

## 基于木质纤维素原料的产油脂酵母发酵研究

### 摘要

油脂原料短缺是生物柴油产业最主要的瓶颈。本论文以农作物秸秆类木质纤维素为原料,利用产油微生物油脂含量高、不受季节和气候限制、生产周期短、原料来源广泛、连续大规模生产等特点,利用诱变技术改造产油微生物菌株,并在极限低营养条件下进行产油脂发酵研究,以生产生物柴油所需要的油脂原料。本文选择了木质纤维素进行预处理和酶水解(糖化)后得到的水解液中所存在的七种主要降解产物作为油脂微生物发酵的典型抑制物,包括三种有机酸类抑制物乙酸、甲酸、乙酰丙酸,两种呋喃类抑制物糠醛、5-羟甲基糠醛,两种苯酚类衍生物香兰素和4-羟基苯甲醛。以上述七种典型抑制物为筛选压力,对十种最为重要的产油酵母菌进行了筛选,结果表明在所选择的产油酵母菌株中,以皮状丝胞酵母(*Trichosporon cutaneum*)对水解液中抑制物抗性最强的菌株。选取 *Trichosporon cutaneum* AS 2.1374 作为起始菌株,利用物理与化学诱变结合的方法,以苹果酸酶抑制剂芝麻酚作为筛选压力进行高通量筛选,获得了一株能够在水解液中高产的菌株 *Trichosporon cutaneum* CX2。酶学性质测定结果表明, *T. cutaneum* CX2 的苹果酸酶比活与起始菌株相比提高 1 倍。诱变前后在水解液中菌体含油量和含油率分别提高了 36.8% 和 56.2%。以 *T. cutaneum* CX2 为发酵菌株,在摇瓶和发酵罐中以极限低营养培养基和木质纤维素水解液为碳源进行了产油脂发酵,并对 pH、C/N、溶氧等发酵条件进行了优化和放大实验,获得了最大油脂得率的发酵条件。本文的研究结果为微生物油脂的工业化应用奠定了良好的基础。

**关键词:** 微生物油脂; *Trichosporon cutaneum*; 木质纤维素水解液; 诱变; 高通量筛选

## Fermentation researches of triacylglycerol lipid from lignocellulose by oleaginous yeasts

### Abstract

High cost of triacylglycerol lipid feedstock is the major barrier for commercial production of biodiesel. The fermentation of oleaginous yeasts for lipid production using lignocellulose biomass provides a practical option with high economic competitiveness which are the high yield of lipid; not suffering from seasons and climate; the short produce cycle; widespread feed stock and continuous full scale operation. Our lab used UV and LiCl induction to obtain the mutant strains, and produce lipid in cheap fermentation medium, such as fermentation waste fluents, lignocellulose hydrolysate without the addition of expensive fermentation ingredients. In this thesis, the typical oleaginous yeast strains were screened under the pressure of lignocellulose degradation compounds which are acetic acid, formic acid, levulinic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural, vanillin and hydroxybenzaldehyde for selection of the optimal strains tolerant to lignocellulose. *Trichosporon cutaneum* was found to be the most adopted strain to the lignocellulose degradation compounds. Then we used the method of UV and LiCl induction to obtain the mutant strains. After sesamol was added as an inhibitor of growth and lipid metabolism via its action on malic enzyme, we selected *Trichosporon cutaneum* CX2 in minimum nutritious medium and lignocellulose. The results of enzymology showed that specific activity the malic enzyme was 2 times as initial strain in *T. cutaneum* CX2. Before and after induction, the lipid in medium (g/L) and lipid in cells (wt. %) were increased by 36.8% and 56.2% in hydrolysate, respectively. Then the optimization of the composes in medium (C/N) and conditions of fermentation (pH, DO) in shake flask and 2L fermentor by *Trichosporon cutaneum* CX2 were carried out. The results paved the foundation for the industrial application of microbial lipid.

**Keywords:** microbial lipid; *Trichosporon cutaneum*; lignocellulose hydrolysate; mutagenesis; high through-out screen

## 目录

前言.....	1
第 1 章 文献综述.....	2
1.1 开发纤维素制生物柴油的意义.....	2
1.1.1 生物质能源概述.....	2
1.1.2 发展生物柴油的意义.....	3
1.1.3 生物柴油的发展现状.....	4
1.2 开发纤维素制微生物油脂对加快生物柴油发展的意义.....	5
1.2.1 产油微生物及微生物油脂概述.....	5
1.2.2 微生物油脂的研究历史.....	5
1.2.3 微生物油脂的生物合成与代谢调控机理.....	6
1.2.4 微生物油脂可能是未来生物柴油的重要油源.....	10
1.2.5 微生物油脂制生物柴油的展望.....	11
1.3 纤维素制微生物油脂基本原理和工艺.....	11
1.3.1 纤维素原料性质.....	11
1.3.2 纤维素制微生物油脂工艺.....	13
1.4 影响产油酵母及其所产油脂的因素.....	15
1.4.1 不同的碳源.....	15
1.4.2 不同的 C:N 比.....	15
1.4.3 不同的金属离子含量.....	16
1.4.4 发酵抑制物的影响.....	16
1.5 课题研究的意义与内容.....	16
第 2 章 材料与设备.....	18
2.1 材料与设备.....	18
2.1.1 菌种.....	18
2.1.2 实验试剂.....	18

2.1.3 培养基.....	20
2.1.4 实验仪器.....	20
2.2 培养方法.....	21
2.2.1 培养基制备方法.....	21
2.2.2 培养方法.....	21
2.3 分析方法.....	21
2.3.1 菌体浓度的测定.....	21
2.3.2 菌体干重的测定.....	21
2.3.3 菌体浓度和菌体干重的关系.....	22
2.3.4 油脂量的测定.....	22
2.3.5 油脂脂肪酸组成的测定.....	22
2.3.6 糖浓度和水解液中抑制物浓度的测定.....	23
2.4 酶水解工艺中木质纤维素的预处理.....	24
2.4.1 稀酸预处理的装置.....	24
2.4.2 稀酸预处理的实验步骤.....	25
2.4.3 蒸汽膨爆预处理.....	26
2.5 稀酸预处理后木质纤维素的酶水解.....	26
2.6 蒸汽膨爆预处理后木质纤维素的酶水解.....	26
2.7 苹果酸酶活的测定.....	27
第 3 章 实验结果.....	28
3.1 产油能力初筛.....	28
3.1.1 通过测定菌液吸光度(OD)生长测定曲线.....	28
3.1.2 通过测定菌干重(DCM)测定生长曲线.....	29
3.1.3 几种菌的产油情况.....	30
3.1.4 油脂脂肪酸组成分析.....	30
3.2 分别以葡萄糖和木糖为唯一碳源发酵.....	31
3.2.1 以葡萄糖为唯一碳源.....	31
3.2.2 以木糖为唯一碳源.....	32
3.3 木质纤维素降解产物对产油酵母菌生长的影响.....	32
3.3.1 有机酸.....	34
3.3.2 呋喃类物质.....	37
3.3.3 芳香类化合物.....	39

---

3.3.4	<i>T. cutaneum</i> 2.1374 在水解液中的发酵情况 .....	41
3.4	以芝麻酚为抗性筛选标志高通量筛选生物油脂高产菌株及其发酵情况 .....	43
3.4.1	以芝麻酚为抗性筛选标志高通量筛选生物油脂高产菌株 .....	43
3.4.2	在摇瓶中对最佳发酵条件进行优化 .....	45
3.4.3	合成培养基在 2L 发酵罐中对最佳发酵条件进行优化放大 .....	48
3.4.4	在 2L 发酵罐中对水解液的最佳发酵条件进行优化 .....	52
第 4 章 结论和展望 .....		56
参考文献 .....		58
攻读硕士期间发表的文章 .....		61
致 谢 .....		62



## 前言

随着化石资源日益减少和世界各国能源供应形势日趋严峻,通过工业微生物技术转化和利用以木质纤维素为主的可再生资源制备液体能源产品-生物柴油,已成为社会经济可持续发展的迫切要求。生物柴油具有能量密度高、含硫量低、燃烧充分、润滑性能好等液体能源产品所期望的优良性能,还具有可再生、易生物降解、储运安全、抗爆性好等特点,所以可作为优质的石化柴油代用品。成本问题是限制生物柴油广泛使用的最主要问题。以植物油脂为原料生产生物柴油,原料成本占总生产成本的70%~85%。可见,依靠植物油脂资源是制约生物柴油产业发展的瓶颈。只有降低成本,生物柴油才具广阔的商业化应用前景。

自然界中少量微生物在适宜条件下能将碳水化合物、碳氢化合物转化为油脂而大量贮存,具有这种表型的菌种称为产油微生物,菌体油脂含量最高可超过其干重的70%。产油微生物利用可再生资源,得到的微生物油脂与植物油脂具有相似的脂肪酸组成,有的还含有丰富的多不饱和脂肪酸,具有广阔的开发应用前景。利用微生物生产油脂具有油脂含量高、不受季节和气候限制、生产周期短、生产原料来源广泛、能连续大规模生产等特点,利用诱变技术和现代分子生物学技术,可以使微生物生产出更符合人们需要的油脂。

国外学者曾报道过产油微生物转化五碳糖为油脂的例子。产油微生物的这一特性尤其适用于木质纤维素全糖利用,这是目前燃料酒精产业还难以实现的。因此,微生物油脂是具有广阔前景的新油脂资源,可能在未来生物柴油产业中发挥重要作用。

