述

目前绝大多数的液体运输燃料是来源于石油的。为降低对石油燃料的依赖,人们开始尝试利用可再生资源生产液体运输燃料的大规模研究。美国能源部制定目标,到 2030 年实现生物燃料的年产量为 600 亿加仑,而欧盟的目标是在 2030 年供应的生物燃料能满足运输燃料总需求量的 25%<sup>[3]</sup>。

人们对微生物油脂的研究最早可追溯到第一次世界大战时期,当时德国针对食用油储备紧张的状态,通过 *Endomyces* 和 *Fusarium sp.* 来生产油脂<sup>[4]</sup>。近年来由于能源紧缺、环境安全等问题,迫使我们去寻求新的可再生生物燃料。作为最具发展潜力的生物柴油,受到越来越多的关注。生物柴油,即脂肪酸甲酯的混合物,可通过动植物油脂和废弃油脂的转酯化反应得到<sup>[5]</sup>。

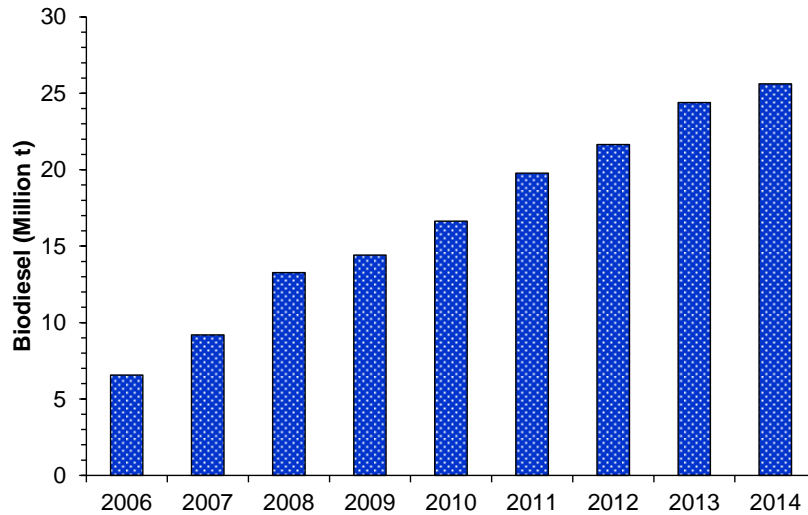
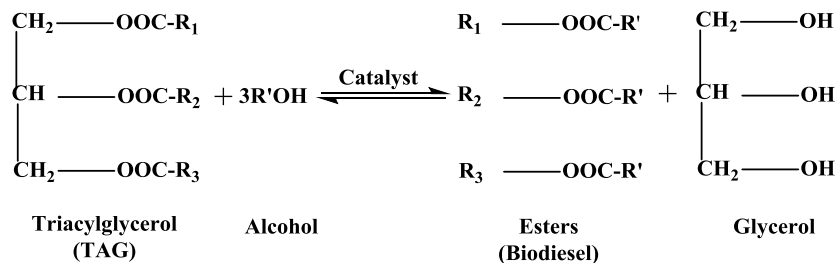
图 1-1 2006—2014 年全球生物柴油产量<sup>[6]</sup>Figure 1-1 Global biodiesel production in 2006—2014<sup>[6]</sup>

图 1-2 微生物油脂转酯化合成脂肪酸单酯（生物柴油）

Figure 1-2 Fatty acid methylesters (biodiesel) synthesized by transesterification from microbial lipid

生物柴油最大的一个优点就是可以用于现在的发动机、车辆和基础设施，而不要再做其他重大改变<sup>[7]</sup>。目前生物柴油已进入快速发展的时期。2007 年仅有 20 个国家生产生物柴油，至 2010 年已有 200 多个国家成为生物柴油的生产及供应国。从 2006 年至 2014 年全世界生物柴油的年产量已由 656.8 万吨/年提高至 2562 万吨/年，如图 1 所示。随生物柴油产量的上升，作为原材料的植物油的需求量也逐年提高。这意味着必须大规模种植油料作物才能满足其需求量，这不但要占用大面积的耕地，还会与我们竞争食用油、导致食用油价格上涨，带来诸多负面影响。

故以消耗粮食为代价的第一代生物炼制技术引发了较大的争议，并刺激了基于非食用原料的二代生物炼制技术的诞生与发展<sup>[8]</sup>。但是当前生物柴油的成本比石油基柴油的成本大约高 30%<sup>[9]</sup>。而生物柴油生产成本主要是来自材料的成本<sup>[10]</sup>。降低微生物油脂的成本，开发新的碳源以替代葡萄糖、淀粉等，对于生物柴油的生产及发展来讲具有非常重要的现实意义。据文献报道，木糖、甘油、玉米秸秆和其他工农业废弃物可作为微生物油脂生产的原料。

微生物油脂主要由甘油三酯(TAGs)构成，因具有与植物油脂相似的脂肪酸组分，已证实可作为生物柴油生产的原料，因而受到越来越多的关注。在酸或碱的催化下 TAGs

与醇（甲醇或乙醇）发生转酯化反应生成脂肪酸甲酯即生物柴油及副产物甘油<sup>[11]</sup>，如图 1-2 所示。

### 1.3 生物航空煤油的制备

航空煤油是民用客机的主要燃料<sup>[12]</sup>，占总燃料消耗量的 10~15%<sup>[13]</sup>。航空煤油由不同馏分的烃类化合物构成，即 C18-C16 的烷烃、环烷烃和一些烯烃。长链烷烃是制备航空煤油的主要原料，从油脂出发制备长链烷烃的主流技术为加氢脱氧，如图 1-3 所示。微生物油脂主要由 C16-C18 的脂肪酸形成的甘油三酯组成，在热的液体介质中即可水解生成饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸及甘油。饱和脂肪酸可通过脱羧、脱酸反应直接脱去氧而生成烷烃<sup>[14]</sup>。近年来不饱和脂肪酸原位加氢脱羧一步制备长链烷烃的研究受到诸多关注，如 Popov 和 Kumar<sup>[15]</sup>、Hollak 等<sup>[16]</sup>、Sari 等<sup>[17]</sup>、Vardon 等<sup>[13]</sup>、Na 等<sup>[18]</sup>、Shim 等<sup>[19]</sup>，就不饱和脂肪酸制备长链烷烃而开展工作并取得了卓有成效的成果，其主流研究思路为利用甲醇、甲酸等供氢剂，代替氢气对不饱和脂肪酸的双键进行原位加氢，同时催化脂肪酸的脱羧，得到相应的长链烷烃。目前已有以微藻油、地沟油为原料制备长链烷烃的研究报道<sup>[20, 21]</sup>。

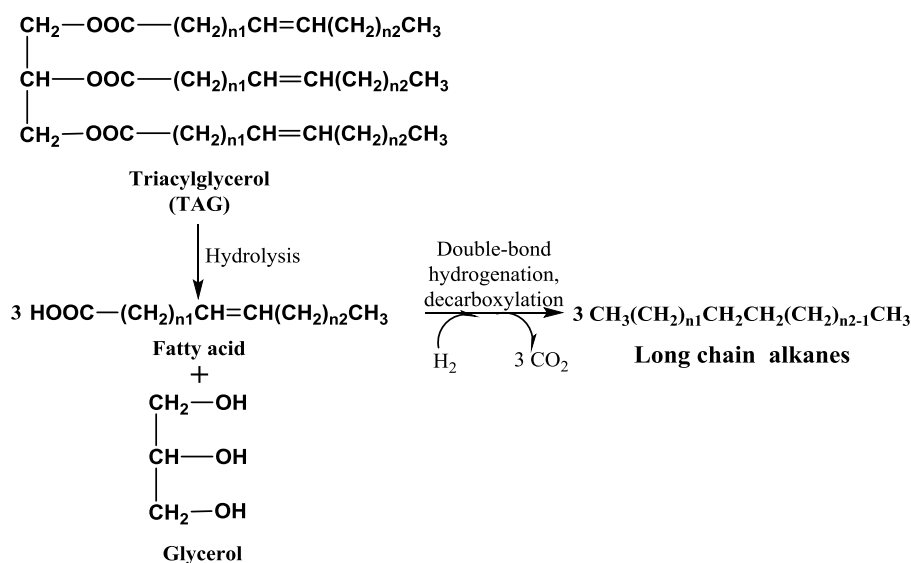


图 1-3 油脂加氢催化制备烷烃的反应<sup>[22]</sup>

Figure 1-3 Catalytic hydrogenation of lipid to alkane<sup>[22]</sup>

### 1.4 油脂微生物

油脂微生物即含油率超过其细胞重量的 20%的微生物<sup>[23]</sup>，甚至某些微生物的油脂含量能达到其细胞重量的 70%。微生物油脂(microbial lipid)，也称为单细胞油脂(single cell oil)，产自酵母、真菌、细菌、藻类等油脂微生物<sup>[24]</sup>。绝大多数油脂微生物累积的油脂主要以甘油三酯(TAGs)的形式贮存在油脂小体内。微生物油脂脂肪酸组成与植物油相似，并且均富含多不饱和脂肪酸，如  $\gamma$ -亚油酸<sup>[25, 26]</sup>。酵母、霉菌和微藻生产的甘油三酯

(TAGs), 与植物油脂的组成成分相似, 可作为生物柴油生产的原料。但是细菌仅用于合成某些特定的油脂, 并且产量有限。所以酵母及霉菌受到诸多关注, 尤其是油脂酵母, 由于可在胞内累积大量的脂肪酸而成为现在的研究热点<sup>[27]</sup>。藻类以二氧化碳为碳源进行光合自养生长或以有机碳为碳源进行异养生长, 并且它们还可利用光照及有机碳为碳源进行混合培养。由于对光照的需求, 不同的季节甚至每天的阳光都存在变化, 所以微藻大规模的自养培养是比较难以实现的。而非自养藻类的培养稍容易些并能扩大到发酵水平, 但是需要消耗有机碳源而限制了该类藻类在生物柴油生产中的发展潜势<sup>[11]</sup>。对于真菌来讲, 利用廉价碳源进行油脂生产将大大降低生产成本, 这对于生物柴油未来的发展具有重要意义<sup>[11]</sup>。

#### 1.4.1 微藻

利用微藻来生产能源的概念早在 50 年前就被提出<sup>[28]</sup>, 但是一直到 20 世纪 70 年代石油危机的时候才真正开始被广泛研究。一般来讲当微藻的油脂含量超过其干重的 20% 的时, 即可称之为油脂微藻。藻类细胞油脂含量大多在 20~50% 之间<sup>[29]</sup>, 但是在某些特定条件下, 可以达到其干重的 75% 甚至更高<sup>[30, 31]</sup>。绿藻、硅藻等微藻的含油率较高并且易于培养, 如 *Chlorella* 是一理想的能源微藻, 可用于工业生产中<sup>[32]</sup>。国际能源研究机构、生物能源开发公司和科研人员为进一步提高油脂产量并更深入的了解 *Chlorella*, 从多方面展开了对 *Chlorella* 的研究。Miao 等通过细胞工程技术手段获得了含油率为 55% 的 *chlorella*, 比野生细胞 (14%) 相比提高了 4 倍<sup>[30]</sup>。Gao 等从基因组、转录组及蛋白质组学多组学水平探究了 *Chlorella* 油脂累积的机制<sup>[32]</sup>。

早在上世纪 90 年代, 美国国家可再生能源实验室(National Renewable Energy Laboratory, NREL)就展开了“*Cyclotella* 工程”的工作, 在自然界中 *Cyclotell* 的含油率一般在 5~20% 之间, 在实验室规模的特定培养条件下其含油率达到了 60%, 在室外大规模培养中其含油率在 40% 以上<sup>[33]</sup>。1990 至 1999 年期间, 日本政府投资了“CO<sub>2</sub> 的生物固定及利用”研究项目<sup>[34]</sup>。该项目取得的成果有获取油脂生产的菌株、建立光发酵系统、光反应器的设计等, 这些研究成果依旧应用于现在的科研当中。培养微藻需要阳光、水、CO<sub>2</sub>、氮和磷。微藻大规模培养必须利用阳光作为唯一的光能。在低纬度的夏天, 过强的光照反而会打破光合作用的周期, 微藻生长受到限制并降低产量。近年来在提高过强光照条件下微藻的光合作用效率方面展开了较多的科研工作, 例如开发小触须的新菌株<sup>[35]</sup>, 在高密度细胞培养中降低光合反应器的光路, 同时增加混合光路等<sup>[36]</sup>。由于微藻对光照的高度需求导致利用微藻生产生物燃料还未实现工业化生产。

#### 1.4.2 细菌

大多数细菌在某些特定条件下可累积油脂。但是细菌生产的油脂组分与其他油脂微生物的不同。大多数细菌仅可生产复杂的类脂, 仅少数细菌生产的油脂可作为生物柴油生产的原料<sup>[37]</sup>。并且由于类脂主要锚定在膜的内含物中所以难以提取得到<sup>[38]</sup>。Zhang 等筛选得到一株核桃内生细菌(*Bacillus subtilis* HB1310), 该菌株油脂胞内油脂累积含量为其菌体干重的 39.8%, 通过脂肪酸组分分析表明该油脂可作为生物柴油生产的原料<sup>[39]</sup>。

与其他油脂微生物相比,人们对细菌的基因操作机制的了解更加深入。为提高油脂累积量,研究者通过生物工程技术、遗传工程及代谢工程等手段构建了许多工程菌株<sup>[40]</sup>。据报道,通过代谢工程构建的大肠杆菌(*Escherichia coli*)可直接生产生物柴油,脂肪酸甲酯浓度达到 1.28 g/L<sup>[41]</sup>。虽然该产量较低,但是它为生物柴油的发展提供了一个新的理念。

#### 1.4.3 霉菌

某些霉菌可累积油脂,占其菌体干重的 25%以上<sup>[42]</sup>。常见的油脂霉菌有:深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)、高山被孢霉(*Mortierella alpine*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)、轮枝霉属(*Dmsporangium*)等。油脂霉菌生产的油脂主要是由饱和脂肪酸和及具营养价值的  $\gamma$ -亚油酸、二高- $\gamma$ -亚麻酸、花生四烯酸、二十二碳六烯酸、十二碳五烯酸构成<sup>[43]</sup>。由于 *M. isabellina* 可累积大量油脂,所以经常作为模式油脂霉菌而被用于研究油脂的生物合成及累积。Kikukawa 等通过基因工程的方式,敲除 *M. isabellina* 的  $\Delta 5$ -去饱和酶基因,使得油脂中双高- $\gamma$ -亚麻酸的含量达到了 40.1%<sup>[44]</sup>。Ye 等<sup>[45]</sup>从基因组水平对油脂霉菌 *M. alpine* 的代谢模型进行了分析,发现氧气水平与脂肪酸不饱和度相关。

#### 1.4.4 酵母

油脂酵母是最常见的产油微生物,也是研究的最广泛的。常见的油脂酵母有解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*)、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)、弯假丝酵母(*Candida curvata*)、斯达氏酵母(*Lipomyces starkeyi*)、油脂丝孢酵母(*Trichosporon oleaginosus*)、发酵丝孢酵母(*Trichosporon fermentans*)、皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)等。油脂酵母具备生长迅速、高细胞浓度等优点,易于大规模培养发酵生产油脂。大多数酵母油脂组分是与植物油脂的相似,主要有 C16、C18 链的脂肪酸组成:软脂酸(C16:0)、棕榈油酸(C16:1)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)和硬脂酸(C18:0)等,可作为生物柴油生产的优良原材料。

基因组测序的完成及完整的基因操作技术的建立,使得 *Y. lipolytica* 成为生物技术研究模式菌株<sup>[77]</sup>。*Y. lipolytica* 油脂从头合成的代谢路径已经完整解读<sup>[78]</sup>。Liu 等<sup>[46]</sup>建立了一种提高 *Y. lipolytica* 的进化代谢工程的方法,成功得到一株高含油率(76%)的菌株。Qiao 等<sup>[79]</sup>通过过表达  $\Delta 9$  硬脂酰-CoA 去饱和酶基因、乙酰-CoA 羧化酶基因及二酰甘油酰基转移酶基因研究了饱和脂肪酸对油脂微生物合成过程的变构抑制作用。为研究油脂酵母的生长并提高油脂生产,Vongsangnak 等<sup>[80]</sup>通过基因组模型构建了 *Y. lipolytica* 的代谢网络,而 Blazeck 等<sup>[81]</sup>结合基因型和表型通过调整 *Y. lipolytica* 的自身代谢以实现其油脂生产的最优化。

表 1-1 油脂酵母利用不同碳源生产油脂的比较

Table 1-1 Comparison of microbial lipid produced by several oleaginous yeasts using different carbon source

Strain	Carbon source	Lipid content	Lipid Titer (g/L)	Reference
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glucose	87.00%	39.1	[46]
	Glycerol	30.10%	1.48	[47]
	Rice Bran Hydrolysate	48.02%	5.16	[48]
	Molasses	30.08%	8.00	[49]
	Fructose	26.20%	9.15	[50]
	Inulin	48.30%	6.42	[51]
	Extract of Jerusalem artichoke tuber	50.60%	7.39	[51]
	Wheat straw hydrolysate	4.60%	0.30	[52]
	Detoxified rice bran hydrolysate	48.02%	5.16	[48]
	Glycerol	43.00%	3.50	[53]
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Glucose	48.00%	72.72	[54]
	Glucose	62.20%	11.20	[55]
	Inulin	70.36%	14.94	[56]
	Jerusalem artichoke tubers	40.00%	39.60	[57]
	Crude glycerol	36.60%	7.60	[58]
	Cassava starch hydrolysate	63.40%	13.95	[59]
	Wheat straw hydrolysate	24.60%	2.40	[52]
	Detoxified bagasse hydrolyzate	52.50%	12.30	[60]
	Corn stover	36.40%	5.50	[61]
	Acetic acid	48.20%	2.10	[62]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Corn cob hydrolysate	36.40%	5.50	[63]
	Crude glycerol	36.50%	5.40	[64]
	Wheat straw hydrolysate	20.70%	2.40	[52]
<i>Trichosporon dermatis</i>	Wastewater	13.50%	1.00	[65]
	Corn cob hydrolysate	40.10%	9.78	[66]
<i>Trichosporon fermentans</i>	Sweetpotato vines hydrolysate	35.60%	9.60	[67]
	Detoxified rice straw hydrolysate	40.10%	11.47	[25]
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Sweet sorghum	47.30%	5.81	[68]
	Wheat straw hydrolysate	29.10%	3.70	[52]
	Potato starch wastewater	8.88%	0.23	[69]
	Fishmeal wastewater	15.34%	2.70	[70]
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Biodetoxified core stover	30.40%	3.11	[71]
	Biodetoxified core stover	3.23 g/L	/	[72]
	Corn cob residues	32.02%	12.30	[73]
	Corn stover hydrolysate	23.50%	3.10	[71]
	Detoxified corn cob acid hydrolysate	45.4%	10.40	[74]
	Corn stover hydrolysate	39.2%	7.60	[75]
	Elephant grass acid hydrolysate	24.0%	5.46	[76]



骤<sup>[83]</sup>。大肠杆菌中的 ACC 由四个亚基构成, 分别由 *accA*、*accB*、*accC* 和 *accD* 基因编码<sup>[84]</sup>, ACC 兼具生物素羧基载体蛋白、生物素羧基亚基和羧基转移亚基三种酶的功能<sup>[85]</sup>。而真核细胞中 ACC 是一多功能域的单链多肽, 发挥 ACC 的所有功能<sup>[86]</sup>。在动物细胞中 ACC 位于胞质中, 利用胞浆中乙酰-CoA 来合成丙二酰-CoA 和酰链的延长。而酵母细胞中既含有胞浆中的 ACC 也有线粒体 ACC 并且结构也是不同的<sup>[87]</sup>。植物中脂肪酸合成发生在种子的质体中, ACC 是利用器官中的乙酰-CoA<sup>[88]</sup>。

### 1.5.2 酰链延长

丙二酰-CoA 一旦生成, 即被丙二酰-CoA:ACP 转酰酶转移至多酶复合体脂肪酸合酶 (FAS) 的酰基载体蛋白 (ACP) 上<sup>[89]</sup>。细菌和植物的 FAS 是属于 II 型 FAS<sup>[90]</sup>, 由多个亚基构成的蛋白, 其中每个亚基是可以分离的, 并能催化一个酶促反应, 而某些油脂霉菌是 I 型 FAS, 即一个多功能蛋白, 如 *M. alpine*<sup>[91]</sup>, 而油脂酵母 *R. toruloides*、*T. oleaginosus* 等是属于 II 型 FAS。

FAS 通过消耗丙二酰-CoA 来催化脂肪酸的延长, FAS 的 ACP 亚基含有一个硫醇基团, 通过形成硫代酸酯而最终形成丙二酰-ACP, 结合正在延伸的脂酰链以确保它的转运<sup>[92]</sup>。ACP 还可通过形成酰基-ACP 来固定乙酰。随后酰基基团被转移至 FAS 的其他亚基上, 酮酰-ACP 合成酶 (KAS) 催化丙二酰-ACP 的固定或延伸的酰基链形成酮丁酰-ACP 或酮乙酰-ACP。这就完成了一次还原、脱氢、还原, 随后开始进行另一个丙二酰-CoA 的固定。这一循环重复进行, 直至棕榈酸 (C16:0) 或硬脂酸 (C18:0) 的生成<sup>[86]</sup>。最后 ACP-硫酯酶将酰链裂解、释放脂肪酸。为得到更长链的脂肪酸或者不饱和脂肪酸, 就需要延长酶和去饱和酶的参与。这些酶位于内质网和线粒体的膜上, 在油脂累积上游的脂肪酸池发挥功能。

### 1.5.3 甘油三脂 (TAG) 的合成

真核生物中 TAG 的合成是在特定的细胞器中完成的, 如线粒体或/和内质网 (植物), 而原核生物中 TAG 的合成是在胞质中进行的。这一过程的产物即中性的油脂, 是细胞以脂肪酸贮备能量的方式<sup>[93]</sup>。以高能量形式的 TAG 来储存能量, 可让细胞有更多的剩余空间<sup>[94]</sup>。

甘油三酯合成的第一步即酰基-CoA:甘油-*sn*-3-磷酸酰基转移酶 (GPAT) 催化甘油-3-磷酸与酰基-CoA 形成溶血磷脂 (LPA)。该酶在 TAG 合成路径中的酶活是比较低的, 很可能是 TAG 合成路径中的限速酶<sup>[95]</sup>。这是因为在转录水平、转录后水平的变构调控。

LPA 受乙酰-CoA:酰基甘油-*sn*-3-磷酸转移酶 (GPAT) 进一步催化, 与另外一个酰基-CoA 连接而生成磷脂 (PA)<sup>[96]</sup>。随后 PA 经磷脂酸磷酸酯酶的作用去磷酸化生成二酰甘油。最后酰基-CoA:二酰甘油酰基转移酶 (DGAT) 催化第三个酰基-CoA 连接到二酰甘油分子上, 生成 TAG 并最终储存于油脂小体中。

油脂小体并非是一个无生命的结构, 而是在油脂形成与二次利用中发挥重要作用<sup>[97]</sup>。并且在大多数油脂细胞内含有多个具有一定大小的油脂小体而非一个大的油脂小体<sup>[98]</sup>。除具备一定的物理特征外, 在临近油脂小体的质膜上还含有许多与 TAG 合成相关的酶

类<sup>[99, 100]</sup>。如在临近油脂小体的质膜上富集有大量的 TAG 合成步骤的最后一步反应的酶——二酰甘油酰基转移酶(DAGAT)<sup>[99]</sup>。除此之外, 油脂小体还含有一类为 24、29、54 kDa 膜蛋白<sup>[99]</sup>。这类蛋白对于维持油脂小体的特定结构、完整性以及避免与临近油脂小体的合并等方面具有重要作用。

## 1.6 微生物油脂发酵原料

从粮食淀粉获得的葡萄糖或蔗糖是微生物生长与发酵最优良的原料, 但其与人竞争粮食等缺点限制了微生物油脂的工业应用, 导致其不具备作为大规模生产生物柴油原料的潜力。微生物油脂生产的高成本 75%来自原料的成本<sup>[101]</sup>。微生物油脂的大规模生产需要寻找廉价易得的原料。发酵废水<sup>[102]</sup>、粗甘油<sup>[64]</sup>、蜜糖等工业废弃物<sup>[47]</sup>、木质纤维素生物质等各种低廉的原料都被用来作为微生物油脂发酵原料使用, 同时还可实现资源的充分利用且减少污染。

### 1.6.1 工业废水

以纤维质原料代替粮食生产燃料乙醇被认为是解决燃料乙醇原料有限和成本高的根本出路。由于废水量较大, 处理废水的技术还不够成熟, 处理成本比较高, 一直是限制纤维素乙醇工业发展的主要因素。有机废水特别是工业有机废水的生化处理被认为是一种理想的绿色工艺, 可望在解决其环境污染的同时, 通过制备生化产品获得一定的经济效益。传统的有机废水生化法常用如厌氧-好氧联合工艺、生物膜反应器处理等。这些技术对发酵废水的处理效率较高, 但往往还需要一些特殊设备。近年来, 酵母尤其是油脂酵母处理各类有机废水成为了环境工程的研究热点, 如斯达氏油脂酵母(*L. starkeyi*)<sup>[69]</sup>、圆红冬孢酵母(*R. toruloides*)<sup>[103, 104]</sup>等。

### 1.6.2 非粮作物

甜高粱、木薯、菊芋等均被认为是可作为生物能源生产的原料。这些作物具有抗逆性强, 耐旱、贫瘠、盐碱等特征, 可种植区域广, 不会与粮、果、林等争地, 还可以改良土壤<sup>[105, 106]</sup>。但是较高的原料价格不利于其工业化应用与生产。并且大多数微生物由于缺乏相应的水解酶而不能直接利用这类原料, 需要先将其降解为单糖后才能被利用, 水解酶的使用将进一步的提高生产成本。所以获得能够合成、分泌水解酶的菌株对于后续的生物化学品的生产具有重要意义。

木薯 (Cassava) 作为一种非粮作物被广泛种植, 尤其是在我国南方地区大面积种植木薯。所以木薯淀粉在我国属于一种常见、且大量存在的原料。近年来研究发现木薯淀粉也是微生物生产的一种优良原材料。如 *R. mucilaginosa* TJY15a 通过分批发酵木薯淀粉, 细胞的含油率达到 47.9% (w/w)<sup>[105]</sup>。*R. toruloides* 21167 在摇瓶中利用木薯淀粉的油脂发酵, 菌体含油率达到了 63.2% (w/w)<sup>[59]</sup>。

菊粉 (Inulin) 是由  $\beta$ -2,1-糖苷键连接的 D-呋喃果糖分子组成的链状大分子, 在还原性末端以蔗糖型糖苷键连接有一个葡萄糖残基。早在 19 世纪 80 年代菊粉作为一种碳水化合物资源而被发现, 于 1817 年被 Thomson 并命名为菊粉<sup>[106]</sup>。菊粉广泛存在于 3 万多

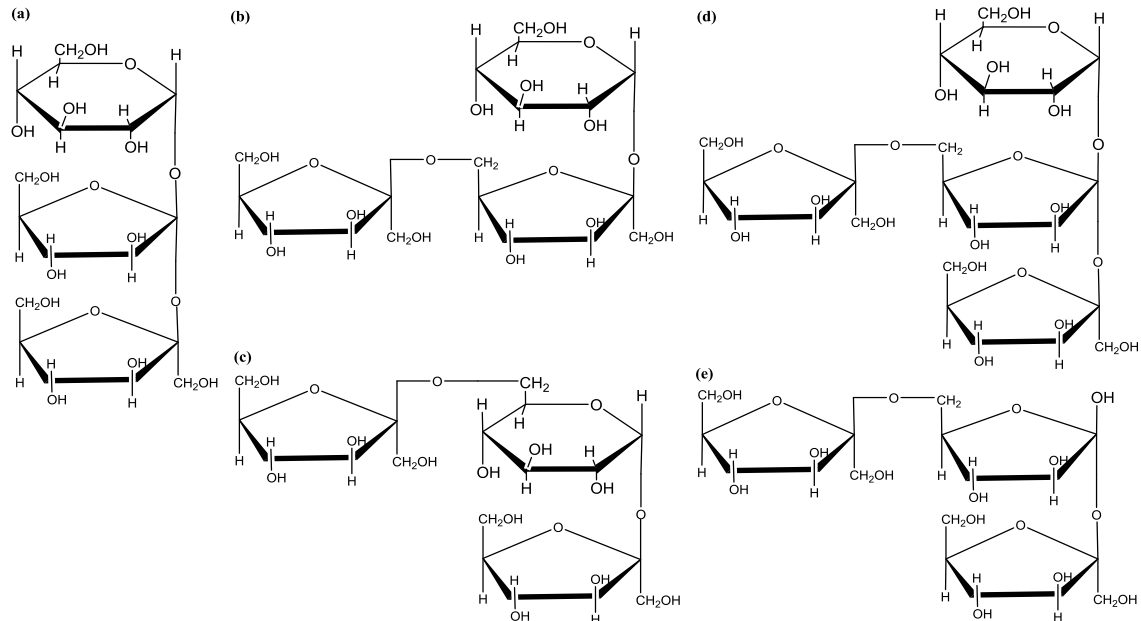


图 1-5 依据 Van Laere 和 Van den Ende (2002) 分类方法不同高等植物来源的聚果糖类型: (A): 1-蔗果三糖; (B): 6-蔗果三糖; (C): 新科斯糖; (D): 黑麦双叉寡糖; (E): 混合型 F3 果聚糖<sup>[106]</sup>  
 Figure 1-5 Different types of fructans from higher plants according to the classification of Van Laere and Van den Ende (2002): (A) 1-kestose; (B) 6-kestose; (C) neokestose; (D) bifurcose; (E) mixed type F3 fructan<sup>[106]</sup>

种植物中,以储存式碳水化合物而存在。菊粉广泛存在于植物的根、茎中,如菊芋、菊苣、大丽花、雪莲果等,不同来源的菊粉结构也是不同的<sup>[106]</sup>,其结构如图 1-5 所示。其中菊芋是典型的产菊粉植物,不仅能够在非耕地中生长,而且具有较好的耐受多种疾病的能力<sup>[107]</sup>,自然界中储量非常丰富<sup>[108]</sup>。这些植物块茎中的菊粉含量可超过 50%<sup>[109]</sup>。作为生物燃料生产的一种可再生的原材料,菊粉及这类含菊粉的原料而备受关注,尤其是近年来有研究者探索利用菊粉生产微生物油脂<sup>[51-57, 110]</sup>。但是菊粉不能直接作为微生物油脂累积的原料,因为诸多油脂微生物不能合成、分泌菊粉酶<sup>[111]</sup>,如 *Y. lipolytica*<sup>[51]</sup>、*R. mucilaginosa*<sup>[112]</sup>等。所以必须先将菊粉或者含菊粉的块茎等原料先水解为单糖才可以被微生物利用进行发酵生产。

在热、酸或酶解条件下,菊粉即可水解为低聚糖、果糖和葡萄糖分子。研究发现菊粉可被多种酶水解为果糖和葡萄糖,如菊粉酶<sup>[113]</sup>、 $\beta$ -糖苷酶<sup>[114]</sup>、转化酶<sup>[115]</sup>、葡糖淀粉酶<sup>[116]</sup>等。很多微生物都可以合成菊粉酶,如真菌、酵母和细菌。在这些微生物中,*Aspergillus sp.*和 *Kluyveromyces sp.*是最常见的商业菊粉酶生产菌株<sup>[117, 118]</sup>。菊粉酶分为菊粉内切酶(EC 2.3.1.7)和外切酶(EC 3.2.1.80)。内切菊粉酶将菊粉裂解为低聚糖和蔗糖分子,菊粉外切酶逐步移去末端单糖水解生成果糖和葡萄糖<sup>[119]</sup>。

水解生成的葡萄糖和果糖即可被微生物利用来生产乙醇<sup>[120]</sup>、乳酸<sup>[121]</sup>、柠檬酸<sup>[122]</sup>、2,3-丁二醇<sup>[123, 124]</sup>或油脂<sup>[51]</sup>等。但是这些酶的纯化需要多步操作才可以完成,并且催化效率较低。所以将菊粉酶基因在发酵菌株中进行表达,可以简化以菊粉或菊芋等含菊粉原材料的发酵过程。某些酵母菌株如: *Saccharomyces cerevisiae*、*K. marxianus*、*P.*

*guilliermondii* 等自身即具备水解菊粉的能力<sup>[125, 126]</sup>。Wang 和 Li 研究发现转化酶—SUC2 是 *S. cerevisiae* 中催化菊粉转化为果糖和葡萄糖的关键酶<sup>[127]</sup>。Wang 等研究了 *R. toruloides* 2F5 菌株的菊粉酶酶活和油脂累积的特性,初步展示了微生物油脂发酵的 CBP 理念<sup>[56]</sup>。据我们之前的研究发现, *Trichosporon cutaneum* 可以直接以菊粉为碳源累积油脂<sup>[126]</sup>。

### 1.6.3 木质纤维素

木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素三部分组成,此外还含有少量的果胶、蛋白质、灰分、盐和矿物质等。典型的木质纤维素原料有农作物秸秆(玉米秸秆、麦秆、稻草托)、草本植物(芒草、柳枝稷等)、经济作物加工固废(甘蔗渣、棕榈壳)以及林业废弃物等<sup>[128]</sup>,是生态系统中最大的碳水化合物资源,也是生物燃料生产最重要的原料。

木质纤维素生物质(农业废弃物、森林生物质等),含 35~50%纤维素、25~30%半纤维素及 15~30%木质素,其中聚糖类组分约占 75%<sup>[129, 130]</sup>。一般而言,木质纤维素中的半纤维素和纤维素才是生物转化可利用的原料。纤维素是 D-吡喃葡萄糖基构成的无支链的同多糖。半纤维素是由戊糖(木糖、阿拉伯糖)、己糖(甘露糖、葡萄糖、半乳糖等)构成的异质多聚体。木质素是由连接有不同侧链的苯丙基团连接而构成的大分子聚合物,如对香豆醇、松柏醇、愈创木酚、丁香醇、芥子醇等<sup>[131]</sup>。植物细胞壁中的纤维素通过氢键连接形成纤维束。纤维束通过半纤维素、不同糖和果胶构成的非晶态聚合物连接起来,并在外层覆盖以木质素<sup>[132]</sup>。玉米秸秆细胞壁包括巨纤维束(macrofibrils)、微纤维(microfibrils)和纤维素基础纤维(cellulose elementary fibrils)。存在于半纤维素-木质素矩阵内部的纤维素微纤丝经常以纤维束或微纤维的形式存在。微纤维的纤维素晶体结构被紧密的包裹在内,以至于纤维素酶甚至是小分子的水都难以进入该复杂的骨架内部。纤维素中也含有少量无序的非晶体结构区域,即非晶区<sup>[133]</sup>。较高的分子量及有序的三级结构导致纤维素不溶于水。与非晶区相比,纤维素的晶体结构区域的可生物降解性更差。纤维素与木质素、半纤维素致密结构的打破及其可生物降解性是其经济可行性发展的主要障碍<sup>[134]</sup>。半纤维素是随机的、非晶结构并且具有支链,易于被酸水解为其单体物质<sup>[135]</sup>。木质素作为木质纤维素原料的第三大主要成分,由于其稳定的大分子芳香环结构,难以被生物转化利用<sup>[136]</sup>,而成为植物细胞壁中最坚固的组成部分,一般而言木质素含量越高,生物或化学降解的难度就越大<sup>[137]</sup>。目前纤维素乙醇或其它产品的发酵过程中,木质素基本上是不能被利用的,仍旧残存于发酵残渣中。而在当前的纤维素乙醇工业中,发酵残渣最终也只能是作为燃料使用。某些微生物可通过  $\beta$ -酮己二酸途径降解木质素单体<sup>[138, 139]</sup>。在好氧微生物中,其主要的障碍有几茶酚和原儿茶酸的降解。在氧依赖型的双加氧酶作用下可在毗邻羟基邻位或间位打开芳香环<sup>[140]</sup>。

## 1.7 木质纤维素微生物油脂的生物炼制技术

### 1.7.1 木质纤维素的预处理

木质纤维素原料生产微生物油脂大体分为以下三个步骤：生物质预处理、纤维素酶解及油脂发酵。预处理是生物炼制过程中的关键步骤，可将植物细胞壁中木质纤维素的致密结构打开，将包裹在内部的纤维束释放出来，并降低纤维素的结晶度提高其松散程度，以便于后续的酶水解及生物/化学加工<sup>[141]</sup>。常见的预处理方式有物理预处理和化学预处理等。

物理预处理的方法是通过铣、磨、凿、冷冻、辐射，以增加其表面积、降低木质纤维原料的粒径大小<sup>[142]</sup>，同时还可以降低原料的聚合度及结晶度。一般来讲物理预处理的方法常与其他预处理方法结合使用。化学预处理有酸式预处理、碱式预处理、离子液体预处理等多种预处理方式。酸式预处理的主要作用是将可溶性半纤维素去除使得纤维素暴露出来，而更易于与纤维素酶接触。稀酸预处理过程由于稀硫酸溶液的加入而产生大量废水，并且需要通过固液分离才能最终实现高固含量的生物炼制，不但增加成本，而且造成了单糖和寡糖的流失。基于此，干式稀酸预处理技术应运而生，大幅度减少水用量，为后续高固含量木质纤维素原料的发酵奠定基础。干式稀酸预处理下玉米秸秆在 0.25% (v/v) 稀硫酸、185℃ 条件下预处理 3 min，纤维素转化率可达到 84.77%<sup>[143]</sup>，随后的高固含量玉米秸秆的同步糖化发酵中乙醇产量可达 71.40 g/L<sup>[144]</sup>。总之由于高效、低成本、无游离水生成等优点，干式稀酸预处理已成为工业生产中最常用的方法<sup>[145]</sup>，被应用于多种木质纤维素生物质的预处理中<sup>[146, 147]</sup>。美国国家可再生能源实验室(National Renewable Research Laboratory in the USA, NREL)已经开展了干式稀酸预处理的中试试验，每天可处理 1 t 玉米秸秆，连续处理 15 d<sup>[148]</sup>。

### 1.7.2 木质纤维素来源抑制物的形成及对微生物的抑制机制

木质纤维素来源的抑制物是在预处理中半纤维素和/或木质素的降解，如图 1-6 所示。抑制物的形成主要受预处理过程的影响。其作用机制如图 1-7 所示。HMF 抑制醇脱氢酶(ADH)、丙酮酸脱氢酶(PDH)和醛脱氢酶(ALDH)，并且也会抑制糖酵解过程(酶和/或辅因子)。糠醛和 HMF 一样，除此之外还可对细胞膜造成破坏。弱酸的降解需要消耗 ATP 并抑制芳香氨基酸的吸收。酚类化合物解偶联并生成活性氧、破坏细胞膜的完整性等。

#### 1.7.2.1 呋喃醛

糠醛、HMF 是木质纤维素预处理产物中最常见的抑制物，分别来源于戊糖和己糖，如图 1-5 所示。糠醛和 HMF 抑制酵母细胞的生长并降低油脂微生物的发酵性能及产量<sup>[60, 149]</sup>。在有氧条件下，*S. cerevisiae*<sup>[150]</sup>、*Zymomonas mobilis*<sup>[151]</sup>、*Amorphotheca resinae*<sup>[152]</sup> 可以将糠醛、HMF 转化为糠醇和 5-羟甲基糠醇，并能进一步氧化为糠酸、2,5-呋喃二羧酸。糠醛的降解与辅因子 NADH 相关，而 HMF 的降解与 NADPH 相关<sup>[153]</sup>。Banerjee 等<sup>[154]</sup>研究了糠醛对糖酵解的影响，发现脱氢酶对糠醛的敏感性很高。

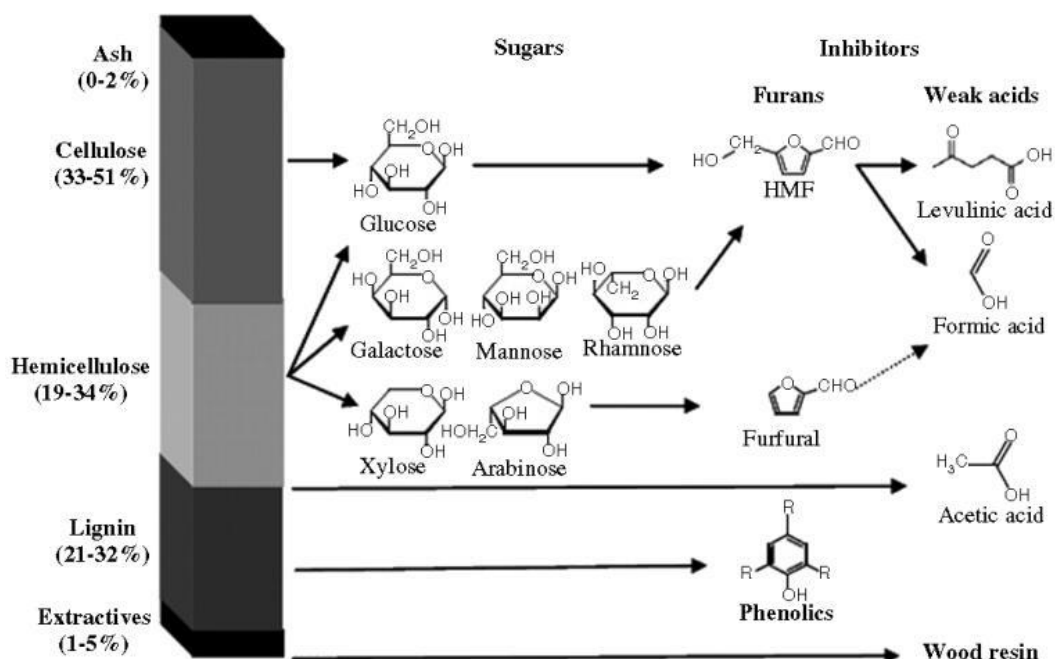


图 1-6 木质纤维素抑制物形成示意图<sup>[155]</sup>

Figure 1-6 Schematic representation of lignocellulose derived inhibitors generation<sup>[155]</sup>

### 1.7.2.2 有机弱酸

甲酸、乙酸和乙酰丙酸是木质纤维素水解液中最常见的弱酸类抑制物。乙酸是在半纤维素的脱乙酰基反应中生成的（图 1-6）。而甲酸和乙酰丙酸是 HMF 的裂解产物。弱酸会抑制细胞的生长。未解离的弱酸可以穿过质膜进入胞浆，弱酸对微生物生长的抑制正是由于进入胞内的弱酸所导致的<sup>[156-158]</sup>。胞浆内的中性 pH 使得弱酸解离并降低其 pH<sup>[159]</sup>。目前有两种关于弱酸抑制的机制：解离及胞内离子的累积<sup>[160]</sup>。弱酸解离导致胞内 pH 降低，即以消耗 ATP 为代价将胞外的物质泵入胞内以中和酸性 pH<sup>[161]</sup>。所以细胞需要额外的 ATP 来维持胞内稳定的 pH<sup>[162]</sup>。胞内离子的累积与 pH 呈正比关系，胞外的离子泵进胞内以中和 pH，即离子累积。

Gong 等<sup>[163]</sup>发现油脂酵母弯曲隐球菌(*Cryptococcus curvatus*)可以直接将乙酸转化为油脂，摇瓶发酵时菌体含油率达到 73.4%，而 3 L 发酵罐的发酵中菌体含油率为 49.9%。Zhang 等<sup>[164]</sup>研究表明在葡萄糖培养基中添加乙酸会降低 *R. glutinis* 的比生长速率，而在木糖培养基中添加乙酸时不会出现此现象。

### 1.7.2.3 酚类化合物

预处理过程中木质素不可避免地会发生部分降解，生成多种小分子酚类化合物，如图 1-6 所示。酚类化合物的类型及含量是由生物质原料种类决定的，由于不同来源的植物细胞壁与半纤维素、纤维素结合的木质素的甲氧基及内部联系都是不同的<sup>[165]</sup>。对羟基苯基(H)、愈创木酚基(G)和丁香基(S)是构成木质素的 3 种典型芳香类单体物质，经预处理后可分别降解为香草醛、4-羟基苯甲醛、丁香醛等，如图 1-8 所示<sup>[166]</sup>。

酚类化合物会破坏细胞膜的完整性<sup>[167]</sup>，并且小分子的酚类化合物毒性更大<sup>[168]</sup>。由于缺乏大量定性、定量实验，酚类化合物的抑制机理目前还不清楚。不过目前已有不少

的研究者探索了典型酚类化合物对乙醇发酵菌株的抑制作用机制,如 Gu 等<sup>[169]</sup>研究发现乙醇发酵菌株 *Z. mobilis* ZM4 在酚酸胁迫下,细胞膜外的脂多糖聚合形成阻碍抑制物进入胞内的屏障。

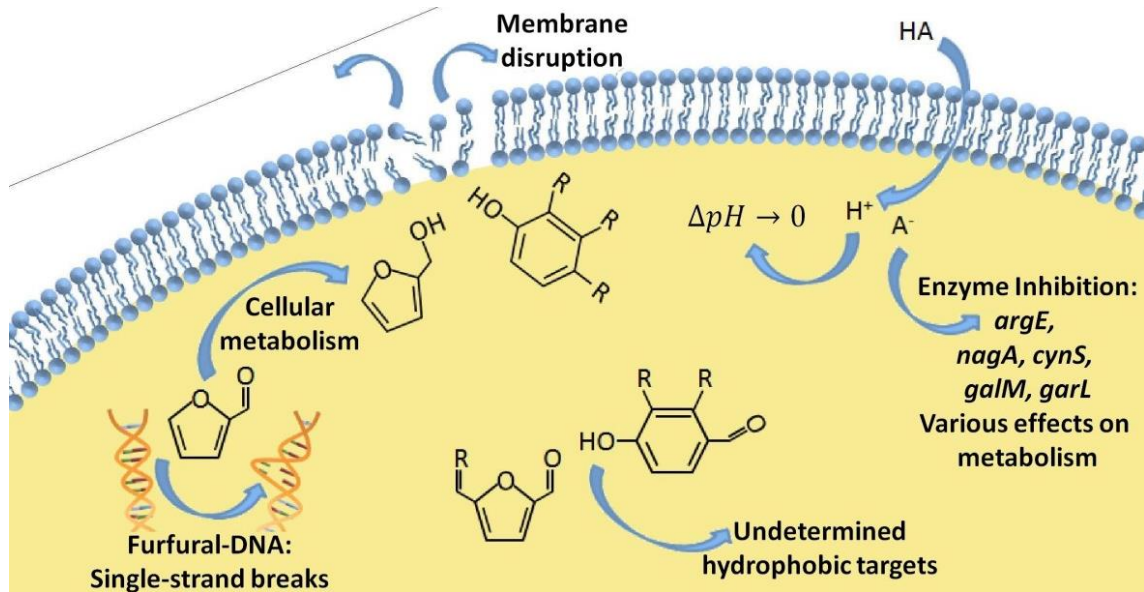


图 1-7 抑制物作用机理推测示意图<sup>[170]</sup>

Figure 1-7 Schematic representation of a presumed inhibition mechanism of inhibitors<sup>[170]</sup>

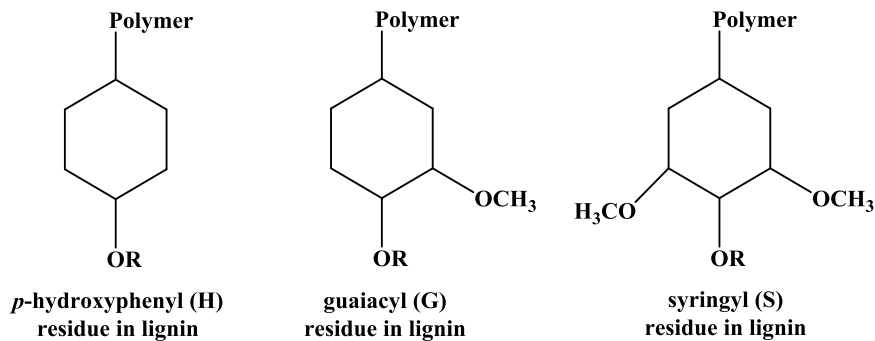


图 1-8 构成木质素的三类单体分子: 对羟基苯基(H)、愈创木酚基(G)和丁香基(S)<sup>[166]</sup>

R: 不同的功能基团

Figure 1-8 Three main phenol building blocks in lignin: phydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) and syringyl (S)<sup>[166]</sup>

R: different functional group

### 1.7.3 木质纤维素来源抑制物的脱毒

抑制物的浓度是由原料的种类及预处理方式决定的,所以为降低抑制物浓度可选用木质纤维素结构稍微松散的原料或选用温和的预处理条件进行。除此之外还研究出通过化学、物理和生物的方法对预处理后的原料或水解液进行脱毒<sup>[171-174]</sup>。

过中和是化学脱毒法中最常见的方法,其原理是抑制物在高 pH 条件下可形成沉淀而被去除<sup>[175]</sup>。早在 1945 年 Leonard 和 Hajony 就报道了通过过中和的方式脱除木质纤维素水解液中的抑制物<sup>[176]</sup>。活性炭吸附也是工业生产中常用的化学脱毒法。除此之外,

还开发了在硫氧离子、巯基试剂等还原剂作用下的原位化学脱毒法<sup>[177]</sup>。真空蒸发<sup>[178]</sup>、水洗<sup>[169]</sup>等是常见的物理脱毒法。但是这些脱毒方法由于会产生大量的废水而不具备实际应用价值。生物脱毒法是通过酶（如过氧化物酶、漆酶）或微生物的作用将抑制物降解。过氧化物酶、漆酶尤其在酚醛类抑制物的脱毒方面具有优良的表现<sup>[170, 179]</sup>。已经报道具备生物脱毒的微生物有细菌<sup>[180-183]</sup>、酵母<sup>[184, 185]</sup>、真菌<sup>[186, 187]</sup>等。如 *Amorphotheca resinae* ZN1 在不消耗葡萄糖的情况下，以固态脱毒的方式将预处理的木质纤维素原料中的多种抑制物完全降解或转化为低毒的醇或酸，并且具备操作简便、无游离水的出现等优点<sup>[186, 188]</sup>，所以这种脱毒方式具备在实际生产中应用与发展的潜力。

#### 1.7.4 生物炼制生产微生物油脂

利用非食用型的木质纤维素生物质原料来生产生物基化学品、燃料等即生物炼制<sup>[134]</sup>。利用生物质原料生产的生物质燃料替代石油基化学品对化学工业的持续增长具有重要意义。近年来一些关于油脂酵母利用木质纤维素原料生产油脂的报道，列于表 1-1 中。其中 *Y. lipolytica* 利用脱毒的米糠水解液时的含油率可达到 48.02%<sup>[48]</sup>，其次 *T. dermatis*<sup>[66]</sup>在低浓度抑制物的玉米芯水解液、*T. fermentans*<sup>[19]</sup>在脱毒稻秆水解液中的菌体含油率均为 40.1%。与合成培养基相比，在利用木质纤维素水解液进行油脂发酵时菌体的含油率是较低的。比如，*R. toruloides* Y4 在合成培养基中的含油率为 51.8%，而在玉米秸秆水解液中的含油率仅为 36.4%<sup>[61]</sup>。目前文献报道中木质纤维素水解液中较高的含油率为 61%，来自 96 深孔板中 *R. toruloides* Y-1091 利用玉米秸秆水解液的发酵结果<sup>[189]</sup>，虽然该研究取得了较高的含油率和油脂产量，但是与实际生产应用具有较大的距离。