为了获得用于制备生物柴油所用的油脂,本课题在十种产油酵母菌中以水解液中的抑制物为筛选压力,筛选出 *Trichosporon cutaneum* 2.1374 这样一株对水解液中抑制物抗性最强的菌株。之后利用物理与化学诱变结合的方法,在培养基中添加芝麻酚作为筛选压力高通量筛选获得一株能够在水解液中高产的菌株 *Trichosporon cutaneum* CX2。此后分别在 250ml 摇瓶和 2L 发酵罐中对最佳发酵条件进行优化和放大。获得了能够得到最大油脂得率的发酵条件,为微生物油脂的工业化应用打下了良好的基础。

## 第 1 章 文献综述

### 1.1 开发纤维素制生物柴油的意义

#### 1.1.1 生物质能源概述

能源是人类社会生存和发展的基石，是经济发展与文明进步的基本制约条件。化石能源是人类当前的主要能源，根据 BP 世界能源数据统计，2006 年全球能源消费结构中，石油占 35.8%、天然气占 23.7%，煤炭占 28.4%，核能占 5.8%，水力等占 6.3%。人类 400 年内，将地球 25 亿年的化石能源：石油、煤、天然气几乎耗尽，按目前探明储量和开采能力测算，煤炭、石油、天然气的可采年限世界平均水平分别是 230 年、45 年和 61 年。随着人口的增长和发展水平的提高，人类对能源的需求呈现急速增长的趋势。据统计，在 20 世纪初，全球对能源的需求量约每 50 年增长 1 倍，而在 20 世纪中叶，每 30 年增长 1 倍，到 20 世纪 80 年代，则每 15~20 年增长 1 倍。尤其是进入 21 世纪后，人类对能源需求量的增长速度已超出人们的想象能力。中国是能源资源严重短缺的国家，煤炭、石油、天然气的可采年限分别只有 80 年、15 年和 30 年，人均剩余可采储量仅是世界平均水平的 56.3%，7.7% 和 7.1%。随着经济的持续增长，我国的能源需求继续呈刚性增长趋势，能源出现严重不足<sup>[1-3]</sup>。

另一方面，大量使用矿物能源引起了严重的环境问题，由能源利用释放的温室气体占总排放量的 85%，造成了气候变暖、损害臭氧层、破坏生态圈碳平衡、释放有害物质、引起酸雨、海平面上升等一系列生态环境的明显改变。开发清洁的替代能源已成为人类社会必须加以解决的重大课题。

生物质能将是未来最重要的替代能源之一，其高效转换和洁净利用技术的开发与利用日益受到全世界的重视。

生物质是指任何可再生的或可循环的有机物质，包括所有的动物，植物和微生物以及由这些生命体排泄和代谢的所有有机物质。生物质能则是指直接或间接地通过绿色植物的光合作用，把太阳能以化学能的方式蕴藏在生物质内部的一种能量方式，是一种以生物质为载体的能量，是可再生的绿色能源。能够作为能源而被利用的生物质能统称为生物能源。生物质能一直是人类赖以生存的重要能源，仅次于煤炭、石油和天然气，居于世界能源消费总量的第 4 位，在整个能源系统中占有重要的地位。生物质能具有以下特点<sup>[4]</sup>：

- (1) 贮量丰富和可再生性，保证能源的永续利用；
- (2) 环保性，在生物质能源利用过程中显著降低了CO<sub>2</sub>排放，对减少温室效应有积极的意义，在利用转换过程中还可以减少硫化物，氮化物和粉尘等的排放；
- (3) 生物质能远具有普遍性，易取性，生产过程较为简单；
- (4) 可再生能源中，生物质是唯一可以储存与运输的能源；
- (5) 生物质具有分布分散，能量密度小，热值低和成分复杂等缺点。

目前，生物质能的研究已成为世界性的热门研究课题，许多国家制定了相应的开发研究计划。美国农业部投资16亿美元发展纤维乙醇，提出10年减免税收21亿美元的政策，并为企业担保20亿美元发展生物能源。2000年国会通过了“生物质研发法案”；2002年能源部和农业部提出了《生物能源和生物基产品发展规划》、《生物质技术路线图》，计划2020年使生物能达到能源总消费量的25%，2050年达到50%。欧盟2003年5月通过了《在交通领域促进使用生物燃料油或其他可再生燃料油的法案》，法案要求到2005年，欧盟成员国生物燃料应占燃料比重的2%，2010年后达到5.75%。为实现第7个发展计划框架，投资1亿欧元研究生物液体能源<sup>[5]</sup>。

开发生物质液化工艺对我国的意义更大。目前中国石油供应紧张问题日趋严重：2005年，中国原油消费量3.23亿t，居世界第二；国内生产原油1.81亿t，净进VI原油1.19亿t，净进口轻柴油、航煤、燃料油等石油产品1746万t。原油及石油产品净进口量1.46亿t。石油对外依存度为45%。估计2020年国内自产石油2.0亿t，缺口2.5亿t，对外依存度要达到55%。

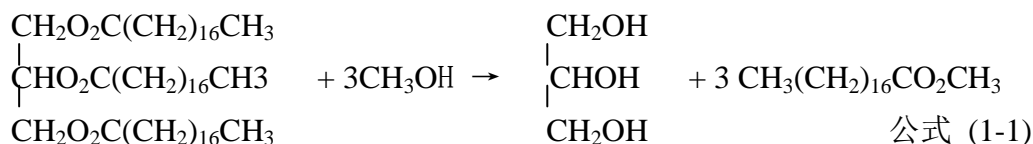
我国生物质能资源丰富，种类多，分布广且产量大，理论生物质能资源约有50亿t左右，是我国目前总能耗的4倍左右。主要来源于以下几个方面：农业废弃物，如各类秸秆、稻壳、蔗渣等；林业废弃物，如废木材、枝桠材、木屑等；工业废弃物，如造纸厂、家具厂、碾米厂、酿酒厂、糖厂和食品厂等的废料；生活垃圾，如城市生活垃圾；有机废水，如人畜粪便、城市污水、工业有机废水等废弃物；能源作物，如甘蔗、木薯、油菜、甜高粱等；能源植物，如速生林、芒草等。目前，可供开发利用的生物质能资源主要为生物质废弃物，包括秸秆等农业废弃物、林木生物质、畜粪、城市垃圾和城市废水等。随着农业、林业的发展，特别是我国有计划地研究开发各种速生能源作物和能源植物，生物质能资源的种类和产量将会越来越大，未来开发和利用潜力巨大<sup>[6]</sup>。

### 1.1.2 发展生物柴油的意义

随着化石资源日益减少和世界各国能源供应形势日趋严峻，通过工业微生物技术转化和利用以木质纤维素为主的可再生资源制备液体能源产品-生物柴油，已成为社会经济可持续发展的迫切要求。生物柴油是最重要的液体可再生能源产品之一，其化学成分主要为长链脂肪酸的低碳酯，通常为甲酯。生物柴油具有能量密度高、含硫量低、燃烧充分、润滑性能好等液体能源产品所期望的优良性能，还具有可再生、易生物降解、

储运安全、抗爆性好等特点，所以可作为优质的石化柴油代用品<sup>[7]</sup>。目前在美国、欧洲和亚洲的一些国家和地区已开始建立商品化生物柴油生产基地，并把生物柴油作为代用燃料广泛使用。

当前主要用化学法制备生物柴油，即高温下通过酸或者碱催化动植物油脂和甲醇或乙醇等低碳醇进行转酯化反应，生成相应的脂肪酸酯，再经洗涤干燥获得。以硬脂酸甘油酯和甲醇为原料，经转酯化反应制备生物柴油并联产甘油的方程式如下：



我国不仅化石资源短缺，而且在能源产品消费结构上也存在危机，尤其是液态燃料产品市场上柴油供需矛盾突出。业内人士指出，到2005年我国柴油产量预计虽可达到8千万吨，但仍缺口60~240万吨<sup>[8]</sup>。因此，加快开发柴油替代品对缓解我能源资源短缺和调整油品结构具有战略意义。

### 1.1.3 生物柴油的发展现状

生产生物柴油的原料在欧洲主要为菜籽油，而美国则主要利用大豆油。巴西政府于2003年重新启动生物柴油计划，发展以蓖麻籽油为原料的生物柴油技术。我国海南省正和生物能源有限公司经过长期努力，2001年在河北邯郸建成以回收废油、野生油料为原料年产1万吨生物柴油的试验厂，其技术和产品已于2002年10月通过了国家经贸委新产品技术鉴定<sup>[9]</sup>。

成本问题是限制生物柴油广泛使用的最主要问题。只有降低成本，生物柴油才具广阔的商业化应用前景。以植物油脂为原料生产生物柴油，原料成本占总生产成本的70%~85%<sup>[10-12]</sup>。可见，依靠植物油脂资源是制约生物柴油产业发展的瓶颈。而且目前的技术没有利用获取植物油脂时伴生的废弃生物质资源，如油料作物秸秆和炼油饼渣等。这些废弃生物质在质量上远远超过植物油脂，它们所蕴藏的能量也远远超过植物油脂所贮存的能量，如不充分开发利用，不仅造成潜在能源资源的巨大浪费，而且还滋生严重的生态环境问题。显然，当前生物柴油产业面临着生物质资源综合利用和发展新型廉价油源的双重压力。

根据国外经验，发展油料作物产业似乎可以为生物柴油提供原料。然而，我国现有耕地资源贫乏，可用来发展能源作物的耕地十分有限，依靠种植油料作物为生物柴油提供油源不符合我国国情。

## 1.2 开发纤维素制微生物油脂对加快生物柴油发展的意义

### 1.2.1 产油微生物及微生物油脂概述

在适宜条件下,某些微生物产生并贮存的油脂占其生物总量的20%以上,具有这样表型的菌株称为产油微生物。已知细菌、酵母、霉菌、藻类中都有能生产油脂的菌株,但以酵母菌和霉菌为主<sup>[13-15]</sup>。

微生物油脂又称单细胞油脂,是指由微生物在一定条件下产生并储存在菌体内的甘油酯,其脂肪酸组成与一般的植物油脂相似,仍以C<sub>16</sub>、C<sub>18</sub>系脂肪酸,如棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸为主。其他功能性脂肪酸,如亚麻酸(GLA)、花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)以及一些特殊脂肪酸则存在于一些变异株中。据文献报道,产油微生物菌体油脂含量可超过其细胞干重的70%,其中甘油三酯约占80%以上,磷脂约占10%以上<sup>[16]</sup>。

微生物发酵产油脂大体分两个阶段,即菌体增殖期和油脂积累期<sup>[17]</sup>。发酵的前期为细胞增殖期,这个时期微生物要消耗培养基中丰富的碳、氮源,以保持菌体旺盛的代谢和增殖过程。当培养基中碳源充足而某些营养成分(特别是氮源)缺乏时,菌体细胞分裂速度锐减,代谢活动转为以消耗碳源并合成和积累油脂为主,这个时期称为油脂积累期。在油脂积累期,微生物基本上不再进行细胞繁殖,而是将过量的碳水化合物转化为脂类。

### 1.2.2 微生物油脂的研究历史

利用微生物生产油脂的研究最早可追溯到第一次世界大战期间,当时德国曾准备利用内孢霉属(*Endomyces*)和单细胞藻类镰刀属(*Fusarium*)的某些菌种生产油脂以解决食用油匮乏问题。随后美国、日本等国也开始研究微生物油脂的生产。

第二次世界大战前夕,德国科学家筛选到了适于深层培养的菌种,并进行规模生产。后来发现利用微生物生产普通油脂成本太高,无法与动、植物来源的油脂相竞争。有关微生物油脂的探索此后一度集中在获取功能性油脂,如富含多不饱和脂肪酸的油脂。

近年来,随着现代生物技术的发展,已获得更多具有高产油能力或其油脂组成中富含稀有脂肪酸的产油微生物资源,提高了微生物产油的效率。日本、德国、美国等国目前已有商品菌油面市。同时,在油脂积累代谢调控的分子机制方面也取得了一些重要成果。更重要的是,随着人类社会资源压力和环境问题日益突出,通过微生物转化可再生资源生产油脂及其它相关代谢产品,部分替代化石资源,将是可持续发展的必然。因此,进一步探索有关微生物积累油脂具有重要的现实意义<sup>[18-20]</sup>。

由于微生物油脂过去常用昂贵的培养基生产,价格比动植物油脂高,所以开发重点主要集中在生产功能性油脂方面,如富含多不饱和脂肪酸的油脂。目前国内有关产油微

生物的研究主要是从生物化工的角度考察一些生产多不饱和脂肪酸的产油霉菌<sup>[21-22]</sup>。国际上对产油微生物甘油三酯生物合成和代谢调控机制的研究已取得了重要进展,例如已初步阐明了AMP脱氨酶、柠檬酸裂解酶、苹果酸酶等的活性变化与甘油三酯积累活动的关系<sup>[23]</sup>,但尚未见成功地通过基因调控手段增加细胞内油脂贮存含量的例子。

### 1.2.3 微生物油脂的生物合成与代谢调控机理

#### 1.2.3.1 微生物油脂的生物合成

生物合成TAG是在动、植物和微生物界广泛存在的多酶催化过程,属初级代谢的一部分。目前研究表明<sup>[24]</sup>,TAG的合成代谢中关键的两个中间产物是磷脂酸(PA)和甘油二酯(DAG)。酿酒酵母(*S. cerevisiae*)细胞中PA的合成与其他真核细胞中PA合成类似,存在两条合成途径,即甘油-3-磷酸(G-3-P)途径和磷酸二羟丙酮(DHAP)途径。甘油-3-磷酸途径通过其酰基转移酶(GAT)在 $sn$ -1位酰化,形成溶血磷脂酸(LPA)。同样地,DHAP在其相应的酰基转移酶(DHAPAT)催化下在 $sn$ -1位酰化,生成的1-acyl-DHAP被其还原酶(ADR)还原也生成LPA。最近在分子水平上研究TAG的生物合成时还发现,Gat1p和Gat2p均能以G-3-P和DHAP为底物,而表现为双重底物特性的 $sn$ -1位酰基转移酶。溶血磷脂酸在相应脂肪酰转移酶(AGAT)作用下在 $sn$ -2位酰化,形成PA。另外PA也可以磷脂为前体在磷脂酶D作用下生成。

磷脂酸在磷脂酸磷酸酶(PAP)作用下去磷酸化形成DAG,这是DAG形成的主要途径。另外,DAG也可由磷脂酶C催化水解磷脂得到。研究表明,DAG转化为TAG时的酰基转移反应并不是由单一的脂肪酰基转移酶完成的。酿酒酵母DAG酰化生成TAG主要有两个酶Dga1p和Lro1p参与催化,前者是标准的甘油二酯酰基转移酶(DAGAT),同TAG合成途径中另外两个酰基转移酶一样以脂肪酰CoA为酰基供体;后者则以卵磷脂为酰基供体,表现为磷脂:甘油二酯酰基转移酶(PDAT)的活性,将供体分子中 $sn$ -2位酰基转至TAG的 $sn$ -3位。最近的研究发现还有两个具有脂肪酰CoA:胆甾醇酰基转移酶(ACAT)活性的蛋白质Are1p和Are2p,可能也用脂肪酰CoA为酰基供体,参与DAG酰化反应。另外,放射性同位素标记实验发现酿酒酵母的微粒体成份能以DAG和游离脂肪酸为底物合成TAG。但到目前为止,尚未见分离或详细生物化学表征这种利用游离脂肪酸为酰基供体的酰基转移酶的报道。

关于产油酵母TAG合成多酶体系的研究工作直到最近才开始<sup>[25]</sup>。实验表明粘红酵母(*R. glutinis*)TAG合成多酶体系存在于细胞溶胶中,主要通过蛋白质间相互作用复合在一起。实验中分离出的多酶体系包含酰基载体蛋白(ACP)、酰基-ACP合成酶、AGAT、PAP和DAGAT。该多酶体系不仅能利用LPA和脂肪酰CoA合成TAG,而且还可接受游离脂肪酸,合成TAG及其相关中间体。有趣的是,后来还发现一个铁超氧化物歧化酶(FeSOD)也和TAG合成多酶体系复合在一起,其作用可能是防止底物(如不饱和脂肪酸)和多酶体系中的蛋白质受到活性氧化物的损害。EMS基因突变法使粘红酵母细胞溶胶TAG合成多酶体系失活,导致细胞生长和TAG生物合成速率下降。

可见, 微生物TAG的生物合成途径中仍然存在着许多富有挑战性的研究课题, 尤其对产油微生物TAG合成途径的研究还刚起步。比如, PA合成时不同途径的生理功能及其相互关系问题; TAG合成时两条主要途径的生理功能、相互关系以及其它旁路在甘油三酯生物合成代谢中的作用问题等。对这些问题的深入研究非常有利于将来在生产实践中应用产油微生物资源。

### 1.2.3.2 微生物油脂合成代谢调控

微生物高产油脂的一个关键因素是培养基中碳源充足, 其他营养成分, 特别是氮源缺乏。在这种情况下, 微生物不再进行细胞繁殖, 而是将过量的碳水化合物转化为脂类。虽然阐明从脂肪酰CoA合成TAG的途径在油脂合成中非常重要, 但该途径并不是产油微生物所特有的。事实上, 产油微生物对油脂积累的重要调控元件是有关脂肪酸合成的一些因素。

目前, 人们对产油酵母和产油霉菌利用葡萄糖为碳源积累TAG的代谢途径已有比较深入的认识, 图1.1简要说明了产油酵母中与TAG合成代谢调控相关的一些重要步骤<sup>[26]</sup>。当产油微生物培养基中可同化氮源耗尽并且可同化碳源丰富的情况下, 其TAG积累过程被激活。这个过程牵涉到微生物代谢和与代谢相关的一系列生理生化过程的变化。首先, 当氮源枯竭时, 产油微生物的腺苷一磷酸(AMP)脱氨酶活性增加, AMP脱氨酶将AMP大量转化为肌苷一磷酸(IMP)和氨, 相当于微生物对缺氮的一种应激反应。通常产油酵母线粒体中异柠檬酸脱氢酶(ICDH)都是AMP依赖性脱氢酶, 细胞内AMP浓度的降低将减弱甚至完全停止该酶的活性。因此, 异柠檬酸不再被代谢为2-酮戊二酸, 三羧酸(TCA)循环陷入低迷状态, 代谢路径发生改变。线粒体中积累的柠檬酸通过线粒体内膜上的苹果酸, 柠檬酸转移酶转运进入细胞溶胶中, 在ATP: 柠檬酸裂解酶(ACL)的作用下裂解生成乙酰CoA和草酰乙酸。这样, 微生物在氮源枯竭、蛋白质合成停滞的情况下仍可将葡萄糖有效地代谢为乙酰CoA, 并在脂肪酸合成酶(FAS)的作用下完成脂肪酰CoA的合成。然而, 在产油真菌*M. circinelloides*和*M. alpina*中ICDH的体外活性并不完全依赖于AMP。当环境氮源耗竭后AMP的浓度降低, 仍然会减量调节ICDH的活力, 激活这些真菌的油脂积累代谢。在产油接合菌(*Zygomycetes*)中, 只有当无细胞抽提物中检测不出ICDH活性时, 油脂的积累过程才会启动。如果能发展一种选择性抑制产油微生物ICDH的工具, 也许可以在更宽松的培养基条件下使微生物在菌体内大量富积油脂。因此, 我们正以油脂酵母为模型, 探索专一性调控ICDH体内活性的化学生物学方法。然而到目前为止, 产油微生物在响应限氮条件时AMP脱氨酶的上游信号传导机制还很不明确。另一个很基础的问题是, 产油微生物为什么选择AMP, 而不是体内其它更易得到的含氮有机分子, 作为氮的补充来源?