通过培养油脂酵母、真菌来生产微生物油脂的研究报道已有许多，但是真正利用木质纤维素原料生产微生物油脂的研究报道依旧较少<sup>[72, 190, 191]</sup>。由于木质纤维素来源抑制物的显著抑制效果，许多研究者集中于抑制物对发酵菌株的抑制作用<sup>[60, 164, 192, 193]</sup>。但是目前能够有效耐受、降解抑制物的菌株寥寥无几。目前定向筛选结合定向进化、代谢路径改造等方法是当前能够获得利用木质纤维素生物质原料工业化生产油脂的发酵菌株的重要途径<sup>[194]</sup>。而据我们之前的研究结果，与 *Rhodotorula glutinis*、*Rhodospiridium toruloides*、*Lipomyces starkeyi* 等多株油脂酵母相比，皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)表现出优良的抑制物耐受性能，并呈现出可在木质纤维素体系中良好生长的状态<sup>[73, 195]</sup>。并且 Huang 等人实现了 *T. cutaneum* 利用木质纤维素水解液生产油脂<sup>[70]</sup>。Liu 等人详细探究了 *T. cutaneum* 利用木质纤维素原料同步糖化发酵油脂的可行性，研究结果表明 50 L 生物反应器中油脂产量为 3.23 g/L<sup>[72]</sup>。Gao 等人的研究中 *T. cutaneum* 在玉米芯残渣的分步糖化发酵中油脂产量提高至 12.3 g/L<sup>[73]</sup>。

## 1.8 组学分析

高通量测序 (High-throughput sequencing) 也称为第二代测序 (next-generation sequencing)<sup>[196, 197]</sup>常用的平台有 Illumina Solexa、Hiseq、Miseq、Roche/454 等。全基因组测序时，随机打断测序的短链须先通过软件工具和运算拼接在一起逐步生成 contig、

scaffold 直至染色体。除全基因组测序外,高通量测序还应用于多个研究领域,如单核苷酸多态性<sup>[198, 199]</sup>、小 RNA<sup>[200, 201]</sup>、mRNA 特性研究<sup>[202, 203]</sup>等。

### 1.8.1 高通量测序在油脂微生物研究中的应用

高通量测序在油脂微生物研究中的应用报道还较少。到目前为止仅少数几株油脂微生物完成了基因组测序。2004 年 Bernard 报道了 *Yarrowia lipolytica* 的基因组信息,之后陆续的几株油脂微生物也完成了基因组测序,如: *C. albidus* NT2002<sup>[204]</sup>、*M. alpine* 32222<sup>[91]</sup>、*R. glutinis* ATCC 204091<sup>[205]</sup>等。Zhu 等人对 *R. toruloides* NP11 从基因组、转录组及蛋白质组学等多组学进行了分析,解读了 *R. toruloides* NP11 的油脂累积过程,通过限氮条件下的转录组及蛋白组学的分析发现,油脂累积过程与氮化合物循环利用、大分子代谢与细胞自噬等生物学过程相关<sup>[206]</sup>。除限氮条件下的转录组分析外, Kourist 等人还特别关注了 *T. oleaginosus* CLIB122 的性成熟过程<sup>[207]</sup>。

### 1.8.2 高通量测序在抑制物代谢研究中的应用

随着高通量测序的发展及应用,已经报道了几株微生物菌株在抑制物胁迫下的转录组序列分析。2013 年, Ries 等人报道了 *Trichoderma reesei* 在小麦秸秆培养条件下的转录组分析并与 *Aspergillus nige* 进行比对,两株菌的不同点是 *T. reesei* 细胞壁降解的相关酶表达上调,相同点即两株菌糖酵解水解酶等基因均显著表达上调<sup>[208]</sup>。经转录组分析发现醛酮还原酶、短链脱氢酶/还原酶家族的编码基因 Cbei\_3974、Cbei\_3904 与 *Clostridium beijerinckii* 的糠醛降解及耐受性相关<sup>[209]</sup>。本实验室也已经完成了糠醛、HMF 胁迫下 *Amorphotheca resinae* ZN1<sup>[152]</sup>及酚醛胁迫下 *Zymomonas mobilis* ZM4<sup>[210]</sup>的转录组分析,两菌株显著表达基因均有醇脱氢酶、醛脱氢酶、醛还原酶等。

## 1.9 本论文的主要研究内容

微生物油脂可作为生物柴油生产的原料,目前限制其发展的主要瓶颈之一为高昂的生产成本。如果能开发新的可再生型原材料可在很大程度上缓解上述问题。皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum* ACCC 20271)是能够代谢多种底物、高含油率的油脂酵母菌株,为生物质资源化利用提供基本保障。木质纤维素作为自然界中最丰富的可再生原料近年来成为生物炼制理想的原材料。在之前的研究中发现 *T. cutaneum* 具有利用木质纤维素生物质进行油脂累积的能力,表现出优良的木质纤维素来源抑制物耐受能力。但对于 *T. cutaneum* 利用玉米秸秆水解液生产微生物油脂的最大潜能,对抑制物的耐受、降解特性及高浓度抑制物耐受机制均不了解。其次,对于 *T. cutaneum* 处理纤维素乙醇发酵废水的可行性,同时累积油脂回收成本的潜能还需通过试验验证分析。再次, *T. cutaneum* 可以直接利用菊粉进行生长、代谢及生产而无需预水解等步骤,但是到目前为止其菊粉水解酶的信息及其整合生物加工菊粉生产微生物油脂的可行性分析还是未知的。

本文围绕上述几个方面展开,主要研究内容包括以下几个方面:

(1) 以木质纤维素为原料生产微生物油脂,进而合成生物柴油是目前生物柴油发展中的一个研究热点。*T. cutaneum* ACCC 20271 具有较好的抑制物耐受及降解性能考察其

利用玉米秸秆水解液生产微生物油脂的最大潜能。分析 *T. cutaneum* ACCC 20271 对典型木质纤维素来源抑制物（呋喃类：糠醛、羟甲基糠醛；弱酸类：甲酸、乙酸、乙酰丙酸；酚类：香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛）的耐受性及其降解能力。

(2) 基于实验分析、基因组注释信息、文献报道等推测 *T. cutaneum* ACCC 20271 中木质纤维素来源典型抑制物的代谢路径，查找相关酶的编码基因等信息，并与 *R. toruloides*、*Y. lipolytica*、*T. oleaginosus* 三株油脂酵母进行比对分析，从基因水平探究 *T. cutaneum* ACCC 20271 高抑制物耐受性的机制。

(3) 通过基因组测序的策略，从基因水平分析其高含油率的机制，解读中心代谢及油脂代谢路径，总结其关键酶类并与其它三株典型油脂酵母(*R. toruloides*、*Y. lipolytica*、*T. oleaginosus*)进行对比分析。

(4) 通过检测废水中化学需氧量(COD)的浓度变化，来评价 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水的可行性。分析不同培养条件对 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理废水及其油脂累积的影响。比较分析 *T. cutaneum* ACCC 20271 的废水处理能力。

(5) 为更好的实现 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用菊粉的微生物油脂生产，分析其菊粉水解酶的酶学特性及生产特性等基本信息，是十分必要的。首先考察菊粉水解酶的亚细胞分布，了解其发挥功能的准确定位信息。参考其酶活的最适温度、pH 值以及各因素对其生产的影响等信息来设定发酵的条件更有利于后续的发醇生产。粗酶液经琼脂糖凝胶(Sephadex G-100)纯化得到纯的菊粉水解酶。优化 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用菊粉生产微生物油脂的条件，以期得到更高的油脂产量。



## 第 2 章 皮状丝孢酵母利用木质纤维素原料生产微生物油脂

### 2.1 引言

生物柴油作为最具发展潜力的可再生新能源受到诸多关注。目前生物柴油主要是利用动植物油脂来生产,这也是限制其替代石油能源的最大限制因素之一,所以寻求新的可再生廉价原材料来替代传统的发酵底物,如淀粉、蔗糖等,降低微生物发酵生产的成本势在必行。从多方面综合考虑,作为可再生、廉价原料的木质纤维素生物质,在生物能源的未来发展中占有举足轻重的地位,受到诸多科研工作者的青睐。在过去的几十年中,研究者主要集中于研究木质纤维素来源的抑制物对乙醇发酵菌株的影响<sup>[169, 201, 211, 212]</sup>,而对油脂酵母的相关研究报道甚少。

微生物对抑制物耐受性是菌株依赖型的,即不同的菌株对抑制物的耐受能力也是不同的。例如,4.8 g/L 的乙酸对六株 *Saccharomyces* 属乙醇发酵酵母菌株的细胞生长均具有明显的抑制作用<sup>[213]</sup>,而 40 g/L 乙酸对油脂酵母 *C. curvatus* 来讲不但没有产生明显的抑制现象,且乙酸还可作为碳源被该菌株利用以生产微生物油脂<sup>[214]</sup>。另外据 Huang 等报道,通过生物脱毒的方法去除玉米秸秆水解液中的抑制物后极大地促进了 *T. cutaneum* 的生长及油脂产量<sup>[71]</sup>。虽然到目前为止已建立了多种多样的脱毒方式,但是大多数的脱毒方法不具有技术经济可行性、能量需求高且对设备要求严格,使得这些方法不具有实际应用价值<sup>[145]</sup>。所以寻求高效可行的脱毒方式及高抑制物耐受型菌株是纤维素油脂工业化生产的关键。

油脂酵母 *T. cutaneum* 不但可利用多种糖,如葡萄糖、木糖、纤维二糖、乳糖等<sup>[75, 215]</sup>,还可耐受多种木质纤维素来源的抑制物<sup>[73]</sup>,使其成为合格的纤维素油脂发酵生产菌株。据报道 *T. cutaneum* 可利用玉米秸秆水解液<sup>[72]</sup>、玉米芯残渣水解液<sup>[73]</sup>、玉米芯酸解液<sup>[74]</sup>等木质纤维素原料生产微生物油脂。但是关于 *T. cutaneum* 利用木质纤维素原料生产微生物油脂的最大潜能及抑制物耐受及降解性能等都是未知的。树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 的微生物脱毒,具有条件温和、无游离水、不消耗葡萄糖、操作简便等优点而成为木质纤维素生物质预处理后脱毒的理想方式<sup>[174]</sup>。

本章主要分析 *T. cutaneum* ACCC 20271 在木质纤维素体系下的生长、油脂累积、抑制物耐受与降解特征。首先探究了 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用玉米秸秆水解液生产微生物油脂的最大潜力:(1) 分析 *T. cutaneum* ACCC 20271 在未脱毒与脱毒的玉米秸秆水解液中的油脂生产潜力,及未脱毒水解液中抑制物降解特性;(2) 将生产得到的微生物油脂合成生物柴油,并对其基本特性进行分析;(3) 选取八种典型的木质纤维素来源抑制物,系统分析 *T. cutaneum* ACCC 20271 在抑制物存在时的生长及油脂生产性能,并依此评价其对抑制物的耐受能力;(4) 分别选取一定浓度的抑制物作为唯一碳源,检测 *T. cutaneum* ACCC 20271 对每种抑制物的降解能力,并监测其降解产物的生成。从多方面、多角度分析 *T. cutaneum* ACCC 20271 在玉米秸秆水解液中的生长及油脂累积潜能。

## 2.2 实验材料

### 2.2.1 原材料

玉米秸秆于 2012 年秋季由河南省郸城收获得到。收获后的秸秆首先用粉碎机 (SF-300, 上海科泰磨浆设备有限公司) 粉碎并经 10 mm 孔径筛初筛。粉碎后的秸秆经水洗除去粉尘等, 并于 105℃ 下烘干至恒重。此时秸秆中的含水量为 7% (w/w)。经两步酸水解法<sup>[216, 217]</sup>测定秸秆中纤维素、半纤维素、木质素及灰分含量分别为 38.72%、20.55%、26.51%、2.76% (w/w)。

### 2.2.2 菌种及培养基

微生物油脂生产菌株为皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum* ACCC 20271), 购自中国农业微生物菌株保藏管理中心 (Agricultural Culture Collection of China, <http://www.accc.org.cn/>)。同时该菌株也保存于在中国普通微生物菌株保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center, <http://www.cgmcc.net/>), 保藏号为 CGMCC 2.1374。

玉米秸秆预处理后的生物脱毒菌株树脂枝胞霉(*Amorphotheca resinae* ZN1)是由本实验室所筛选得到的一株高效生物脱毒霉菌, 于中国普通微生物菌种保藏管理中心保藏, 编号为 CGMCC 7452。A. *resinae* ZN1 菌株在 PDA 培养基中 28℃ 下静置培养。

YPD 培养基: 葡萄糖 20 g/L, 酵母提取物(YE) 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L (琼脂 15 g/L)。

PDA 培养基: 200 g/L 土豆汁、20 g/L 葡萄糖、15 g/L 琼脂, 115℃ 灭菌 20 min。

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 种子培养

从固体 YPD 培养基中挑取单菌落至含 20 mL YPD 培养基的 100 mL 三角瓶中, 30℃、180 rpm 培养 24 h。然后加入等体积的 60% 甘油混匀并分装到保存管中, 液氮快速冷冻后于 -80℃ 冰箱中保存。取一只上述菌种甘油管接种至 20 mL YPD 培养基中 30℃、180 rpm 活化培养 12 h, 以 10% (v/v) 接种量转接到相应量的 YPD 培养基中扩大培养 24 h, 作为种子培养液。以 10% 接种量接种至相应量的发酵培养基。

### 2.3.2 玉米秸秆的预处理

首先将烘干、粉碎后的玉米秸秆与稀硫酸溶液(2.5%, w/w)混合均匀同时调节固液比至 2:1 (w/w), 加入预处理反应器中并将其密封, 通入蒸汽, 开始预处理反应。当温度达到 175℃ 后开始计时, 5 min 后结束预处理反应, 并将原料从反应器内转移出来, 待物料的温度降至室温后装入塑料袋中并于 4℃ 冰箱中贮存备用。预处理后的玉米秸秆经两步酸水解法测定<sup>[216, 217]</sup>, 其纤维素、半纤维素、灰分的含量分别为 39.47%、6.80%、6.57% (w/w)。预处理后玉米秸秆物料中抑制物成分及含量分别为(mg/g 预处理后玉米秸秆干重)糠醛 5.13、5-羟甲基糠醛(HMF) 3.38、甲酸 1.97、乙酸 16.65、乙酰丙酸 2.54、香草醛 1.27、丁香醛 0.67、4-羟基苯甲醛 0.18。

### 2.3.3 预处理后玉米秸秆的生物脱毒

脱毒菌株树脂枝孢酶 *Amorphotheca resinae* ZN1 接种至 YPD 斜面培养基中, 28℃ 培养箱中培养 4 d 后, 用无菌水将孢子都冲洗下来, 该液体即脱毒种子液。

预处理后玉米秸秆的生物脱毒过程依据 Zhang 等(2010)<sup>[186]</sup>的方法进行。用 20% (w/v) 的  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节预处理的玉米秸秆的 pH 至 5.0~5.5 之间, 并接种 *A. resinae* ZN1 的脱毒种子液, 28℃ 下培养 5 d。脱毒后物料中抑制物组分及含量分别为(mg/g 干的玉米秸秆): 糠醛 1.33、HMF 1.43、甲酸 0.57、乙酸 8.58、乙酰丙酸 2.23、香草醛 0.62、丁香醛 0.48、4-羟基苯甲醛 0.08。

#### 2.3.4 玉米秸秆组分测定

玉米秸秆中纤维素与半纤维素组分测定, 依据美国可再生能源实验室(NREL)两步酸解方法(TP-510-42618)进行测定<sup>[218]</sup>。

#### 2.3.5 纤维素酶及水解液制备

本研究中所用的纤维素酶为尤特尔#6 纤维素酶, 购自尤特尔生化有限公司(湖南省岳阳市)。根据 NREL(National Renewable Energy Laboratory)实验室分析程序(Laboratory Analytical Procedure, LAP) LAP-006 的方法测定<sup>[219]</sup>, 尤特尔#6 纤维素酶的滤纸酶活为 63.0 FPU/g, 依据 Ghose (1987)的方法<sup>[220]</sup>测定其纤维二糖酶活为 102.0 纤维二糖酶酶活单位(CBU)/g。

玉米秸秆经预处理后, 或经 *A. resinae* ZN1 生物脱毒后, 在 5 L 生物反应器中制备水解液。纤维素酶用量为 15 FPU/g DM (干物料), 酶解条件为 50℃、150 rpm, 用 5 M NaOH 调节 pH 在 4.8, 水解 72 h 后结束。10,000×g 离心 10 min 后, 上清即为玉米秸秆水解液。115℃ 灭菌 20 min 后备用。本文中所用玉米秸秆水解液经 HPLC 测定其组分, 结果见表 2-1。随固含量升高, 水解液中糖、抑制物浓度逐步升高, 并且脱毒水解液中葡萄糖浓度高于未脱毒水解液的, 但是木糖浓度相反。这是由于在脱毒过程中 *A. resinae* ZN1 利用了玉米秸秆中一部分木糖<sup>[174]</sup>。

#### 2.3.6 微生物油脂发酵

*T. cutaneum* ACCC 20271 利用玉米秸秆水解液的微生物油脂发酵实验在 3 L 生物反应器(上海保兴生物设备工程有限公司)内进行, 1 L 工作体积。接种量为 10% (v/v), 即将 100 mL *T. cutaneum* ACCC 20271 种子液接入含有 1 L 玉米秸秆水解液的 3 L 罐内。另外添加营养盐: 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.22 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和 0.5 g/L YE。油脂发酵温度为 30℃, pH 控制在 5.0。通气量为 100 L/h (即 1.67 vvm), 搅拌速度为 600 rpm, 以使发酵体系中溶氧水平高于 50%。

表 2-1 所用玉米秸秆水解液组分

Table 2-1 Compositon of corn stover hydrolyzate used

Solids contents (w/w)	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Acetic acid (g/L)	Vanillin (g/L)	Syringaldehyde (g/L)	4-hydroxybenzaldehyde (g/L)
Freshly pretreated corn stover								
15%	54.83	25.31	0.22	0.27	4.36	0.20	0.16	0.01
20%	80.44	34.03	0.53	0.51	4.58	0.24	0.17	0.01
25%	88.76	43.83	0.65	0.55	5.83	0.19	0.13	0.01
Pretreated and biodetoxified corn stover								
15%	62.22	11.20	0.06	0.09	1.45	0.00	0.04	0.00
20%	81.84	19.11	0.18	0.25	3.00	0.00	0.05	0.00
25%	104.02	24.61	0.20	0.40	3.93	0.03	0.04	0.00
30%	121.44	33.26	0.20	0.57	5.39	0.20	0.04	0.04

### 2.3.7 菌体干重及油脂测定

取 30 mL 发酵液, 10,000 rpm 离心 5 min 弃去上清液, 用水洗涤细胞沉淀 2 次, 然后用 6 mL 水将细胞沉淀转移至平皿中, 80°C 烘干至恒重, 差重法测得其细胞干重(DCW)。用 6 mL 4 M HCl 将上述干菌体浸泡并转移至 50 mL 的离心管中, 沸水浴 10 min, 并立刻至于冰上冷却 10 min, 以裂解酵母细胞。加入 20 mL 氯仿甲醇(2:1, v/v)溶液, 用封口膜封紧后 30°C、180 rpm 震荡 1 h, 萃取油脂成分。10,000 rpm 离心 5 min 使混合液分层后用注射器将下层含有油脂的氯仿转移到圆底烧瓶中。80°C 下旋转蒸发将氯仿去除后, 将圆底烧瓶在 80°C 烘箱中烘干至恒重后, 差重法计算油脂的量。

### 2.3.8 油脂中脂肪酸组分测定

将提取到的油脂及 5 mL 0.5 M 的 KOH-甲醇溶液置于三角烧瓶中, 50°C 水浴摇床中反应 1~2 h, 待油脂完全皂化后加入 4 mL 三氟化硼-甲醇溶液(4:10, v/v), 进行酯化反应, 约 1 h 后取出。待冷却后加入 5 mL 正己烷充分振荡后, 加入 2 mL 饱和氯化钠溶液, 1000×g 离心 5 min, 取上层含有脂肪酸甲酯的正己烷层, 通过气相色谱-质谱连用仪(GC-MS)测定脂肪酸组分。GC-MS 参数: 进样口温度 280°C; 进样量 0.4  $\mu$ L; 色谱柱 Agilent 19091J-433 (30 m×250  $\mu$ m×0.25  $\mu$ m); 分流:不分流进样口=20:1; 火焰离子化检测器(flame-ionization detector, FID), 检测器温度 120°C; 载气氦气, 流速 1 mL/min; 升温程序为: 80°C 保温 3 min; 以 16°C/min 升温至到 280°C, 保温 8 min。分析系统为 NIST MS Search 2.0。

### 2.3.9 抑制物耐受性及降解分析

*T. cutaneum* ACCC 20271 抑制物耐受性及降解分析在合成培养基中进行。合成培养基: 60 g/L 葡萄糖、0.5 g/L YE、0.22 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 再分别添加不同浓度的抑制物, 以不添加任何抑制物的作为对照组。pH 5.0、30°C、180 rpm, 培养 120 h 后测定菌体干重及油脂含量, 以此来评定耐受性的高低。抑制物耐受性分析实验的抑制物浓度如下, 糠醛(g/L): 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5; HMF(g/L): 1、2、3、4、5; 香草醛(g/L): 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0; 丁香醛(g/L): 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5; 4-羟基苯甲醛(g/L): 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5; 甲酸(g/L): 1、2、3、4、6; 乙酸(g/L): 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0; 乙酰丙酸(g/L): 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0。

抑制物降解分析是在以抑制物为唯一碳源的条件下进行的, 将合成培养基中的葡萄糖去掉, 即无糖的合成培养基: 0.5 g/L YE、0.22 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。再添加一定浓度的单一抑制物: 1.0 g/L 糠醛、3.0 g/L HMF、2.0 g/L 香草醛、2.5 g/L 丁香醛、1.0 g/L 4-羟基苯甲醛、3.0 g/L 甲酸、15 g/L 乙酸、10 g/L 乙酰丙酸。将种子液 10,000×g 离心 5 min 去上清, 添加等体积的无菌水将细胞重悬后作为种子液接种至上述无糖合成培养基中。pH 5.0、30°C、180 rpm 条件下培养 *T. cutaneum* ACCC 20271, 每隔一定时间取样测定细胞生长情况并检测培养液中的抑制物及其代谢产物的浓度等。

### 2.3.10 高效液相色谱(HPLC)分析

水解液中葡萄糖、木糖、甲酸、乙酸、乙酰丙酸、糠醛、HMF 通过 HPLC 定量分析。HPLC 配有日本岛津公司 RID-10A 示差折光检测器, 色谱柱: Bio-Rad HPX-87H (300 mm×7.8 mm)。流动相为 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速 0.6 mL/min, 柱温 65℃, 20 μL 进样量。样品经 13,000×g 离心 5 min, 稀释一定倍数、0.22 μm 滤膜过滤后进行检测分析。

抑制物代谢分析中呋喃类及酚类化合物通过 HPLC 定量分析。日本岛津公司 SPD-20A 型 UV/Vis 检测器的 HPLC, 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A (150 mm×4.6 mm), 柱温 35℃。糠醛、糠醇、糠酸分析的流动相为含 50% (v/v) 乙腈的乙腈-水溶液, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 220 nm。HMF、5-羟甲基糠醇、5-羟甲基糠酸的流动相为超纯水(A) 和乙腈(B), 流速 0.6 mL/min, 梯度洗脱: 0~15 min 乙腈浓度由 5% 升高至 100%, 15~20 min 乙腈浓度由 100% 降低至 5%, 20~30 min 乙腈浓度保持在 5% 不变。检测器波长为 230 nm。香草醛、香草醇、香草酸、丁香醛、丁香醇、丁香酸、4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲醇、4-羟基苯甲酸: 流动相为 0.1% (v/v) 甲酸(A) 和乙腈(B), 流速 1 mL/min, 梯度洗脱: 0~4 min, 乙腈浓度由 10% 升高至 35%, 4~15 min 乙腈浓度保持 35%, 15~20 min 乙腈浓度由 35% 降低至 10%, 20~30 min 乙腈浓度保持 10%。检测器波长 270 nm。

### 2.3.11 *T. cutaneum* ACCC 20271 的适应性驯化

合成培养基: 葡萄糖 60 g/L、YE 0.5 g/L、0.22 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 另外添加糠醛 0.25 g/L、0.4 g/L、乙酸 2 g/L、糠醛、香草醛 0.05 g/L、丁香醛 0.05 g/L、4-羟基苯甲醛 0.05 g/L。每次转接培养 24 h 后, 培养液以 10% 接种量接入新鲜的培养基中。首先用无菌水将合成培养基稀释至 50% (v/v) 之后, 待菌体生长呈稳定趋势后转接至经无菌水稀释至 75% (v/v) 的合成培养基中, 并按此方法依次在低抑制物浓度的 15% 固含量玉米秸秆水解液、常规的 15% 固含量玉米秸秆水解液中进行长期适应性培养。待生长稳定后, 保种结束长期适应性培养。

玉米秸秆水解液: 15% (w/w) 固含量, 纤维素酶: 尤特尔#6 (湖南尤特尔生化有限公司, 湖南岳阳) 15 FPU/g (干物料)。纤维素酶用量为 15 FPU/g DM (玉米秸秆干重), 水解条件为 50℃、150 rpm, 用 5 mol/L NaOH 调节 pH 在 4.8, 水解 72 h。

### 2.3.12 生物柴油的合成

提取得到的微生物油脂首先需要在 105℃ 下烘干 2 h, 并转移至试剂瓶中储存。取 60 mL 5.4 g KOH /120 mL 甲醇溶液添加至 30 mL 干燥后的油脂中, 搅拌、加热至 60℃ 后再加入 60 mL 5.4 g KOH/120 mL 甲醇液, 反应进行 3 h; 待反应液冷却至室温后用分液漏斗将下层棕红色有杂质、粗甘油及甲醇的液体排出。取上层液体 (酯交换粗产物) 再重复进行一次酯交换, 尽可能的将所有油脂均转化完全。旋转蒸除去残留的甲醇, 用冷水洗涤数次至水相成中性, 该液体即为生物柴油, 105℃ 干燥 2 h 除去残余水分, 获得生物柴油。

### 2.3.13 生物柴油性能测定

生物柴油的性能测定经委托太仓出入境检验检疫局综合技术服务中心对其各项指标及性能进行了测定。生物柴油的各项性能指标的测定均依据国标法进行。根据国标

GB/T261-2008、GB/T264-1983、GB/T265-1988、GB/T2540-1981、GB/T5096-1985、SH/T0246-1992、SH/T0689-2000、SH/T0248-2006 分别对闪点、酸值、动力粘度、密度、铜片腐蚀、含水量、硫含量、凝点等进行测定, 样品用量分别为 5 mL、10 g、18 mL、25 mL、5 mL、2 mL、20  $\mu$ L、45 mL、2 mL。而生物柴油的润滑性, 采用 MQ-800 的四球测定仪(SGW-10G, 济南恒旭试验机技术有限公司)进行, 以磨痕来表征。样品用量 2 mL。负荷为 392 N、上球的转速设为 1450 rpm, 球的直径均为 12.7 mm。在光学显微镜下测量下面三个球的磨痕直径, 即可得知润滑性。

## 2.4 结果与讨论

### 2.4.1 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用不同固含量玉米秸秆水解液生产微生物油脂

为实现 *T. cutaneum* ACCC 20271 直接利用玉米秸秆水解液生产微生物油脂。考察了 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用不同固含量玉米秸秆水解液生产纤维素微生物油脂的潜能, 本部分实验均于 3 L 发酵罐进行, 工作体积均为 1 L、接种量 10% (v/v), 结果如图 2-1 所示。图 2-1a 表明 *T. cutaneum* ACCC 20271 在 15% 固含量玉米秸秆水解液中经 12 h 延滞期后即可进入对数生长期, 发酵 84 h 后菌体干重及油脂产量分别为 19.84 g/L、4.44 g/L。*T. cutaneum* ACCC 20271 在 20% 固含量的玉米秸秆水解中经 156 h 培养后油脂产量为 5.78 g/L, 而 *R. toruloides* Y4 在玉米秸秆水解液中的油脂产量为 5.53 g/L<sup>[51]</sup>。而 *Y. lipolytica* 在 20% 小麦秸秆水解液中的油脂产量仅为 0.4 g/L<sup>[52]</sup>, 虽然 *Y. lipolytica* 是一株优良的油脂酵母模式菌株, 但是并不具备利用木质纤维素生物质生产微生物油脂的潜力。在高固含量(20%、25%)玉米秸秆水解液中需要经过相当长的延滞期后才可以进入生长阶段。尤其是在 25% 固含量玉米秸秆水解液中, *T. cutaneum* ACCC 20271 的延滞期长达 96 h, 导致 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用高固含量玉米秸秆水解液的油脂生产即失去了现实意义。这主要是由于随固含量增高, 水解液中抑制物浓度也明显提高(表 2-1), 而抑制了菌株的生长<sup>[175, 221, 222]</sup>。在发酵期间, 玉米秸秆水解液中的木糖浓度仅有微量减少, 这可能是由于葡萄糖存在时 *T. cutaneum* ACCC 20271 优先利用葡萄糖, 或者是由于水解液中抑制物抑制了木糖代谢关键酶的活性等。在其发酵期间, 玉米秸秆水解液中抑制物浓度变化如图 2-2 所示。在 15%、20%、25% 固含量水解液的发酵过程中 *T. cutaneum* ACCC 20271 首先将糠醛降解掉, 才可以进行 HMF 和乙酸的降解。经过 6、36、48 h 后三种固含量水解液中的糠醛被 *T. cutaneum* ACCC 20271 完全降解掉。结合图 2-1、2-2 可知, *T. cutaneum* ACCC 20271 在玉米秸秆水解液中是否能够生长与糠醛的存在与否具有密切关系。只有在糠醛基本消耗掉之后 *T. cutaneum* ACCC 20271 才会进入生长期, 说明糠醛的存在可能直接抑制了菌体生长、繁殖的关键酶等。

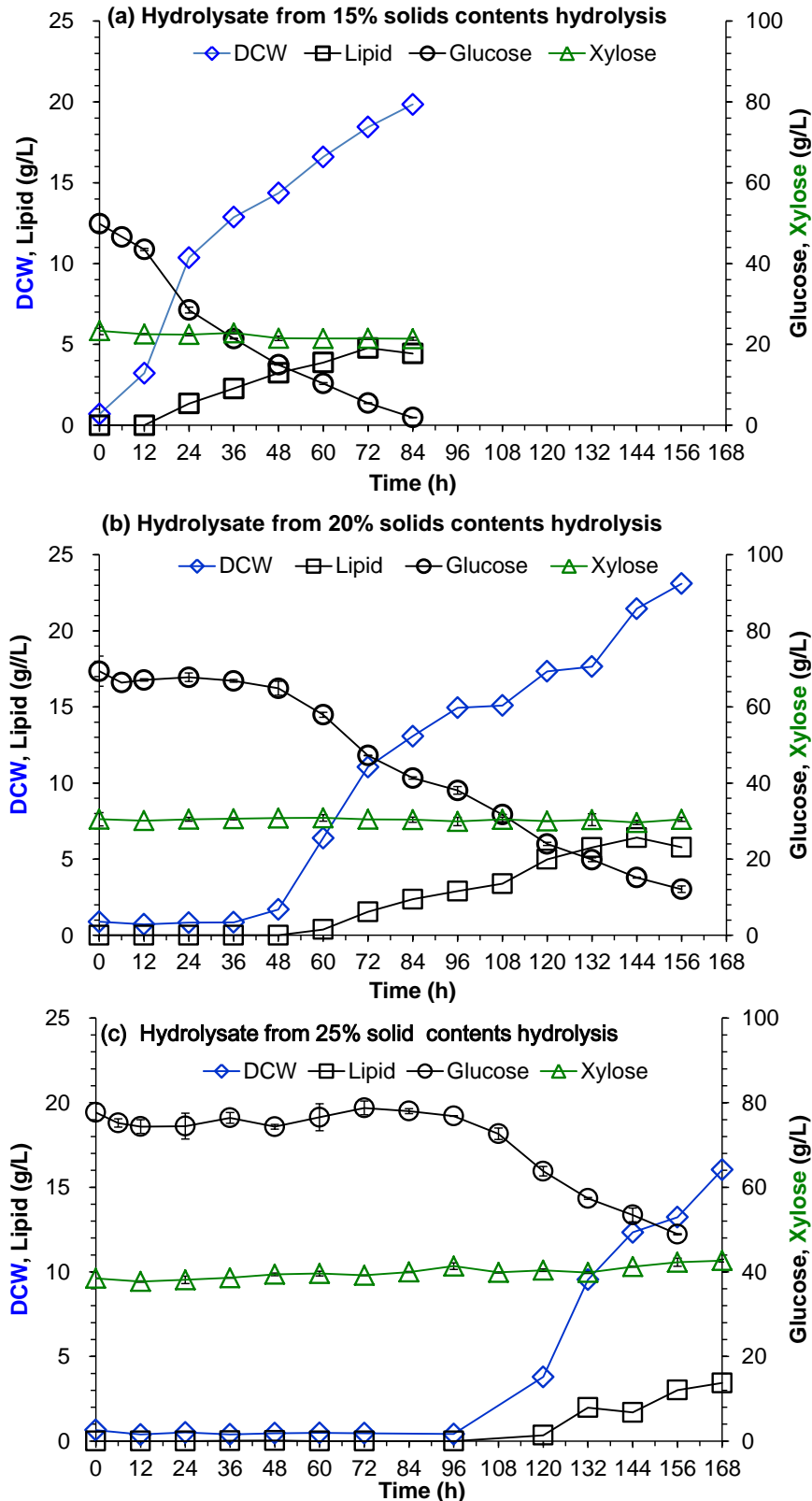


图 2-1 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用不同固含量玉米秸秆水解液生产微生物油脂

(a) 15% 玉米秸秆水解液; (b): 20% 玉米秸秆水解液; (c) 25% 玉米秸秆水解液

Figure 2-1 Microbial lipid production by *T. cutaneum* ACCC 20271 using different solids contents of corn stover hydrolysate

(a) 15% solids contents corn stover hydrolysate; (b) 20% solids contents corn stover hydrolysate; (c) 25% solids contents corn stover hydrolysate

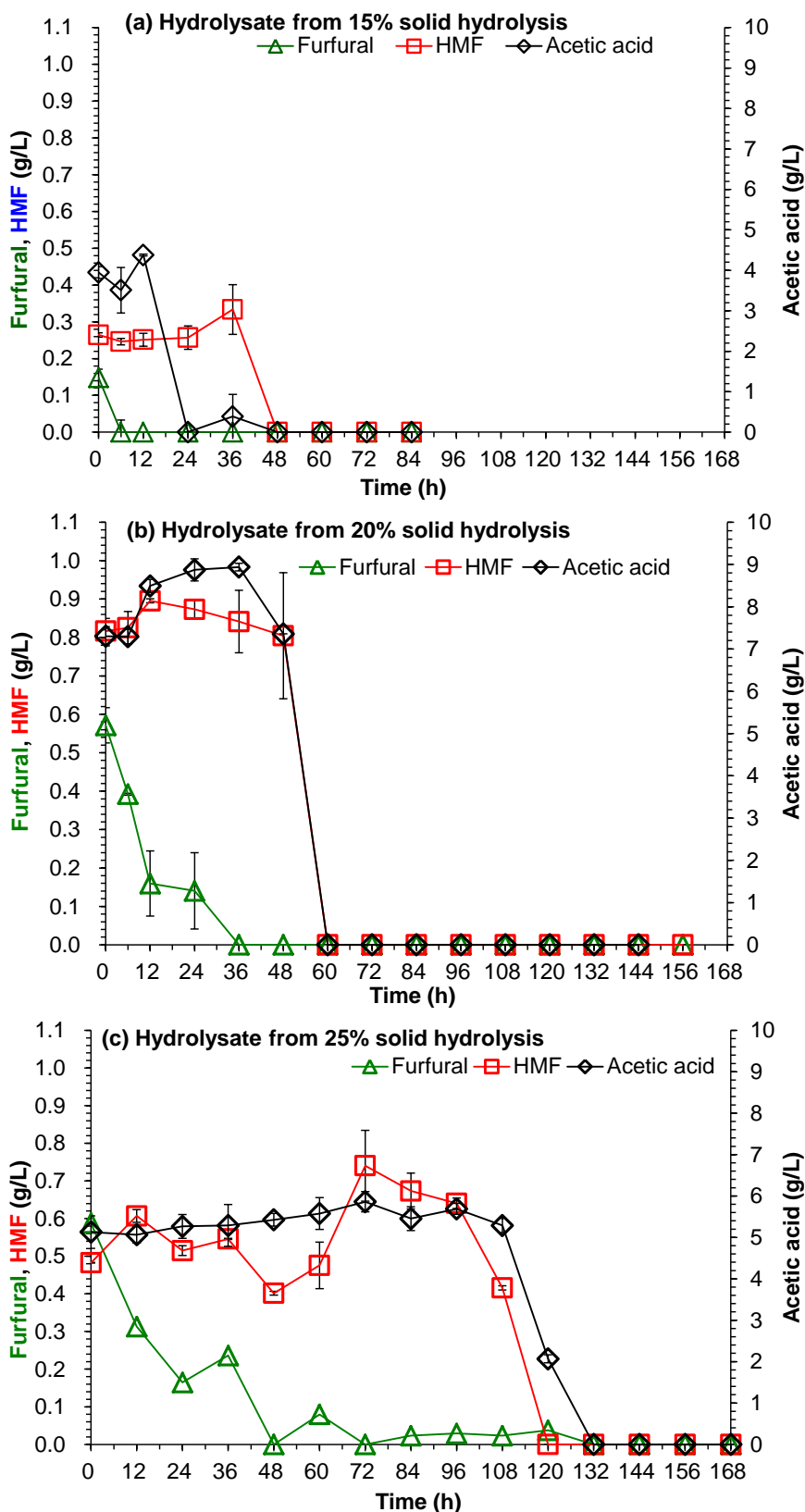


图 2-2 不同固含量玉米秸秆水解液的抑制物浓度变化曲线

(a) 15% 玉米秸秆水解液; (b): 20% 玉米秸秆水解液; (c) 25% 玉米秸秆水解液

Figure 2-2 Time course of inhibitors of different solids contents of corn stover hydrolysate  
 (a) 15% solids contents corn stover hydrolysate; (b) 20% solids contents corn stover hydrolysate; (c) 25% solids contents corn stover hydrolysate

#### 2.4.2 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用脱毒玉米秸秆制备的水解液生产微生物油脂

本部分研究中采用不同固含量脱毒水解液进行纤维素微生物油脂生产。如图 2-3 所示,脱毒过程的确明显地促进了 *T. cutaneum* ACCC 20271 的油脂产量并且也提高了发酵速率。同样 *Y. lipolytica* Po1g 两种酵母在脱毒的木质纤维素体系中的油脂产量分别提高至 7.39 g/L<sup>[48]</sup>。在 15%、20% 未脱毒的玉米秸秆水解液中,经 84 h、156 h 葡萄糖才基本消耗完毕(图 2-1a、图 2-1b),而在 15%、20% 脱毒的玉米秸秆水解液中经 78 h、120 h 即可基本消耗完。由图 2-3 可知 *T. cutaneum* ACCC 20271 可以很好的在 15%~30% 固含量脱毒玉米秸秆水解液中生长与代谢。在 25% 脱毒玉米秸秆水解液中的 *T. cutaneum* ACCC 20271 的菌体干重最高,为 31.48 g/L(图 2-3c);在 30% 脱毒水解液中的油脂产量最高,为 8.572 g/L(图 2-3d)。菌体干重并没有随固含量的升高而得到提高,这是由于在高固含量水解液中的高浓度的糖对菌体的底物抑制及过高的渗透压而导致的<sup>[223]</sup>。本部分实验所得的油脂产量高于 *Y. lipolytica* Po1g 利用脱毒米糠水解液中的油脂产量(7.39 g/L)<sup>[48]</sup>及 *T. cutaneum* CH002 利用脱毒的玉米芯酸解液的油脂产率(7.96 g/L)<sup>[224]</sup>。

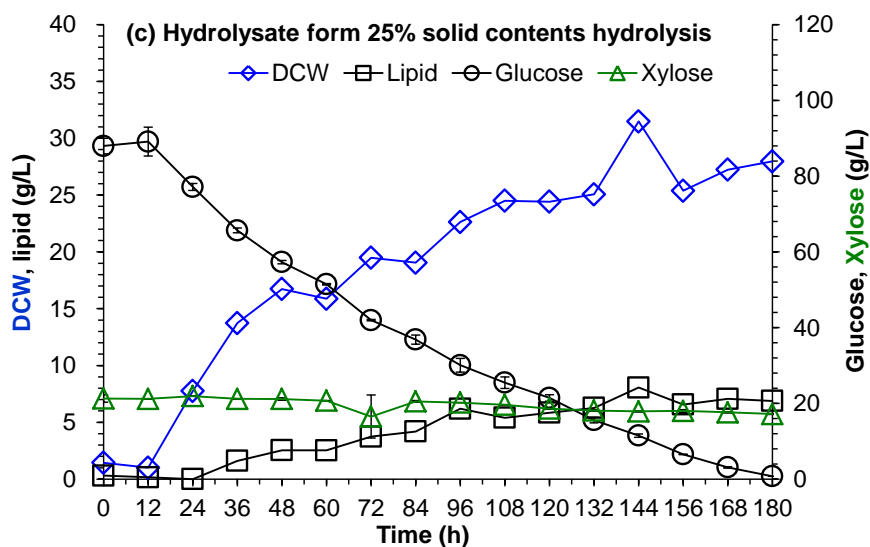
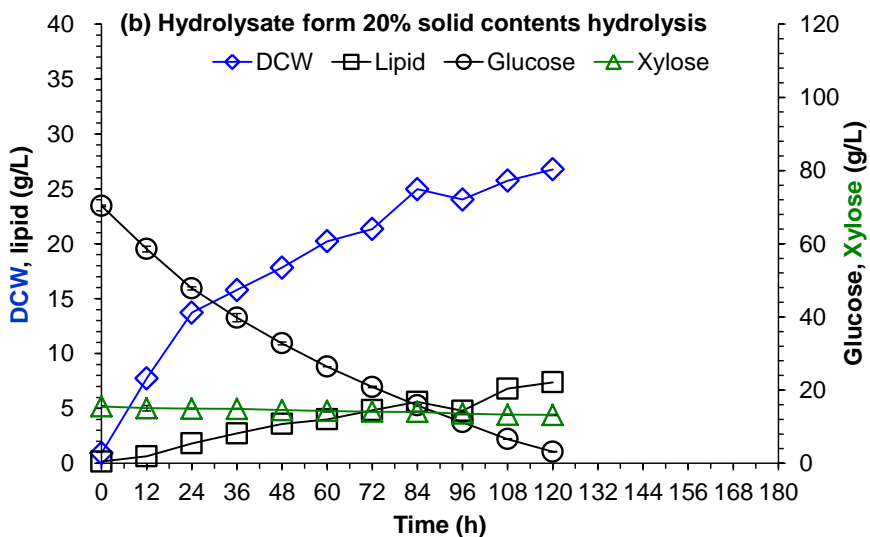
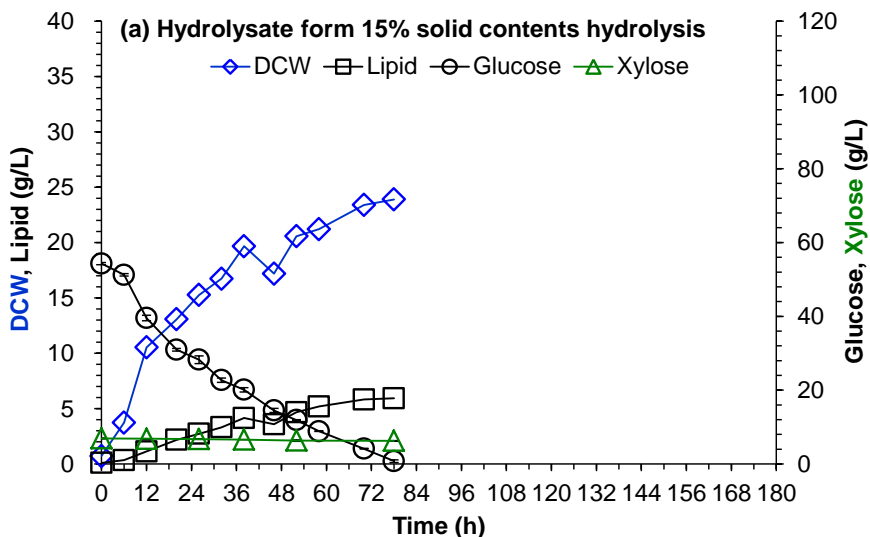
与未脱毒水解液相似的是,在发酵期间脱毒玉米秸秆水解液中的木糖浓度仅有微量降低,说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 不能同步代谢葡萄糖及木糖。

#### 2.4.3 生物柴油的合成

脂肪酸链的长度、不饱和度、支链结构影响着生物柴油物理特性和燃料性能<sup>[225]</sup>。十六烷值、废气排放量、燃烧热、冷流、氧化稳定性、粘度和润滑性等生物柴油的性能取决于脂肪酸的特性。支链酯可提高其低温性能,饱和长链脂肪酸会降低粘度<sup>[226]</sup>。

*T. cutaneum* ACCC 20271 利用玉米秸秆水解液生产的微生物油脂组分见表 2-2。该油脂主要是由 C16~C18 长度的碳链构成,同时含有微量 C14、C15、C19、C24 脂肪酸。其中油酸(C18:1)含量最高,为 42.11%,其次为软脂酸(C16:1),含量为 19.41%。不饱和脂肪酸的含量为 64.96%。

300 mL 微生物油脂经酯交换制备的生物柴油(约 160 mL),如图 2-4 所示。生物柴油得率约为 53.3%。生物柴油性能检测结果见表 2-3,除含水量较高外,该生物柴油其他指标达到了中国生物柴油 BD100 标准(GB/T 25199-2010)和美国 ASTM (American Society for Testing and Materials)标准<sup>[227]</sup>。而含水量的偏高可通过提高烘干温度或延长烘干时间来克服。



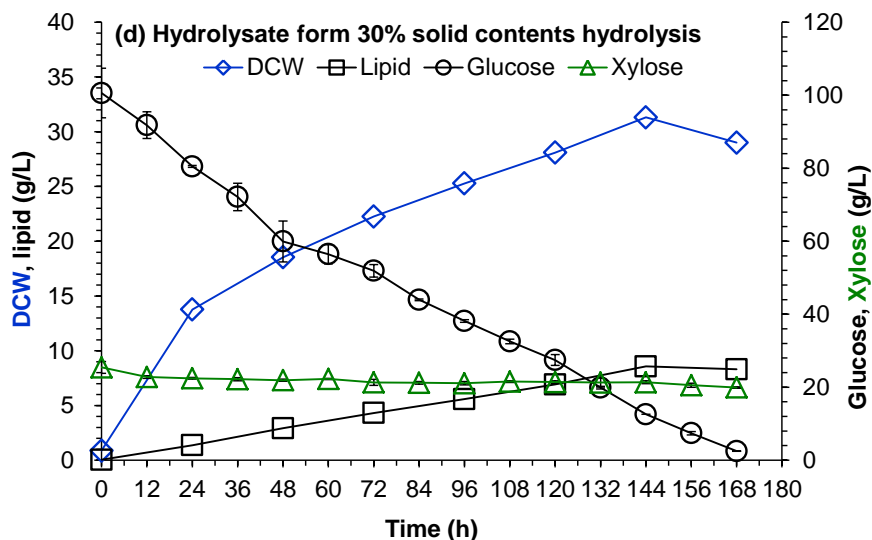


图 2-3 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用不同固含量脱毒玉米秸秆水解液生产微生物油脂  
(a) 15% 玉米秸秆水解液; (b) 20% 玉米秸秆水解液; (c) 25% 玉米秸秆水解液; (d) 30% 玉米秸秆水解液

Figure 2-3 Microbial lipid production by *T. cutaneum* ACCC 20271 using different solids contents biotodetoxified corn stover hydrolysat

(a) 15% solids contents corn stover hydrolysat; (b) 20% solids contents corn stover hydrolysat; (c) 25% solids contents corn stover hydrolysat; (d) 30% solids contents corn stover hydrolysat

表 2-2 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用玉米秸秆水解液生产的微生物油脂的脂肪酸组成  
Table 2-2 Fatty acid composition of the microbial lipid produced by *T. cutaneum* ACCC 20271 using corn stover hydrolysat

Composition		Content (%)
Myristate	C14:0	0.23
Pentadecanoate	C15:0	0.67
Palmitoleate	C16:1	10.69
Palmitate	C16:0	19.41
Margaroleate	C17:1	7.90
Margarate	C17:0	3.56
Linoleate	C18:2	4.26
Oleate	C18:1	42.11
Stearate	C18:0	5.98
Nonadecanoate	C19:0	0.22
Lignocerate	C24:0	0.46



图 2-4 酯交换制备的生物柴油

Figure 2-4 Biodiesel synthesized after transesterification

表 2-3 由 *T. cutaneum* ACCC 20271 微生物油脂合成的生物柴油性能分析Table 2-3 Characteristics of biodiesel derived from microbial lipid produced by *T. cutaneum* ACCC 20271 using corn stover hydrolysate

Index and unit	Microbial biodiesel	BD100 Standard	ASTM standard
1 Acid value (KOH mg/g samples)	0.28	≤0.80	<0.8
2 Copper strip corrosion (50 °C, 3 h)	1	≤1	<3
3 Water content (%)	0.091	≤0.050	<0.05
4 Kinetic viscosity (20 °C, mm <sup>2</sup> /s)	6.42 (20 °C)	1.9-6.0 (40 °C)	1.9-6.0 (40 °C)
5 Flash point (°C)	178.5	≥130	>100
6 Sulfur content (%)	<0.5	<50	<50
7 Density (g/cm <sup>3</sup> )	0.8809	0.820-0.900	-
8 Lubrication (HFRR) and wear scar diameter (μm)	587	-	-
9 Cloud point (°C)	undetected	-	-
10 Fatty acid methyl ester (%)	>97	-	-

#### 2.4.4 *T. cutaneum* ACCC 20271 对木质纤维素来源抑制物的耐受性分析

鉴于抑制物对 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长及油脂发酵具有一定的抑制作用，所以需要系统分析 *T. cutaneum* ACCC 20271 对木质纤维素来源的典型抑制物的耐受性。将 *T. cutaneum* ACCC 20271 接种至含有单一抑制物的合成培养基中。考察抑制物对菌体生长及油脂累积的影响。

##### (a) 呋喃类抑制物

糠醛、HMF 作为典型的呋喃类抑制物，是木质纤维素水解产物中的主要抑制物<sup>[228]</sup>，通过破坏 DNA<sup>[229, 230, 231]</sup>、抑制糖酵解相关酶<sup>[232, 233]</sup>与胞内物质发生化合反应<sup>[234]</sup>等来抑

制发酵菌株的生长。如图 2-5 所示, 对照组中 *T. cutaneum* ACCC 20271 的菌体干重及油脂产量分别为 15.70 g/L、4.238 g/L。而实验组中 0.5 g/L 的糠醛即可明显抑制 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长, 培养 120 h 后菌体干重、油脂产量分别为 5.50 g/L、0.40 g/L, 与对照组相比降低了 65.0%、90.6%。1 g/L 糠醛时 *T. cutaneum* ACCC 20271 的菌体干重比对照组降低了 64.4%。据文献报道 *R. toruloides* AS 2.1389 在 1 g/L 糠醛时的菌体干重比对照组低 60%<sup>[60]</sup>, *R. toruloides* Y4 在 1 mM (0.96 g/L) 的糠醛下菌体干重降低了 45.5%<sup>[149]</sup>, 说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 对糠醛的耐受性和 *R. toruloides* AS 2.1389、*R. toruloides* Y4 是相当的。

与糠醛相比, HMF 的毒性要低很多, 如图 2-6 所示。即使在 4 g/L HMF 浓度下, *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长及油脂累积仅受到微弱的抑制。在 5 g/L HMF 条件下, 菌体干重及油脂产量分别为 10.74、2.69 g/L, 分别比对照组低 35.3%、24.7%。

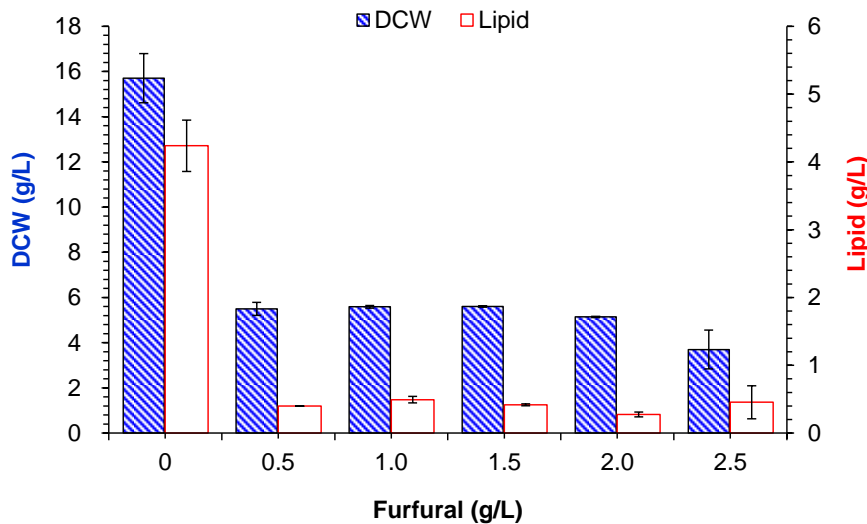


图 2-5 *T. cutaneum* ACCC 20271 对糠醛的耐受性分析

Figure 2-5 Tolerance of *T. cutaneum* ACCC 20271 to furfural

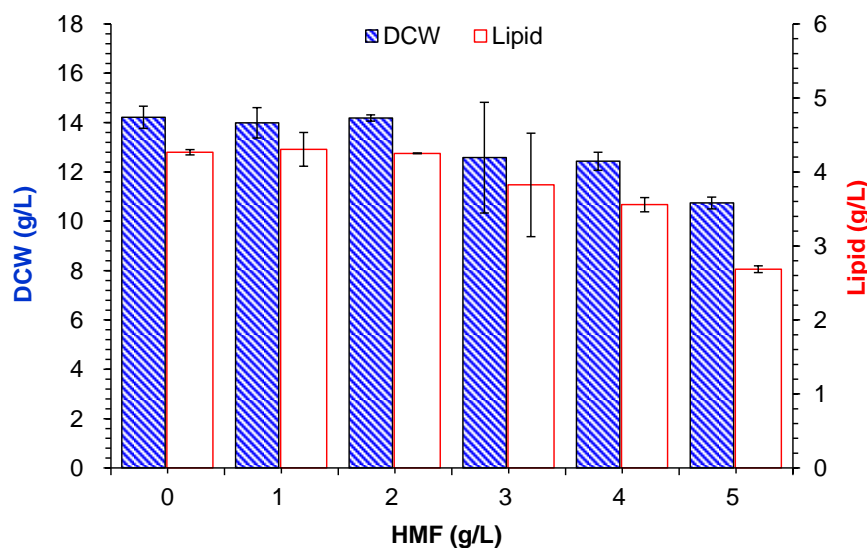


图 2-6 *T. cutaneum* ACCC 20271 对 HMF 的耐受性分析

Figure 2-6 Tolerance of *T. cutaneum* ACCC 20271 to HMF

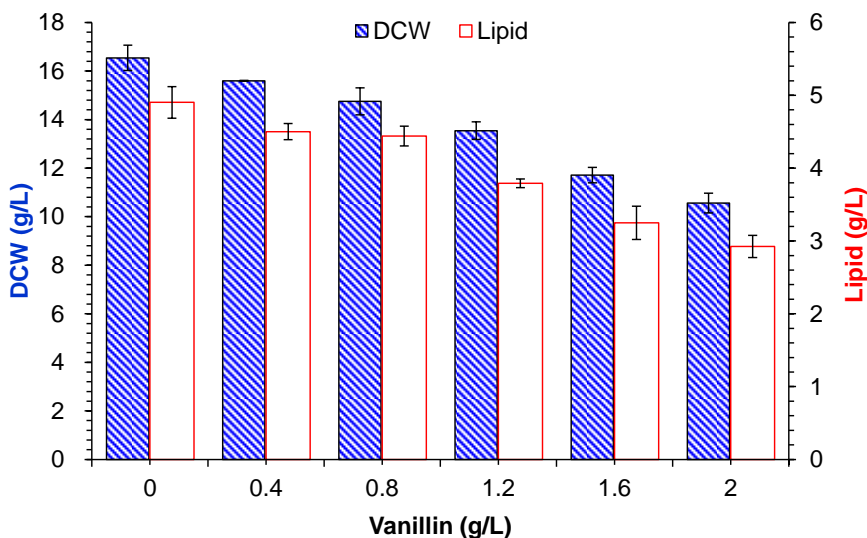


图 2-7 *T. cutaneum* ACCC 20271 对香草醛的耐受性分析

Figure 2-7 Tolerance of *T. cutaneum* ACCC 20271 to vanillin

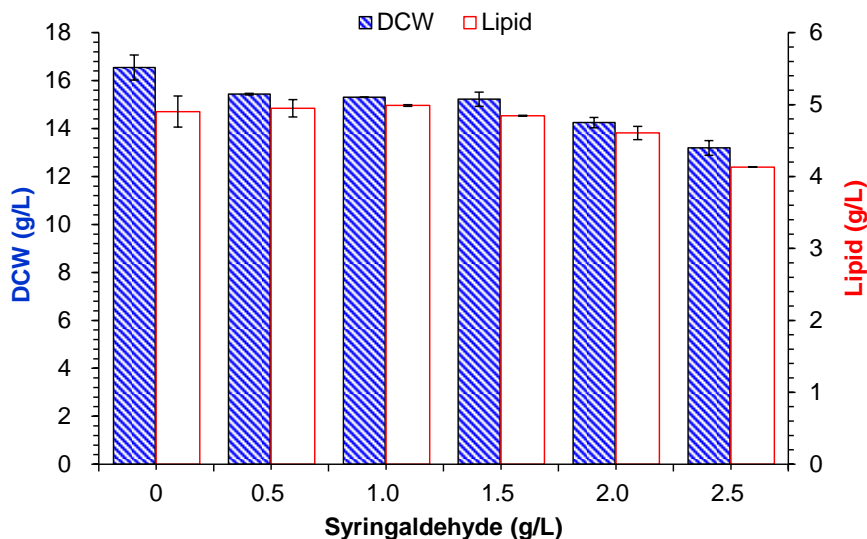


图 2-8 *T. cutaneum* ACCC 20271 对丁香醛的耐受性分析

Figure 2-8 Tolerance of *T. cutaneum* ACCC 20271 to syringaldehyde

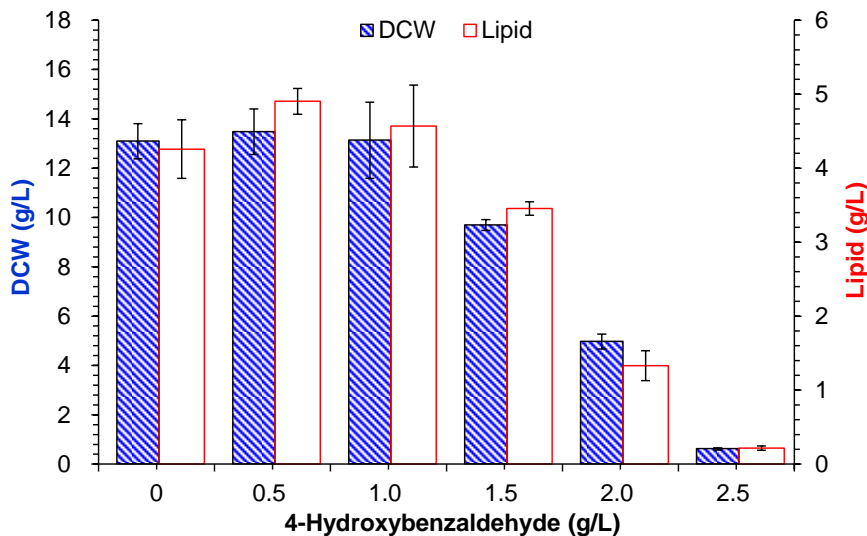


图 2-9 *T. cutaneum* ACCC 20271 对 4-羟基苯甲醛的耐受性分析

Figure 2-9 Tolerance of *T. cutaneum* ACCC 20271 to 4-hydroxybenzaldehyde

### (b) 酚类抑制物

酚类化合物不仅对发酵菌种具有明显的抑制<sup>[235]</sup>, 还对纤维素酶具有抑制作用<sup>[226]</sup>。本文中研究了 *T. cutaneum* ACCC 20271 对三种典型的酚醛化合物: 香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛的耐受性, 分别代表木质素基本单元的愈创木基、丁香基和苯羟基<sup>[175]</sup>。酚醛的抑制性取决于酚醛上的功能团而不是芳香基团本身<sup>[212]</sup>。在三种酚醛化合物中, *T. cutaneum* ACCC 20271 对香草醛的耐受性居中, 2 g/L 香草醛时, *T. cutaneum* ACCC 20271 菌体干重及油脂产量分别为 10.56、2.93 g/L, 分别比对照组降低了 36.16%、40.35% (图 2-7)。*R. toruloides* AS 2.1389 (2 g/L)<sup>[60]</sup>或 *R. toruloides* Y4 (12 mM 香草醛=1.82 g/L)<sup>[149]</sup>对香草醛的耐受性与 *T. cutaneum* ACCC 20271 是相当的。在三种酚醛化合物中 *T. cutaneum* ACCC 20271 对丁香醛的耐受性最高, 2.5 g/L 丁香醛时 *T. cutaneum* ACCC 20271 的菌体生长并没有受到明显抑制, 培养 120 h 后菌体干重、油脂产量分别为 13.19、4.13 g/L, 分别为对照组的 79.7%、84.3% (图 2-8), 但是该值仍旧高于 *R. toruloides* Y4 在 12 mM (2.18 g/L)丁香醛下的菌体干重(12.4 g/L)<sup>[149]</sup>, 说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 对丁香醛的耐受性优于 *R. toruloides* Y4。在 1.5 g/L 4-羟基苯甲醛存在时, *T. cutaneum* ACCC 20271 生长即受到明显的抑制, 2.5 g/L 4-羟基苯甲醛时 *T. cutaneum* ACCC 20271 菌体干重、油脂产量分别为 0.62、0.22 g/L, 仅为对照组的 4.7%、5.1% (图 2-9)。而 10 mM (1.22 g/L) 4-羟基苯甲醛即可完全抑制 *R. toruloides* Y4<sup>[149]</sup>。说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 对 4-羟基苯甲醛的耐受性优于 *R. toruloides* Y4。综上可知, *T. cutaneum* ACCC 20271 对三种酚醛化合物的耐受性由高到低的顺序为: 丁香醛>香草醛>4-羟基苯甲醛, 该结果与 Hu 等曾报道的 *R. toruloides* Y4 的耐受性分析结果是相似的<sup>[149]</sup>。并且本结果也符合与先前提出的酚类化合物的毒性与疏水性相关的结论<sup>[236]</sup>。

### (c) 弱酸类抑制物

甲酸、乙酸、乙酰丙酸是木质纤维素水解液中最常见的弱酸类抑制物。在 6 g/L 甲酸存在条件下, *T. cutaneum* ACCC 20271 菌体干重及油脂产量明显低于对照组(图 2-10)。*R. toruloides* AS 2.1389 在 2 g/L、4 g/L 甲酸时的生物量分别降低了 25%、40%, 而 *T. cutaneum* ACCC 20271 在 2 g/L、4 g/L 甲酸时的生物量分别降低了 17.9%、25.7%, 证明 *T. cutaneum* ACCC 20271 对甲酸的耐受性高于 *R. toruloides* AS 2.1389。图 2-11 说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 表现出对乙酸的良好耐受性, 25 g/L 乙酸存在时的菌体干重及油脂产量分别降低了 49.6%、34.0%。并且随乙酸浓度升高, 菌体含油率逐步上升, *R. toruloides* Y4 同样也表现出这一现象<sup>[149]</sup>。说明乙酸可被 *T. cutaneum* ACCC 20271 用于油脂的累积, 其原因可能是由于乙酸的存在提高了 C/N 所致。另外 Gong 等<sup>[163]</sup>已证实乙酸可作为油脂酵母 *C. curvatus* 生产油脂的碳源。此外据报道, 油脂酵母 *C. curvatus* 在乙酸与葡萄糖或木糖的共发酵中, 可同时利用乙酸及葡萄糖或木糖, 并且乙酸的存在可促进该菌株的油脂生产<sup>[237]</sup>。相对于乙酸而言, *T. cutaneum* ACCC 20271 对乙酰丙酸的耐受性明显降低很多, 15 g/L 乙酰丙酸条件下, *T. cutaneum* ACCC 20271 经 120 h 培养后, 菌体干重及油脂产量仅为 1.32、0.42 g/L, 是对照组的 8.9%、8.5% (图 2-12)。Huang

等人<sup>[238]</sup>发现 *T. fermentans* 具有较好的乙酰丙酸耐受性，在 310 mM (35.96 g/L)时 *T. fermentans* 的细胞生长及油脂产量分别降低了 21%、50%。

综上所述，与其他微生物一样 *T. cutaneum* ACCC 20271 对糠醛和 4-强加苯甲醛的敏感性较高，但相对而言其对 HMF、丁香醛和弱酸的耐受性较好。与 *R. toruloides* 相比，*T. cutaneum* ACCC 20271 对乙酸、丁香醛、4-羟基苯甲酸的耐受性较高，而对糠醛、甲酸和香草醛的耐受性是相当的。

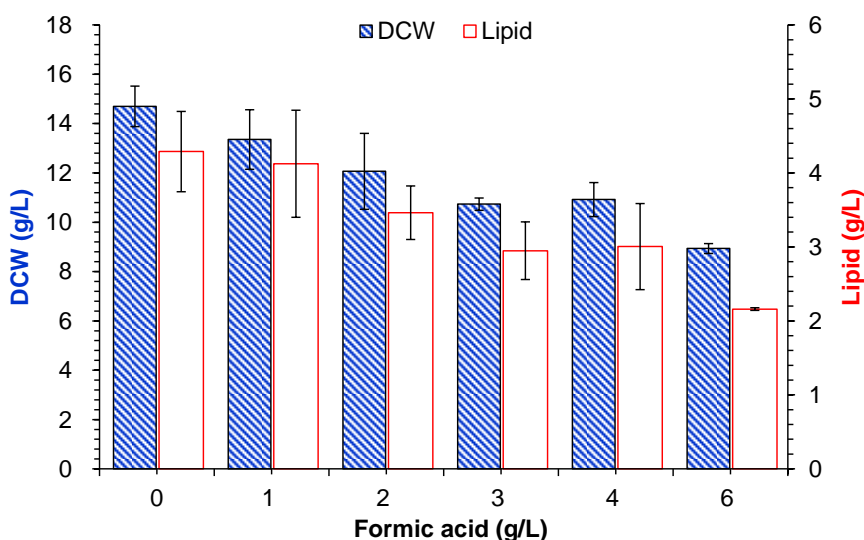


图 2-10 *T. cutaneum* ACCC 20271 对甲酸的耐受性分析

Figure 2-10 Tolerance of *T. cutaneum* ACCC 20271 to formic acid

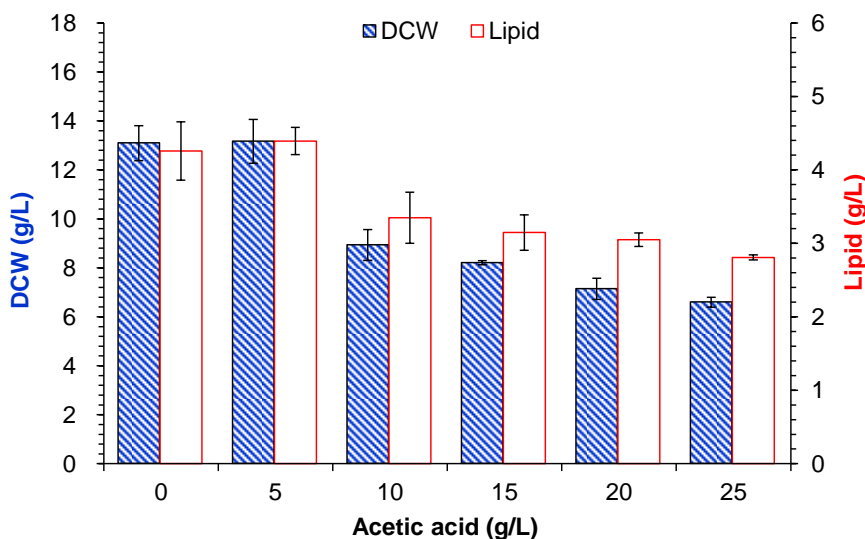


图 2-11 *T. cutaneum* ACCC 20271 对乙酸的耐受性分析

Figure 2-11 Tolerance of *T. cutaneum* ACCC 20271 to acetic acid

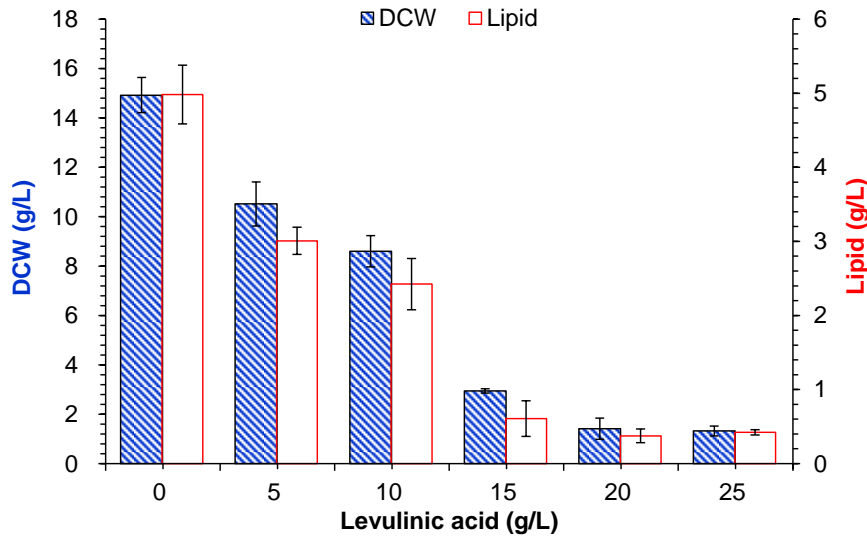


图 2-12 *T. cutaneum* ACCC 20271 对乙酰丙酸的耐受性分析

Figure 2-12 Tolerance of *T. cutaneum* ACCC 20271 to levulinic acid

#### 2.4.5 *T. cutaneum* ACCC 20271 对木质纤维素来源抑制物的生物转化与脱毒

在抑制物作为唯一碳源的情况下, 考察 *T. cutaneum* ACCC 2.1374 对木质纤维素来源抑制物的生物转化能力。参考 *T. cutaneum* ACCC 20271 对抑制物的耐受性实验结果及不同预处理强度玉米秸秆物料中抑制物浓度<sup>[239]</sup>而设定抑制物的浓度。所选的典型的木质纤维素来源抑制物及其浓度分别为: 1.0 g/L 糠醛、3.0 g/L HMF、2.0 g/L 香草醛、2.5 g/L 丁香醛、1.0 g/L 4-羟基苯甲醛、3.0 g/L 甲酸、15 g/L 乙酸、10 g/L 乙酰丙酸。

##### (a) 呋喃类抑制物

如图 2-13 所示, 1 g/L 的糠醛经 12 h 后即可被 *T. cutaneum* ACCC 20271 完全降解掉, 同时生成糠醇及糠酸, 但是自 24 h 后糠醇全部转化为糠酸, 并且糠酸浓度基本保持不变, 故推测 *T. cutaneum* ACCC 20271 可能不具备进一步降解糠酸的能力。由于糠醛具有较高的挥发性, 导致对照组中糠醛含量的降低 (0.31 g/L)。并且在无糖的合成培养基中单独添加 2.5 g/L 糠酸的实验中发现, 糠酸依旧不能被 *T. cutaneum* ACCC 20271 降解(图 2-14), 不但印证了上述推测, 还证实了糠酸是 *T. cutaneum* ACCC 20271 代谢糠醛的最终降解产物。

3.0 g/L HMF 经 48 h 后即完全被降解, 在 12 h 时即可检测到其降解产物 5-羟甲基糠醇和 5-羟甲基糠酸的累积, 随时间延长 5-羟甲基糠醇转化为 5-羟甲基糠酸, 最终 5-羟甲基糠酸的浓度不再变化。推测 *T. cutaneum* ACCC 20271 同样不具备降解 5-羟甲基糠酸的能力(图 2-15)。在以 5-羟甲基糠酸为唯一碳源的实验中发现, *T. cutaneum* ACCC 20271 依旧不能降解该酸(图 2-16)。据文献报道, 呋喃-2,5-二羧酸是连接糠醛、HMF 降解路径的中间代谢产物。在以呋喃-2,5-二羧酸为唯一碳源的实验结果表明, 也不能被 *T. cutaneum* ACCC 20271 降解(图 2-17)。综上可知, 糠醛、HMF 均不能被 *T. cutaneum* ACCC 20271 完全降解而进入中心碳代谢。

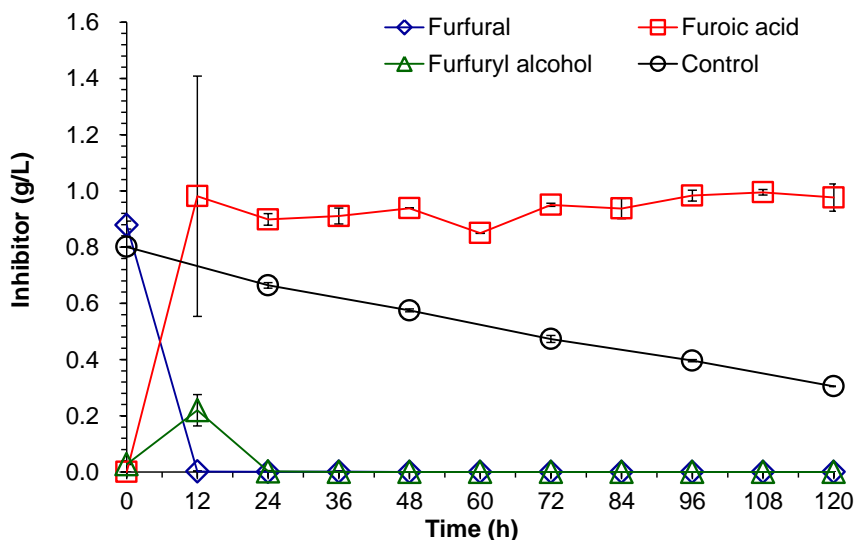


图 2-13 *T. cutaneum* ACCC 20271 对糠醛降解

Figure 2-13 Biodegradation of furfural in *T. cutaneum* ACCC 20271

Control: 以无菌水代谢种子液，其他操作相同，下同。

Control: replace the seed culture with sterilized water, other operation was same, similarly hereinafter.

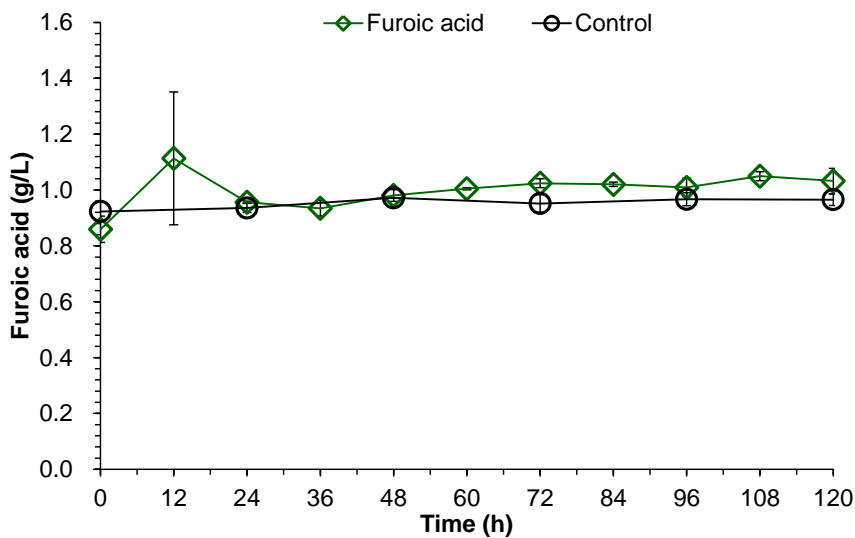
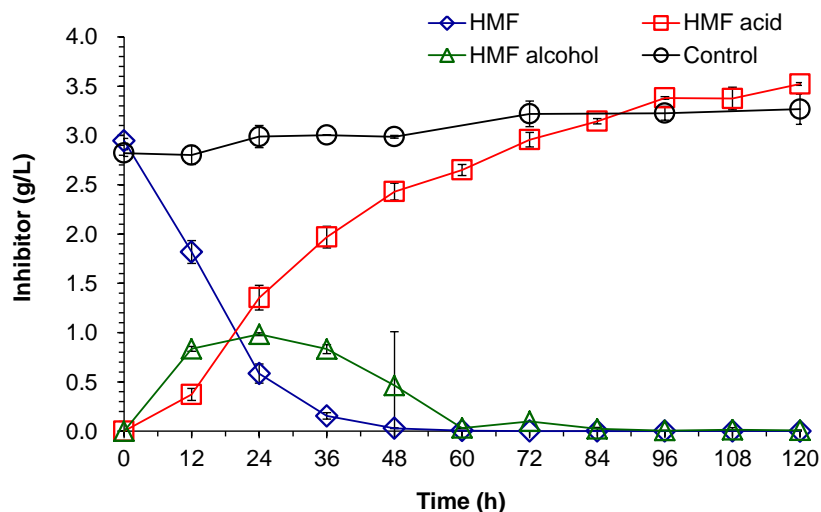
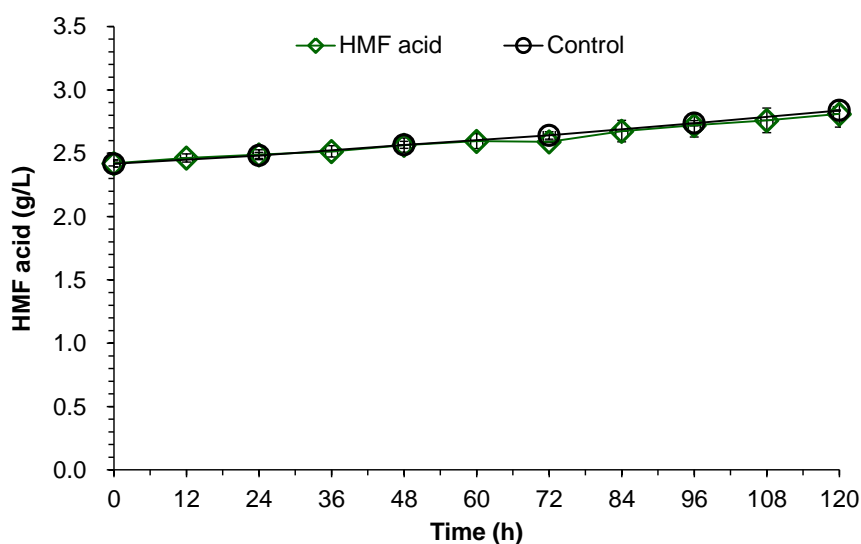
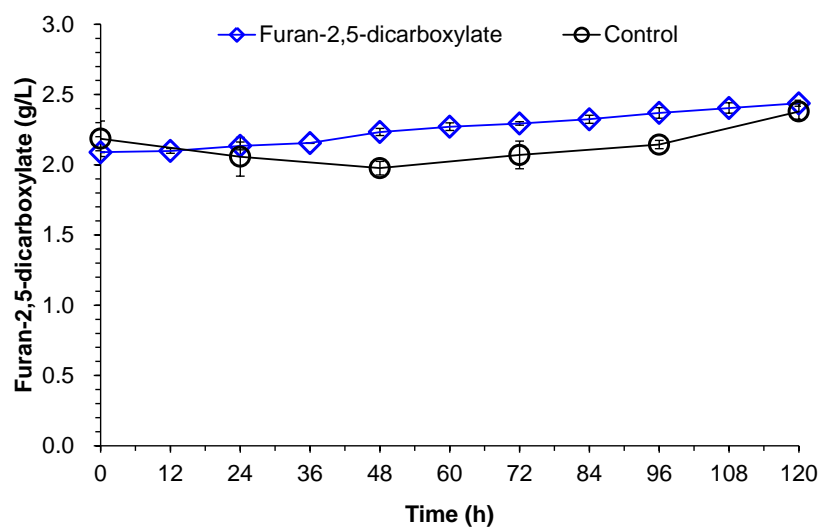


图 2-14 *T. cutaneum* ACCC 20271 对糠酸降解

Figure 2-14 Biodegradation of furoic in *T. cutaneum* ACCC 20271

图 2-15 *T. cutaneum* ACCC 20271 对 HMF 的降解Figure 2-15 Biodegradation of HMF in *T. cutaneum* ACCC 20271图 2-16 *T. cutaneum* ACCC 20271 对 5-羟甲基糠酸的降解Figure 2-16 Biodegradation of HMF acid in *T. cutaneum* ACCC 20271图 2-17 *T. cutaneum* ACCC 20271 对呋喃-2,5-二羧酸的降解Figure 2-17 Biodegradation of furan-2,5-dicarboxylate in *T. cutaneum* ACCC 20271

(b) 酚类抑制物

如图 2-18 所示，香草醛经 60 h 后即可被 *T. cutaneum* ACCC 2.137 转化完全，12 h 时即可检测到香草醇的生成并且开始累积，至 48 h 时浓度最高；而 36 h 时后香草酸浓度开始明显上升直到 72 h 后基本保持不变，在培养至 120 h 时香草酸浓度又开始降低，并且香草醛、香草醇、香草酸的总摩尔浓度由 0 h 的 9.50 mM 降低至 120 h 的 7.23 mM，另外在 2 g/L 香草酸为唯一碳源时，培养 120 h 后其浓度降低至 0.86 g/L（图 2-19），进一步证实 *T. cutaneum* ACCC 20271 具备降解香草酸的能力。

在丁香醛的降解中发现，随培养时间延长，丁香醛浓度逐步降低，同时丁向醇、丁香酸开始累积，自 72 h 后丁向醇浓度基本保持不变，但是丁香酸浓度依旧上升，如图 2-20 所示。在以丁香酸为唯一碳源的实验中发现，丁香酸是不能被 *T. cutaneum* ACCC 20271 降解的（图 2-21）。说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 不具备降解丁香酸的能力。

图 2-22 表明，*T. cutaneum* ACCC 20271 可快速的降解 4-羟基苯甲醛，并且生成的 4-羟基苯甲醇和 4-羟基苯甲酸也可以在 36 h 内被完全降解掉。说明 4-羟基苯甲醛可经 *T. cutaneum* ACCC 20271 转化并最终进入碳代谢而实现完全降解。

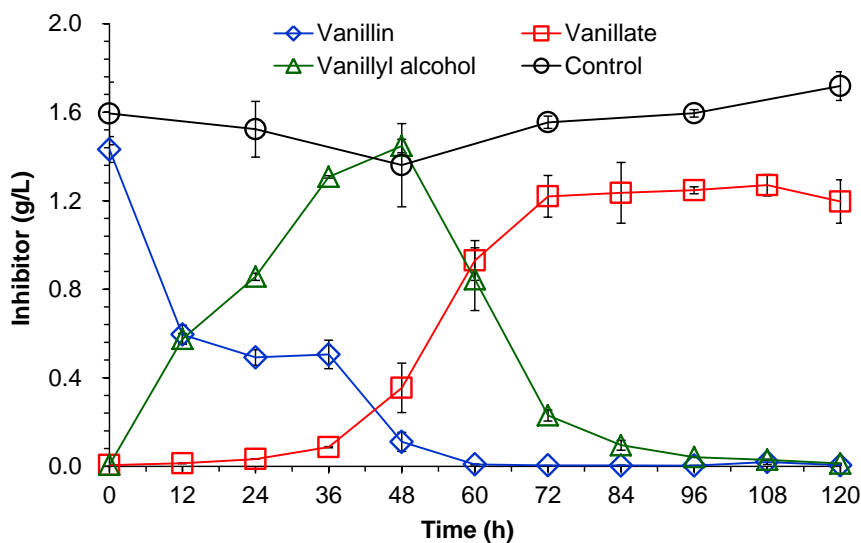


图 2-18 *T. cutaneum* ACCC 20271 对香草醛的降解

Figure 2-18 Biodegradation of vanillin in *T. cutaneum* ACCC 20271

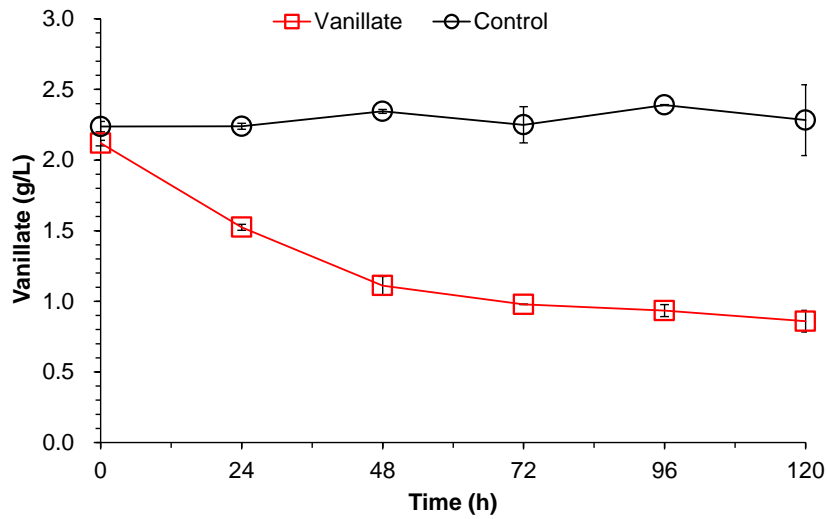


图 2-19 *T. cutaneum* ACCC 20271 对香草酸的降解

Figure 2-19 Biodegradation of vanillate in *T. cutaneum* ACCC 20271

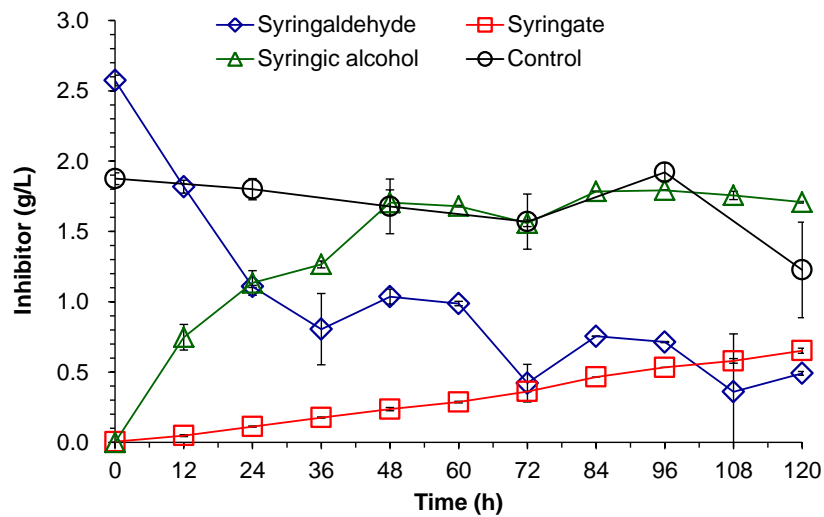


图 2-20 *T. cutaneum* ACCC 20271 对丁香醛的降解

Figure 2-20 Biodegradation of syringaldehyde in *T. cutaneum* ACCC 20271

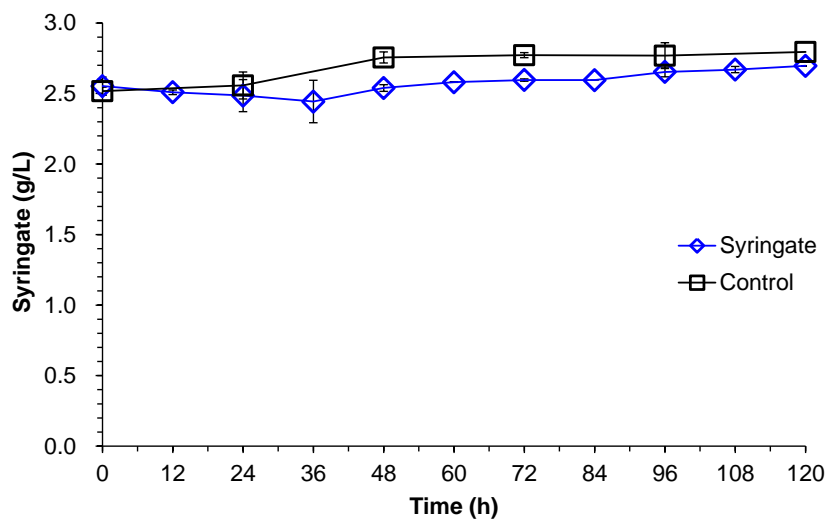


图 2-21 *T. cutaneum* ACCC 20271 对丁香酸的降解

Figure 2-21 Biodegradation of syringate in *T. cutaneum* ACCC 20271

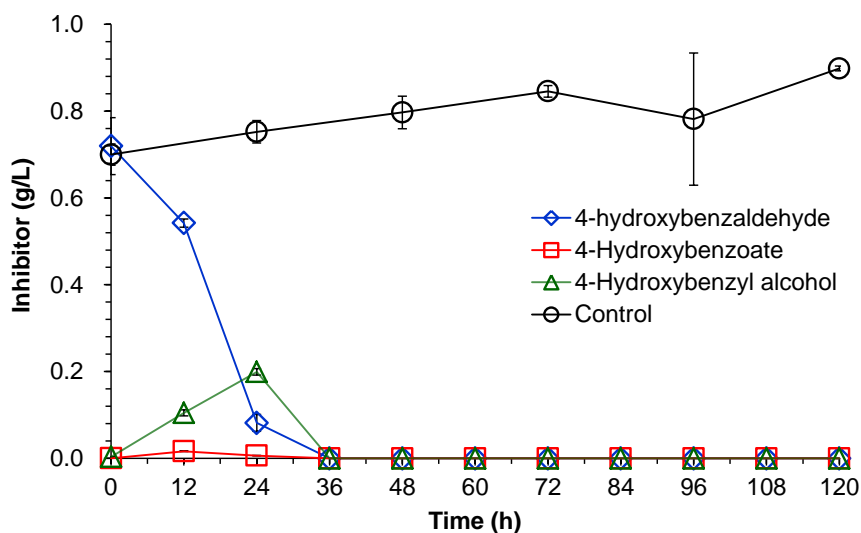


图 2-22 *T. cutaneum* ACCC 20271 对 4-羟基苯甲醛的降解

Figure 2-22 Biodegradation of 4-hydroxybenzaldehyde in *T. cutaneum* ACCC 20271

(c) 弱酸类抑制物

如图 2-23、2-24 所示，经过 96 h、84 h 后甲酸和乙酸均可以被 *T. cutaneum* ACCC 20271 完全降解，而乙酰丙酸仅部分被降解掉（图 2-25），并且没有检测到相应的代谢产物的出现。

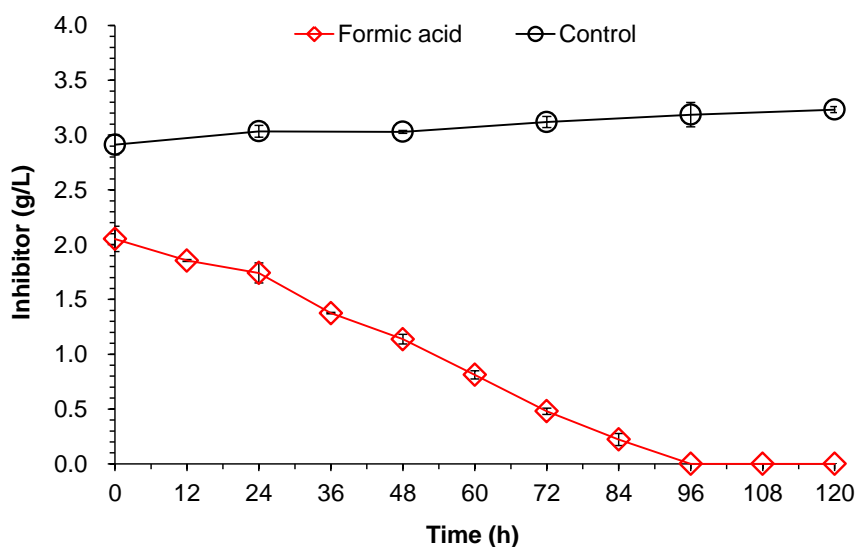
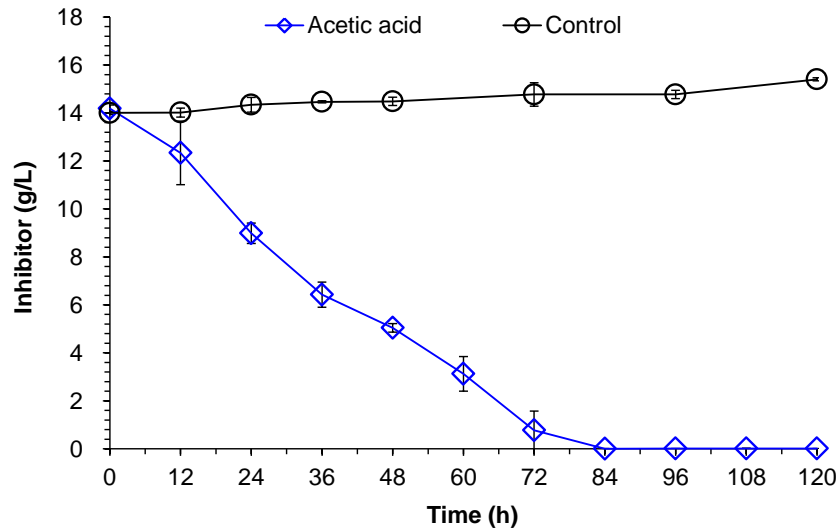
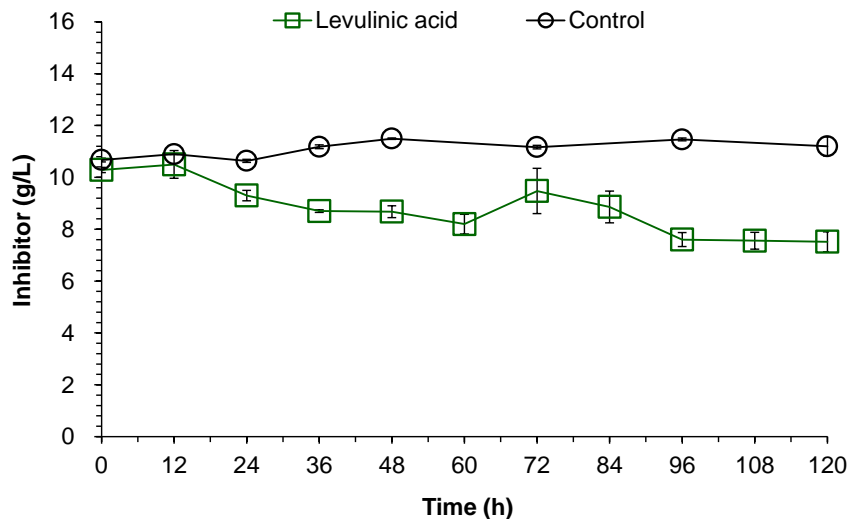


图 2-23 *T. cutaneum* ACCC 20271 对甲酸的降解

Figure 2-23 Biodegradation of formic acid in *T. cutaneum* ACCC 20271

图 2-24 *T. cutaneum* ACCC 20271 对乙酸的降解Figure 2-24 Biodegradation of acetic acid in *T. cutaneum* ACCC 20271图 2-25 *T. cutaneum* ACCC 20271 对乙酰丙酸的降解Figure 2-25 Biodegradation of levulinic acid in *T. cutaneum* ACCC 20271

#### 2.4.6 *T. cutaneum* ACCC 20271 在玉米秸秆水解液中长期适应性培养

为进一步提高 *T. cutaneum* ACCC 20271 对玉米秸秆水解液的适应能力, 采用长期适应性培养的策略通过梯度培养来逐步提高 *T. cutaneum* ACCC 20271 对木质纤维素来源抑制物的耐受性。如果在连续 5~7 次转接培养期间 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长 ( $OD_{600}$ ) 稳定在 1~2 单位内、培养 24 h 后残留葡萄糖量稳定在 2~3 g/L 范围内即可进入下一梯度的培养。

首先 *T. cutaneum* ACCC 20271 在 50% (v/v) 的模拟水解液的合成培养基 (50% SMI) 中培养, 由图 2-26 可知, 转接 17 次之后的每次转接培养 24 h 后菌体生长趋于稳定,  $OD_{600}$  保持在 5~6 之间, 培养 24 h 后发酵液残留葡萄糖浓度为 21~22 g/L 之间。转接培养 76 次后, 开始在 75% 合成培养基 (75% SMI) 中进行, 转接培养至 102 次期间生长基本趋于稳定, 98~104 次转接培养期间菌体  $OD_{600}$  基本保持在 4~5 之间, 而发酵液中残留葡萄糖

稳定在 36~37 g/L 之间。开始在低抑制物浓度的 15% 固含量玉米秸秆水解液(CSH-L)中  
转接培养, 期间 *T. cutaneum* ACCC 20271 菌体生长虽有小范围的波动, 但是整体趋于稳  
定, 转接培养至第 190 次, 开始在常规的、高浓度抑制物的 15% 固含量玉米秸秆水解液  
中培养。但是菌体生长状态仍然较差, 所以先用无菌水将其稀释至 50% (v/v) (50%  
CSH-H)之后培养, 在第 191~206 次转接培养期间, 菌体的生长基本保持稳定, OD<sub>600</sub> 基  
本保持在 7~8 之间, 而在第 192~201 次转接期间发酵液中残留葡萄糖浓度为 24~25 g/L,  
而第 202~206 代培养期间发酵液中残留葡萄糖量逐步下降至 19.80 g/L。从第 207 次转接  
培养开始在 75% (v/v, 用无菌水稀释) (75% CSH-H) 15% 固含量玉米秸秆水解液中培养  
*T. cutaneum* ACCC 20271。在第 207 至 231 次转接培养期间菌体的生长性能不稳定, OD<sub>600</sub>  
波动幅度较大, 在 0.37~10.27 直接波动。自第 232 次转接开始生长趋于稳定, OD<sub>600</sub> 保  
持在 6.5~7.0 之间。由第 242 次转接开始在 15% 固含量玉米秸秆水解液(CSH-H)中培养  
*T. cutaneum* ACCC 20271, 由图 2-26 可知菌体的生长整体基本保持稳定状态, OD<sub>600</sub> 保  
持在 4~6 之间, 发酵液中残留葡萄糖量基本为 50~55 g/L 之间。至此共转接培养 277 次,  
并在此时保种, 将此时的驯化菌株命名为 *T. cutaneum* 277。

为验证长期适应性培养菌株的性能, 并与原始菌株进行对比。将驯化后的菌株分别  
于合成培养基(SM)、添加抑制物(糠醛、HMF、乙酸、香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛)  
的合成培养基(SMI)及 15% 固含量的玉米秸秆水解液(CSH)中分别培养驯化后的菌株及  
原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271, 结果见图 2-27。如图 2-27a 所示, 原始菌株 *T. cutaneum*  
ACCC 20271 不能够在高浓度抑制物的 15% 玉米秸秆水解液中生长, 而 3 种培养条件  
下的驯化后的菌株生长状态均优于相应条件下的原始菌株。驯化菌株在玉米秸秆水解液  
中的菌体干重最高, 其次为添加有抑制物的合成培养基, 而在合成培养基中的菌体干重最  
低, 并且葡萄糖消耗速率也低。这是由于在水解液中含有较丰富的营养物质, 故经水解  
液培养的 *T. cutaneum* 驯化菌株的生长优于合成培养基及添加抑制物的合成培养基; 其  
次由于添加抑制物的合成培养基中含有可被 *T. cutaneum* 代谢利用的乙酸, 故其菌体干  
重高于合成培养基的。而原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 则相反, 在合成培养基中的  
菌体干重高于添加抑制物的合成培养基, 最低的为玉米秸秆水解液, 这是由于合成培养  
基及水解液的抑制物抑制了其生长。驯化菌株在合成培养基、添加抑制物的合成培养基  
及玉米秸秆水解液中的油脂产量分别为 6.15、6.16、5.17 g/L, 而原始菌株 *T. cutaneum*  
ACCC 20271 的油脂产量明显低于驯化菌株, 分别为 5.04、3.24、0.15g/L (图 2-27b)。  
同时驯化菌株比原始菌株的抑制物代谢能力也提高了很多, 如图 2-28 所示。添加抑制  
物的合成培养基及玉米秸秆水解液中的糠醛, 驯化菌株经 12 h、24 h 即可将其代谢完,  
原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 需要 24 h、48 h 才可代谢完; HMF, 驯化菌株 36 h  
均可代谢完, 原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 需要 36 h、84 h 代谢完; 乙酸, 驯化菌  
株 24 h 均可代谢完, 原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 需要 24 h、84 h 代谢完。总  
之经过适应性培养之后的驯化菌株不但比原始菌株的油脂生产性能得到提高, 并且其抑  
制物耐受能力也得到了增强。