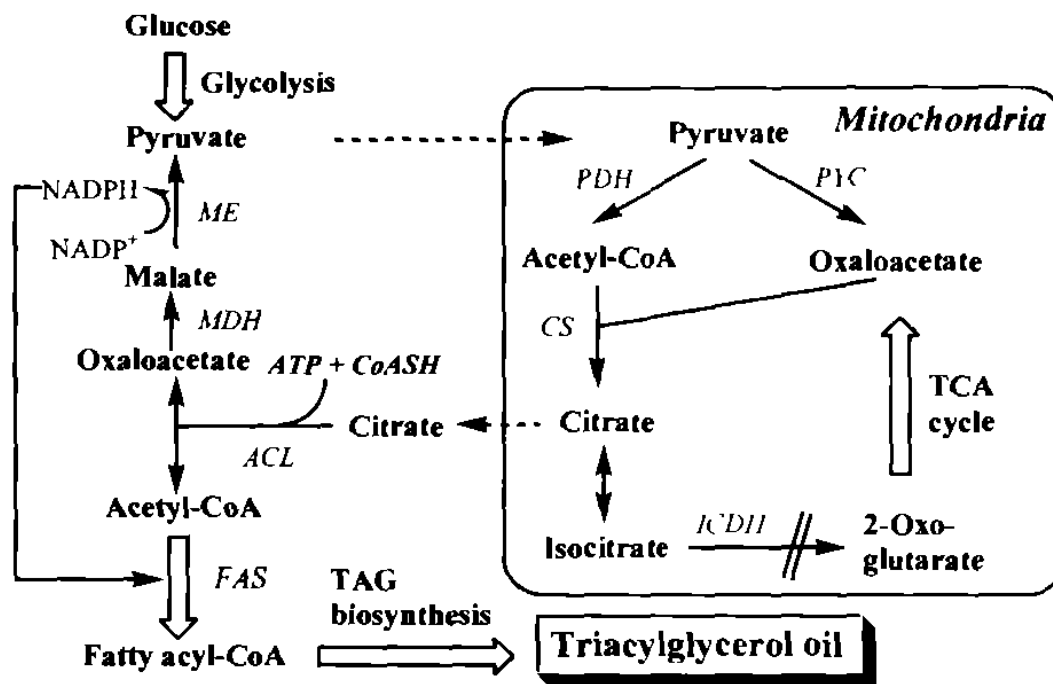


图1.1 产油酵母油脂积累代谢调控途径简图

Fig.1.1 Outline of the metabolic regulation of lipid accumulation oleaginous yeasts

产油微生物油脂合成代谢调控中有两个关键酶，即柠檬酸裂解酶(ACL)和苹果酸酶(ME)。柠檬酸裂解酶在细胞溶胶中催化柠檬酸裂解反应，提供油脂合成所需的乙酰CoA。ACL的活性与产油微生物的油脂积累的能力具有很强的相关性，还没有发现微生物能积累TAG超过其生物量的20%却没有ACL活性的例子。然而有一小部分的酵母菌具有ACL活性，但油脂的积累仍然不会超过生物量的10%。因此，柠檬酸裂解酶是油脂积累的一个先决条件，但并不是有这种酶的微生物都是产油微生物。在不同酵母和真菌中也没有发现油脂积累的程度和ACL的活性具有明确的定量关系。

ACL催化反应的另一产物草酰乙酸首先由苹果酸脱氢酶(MDH)还原成苹果酸，再在ME作用下氧化脱羧得到丙酮酸，并释放NADPH。其中丙酮酸可透过线粒体膜进入线粒体，参与新一轮循环，而NADPH作为脂肪酸合成酶进行链延伸必不可少的辅助因子留在细胞溶胶中。线粒体中的丙酮酸既可以通过丙酮酸脱氢酶(PDH)产生乙酰CoA，又可在丙酮酸羧化酶(PYC)的作用下产生草酰乙酸。这两个产物在柠檬酸合成酶(CS)催化下合成柠檬酸，即ACL的底物，完成产油微生物TAG合成调控最重要的代谢循环。值得注意的是，线粒体中的乙酰CoA无法直接穿透线粒体内膜而进入细胞溶胶中参与脂肪酸合成。

脂肪酸合成不仅需要连续供给乙酰CoA用于碳链延伸，还需要提供足够的NADPH。每一个乙酰CoA单元在新生脂肪酸碳链上延伸时需消耗两当量的NADPH用于还原反应。研究表明，产油微生物油脂积累的多少与ME的代谢调控有关，如果ME受到抑制，则油脂积累下降。这是因为虽然微生物代谢途径中有许多生成NADPH的过程，但FAS几乎只能利用由ME产生的NADPH(图2-1)。因此，有人认为产油微生物中FAS和ME等可

能有机地复合在一起，形成成脂代谢体(Lipogenic metabolon)。研究推测真菌 *M. circinelloides* 至少含有六个ME同功酶，在不同的时空范围内或不同的生长环境下同功酶的活性表现出对不同代谢途径的调控过程<sup>[26]</sup>。但目前尚未见分离出产油微生物ME基因的报道。最近 dos Santos 等<sup>[27]</sup>以酿酒酵母为模型，利用基因工程方法成功实现对苹果酸酶表达量的调控。因此，如果能鉴定和分离产油微生物的ME基因，就可以利用基因工程手段甚至化学生物学手段选择性调控苹果酸酶的活性，提高微生物产油能力。相应地，本实验室已通过常规诱变等方法筛选得到一株具有较高产油能力的油脂酵母，正在开展该酵母菌中ME基因的分离和鉴定工作。

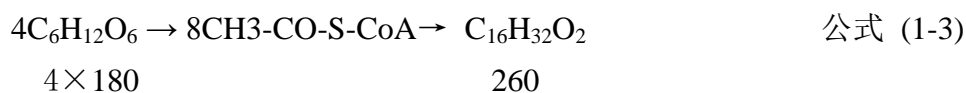
最后需要特别说明的是，当外界条件改变时产油微生物体内的TAG也可能被降解。例如，产油霉菌 *M. isabellina* 只要培养基中碳源耗竭后就会大量分解储存的TAG；对于 *C. echinulata*，则还需要培养环境中较丰富的铁离子、镁离子或酵母提取物时才会启动降解储存TAG的机制。这些结果对产油微生物的发酵工程设计具有重要参考价值。

尽管目前对产油微生物TAG生物合成和代谢调控机制的研究已取得了重要进展，但尚未见成功地通过基因调控手段增加细胞内油脂贮存含量的例子。因此，微生物产油脂领域具有广阔的研究发展空间。随着化石资源日益枯竭和世界各国能源供应形势日趋严峻，通过微生物转化和利用基于碳水化合物的可再生资源已成为社会经济可持续发展的迫切要求。应充分利用现代分子生物学、化学生物学和生物化工技术的最新成果，加快对产油微生物菌种筛选、改良、代谢调控和发酵工程的研究，降低获取微生物油脂的成本，使微生物产油的研究领域取得更快的发展<sup>[28]</sup>。

现在就油脂的理论产率做一个核算，以生成棕榈酸为例，从起始物乙酰CoA到产物棕榈酸的化学计量的总反应式为：



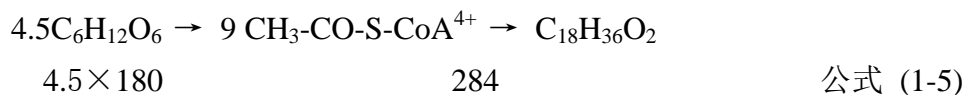
其中，1mol的葡萄糖生成2mol的乙酰CoA，所以可以通过以下关系式计算软脂酸的理论得率：



$$\frac{4 \times 180}{260}$$

故理论得率为36.1%

以生成硬脂酸(C18)为例，其中，1mol的葡萄糖生成2mol的乙酰CoA，所以可以通过以下关系式计算软脂酸的理论得率：



$$\frac{4.5 \times 180}{284}$$

故理论得率为35.1%

### 1.2.4 微生物油脂可能是未来生物柴油的重要油源

国外学者曾报道过产油微生物转化五碳糖为油脂的例子<sup>[29]</sup>。产油微生物的这一特性尤其适用于木质纤维素全糖利用，这是目前燃料酒精产业还难以实现的。因此，微生物油脂是具有广阔前景的新油脂资源，可能在未来生物柴油产业中发挥重要作用<sup>[30]</sup>。

木质纤维素资源具有来源丰富，品种多，再生时间短等优点。我国纤维素类可再生资源非常丰富，仅农作物的秸秆每年就有 $6 \times 10^8$ 吨。除部分用于造纸、建筑、纺织等行业外，大部分未能被有效利用，有些还造成环境污染。木质纤维素主要成份为纤维素、半纤维素和木素等，其中纤维素和半纤维素含量超过65%。由于木质纤维素氧含量高，能量密度低，不能直接用作高品位能源产品。如干燥秸秆资源总碳氢氧元素组成比约为1:1.4:0.6。而化石能源含氧量均很低，生物能源产品若以生物柴油为例，碳氢氧元素组成比大约为1:1.9:0.1。