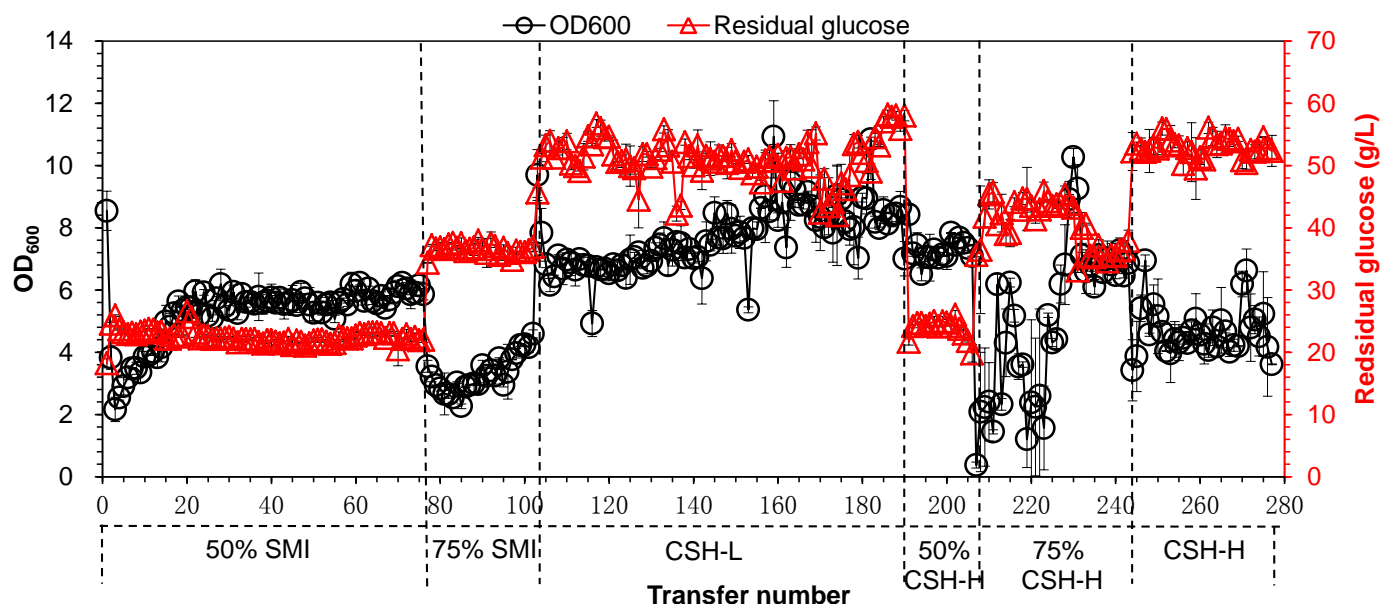


图 2-26 *T. cutaneum* ACCC 20271 长期适应性培养

SMI: 添加有抑制物的仿玉米秸秆水解液的合成培养基; CSH-L: 低抑制物浓度的玉米秸秆水解液 (15%固含量、15 FPU, 2.0%酸用量, 175℃预处理 5 min; 54.83 g/L 葡萄糖、25.31 g/L 木糖、0.22 g/L 糠醛、0.27 g/L HMF、4.36 g/L 乙酸); CSH-H: 常规的高抑制物浓度玉米秸秆水解液 (15%固含量、15 FPU, 2.5%酸用量, 175℃预处理 5 min; 66.19 g/L 葡萄糖、30.91 g/L 木糖、0.68 g/L 糠醛、0.40 g/L HMF、5.09 g/L 乙酸)

Figure 2-26 Long time adaptation culture of *T. cutaneum* ACCC 20271

SMI respects the synthetic medium containing inhibitors simulating corn stover hydrolysate; CSH-L respects the corn stover hydrolysate with low concentration inhibitors (15% solids content, 15 FPU, 2.0% sulfuric acid, preated at 175 °C for 5 min; containing 54.83 g/L of glucose, 25.31 g/L of xylose, 0.22 g/L of furfural, 0.27 g/L of HMF, 4.36 g/L of acetic acid); CSH-H respects the normal corn stover hydrolysate (15% solids content, 15 FPU, 2.5% sulfuric acid, preated at 175 °C for 5 min; containg 66.19 g/L glucose, 30.91 g/L of xylose, 0.68 g/L furfural, 0.40 g/L of HMF, 5.09 g/L acetic acid)

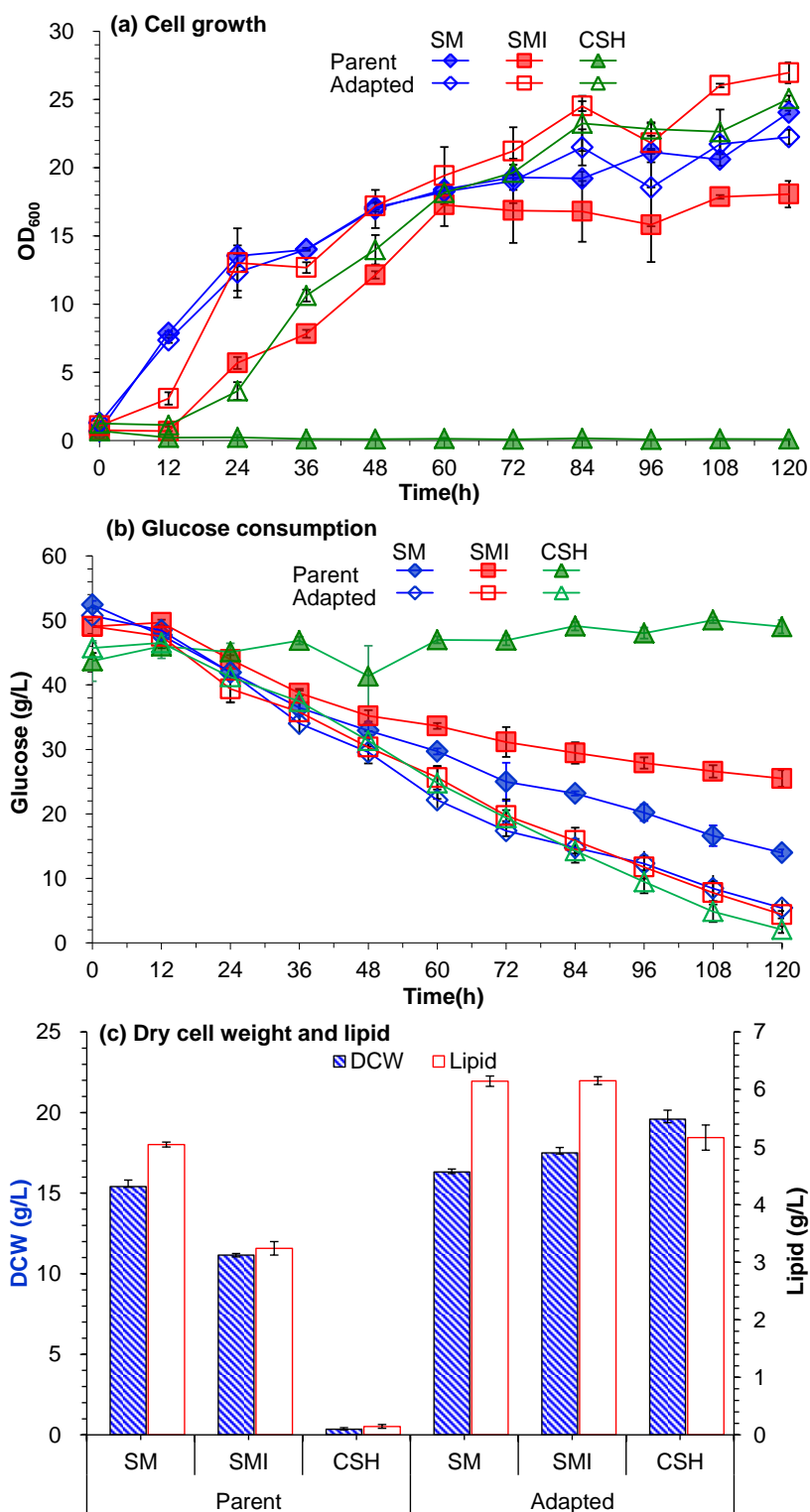


图 2-27 驯化菌株与 *T. cutaneum* ACCC 20271 生长及微生物油脂发酵性能对比

(a) 细胞生长(OD<sub>600</sub>); (b) 葡萄糖消耗; (c) 细胞干重及油脂

SM 合成培养基; SMI 添加有抑制物的仿玉米秸秆水解液的合成培养基; CSH 玉米秸秆水解液

Figure 2-27 Comparison of cell growth and microbial lipid production of the adapted strain and *T. cutaneum* ACCC 20271

(a) cell growth (OD<sub>600</sub>); (b) glucose consumption; (c) dry cell weight and lipid

SM respects synthetic medium, SMI respects the synthetic medium containing inhibitors simulating corn stover hydrolysate, CSH respects corn stover hydrolysate

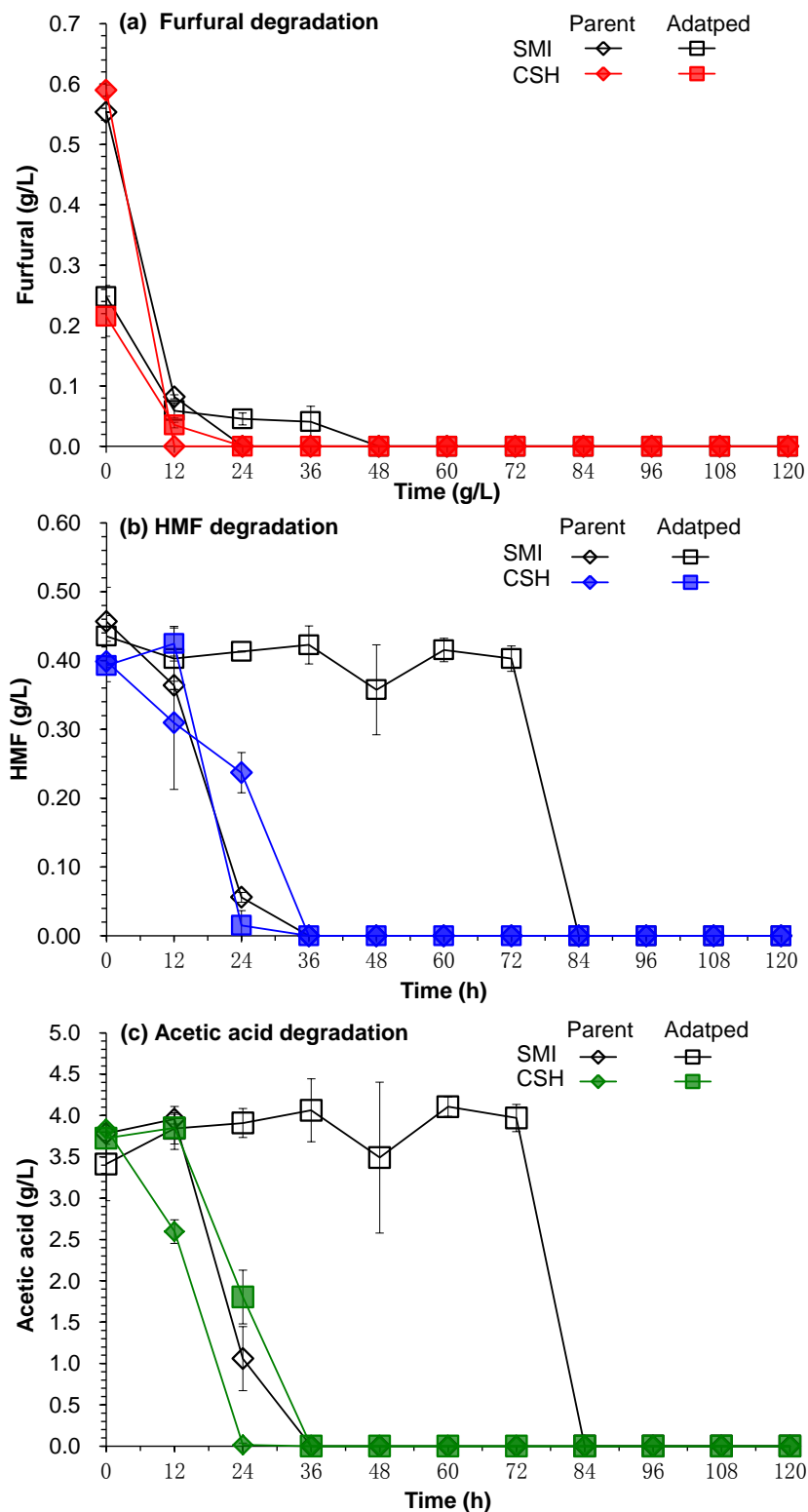


图 2-28 驯化菌株与 *T. cutaneum* ACCC 20271 抑制物降解能力对比

(a)糠醛; (b) HMF; (c)乙酸

SMI: 添加抑制物的合成培养基, CSH: 玉米秸秆水解液

Figure 2-28 Comparison of inhibitors degradation of the adapted strain and *T. cutaneum* ACCC 20271

(a) furfural; (b) HMF; (c) acetic acid

SMI respects synthetic medium containing inhibitors simulating corn stover hydrolysate, CSH respects corn stover hydrolysate

## 2.5 小结

本章主要探究 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用玉米秸秆水解液生产微生物油脂的能力, 分析了其对木质纤维素来源抑制物的耐受性及降解能力。通过长期适应性培养策略提高 *T. cutaneum* ACCC 20271 在玉米秸秆水解液中的发酵性能。得到以下结论:

(1) *T. cutaneum* ACCC 20271 在 15%、20% 固含量的玉米秸秆水解液中能够较好的生长及油脂累积, 但是在 25% 固含量玉米秸秆水解液中的生长就变得很差, 必须要经过相当长的延滞期才能进入生长期。15% 固含量玉米秸秆水解液中菌体干重及油脂产量分别为 19.84、4.44 g/L, 20% 固含量玉米秸秆水解液中菌体干重及油脂产量分别为 23.10、5.78 g/L。在脱毒水解液中 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长及油脂产量得到明显的提高, 30% 脱毒玉米秸秆水解液中期菌体干重及油脂产量分别提高至 31.31、8.57 g/L。说明脱毒过程可促进 *T. cutaneum* ACCC 20271 的油脂生产, 同时也表明抑制物对 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长、代谢与生产均具有一定程度的抑制作用。

(2) *T. cutaneum* ACCC 20271 对糠醛、4-羟基苯甲醛较为敏感, 但是对 HMF、弱酸类及香草醛、丁香醛具有较高的耐受性。通过分析发现甲酸、乙酸、香草醛、4-羟基苯甲醛可被 *T. cutaneum* ACCC 20271 完全降解, 而糠醛、HMF、丁香醛的代谢产物为相应的醇和酸, 并不能被进一步代谢。

(3) 通过长期适应性培养的策略提高了 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用玉米秸秆水解液的能力, 抑制物降解耐受能力及生长与油脂累积均得到提高。15% 固含量玉米秸秆水解液中 *T. cutaneum* ACCC 20271 菌体干重及油脂产量分别为 19.59、5.17 g/L。



## 第 3 章 皮状丝孢酵母基因组测序及抑制物代谢路径解析

### 3.1 引言

伴随高通量测序技术的日益成熟及成本的逐步降低,越来越多的油脂微生物完成了基因组测序。油脂微生物中已完成基因组测序的有:解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica* CLIB 122、*Y. lipolytica* PO1f)、圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides* NP11)、油脂丝孢酵母(*Trichosporon oleaginosus* IBC0246)、浅白隐球酵母(*C. albidus* NT2002)、高山被孢霉(*Mortierella alpine* ATCC#32222)等。油脂酵母中 *Y. lipolytica* 是最早完成基因组测序的菌株,并且也已作为模式菌株用于多方面的研究中<sup>[240]</sup>。Loira 等<sup>[241]</sup>建立了 *Y. lipolytica* 的代谢模型, Pan 和 Hua<sup>[242]</sup>分析了其代谢网络。*R. toruloides* NP11<sup>[206]</sup>及 *T. oleaginosus* IBC0246<sup>[207]</sup>的基因组及限氮条件下的转录组、蛋白组等多组学已经进行了详细报道。

在 2012 年两株阿萨丝孢酵母(*Trichosporon asahii* CBS 2479<sup>[243]</sup>、*Trichosporon asahii* CBS 8904<sup>[244]</sup>)测序之后,丝孢酵母属中的多株酵母已被测序:*Trichosporon laibachii*、*Trichosporon guehoae*、*Trichosporon oleaginosus* 等。到目前为止已经有三株 *Trichosporon cutaneum* 菌完成了基因组测序,分别为 *T. cutaneum* JCM1462 (Genbank 获取号: BCKU00000000.1)、*T. cutaneum* B3 (Genbank 获取号: LRUG00000000.1)及本文中的 *T. cutaneum* ACCC 20271 (Genbank 获取号: LTAL00000000.1)。但是 *T. cutaneum* JCM1462 和 *T. cutaneum* B3 两株菌的基因组注释信息及相关报道均未公布。故对 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行基因组测序与注释,对于其他 *Trichosporon cutaneum* 菌株的遗传信息研究、基因工程改造等也将具有重要的意义。

如第二章所述 *T. cutaneum* ACCC 20271 为高抑制物耐受性的油脂酵母菌株。由于其遗传信息的未知而导致对其基本代谢及高抑制物耐受性的机制了解甚少。所以通过解读基因组信息来推测 *T. cutaneum* ACCC 20271 油脂合成、抑制物代谢在内的机制是目前亟待完成的工作。本文对 *T. cutaneum* ACCC 2027 进行了基因组测序及其统计学分析,对糖酵解、三羧酸循环(TCA)、戊糖磷酸路径(PPP)、脂肪酸合成、甘油三酯(TAGs)合成在内的中心碳代谢进行了分析及代谢路径的推测。根据第二章中的抑制物生物转化的实验结果,结合基因组注释信息及已有的相关研究报道,对 *T. cutaneum* ACCC 20271 中抑制物代谢路径和相关路径中的关键酶进行了总结与分析。同时与另外三株典型的油脂酵母(圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* NP11、解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* CLIB122、油脂丝孢酵母 *Trichosporon oleaginosus* IBC0246)进行了比较,分析了 *T. cutaneum* ACCC 20271 优良的抑制物耐受和降解性能的分子生物学基础。本部分研究内容对揭示微生物菌株对木质纤维素来源抑制物抗逆机制的解析、抑制物降解路径的推测具有重要意义。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 基因组 DNA 提取

将 *T. cutaneum* ACCC 20271 于 YPD 培养基中 30℃、180 rpm 下培养 24 h, 以备全基因 DNA 的提取。全基因 DNA 的提取参考 Zhu 等(2012)<sup>[206]</sup>的方法进行。*T. cutaneum* ACCC 20271 于 YPD 培养基中过夜培养后, 离心收集菌体细胞。加入裂解缓冲液(2%, v/v) Triton-100、1% (w/v) SDS、100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl pH 8.0), 结合磁珠旋光破碎法破碎细胞, 并用 Tris 饱和酚和氯仿异戊醇(24:1, v/v)混合溶液提取 DNA。DNA 溶于 TE 缓冲液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH7.6)中, RNase A (TOYOBO, 日本) 37℃ 温育 15 min 去除 RNA。

### 3.2.2 全基因组测序、组装与拼接

提取得到的基因组 DNA(gDNA)送交上海派森诺生物科技有限公司对样品进行测序。采用全基因组鸟枪法(WGS)策略, 利用第二代测序技术, 构建插入片段长度分别为 360 bp、400bp、700 bp、8000 bp 的四个文库, 采用 MiSeq 测序平台对这些文库进行测序。样品经过 DNA 提取、建库和测序, 得到原始下机数据(Raw Reads)。Raw Data 通过质量过滤后, 采用 FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) 程序进行质控分析。采用 Newbler v2.8 (20110517\_1502)从头拼装, 拼接构建 contig 和 scaffold 得到最终的拼接结果。

### 3.2.3 蛋白编码基因预测及功能注释

蛋白编码基因的预测采用 Maker 管道注释系统(version 2008)<sup>[245, 246]</sup>, 该注释管道利用从头预测结果信息、同源蛋白注释结果信息及近缘物种 RNA-Seq 注释结果等信息对样品中蛋白编码基因进行预测。

蛋白编码基因功能注释的主要方法是将所有预测得到的蛋白编码基因与各种数据库中包含的蛋白质进行比较。采用 BLAST2GO 软件进行蛋白编码基因的 GO 注释。蛋白编码基因的 EuKaryotic Orthologous Groups (KOG)的注释采用 blast 软件来完成。蛋白编码基因的 KO 及 Pathway 注释主要采用 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)的 KAAS 自动化注释系统完成, 并将 KO 映射到相应的 KEGG Pathway 通路

### 3.2.4 进化树分析

进化树分析是基于同源蛋白来实现的, 通过基因家族分析的方法找到相似的同源蛋白, 比对后再采用 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 *T. cutaneum* ACCC 20271 全基因组测序与组装结果

*T. cutaneum* ACCC 20271 为单倍体酵母菌株。对 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组测序原始数据进行过滤, 结果见表 3-1。过滤后的数据通过拼接得到 923 个 contig, 并组装为 22 个 scaffold, 组装统计结果及基因组基本特征见表 3-2、3-3。*T. cutaneum* ACCC 20271 全基因组总长为 30.45 Mb, G+C 含量为 57.64%。基因组中包含有 5704 个蛋白编码基因, 占基因组总长的 36.91%, 蛋白编码基因平均长度为 1970 bp。*T. cutaneum* ACCC

20271 全基因组中含有 925 个非编码 RNA，占基因组总长的 0.28%。其中 tRNA 编码基因为 915 个，snoRNA、snRNA 分别为 2、6 个，miRNA、antisense RNA 均为 1 个。

表 3-1 数据过滤统计

Table 3-1 Statistical result of data filtering

Sample	Library	Raw Data	Clean Data	Coverage( $\times$ )*
Pi	PE360	913,877,948	628,069,962	25
Pi	PE400	1,199,144,970	997,421,043	40
Pi	PE700	2,114,584,640	1,100,232,124	44
Pi	MP8K	969,526,656	812,858,431	33
Summary		5,197,134,214	3,538,581,560	142

\*: Coverage 按基因组大小为 25 Mb 来计算获得

\*: Coverage was calculated baed on the genome size of 25 Mb

表 3-2 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组拼装的数据统计Table 3-2 Assembly result of the *T. cutaneum* ACCC 20271 genome

Property	Contigs	Scaffolds
Total sequence number	923	22
Shortest (bp)	534	2,356
Longest (bp)	332,954	6,933,627
N20	923	6,933,627
N50	101,228	5,629,136
N90	17,316	1,409,272
N number	0	273,242
N rate	0	0.89%
Total sequence length	30,446,464	30,446,464
GC content	57.64%	57.64%
Sequences greater than 1 kb	22	22

2016 年日本理化学研究所生命科学技术中心公布了 *T. cutaneum* JCM 1462 的测序结果，Genbank 获取号：BCKU00000000.1；随后江西师范大学报道了 *T. cutaneum* B3 基因组测序结果，Genbank 获取号：LRUG00000000.1。*T. cutaneum* JCM 1462、*T. cutaneum* B3 基因组总长分别为 23.16 Mb、38.7 Mb。*T. cutaneum* JCM 1462 基因组比 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组小 8.29 Mb，*T. cutaneum* B3 基因组比 *T. cutaneum* ACCC 20271 大 8.25 Mb；*T. cutaneum* JCM 1462 基因组 GC% 含量为 61.9%。但是这两株酵母基因组注释结果还未公布。

*R. toruloides*、*Y. lipolytica* 及 *T. oleaginousus* 是三株较为典型的油脂酵母，并且已经对其基因组测序及注释等进行了报道<sup>[206, 207, 240]</sup>，Genbank 中三株菌的基因组 Genbank 的获取号分别为 LNQQ00000000.1、GCA\_000002525.1、JZUH00000000.1。特别是 Hu 等<sup>[149]</sup>曾报道 *R. toruloides* 也是木质纤维素来源抑制物耐受型菌株。所以本文中将 *T. cutaneum* ACCC 20271 的基因组与这三株油脂酵母进行了比对。

表 3-3 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组一般特征  
Table 3-3 General features of the *T. cutaneum* ACCC 20271 genome

General features	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271
Length (bp)	30,446,464
GC content(%)	57.64
Protein-coding gene number	5704
Coding region of genome (%)	36.91
Total number of predicted ORFs	5704
Stable RNA (percent of genome)	0.28
tRNA	915
snoRNA	2
miRNA	1
snRNA	6
Antisense RNA	1
Properties of predicted gene models	No. of genes
KEGG alignment	5503
KOG/COG assignment	2901
KO assignment	6415
GO assignment	2113
InterPro signature	8740
Signal peptide	2041
Transmembrane domain	2286

### 3.3.2 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因功能预测与分析结果

#### 3.3.2.1 COG 功能分类

COG 聚类分析结果表明, *T. cutaneum* ACCC 20271 共有 2901 个蛋白编码基因具有 COG 编号, 分布于 25 个功能聚类中, 见表 3-4。其中有 756 个基因仅具有一个功能, 另有 103 个为未知功能基因。由图 3-1 可知, 在所有 COG 分类中, COG 类别 R (基本功能预测, General function prediction only)、E (氨基酸转运和代谢, Amino acid transport and metabolism)、G (碳水化合物转运和代谢, Carbohydrate transport and metabolism)、J (翻译、核糖体结构和生物转化, Translation, ribosomal structure and biogenesis)、P (无机离子运输和代谢, Inorganic ion transport and metabolism) 所涉及到的蛋白编码基因数目相对较多, 分别为 18.52%、10.75%、8.25%、6.51%、6.47%。

表 3-4 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组功能聚类分析

Table 3-4 Functional categories of predicted genes in *T. cutaneum* ACCC 20271 genome

COG Group	COG Name	Number	Number %
Information storage and processing			
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	266	6.51%
K	Transcription	225	5.51%
L	Replication, recombination and repair	232	5.68%
Cellular processes			
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	70	1.71%
V	Defense mechanisms	39	0.96%
T	Signal transduction mechanisms	144	3.53%
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	66	1.62%
N	Cell motility	3	0.07%
U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	80	1.96%
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	229	5.61%
Metabolism			
C	Energy production and conversion	196	4.80%
G	Carbohydrate transport and metabolism	337	8.25%
E	Amino acid transport and metabolism	439	10.75%
F	Nucleotide transport and metabolism	65	1.59%
H	Coenzyme transport and metabolism	118	2.89%
I	Lipid transport and metabolism	189	4.63%
P	Inorganic ion transport and metabolism	264	6.47%
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	151	3.70%
Poorly characterized			
R	General function prediction only	756	18.52%
S	Function unknown	103	2.52%

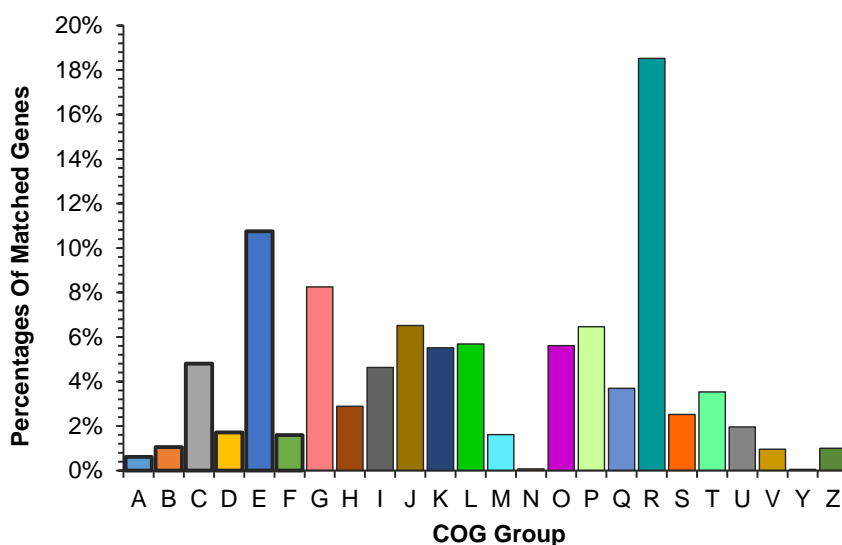


图 3-1 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组的 COG 功能分类图

Figure 3-1 COG functional classification of *T. cutaneum* ACCC 20271 genome

### 3.3.2.2 GO 功能分类

Gene Ontology (GO) 总共有三个 ontology，分别描述基因的分子功能 (molecularfunction)、所处的细胞位置 (cellular component)、参与的生物学过程 (biological process)。GOSlim，它提供了基因组 GO 注释的概述性结果。*T. cutaneum* ACCC 20271 的 GO 注释结果见图 3-2。*T. cutaneum* ACCC 20271 基因组 GO 注释信息中共有 2112 条序列。其中生物过程分类中生物学过程 (biological\_process)、细胞氮化合物代谢过程 (cellular nitrogen compound metabolic process)、生物合成过程 (biosynthetic process)、小分子代谢过程 (small molecule metabolic process)、转运 (transport)、催化过程 (catabolic process)、翻译 (translation) 占有较高的比例；细胞元件分类中细胞 (cell)、胞内 (intracellular)、细胞器 (organelle)、细胞质 (cytoplasm) 占有较高的比例；分子功能分类中分子功能 (molecular\_function)、离子结合 (ion binding)、氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity) 占较高的比例。整体而言生物过程最活跃，其次为细胞元件，分子功能最低。

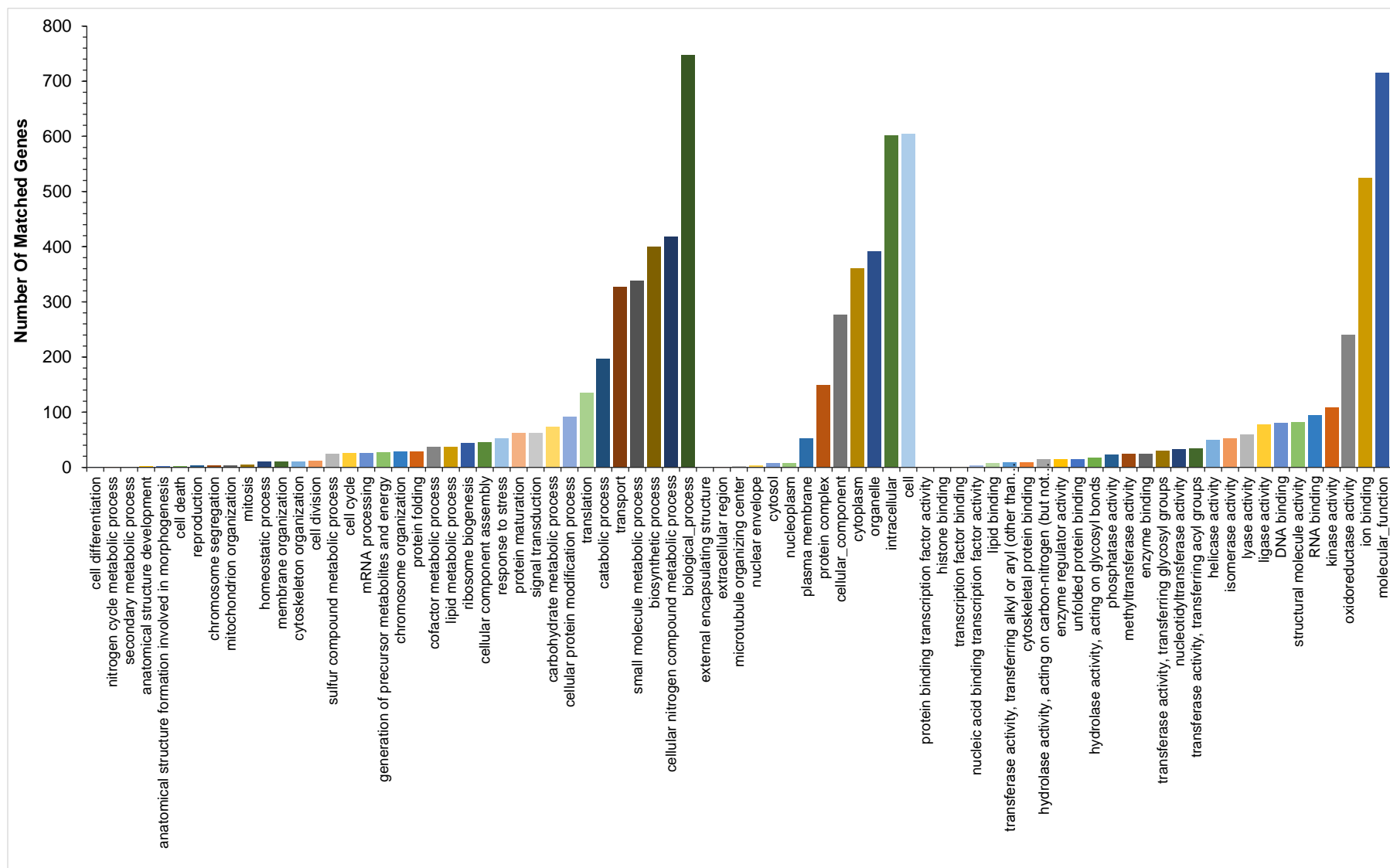


图 3-2 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组 GO 功能分类图

Figure 3-2 GO functional classification of *T. cutaneum* ACCC 20271 genome

### 3.3.2.3 蛋白编码基因的 KEGG 注释

*T. cutaneum* ACCC 20271 全基因组 KEGG Pathway 统计结果如图 3-3 所示。在 *T. cutaneum* ACCC 20271 全基因组 KEGG Pathway 注释中共有 1854 个基因参与了共 313 个代谢路径。其中参与氨基酸代谢(Amino acid metabolism (Metabolism))的基因数量最多, 为 353 个, 其次为碳水化合物代谢(Carbohydrate metabolism (Metabolism)), 为 290 个, 参与油脂代谢(Lipid metabolism (Metabolism))的为 171 个。

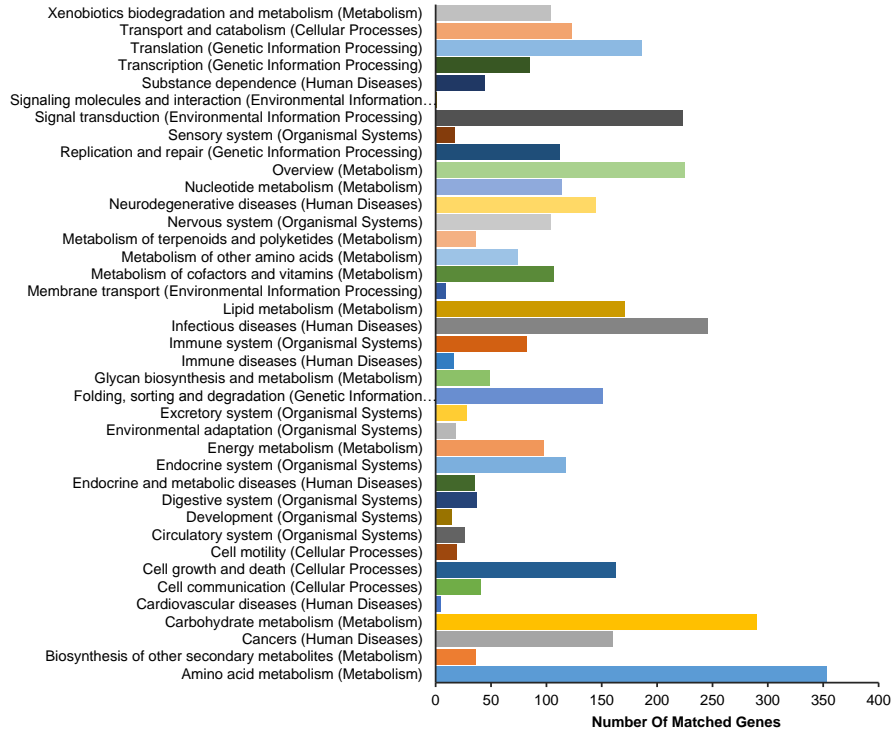


图 3-3 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组的 KEGG 功能分类图

Figure 3-3 KEGG function analysis of *T. cutaneum* ACCC 20271 genome

### 3.3.3 进化树分析

通过同源蛋白进行进化树分析, 结果见图 3-4。 *T. cutaneum* ACCC 20271 (pi) 隶属于 *Trichosporon* 属。在所对比的几个属中, 与 *Rhodotorula* 的亲缘关系最近, 其次为 *Rhodotorula*、*Yarrowia* 等, 其中亲缘关系最远的属为 *Candida*。

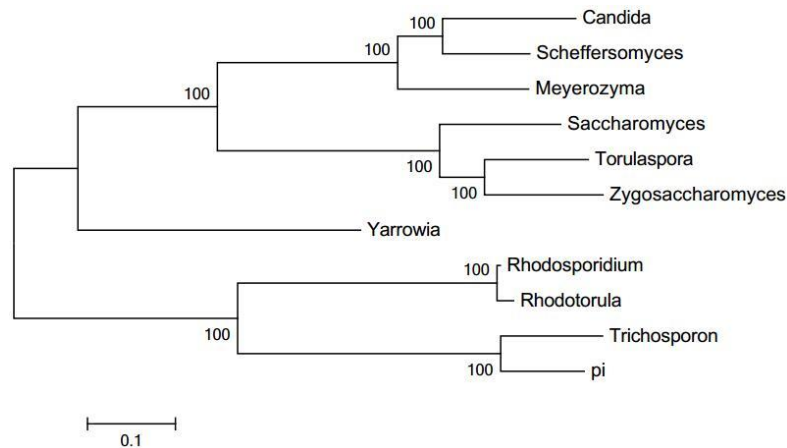


图 3-4 基于同源蛋白的进化树分析

Figure 3-4 Evolutionary tree based on the homologous proteins

### 3.3.4 中心代谢及油脂合成路径

由于 *T. cutaneum* ACCC 20271 为一油脂酵母, 具有在胞内累积油脂的能力, 故对其包含油脂合成在内的中心代谢进行了分析。依据基因组注释结果, 推测了糖酵解、TCA 循环、戊糖磷酸途径、脂肪酸合成、甘油三酯合成及脂肪酸的  $\beta$ -氧化、乙醛酸循环等代谢路径等, 如图 3-5 所示。

对于油脂合成来讲, 糖酵解途径的贡献主要是提供丙酮酸, TCA 循环则在合成 ATP、柠檬酸及 NAD(P)H 方面发挥重要作用。线粒体内柠檬酸通过柠檬酸—苹果酸穿梭而进入胞浆中。在 ATP-柠檬酸裂解酶(ACL, Trcu\_05047)的催化下, 将柠檬酸裂解生成乙酰-CoA 及草酰乙酸。在油脂微生物中用于脂肪酸合成的乙酰-CoA 主要是来源于 ATP-柠檬酸裂解酶(ACL, Trcu\_05047)催化裂解柠檬酸<sup>[247]</sup>。乙酰-CoA 羧化酶 1 (ACC1, Trcu\_04595) 负责催化乙酰-CoA 的羧化反应以生成丙二酰-CoA, 起始脂肪酸合成的第一步反应<sup>[248]</sup>。脂肪酸合酶(FAS)直接负责脂肪酸碳链延长的循环反应, 即消耗乙酰-CoA 和 NADPH 生成酰基-CoA。典型的 FAS 一般被分为两类: 分离的 II 类、多个功能域构成的 I 类。真菌的 FAS 属于 II 型, 主要是由 8 个不同的功能域组成, 由 2 个亚基或 1 个多肽构成<sup>[89]</sup>。*T. cutaneum* ACCC 20271 的 FAS 是由  $\beta$  (Trcu\_00520)、 $\alpha$  (Trcu\_00529) 两个亚基构成。生成的 TAG 储存在油脂小体中, 提取得到后通过酯交换将甘油去掉即可进行生物柴油的体外合成。脂肪酸合成关键酶的编码基因见表 3-5。与 *R. toruloides*、*Y. lipolytica*、*T. oleaginosus* 相比, *T. cutaneum* ACCC 20271 含有两个苹果酸脱氢酶 (MAE1, EC. 1.1.1.38) 编码基因 (Trcu\_01702、Trcu\_05516)。*R. toruloides*、*Y. lipolytica* 和 *T. cutaneum* ACCC 20271 均含有一个苹果酸脱氢酶 2 (MDH2, EC. 1.1.1.37), 而 *T. oleaginosus* 却没有 MDH2 的编码基因。

Wasylenko 等<sup>[249]</sup>及 Mishra 等<sup>[250]</sup>研究发现来源于戊糖磷酸途径的 NADPH 是油脂酵母中油脂合成所需 NADPH 的主要来源。葡萄糖-6-磷酸 1-脱氢酶(ZWF, Trcu\_05648)及磷酸葡萄糖酸脱氢酶(GND1, Trcu\_02851)是戊糖磷酸途径中合成 NADPH 的两个关键酶, 如 *T. oleaginosus* 中葡萄糖-6-磷酸 1-脱氢酶(CC85DRAFT\_307888)在脂肪酸合成时表达水平显著上调<sup>[207]</sup>。另外胞质中 NADP<sup>+</sup>—依赖型苹果酸酶(ME, Trcu\_00011)、NADP<sup>+</sup>—依赖型异柠檬酸脱氢酶(IDH1, Trcu\_02014)、丙酮酸羧化酶(PYC, Trcu\_03258)也是脂肪酸从头合成所需 NADPH 的重要来源<sup>[207, 251]</sup>。

*T. cutaneum* ACCC 20271 脂肪酸去饱和酶有硬脂酰-CoA 去饱和酶(Trcu\_03332)、 $\Omega$ -6 去饱和酶(Trcu\_00713)、 $\Delta$ -12 去饱和酶(Trcu\_01046)、 $\Delta$ -8 去饱和酶(Trcu\_02313)。

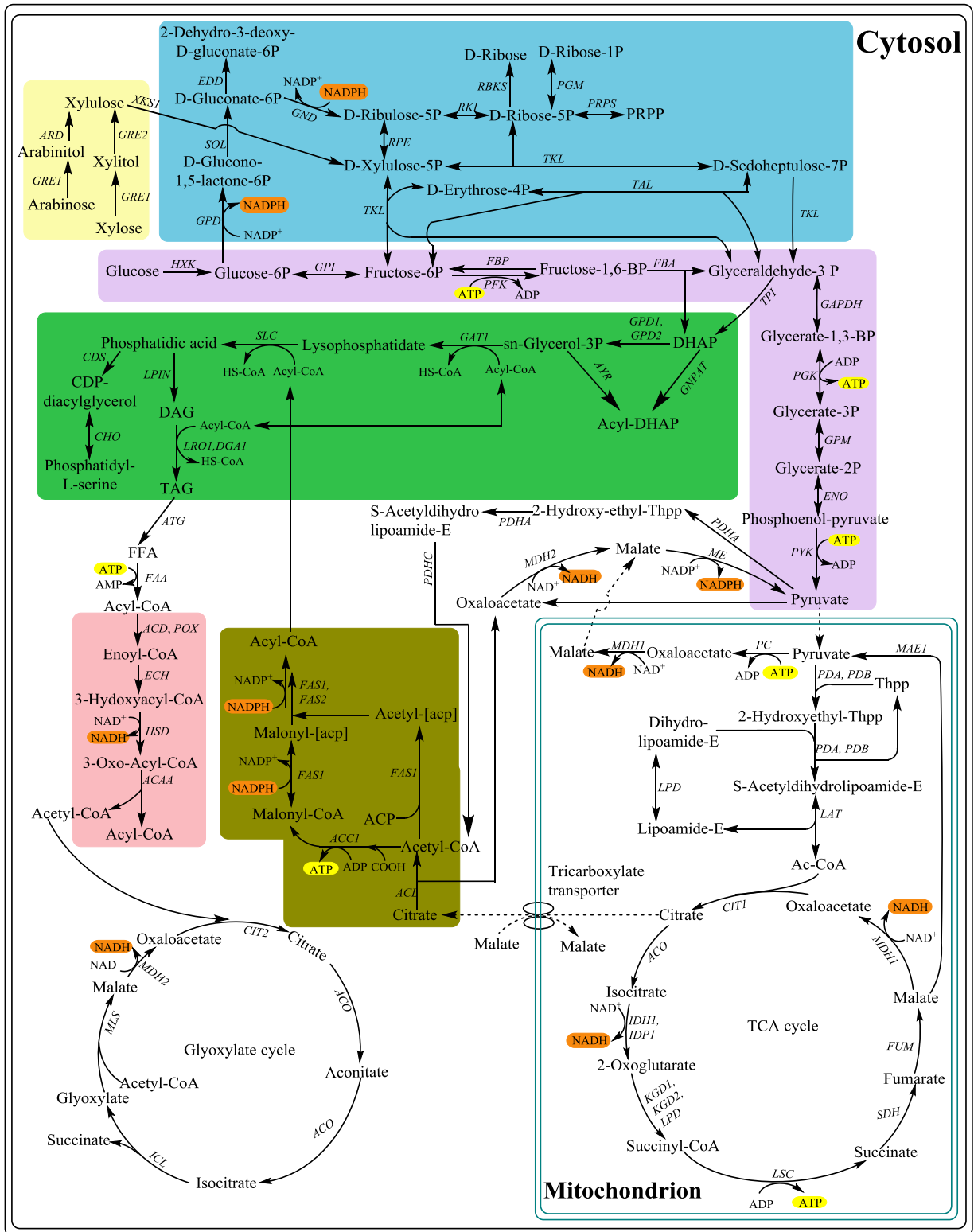


图 3-5 *T. cutaneum* ACCC 20271 中心代谢及油脂代谢路径

紫色：糖酵解；蓝色：戊糖磷酸途径；黄色：木糖、阿拉伯糖代谢；橄榄绿：脂肪酸合成；绿色：磷脂、甘油三酯合成；粉色：脂肪酸 β-氧化

Figure 3-5 Central and lipid metabolism pathways of *T. cutaneum* ACCC 20271

Purple: glycolysis; blue: the pentose phosphate pathway; yellow: xylose, arabinose metabolism; olive: fatty acid synthesis; green: phospholipid, triglyceride synthesis; pink: the β-oxidation of fatty acid

表 3-5 *T. cutaneum* ACCC 20271、*R. toruloides* NP11、*Y. lipolytica* CLIB122 和 *T. oleaginosus* ICB0246 脂肪酸合成关键酶编码基因

Table 3-5 Key enzymes encoding genes of lipogenesis in *T. cutaneum* ACCC 20271, *R. toruloides* NP11, *Y. lipolytica* CLIB122 and *T. oleaginosus* ICB0246.

Abbreviation	Enzyme	EC number	<i>T. cutaneum</i>		<i>R. toruloides</i>		<i>Y. lipolytica</i>		<i>T.oleaginosus</i>	
			NO.	Locus	NO.	Locus	NO.	Locus	NO.	Locus
<i>IDP1</i>	isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	1	Trcu_00627	1	RHTO_04315	1	YALIO_F04095g	1	CC85DRAFT_283698
<i>IDH1</i>	isocitrate dehydrogenase	1.1.1.41	1	Trcu_02014	1	RHTO_01289	1	YALIO_E05137g	1	CC85DRAFT_283698
<i>IDH2</i>	isocitrate dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )	1.1.1.41	1	Trcu_01945	1	RHTO_01290	1	YALIO_D06303g	1	CC85DRAFT_282327
<i>ACL</i>	ATP citrate (pro-S)-lyase	2.3.3.8	1	Trcu_05047	1	RHTO_03915	1	YALIO_E00638g	1	CC85DRAFT_300658
<i>ACCI</i>	acetyl-CoA carboxylase / biotin carboxylase	6.4.1.2	1	Trcu_04595	1	RHTO_02004	1	YALIO_C11407g	1	CC85DRAFT_329998
<i>ME</i>	malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP <sup>+</sup> )	1.1.1.40	1	Trcu_00011	1	RHTO_03795	1	YALIO_E18634g	1	CC85DRAFT_285398
<i>MDH1</i>	malate dehydrogenase, mitochondrial	1.1.1.37	1	Rrcu_00187	1	RHTO_04363	1	YALIO_D16753g	1	CC85DRAFT_285398
<i>MDH2</i>	malate dehydrogenase	1.1.1.37	1	Trcu_00254	1	RHTO_03745	1	YALIO_E14190g	/	/
<i>MAE1</i>	malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating)	1.1.1.38	2	Trcu_01702 , Trcu_05516	1	RHTO_07218	1	YALIO_E18634g	1	CC85DRAFT_289494
<i>ZWF</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.1.1.49	1	Trcu_05648	1	RHTO_07853	1	YALIO_E22649g	1	CC85DRAFT_300435
<i>GND</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44	1	Trcu_02851	1	RHTO_02788	1	YALIO_B15598g	1	CC85DRAFT_307888
<i>FAS1</i>	fatty acid synthase subunit beta, fungi type	2.3.1.86	1	Trcu_00520	1	RHTO_02032	1	YALIOB15059g	1	CC85DRAFT_330866
<i>FAS2</i>	fatty acid synthase subunit alpha, fungi type	2.3.1.86	1	Trcu_00529	1	RHTO_02139	1	YALIO_B19382g	1	CC85DRAFT_279681

---

<i>LROI</i>	phospholipid:diacylglycerol acyltransferase	2.3.1.158	1	Trcu_05085	1	RHTO_01945	1	YALI0_E16797g	1	CC85DRAFT_331590
<i>DGAI</i>	diacylglycerol O-acyltransferase 1	2.3.1.20	1	Trcu_03536	1	RHTO_01962	1	YALI0_E32769g	1	CC85DRAFT_283512
<i>GATI</i>	glycerol-3-phosphate O-acyltransferase / dihydroxyacetone phosphate acyltransferase	2.3.1.15	1	Trcu_04305	1	RHTO_03058	1	YALI0C00209g	1	CC85DRAFT_259482

---

### 3.3.5 氮代谢路径

油脂微生物是在限氮的条件下才大量合成微生物油脂的，并且氮代谢与脂肪酸的合成密切相关。不同氮源对菌体的胞内含油率也有不同的作用，与无机氮源相比有机氮源更有利于 *R. toruloides* 的油脂累积<sup>[252]</sup>。另外不同氮源被油脂酵母代谢的速率也是不一样的<sup>[253]</sup>。

氮缺乏是油脂合成的一关键调控因素。氮缺乏时菌株对代谢流的分配进行重排以供油脂累积之所需。油脂微生物在限氮条件下的 AMP 含量急剧下降，其含量可降低至限碳条件下的 5%，甚至更低的水平，随 AMP 含量的降低，ADP 和 ATP 的含量并没有上升，而非油脂菌株在限氮条件下的 AMP 含量仅有少量降低<sup>[254]</sup>。在氮缺乏时在 AMP 脱氨酶 (Trcu\_04325) 的作用下，将 AMP 转化为肌苷一磷酸 (Inosine monophosphate, IMP) 及  $\text{NH}_4^+$  以供细胞的正常生长及代谢<sup>[255]</sup>。从而导致胞内依赖于 AMP 的异柠檬酸脱氢酶 (IDH1, Trcu\_02014; IDH2, Trcu\_01945) 酶活降低，使得异柠檬酸、柠檬酸在线粒体内累积。线粒体内柠檬酸得到累积并穿过线粒体膜进入胞浆，在 ACL 的作用下裂解生成乙酰-CoA 用于脂肪酸的生物合成。另外，氮缺乏时介导了胞内的整体应激反应，如释放氮分解代谢物的阻遏及细胞自噬等<sup>[206]</sup>。胞内中心氮代谢主要是在谷氨酸脱氢酶 (GDH1, Trcu\_04903; GDH2, Trcu\_02909) 和谷氨酰胺合成酶 (GLN1, Trcu\_01838; GLN2, Trcu\_03031) 的作用下将铵转化生成谷氨酸和谷氨酰胺<sup>[206, 207]</sup>。但是在 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组中没有负责催化 OHCU (2-2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline) 转化生成尿囊素的 OHCU 脱羧酶，通过在 NCBI 数据库中比对，发现一假定蛋白 (Trcu\_03062) 与该酶的相似性最高，可能发挥催化该步反应的功能。

氨基酸转运体及透性酶在氮代谢中发挥重要作用，另外细胞应对氮缺乏的另一应激反应即将培养基中少量的铵转化为谷氨酸和谷氨酰胺，以供蛋白生物合成所需的氮源<sup>[207]</sup>。Kourist 等(2015)<sup>[207]</sup>、Zhu 等(2012)<sup>[206]</sup>、Morin 等(2011)<sup>[256]</sup>均发现负责铵及包括氨基酸在内的氮化合物转运的转运体在氮缺乏时发挥重要作用，即 *T. cutaneum* ACCC 20271 中的 Trcu\_02054、Trcu\_02140、Trcu\_03700、Trcu\_00883、Trcu\_01119、Trcu\_02199。

氨基酸、铵态氮、尿素形式的氮源分别在氨基酸转运体、铵转运体、尿素转运体的作用下转移至胞内，如图 3-6 所示。*T. cutaneum* ACCC 20271 中氨基酸转运体、铵转运体、尿素转运体编码基因个数分别为 16、2、1。与 *R. toruloides* NP11 和 *T. oleaginosus* IBC0246 相比，三种转运体编码基因的个数是相当的。而 *Y. lipolytica* CLIB122 的氨基酸转运体编码基因个数明显少于其他三株油脂酵母，而铵转运体编码基因个数多与其他三株油脂酵母（表 3-6）。

胞内的尿素首先在脲酶 (URE, Trcu\_02582, Trcu\_02586) 的作用下转化为铵态氮，进入中心氮代谢。铵在谷氨酸脱氢酶 1 (GDH1, Trcu\_04903) 的作用下转化为谷氨酸，进而经谷氨酰胺合成酶 (GLN1, Trcu\_01838; GLN2, Trcu\_03031) 催化生成谷氨酰胺，再进行蛋白的合成代谢。当然谷氨酰胺也可经谷氨酸合酶 (GLT1, Trcu\_00619; GLT2, Trcu\_03847)、谷氨酸脱氢酶 2 (GDH2, Trcu\_02909) 的作用而转化为铵。

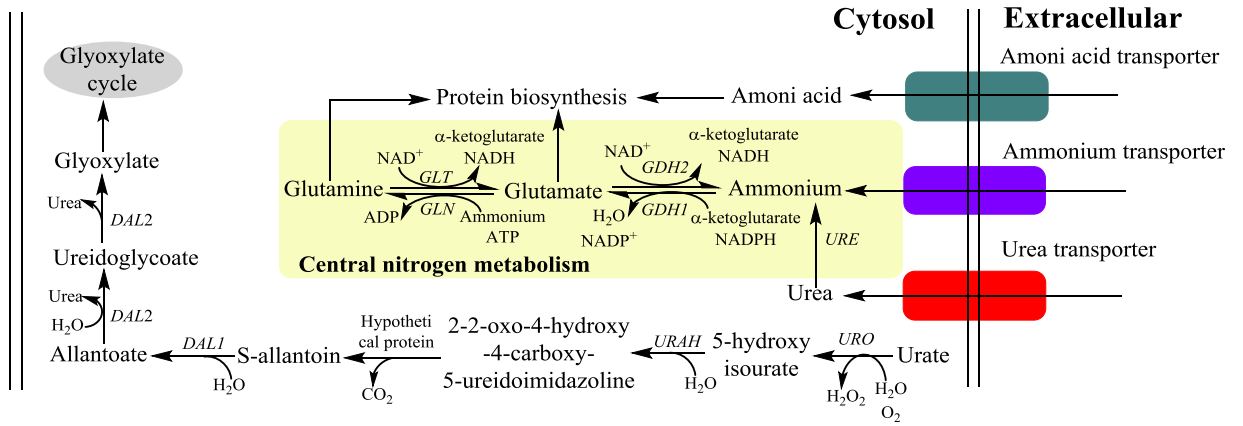


图 3-6 *T. cutaneum* ACCC 20271 氮代谢路径

OHCU: 2-2 氧代-4-羟基-4-羧基-5-脲基咪唑啉

Figure 3-6 Nitrogen metabolism pathway in *T. cutaneum* ACCC 20271

OHCU: 2-2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline

表 3-6 *T. cutaneum* ACCC 20271、*R. toruloides* NP11、*Y. lipolytica* CLIB122 和 *T. oleaginosus* IBC0246 中氨基酸转运体、铵转运体和尿素转运体  
 Table 3-6 Genes encoding amino acid transport, ammonium transporter and urea transporter in *T. cutaneum* ACCC 20271, *R. toruloides* NP11, *Y. lipolytica* CLIB122 and *T. oleaginosus* IBC0246

	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271	<i>R. toruloides</i> NP11	<i>Y. lipolytica</i> CLIB122	<i>T. oleaginosus</i> IBC0246
	Numbers and Locus	Numbers and Locus	Numbers and Locus	Numbers and Locus
Amino acid transporter	16 Trcu_00010, Trcu_00015, Trcu_00070, Trcu_00076, Trcu_00078, Trcu_00844, Trcu_01504, Trcu_01522, Trcu_01637, Trcu_02151, Trcu_02571, Trcu_02760, Trcu_03770, Trcu_04014, Trcu_04539, Trcu_05602	3 RHTO_00398, RHTO_00931, RHTO_01882	2 YALIOE_22506g, YALIOE_10637	18 CC85DRAFT_319866, CC85DRAFT_238395, CC85DRAFT_283316, CC85DRAFT_326270, CC85DRAFT_283343, CC85DRAFT_284170, CC85DRAFT_272125, CC85DRAFT_295918, CC85DRAFT_272296, CC85DRAFT_284566, CC85DRAFT_292086, CC85DRAFT_308064, CC85DRAFT_285678, CC85DRAFT_329159, CC85DRAFT_288223, CC85DRAFT_288831, CC85DRAFT_305911, CC85DRAFT_33172
Ammonium transporter	2 Trcu_02054, Trcu_02091	2 RHTO_01680, RHTO_01846	5 YALIO_A19228g, YALIO_F16896g, YALIO_E27203g, YALIO_B13794g, YALIO_F12925g, YALIO_A02244g	2 CC85DRAFT_302913, CC85DRAFT_69276
Urea transporter	1 Trcu_01119	2 RHTO_00113, RHTO_04944	3 YALIOA02244p, YALIOC15807p, YALIOB04202p	1 CC85DRAFT_161533

### 3.3.6 *T. cutaneum* ACCC 20271 中木质纤维素来源抑制物代谢路径

基于 *T. cutaneum* ACCC 20271 抑制物代谢特性及基因组信息与文献报道, 研究抑制物代谢路径可推动 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用木质纤维素生物燃料生产瓶颈的研究。本文中推测了 *T. cutaneum* ACCC 20271 对包括呋喃类(糠醛、HMF)、弱酸类(甲酸、乙酸)、酚类化合物(香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛)在内的几种典型的抑制物的代谢路径。

#### 3.3.6.1 呋喃类抑制物

*T. cutaneum* ACCC 20271 中在醇脱氢酶(醇脱氢酶( $\text{NAD}^+$ )、醇脱氢酶( $\text{NADP}^+$ )、短链醇脱氢酶、Zn-依赖型醇脱氢酶、醇脱氢酶-离子型、其他醇脱氢酶)、醛还原酶(醛还原酶、半醛还原酶)和醛酮还原酶的作用下, 糠醛和 HMF 可分别转换为糠醇和 5-羟甲基糠醇, 并且该反应是可逆的, 在这些酶的作用下糠醇和 5-羟甲基糠醇还可以再转化为糠醛、HMF。在醛脱氢酶(醛脱氢酶( $\text{NAD(P)}^+$ )、水杨醛脱氢酶、D-乳醛脱氢酶、氨基己二酸半醛脱氢酶、甜菜碱醛脱氢酶、半醛脱氢酶)作用下糠醛和 HMF 均可转化为糠酸和 5-羟甲基糠酸<sup>[152, 181]</sup>, 如图 3-7 所示。糠醛、HMF 代谢过程中所涉及到的所有可能的酶的编码基因见表 3-7。当糠酸、5-羟甲基糠酸别作为唯一碳源时, 其浓度并不随培养时间的延长而减少, 说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 不能降解糠酸和 5-羟甲基糠酸。故糠醛和 HMF 的最终代谢产物即糠醇、糠酸和 5-羟甲基糠醇、5-羟甲基糠酸(图 2-12、2-14)。5-羟甲基糠酸的代谢产物—呋喃-2,5-二羧酸也不能被 *T. cutaneum* ACCC 20271 代谢(图 2-17), 进一步印证了 *T. cutaneum* ACCC 20271 中 HMF 的代谢止步于 5-羟甲基糠酸。

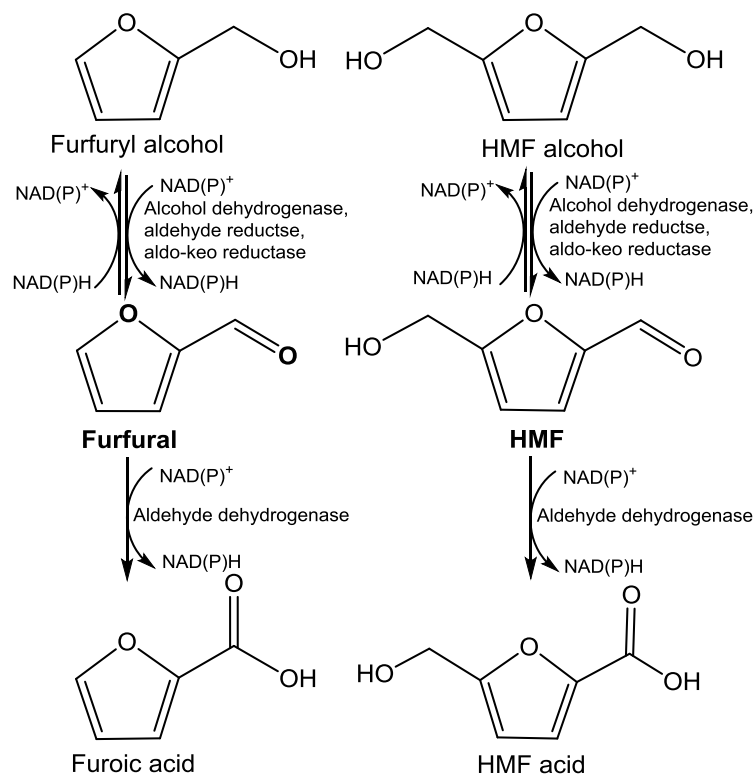


图 3-7 糠醛、HMF 在 *T. cutaneum* ACCC 20271 中代谢路径

Figure 3-7 The degradation pathways of furan and HMF in *T. cutaneum* ACCC 20271

表 3-7 *T. cutaneum* ACCC 20271、*R. toruloides* NP11、*Y. lipolytica* CLIB122 和 *T. oleaginous* ICB0246 中呋喃醛和酚醛代谢相关基因

Table 3-7 Genes involved in furan aldehydes and phenolic aldehydes degradation in *T. cutaneum* ACCC 20271, *R. toruloides* NP11, *Y. lipolytica* CLIB122 and *T. oleaginous* ICB0246

Encoding enzymes		<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271		<i>R. toruloides</i> NP11		<i>Y. lipolytica</i> CLIB122		<i>T. oleaginous</i> ICB0246	
		Numbers and locus		Numbers and locus		Numbers and locus		Numbers and locus	
<b>Alcohol dehydrogenases</b>									
alcohol dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )		18	Trcu_00103, Trcu_00411, Trcu_02229, Trcu_02501, Trcu_04032, Trcu_04134, Trcu_00679, Trcu_00347, Trcu_00109, Trcu_00589, Trcu_00604, Trcu_00714, Trcu_01328, Trcu_02221, Trcu_02684, Trcu_04134, Trcu_04221, Trcu_04303	8	RHTO_00513, RHTO_00517, RHTO_03062, RHTO_03098, RHTO_04685, RHTO_01725, RHTO_02519, RHTO_03798	1	YALI0E17787g	5	CC85DRAFT_301122, CC85DRAFT_286228, CC85DRAFT_288323, CC85DRAFT_285125, CC85DRAFT_165394
alcohol dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )		4	Trcu_01821, Trcu_04946, Trcu_00053, Trcu_00098	2	RHTO_01922, RHTO_01930,	1	YALI0B16192g		
Short-chain dehydrogenase	alcohol	5	Trcu_01507, Trcu_04730, Trcu_04786, Trcu_04816, Trcu_05676	/ /		/ /		/ /	

Zn-dependent dehydrogenases	alcohol	13	Trcu_00053, Trcu_00098, Trcu_00411, Trcu_02229, Trcu_02501, Trcu_04032, Trcu_04134, Trcu_04221, Trcu_04303, Trcu_04946, Trcu_00103, Trcu_02195, Trcu_01654	9	RHTO_04635, RHTO_07889, RHTO_00661, RHTO_01633, RHTO_03808, RHTO_03847, RHTO_03880, RHTO_04424, RHTO_04424	5	YALIO_D25630g, YALIO_A15147g, YALIO_A16379g, YALIO_E12463g, YALIO_E07766g	3	CC85DRAFT_272173, CC85DRAFT_285852, CC85DRAFT_327221
Alcohol (iron-type) dehydrogenase	/	/	/	2	RHTO_00263, RHTO_04708	/	/	1	CC85DRAFT_282431
Other alcohol dehydrogenase	/	/	/	5	RHTO_02673, RHTO_03075, RHTO_06892, RHTO_03559, RHTO_05962	1	YALIO_F09603g,	2	CC85DRAFT_271749, CC85DRAFT_264068

---

**Aldehyde reductases**


---

Aldehyde reductase		4	Trcu_01328, Trcu_01463, Trcu_01821, Trcu_03118	2	RHTO_03964, RHTO_03032	/	/	2	CC85DRAFT_300021, CC85DRAFT_249059
Semialdehyde reductase		2	Trcu_01507, Trcu_05676	/	/	/	/	/	/
Aldo/keto reductase		13	Trcu_03868, Trcu_00463, Trcu_00843, Trcu_01328, Trcu_01410, Trcu_01463, Trcu_01821, Trcu_01822, Trcu_01943,	3	RHTO_00641, RHTO_06555, RHTO_03963	13	YALIO_D07634g, YALIO_F18590g, YALIO_A15906g, YALIO_E18348g, YALIO_B07117g, YALIO_A19910g, YALIO_C00319g, YALIO_D04092g, YALIO_B21780g,	15	CC85DRAFT_282180, CC85DRAFT_151847, CC85DRAFT_284302, CC85DRAFT_284949, CC85DRAFT_318912, CC85DRAFT_285592, CC85DRAFT_285664, CC85DRAFT_232176, CC85DRAFT_247936,

---

Trcu_02999, Trcu_03519, Trcu_03746, Trcu_05608, Trcu_01943	YALIO_C09119g, YALIO_F06974g, YALIO_C13508g, YALIO_B15268g	CC85DRAFT_262565, CC85DRAFT_329428, CC85DRAFT_147886, CC85DRAFT_287572, CC85DRAFT_264235, CC85DRAFT_287865
--	---	---

**Aldehyde dehydrogenases**

Aldehyde (NAD(P) <sup>+</sup> )	dehydrogenase	26	Trcu_03118, Trcu_01234, Trcu_01775, Trcu_02638, Trcu_00064, Trcu_00068, Trcu_01234, Trcu_01775, Trcu_02569, Trcu_02638, Trcu_02661, Trcu_03118, Trcu_03765, Trcu_03855, Trcu_03870, Trcu_04064, Trcu_04141, Trcu_04359, Trcu_04385, Trcu_04408, Trcu_05408, Trcu_05469, Trcu_05623, Trcu_04141, Trcu_00404, Trcu_05610	1 0	RHTO_00119, RHTO_06090, RHTO_06724, RHTO_01654, RHTO_03710, RHTO_04310, RHTO_04425, RHTO_04543, RHTO_05680, RHTO_05838	14	YALIO_F23793g, YALIO_E15400g, YALIO_B01298g, YALIO_A17875g, YALIO_F26191g, YALIO_B09647g, YALIO_C01859g, YALIO_E30481g, YALIO_E11341g, YALIO_A19448g, YALIO_C03025g, YALIO_E00264g, YALIO_F04444g, YALIO_D07942g	14	CC85DRAFT_294805, CC85DRAFT_283248, CC85DRAFT_256663, CC85DRAFT_283984, CC85DRAFT_284080, CC85DRAFT_272549, CC85DRAFT_259523, CC85DRAFT_302667, CC85DRAFT_329114, CC85DRAFT_277397, CC85DRAFT_287487, CC85DRAFT_287882, CC85DRAFT_287961, CC85DRAFT_200477,
Salicylaldehyde	dehydrogenase	2	Trcu_03855, Trcu_04531	5	RHTO_00385, RHTO_06811, RHTO_01494, RHTO_02062,	6	CC85DRAFT_283363, CC85DRAFT_272464, CC85DRAFT_327950, CC85DRAFT_263114,		

				RHTO_05993				CC85DRAFT_330956, CC85DRAFT_288983
D-lactaldehyde dehydrogenase	/	/	1	RHTO_03406	/	/	/	/
Amino adipate-semialdehyde dehydrogenase	2	Trcu_05610, Trcu_01477	/	/	/	/	/	/
Betaine aldehyde dehydrogenase	1	Trcu_04408	/	/	/	/	/	/
Semialdehyde dehydrogenase	8	Trcu_00064, Trcu_00404, Trcu_04064, Trcu_04737, Trcu_05408, Trcu_05469, Trcu_05543, Trcu_02661	/	/	/	/	/	/
<b>Oxidases</b>								
Alcohol oxidase	/	/	2	RHTO_01165, RHTO_02441	1	YALIO_B14014g	2	CC85DRAFT_317844, CC85DRAFT_233638
Vanillyl alcohol oxidase	1	Trcu_03959	2	RHTO_01165, RHTO_02441	/	/	/	/
Glucose oxidase	1	Trcu_01554	/	/	/	/	/	/
Choline oxidase	1	Trcu_04415	1	RHTO_06508	/	/	1	CC85DRAFT_283985

### 3.3.6.2 酚类化合物

与糠醛和 HMF 一样,在醇脱氢酶、醛脱氢酶、醛酮还原酶的作用下,香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛均可转化为相应的醇,在醛脱氢酶的作用下分别转化为相应的酸,如图 3-8 所示。在儿茶酚 1,2-双加氧酶(CAT, Trcu\_03891、Trcu\_00122)的催化下 4-羟基苯甲酸可转化为儿茶酚<sup>[257]</sup>,但是在 *T. cutaneum* ACCC 20271 的基因组中并没有找到这个酶的编码基因,根据在 NCBI 数据库中的氨基酸序列比对结果,一氧化氮氧化酶(Trcu\_05557)与该酶的氨基酸序列相似性最高,故推测该酶可能在 *T. cutaneum* ACCC 20271 发挥该步反应的催化功能。如图 2-21 示,当在丁香酸作为唯一碳源时,其浓度并不随培养时间的延长而降低,说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 不具备降解丁香酸的能力,并且在 *T. cutaneum* ACCC 20271 的基因组中没有找到可以催化丁香酸降解的酶。2,3-龙胆酸羧化酶(Trcu\_02387)可催化原儿茶酸转化为儿茶酚<sup>[258]</sup>,随后经儿茶酚 1,2-双加氧酶(CAT, Trcu\_03891, Trcu\_00122)催化生成粘糠酸<sup>[236, 259]</sup>,随后经多步反应即可转化为琥珀酰-CoA 或乙酰-CoA<sup>[260]</sup>。

呋喃醛、酚醛转化生成低毒的醇、酸过程共涉及到 4 类酶,即醇脱氢酶、醛还原酶、氧化酶、醛脱氢酶基因,见表 3-7。*T. cutaneum* ACCC 20271 中共 101 个相关编码基因,其中包含 40 个醇脱氢酶基因(18 个 NAD<sup>+</sup>依赖型的醇脱—依赖型醇脱氢酶)、19 个醛还原酶基因(4 个醛还原酶、2 个半醛还原酶、13 个醛/酮还原酶)、3 个氧化酶(1 个香草醇氧化酶、1 个葡萄糖、1 个甜菜碱)、39 个醛脱氢酶基因(26 个醛脱氢酶基因、2 个水杨醛脱氢酶、2 氨基己二酸半醛脱氢酶、1 甜菜碱醛脱氢酶、8 半醛脱氢酶)。而 *R. toruloides*、*Y. lipolytica*、*T. oleaginosus* 的醇脱氢酶、醛还原酶、醛脱氢酶 3 类酶的编码基因个数均少于 *T. cutaneum* ACCC 20271。*R. toruloides*、*Y. lipolytica*、*T. oleaginosus* 醇脱氢酶、醛还原酶、醛脱氢酶基因的基因个数分别为 *R. toruloides*: 27、7、16; *Y. lipolytica*: 8、13、14; *T. oleaginosus*: 11、17、20。

在抑制物的代谢过程中的许多酶促反应都需要 NAD(P)H 的参与。据 Almeida 等<sup>[261]</sup>、Allen 等<sup>[262]</sup>、Nguyen 等<sup>[263]</sup>均报道 NAD(P)H 在 *S. cerevisiae* 耐受木质纤维素来源抑制物的过程中发挥重要作用。由抑制物代谢路径分析可知,戊糖磷酸途径(PPP)是细胞抵抗氧胁迫还原力的主要来源<sup>[264-266]</sup>,并且据报道 PPP 是糠醛<sup>[226, 267]</sup>、香草醛<sup>[263]</sup>降解所需 NADPH 的主要来源,其中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(ZWF)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(GND)、D-核酮糖-5-磷酸 3-差向异构酶(RPE)、转酮醇酶(TKL)与抑制物的代谢有直接关系<sup>[232, 268]</sup>。可知 *T. cutaneum* ACCC 20271 中戊糖磷酸途径生成的 NADPH 除用于脂肪酸的合成,在抑制物的降解中也发挥重要作用。

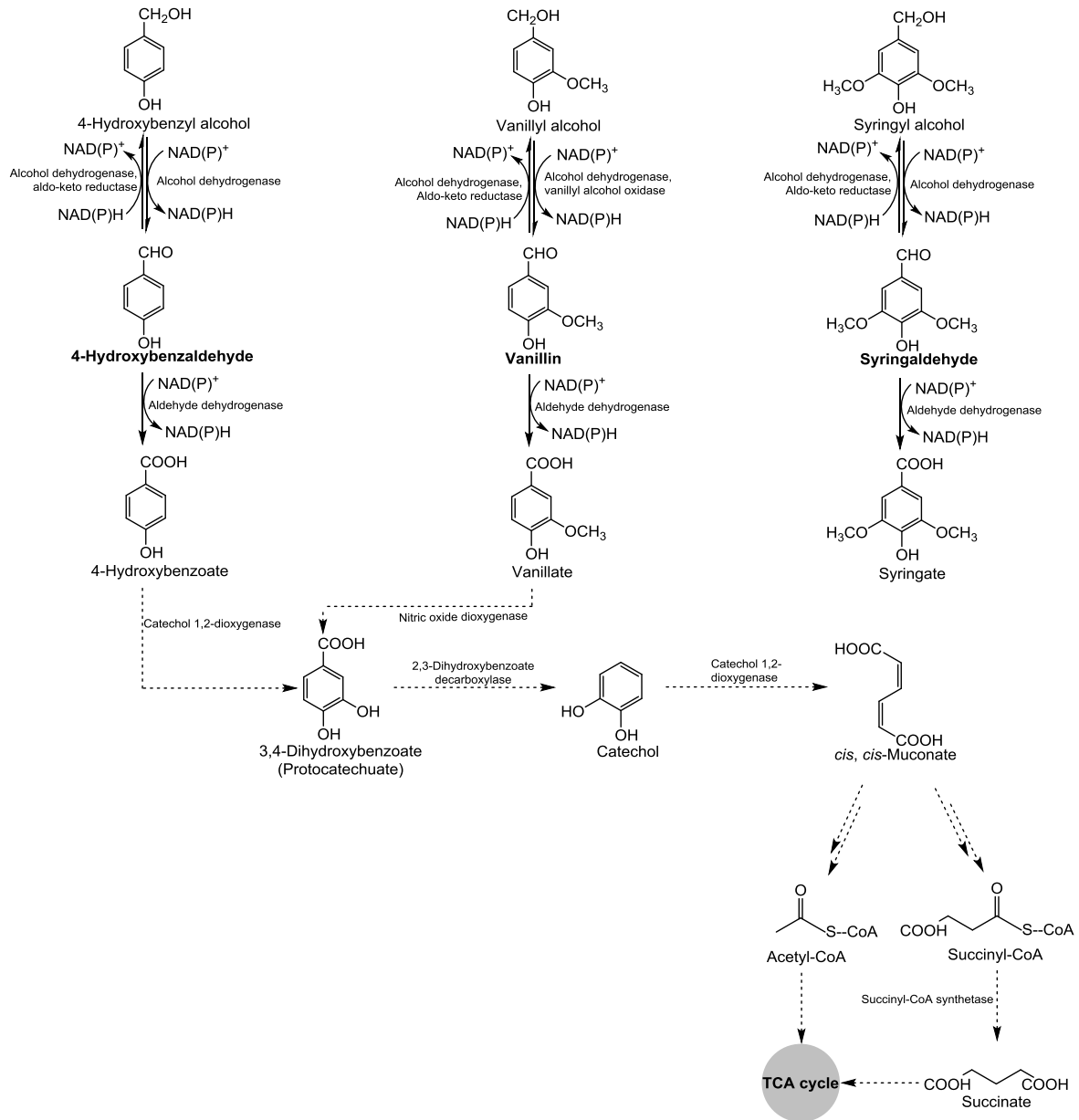


图 3-8 香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛在 *T. cutaneum* ACCC 20271 中代谢路径——代表经实验证实的代谢步骤；---代表依据 *T. cutaneum* ACCC 20271 实验结果、基因组注释及相关文献报道推测的代谢步骤；——、---代表多步反应。

Figure 3-8 The degradation pathways of vanillin, syringaldehyde and 4-hydroxybenzaldehyde in *T. cutaneum* ACCC 20271

—— respects metabolism pathways proved by experiment; --- respects metabolism pathways speculated according to experiment results, genome annotation and corresponding reports ;

——, --- respects multi-step of metabolism pathway

### 3.3.6.3 弱酸类抑制物

在甲酸脱氢酶(Trcu\_03671)的作用下,甲酸被氧化为二氧化碳和水<sup>[269]</sup>。经乙酰-CoA 合酶(Trcu\_03003、Trcu\_00570、Trcu\_02518)的催化,乙酸转化生成乙酰-CoA 并最终进入 TCA 循环<sup>[270]</sup>,如图 3-9 所示。

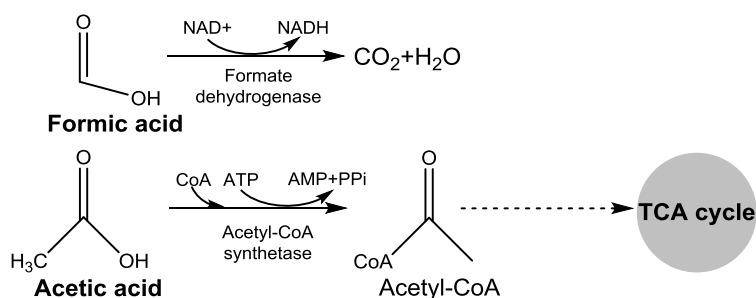


图 3-9 *T. cutaneum* ACCC 21374 甲酸、乙酸代谢路径

Figure 3-9 The degradation pathways of fromic acid and acetic acid in *T. cutaneum* ACCC 20271

### 3.4 小结

为探究 *T. cutaneum* ACCC 20271 高含油率及对木质纤维素来源抑制物具有较高耐受能力的机制,对其进行了基因组测序、组装、注释。根据实验结果、基因组注释信息、相关文献推测了 *T. cutaneum* ACCC 20271 中抑制物代谢路径。得到以下几个结论:

(1) *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组共 30.45 Mb, GC 含量为 57.64%。蛋白编码基因共 5704 个, 占全基因组总长的 36.91%, 非编码 RNA 基因为 925 个。通过构建进化树分析发现 *T. cutaneum* ACCC 20271 隶属于 *Trichosporon* 属, 与 *Rhodotorula* 的亲缘关系最近。

(2) 解读了 *T. cutaneum* ACCC 20271 中包括中心碳代谢、油脂代谢在内的基本代谢路径, 总结出其关键酶并与其它三株油脂酵母进行对比分析。分析了氮代谢与油脂合成之间的关系。初步分析了木糖、阿拉伯糖进入戊糖磷酸途径的代谢路径。

(3) 基于第三章的抑制物代谢实验结果、基因组注释及文献报道, 推测了糠醛、HMF、甲酸、乙酸、香草醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛在 *T. cutaneum* ACCC 20271 的代谢路径。并找到了代谢相关酶的编码基因, 并与其他三株油脂酵母进行比对。*T. cutaneum* ACCC 20271 高抑制物耐受性可能来源于其较多的呋喃醛、酚醛代谢相关基因。



## 第 4 章 皮状丝孢酵母利用纤维素乙醇发酵废水生产微生物油脂

### 4.1 引言

有机废水中含有丰富的营养物质，直接反映为较高的化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD)，具有不易被降解等特性，如果直接排放将造成较为严重的环境污染<sup>[271, 272]</sup>。并且水质指标会随生产条件的变动而发生较大的改变，导致处理工艺繁杂，且成本较高。由于废水中较高浓度碳源、氮源，而被考虑作为微生物生长的基质。曾有文献报道通过油脂微生物可将乙醇发酵废水转化为微生物油脂，还能有助于乙醇工业的成本回收。已有关于通过微生物发酵来降低废水中 COD 及生化需要量(Biochemical oxygen demand, BOD)的报道<sup>[273]</sup>。

纤维素乙醇是目前生物质能源中发展较为成熟的技术，不但在实验室范围内得到广泛研究并且即将进入工业化生产阶段<sup>[274]</sup>。通过精馏得到乙醇产品后势必会有大量的高浓度 COD (约 125 g/L)的废水产生<sup>[275]</sup>。这些废水中含有发酵残留的糖类、有机酸及木质纤维素预处理与水解过程中生成的副产物等，导致废水处理成本较高，占总成本的 20-30%<sup>[276]</sup>。乙醇发酵废水非常难处理，虽然通过厌氧污泥、好氧污泥等处理工序可降低 99%的 COD、BOD、悬浮物等指标并且有一定量的甲烷生成<sup>[277]</sup>，但是需要长达 3 个月左右的时间来产生这些活性污泥<sup>[278]</sup>。所以开发新的高效、快速、经济型处理乙醇发酵废水的技术对于乙醇的工业生产意义非凡。

美国国家可再生能源实验室(National Renewable Energy Laboratory, NREL)提出的纤维素乙醇废水处理方案<sup>[275]</sup>，除了厌氧处理、好氧处理等常规的处理步骤外，其废水处理的方法中还添加了一些其他的过程，具体如下：厌氧处理（有机物去除、沼气生产）、活性污泥处理（有机物去除、氨氮去除）、膜过滤（总悬浮物去除、胶体有机物去除、反渗透系统的保护）、反渗透（可溶性无机盐的去除）、蒸发（缩小反渗透体系及结晶器的尺寸）、结晶（减少蒸发器液体排出量、实现零液体排放）和离心（生物污泥脱水）。国内也开始了纤维素乙醇发酵废水处理的探索，通过对比分析发现微电解+ABR (anaerobic baffled reactor) +UASB (upflow anaerobic sludge blanket reactor) +MBR (membrane Bioreactor)反应器相结合的方法是纤维素乙醇废水处理的可行性方案<sup>[279-281]</sup>。

以粮食、淀粉或糖类为底物的乙醇发酵废水组分相对单一，并且其中的大多数有机物是属于生物降解型的，已被证实生物法是较为理想的废水处理方法<sup>[282]</sup>。Zhou 等报道了利用 *R. toruloides* Y2 处理红薯水解液的乙醇发酵废水并生产微生物油脂的研究，废水 COD 浓度降低了 72.3%，酵母的生物量及含油率分别为 3.8 g/L、34.9%<sup>[283]</sup>。据报道皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CH002 和 *T. dermatis* CH007 均具备处理丙酮-丁醇-乙醇发酵废水的能力，废水 COD 浓度均降低了 68%，酵母生物量及含油率分别为 4.9 g/L、14.7%；7.4 g/L、13.5%<sup>[284, 65]</sup>。目前还没有直接以微生物处理纤维素乙醇发酵废水的报道。寻求能够耐受纤维素体系、具备广谱的底物代谢性能的菌株是微生物处理纤维素发酵废水的关键所在。*T. cutaneum* 不但能够代谢利用多种糖类<sup>[75, 215]</sup>，具备在木质纤维素

体系中生长及油脂累积的能力<sup>[71, 73]</sup>, 还表现出良好的抑制物耐受性能<sup>[195]</sup>, 这些特征为其处理纤维素乙醇发酵废水提供了可能。(见本文第三章 3.44)。

本部分主要探究 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理纤维素乙醇发酵废水的可能性及利用废水生产微生物油脂的能力。①优化 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水、累积油脂的培养条件, 以期最大程度的降低废水的 COD 浓度, 提高 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水的处理效率, 提高整个生物炼制过程的经济效益。②在 3 L 发酵罐上进行 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理纤维素乙醇发酵废水、油脂累积的放大实验, 分析废水各项指标尤其是 COD 值的变化情况。③与其他油脂微生物处理废水报道的结果, 进行比对分析。④纤维素乙醇发酵废水经 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理后, 再利用污水处理的微生物菌剂对其进行深度处理以期能够最大限度降低废水的 COD 值。⑤*T. cutaneum* ACCC 20271 利用纤维素乙醇发酵废水累积得到的油脂进行组分分析, 鉴定其是否可用作生物柴油生产的原料。本研究首次提出了采用油脂酵母处理纤维素乙醇发酵废水的理念, 对于日后纤维素乙醇工业废水处理方案的建立、成本回收具有重要意义。

## 4.2 实验材料

### 4.2.1 种子培养

同 2.3.1。

### 4.2.2 纤维素乙醇发酵废水的准备

玉米秸秆经干式稀酸预处理(同 2.3.2)后, 经树脂枝孢酶 *A. resiniae* ZN1 脱毒(同 2.3.3)至糠醛完全消失。30% (w/w)固含量, 诺维信 CTec2 纤维素酶(购自诺维信生物技术有限公司, 中国北京)(滤纸酶活: 203.20 FPU/mL, 纤维二糖酶活: 4900 CBU/mL<sup>[219, 220]</sup>, 蛋白含量: 87.31 mg/mL), 酶用量为 4 mg (酶蛋白) /g (纤维素), 50°C、150 rpm、pH 5.0 预糖化 12 h。接种可利用葡萄糖、木糖的工程菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 (由山东大学生命科学院鲍晓明教授课题组提供), 同步糖化共发酵 96 h 后, 发酵醪进行精馏除去乙醇。10,000×g 离心 10 分钟进行固液分离, 上清即纤维素乙醇发酵废水。115°C 灭菌 20 min 后备用。

乙醇发酵醪精馏后得到的纤维素乙醇发酵废水, 经 HPLC 分析其主要成分为葡萄糖、木糖、乙酸、和乙醇, 分别为: 7.25、11.52、5.01、3.43g/L。总糖、总酚含量分别为 38.56、5.21 g/L, COD 浓度为 112.41 g/L。所得纤维素乙醇发酵废水中糖浓度偏高是由于在废水制备过程中乙醇蒸馏、固体残渣去除所导致的体积减少而导致的浓缩。

## 4.3 实验方法

### 4.3.1 高效液相色谱(HPLC)分析

水解液中葡萄糖、木糖、乙酸、乙醇通过 HPLC 定量分析。同 3.3.10。

### 4.3.2 废水总糖含量测定

取 3 mL 稀释后的废水至带刻度的试管中, 加 0.2 mL 6 M HCl 混合均匀后, 121°C 反应 30 min。待温度降低至室温后, 用 6 M NaOH 调 pH 至中性并定容至 10 mL, 混合

均匀, 取 2 mL 上述混合液, DNS 法测定还原糖含量, 即总糖含量。

#### 4.3.3 废水总酚含量测定

总酚含量的测定采用福林酚法<sup>[285]</sup>。废水稀释一定倍数后, 取 0.5 mL, 添加 1.0 mL 15% (v/v)福林酚溶液, 混合均匀后再加入 4.0 mL 1 M NaCO<sub>3</sub> 室温下反应 2 h 后, 测定 765 nm 的吸光值。以 0.1 mg/mL 的没食子酸稀释 5 个浓度梯度后做标线。

#### 4.3.4 废水中 COD 测定

废水中 COD 的测定采用中华人民共和国国家标准——水质化学需氧量的测定——重铬酸钾法 (序列号: 11914-1989)。

#### 4.3.5 不同培养条件对 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水及微生物油脂累积的影响

本部分实验在 500 mL 锥形瓶中进行, 装有 50 mL 乙醇发酵废水, 接种量为 10% (v/v)。另外根据需要添加营养盐及其终浓度分别为: 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.22 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 0.5 g/L YE。*T. cutaneum* ACCC 20271 废水中的培养温度为 30℃, 转速 180 rpm, pH 5.0。

#### 4.3.6 发酵罐实验

选用 3 L 发酵罐进行本部分实验。不添加任何营养盐或 YE, 工作体积 1 L, 其他设置同 3.3.6。

#### 4.3.7 菌体干重及油脂测定

同 2.3.7。

#### 4.3.8 油脂组分测定

同 2.3.8。

#### 4.3.9 废水的深度微生物降解

采用污水处理菌剂对油脂发酵后的废水进一步处理, 菌剂购自台湾德丰生物技术有限公司, 设定其添加量为 5、10 g/L。不添加任何其他外源营养。30℃、180 rpm, pH 6.5~7.5。

### 4.4 结果与讨论

#### 4.4.1 转速对 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水及生产微生物油脂的影响

一般而言 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长需要足够的氧气, 摇瓶中的溶氧水平与转速呈正相关关系。研究发现随转速升高细胞生长(OD<sub>600</sub>)显著提高, 尤其是在生长的初期该趋势尤为明显, 如图 4-1a 所示。培养自 96 h 起, 100~300 rpm 转速下的生长趋于稳定, 并且培养 120 h 时的菌体干重也相差不大。发酵 120 h 后, 180 rpm 的菌体干重及油脂产量最高, 分别为 19.96 g/L、2.61 g/L (图 4-1c), 且残留总糖、总酚均最低, 为 20.77 g/L、4.08 g/L (图 4-1b)。

如表 4-1 所示, 在静置培养条件下培养 120 h 后废水的 COD 浓度仅降低了 10.15%。而在非静置培养时, COD 的去除率明显高于静置培养的。在转速 180 rpm 时, COD 去除率最高, 为 47.54%。综上所述 180 rpm 是 *T. cutaneum* ACCC 20271 最适的废水处理及

油脂生产条件。

由图 4-2a 可知，伴随 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长，乙醇发酵废水中的葡萄糖在 24 h 内即可被完全消耗掉，而木糖也被部分消耗，在 300 rpm 时的木糖消耗量最大，培养 120 h，废水中残余木糖量仅为 2.93 g/L。同时废水中的乙酸、乙醇也可被降解掉（图 4-2b），尤其是在转速为 100~300 rpm 时，乙酸、乙醇均可被降解掉。说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 不但具备代谢乙酸的能力，还能够代谢乙醇。

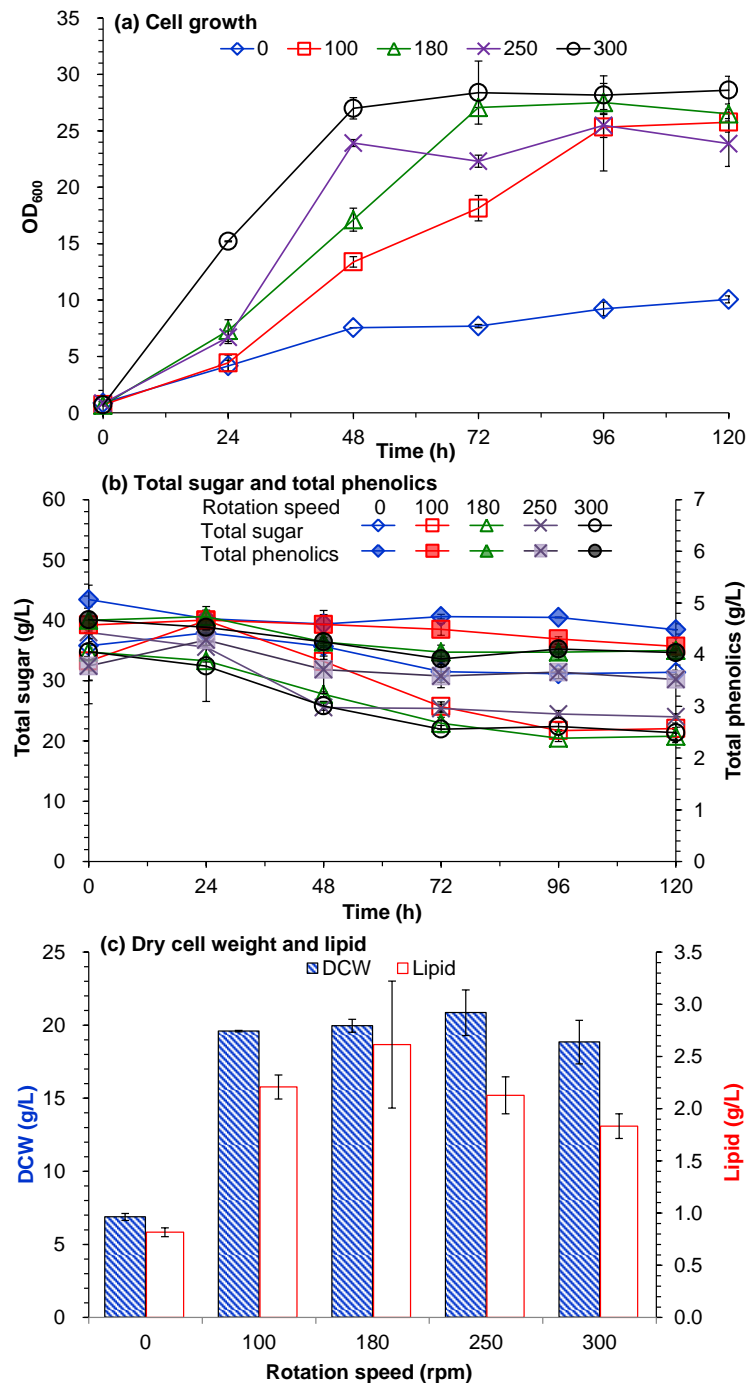


图 4-1 转速对 *T. cutaneum* ACCC 20271 细胞生长及油脂生产的影响

(a)细胞生长( $OD_{600}$ )；(b)总糖和总酚变化曲线；(c)胞干重及油脂

Figure 4-1 Effects of rotation speed on the cell growth and lipid production of *T. cutaneum* ACCC 20271

(a) cell growth ( $OD_{600}$ ); (b) time course of total sugar and total phenolics; (c) dry cell weight and lipid

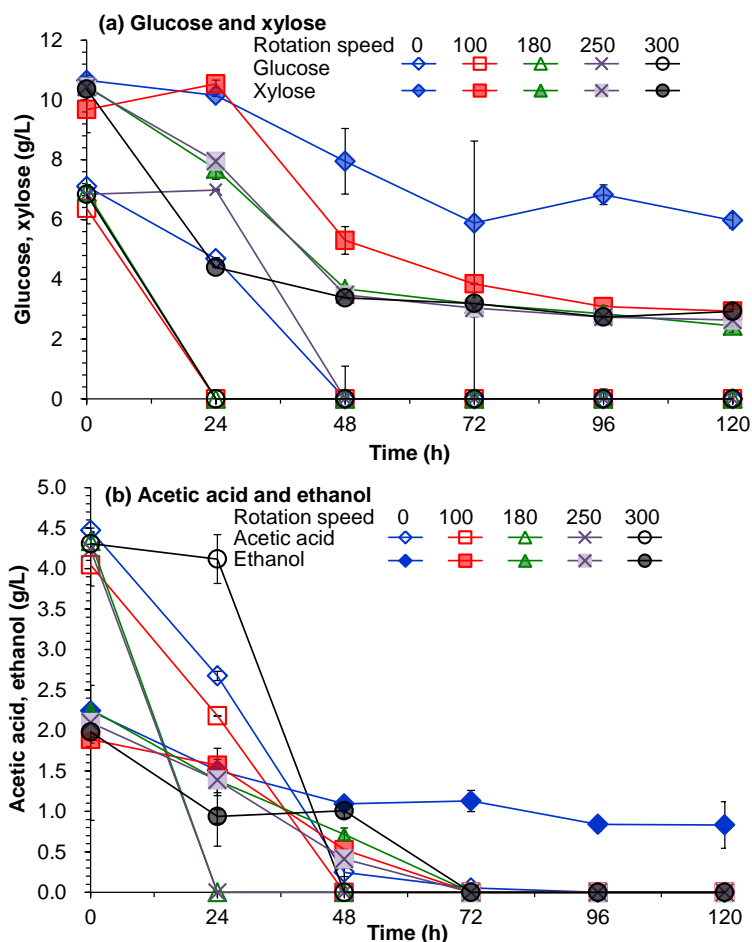


图 4-2 不同转速下 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水时的主要成分物质浓度变化  
(a)葡萄糖、木糖浓度变化曲线；(b)乙酸、乙醇浓度变化曲线

Figure 4-2 Time course of main compasion materials of ethanol fermentation wastewater treated by *T. cutaneum* ACCC 20271 under different rotation speed

(a) time course of glucose and xylose; (b) time course of acetic acid and ethanol

表 4-1 转速对 *T. cutaneum* ACCC 20271 降低废水 COD 的影响

Table 4-1 Effects of rotation speed on the COD reducing by *T. cutaneum* ACCC 20271

Rotation speed (rpm)	COD at 0 h (g/L)	COD at 120h (g/L)	Deduce value
0	95.69±5.28	85.98±7.76	10.15%
100	97.7±8.13	65.55±0.43	32.91%
180	102.87±0.81	53.96±0.43	47.54%
250	88.55±6.82	66.60±4.24	24.79%
300	100.00±3.25	60±2.16	39.94%

#### 4.4.2 pH 对 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水及生产微生物油脂的影响

当废水的 pH 在 3~4 之间时, *T. cutaneum* ACCC 20271 菌体生长受到明显的抑制, 培养 120 h 后其菌体干重仅为 1.43、1.70 g/L。当 pH 升高至 5~7 之间时生长状态良好, pH 6 时 72 h 的 OD<sub>600</sub> 达到 29.60 (图 4-3a)。经过 120 h 的培养之后, pH 5 时菌体干重达到 19.96 g/L, 并且 pH 5 时油脂产量最高, 为 2.61 g/L (图 4-3c)。说明 pH 中性或弱酸性更适宜 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长及油脂累积。

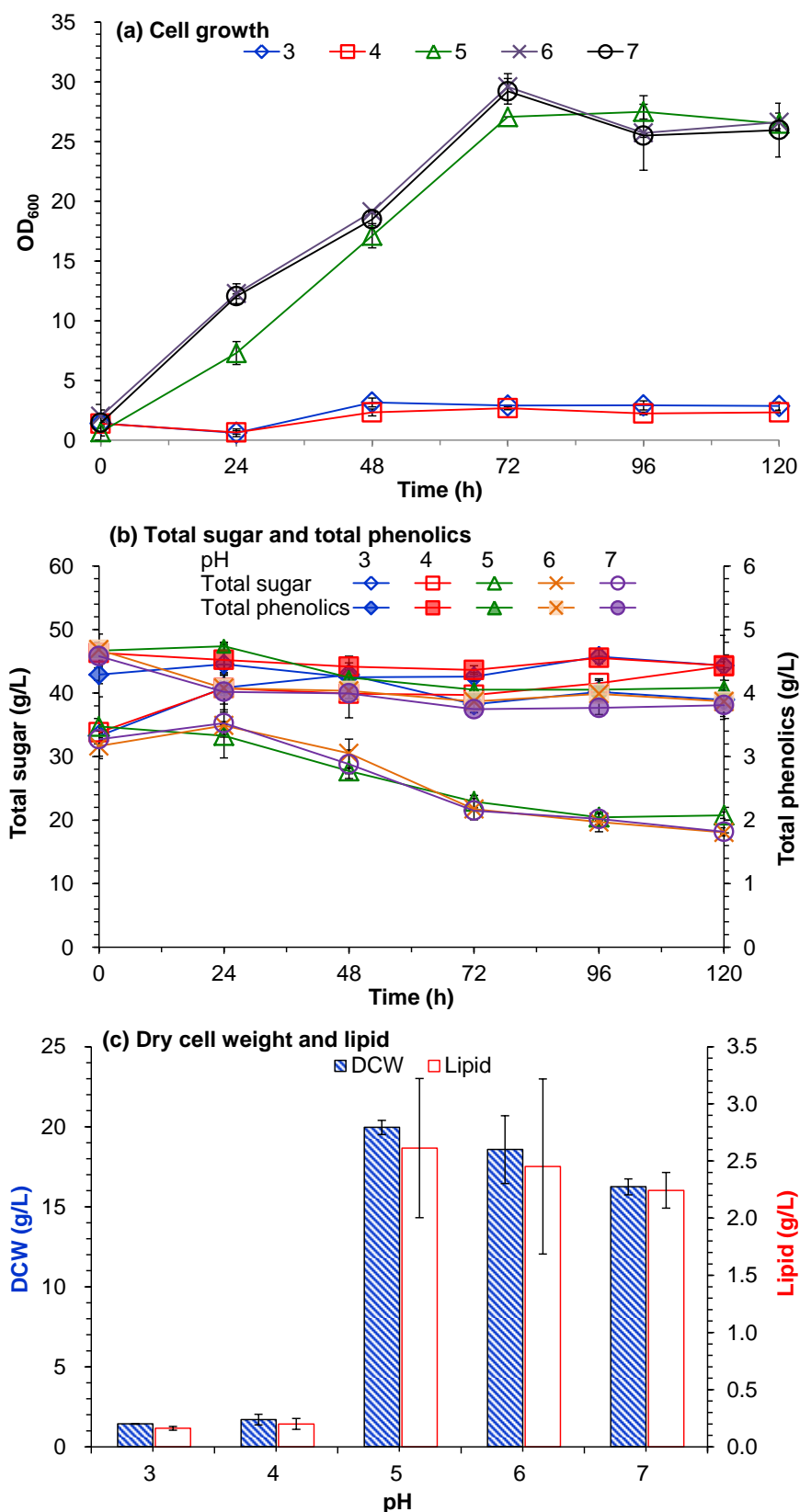


图 4-3 pH 对 *T. cutaneum* ACCC 20271 细胞生长及油脂生产的影响

(a) 细胞生长(OD<sub>600</sub>); (b) 总糖、总酚浓度变化; (c) 细胞干重及油脂

Figure 4-3 Effects of pH on the cell growth and lipid production of *T. cutaneum* ACCC 20271