可见，生物质资源转化为能源产品的化学本质是“深度脱氧”。生物转化法能通过微生物的呼吸作用以牺牲部分碳源为基础实现“深度脱氧”，并代谢得到低含氧量的产品。

下面简要从理论上分析一下利用玉米秸秆生产生物柴油和燃料酒精的质量和生物质能量利用情况。干燥玉米秸秆含纤维素40%，半纤维素25%，木素17%，其高热值为17.8kJ/kg。由于产油微生物能同时利用六碳糖(葡萄糖)和五碳糖(木糖和阿拉伯糖)，每吨玉米秸秆理论上将产出生物柴油233 kg(按硬脂酸乙酯计，制备生物柴油所需油脂和乙醇均来自玉米秸秆)和甘油22.8 kg<sup>[31]</sup>，生物质能量利用率约为55%。以玉米秸秆为原料发酵法生产燃料酒精，由于目前酒精发酵工业菌株还只能利用六碳糖，理论上每吨玉米秸秆产出酒精227kg，生物质能量利用率为34%。将来通过代谢工程技术若能实现全糖利用，则理论上每吨玉米秸秆可产出酒精401 kg，生物质能量利用率达到60%<sup>[32]</sup>。值得注意的是，同生产燃料酒精相比，利用农作物秸秆生产微生物油脂和生物柴油在产品分离上具有操作相对简单、能耗低的优点。因此，我们在这里明确提出从木质纤维素原料经微生物油脂制备生物柴油的技术路线(图1.2)。

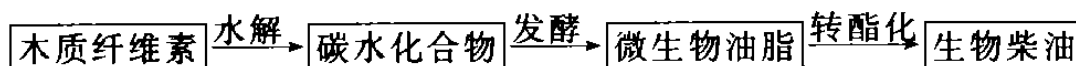


图 1.2 从木质纤维素原料经微生物油脂制备生物柴油的技术路线

Fig.1.2 The engineering course of producing biodiesel from lignocellulose

在利用微生物油脂资源生产生物柴油的同时，还可以开发其它高价值用途以降低成本。如微生物油脂通过与不同的醇进行酯交换，用于生产可生物降解的润滑油、溶剂油、油漆和油墨溶剂、表面活性剂、粘接剂等产品。生物润滑剂特别适用于水力及农业机械设备、铁路，不但环境友好，而且易于涂抹。

可见，利用产油微生物转化碳水化合物为微生物油脂，将为木质纤维素资源高值化

利用提供新思路和新技术。该路线有可能从根本上解决制备生物柴油的油脂资源问题，对解决中国社会“三农”问题和能源危机问题、促进我国生物技术产业的发展具有重要意义。

### 1.2.5 微生物油脂制生物柴油的展望

产油微生物具有资源丰富、油脂含量高、生长周期短、碳源利用谱广、能在多种培养条件下生长等特点。微生物油脂生产工艺简单、高值化潜力大，有利于进行工业规模生产和开发。目前中国、日本、德国、美国等国已有商品微生物菌油或相应下游加工产品面市，但生产成本还较高。

利用产油微生物转化废弃物木质纤维素资源可降低成本，有利于环境保护和社会经济可持续发展。随着现代生物技术的发展，将可能获得更多的微生物资源。如通过对野生菌进行诱变、细胞融合和定向进化等手段能获得具有更高产油能力或其油脂组成中富含稀有脂肪酸的突变株，提高产油微生物的应用效率。最近希腊学者Papanikolaou等<sup>[33]</sup>报道了利用*M. isabellina*进行高浓度糖发酵(初始糖浓度达100 g/L)，油脂产量达到18.1 g/L，显示出很好的应用前景。应充分利用现代分子生物学、化学生物学和生物化工技术的最新成果，加快对产油微生物菌种筛选、改良、代谢调控和发酵工程的研究，降低微生物油脂的生产成本，使产油微生物的研究领域取得更快的发展<sup>[34-35]</sup>。

## 1.3 纤维素制微生物油脂基本原理和工艺

### 1.3.1 纤维素原料性质

木质纤维素的主要有机成分包括纤维素，半纤维素和木质素三部分。

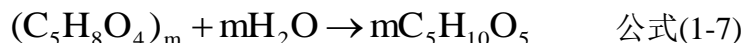
纤维素属大分子同多糖，是由葡萄糖脱水生成的糖苷，通过  $\beta$ -1,4 葡萄糖苷键连接而成的直链聚合体。它的分子式可简单表为 $(C_6H_{10}O_5)_n$ ，这里的  $n$  为聚合度，表示纤维素中葡萄糖单元的数目，其值一般在 3500-10000。纤维素经水解可生成葡萄糖，该反应可表示为：



理论上每 162kg 纤维素水解可得 180kg 葡萄糖。

纤维素大分子间通过大量的氢键连接在一起形成晶体结构的纤维束。这种结构使得纤维素的性质很稳定，它不溶于水，无还原性，常温下不发生水解，高温下水解也很慢。只有在催化剂存在下，纤维素的水解反应才能显著地进行。

半纤维素是由不同多聚糖构成的混合物，这些多聚糖由不同的单糖聚合而成。半纤维素的水解产物包括 2 种戊糖(木糖和阿拉伯糖)和 3 种己糖(葡萄糖，半乳糖和甘露糖)。各种糖所占比例随原料而变化，一般木糖占一半以上，以农作物秸秆和草为水解原料时还有相当量的阿拉伯糖生成(可占戊糖的 10—20%)。半纤维素中木聚糖的水解过程可用下式表示：



理论上每 132kg 木聚糖水解释可得 150kg 木糖，这里的 m 也为聚合度。

半纤维素的聚合度较低，所含糖元数在 60-200，也无晶体结构。它在 100℃左右就能在稀酸里水解，也可在酶催化下水解。

半纤维素的侧链上通常有大量的乙酰基存在，它们在水解过程中会生成对发酵有抑制作用的乙酸。

木质素是由苯基丙烷结构单元通过碳-碳键连接而成的三维空间高分子化合物，它不能被水解为单糖，且在纤维素周围形成保护层，影响纤维素水解。但木质素中氧含量低，能量密度比纤维素高，水解中留下的木质素残渣常用作燃料。

不同生物质中纤维素，半纤维素和木质素的含量不同。表 1.1 给出了部分生物质的组成<sup>[36]</sup>。由于数据来源不同，表中对有些原料给出的是纤维素和半纤维素的含量。

表 1.1 原料化学组成

Table 1.1 Chemical composition of raw materials and simulated ethanol production

原料	纤维素或己糖 %	半纤维素或戊糖 %	木质素 %
甘蔗渣	33 (H)	30 (P)	29
小麦秸	30 (H)	24 (P)	18
高粱秸	33 (H)	18 (P)	15
稻草	32 (H)	24 (P)	13
燕麦秸	41 (H)	16 (P)	11
玉米芯	42 (H)	39 (P)	14
玉米茎	35 (H)	15 (P)	19
大麦秸	40 (H)	20 (P)	15
花生壳	38 (H)	36 (P)	16
苜蓿茎	48.5	6.5	16.6
稻壳	36 (H)	15 (P)	19
巨桉	38	13	37
柳桉	45	12.0	25.0
松木	44.0	26.0	29.0

白杨	47.6	27.4	19.2
锯木屑	55.0	14.0	21.0
柳木	37.0	23.0	21.0
山杨	51	29.0	16.0
云杉	43.0	26.0	29.0
白桦	40.0	23.0	21.0
马缨丹	42.50	22.70	22.88
牧豆树	45.5	20.38	24.65
甜根子草	45.10	22.70	24.56
水葫芦	18.2	48.7	3.50
Paja brava (一种牧草)	32.2	28.1	24.0

### 1.3.2 纤维素制微生物油脂工艺

纤维素的性质很稳定，只有在催化剂存在下才能显著地水解。常用的催化剂是无机酸和纤维素酶，由此分别形成了酸水解和酶水解工艺，酸水解又可分为稀酸水解和浓酸水解<sup>[37-38]</sup>。

酶水解有不少优点。它在常温下进行，过程能耗低。酶有很高的选择性，可生成单一产物，故得到的糖产率很高(大于 95%)。由于酶水解中基本上不加化学药品，且仅生成很少的副产物，所以提纯过程相对简单，也避免了污染。酶水解的缺点是所需时间长(一般要几天)，酶的生产成本高，且水解原料需经预处理。

酶水解工艺包括原料预处理，和纤维素水解等部分。其中预处理的目的是增大纤维素的可接近表面，提高水解产率<sup>[39]</sup>。

酶水解工艺的流程变化较多，它们基本上可以分为两类。在第一类工艺中，纤维素的水解和糖液的发酵在不同的反应器内进行，它因此被称为分别水解和发酵工艺，简称 SHF；在第二类工艺中，纤维素的水解和糖液的发酵在同一个反应器内进行，由于酶水解的过程又被称为糖化反应，故被称为而现在主要的水解工艺以先用稀酸预处理之后再用水解为主。同时糖化和发酵工艺，简称 SSF。SHF 和 SSF 中又分别有不同的工艺安排。