(a) cell growth (OD<sub>600</sub>); (b) time course of total sugar and total phenolics; (c) dry cell weight and lipid

由图 4-4a 可知, 废水中的葡萄糖在 24 h 内即可被消耗完全, 而木糖在整个培养阶

段逐步被消耗掉。经 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理 120 h 后，随 pH 的升高，残余木糖量逐步降低。pH 7 时木糖残余量最低，为 0.49 g/L。pH 3、4 时，废水中的乙酸、乙醇均没有被降解掉。pH 5~7 时的乙酸均被降解掉。pH 5 时乙醇剩余 1.56 g/L，pH 6、7 时的乙醇被降解掉。

表 4-3 表明 pH 3、4 的条件下，经过 120 h 培养后，废水中 COD 值只有很少的降低或不降低。而在 pH 5、6、7 的时候，COD 值分别降低了 47.54%、37.26%、32.64%，pH 5 时 COD 值最低，说明弱酸性的 pH 条件更有利于 *T. cutaneum* ACCC 20271 降低废水中的 COD 值。

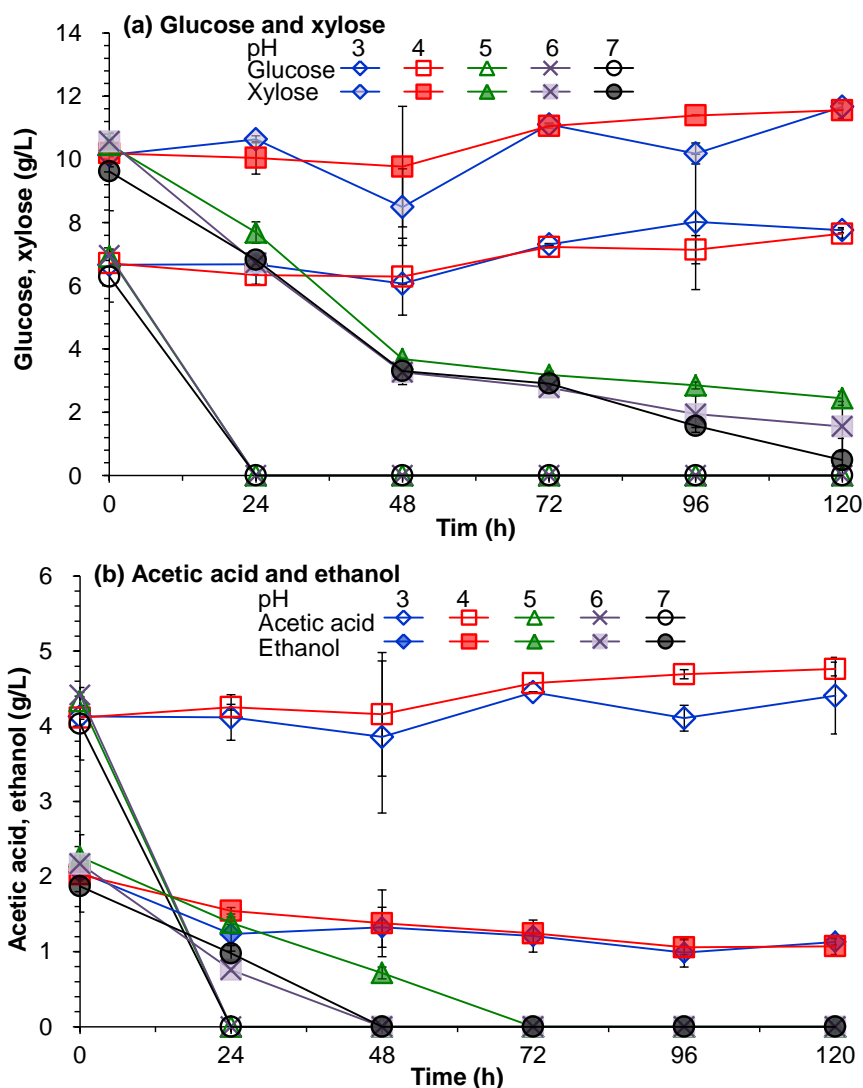


图 4-4 不同 pH 下 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水时的主要成分物质浓度变化  
(a)葡萄糖、木糖浓度变化；(b)乙酸、乙醇浓度变化曲线

Figure 4-4 Time course of main composition materials of ethanol fermentation wastewater treated by *T. cutaneum* ACCC 20271 under different pH  
(a) time course of glucose and xylose; (b) time course of acetic acid and ethanol

表 4-2 pH 对 *T. cutaneum* ACCC 20271 降低废水 COD 的影响

Table 4-2 Effects of pH on the COD reducing by *T. cutaneum* ACCC 20271

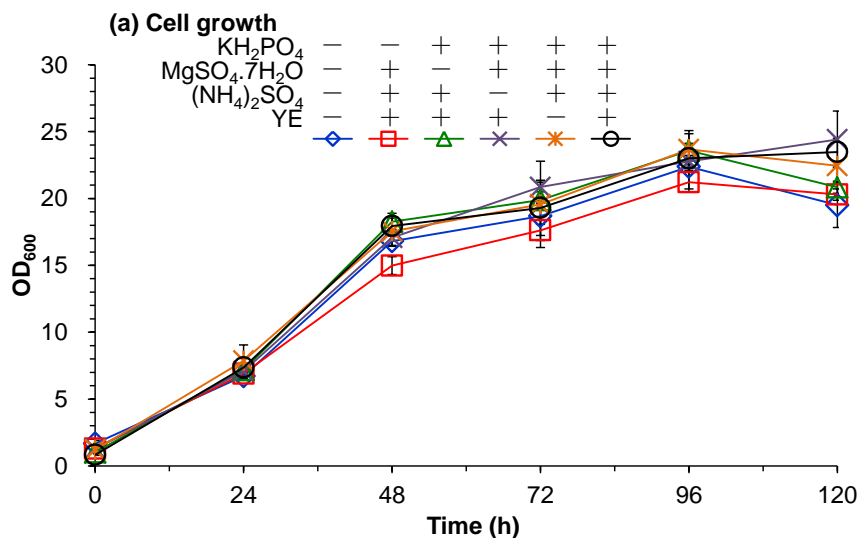
pH	COD at 0 h(g/L)	COD at 120h (g/L)	Deduce value
3	102.30±0.00	96.95±2.59	5.23%
4	99.43±0.81	103.66±1.72	-4.26%
5	102.87±0.81	53.96±0.43	47.54%
6	88.45±3.38	55.49±4.31	37.26%
7	92.33±0.42	62.20±3.45	32.64%

#### 4.4.3 营养盐对 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水及生产微生物油脂的影响

为考察不添加营养盐或 YE 是否对 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水存在影响, 在  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、YE 几种营养物质中去掉其中的一种, 结果如图 4-5a 所示。结果表明营养盐的有无对 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长并没有明显的影响。在不添加  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  时, 菌体干重及油脂产量均最高, 分别为 19.24、2.11 g/L (图 4-5c)。

如图 4-6a 所示, 在 24 h 内葡萄糖即可被消耗完, 在不添加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  或 YE 时木糖残余量较低, 为 1.87、1.86 g/L。图 4-6b 表明, 是否添加营养盐或 YE 对乙酸、乙醇的降解没有明显的影响作用。

不添加 YE 时, 废水中 COD 的去除率最高, 为 48.95%; 而添加了所有营养盐和 YE 时 COD 仅降低了 30.72%。但无论是否添加营养盐或者 YE, *T. cutaneum* ACCC 20271 培养 120 h 后废水的 COD 值均在 63.00~70.20 g/L 之间。所以是否添加营养盐或 YE 对于废水最终的 COD 水平来讲, 没有明显的影响。



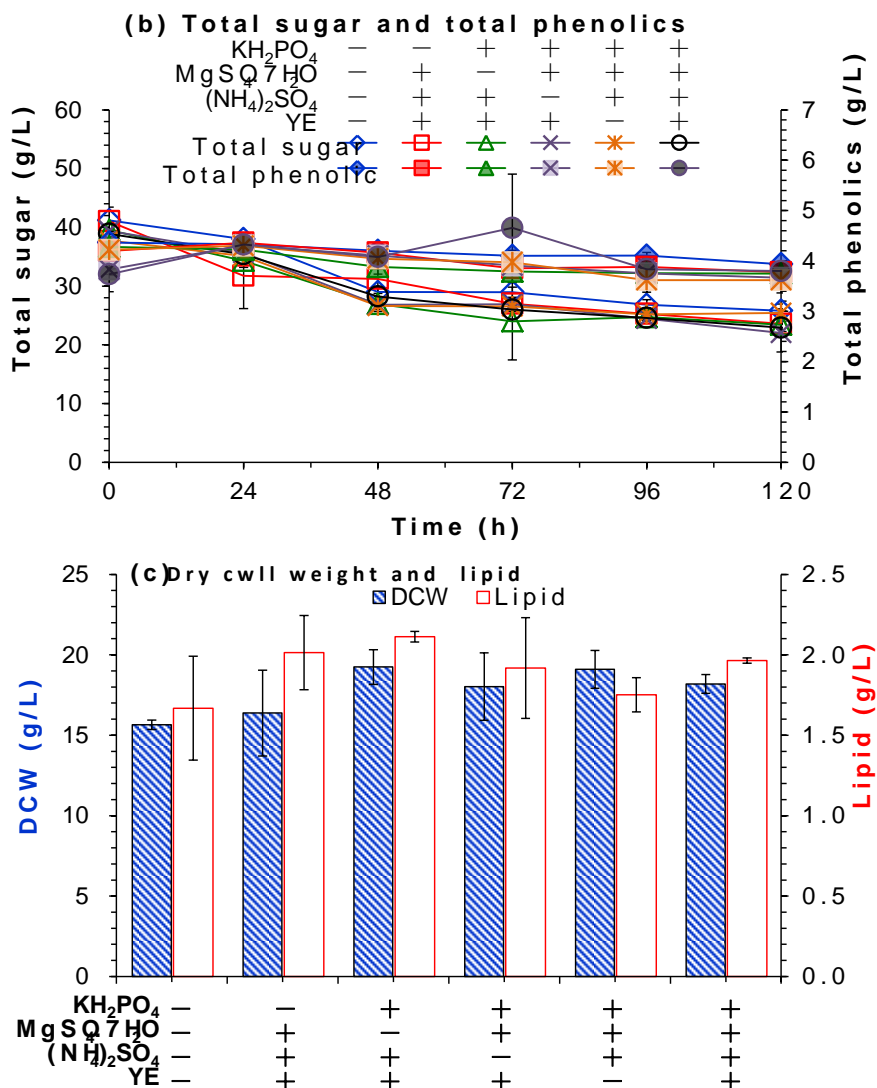
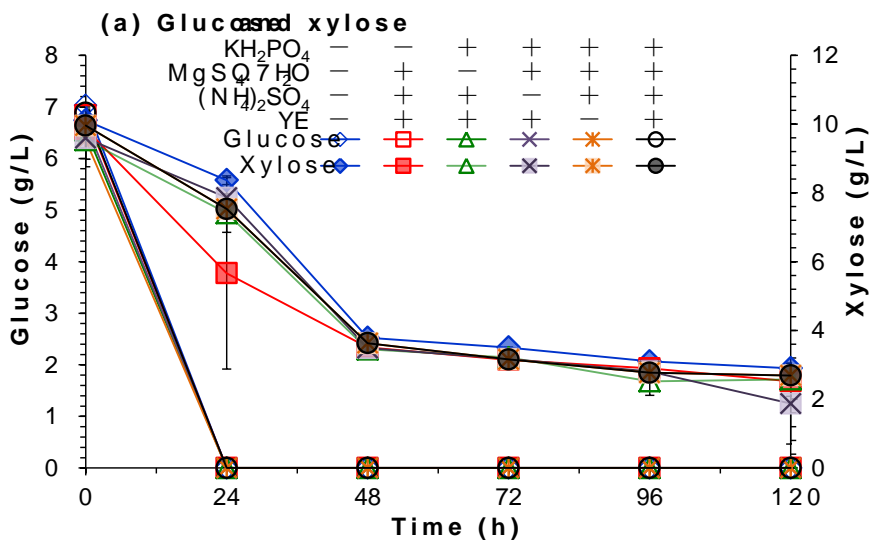


图 4-5 营养盐、YE 对 *T. cutaneum* ACCC 20271 细胞生长及油脂生产的影响

(a) 细胞生长( $\text{OD}_{600}$ ); (b) 总糖、总酚浓度变化曲线; (c) 细胞干重及油脂

Figure 4-5 Effects of salt or YE on the cell growth and lipid production of *T. cutaneum* ACCC 20271  
 (a) cell growth ( $\text{OD}_{600}$ ); (b) time course of total sugar and total phenolics; (c) dry cell weight and lipid



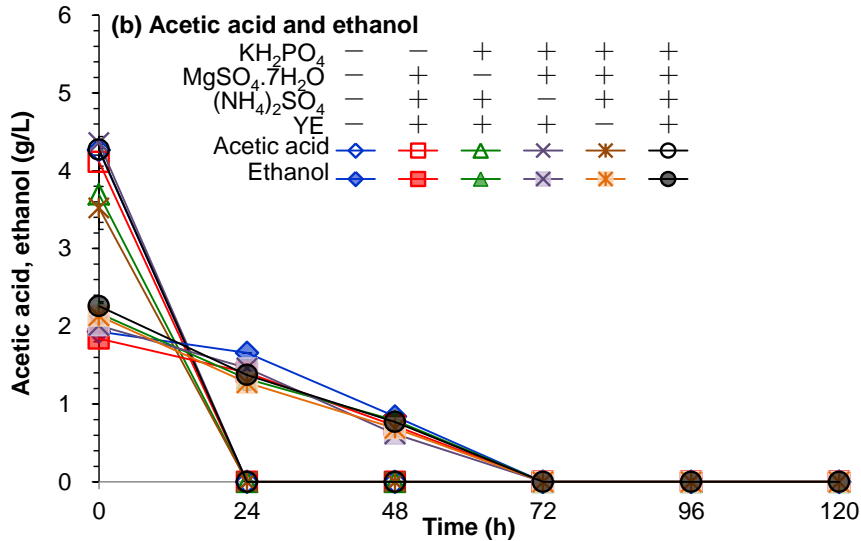


图 4-6 不同营养盐或 YE 存在时 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水时的主要成分物质浓度变化

(a)葡萄糖、木糖浓度变化曲线；(b)乙酸、乙醇浓度变化曲线

Figure 4-6 Time course of main composition materials of ethanol fermentation wastewater treated by *T. cutaneum* ACCC 20271 with different salts or YE

(a) time course of glucose and xylose; (b) time course of acetic acid and ethanol

表 4-3 营养盐对 *T. cutaneum* ACCC 20271 降低废水 COD 的影响

Table 4-3 Effects of nutrient on the COD reducing by *T. cutaneum* ACCC 20271

Nutrient	COD at 0 h(g/L)	COD at 120h (g/L)	Reduction
N	112.05±0.85	70.20±3.39	37.35%
-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	109.04±10.22	66.90±2.97	38.64%
-MgSO <sub>4</sub>	114.46±0.85	64.20±1.70	43.91%
-(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	117.47±1.70	63.00±3.39	46.37%
-YE	127.71±16.19	65.20±8.20	48.95%
F	100.60±1.70	69.70±1.84	30.72%

N: 不添加任何营养盐或 YE; F: 添加所有的营养盐和 YE.

N: no addition of any nutrient; F addition all of the nutrients.

#### 4.4.4 发酵罐实验

*T. cutaneum* ACCC 20271 在乙醇发酵废水中无需延滞期即可直接进入对数期，24 h 后进入生长稳定期（图 4-7a）。在生长旺盛的对数期发酵液中的溶氧(DO)也是显著降低的，在进入稳定期之后溶氧值基本维持在 98%左右而不再明显变化（图 4-7a）。随发酵进行总糖含量也逐步下降（图 4-7b），由 47.89 g/L 降低至 21.65 g/L。废水中总酚含量仅有小幅度降低，由 4.41 g/L 降低至 3.37 g/L。说明废水中的酚类化合物并没有被 *T. cutaneum* ACCC 20271 有效的利用掉，而是依旧存留在废水中。经过 120 h 培养后菌体干重及油脂产量分别为 16.20、2.16 g/L（图 4-8a）。此时菌体含有率仅为 0.133 g/g，这是由于废水中含有过量的氮所致，较高浓度的氮明显的降低了废水中的 C/N 比而不利于微生物的油脂累积<sup>[71, 82]</sup>。

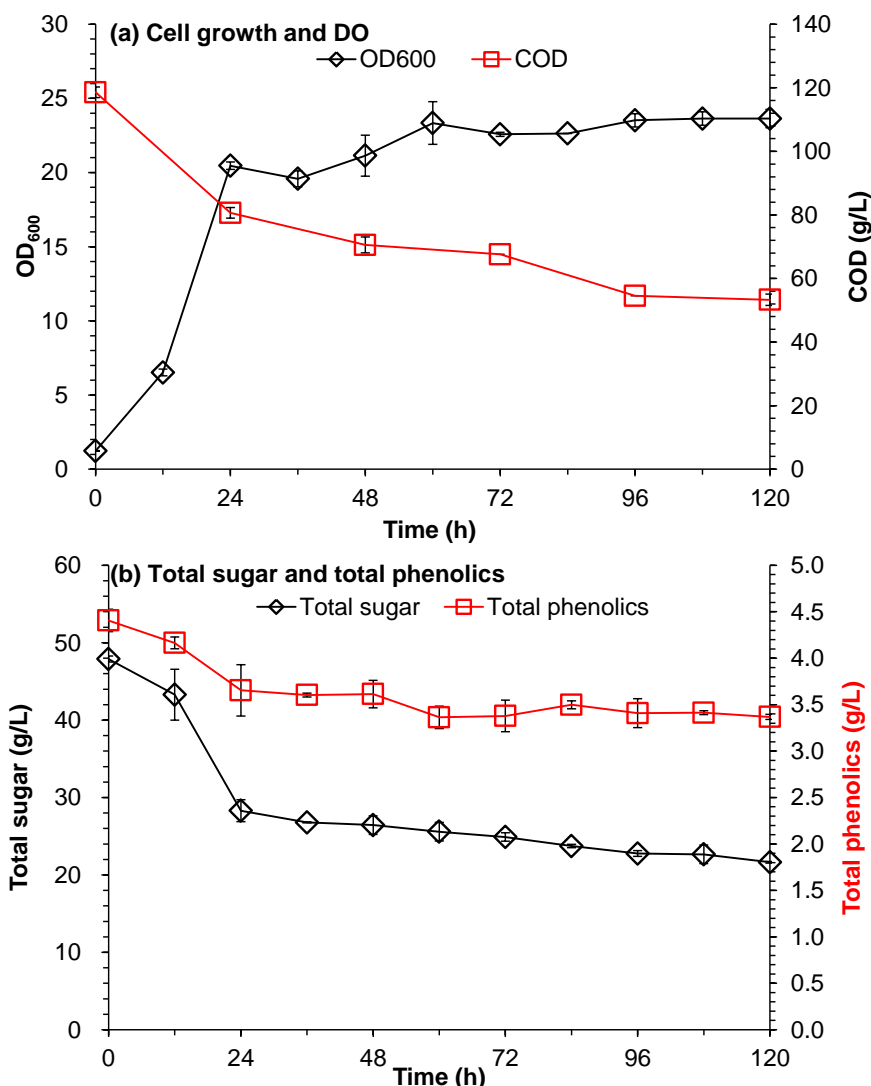


图 4-7 *T. cutaneum* 利用纤维素乙醇发酵废水生产微生物油脂的 3 L 罐的实验

(a)细胞生长(OD<sub>600</sub>); (b)总糖、总酚浓度变化曲线

Figure 4-7 Microbial lipid production by *T. cutaneum* ACCC 20271 using cellulosic ethanol fermentation wastewater in 3 L bioreactor

(a) cell growth (OD<sub>600</sub>); (b) time course of total sugar and total phenolics

如图4-9所示,废水的COD值逐步缓慢下降,由118.58 g/L降低至53.31g/L(120 h),说明随 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长及油脂累积,废水 COD 浓度的确得到明显下降。但是这是由于油脂酵母在限氮条件下的油脂累积过程与细胞自噬相关<sup>[206]</sup>, 油脂累积过程中产生的细胞碎片等导致了 COD 最终不能实现全部去除。同之前摇瓶实验相比,此次放大实验中,菌体干重及油脂产量只有小幅度提高,废水 COD 去除率提高至 55.05%。

提取得到的油脂转酯化后经 GC-MS 测定其脂肪酸组分,结果如表 4-4 所示。与 *T. coremiiforme* CH005、*T. dermatis* CH007、*R. opacus* DSM 44193、*R. toruloides* Y2 相比, *T. cutaneum* ACCC 20271 利用乙醇发酵废水生产的微生物油脂的脂肪酸组分种类丰富,由 12 至 25 个碳链长度的脂肪酸构成,但其主要成分为 C16、C18 的脂肪酸。含量最多的为油酸(C18:1),占总量的 67.81%,其次为棕榈酸、和硬脂酸,分别占总量的 14.21%、10.12%,其中不饱和脂肪酸的含量为 69.40%,说明该油脂的组分与植物油相似,可作

为生物柴油生产的原材料。

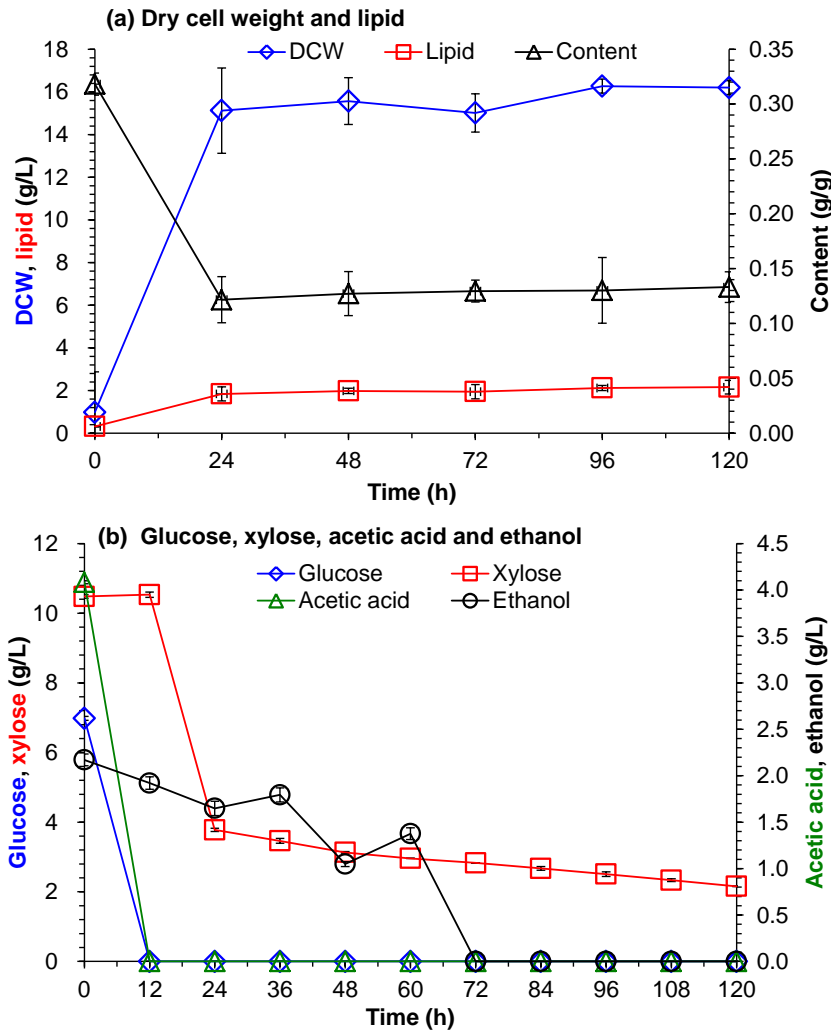


图 4-8 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理纤维素乙醇发酵废水时的油脂生产及主要成分物质浓度变化  
(a)细胞干重及油脂；(b)葡萄糖、木糖、乙酸及乙醇浓度变化曲线

Figure 4-8 Time course of microbial lipid production and main composition materials of cellulosic ethanol fermentation wastewater treated by *T. cutaneum* ACCC 20271

(a) dry cell weight and lipid; (b) time course of glucose, xylose, acetic acid and ethanol

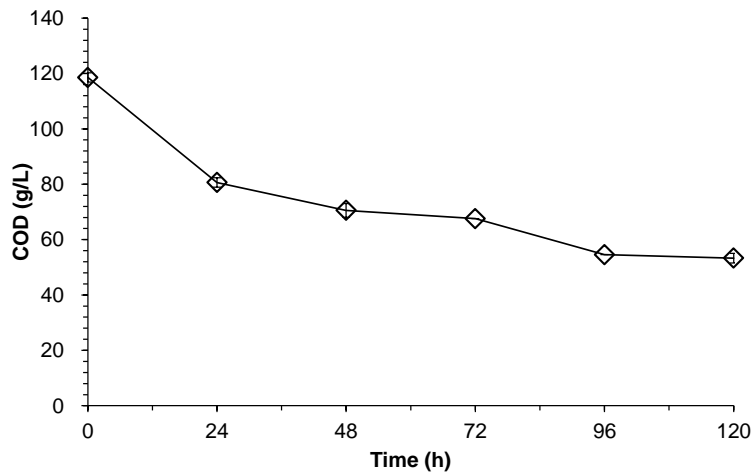


图 4-9 乙醇发酵废水被 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理时 COD 变化情况

Figure 4-9 The changes of COD of ethanol fermentation wastewater treated by *T. cutaneum* ACCC 20271

表 4-4 不同油脂微生物利用不同废水生产的微生物油脂脂肪酸成分

Table 4-4 Fatty acid composition of microbial lipid produced by oleaginous yeasts cultivation in different wastewater

Fatty acid		<i>T. coremiiforme</i> CH005	<i>T. dermatis</i> CH007	<i>R. opacus</i> DSM 44193	<i>R. toruloides</i> Y2	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271
Laurate	C12:0	-	-	-	0.1%	-
Myristate	C14:0	-	-	2.18%	1.4%	0.31%
Pentadecanoate	C15:0	-	-	-	-	1.09%
Palmitoleate	C16:1	-	-	11.14%	11.2%	0.55%
Palmitate	C16:0	29.3%	19.4%	14.71%	0.9	14.21%
Margarate	C17:0	-	-	-	-	1.88%
Oleate	C18:1	36.4%	39.9%	21.69%	49.9%	67.81%
Stearate	C18:0	22.3%	10.6%	9.57%	16.9%	10.12%
Linoleate	C18:2	7.0%	21.7%	8.56%	13.6%	0.36%
Linolenate	C18:3	-	-	4.54%	-	-
Nonadecenoate	C19:1	-	-	-	-	0.20%
Nonadecanoate	C19:0	-	-	-	-	0.16%
Eicosenate	C20:1	-	-	-	1.0%	0.48%
Arachidate	C20:0	-	-	6.05%	-	0.43%
Erucate	C22:1	-	-	5.60%	0.1%	-
Behenate	C22:0	-	-	10.41%	1.5%	0.31%
Lignocerate	C24:0	-	-	6.03%	-	1.65%
Pentacosanoate	C25:0	-	-	-	-	0.45%
Hexacosanoate	C26:0	-	-	-	3.6%	-
Unsaturated fatty acids		43.4%	61.6%	51.53%	75.8%	69.40%
Reference		[286]	[63]	[287]	[283]	This study

-: 代表微量或未检测到

-: Standing for trace or none.

如图 4-9 所示,废水的 COD 值逐步缓慢下降,由 118.58 g/L 降低至 53.31g/L(120 h),说明随 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长及油脂累积,废水 COD 浓度的确得到明显下降。但是这是由于油脂酵母在限氮条件下的油脂累积过程与细胞自噬相关<sup>[206]</sup>,油脂累积过程中产生的细胞碎片等导致了 COD 最终不能实现全部去除。同之前摇瓶实验相比,此次放大实验中,菌体干重及油脂产量只有小幅度提高,废水 COD 去除率提高至 55.05%。

提取得到的油脂转酯化后经 GC-MS 测定其脂肪酸组分,结果如表 4-4 所示。与 *T. coremiiforme* CH005、*T. dermatis* CH007、*R. opacus* DSM 44193、*R. toruloides* Y2 相比,*T. cutaneum* ACCC 20271 利用乙醇发酵废水生产的微生物油脂的脂肪酸组分种类丰富,由 12 至 25 个碳链长度的脂肪酸构成,但其主要成分为 C16、C18 的脂肪酸。含量最多的为油酸(C18:1),占总量的 67.81%,其次为棕榈酸、和硬脂酸,分别占总量的 14.21%、10.12%,其中不饱和脂肪酸的含量为 69.40%,说明该油脂的组分与植物油相似,可作

为生物柴油生产的原材料。

#### 4.4.5 与其他油脂微生物处理废水的发酵结果相比较

近年来关于微生物处理不同来源的废水的报道逐渐增多，如表 4-5 所示。首先与其他来源废水相比，本研究中所用废水的 COD 浓度是最高的。与其他研究报道相比，本研究中 COD 降低的绝对值也是最高的(65.27 g/L)。 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用废水发酵生产的油脂产量达到 2.16 g/L，高于其他的油脂菌株。 *T. cutaneum* ACCC 20271 展现出废水处理及微生物油脂生产的双重功能。

表 4-5 微生物利用不同废水生产微生物油脂

Table 4-5 Lipid production on different wastewaters by oleaginous microbes

Strain(s)	Wastewater	DCW (g/L)	Lipid (g/L)	Initial COD (mg/L)	COD removal (%)	Reference
Oleaginous consortium	Municipal wastewater	0.6	0.12	2,450	81.0	[286]
<i>Aspergillus</i> sp.	Corn cob waste liquor	2.0	0.44	5,000	60.0	[288]
<i>R. glutinis</i>	Monosodium glutamate wastewater	1.5	0.14	20,000	43.8	[101]
<i>L. starkey</i>	Olive oil mill wastewaters	11.0	N/A	43,000	-	[289]
<i>T. coremiiforme</i>	Wastewater after butanol fermentation	5.8	1.11	23,560	68.0	[286]
<i>T. cutaneum</i>	Acetone-butanol-ethanol fermentation wastewater	4.9	0.72	18,000	68	[288]
<i>R. glutinis</i>	Brewery effluents	5.2	0.75	36,000	Hardly reduced	[290]
<i>R. toruloides</i>	Bioethanol wastewater	3.8	1.33	17,000	72.3	[283]
<i>T. cutaneum</i>	Acetone-butanol-ethanol fermentation wastewater	4.9	0.72	18,000	68	[284]
<i>T. dermatis</i>	Acetone-butanol-ethanol fermentation wastewater	7.4	1.00	23560	68	[65]
<i>T. cutaneum</i>	Bioethanol fermentation wastewater	16.20	2.16	118,580	55.05	This study

#### 4.4.6 废水的深度微生物降解

一般来讲微生物菌剂由多种不同类型的微生物菌群构成，通过微生物的生长而将水体中的污染物质逐步降解，从而实现提高水质的目的<sup>[291]</sup>。经 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理后废水的 COD 浓度依旧较高，还需要进一步的处理，所以选用污水处理菌剂对其进行进一步的处理。本实验中设定菌剂添加量分别为 5、10 g/L，考察废水被进一步降解的效果。由表 4-6 可知，菌剂可有效的降低废水的 COD 值。添加 10 g/L 的菌剂，培养 96 h 后 COD 浓度降低至 25.49 g/L，去除率为 57.84%。图 4-10 说明该菌剂可明显降低废水中的总糖含量，10 g/L 菌剂处理 192 h 后废水中残留总糖含量为 9.07 g/L，但是总酚仍旧残留于废水中而不是被微生物降解、利用。

表 4-6 菌剂进一步处理废水后的 COD 浓度

Table 4-6 COD concentration of wastewater further treated by microbial agent

Microbial agent (g/L)	COD at 0 h (g/L)	COD at 96 h (g/L)
0	55.38±4.03	54.84±0.42
5	52.17±0.00	33.79±4.19
10	60.47±0.00	25.49±0.84

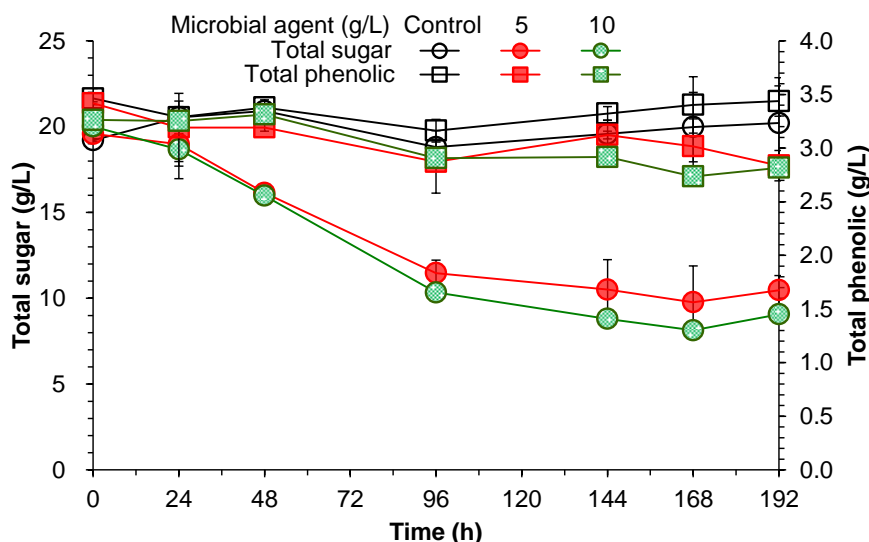


图 4-10 菌剂处理废水时的总糖和总酚变化情况

Figure 4-10 Time course of total sugar and total phenolic of wastewater treated by microbial agent

#### 4.4.7 乙醇代谢路径

实验中发现残留在乙醇发酵废水中的乙醇可以被 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用。结合 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组注释信息，推测其乙醇代谢路径，如图 4-11 所示。首先在醇脱氢酶(Trcu\_00679、Trcu\_00347)的作用下，乙醇被氧化为乙醛酸<sup>[292]</sup>，而后经醛脱氢酶(Trcu\_01234、Trcu\_01775、Trcu\_02638)催化转化为乙酸<sup>[293]</sup>，最后在乙酰-CoA 合成酶(Trcu\_03003)的作用下生成乙酰-CoA<sup>[270, 294]</sup>，并最终进入 TCA 循环。但是上述代谢路径的关键酶并未进行验证，故其可靠性还需要进一步试验分析。

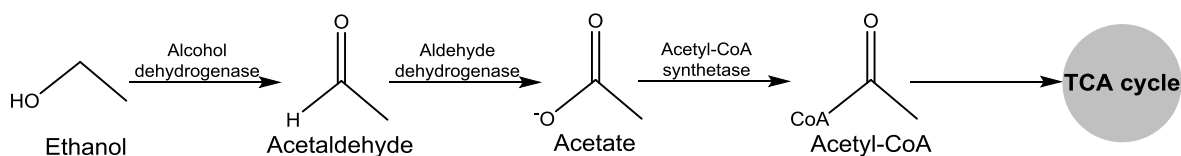


图 4-11 *T. cutaneum* ACCC 20271 中乙醇代谢路径

Figure 4-11 The ethanol degradation pathway in *T. cutaneum* ACCC 20271

#### 4.5 小结

本章主要考察了 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理乙醇发酵废水及其利用废水累积油脂的能力。分析了不同培养条件对 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理废水及油脂累积的影响，并进行了放大实验。为更进一步的降低乙醇发酵废水的 COD 值，最后采用污水处理菌

剂对其再处理。得到以下结论：

(1) *T. cutaneum* ACCC 20271 具备处理乙醇发酵废水的潜能，废水 COD 去除率为 55.05%，其最适条件为 180 rpm，pH 中性或弱酸性。是否添加营养盐或 YE 对其最终效果没有显著影响。*T. cutaneum* ACC 20271 的培养过程中残余的葡萄糖、乙酸可被快速消耗，而木糖、乙醇被部分消耗。约 50% 的总糖被消耗，而总酚含量变化不明显。

(2) *T. cutaneum* ACCC 20271 具备一定的降低废水 COD 指标的能力。但是经 *T. cutaneum* ACCC 20271 的培养之后，废水中的 COD 值依旧较高。采用污水处理菌剂可进一步显著降低废水的 COD 值。

(3) 通过脂肪酸组分分析发现该油脂组分与植物油相似，可作为生物柴油生产的原料。总之通过 *T. cutaneum* ACCC 20271 的培养，实现了乙醇发酵废水的处理，及成本回收的双重目标。

## 第 5 章 皮状丝孢酵母菊粉水解酶特性分析及整合生物加工菊粉生产微生物油脂

### 5.1 引言

菊粉是一种以聚果糖形式存在的碳水化合物，广泛存在于菊芋等 3 万多种植物中。菊芋具有较好的耐受多种疾病的能力，能够在非耕地中生长<sup>[295]</sup>，还能改善土壤沙漠化及水土保持<sup>[296]</sup>。到目前为止，菊芋已经在北美、北欧、韩国、澳大利亚、新西兰以及我国的多个省份被广泛种植。菊粉作为一种廉价且储备丰富的原料在生物乙醇、果糖糖浆、单细胞蛋白、微生物油脂生产的研究中受到诸多科研工作者的青睐。

当菊粉作为发酵底物用于生物基化学品的生产时，首先要通过酸或酶水解转化为发酵性糖。酸解是由菊粉或菊芋等原料获得发酵性糖的传统方法，通常是在高浓度酸、低温条件或者低浓度酸、高温条件下进行。酸水解菊粉时会生成某些有颜色的产物，如二果糖酐<sup>[297]</sup>。提高温度或者延长保温时间可促进果聚糖转化为果糖的效率，但同时会生成羟甲基糠醛(HMF)，而抑制发酵菌株的性能<sup>[298]</sup>。用酶水解菊粉是一种新的生产果糖的方式，并且没有副产物的生成。可生产菊粉酶的微生物有真菌、酵母和细菌，其中酵母菌株有：*K. marxianus*、*K. fragilis*、*Pichia guilliermondii*、*C. aureus* 等。Guiraud 等<sup>[299]</sup>尝试以呼吸缺陷型菌株 *K. fragilis* 利用菊芋生产乙醇。生物乙醇发酵菌株 *K. marxianus*、*S. cerevisiae* 本身就具备水解菊粉的能力<sup>[300]</sup>，在不添加外源菊粉水解酶的情况下即可实现整合加工生产乙醇<sup>[301, 302]</sup>。研究发现 *K. marxianus* 中菊粉水解酶为菊粉酶<sup>[303]</sup>，而 *S. cerevisiae* 中菊粉水解酶为蔗糖酶（转化酶）SUC2<sup>[127]</sup>。

大部分油脂微生物是不能直接利用菊粉来生产微生物油脂。Zhao 等先后报道了 *R. mucilaginosa* 利用菊粉水解液生产油脂的研究<sup>[110]</sup>及其与菊粉酶生产菌株 *P. guilliermondii* M-30 共培养以实现直接利用菊粉、菊芋生产微生物油脂的探索<sup>[112]</sup>。油脂酵母 *R. toruloides* 2F5<sup>[56]</sup>、和 *P. guilliermondii* Pcl22<sup>[304]</sup>利用菊芋生产微生物油脂的研究也有报道。在我们之前的研究，发现油脂酵母 *T. cutaneum* 具备直接利用菊粉生产微生物油脂的能力<sup>[126]</sup>。本章中对油脂酵母 *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271 利用菊粉整合生物加工(Consolidated bioprocessing, CBP)生产微生物油脂的性能进行评价。首先验证 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的存在；其次分析 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的生产特性、亚细胞分布、稳定性等基本的酶学特性等，以更详细地了解该菊粉水解酶；第三，通过琼脂糖凝胶柱对 *T. cutaneum* ACCC 20271 粗酶液进行纯化以得到其菊粉水解酶，并进行 SDS-PAGE 初步分析该菊粉水解酶的分子大小，结合 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组信息推测可能的菊粉水解酶编码基因等信息；第四优化 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用菊粉生产微生物油脂的条件，以期得到较高的油脂产量。本章中初步构建了菊粉或含菊粉原料整合生物加工生产微生物油脂的模型，为菊粉或含菊粉原料的资源化利用提供理论基础。

## 5.2 实验材料

### 5.2.1 原材料

菊粉购于广州市天河新海信贸易有限公司,菊粉中葡萄糖、果糖含量分别为 10.32%、5.83% (w/w)。用 3 M HCl 将菊粉溶液的 pH 调至 2 左右,120℃反应 30 min 以水解菊粉,经 0.22 μm 滤膜过滤后用高效液相色谱(HPLC)测定果糖、葡萄糖的含量。菊粉中聚果糖、葡聚糖的含量分别为 58.83%、8.98% (w/w)。

### 5.2.2 菌种及培养基

皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum* ACCC 20271),同 2.2.2。粘红酵母(*Rhodotorula glutinis* CGMCC 2.703)、圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides* CGMCC 2.1609)和马克斯克鲁维酵母(*K. marxianus varmarxianus* CGMCC 2.1549)均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(<http://www.cgmcc.net/>);酿酒酵母(*Saccharomy cerevisiae* DQ1)为本实验室筛选的突变株并保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心,解脂耶氏酵母(*Yarrowitica lipolytica* DSM 3286)购自德国微生物菌株保藏中心 (<http://www.dsmz.de/home.html>)。酵母菌均在 YPD 培养基中,于 30℃、180 rpm 下培养 12 h。之后以 10% (v/v)接种量接种至新鲜的 YPD 培养基中,30℃、180 rpm 下培养 24 h 作为种子液。

发酵培养基:葡萄糖或菊粉 25 g/L、YE 0.5 g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.22 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L。

菊粉水解酶生产培养基:菊粉 20 g/L、YE 1.0g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0 g/L。

## 5.3 实验方法

### 5.3.1 种子培养

同 2.3.1。

### 5.3.2 Bradford 溶液配制

Bradford 储备液制备:称取 350 mg 考马斯亮蓝 G250,加入 100 mL 95%乙醇、200 mL 88%磷酸搅拌均匀,于棕色瓶中 4℃冰箱中避光保存备用。此溶液可长期存放。

Bradford 工作液配制:量取 850 mL 超纯水,加入 95%乙醇 30 mL、88%磷酸 60 mL 搅拌均匀后再加入 60 mL Bradford 储备液混匀,于棕色瓶中常温下避光保存。使用前用 Whatman 1 号滤纸过滤即可直接使用。

### 5.3.3 DNS 溶液配制

将 6.3 g DNS 和 262 mL 2 mol/L NaOH 溶液,加到 500 mL 含有 185 g 酒石酸钾钠的热水溶液中,搅拌至完全溶解,再加入 5 g 结晶酚和 5 g 亚硫酸钠,搅拌均匀、冷却后加蒸馏水定容至 1 L,贮存于棕色瓶中,常温下避光保存 7 天后使用。

### 5.3.4 菊粉测定方法

取适量菊粉溶液,用 3M HCl 调 pH 至 2.0,120℃反应 30 min 后,稀释相应倍数后用 0.22μm 滤膜过滤,用 HPLC (日本岛津)测定,RID-10A 型示差折光检测器,Bio-Rad

HPX-87H 型色谱柱(300 mm×7.8 mm)进行检测。5 mM 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为流动相, 流速为 0.6 mL/min, 柱温 65℃。所测得的葡萄糖、果糖总量即为菊粉的量。

#### 4.3.5 微生物油脂发酵

*T. cutaneum* ACCC 20271 利用菊粉的油脂发酵实验在 500 mL 锥形瓶中进行, 装液量为 50 mL。*T. cutaneum* ACCC 20271 种子液按 10% (v/v) 接种量接种至发酵培养基中, 进行微生物油脂的发酵。pH 5.0、30℃、180 rpm 发酵 120 h, 每隔一定时间取样测定菌体生长(OD<sub>600</sub>)、糖的消耗等情况。

#### 5.3.6 菌体干重及微生物油脂含量测定

同 2.3.7。

#### 5.3.7 微生物油脂组分分析

同 2.3.8。

#### 5.3.8 菊粉水解酶粗酶液制备及酶活测定

将种子培养液接种至菊粉水解酶生产培养基中, 30℃、180 rpm 培养 24 后, 取 30 mL 培养液 10,000×g 离心 10 min 收集酵母细胞, 用 0.1 M (pH 5.0) 柠檬酸缓冲液清洗细胞沉淀两次, 10,000×g 离心 10 min 以彻底去除细胞沉淀中的水分。弃去上清液, 快速放置于冰上。添加 0.1 M (pH 5.0) 柠檬酸缓冲液 3 mL 及 0.2 mL 磁珠涡旋振荡 4 min 破碎细胞, 4℃、10,000×g 离心 10 min, 上清即为粗酶液。

菊粉水解酶酶活测定: 取 0.1 mL 酶液、0.9 mL 2% (w/v) 菊粉溶液, 50℃ 反应 30 min, 沸水浴 10 min 以终止反应。DNS 法测定还原糖含量。以沸水浴 10 min 失活的酶液作为对照。酶活定义: 在本文的测定条件下每分钟内生成 1 微摩尔还原性糖所需要的酶量。

#### 5.3.9 pH 对菊粉水解酶酶活及稳定性的影响

不同 pH 对菊粉水解酶酶活影响的测定: 不同 pH 梯度下, 50℃ 反应 30 min。pH 稳定性定义: 调节菊粉水解酶粗酶液的柠檬酸缓冲溶液到不同的 pH 值下, 于 20℃ 保温 24 h 后测定其酶活, 即为残余酶活。

#### 5.3.10 温度对菊粉水解酶酶活及稳定性的影响

不同温度对菊粉水解酶酶活的影响: 于不同温度梯度(30、35、40、45、50、55、60、65、70℃)下, pH 5.0, 其他条件相同, 反应 30 min 后沸水浴 10min 以终止反应。菊粉水解酶的温度稳定性定义: 将菊粉水解酶粗酶液于 0.1 M (pH 5.0) 的柠檬酸缓冲溶液中在不同的温度梯度(30、35、40、45、50、55、60、65、70℃)下保温 1 h, 然后再测定其酶活, 即为残余酶活。

#### 5.3.11 蛋白质含量的测定

蛋白浓度的测定采用 Bradford 法, 用牛血清蛋白(BSA)作为标准。用柠檬酸缓冲溶液 0.1 M (pH 5.0) 为溶剂配制 1 mg/mL 的 BSA 标准溶液。比酶活定义为每毫克粗蛋白中的酶活单位水平。

#### 5.3.12 菊粉水解酶亚细胞分布

*T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的分布: 胞外菊粉水解酶即发酵液上清中的

酶活。胞内及周质空间酶活测定：细胞沉淀重悬于 pH 7.0 的提取缓冲液(50 mM 磷酸钠、10 mM DTT 和 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA)中以提取周质空间中的菊粉水解酶。添加 80 μL/mL 氯仿、40 μL/mL 10.0% SDS 并剧烈振荡 10 s，即可得到胞内菊粉水解液酶。按上述方法测定各部分菊粉水解酶酶活。

### 5.3.13 菊粉水解酶的纯化

采用琼脂糖 Sephadex G-100 (瑞典 GE Healthcare)纯化菊粉水解酶。Sephadex G-100 凝胶柱安装的操作方法依据 Guo 等(2013)进行<sup>[302]</sup>。

缓慢搅拌溶胀后的 Sephadex G-100 琼脂糖凝胶直至呈均匀溶液状态，放置几分钟后将上层漂浮的凝胶随上清液一起倒出，再取适量的 0.1 M (pH 5.0)的柠檬酸缓冲液补加进去，如此反复重复几次，直至上清液中不再有漂浮的凝胶为止。加入新的 0.1 M (pH 5.0)柠檬酸缓冲液缓慢搅拌均匀。将层析柱下端夹子打开让液体流出，以保证层析柱内没有气泡后再夹住出口。将凝胶充分搅拌至呈悬浊液为止，沿层析柱内壁倒入层析柱内。当层析柱下部形成约 5~10 cm 高度的凝胶后打开夹子让柠檬酸缓冲液流出同时继续缓慢加入凝胶悬浊液，确保凝胶床面上有连续的凝胶累积。若凝胶床面上不再有凝胶颗粒下降时用玻璃棒轻轻地将凝胶搅起约 5 cm 的高度，再加入凝胶悬浊液，以防止分层现象的发生。如果层析柱内出现气泡则需要重新装柱。

层析柱装好之后，静置 20 min。将装有洗脱液的瓶子与层析柱顶端入口连接。用至少 2 倍体积的 0.1 M (pH 5.0)柠檬酸缓冲液平衡柱子，流速为 1.0 mL/min。注意在洗脱过程中要保持层析柱内的压力稳定。

菊粉水解酶粗酶液经 0.45 μm 滤膜过滤，取 3 mL 粗酶液沿着层析柱内壁加入，同时确保胶床平面的完整而不被破坏，静置 15-20 min 后开始洗脱，流速 1.0 mL/min。以 A280nm 吸光值来表征蛋白浓度。每 2 mL 洗脱液为一个洗脱样品，并测定每个样品的酶活，剩余样品经冷冻干燥后添加等体积的超纯水后进行 SDS-PAGE 电泳。