图 1.3 所示的是戊糖和己糖共发酵的 SHF 工艺<sup>[36]</sup>。图中给出了两种可能的预处理方法。左边部分用的是稀酸预处理，它可以把原料中的半纤维素水解为戊糖，从而增大纤维素的可接近表面。右边部分用的是碱预处理，它能把原料中的木质素溶解掉，同样能增大纤维素的可接近表面。碱预处理后原料中的半纤维素依然存在，可以用半纤维素酶水解。

图 1.4 所示的是戊糖和己糖共发酵的 SSF 工艺<sup>[36]</sup>。图中给出的两种预处理方法是碱

预处理和微生物预处理，它们都可以除去原料中的木质素。

除了上面提到的几种预处理方法外，蒸汽爆破也常用于酶水解的原料预处理。由于在发酵结束后需要分离细胞来得到油脂，故微生物油脂发酵多采取第一种工艺条件。

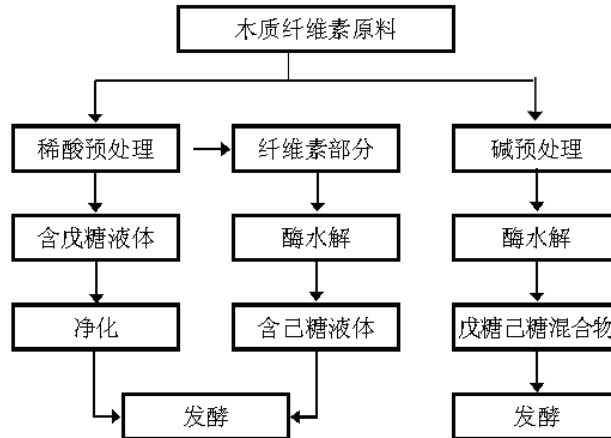


图 1.3 戊糖和己糖共发酵的 SHF 工艺

Fig.1.3 SHF with separate pentose and hexose sugars and combined sugar fermentation.

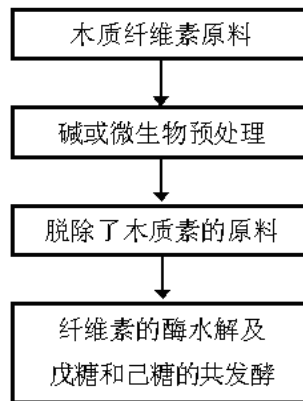


图 1.4 戊糖和己糖共发酵的 SSF 工艺

Fig.1.4 SSF with combined sugars (pentoses and hexoses) fermentation.

## 1.4 影响产油酵母及其所产油脂的因素

### 1.4.1 不同的碳源

对产油酵母利用木质纤维素水解液中主要单糖(葡萄糖、D-木糖和L-阿拉伯糖)的产油特性进行了初步筛选,表征了菌油中长链脂肪酸的组成。产油酵母菌的这些特点有利于充分利用木质纤维素水解混合糖,在开发生物质能源产品—生物柴油和其它高附加值生物化工产品中具有重要作用。

天然木质纤维素类生物质是由纤维素、半纤维素和木素三大部分组成。在许多植物体中半纤维素的含量接近或略少于纤维素。纤维素水解产物葡萄糖易被微生物利用,是常规发酵碳源。半纤维素主要是五碳糖的聚合物,水解产物以D-木糖和L-阿拉伯糖为主。许多微生物,如酿酒酵母,不能发酵约占原料8%~28%的五碳糖生产酒精<sup>[40]</sup>。因此,高效利用半纤维素水解产物是工业微生物研究中的重要课题。进行同化碳源实验,发现产油酵母对自然界所存在的主要六碳糖和五碳糖表现出广谱的同化能力<sup>[41]</sup>。

在以葡萄糖为碳源发酵时,产油酵母菌油中棕榈酸含量在12%~37%之间,油酸含量在46%~72%之间,棕榈油酸、硬脂酸、亚油酸和亚麻酸含量都比较低。这些产油酵母在利用木糖和阿拉伯糖发酵时,各脂肪酸相对含量变化范围较宽。以D-木糖为碳源发酵时,油脂中棕榈酸含量在12%~43%之间,油酸含量在40%~70%之间;以L-阿拉伯糖发酵时,油脂中棕榈酸含量在14%~40%之间,油酸含量在33%~72%之间。这说明各种属间利用不同单糖合成储存油脂的代谢调控机制可能存在着较大差别,值得深入研究。

### 1.4.2 不同的 C:N 比

产油微生物在培养基中碳源充足而某些营养成分(特别是氮源)缺乏时,菌体细胞分裂速度锐减,代谢活动转为以消耗碳源并合成和积累油脂为主。在油脂积累期,微生物基本上不再进行细胞繁殖,而是将过量的碳水化合物转化为油脂。因此,培养基中碳、氮源浓度及C:N比是影响微生物油脂含量的主要因素。

C:N 比在 20 和 50 之间的细胞内油脂累积是最佳的,当大于 50 g/g, C:N 比率变为补料发酵的酵母成长和油脂生产的关键。在培养结束时最大的 C:N 比率是 75 g/g。

限铁和限氮补料发酵的综合作用是使硬脂酸的比例增加到总油脂的 19%和提高被消耗的 C:N 比到 20 g/g。当在补料发酵培养液中生长到大约 172 小时,最高的生物油脂量可以累积达到是 70 g/L 和 53% (w/w)<sup>[42]</sup>。

### 1.4.3 不同的金属离子含量

微生物油脂是由产油脂微生物在一定条件下,利用碳水化合物、碳氢化合物和普通油脂作为碳源,辅以无机盐在菌体内产生的大量油脂。细胞油脂的合成取决于菌体内关键酶的作用,而金属离子直接影响菌体中酶的活性,因此对金属离子的研究具有很重要的意义。通过摇瓶发酵,初步研究了金属离子( $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ )对发酵性丝孢酵母发酵产油脂的影响。金属离子( $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ )影响发酵性丝孢酵母发酵产油脂,表现为: $MgSO_4$ 有利于菌体油脂的积累; $MnSO_4$ 浓度越高越不利于菌体发酵产油脂; $MnSO_4$ 的缺失对菌体的生物量稍有影响,但有利于细胞积累油脂;适当增大 $ZnSO_4$ 浓度有利于菌体生长和细胞内油脂的积累;适当添加 $CuSO_4$ 有利于菌体生长和及提高油脂产量<sup>[43-45]</sup>。

### 1.4.4 发酵抑制物的影响

木质纤维素原料在高温高压预处理(水解)过程中产生三大类发酵抑制物质,分别为脂肪酸、糠醛和芳香族化合物(图1.5)<sup>[46-49]</sup>。抑制性物质随着预处理温度升高和处理时间的延长而增加。同时抑制性物质的生成与木质纤维素材料的质地相关。木质纤维素材料不同,产生的抑制物质的数量与比例也不同<sup>[50-51]</sup>。

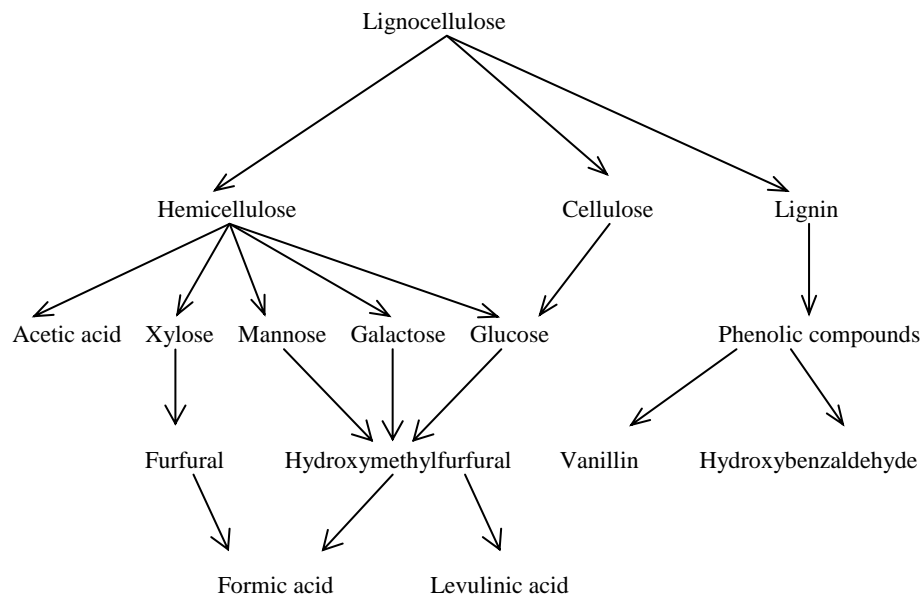


图 1.5 木质纤维素原料的生物降解路径

Fig.1.5 Degradation pathway of lignocellulose biomass.