### 5.3.14 SDS-PAGE

菊粉水解酶的 SDS-PAGE 采用 10% 聚丙烯酰胺凝胶。分离胶与浓缩胶配置如表 5-1。

表 5-1 SDS-PAGE 凝胶配制  
Table 5-1 SDS-PAGE gel preparation

	Separation gel	Stacking gel
H <sub>2</sub> O	4	2.1
30% Polyacrylamide	3.3	0.5
1.5 M Tris (pH 8.0)	2.5	0.38
10% SDS	0.1	0.03
10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	0.1	0.03
TEMED	0.004	0.003

## 5.4 结果与讨论

#### 5.4.1 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶的发现

以葡萄糖、果糖、蔗糖和菊粉为底物的合成培养基培养 *T. cutaneum* ACCC 20271，不同底物的代谢情况、菌体生长及微生物油脂生产性能如图 5-1 所示。以菊粉为底物，在不添加任何外源菊粉水解酶的条件下，*T. cutaneum* ACCC 20271 菌体干重及油脂产量分别为 9.29 g/L、2.45 g/L。菊粉中葡萄糖、果糖的含量分别为 10.32%、5.83% (w/w)，培养基中菊粉的浓度为 25 g/L，即培养基中葡萄糖、果糖的浓度分别为 2.58 g/L、1.45 g/L。经测定发酵期间菊粉的消耗量为 20.50 g/L，远大于菊粉中所包含的单糖(葡萄糖、果糖)总量。说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 具有生产、分泌菊粉水解酶的能力，并能利用菊粉进行胞内油脂累积。

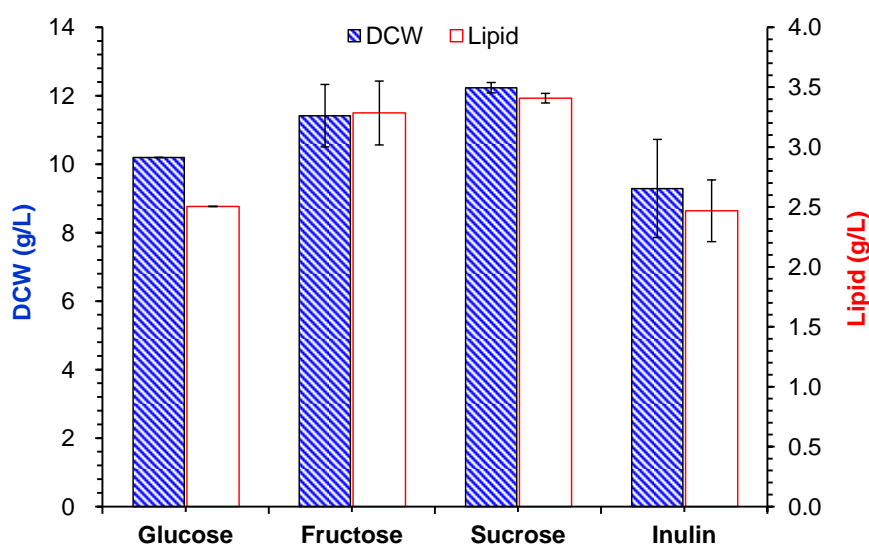


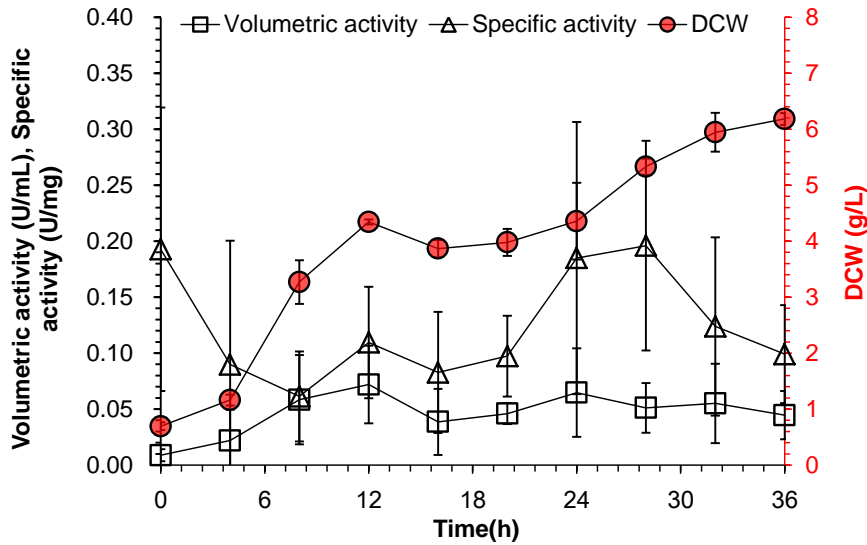
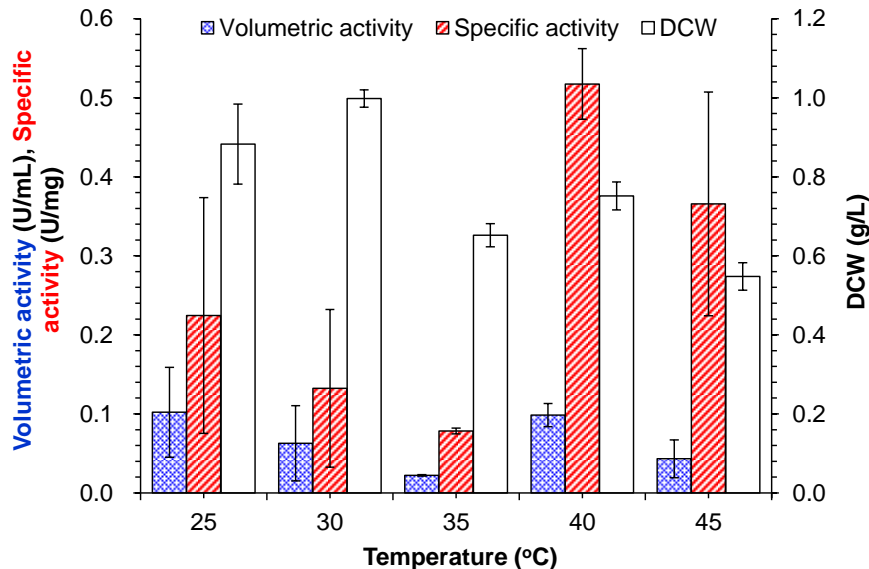
图 5-1 不同碳源对 *T. cutaneum* ACCC 20271 微生物油脂生产的影响

Figure 5-1 Effects of different carbon sources on microbial lipid production by *T. cutaneum* ACCC 20271

#### 5.4.2 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶生产特性

为研究 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶的生产特性及最适生产条件。首先考察了 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶的生产曲线，随后考察了温度、pH、氮源、碳源及菊粉浓度对 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶生产条件的影响。

(a) *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶酶活在前 8 h 的培养过程中缓慢上升，而在随后的时间内则基本保持不变 (5-2 所示)。12 h 时酶活最高，为 0.0719 U/mL；28 h 时比酶活最高，为 0.1960 U/mg (粗蛋白)。

图 5-2 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶生产曲线Figure 5-2 Time course of inulin hydrolysis enzyme(s) production in *T. cutaneum* ACCC 20271图 5-3 温度对 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶生产的影响Figure 5-3 Effects of temperature on the inulin hydrolysis enzyme(s) production in *T. cutaneum* ACCC 20271

(b) 温度不仅是酶活的重要影响因素，并且对于酶的生产也有至关重要的决定性。由图 5-3 可知，于温度 25°C 时 *T. cutaneum* ACCC 20271 的菊粉水解酶酶活最高，为 0.120 U/mL；而 40°C 时比酶活最高，为 0.517 U/mg（粗蛋白）。在较高温度(40~45°C)条件下菌体干重明显降低，因此在实际的发酵生产中要综合考虑发酵温度与酶生产温度，才能尽可能实现产量最大化。

(c) 研究中发现无论初始 pH (3~6.5) 为多少，培养 24 h 后 *T. cutaneum* ACCC 20271 发酵液的 pH 均降至 2.0~3.0 之间。由图 5-4 可知，相对于较低的 pH 值来讲，弱酸性的 pH (5.5~6.5) 更宜于菌体的生长。初始 pH 6.0 时酶活、比酶活均最高，分别为 0.273 U/mL、0.388 U/mg（粗蛋白）。故弱酸性的初始 pH 更有利于该菌株菊粉水解酶的生产。

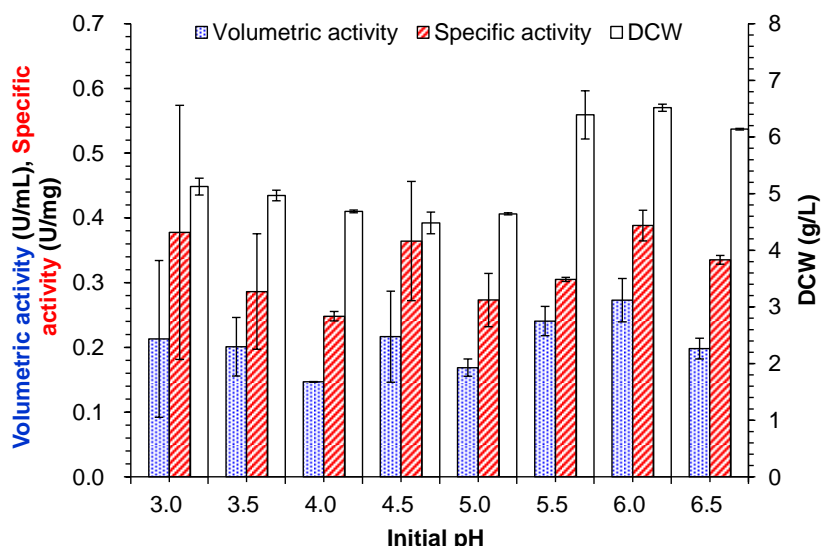


图 5-4 初始 pH 对 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶生产的影响

Figure 5-4 Effects of initial pH on the inulin hydrolysis enzyme(s) production in *T. cutaneum* ACCC 20271

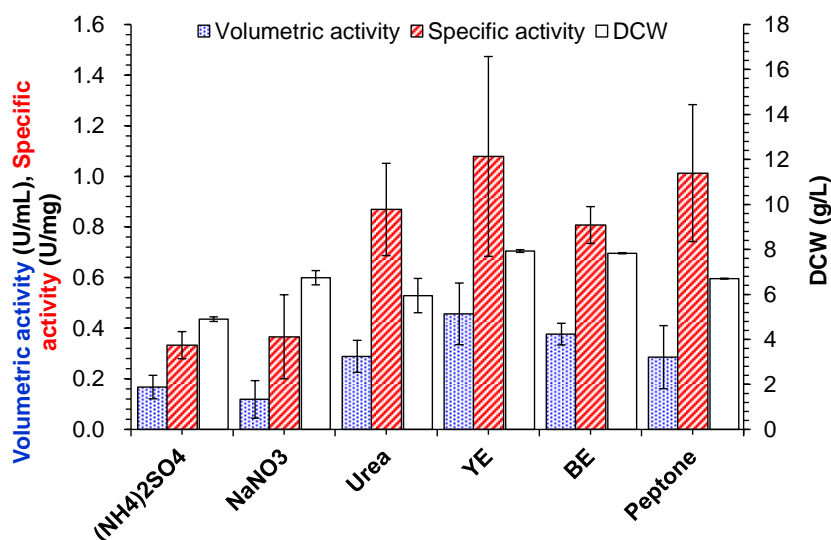


图 5-5 不同氮源对 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶生产的影响

Figure 5-5 Effects of different nitrogen sources on the inulin hydrolysis enzyme(s) production in *T. cutaneum* ACCC 20271

(d) 氮是酶的重要构成元素。图 5-5 表明有机氮源 YE、蛋白胨及牛肉膏条件下 *T. cutaneum* ACCC 20271 的细胞生长及菊粉水解酶优于无机氮源  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{NaNO}_3$  条件下的，尤其是当 YE 作为氮源时菌体干重、菊粉水解酶酶活及比酶活均最高，分别为 7.930 g/L、0.457 U/mL、1.079 U/mg（粗蛋白）。而无机氮源中，尿素是相对较优异的一种氮源，菊粉水解酶酶活及比酶活分别为 0.289 U/mL、0.870 U/mg（粗蛋白），均高于  $\text{NaNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的。

(e) 据文献报道，不同的碳源对菊粉酶的生产具有显著的影响作用<sup>[305]</sup>。图 5-6 表明葡萄糖、果糖、蔗糖利于 *T. cutaneum* ACCC 20271 的细胞生长，而乳糖、淀粉及菊粉有利于 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解液酶的生产，尤其是在以乳糖为碳源时，菊粉水

解酶的酶活、比酶活分别为 0.271 U/mL、0.569 U/mg (粗蛋白)。说明乳糖存在时更有利于激活 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶基因的转录、表达等。相反在以葡萄糖或果糖等单糖为底物时, 菊粉水解酶的酶活仅为 0.076 U/mL、0.080 U/mg (粗蛋白)。说明单糖并不能激活菊粉水解酶编码基因的转录、表达。但是在以单糖、二糖为底物时菌体干重却高于聚多糖的, 可能是由于水解这些聚多糖的酶的酶活较低所致, 如果能够提高菊粉水解酶的酶活也许能够得以改善。所以, 如何提高 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶的酶活也是该菌株利用菊粉、菊芋等原料实现工业化大规模生产油脂的重要问题。

(f) 图 5-7 表明伴随菊粉浓度升高 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶的比酶活反而降低, 在 20 g/L 菊粉时, 其菊粉水解酶比酶活最高, 为 1.0226 U/mg (粗蛋白)。说明高浓度的菊粉并不利于 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶的生产。

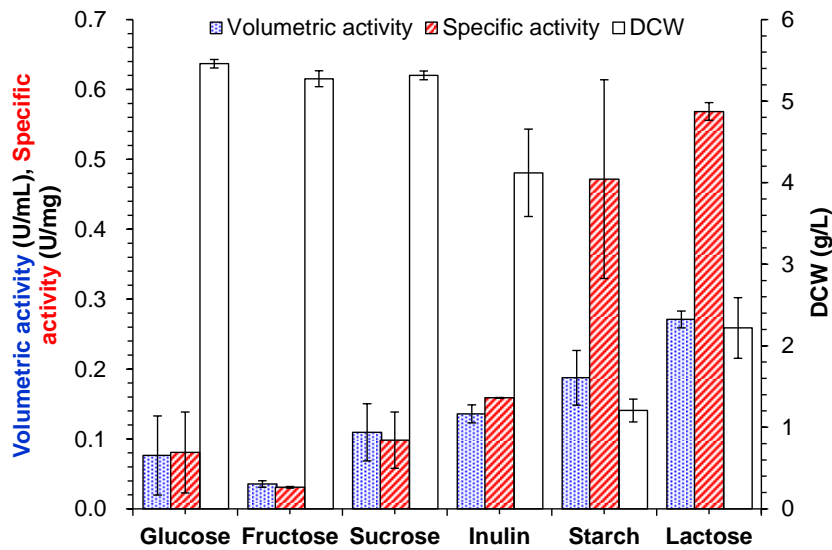


图 5-6 不同碳源对 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶生产的影响

Figure 5-6 Effects of different carbon sources on the inulin hydrolysis enzyme(s) production in *T. cutaneum* ACCC 20271

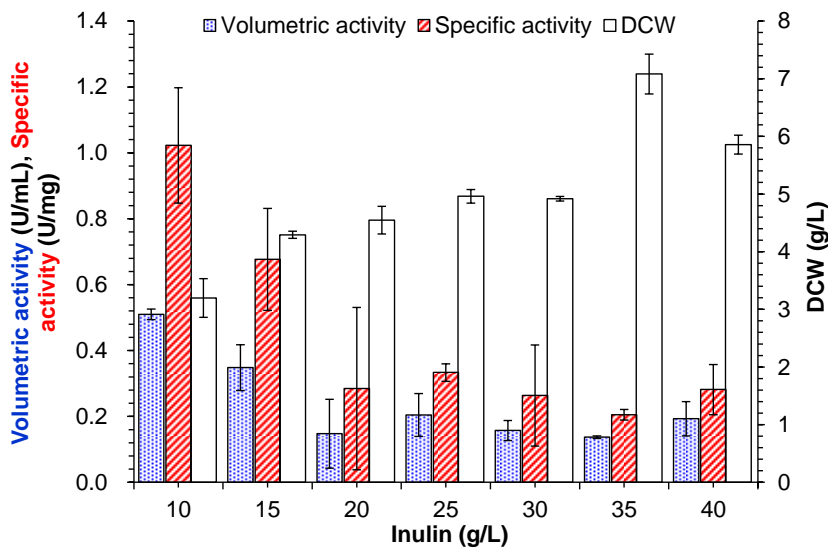


图 5-7 不同菊粉浓度对 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶生产的影响

Figure 5-7 Effects of inulin concentration on the inulin hydrolysis enzyme(s) production in *T. cutaneum* ACCC 20271

### 5.4.3 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶特性

通过分析 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶粗酶液, 以望更深入的了解 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的基本特性, 为 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用菊粉或含菊粉原料的微生物油脂生产而提供理论基础。

#### 5.4.3.1 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶的分布

由图 5-8 可知 *T. cutaneum* ACCC 20271 中有 56.45% 的菊粉水解酶分布于周质空间和胞外, 而胞内含量为 43.55%。表明 *T. cutaneum* ACCC 20271 中大部分的菊粉水解酶是可分泌到菊粉容易接触到的周质空间或胞外的, 以便其功能发挥。而 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉酶有 43% 分布于周质空间中, 胞外含量是微量的<sup>[302]</sup>。相比之下 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶在胞外与周质空间酶活所占比例高于 *S. cerevisiae* DQ1。*T. cutaneum* ACCC 20271 的菊粉水解酶仍有 43.55% 存留于胞内, 可能是由于其致密的细胞壁结构所导致的<sup>[306]</sup>。据 Rouwenhorst 等报道 *K. marxianus* CBS 6556 中的菊粉酶的分泌过程受细胞壁结构的影响, 于磷酸钾缓冲液(50 mM pH 7.0)的培养过程中另外添加巯基乙醇及二硫苏糖醇可明显提高其分泌率<sup>[307]</sup>。所以改变 *T. cutaneum* ACCC 20271 的细胞壁结构, 也许可提高其菊粉水解酶的分泌到胞外的含量。

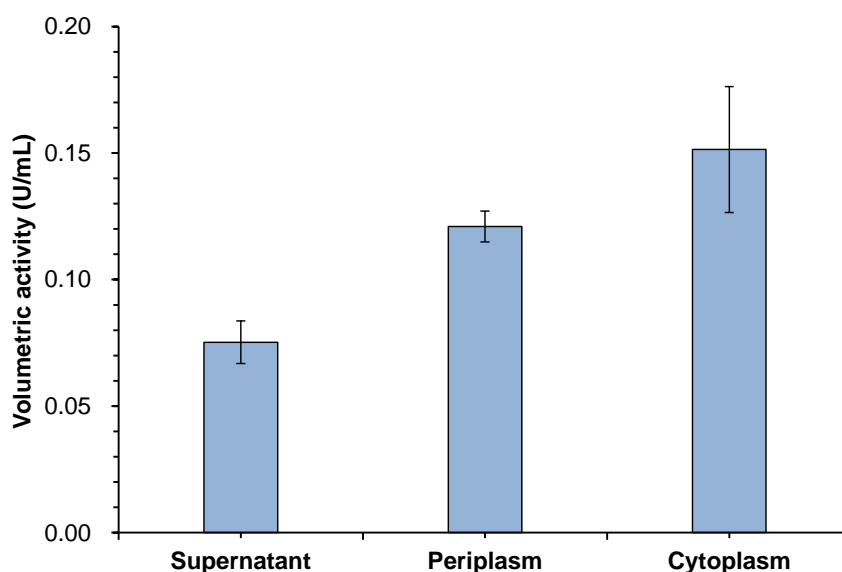


图 5-8 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶亚细胞分布

Figure 5-8 Subcellular distribution of inulin hydrolysis enzyme(s) activity in *T. cutaneum* ACCC 20271

#### 5.4.3.2 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶最适温度及温度稳定性

从图 5-9 可知 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的最适温度为 55℃。30~55℃ 时其酶活是逐步升高的, 于 55℃ 时达到其最高值, 0.121 U/mL, 但是当温度继续升高时反而降低。随温度升高, 其稳定性是逐步降低的。

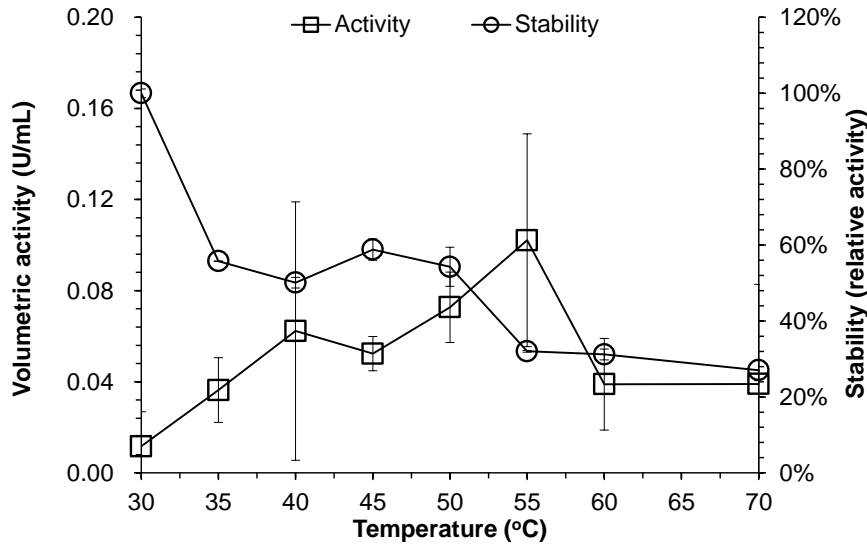


图 5-9 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶最适温度及温度稳定性

Figure 5-9 Effect of temperature on inulin hydrolysis enzyme(s) activity in *T. cutaneum* ACCC 20271

#### 5.4.3.3 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶最适 pH 及 pH 稳定性

由图 5-10 可知, pH 3.5~4.5 范围内其酶活基本保持稳定, pH 4.5~5.5 时酶活逐步升高, 于 pH 5.5 时升高至最高点 0.484 U/mL。而 pH 3.5~5.5 之间其稳定性是逐步升高的, 而当 pH 值继续升高时其稳定性是显著降低的。

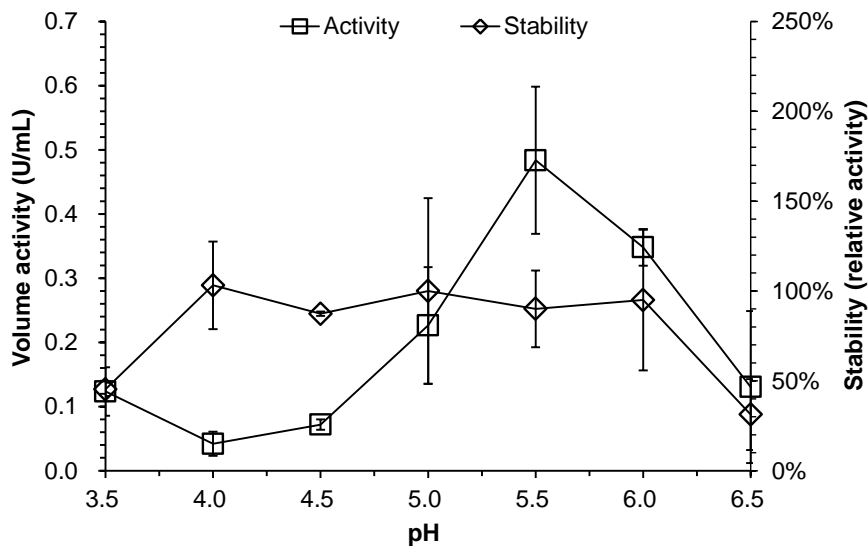


图 5-10 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶最适 pH 及 pH 稳定性

Figure 5-10 Effect of pH on inulin hydrolysis enzyme(s) activity in *T. cutaneum* ACCC 20271

#### 5.4.3.4 不同酵母中菊粉水解酶的比较

共选取 3 株乙醇生产酵母菌株、4 株油脂酵母菌株进行比较, 结果如图 5-11a 所示, *K. marxianus* 酵母粗酶液中的菊粉水解酶酶活最高, 为 15.053 U/mL, 其次为 *S. cerevisiae* DQ1 (12.677 U/mL)。在所考察的 4 株油脂酵母中, 由于 *Y. lipolytica* 中并没有编码菊粉水解酶的基因<sup>[51]</sup>而作为对照, *R. toruloides* 粗酶液中菊粉水解酶酶活最高为, 1.037 U/mL,

其次为 *T. cutaneum* (0.179 U/mL), 而 *R. glutinis* 中的菊粉水解酶酶活是相当低的, 如图 5-11b 所示。乙醇生产酵母中菊粉水解酶的酶活明显高于油脂酵母中的。*T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶酶活、比酶活分别比 *K. marxianus* 中的低 84、115 倍。故可知 *T. cutaneum* ACCC 20271 中较低的菊粉水解酶酶活也是限制其利用菊粉生产油脂的一重要因素。所以建立 *T. cutaneum* 的分子遗传操作平台, 表达外缘菊粉水解酶基因也是未来 *T. cutaneum* ACCC 20271 整合生物加工菊粉生产微生物油脂的重要内容。基于其乙醇生产菌株优良的菊粉利用能力, 已有关于乙醇发酵的整合生物加工。

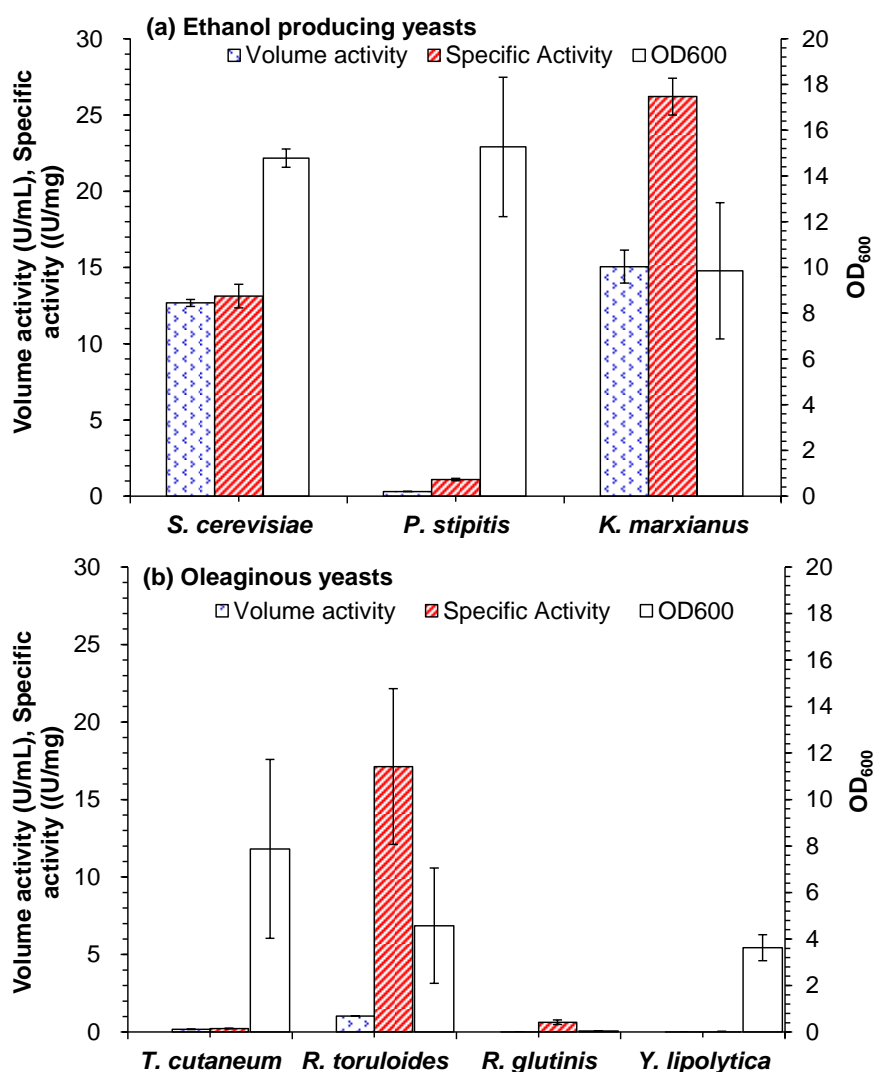


图 5-11 不同酵母来源菊粉水解酶的比较

(a) 乙醇生产酵母; (b) 油脂酵母

Figure 5-11 Comparison of inulin hydrolysis enzyme(s) among different yeast strains

(a) Ethanol producing yeast; (b) oleaginous yeast

#### 5.4.3.5 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶的纯化

收集 *T. cutaneum* ACCC 20271 的粗酶液, 经 Sephadex G-100 柱子纯化。洗脱过程如图 5-12a 所示, 有 3 个明显的蛋白吸收峰, 但是只有第三个峰对应的样品具有菊粉水

解酶的酶活。收集该部分的洗脱液进行 SDS-PAGE, 结果如图 5-12b 所示, 仅有 1 个约 60 kDa 的蛋白条带。据文献报道,  $\beta$ -呋喃果糖苷水解酶家族<sup>[308]</sup>, 如菊粉酶(EC 3.2.1.80、EC 3.2.1.7)<sup>[309]</sup>、果聚糖蔗糖酶(EC 2.4.1.10)<sup>[310]</sup>、果聚糖酶(EC 3.2.1.65)<sup>[311]</sup>、转化酶(EC 3.2.1.26)<sup>[312]</sup>均具备菊粉水解的能力。

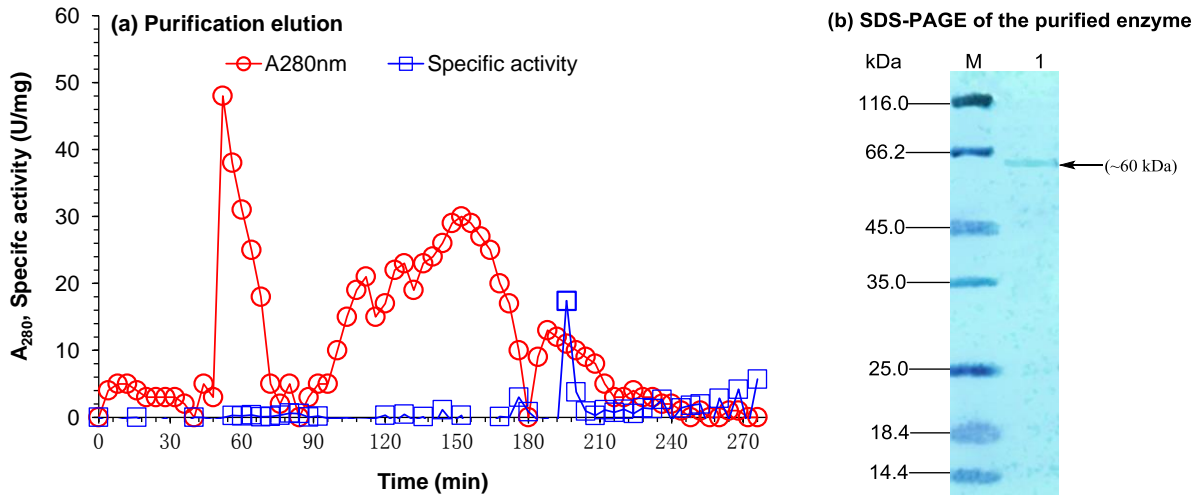


图 5-12 *T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶的纯化

(a) Sephadex G-100 层析柱纯化洗脱图; (b) 菊粉水解酶 SDS-PAGE 电泳图, 泳道 M: 蛋白 Markers (116 kDa), 泳道 1: 纯化后的菊粉水解酶

Figure 5-12 Purification of inulin hydrolyzing enzyme(s) in *T. cutaneum* ACCC 20271

(a) Purification with Sephadex G-100; (b) SDS-PAGE of the inulin hydrolysis enzyme, Lane M: Marker (116 kDa), Lane 1: purified inulin hydrolysis enzyme

#### 5.4.3.6 菊粉水解酶编码基因

结合基因组注释信息及 NCBI 比对结果, 发现 *T. cutaneum* ACCC 20271 中  $\beta$ -果糖苷酶(EC. 3.2.1.26, Trcu\_01547)与 *Sacharomyces ercevisiae* 转化酶(SUC)、*Kluyveromyces marxianus* 菊粉酶(INU1)、*Meyerozyma guilliermondii* 外切菊粉酶(INUE)等其他酵母中菊粉水解酶的相似性最高, 分别为 37%、39%、35%。故推测 *T. cutaneum* ACCC 20271 中发挥菊粉水解酶功能的酶为  $\beta$ -果糖苷酶(EC. 3.2.1.26, Trcu\_01547), 该酶有 515 个氨基酸构成, 理论的分子量为 56.65 kDa, 与经 Sephadex G-100 凝胶柱纯化分析、SDS-PAGE 得到的目的条带大小 (60 kDa) 结果相符。在 SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)数据库分析, 第 1-18 位氨基酸为信号肽序列。

#### 5.4.4 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用菊粉生产微生物油脂的条件优化

##### 5.4.4.1 不同氮源对 *T. cutaneum* ACCC 20271 微生物油脂生产的影响

在所选用的 4 种氮源与不添加氮源的情况下, *T. cutaneum* ACCC 20271 的菌体生长与菊粉消耗情况是极为相似的, 如图 5-13 所示。相比其他氮源, 尿素对 *T. cutaneum* ACCC 20271 具有微弱的促进的作用。发酵 120 h 后以尿素为氮源时 *T. cutaneum* ACCC 20271 的菌体干重及油脂产量分别为 11.06 g/L、2.62 g/L, 其次为蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 。

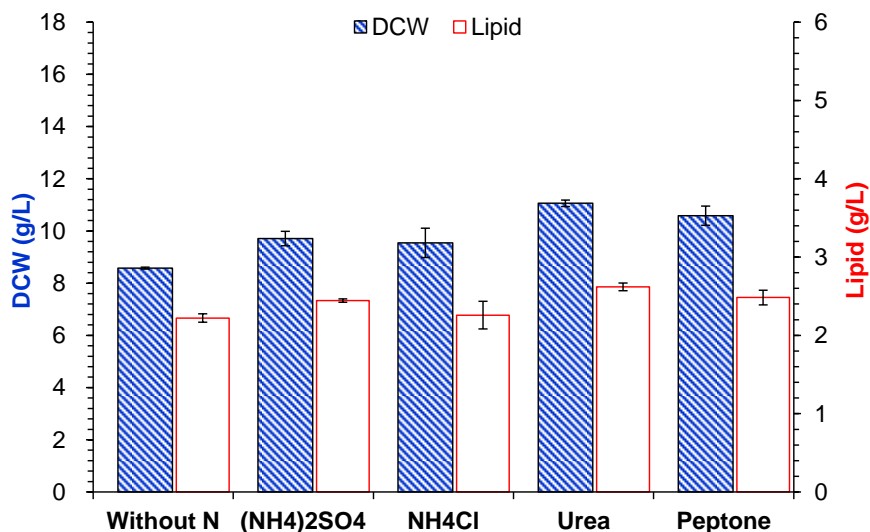


图 5-13 不同氮源对 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用菊粉生产微生物油脂的影响

Figure 5-13 Effects of different nitrogen sources on the microbial lipid production of *T. cutaneum* ACCC 20271 using inulin

#### 5.4.4.2 初始 pH 对 *T. cutaneum* ACCC 20271 微生物油脂生产的影响

如图 5-14 所示, 初始 pH 对 *T. cutaneum* ACCC 20271 微生物油脂生产的影响并不明显。当初始 pH 5.0 时油脂产量最高为 2.75 g/L, 而当 pH 6.0 时菌体干重值最高为 11.32 g/L。

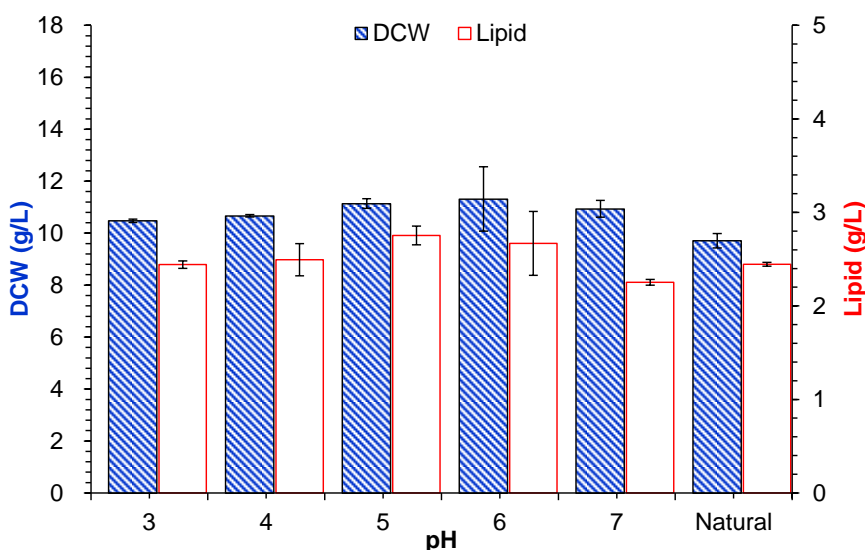


图 5-14 初始 pH 对 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用菊粉生产微生物油脂的影响

Figure 5-14 Effects of pH on the microbial lipid production by *T. cutaneum* ACCC 20271 using inulin

#### 5.4.4.3 菊粉浓度对 *T. cutaneum* ACCC 20271 微生物油脂生产的影响

菊粉浓度 10~50 g/L 时, 发酵 120 h 后 *T. cutaneum* ACCC 20271 菌体干重及油脂产量随菊粉浓度上升而明显提高, 但是当菊粉浓度再进一步上升的情况下, 菌体干重及油脂产量只有微弱提高 (图 5-15)。并且当菊粉浓度为 50 g/L 时, *T. cutaneum* ACCC 20271 菌体含油率最高, 为 0.370 g/g。所以在随后的实验中采用 50 g/L 的菊粉浓度。

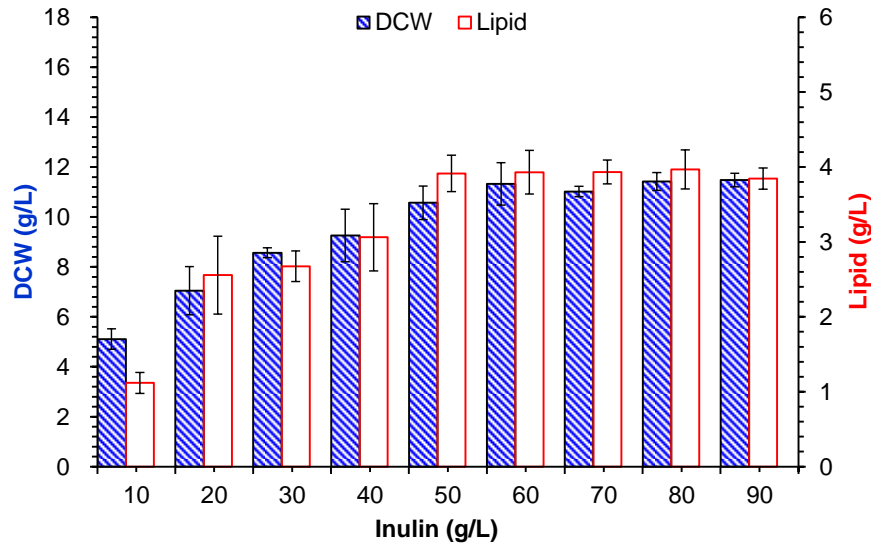
图 5-15 菊粉浓度对 *T. cutaneum* ACCC 20271 微生物油脂生产的影响

Figure 5-15 Effects of inulin concentration on the microbial lipid production by *T. cutaneum* ACCC 20271

#### 5.4.4.4 不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对 *T. cutaneum* ACCC 20271 微生物油脂生产的影响

菊粉浓度为 50 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0 g/L, 即 C/N 比分别为 1100、550、183、137、110、73、55。如图 5-16 所示, 随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度升高, *T. cutaneum* ACCC 20271 菌体干重逐渐升高, 但是 2.0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  时却有微弱降低。说明过高的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度并不适宜菌体的生长。当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度 0.8 g/L, 即 C/N 为 137 时, 油脂产量最高, 为 4.79 g/L。当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度为 0.2 g/L 时, 菌体含油率最高, 为 0.336 g/g。

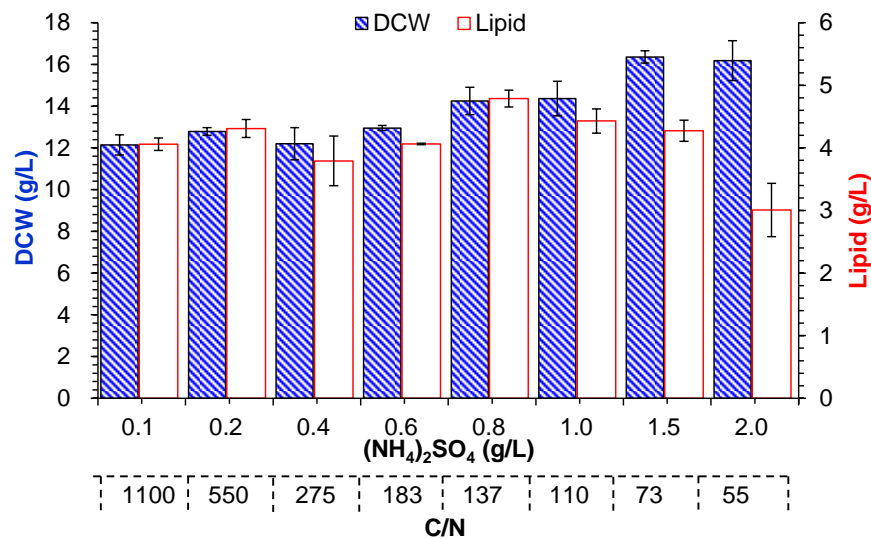
图 5-16 不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对 *T. cutaneum* ACCC 20271 油脂生产的影响

Figure 5-16 Effects of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration on the microbial lipid production of *T. cutaneum* ACCC 20271

## 5.4.4.5 微生物油脂组分

*T. cutaneum* ACCC 20271 利用菊粉发酵生产的微生物油脂, 经转酯化后, 通过气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分析其脂肪酸构成。微生物油脂中脂肪酸成分如表 5-2 所示, 由十四烷酸、十五烷酸、棕榈油酸、软脂酸、十七烷油酸、十七烷酸亚油酸、亚油酸、油酸、硬脂酸, 九种成分构成, 尤其是油酸的含量最高, 占总量的 69.13%, 其次为棕榈酸、硬脂酸、亚油酸, 其含量分别为 14.90%、8.21%、5.21%。该结果表明其组成与植物油相似。该油脂可用做生物柴油生产的原材料。这一结果与该酵母利用玉米芯残渣水解液生产的微生物油脂组分相似<sup>[73]</sup>。

表 5-2 *T. cutaneum* ACCC 2027 利用菊粉生产的微生物油脂脂肪酸成分Table 5-2 Fatty acid composition of the microbial lipid produced by *T. cutaneum* ACCC 20271 using inulin

Fatty acid		Percentage
Myristate	C14:0	0.13%
Pentadecanoate	C15:0	0.48%
Palmitoleate	C16:1	0.65%
Palmitate	C16:0	14.90%
Margaroleate	C17:1	0.26%
Margarate	C17:0	0.27%
Linoleate	C18:2	5.21%
Oleate	C18:1	69.13%
Stearate	C18:0	8.21%

## 5.5 小结

*T. cutaneum* ACCC 20271 具备直接利用菊粉的能力, 并且能够合成、分泌菊粉水解酶。所以 *T. cutaneum* ACCC 20271 具备整合生物加工菊粉生产微生物油脂能力。为菊粉、菊芋等原料的整合生物加工生产的开发、应用提供了坚实的理论基础。

(1) *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶随温度的升高稳定性逐步降低而 pH 对其稳定性并没有明显的影响。该酶的最适生产温度及酶活的最适温度分别为 25℃、55℃, 而菌株的生长温度为 30℃, 所以在实际生产中应综合考虑菌株的生长及菊粉水解酶的生产与最适温度。

(2) 相对于无机氮源来讲, YE 及蛋白胨更有利于 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的生产, 菊粉水解酶酶活分别达到 0.457、0.258 U/mL。*T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的生产受乳糖、淀粉的激活, 而低浓度(20 g/L)的菊粉下该酶的比酶活最高, 为 1.0226 U/mg(粗蛋白)。*T. cutaneum* ACCC 20271 菊粉水解酶的酶活比 *K. marxianus* 和 *S. cerevisiae* 分别低 84、79 倍。所以如何提高 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶酶活对于未来 *T. cutaneum* ACCC 20271 整合生物加工菊粉的发展来讲具有重要的现实意义。

(3) 通过比对发现尿素为氮源时 *T. cutaneum* ACCC 20271 油脂最高, 为 2.62 g/L。

高浓度的菊粉反而不利于油脂的生产, 50 g/L 菊粉浓度下 *T. cutaneum* ACCC 20271 的含油率达到 0.370 g/g。通过分析油脂的脂肪酸组分, 发现 *T. cutaneum* ACCC 20271 整合生物加工菊粉生产而得到的油脂可作为生物柴油生产的原材料。

## 第 6 章 结论与展望

### 6.1 结论与创新点

寻找新的可再生原料以替代淀粉、葡萄糖等商品原料以供微生物油脂生产是目前亟待解决的问题。木质纤维素生物质不但来源广泛并且价格低廉,是微生物油脂生物炼制最受青睐的原料。在预处理过程中生成的大量抑制物,势必会抑制发酵菌株的生长与生产。*T. cutaneum* ACCC 20271 高抑制物耐受性能使其成为纤维素油脂生产的优良菌株。本文中针对 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用玉米秸秆水解液生产微生物油脂的最大潜能进行了分析。经过详细分析发现 *T. cutaneum* ACCC 20271 表现出对 HMF、有机弱酸、酚类化合物较强的耐受能力,尤其是该菌株具备将甲酸、乙酸、香草醛、4-羟基苯甲醛终极降解,将糠醛、HMF、丁香醛降解为低毒的醇与酸的能力。通过基因组注释信息分析,发现该菌株中丰富的氧化还原酶类基因是其抑制物耐受及降解的基本保障。

经分析发现利用 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理成分复杂的纤维素乙醇发酵废水是可行的。经处理后纤维素乙醇发酵废水 COD 去除率为 55.05%,在一定程度上解决了环境问题。同时可累积一定量的微生物油脂,为纤维素乙醇工业的回收成本而言富有较大潜力。本研究为未来纤维素乙醇工业废水处理模型的建立奠定基础。

菊粉因广泛的来源、成分单一而成为近年来生物基化学品生产关注的焦点。菊粉不经任何处理,即可被 *T. cutaneum* ACCC 20271 直接利用生产微生物油脂,为菊粉及菊芋等高菊粉含量原料的整合生物加工提供理论支持。对 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的酶学特性进行分析,并进行纯化。

#### 6.1.1 结论

(1) *T. cutaneum* ACCC 20271 能够在玉米秸秆水解液体系中生长并累积油脂。分析了 *T. cutaneum* ACCC 20271 在玉米秸秆水解液中油脂生产的最大潜力。并利用该油脂进行生物柴油的合成,该生物柴油的指标达到中国生物柴油 BD100 标准(GB/T 25199-2010)和美国 ASTM 标准。分析了 *T. cutaneum* ACCC 20271 对木质纤维素来源抑制物的耐受性及降解能力。通过长期适应性培养的方式,可以进一步提高 *T. cutaneum* ACCC 20271 对木质纤维素来源抑制物的耐受能力。

(2) 对 *T. cutaneum* ACCC 20271 基因组进行了测序、组装、拼接、注释。对蛋白编码基因进行了预测。根据基因组注释,对 *T. cutaneum* ACCC 20271 的中心代谢、油脂代谢等路径进行了解读。针对脂肪酸合成主要底物乙酰-CoA、NADPH 的来源进行了分析。对 *T. cutaneum* ACCC 20271 中氮代谢路径进行了推测。

(3) 根据实验结果、基因组注释及相关文献报道对油脂酵母中的抑制物代谢路径进行了推测,并与其他三株油脂酵母 *R. toruloides* NP11、*Y. lipolytica* CLIB122、*T. oleaginis* IBC0246 进行比对、分析。与其他三株油脂酵母相比, *T. cutaneum* ACCC 20271 中含有大量的醇脱氢酶基因、醛还原酶基因及醛脱氢酶基因。

(4) *T. cutaneum* ACCC 20271 不但可以在乙醇发酵废水中生长、累积油脂还能降低废水的 COD 指标,表现出在处理废水方面的优良性能。提高溶氧水平,不但可以提高油脂产量还能够促进废水 COD 的降低。与酸性条件相比,中性 pH 更适宜于 COD 的降低。经 *T. cutaneum* ACCC 20271 处理后乙醇发酵废水 COD 值降低了 55.05%。所得到的油脂组分与植物油相似可作为生物柴油生产的原材料。

(5) 菊粉不需要水解即可被 *T. cutaneum* ACCC 20271 直接利用进行细胞生长及油脂累积,表明该菌株具有水解菊粉的能力,能够合成、分泌菊粉水解酶。经纯化后发现该酶大小约为 60 kDa。对 *T. cutaneum* ACCC 20271 中菊粉水解酶的酶学特性及其生产条件进行分析。以菊粉为底物,在 C/N 比为 137 时,*T. cutaneum* ACCC 20271 的油脂产量最高,为 4.79 g/L。该油脂主要由 C16、C18 碳链的脂肪酸构成,其中不饱和脂肪酸的含量为 76.1%,可以作为生物柴油生产的原料。

### 6.1.2 创新点

(1) 经研究发现 *T. cutaneum* ACCC 20271 具备利用木质纤维素生物质生产微生物油脂的能力,并具备进行大规模生产的潜能。由该油脂所合成的生物柴油符合中国 BD100 标准和美国 ASTM 标准,为基于木质纤维素微生物油脂的生物柴油的工业化生产奠定理论基础并提供可能。

(2) 通过实验、分析推测了 *T. cutaneum* ACCC 20271 的高抑制物耐受力 and 生物降解的可能机制,并通过全基因组测序对降解代谢在分子生物学层面进行了预测。

(3) 提出并测试了油脂发酵的方式降低纤维素乙醇发酵废水 COD 并产油脂的方法,为纤维素乙醇工业发酵废水的处理和成本回收提出了一个新的思路。

(4) 构建了以具有菊粉酶活性的 *T. cutaneum* ACCC 20271 为发酵菌株的整合加工菊粉生产微生物油脂的方法,大幅降低了菊粉生物质发酵微生物油脂的成本。

## 6.2 展望

本论文主要为降低微生物油脂生产成本寻找新的可再生的廉价原料为出发点展开。发现油脂酵母 *T. cutaneum* ACCC 20271 可利用木质纤维素生物质、乙醇发酵废水、菊粉来进行油脂发酵生产。发现并解决了一部分问题,并对某些现象与机理进行了合理的推测与解释。但是上述研究仍然存在一些工作有待于进一步的研究与探索。