## 1.5 课题研究的意义与内容

为了获得用于制备生物柴油所用的油脂，本课题的研究就是从十种产油酵母菌中筛选出一种或几种能够在木质纤维素酶水解液中生长、发酵并产生油脂的酵母菌。本课题研究使用的菌株均购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。由于对于它们的发酵特性，我们还不了解，所以如果应用到大规模工业生产上是很不现实的。利用生物质(秸秆)为原料来生产纤维素生物油脂是一项迫切的、具有重要战略意义的任务。利用微生物生产油脂具有油脂含量高、不受季节和气候限制、生产周期短、生产原料来源广泛、能连续大规模生产等特点，利用诱变技术和现代分子生物学技术，可以使微生物生产出更符合人们需要的油脂。

本课题在十种产油酵母菌中以水解液中的抑制物为筛选压力，筛选出 *Trichosporon cutaneum* 2.1374 这样一株对水解液中抑制物抗性最强的菌株。之后利用物理与化学诱变结合的方法，在培养基中添加芝麻酚作为筛选压力高通量筛选获得一株能够在水解液中高产的菌株 *Trichosporon cutaneum* CX2。此后分别在 250ml 摇瓶和 2L 发酵罐中对最佳发酵条件进行优化和放大。获得了能够得到最大油脂得率的发酵条件，为微生物油脂的工业化应用打下了良好的基础。

## 第 2 章 材料与方法

### 2.1 材料与设备

#### 2.1.1 菌种

本研究课题所筛选的菌株(表2.1)均购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)。

表2.1 实验中筛选的菌株

Table 2.1 Oleaginous microorganisms used. All strains were from China General Microbiological Culture

Collection Center (CGMCC)

序号	菌种保藏编号	菌株名称
1	2.107	粘红酵母 <i>Rhodotorula glutinis</i>
2	2.703	
3	2.704	
4	2.571	皮状丝孢酵母 <i>Trichosporon cutaneum</i>
5	2.1374	
6	2.1515	深红酵母 <i>Rhodotorula rubra</i>
7	2.1389	红冬孢酵母 <i>Rhodosporidium toruloides</i>
8	2.1609	
9	2.1390	油脂酵母 <i>Lipomyces starkeyi</i>
10	2.1608	

#### 2.1.2 实验试剂

见表2.2

表 2.2 试剂

Table 2.2 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
3.5-二硝基水杨酸	AR	浙江湖州生物化学厂

---

98%浓硫酸	CR	上海菲达工贸有限公司
NaOH	AR	上海振兴化工厂
酒石酸钾钠	AR	上海振兴化工厂
苯酚	AR	上海润捷化学试剂有限公司
葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
无水亚硫酸钠	AR	上海振兴化工厂
$\beta$ -葡萄糖苷酶(酶活约 120 FPU/mL)	AR	上海科华生物工程有限公司
纤维素酶(酶活约 60 FPU/mL)	AR	上海科华生物工程有限公司
YEAST EXTRACT	AR	OXOIDLID BASINGSTOKE HAMPSHIRE ENGLAND
蛋白胨	AR	国药集团化学试剂有限公司
D-葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
D-木糖	AR	美国ICN公司
琼脂	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
糠醛	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
甲醇	AR	上海振兴化工一厂
甲酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酰丙酸	AR	美国Johnson Matthey
糠醛	AR	比利时Acros
羟甲基糠醛	AR	比利时Acros
香兰素	AR	国药集团化学试剂有限公司
4-羟基苯甲醛	AR	国药集团化学试剂有限公司
纤维素酶	AR	Genencor Internal, Rochester, NY, USA
纤维二糖酶	AR	Novo Industri A/S, Denmark
硫酸铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸镁	AR	上海美兴化工有限公司
氢氧化钙	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
氯化钙	AR	上海凌峰化学试剂有限公司

---

### 2.1.3 培养基

#### (1) YPD培养基

葡萄糖20 g/L; 酵母粉10 g/L( OXOIDLID BASINGSTOKE HAMPSHIRE ENGLAND); 蛋白胨10 g/L(国药集团化学试剂有限公司); 琼脂粉10 g/L。pH值为5.8~6.0, 115 ℃下灭菌 20 min。

#### (2) 种子培养基

葡萄糖20 g/L; 酵母粉0.5 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0 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; pH值为5.8~6.0, 115 ℃下灭菌 20 min。

#### (3) 限氮培养基

葡萄糖50 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 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; pH值为5.8~6.0, 115 ℃下灭菌 20 min。

#### (4) 酶水解液发酵培养基

由华东理工大学生物质能源研究中心提供, 采用的是稀硫酸预处理和蒸汽膨爆预处理秸秆, 通过加入纤维素酒精酶进行水解(该酶留在水解液中), 水解后进行固液分离所得到的水解液。由于批次间固含量的不同, 糖的浓度和抑制物的浓度分别不同。

### 2.1.4 实验仪器

本研究所用主要实验仪器如表2.3所示。

表2.3 实验仪器

Table 2.3 Experiment equipment

仪器名称	规格	生产厂家
电子天平	BS423S	北京赛多利斯
立式压力蒸气灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
气浴恒温振荡器	SHZ-82	金坛亿通电子
落地恒温振荡摇床	HZ-9311K	太仓华利达
分光光度计	DU-800	Beckman 公司
高速冷冻离心机	J-25	Beckman 公司
台式低速冷冻离心机	5415R	Eppendorf 公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9203A	上海一恒科技
制冰机	XB100	GRANT 公司
恒温恒湿箱	LHS-150HC	上海一恒科技
超低温冰箱	86C	Thermo 公司
冰箱	BCD-215KA	海尔公司
冰箱	SC-329GA	海尔公司

---

旋涡混合仪	XW-80A	江苏海门市其林贝尔公司
洁净工作台	100 级 SW-CJ-IBU	上海博迅公司
高效液相色谱	LC-20AD	岛津
气相色谱	Agilent6820	安捷伦
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore 公司
2L- 4 连发酵罐	Biotech-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司

---

## 2.2 培养方法

### 2.2.1 培养基制备方法

将配制好的培养基在 115 ℃, 20min 的条件下高温灭菌后, 自然冷却至室温。

### 2.2.2 培养方法

从冻存管中取出酵母菌接种于50/250mL YPD培养基中, 30 ℃, 180rpm培养24h后, 划斜面保存菌种。从斜面上挑取单菌落接种于液体种子培养基中, 30 ℃, 180rpm, 培养 24h。然后再接种于限氮培养基中进行发酵(30 ℃, 180rpm), 接种量为10%, 培养过程中测定细胞浓度、菌体生物量以及菌体油脂量, 发酵结束测定油脂组成。

种子保藏: 长期保藏: -80 ℃, 30%甘油, 冷冻保藏; 短期保存: 从冻干管中分离出斜面, 4 ℃ 保藏, 3 个星期之内使用。

## 2.3 分析方法

### 2.3.1 菌体浓度的测定

菌体浓度采用吸光度间接法测量, 每隔一定时间(12h 或 24h)从发酵液中取出 1mL, 在 600nm 的波长下测量其吸光度(OD)。

### 2.3.2 菌体干重的测定

菌体干重法: 每隔 24 小时, 取出一瓶 20mL 发酵液, 用 50mL 离心管离心, 用取离子水清洗, 再离心, 重复三遍, 洗净后置于 65 ℃ 烘箱内烘至恒重, 称重。

### 2.3.3 菌体浓度和菌体干重的关系

菌体浓度OD与菌体干重 (Dry Cell Mass DCM) 成线性关系。以 *Trichosporon cutaneum* 2.1374 为例, 如图2.1所示。

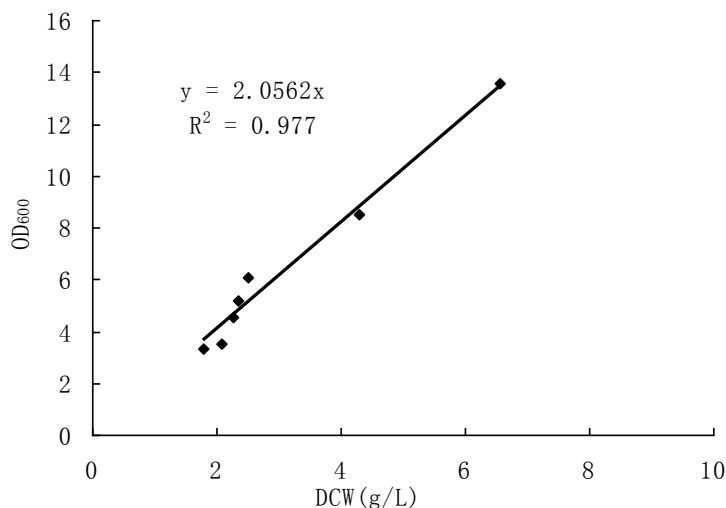


图 2.1 *Trichosporon cutaneum* 2.1374 菌体干重和 OD<sub>600</sub> 的关系

Fig.2.1 The relationship of OD<sub>600</sub> and dry cell weight for *Trichosporon cutaneum* 2.1374

### 2.3.4 油脂量的测定

酸热-有机溶剂萃取法<sup>[52]</sup>: 将称重后的湿菌体用 5mL 4M 的 HCl 浸泡 30 分钟, 再煮沸 10 分钟。速冷后, 加入 20mL 氯仿: 甲醇为 2:1 的混合有机溶剂对油脂进行萃取, 振荡, 离心, 取下层有机层。余下的液体再加入 15mL 混合有机溶剂再次萃取, 振荡, 离心, 取下层有机层, 向所收集的有机溶液中加入无水硫酸钠, 静置至溶液澄清后过滤, 旋转蒸发掉有机溶剂, 即得到酵母菌所产油脂, 称重。

### 2.3.5 油脂脂肪酸组成的测定

将得到的油脂脂肪酸进行气质联用分析, 可得知其组成。方法如下: 向制得的油脂脂肪酸中加入衍生化试剂10%的三氟化硼-甲醇溶液0.5mL, 在60℃水浴中加热10min, 反应完全后向Clarus500气质联用仪(GC-MS)中进样。

分析方法如下:

- (1)进样口温度: 280℃;
- 分流/不分流进样口, 分流比 10:1;
- (2)进样量: 1μL;
- (3)色谱柱: PE-5色谱柱(30m × 0.25 mm × 0.25μm);
- (4)程序升温: 在80℃条件下保留3分钟, 以16℃/min升温到280℃;
- (5)检测器温度: (FID, 氢火焰离子化检测器)300℃。

(6)载气:氦气; 载气流速:1mL/min。

(7)分析系统:NIST MS Search 2.0.