(1) *T. cutaneum* ACCC 20271 不能在高固含量玉米秸秆水解液中进行生长及油脂生产,并且在脱毒玉米秸秆水解液中油脂产量为 8.57 g/L,并且发酵周期较长,所以可通过基因工程改造、诱变育种等方式来提高其产量及产率。

(2) *T. cutaneum* ACCC 20271 能够较好的耐受木质纤维素来源的抑制物,但是其机理及确切的代谢路径还不确定。可结合转录组、蛋白质组学等策略从多水平、多角度分析其抑制物耐受机制及油脂合成代谢状态。

(3) 研究中发现 *T. cutaneum* ACCC 20271 可利用木质素单体:香草醛、4-羟基苯甲醛等单体,故可对 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用木质素生产微生物油脂的潜力进行挖掘。

(4) 虽然 *T. cutaneum* ACCC 20271 具备合成、分泌菊粉水解酶的能力，但是该酶的酶活水平较低，所以可通过基因工程、代谢工程的策略提高该酶的酶活从而进一步提高油脂产量。



## 参考文献

- [1] Ahmad AL, Mat Yasin NH, Derek CJC, et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011, 15(1): 584-593.
- [2] Atabani AE, Silitonga AS, Badruddin JA, et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012, 16 (4): 2070-2093.
- [3] Himmel ME, Shi-You D, Johnson DK, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production[J]. *Science*, 2007, 315(5813): 804-807.
- [4] 刘波, 孙艳, 刘永红, 等. 产油微生物油脂生物合成与代谢调控研究进展[J]. *微生物学报*, 2005, 45(45): 153-156.
- [5] Hoekman SK, Broch A, Robbins C, et al. Review of biodiesel composition, properties, and specifications [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012, 16(1): 143-169.
- [6] 中国产业信息网 [EB/OL]. <http://www.chyxx.com/industry/201507/329535.html>, 2016.2.25.
- [7] Van Gerpen J, Shanks B, Pruszko R, et al. *Knothe Biodiesel production technology* National Renewable Energy Laboratory[R], Golden, USA, 2004.
- [8] Sims REH, Warren M, Saddler JN, et al. An overview of second generation biofuel technologies[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(6): 1570-1580.
- [9] Coltrain D. *Biodiesel: is it worth considering?* Presentation made at the risk and profit conference[D]. Kansas: Kansas State University, 2002.
- [10] Zhang Y, Dube M, McLean D, et al. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 89(1): 1-16.
- [11] Li Q, Du W, Liu DH. Perspectives of microbial oils for biodiesel production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(5): 749-756.
- [12] 藏妮. 生物燃料引领航空业绿色来来[J]. *世界环境*, 2009, 4: 31-32.
- [13] 汪继聪. 生物合成航空煤油环烷烃以及芳烃的研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2015.
- [14] Vardon DR, Sharma BK, Jaramillo H, et al. Hydrothermal catalytic processing of saturated and unsaturated fatty acids to hydrocarbons with glycerol for in situ hydrogen production[J]. *Green Chemistry*, 2014, 16(3), 1507-1520.
- [15] Popov S, Kumar S. Rapid Hydrothermal Deoxygenation of Oleic Acid over Activated Carbon in a Continuous Flow Process[J]. *Energy and Fuels*, 2015, 29(5): 3377.
- [16] Hollak SA, Ari ős MA, de Jong KP, et al. Hydrothermal Deoxygenation of Triglycerides over Pd/C aided by In Situ Hydrogen Production from Glycerol Reforming[J]. *ChemSusChem*, 2014, 7(4):1057-1062.
- [17] Sari E, Kim M, Salley SO, et al. A highly active nanocomposite silica-carbon supported palladium catalyst for decarboxylation of free fatty acids for green diesel production:

- Correlation of activity and catalyst properties[J]. *Applied Catalysis A: General*, 2013, 467(10): 261-269.
- [18] Na JG, Yi BE, Han JK, et al. Deoxygenation of microalgal oil into hydrocarbon with precious metal catalysts: Optimization of reaction conditions and supports[J]. *Energy*, 2011, 47(1): 25-30.
- [19] Shim JO, Jeong DW, Jang WJ, et al. Optimization of unsupported CoMo catalysts for decarboxylation of oleic acid[J]. *Catalysis Communications*, 2015, 67: 16.
- [20] 傅杰, 王元巧, 吴江华, 等. 一种以微藻油为原料低氢耗制备长链烷烃的方法[P]. 申请号: 201510051036.7.
- [21] 吕冬伟, 宋茜, 王旭晨. 小球藻和三角褐指藻中脂肪酸和长链烷烃组成的比较研究[J]. *海洋科学*, 2009, 33(5): 28-32.
- [22] 赵阳, 吴佳, 王宣, 等. 植物油加氢制备高十六烷值柴油组分研究进展[J]. *化工进展*, 2007, 26(10): 1391-1394.
- [23] Meng X, Yang JM, Xu X, et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms[J]. *Renewable Energy*, 2009, 34(1): 1-5.
- [24] 马艳玲. 微生物油脂及其生产工艺的研究进展[J]. *生物加工过程*, 2006, 4(4): 7-11.
- [25] Huang C, Zong MH, Wu H, et al. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(19): 4535-4538.
- [26] Donot F, Fontana A, Baccou JC, et al. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2014, 68(5): 135-150.
- [27] Zhang S, Skerker JM, Rutter CD, et al. Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 113(5): 1056-1066.
- [28] Oswald WJ, Golueke CJ. Biological transformation of solar energy[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 1960, 2(2): 223-262.
- [29] Liu ZY, Wang GC, Zhou BC. Effect of iron growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 99(11): 4717-4722.
- [30] Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(6): 841-846.
- [31] Huang GH, Chen F, Wei D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology[J]. *Applied Energy*, 2010, 87(1): 38-46.
- [32] Gao C, Wang Y, Shen Y, et al. Oil accumulation mechanisms of the oleaginous microalga *Chlorella protothecoides* revealed through its genome, transcriptomes, and proteomes[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 582.
- [33] Dunahay TG, Jarvis EE, Zeiler KG, et al. Genetic engineering of microalgae for fuel production[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1992, 34-35(1): 331-339.
- [34] Usui N, Ikenouchi M. Biological CO<sub>2</sub> fixation and utilization project by RITE (1) Highly-effective photobioreactor system[C]. *Energy Conversion and Management*, 1997, 38(suppl. 1): S487-S492.
- [35] Melis A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the

- chlorophyll antennae to maximize efficiency[J]. *Plant Science*, 2009, 177(4): 272-280.
- [36] Tredici MR. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution[J]. *Biofuels*, 2010, 1(1): 143-162.
- [37] 薛飞燕, 张栩, 谭天伟. 微生物油脂的研究进展及展望[J]. *生物加工过程*, 2005, 3(1): 23-27.
- [38] Alvarez HM, Steinbüchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(4): 367-376.
- [39] Zhang Q, Li YB, Xia LM. An oleaginous endophyte *Bacillus subtilis* HB1310 isolated from thin-shelled walnut and its utilization of cotton stalk hydrolysate for lipid production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 152-165.
- [40] Röttig A, Zurek PJ, Steinbüchel A. Assessment of bacterial acyltransferases for an efficient lipid production in metabolically engineered strains of *E. coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 32: 195-206.
- [41] Kalscheuer R, Stolting T, Steinbüchel A. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production[J]. *Microbiology*, 2006, 152(Pt9): 2529-2536.
- [42] Vicente G, Bautista L F, Rodríguez R, et al. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 48(1): 22-27.
- [43] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media[J]. *Bioresource Technology*, 2004, 95: 287-291.
- [44] Kikukawa H, Sakuradani E, Ando A, et al. Microbial production of dihomog- $\gamma$ -linolenic acid by  $\Delta 5$ -desaturase gene-disruptants of *Mortierella alpina* 1S-4[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 122(1): 22-26.
- [45] Ye C, Xu N, Chen H, et al. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*[J]. *BMC Systems Biology*, 2015, 9(1): 1-11.
- [46] Liu L, Pan A, Spofford C, et al. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*. [J] *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 36-45.
- [47] Poli JS, da Silva MA, Siqueira EP, et al. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 161(6): 320-326.
- [48] Tsigie YA, Wang CY, Kasim NS, et al. Oil Production from *Yarrowia lipolytica* Po1g Using Rice Bran Hydrolysate[J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 2012(8): 378-384.
- [49] Gajdoš P, Nicaud JM, Rossignol T, et al. Single cell oil production on molasses by *Yarrowia lipolytica* strains overexpressing DGA2 in multicopy[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(19): 8065-8074.
- [50] Lazar Z, Dulermo T, Neuvéglise C, et al. Hexokinase—A limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 26(26): 89-99.

- [51] Zhao CH, Cui W, Liu XY, et al. Expression of inulinase gene in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and single cell oil production from inulin-containing materials[J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(6): 510-517.
- [52] Yu X, Zheng Y, Dorgan KM, et al. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(10): 6134-6140.
- [53] Papanikolaou S, Aggelis G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 82(1): 43-49.
- [54] Li Y, Zhao ZK, Bai F, et al. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(3): 312-317.
- [55] Wu S, Hu C, Jin G, et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(101): 6124-6129.
- [56] Wang ZP, Fu WJ, Xu HM, et al. Direct conversion of inulin into cell lipid by an inulinase-producing yeast *Rhodospiridium toruloides* 2F5[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 161(3): 131-136.
- [57] Zhao X, Wu S, Hu C, et al. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2010, 37(6): 581-585.
- [58] Yang X, Jin G, Gong Z, et al. Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 91: 86-91.
- [59] Wang Q, G FJ, Rong YJ, et al. Lipid production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodospiridium toruloides* 21167 for biodiesel making[J]. *Renewable Energy*, 2012, 46(5): 164-168.
- [60] Zhao X, Peng F, Du W, et al. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(6): 993-1004.
- [61] Xie H, Shen H, Gong Z, et al. Enzymatic hydrolysates of corn stover pretreated by a N-methylpyrrolidone-ionic liquid solution for microbial lipid production[J]. *Green Chemistry*, 2012, 14(4): 1202-1210.
- [62] Huang XF, Liu JN, Lu LJ, et al. Culture strategies for lipid production using acetic acid as sole carbon source by *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 206: 141-149.
- [63] Liu Y, Wang Y, Liu H, et al. Enhanced lipid production with undetoxified corncob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 180: 32-39.
- [64] Yen HW, Yang YC, Yu YH. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*[J]. *Journal of Bioscience*

- and Bioengineering, 2012, 114(4): 453-456.
- [65] Peng W, Huang C, Chen XF, et al. Microbial conversion of wastewater from butanol fermentation to microbial oil by oleaginous yeast *Trichosporon dermatis*[J]. Renewable Energy, 2013, 55(C): 31-34.
- [66] Huang C, Chen XF, Xion L, et al. Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs[J]. Bioresource Technology, 2012, 110(2): 711-714.
- [67] Zhan J, Lin H, Shen Q, et al. Potential utilization of waste sweetpotato vines hydrolysate as a new source for single cell oils production by *Trichosporon fermentans*[J]. Bioresource Technology, 2012, 135(10): 622-629.
- [68] Mastsakas L, Sterioti AA, Christakopoulos P. Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807[J]. Industrial Crops and Products, 2014, 62: 367-372.
- [69] Liu JX, Yue QY, Gao BY, et al. Research on microbial lipid production from potato starch wastewater as culture medium by *Lipomyces starkeyi*[J]. Water Science and Technology a Journal of the International Association on Water Pollution Research, 2013, 67(8): 1802-1808.
- [70] Huang L, Zhang B, Gao B, et al. Application of fishmeal wastewater as a potential low-cost medium for lipid production by *Lipomyces starkeyi* HL[J]. Environmental Technology, 2011, 33(15-16): 1975-1981.
- [71] Huang X, Wang Y, Liu W, et al. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(20): 9705-9709.
- [72] Liu W, Wang Y, Yu Z, et al. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*[J]. Bioresource Technology, 2012, 118(4): 13-18.
- [73] Gao Q, Cui Z, Zhang J, et al. Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*[J]. Bioresource Technology, 2013, 152(1): 552-556.
- [74] Chen XF, Huang C, Yang XY, et al. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate[J]. Bioresource Technology, 2013, 143(6): 18-24.
- [75] Hu C, Wu S, Wang Q, et al. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4(1): 25.
- [76] Chen XF, Huang C, Xiong L, et al. Use of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) acid hydrolysate for microbial oil production by *Trichosporon cutaneum*[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2016, 46(7): 704-708.
- [77] Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production [J]. Progress in Lipid Research, 2009, 48(6): 375-387.
- [78] Tai M, Stephanopoulos G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production[J]. Metabolic Engineering,

- 2013, 15(1): 1-9
- [79] Qiao K, Imam Abidi SH, Liu H, et al. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 56-65.
- [80] Kavšček M, Bhutada G, Madl T, et al. Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*[J]. *BMC Systems Biology*, 2015, 9(1): 1-13
- [81] Blazeck J, Hill A1, Liu L, et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production[J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 149-168.
- [82] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2002, 51(51): 1-51.
- [83] Davis MS, Solbiati J, Cronan Jr JE. Overproduction of acetyl-CoA carboxy lase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (37): 28593-28598.
- [84] Li SJ, Cronan Jr JE. Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis [J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(2): 332-340.
- [85] Sendl A, Schliack M, Loser R, et al. Inhibition of cholesterol synthesis *in vitro* by extracts and isolated compounds prepared from garlic and wild garlic[J]. *Atherosclerosis*, 1992, 94 (1): 79-85.
- [86] Sasaki Y, Nagano Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68 (6): 1175-1184.
- [87] Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD. Fatty acid synthesis and elongation in yeast[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2007, 1771(3): 255-270.
- [88] Dyer JM, Mullen RT. Development and potential of genetically engineered oilseeds[J]. *Seed Science Research*, 2005, 15(4): 255-267.
- [89] Simon J, Marc L, Daniel B. Structure of fungal fatty acid synthase and implications for iterative substrate shuttling[J]. *Science*, 2007, 316(5822): 254-261.
- [90] Rock CO, Jackowski S. Forty years of bacterial fatty acid synthesis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 292(5): 1155-1166.
- [91] Lei W, Wei C, Yun F, et al. Genome Characterization of the Oleaginous Fungus *Mortierella alpine*[J]. *Plos One*, 2011, 6(12): e28319.
- [92] Subrahmanyam S, Cronan Jr JE. Overproduction of a functional fatty acid biosynthetic enzyme blocks fatty acid synthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(17): 4596-4602.
- [93] Rajakumari S, Grillitsch K, Daum G. Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast[J]. *Progress in Lipid Research*, 2008, 47(3): 157-171.
- [94] Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation[J]. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43(2): 134-176.
- [95] Cao Z, Gao H, Liu M, et al. Engineering the acetyl-CoA transportation system of

- Candida tropicalis* enhances the production of dicarboxylic acid[J]. *Biotechnology Journal*, 2006, 1(1): 68-74.
- [96] Athenstaedt K, Daum G. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 266(1): 1-16.
- [97] Murphy DJ, Vance J. Mechanisms of lipid-body formation[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(24): 109-115.
- [98] Kamisaka Y, Noda N, Sakai T, Kawasaki K. Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1999, 1438(2): 185-98.
- [99] Kamisaka Y, Nakahara T. Characterization of the diacylglycerol acyltransferase activity in the lipid body fraction from an oleaginous fungus[J]. *Journal of Biochemistry*, 1994, 116(6): 1295-1301.
- [100] Pillai MG, Certik M, Nakahara T, et al. Characterization of triacylglycerol biosynthesis in subcellular fractions of an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1998, 1393(1): 128-136.
- [101] Xue FY, Zhang X, Luo H, et al. A new method for preparing raw material for biodiesel production [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(7): 1699-1702.
- [102] Muniraj IK, Xiao L, Hu Z, et al. Microbial lipid production from potato processing wastewater using oleaginous filamentous fungi *Aspergillus oryzae*[J]. *Water Research*, 2013, 47(10): 3477-3483.
- [103] Ling J, Nip S, Toledo RAD, et al. Evaluation of specific lipid production and nutrients removal from wastewater by *Rhodospiridium toruloides* and biodiesel production from wet biomass via microwave irradiation[J]. *Energy*, 2015, 108: 185-194.
- [104] 周稳稳, 相会明, 刁红亮, 等. 圆红冬孢酵母利用生物乙醇废水-木薯粉水解液发酵产油[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(8): 1433-1441.
- [105] Li M, Liu GL, Chi Z, et al. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2010, 34(1): 101-107.
- [106] Apolinário AC, Pessoa A, A Converti A, et al. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 101(1): 368-378.
- [107] Li L, Wang Y, Du Y, et al. Biorefinery products from the inulin-containing crop Jerusalem artichoke [J]. *Biotechnology Lett*, 2013, 35(4): 471-477.
- [108] Chi Z, Zhang T, Cao TS, et al. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4295-4303.
- [109] Pandey A, Soccol CR, Selvakumar P, et al. Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 81(1): 35-52.
- [110] Zhao CH, Zhang T, Li M, Chi ZM. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa*

- TJY15a[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(7): 1121-1126.
- [111] 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(58): 308-312.
- [112] Zhao C, Chi Z, Zhang F, et al. Direct conversion of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke into single cell oil by co-cultures of *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a and immobilized inulinase-producing yeast cells[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(10): 6128-6133.
- [113] Chi Z, Chi Z, Zhang T, et al. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2009, 2(82): 211-220.
- [114] Marzena JK, Karolina LT, Stanislaw B. Identification of the Gene for  $\beta$ -Fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM10140T and Characterization of the Enzyme Expressed in *Escherichia coli*[J]. *Current Microbiology*, 2003, 6(46): 391-397.
- [115] Bo Y, Wang SA, Li FL. Improved ethanol fermentation by heterologous endoinulinase and inherent invertase from inulin by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 139(7): 402-405.
- [116] An K, Hu F, Bao J. Simultaneous saccharification of inulin and starch using commercial glucoamylase and the subsequent bioconversion to high titer sorbitol and gluconic acid[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2013, 8(171): 2093-2104.
- [117] Galindoleva LÁ, Hughes SR, Lópeznúñez JC, et al. Growth, ethanol production, and inulinase activity on various inulin substrates by mutant *Kluyveromyces marxianus* strains NRRL Y-50798 and NRRL Y-50799[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2016, 43: 1-13.
- [118] Pandey A, Soccol CR, Selvakumar P, et al. Recent developments in microbial inulinases. Its production, properties, and industrial applications[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 81(1): 35-52.
- [119] Vijayaraghavan K, Yamini D, Ambika V, et al. Trends in inulinase production-A Review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2009, 29(1): 67-77.
- [120] Schorr-Galindo S, Ghommidh C, Guiraud J P. Influence of yeast flocculation on the rate of Jerusalem artichoke extract fermentation[J]. *Current Microbiology*, 2000, 2(41): 89-95.
- [121] Dao TH, Zhang J, Bao J. Characterization of inulin hydrolyzing enzyme(s) in commercial glucoamylases and its application in lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers (Jat)[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 148(7): 157-162.
- [122] Liu XY, Chi Z, Liu GL, et al. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase[J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(5): 469-476.
- [123] Gao J, Xu H, Li Q, et al. Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce

- R, R-2,3-butanediol[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(18): 7087-7093.
- [124] Li D, Dai JY, Xiu ZL. A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(21): 8342-8347.
- [125] Lane MM, Morrissey JP. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2010, 1-2(24): 17-26.
- [126] Wang Y, Liu W, Bao J. Repeated batch fermentation with water recycling and cell separation for microbial lipid production[J]. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2012, 6(4): 453-460.
- [127] Wang S, Li F. Invertase SUC2 is the key hydrolase for inulin degradation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Environment Microbiology*, 2013, 1(79): 403-406.
- [128] Gomez LD, Steele-King CG, McQueen-Mason SJ. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls[J]. *New Phytologist*, 2008, 178(3): 473-485.
- [129] Bayer EA, Lamed R, Himmel ME. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(3): 237-245.
- [130] Lynd LR, Cushman JH, Nichols RJ, et al. Fuel ethanol from cellulosic biomass[J]. *Science*, 1991, 251(4999): 1318-1323.
- [131] Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 100(1): 10-18.
- [132] Pu Y, Hu F, Huang F, et al. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 15.
- [133] Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3(1): 275-277.
- [134] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept[J]. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2012, 38(4): 522-550.
- [135] Ademark P, Varga A, Medve J, et al. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a beta-mannanase[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 63(3): 199-210.
- [136] Zeng Y, Zhao S, Yang S, et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27(6): 38-45.
- [137] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9(9): 1621-1651.
- [138] Harwood CS, Parales RE. The  $\beta$ -ketoacid pathway and the biology of self-identity[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1996, 50(1): 553-590.
- [139] Kosa M, Ragauskas AJ. Bioconversion of lignin model compounds with oleaginous

- Rhodococci*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 891-900.
- [140] Fuchs G, Boll M, Heider J. Microbial degradation of aromatic compounds—from one strategy to four[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(11): 803-816.
- [141] Ayeni AO, Hymore FK, Mudliar SN, et al. Hydrogen peroxide and lime based oxidative pretreatment of wood waste to enhance enzymatic hydrolysis for a biorefinery: process parameters optimization using response surface methodology[J]. Fuel, 2013, 106(4): 187-194.
- [142] Harun MY, Dayang Radiah AB, Zainal Abidin Z, et al. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(8): 5193-5199.
- [143] He Y, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation[J]. Bioresource Technology, 2014, 158(4): 360-364.
- [144] Qureshi AS, Zhang J, Bao J. High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. Bioresource Technology, 2015, 189: 399-404.
- [145] Jönsson LJ, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects[J]. Bioresource Technology, 2015, 199: 103-112.
- [146] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol[J]. Biofuels Bioproducts and Biorefining, 2008, 2(2): 26-40.
- [147] Hu F, Ragauskas A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry[J]. Bioenergy Research, 2012, 5(4): 1043-1066.
- [148] Schell DJ, Riley CJ, Dowe N, et al. A bioethanol process development unit: initial operating experiences and results with a corn fiber feedstock[J]. Bioresource Technology, 2004, 91(2): 179-188.
- [149] Hu C, Zhao X, Zhao J, et al. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(4): 4843-4847.
- [150] Laadan B, Almeida JR, Radstroem P, et al. Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2008, 25(3): 191-198.
- [151] Kinoshita S, Kakizono T, Kadota K, et al. Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1985, 22(4): 249-254.
- [152] Wang X, Gao Q, Bao J. Transcriptional analysis of *Amorphotheca resinae* ZN1 on biological degradation of furfural and 5-hydroxymethylfurfural derived from lignocellulose pretreatment [J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8(1): 136.
- [153] Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 78(2): 172-178.

- [154] Banerjee N, Bhatnagar R, Viswanathan L. Inhibition of Glycolysis by Furfural in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1981, 11(11): 226-228.
- [155] Almeida JRM, Modig T, Petersson A, et al. Mini-Review Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, 82(4): 340-349.
- [156] Axe DD, Bailey JE. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 47(1): 8-19.
- [157] Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation[J]. *Yeast*, 1992, 8(7): 501-517.
- [158] Warth AD. Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54 (8): 2091-2095.
- [159] Pampulha ME, Loureiro-Dias MC. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989, 31(5): 547-550.
- [160] Russell JB. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, 73(5): 363-370.
- [161] Roe AJ, McLaggan D, Davidson I, et al. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(4): 767-772.
- [162] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, et al. Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolyzates of Spruce[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 77(1-3): 91-103.
- [163] Gong Z, Shen H, Zhou W, et al. Efficient conversion of acetate into lipids by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 189.
- [164] Zhang G, French WT, Hernandez R, et al. Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(1): 734-740.
- [165] Perez J, Munoz-Dorado J, de la Rubia T, et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview[J]. *International Microbiology*, 2002, 5(2): 53-63.
- [166] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 66(1): 10-26.
- [167] Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J, et al. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents[J]. *Trends in Biotechnology*, 1994, 12(10): 409-415.
- [168] Buchert J, Puls J, Poutanen K. The use of steamed hemicellulose as substrate in microbial conversions[J]. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 1989, 20(1): 309-318.

- [169] Gu H, Zhang J, Bao J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(9): 1770-1782.
- [170] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N-O, et al. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 77(1-3): 91-103.
- [171] Cavka A, Jönsson LJ. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates using sodium borohydride[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 136C(3): 368-376.
- [172] Pienkos PT, Zhang M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates[J]. *Cellulose*, 2009, 16(4): 743-762.
- [173] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: Review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, 31(1): 20-31.
- [174] He Y, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1):1-13.
- [175] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 74(1): 17-24.
- [176] Leonard RH, Hajny GJ. Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol[J]. *Industrial and Engineering Chemistry*, 1945, 37 (4): 390-395.
- [177] Nilvebrant NO, Reimann A, Larsson S, et al. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, 91-93(1): 35-49.
- [178] Converti A, Dominguez JM, Perego P, et al. Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production[J]. *Chemical Engineering and Technology*, 2000, 23(11): 1013-1020.
- [179] Alvira P. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015, 35(3): 1-13.
- [180] Wierckx N, Koopman F, Bandounas L, et al. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate[J]. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3(3): 336-343.
- [181] Koopman F, Wierckx N, de Winde JH, et al. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(11): 4919-4924.
- [182] Zhang D, Ong YL, Li Z, Wu JC. Biological detoxification of furfural and 5-hydroxyl methyl furfural in hydrolysate of oil palm empty fruit bunch by *Enterobacter* sp. FDS8[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 72(2):77-82.
- [183] Hunter WJ, Manter DK. Pre-treatment step with *Leuconostoc mesenteroides* or *L. pseudomesenteroides* strains removes furfural from *Zymomonas mobilis* ethanolic

- fermentation broth[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 169(5): 162-168.
- [184] Liu ZL, Slininger PJ, Gorsich SW. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 124(1-3): 451-460.
- [185] Huang C, Wu H, Smith TJ, et al. *In vivo* detoxification of furfural during lipid production by the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(9): 1637-1642.
- [186] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3(47): 26.
- [187] Lopez MJ, Nichols NN, Dien BS, et al. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(1):125-131.
- [188] Ran H, Zhang J, Gao Q, et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 1-12.
- [189] Slininger PJ, Dien BS, Kurtzman CP, et al. Comparative lipid production by oleaginous yeasts in hydrolyzates of lignocellulosic biomass and process strategy for high titers[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(8): 1676-1690.
- [190] Chang YH, Chang KS, Lee CF, et al. Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corncob hydrolysate as carbon source[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2015, 72: 95-103.
- [191] Zeng J, Zheng Y, Yu X, et al. Lignocellulosic biomass as a carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 128C(1): 385-391.
- [192] Yu X, Zeng J, Zheng Y, et al. Effect of lignocellulose degradation products on microbial biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49: 457-465.
- [193] Ruan Z, Zanotti M, Zhong Y, et al. Co-hydrolysis of lignocellulosic biomass for microbial lipid accumulation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 110(4): 1039-49.
- [194] Jin M, Slininger PJ, Dien BS, et al. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges[J]. *Trends in Biotechnology*, 2014, 33(1): 43-54.
- [195] Chen X, Li Z, Zhang X, et al. Screening of Oleaginous Yeast Strains Tolerant to Lignocellulose Degradation Compounds[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 159(3): 591-604.
- [196] Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation[J]. *Nature Reviews, Genetics*, 2010, 11(11): 1-13.
- [197] Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques[J]. *New Biotechnology*, 2010, 27(4): S3.

- [198] Li R, Li Y, Fang X, et al. SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing[J]. *Genome Research*, 2009, 19(6): 1124-1132.
- [199] Hyten DL, Cannon SB, Song Q, et al. High-throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(5): 38-45.
- [200] Schulte JH, Marschall T, Martin M, et al. Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(17): 5919-5928.
- [201] Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells[J]. *Genome Research*, 2008, 18(4): 610-621.
- [202] Legendre M, Audic S, Poirot O, et al. mRNA deep sequencing reveals 75 new genes and a complex transcriptional landscape in Mimivirus[J]. *Genome Research*, 2010, 20(5): 664-674.
- [203] Matkovich SJ, Zhang Y, Van Booven DJ, et al. Deep mRNA sequencing for in vivo functional analysis of cardiac transcriptional regulators: application to Galphaq[J]. *Circulation Research*, 2010, 106(9): 1459-1467.
- [204] Yong X, Yan Z, Xu L, et al. Genome sequence of a microbial lipid producing fungus *Cryptococcus albidus* NT2002[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 223: 6-7.
- [205] Paul D, Magbanua Z, Arick M, et al. Genome Sequence of the Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* ATCC 204091[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(1): e00046-e00114.
- [206] Zhu Z, Zhang S, Liu H, et al. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Nature Communications*, 2012, 3(4): 1112.
- [207] Kourist R, Bracharz F, Lorenzen J, et al. Genomics and transcriptomics analyses of the oil-accumulating basidiomycete yeast *Trichosporon oleaginosus*: Insights into substrate utilization and alternative evolutionary trajectories of fungal mating systems[J]. *MBiology*, 2015, 6(4): 915-918.
- [208] Ries L, Pullan ST, Delmas S, et al. Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with *Aspergillus niger*[J]. *Bmc Genomics*, 2013, 14(1): 1-12.
- [209] Zhang Y, Ezeji TC. Transcriptional analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 to elucidate role of furfural stress during acetone butanol ethanol fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 69-75.
- [210] Yi X, Gu H, Gao Q, et al. Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment[J]. *Biotechnol for Biofuels*, 2015 8(1): 153.
- [211] Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19(3): 220-225.

- [212] Sakai S, Tsuchida Y, Okino S, et al. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(7): 2349-2353.
- [213] Wu ZY, Deng Y, Tan L, et al. Investigating the effects of two lignocellulose degradation by-products (furfural and acetic acid) on ethanol fermentations by six ethanologenic yeast strains[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(50): 8661-8666.
- [214] Chi Z, Zheng Y, Ma J, et al. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2011, 36(16): 9542-9550.
- [215] Mårtberg M, Neujahr HY. Transport and hydrolysis of disaccharides by *Trichosporon cutaneum*[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 168(2): 734-738.
- [216] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples[R]. NREL/TP-510-42623. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2008.
- [217] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. NREL/TP-510-42618[R]. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2008.
- [218] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, laboratory analytical procedure (LAP)[R]. Technical Report NREL/TP-510-42618. Golden, Colorado: NREL, 2008.
- [219] Adney B, Baker J. Measurement of Cellulase Activities, Laboratory Analytical Procedure (LAP)[R]. LAP-006. NREL: Golden, CO. 1996.
- [220] Ghose TK. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry, 2004, 59(2): 257-268.
- [221] Notley-McRobb L, Death A, Ferenci T. The relationship between external glucose concentration and cAMP levels inside *Escherichia coli*: Implications for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate cyclase[J]. Microbiology, 1997, 143 (Pt6)(6): 1909-1918.
- [222] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition[J]. Bioresource Technology, 2000, 74(1): 25-33.
- [223] Zhang J, Fang X, Zhu XL, et al. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture[J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35(5): 1906-1911.
- [224] Chen X, Huang C, Xiong L, et al. Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*[J]. Biotechnol Lett, 2012, 34(6): 1025-1028.
- [225] Knothe G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters[J]. Fuel Process Technology, 2005, 86(10): 1059-1070.
- [226] Refaat AA. Correlation between the chemical structure of biodiesel and its physical properties[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 200, 6(4): 677-694.

- [227] 司利增, 边耀璋, 张春化. 生物柴油特性分析与应用[J]. 小型内燃机与摩托车, 2006, 35(2): 31-34.
- [228] Kumar R, Singh S, Singh OV, et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(35): 377-391.
- [229] Barciszewski J, Siboska GE, Pedersen BO, et al. A mechanism for the in vivo formation of N6-furfuryladenine, kinetin, as a secondary oxidative damage product of DNA[J]. FEBS Letters, 1997, 414(2): 457-460.
- [230] Khan QA, Shamsi FA, Hadi S. Mutagenicity of furfural in plasmid DNA[J]. Cancer Letter, 1995, 89(1): 95-99.
- [231] Miller EN, Jarboe LR, Turner PC, et al. Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6132-6141.
- [232] Gorsich SW, Dien BS, Nichols NN, et al. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(3): 339-349.
- [233] Hristozova T, Gotcheva V, Tzvetkova B, et al. Effect of furfural on nitrogen assimilating enzymes of the lactose utilizing yeasts *Candida blankii* 35 and *Candida pseudotropicalis* 11[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 43(3): 284-288.
- [234] Barakat A, Monlau F, Steyer JP, et al. Effect of ligninderived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production[J]. Bioresource Technology, 2012, 104(1): 90-99.
- [235] Jing X, Zhang X, Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 159(3): 696-707.
- [236] Itoh M. Characteristics of a new catechol 1,2-oxygenase from *Trichosporon cutaneum* WY 2-2[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1981, 45(12): 2787-279.
- [237] Gong Z, Zhou W, Shen H, et al. Co-fermentation of acetate and sugars facilitating microbial lipid production on acetate-rich biomass hydrolysates[J]. Bioresource Technology, 2016, 207: 102-108.
- [238] Huang C, Wu H, Liu Z, et al. Effect of organic acids on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(1): 4.
- [239] Zhang J, Wang X, Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(6): 4480-4488.
- [240] Bernard D, David S, Gilles F, et al. Genome evolution in yeasts[J]. Nature, 2004, 430(6995): 35-44.
- [241] Loira N, Dulermo T, Nicaud JM, et al. A genome-scale metabolic model of the

- lipid-accumulating yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Bmc Systems Biology*, 2012, 6(1): 1-9.
- [242] Pan PC, Hua Q. Reconstruction and In Silico Analysis of Metabolic Network for an Oleaginous Yeast, *Yarrowia lipolytica*[J]. *Plos One*, 2012, 7(12): e51535.
- [243] Yang RY, Li HT, Zhu H, et al. Draft genome sequence of CBS 2479, the standard type strain of *Trichosporon asahii*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2012, 11(11): 1415-1416.
- [244] Yang RY, Li HT, Zhu H, et al. Genome sequence of the *Trichosporon asahii* environmental strain CBS 8904[J]. *Eukaryotic Cell*, 2012, 11(12): 1586-1587.
- [245] Cantarel BL, Korf I, Robb SM, et al. MAKER: an easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes[J]. *Genome Research*, 2008, 18(1): 188-196.
- [246] Holt C, Yandell M. MAKER2: an annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects[J]. *Bmc Bioinformatics*, 2011, 12(1): 251-254.
- [247] Boulton CA, Ratledge C. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: citrate lyase[J]. *Microbiology*, 1981, 127(1): 169-176.
- [248] Fakas S. Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2016. (In press)
- [249] Wasylenko TM, Ahn WS, Stephanopoulos G. The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 27-39.
- [250] Mishra P, Park GY, Lakshmanan M, et al. Genome-scale metabolic modeling and in silico analysis of lipid accumulating yeast *Candida tropicalis* for dicarboxylic acid production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(9): 1993-2004.
- [251] Subhash GV, Mohan SV. Sustainable biodiesel production through bioconversion of lignocellulosic wastewater by oleaginous fungi[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2015, 5(2): 215-226.
- [252] Evans CT, Ratledge C. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts[J]. *Journal of General Microbiology*, 1984, 130(130): 1693-1704.
- [253] Evans CT, Ratledge C. Influence of Nitrogen Metabolism on Lipid Accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14[J]. *Journal of General Microbiology*, 1984, 130(7): 1705-1710.
- [254] Botham PA, Ratledge C. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms[J]. *Journal of General Microbiology*, 1979, 114(2): 361-75.
- [255] Papanikolaou S, Beopoulos A, Koletti A, et al. Importance of the methyl-citrate cycle on glycerol metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Journal of Biotechnology*. 2013, 168(4): 303-314.
- [256] Morin N, Cescut J, Beopoulos A, et al. Transcriptomic analyses during the transition from biomass production to lipid accumulation in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27966.

- [257] Priefert H, Rabenhorst J, Steinbüchel A. Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(8): 2595-2607.
- [258] Anderson JJ, Dagley S. Catabolism of tryptophan, anthranilate, and 2,3-dihydroxybenzoate in *Trichosporon cutaneum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1981, 146(1): 291-297.
- [259] Matera I, Ferraroni M, Kolomytseva M, et al. Catechol 1,2-dioxygenase from the Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP: Quantitative structure/activity relationship and the crystal structures of native enzyme and catechols adducts[J]. *Journal of Structural Biology*, 2010, 170(3): 548-564.
- [260] Eduardo D, Ignacio JJ, Nogales J. Aerobic degradation of aromatic compounds[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(3): 431-442.
- [261] Almeida JR, Röder A, Modig T, et al. NADH- vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(6): 939-945.
- [262] Allen SA, Clark W, McCaffery JM, et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3: 2.
- [263] Nguyen TT, Kitajima S, Izawa S. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) for vanillin tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(3): 263-269.
- [264] Izawa S, Maeda K, Miki T, et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemical Journal*, 1998, 330 (2): 811-817.
- [265] Juhnke H, Krems B, Kötter P, et al. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress[J]. *Molecular and general genetics: MGG*, 1996, 252(4): 456-464.
- [266] González Siso MI, Freire Picos MA, Cerdá ME. Reoxidation of the NADPH produced by the pentose phosphate pathway is necessary for the utilization of glucose by *Kluyveromyces lactis* rag2 mutants[J]. *Febs Letters*, 1996, 387(1): 7-10.
- [267] Heer D, Heine D, Sauer U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-Dependent Reduction by at least two oxidoreductases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(24): 7631-7638.
- [268] Cunha JT, Aguiar TQ, Romani A, et al. Contribution of *PRS3*, *RPB4* and *ZWF1* to the resistance of industrial *Saccharomyces cerevisiae* CCUG53310 and PE-2 strains to lignocellulosic hydrolysate-derived inhibitors[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 191: 7-16.
- [269] Hoelsch K, Suehrer I, Heusel M, et al. Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability[J].

- Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(6): 2473-2481.
- [270] Martinez-Blanco H, Reglero A, Fenandez-Valverde M, et al. Isolation and characterization of the acetyl-CoA synthetase from *Penicillium chrysogenum*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(8): 5474-5481.
- [271] Ling J, Nip S, Shim H. Enhancement of lipid productivity of *Rhodospiridium toruloides* in distillery wastewater by increasing cell density[J]. Bioresource Technology, 2013, 146C(10): 301-309.
- [272] Melamane XL, Strong PJ, Burgess JE. Treatment of wine distillery wastewater: a review with emphasis on anaerobic membrane reactors[J]. South African Journal for Enology and Viticulture, 2007, 28(1): 25-36.
- [273] Xue F, Gao B, Zhu Y, et al. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(15): 6092-6095.
- [274] Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview[J]. Renewable Energy, 2012, 37(1):19-27
- [275] Zhao YB. Process design of wastewater treatment for the nrel cellulosic ethanol model[J]. Advanced Materials Research, 2013, 777, 365-369.
- [276] Luiz A, Handelsman H, Barton G, et al. Membrane treatment options for wastewater from cellulosic ethanol biorefineries[J]. Desalination and Water Treatment, 2014, 53(6): 1547-1558.
- [277] Liu J, Zhang C, Zhang G, et al. Reclaiming bioenergy from alcohol wastewater by upflow anaerobic solid reactor process and high value use of biogas[J]. International Conference on New Technology of Agricultural Engineering (ICAE 2011). 537-539.
- [278] 刘华, 孙丽娜, 陈锡剑, 等. 酒精废水处理及资源利用[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(4): 180-183.
- [279] Shi Z, Yuan J, Wang Z. Study on the treatment of cellulosic ethanol[J]. Journal of Environmental Science and Engineering, 2010, 4(1): 20-24.
- [280] 王宗华, 郑伟花. 纤维素乙醇废水处理研究与工程应用[J]. 工业水处理, 2012, 32(8): 88-91.
- [281] 张蕾, 郭宏山, 马荣华, 等. 纤维素乙醇废水的水质特性及处理工艺分析[J]. 当代化工, 2015, 44(4): 691-694.
- [282] Mosse KPM, Patti AF, Christen EW et al. Review: Winery wastewater quality and treatment options in Australia[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2011, 17(2): 111-122.
- [283] Zhou W, Wang W, Li Y, et al. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y2 in bioethanol wastewater and evaluation of biomass energetic yield[J]. Bioresource Technology, 2013, 127(1): 435-440.
- [284] Xiong L, Huang C, Li X, et al. Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation Wastewater Treatment by Oleaginous Yeast *Trichosporon cutaneum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(2): 1-9.
- [285] Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation

- substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent[J]. *Nature Protocol*, 2007, 2(4): 875-877.
- [286] Chen X, Huang C, Xiong L, et al. Oil production on wastewaters after butanol fermentation by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 118(8): 594-597.
- [287] Hall J, Hetrick M, French T, et al. Oil production by a consortium of oleaginous microorganisms grown on primary effluent wastewater[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2011, 86(1): 54-60.
- [288] Subhash GV, Mohan SV. Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus* sp. using corncob waste liquor as a substrate[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19): 9286-9290.
- [289] Yousuf A, Sannino F, Addorisio V, et al. Microbial Conversion of Olive Oil Mill Wastewaters into Lipids Suitable for Biodiesel Production[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(15): 8630-8635.
- [290] Schneider T, Graeff-Hänninger 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.
- [291] Meyer T, Edwards EA. Anaerobic digestion of pulp and paper mill wastewater and sludge[J]. *Water Research*, 2014, 65, 321-349.
- [292] Hess M, Antranikian G. Archaeal alcohol dehydrogenase active at increased temperatures and in the presence of organic solvents[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 77(5): 1003-1013.
- [293] Eggert MW, Byrne ME, Chambers RP. Kinetic involvement of acetaldehyde substrate inhibition on the rate equation of yeast aldehyde dehydrogenase[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 168(4): 824-833.
- [294] Patel SS, Walt DR. Substrate specificity of acetyl coenzyme A synthetase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(15): 7132-7134.
- [295] Mitsuoka T, Hidaka H, Eida T. Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora[J]. *Food*, 1987, 31(5-6): 427-436.
- [296] Baldini M, Danuso F, Turi M, et al. Evaluation of new clones of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for inulin and sugar yield from stalks and tubers[J]. *Industrial Crops and Products*, 2004, 428(1): 25-40.
- [297] Barthelemy C, Regeat F, Pourrat H. Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1991, 72(6): 491-494.
- [298] Razmovski RN, Sciban MB, Vucurovic VM. Bioethanol production from Jerusalem artichoke by acid hydrolysis[J]. *Romanian Biotechnological Letters*, 2011, 16(5): 6497-6503.
- [299] Guiraud JP, Bourgi J, Stervinou M, et al. Isolation of a respiratory-deficient *Kluyveromyces fragilis* mutant for the production of ethanol from Jerusalem artichoke[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, 29(7): 850-858.

- [300] Hu N, Yuan B, Sun J, et al. Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(5): 1359-1368.
- [301] Yuan WJ, Chang BL, Ren JG, et al. Consolidated bioprocessing strategy for ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces marxianus* under high gravity conditions[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1): 38-44.
- [302] Guo L, Zhang J, Hu F, et al. Consolidated bioprocessing of highly concentrated Jerusalem artichoke tubers for simultaneous saccharification and ethanol fermentation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(10): 2606-2615.
- [303] Singh RS, Sooch BS, Puri M. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1[J]. *Geosynthetics International*, 2007, 98(13): 2518-2525.
- [304] Wang GY, Chi Z, Song B, et al. High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22[J]. *Bioresource Technology*, 124(3): 77-82.
- [305] Singh RS, Dhaliwal R, Puri M. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(7): 1703-1707.
- [306] Depree J, Emerson GW, Sullivan PA. The cell wall of the oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139(9): 2123-2133.
- [307] Rouwenhorst RJ, Visser LE, Van Der Baan AA, Scheffers WA, Van Dijken JP. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(5): 1131-1137.
- [308] Olmea O, Chinea G, Beldarrain A, et al. Structural model for family 32 of glycosyl-hydrolase enzymes[J]. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, 1998, 3(33): 383-395.
- [309] Zhang LL, Tang MJ, Liu GL, et al. Cloning and characterization of an inulinase gene from the marine yeast *Candida membranifaciens* subsp. *flavinogenie* W14-3 and its expression in *Saccharomyces* sp. W0 for ethanol production[J]. *Molecular Biotechnology*, 2015, 57(4): 337-347.
- [310] Goldman D, Lavid N, Schwartz A, et al. Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase: an ordered microfibril structure of the enzyme promotes levan polymerization[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 47(283): 32209-32217.
- [311] Chaudhary A, Gupta LK, Gupata JK, et al. Purification and properties of levanase from *Rhodotorula* sp.[J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, 46(46): 55-61.
- [312] Ali S, Haq I. Kinetics of improved extracellular beta-D-fructofuranosidase fructohydrolase production by a derepressed *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 2(45): 160-167.



## 附录 I 仪器设备

仪器名称	型号	生产厂家
核酸蛋白质分析仪	Biomate 3S	美国 Thermo 有限公司
超纯水机	Milli-Q Synthesis	德国 Merck Millipore (美国) 公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化
隔水式恒温培养箱	DK-8D	上海一恒科学仪器
气浴摇床	HZ-9310KB	太仓华利达实验设备有限公司
旋转蒸发器	EYELA	上海大颜仪器设备有限公司
低温冷却循环泵	DLSB-10/20°	上海大颜仪器设备有限公司
高效液相色谱	LC-20AT 紫外检测器	日本岛津公司
高效液相色谱	LC-20AD 示差检测器	日本岛津公司
台式离心机	5415R	德国 Eppendorf 公司
蛋白电泳系统	EPS-300	美国伯乐生命医学产品有限公司
核酸电泳系统	EPS-100	上海天能科技有限公司
超声波清洗机	SB-5200D	宁波新芝生物科技
5 L 四联发酵罐	BIOTECH-4BG-5L	上海保兴生物设备工程有限公司
预处理蒸汽发生器	HX-36D-2.5	上海华征特种锅炉制造有限公司
螺带搅拌式预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工设备有限公司
磨浆机	DSX-32S	江苏启东市东盛化工机械厂
旋转蒸发器	N-1001	上海大研仪器有限公司
低温冷却循环泵	DLSB-10/20	上海鹰迪仪器设备有限公司
超高速离心机	J-26	美国 Beckman Coulter 有限公司
超低温冰箱	Forma-86C	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
pH 计	PHS-3C	上海仪电科学仪器股份有限公司
真空干燥箱	DZF-6050B	上海一恒科学仪器
水浴恒温摇床	HZ-9212S	江苏华利达
MQ-800 四球机	SGW-10G	济南恒旭试验机技术有限公司
粉碎机	SF	上海科太粉碎设备厂
分样筛	20-600 目	上海丰行筛网制造有限公司
自动灭菌锅	YXQ-LS-75SII	上海博迅实业有限公司

## 博士期间研究成果

### 已发表论文

1. **Juan Wang**, Qiuqiang Gao, Huizhan Zhang, Jie Bao\*. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. **Bioresource Technology**, 2016, 218:892-901. (对应本论文第二章)
2. **Juan Wang**, Qiuqiang Gao\*, Jie Bao\*. Genome sequence of *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271: An oleaginous yeast with excellent lignocellulose derived inhibitor tolerance. **Journal of Biotechnology**, 2016, 228:50-51. (对应本论文第三章)
3. **Juan Wang**, Qiuqiang Gao, Huizhan Zhang\*, Jie Bao\*. Characterization of Inulin Hydrolyzing Enzyme(s) in Oleaginous Yeast *Trichosporon cutaneum* in Consolidated Bioprocessing of Microbial Lipid Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2015, 177:1083-1098. (对应本论文第五章)

### 投稿中论文

1. **Juan Wang**, Mingshan Hu, Huizhan Zhang\*, Jie Bao\*. Cellulosic ethanol fermentation wastewater treatment and simultaneously microbial lipid accumulation by *Trichosporon cutaneum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2016. (对应本论文第四章)

### 学术会议论文

1. **Juan Wang**, Qiuqiang Gao, Jie Bao. Consolidated bioprocessing of microbial lipid production from inulin using *Trichosporon cutaneum*. **International Symposium on Biocatalysis and Biosynthetic Engineering 2013**, 2013, Shanghai, China. (Poster)
2. **Juan Wang**, Jie Bao. Direct utilization of inulin biomass for microbial lipid fermentation using *Trichosporon cutaneum*. **The fourth session of international seminar on Jerusalem artichoke**. 2014, Nanjing, China. (Oral presentation)
3. **Juan Wang**, Qiuqiang Gao, Jie Bao. Lignocellulose inhibitors tolerance and degradation by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. **21<sup>st</sup> Young Asian Biochemical Engineers' Community**, 2015, Seoul Korea. (Poster)

## 致谢

在本论文付梓之际，回首几年的博士学习生活，艰辛、收货并存。但更多的是自身的成长与进步。首先要感谢我的导师鲍杰教授、张惠展教授。在我的整个实验研究中鲍老师都倾入了大量心血，时刻关心科研的进展情况，尤其是在论文修改过程中投入了大量的时间与精力。此外与时的科研理念、缜密的科研思路一直引导我向前。鲍老师严谨的治学、科研态度让我受益匪浅，终身难忘。张惠展老师幽默风趣的教学方式以及广博的学识进一步加深了我对生物专业的热爱，受益匪浅。在以后的学习与生活中也要一直向鲍老师、张老师学习这种精神。在本人毕业之际表示衷心感谢！

高秋强老师尤其对本论文中基因组数据分析与整理方面给予了大量指导与帮助，高老师仔细、认真的态度让我受益颇多，于此再次表示感谢。另外需要特别感谢张建老师，对发酵实验的顺利进行提供了许多帮助，尤其是发酵罐的使用及玉米秸秆物料的整体分配及使用方面给予大量的帮助与指导。

感谢同窗好友张宏森、易霞同学对本人生活、学习、科研上的大量帮助。感谢崔振阳在微生物油脂实验操作方面提供了大量指导与帮助，带领我快速的进入了微生物油脂课题的学习中。感谢孟娇、肖艳秋两年来的陪伴，与你们相处的每一天都充满欢声笑语，能与你们做朋友是我最大收获之一。感谢王霞、张强、温经柏、姚瑞苗、韩昀身、邱忠洋、邵帅、刘刚、高小创等同学给予的大量帮助。同时感谢实验室其他同学在四年时间内对我的帮助、理解、宽容与鼓励，是你们的欢声笑语伴随着我每天的学习与成长。

感谢我的家人与朋友，是你们一直以来的关怀与鼓励激励着我勇往直前，并将在以后的日子里一直鼓舞着我的。你们是我今生奋斗永恒的动力，谢谢！

最后把我的感谢与祝福送给每一位关心、支持过我的人，愿你们一切如意！

王娟

2016年8月于上海

# 卷 内 备 考 表

## 本卷情况说明

本卷共      壹佰叁拾叁 页

立 卷 人 \_\_\_\_\_

检 查 人 \_\_\_\_\_

立卷时间 \_\_\_\_\_