### 2.3.6 糖浓度和水解液中抑制物浓度的测定

#### 2.3.6.1 DNS 法测还原糖

(1) 原理: 在 NaOH 和丙三醇存在下, 3,5-二硝基水杨酸(DNS)与还原糖共热后被还原成氨基化合物。在过量的 NaOH 溶液中此化合物呈桔红色, 在 540nm 波长处有最大吸收, 在一定的浓度范围内, 还原糖的量与光吸收值呈线性关系。

#### (2) DNS比色法作标准曲线

先在1~6号试管中分别加入0.0~0.3的mL浓度为1%标准糖溶液, 再用水补足到0.5mL, 然后加入1mL去离子水, 最后加入3mLDNS试剂。摇匀后在沸水浴中准确放置5min, 用冰水迅速冷却。取新试管分别加入2.5mL水和0.2mL冷却后样品, 振荡混匀。在540nm可见光下测OD, 以空白(1号)作参照比色测定吸光度, 结果见图2.2。

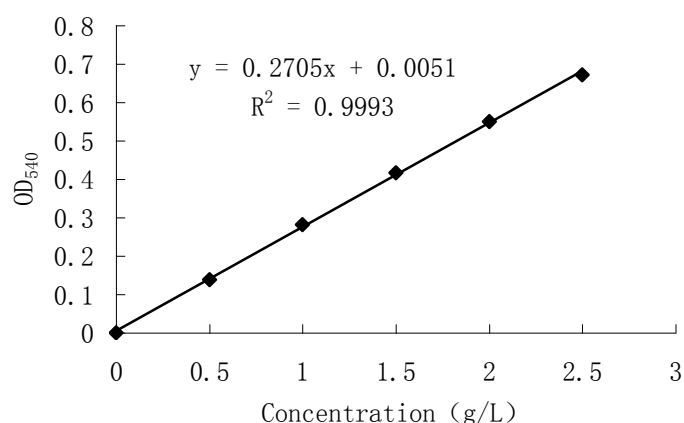


图2.2 DNS比色法糖标准曲线

Fig.2.2 DNS colorimetry glucose standard curve

由图2.2可见糖浓度0~3mg/mL内, 糖浓度与吸光度有很好的线性关系。

#### (3) 操作

样品根据糖范围按实际需要稀释相应倍数。在试管中分别加入稀释后样品 0.5mL, 水 1mL, 3mLDNS, 振荡混匀。(使用水 1.5mL, 3mLDNS 作为对照)沸水浴 5min 显色, 冰水速冷, 取新试管分别加入 2.5mL 水和 0.2mL 冷却后样品, 振荡混匀。在 540nm 可见光下测 OD, 与标准曲线对照通过计算得出糖浓度。

计算公式如(2-1)所示:

$$m = \frac{n(y - 0.0051)}{0.2705} \quad \text{公式 (2-1)}$$

m-----样品中总的还原糖质量, mg

n-----样品稀释倍数

y-----540nm 可见光下吸光度

还原糖的转化率:

$$x = \frac{m}{M} \quad \text{公式 (2-2)}$$

x-----转化率

m-----样品中总的还原糖质量, mg

M----- 原料质量, mg

### 2.3.6.2 高效液相色谱法

由于纤维素废弃物水解液中成分很复杂, 液体颜色较重, 使用常规化学分析方法, 很难准确判断分析过程中的等当点。上述 DNS 法仅能测出还原总糖浓度, 因此我们在试验中采用高效液相色谱配蒸发光检测器对还原性单糖和水解液中抑制物的含量进行测定, 该方法可以较准确的测出这些成分。

#### (1) 标准曲线测定

采用日本岛津的 LC-20AD 高效液相色谱仪, RID-10A 示差检测器, Bio-rad Aminex HPX-87H 色谱柱, 柱温 65℃, 流动相 0.005M 硫酸, 流速 0.6 mL/min。梯度稀释精确浓度的葡萄糖(木糖)和各种抑制物标准液, 经 0.22-μm 滤纸过滤, 通过进样器加入, 进样体积 50μL, 根据液相色谱谱图得到出峰时间, 同时通过峰面积计算出标准曲线。

#### (2) 样品中各种物质浓度测定

样品通过稀释, 在分析前均经 0.22-μm 微孔滤膜(上海迪清过滤技术有限公司)过滤, 得到之前标准品对应位置的峰面积, 通过与标准曲线比对, 通过计算得到浓度。

## 2.4 酶水解工艺中木质纤维素的预处理

### 2.4.1 稀酸预处理的装置

酶水解中的稀酸预处理实验流程如图 2.3 所示。

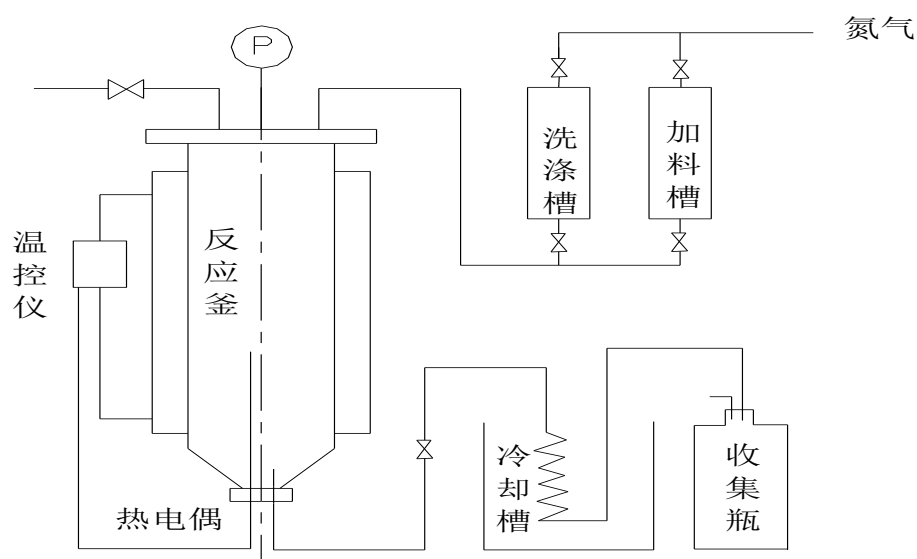


图 2.3 稀酸预处理装置图

Fig.2.3 Schematic diagram of the equipment for dilute acid pretreatment

该实验装置的核心部件是一个不锈钢反应器，主体部分为内径 10cm 的圆柱体，全部容积 2.5L，上下盖以法兰连接，用于装料和卸料，底部法兰上有插热电偶的小管，反应器外有夹套，通过夹套内的电热丝加热，由温控仪显示和控制温度。

## 2.4.2 稀酸预处理的实验步骤

### 2.4.2.1 物料处理

利用固体粉碎机对未处理玉米秸秆(已过 5mm 筛)进行粉碎，并分别筛选出 20~45 目、45~60 目、60 目以下各筛分，进行称量烘干，待恒重后，进行密封保存，以待实验时用。

### 2.4.2.2 玉米秸秆的稀酸预处理

将事先准备好的一定筛分的玉米秸秆加入稀硫酸(质量百分比浓度 2.5%)，搅拌均匀放置 1.5h 后放入反应器进行反应。

反应的条件分别为：

原料颗粒大小：分为经 5mm 过筛、20-45 目、45-60 目、60 目以下等部分；

温度：180℃；

液固比(v/m)：3:1；

反应时间：5min。

预实验表明，在一定反应时间、反应温度、酸浓度和液固比下，还原糖的转化率随着原料颗粒大小的改变变化不大。从降低能耗的角度考虑，在以后的实验中都选择未处理但已过 5mm 筛的原料。

### 2.4.3 蒸汽膨爆预处理

蒸汽膨爆预处理主要在吉林燃料乙醇有限公司完成。

## 2.5 稀酸预处理后木质纤维素的酶水解

将稀酸预处理后的残渣 pH 浓度调节到 4.8~5.0 后加入酸预处理后得到的预处理液，加入纤维素酶和葡萄糖苷酶，所加入的酶量分别为：纤维素酶 Spezyme CP(上海科华生物工程有限公司)7 FPU， $\beta$ -葡萄糖苷酶 Novozyme 188(上海科华生物工程有限公司)15 IU，在 5L 发酵罐中 50℃酶水解 48 小时，转速为 300rpm。酶解结束后进行固液分离。所得到的酶水解液组分如表 2.4 所示。

表 2.4 水解液中各组分的浓度

Table 2.4 The major compositions in lignocellulosic hydrolysate

名称	浓度(g/L)
葡萄糖	84.65
木糖	36.39
乙酸	11.58
甲酸	2.56
乙酰丙酸	1.49
糠醛	0.32
5-羟甲基糠醛	1.01
香兰素	0.061
对羟基苯甲醛	0.103

## 2.6 蒸汽膨爆预处理后木质纤维素的酶水解

将蒸汽膨爆预处理后的木质纤维素残渣高温灭菌后计算含水量，加入相应的纤维素酒精酶，50℃酶水解 48 小时，转速为 300rpm。酶解结束后进行固液分离。所得到的酶水解液组分如表 2.5 所示。

表 2.5 水解液中各组分的浓度

Table 2.5 The major compositions in lignocellulosic hydrolysate

名称	浓度(g/L)
葡萄糖	62.51
木糖	9.38
乙酸	0.57

## 2.7 苹果酸酶酶活的测定

在 2.5L 发酵罐中装 YPD 培养基 1L，接入诱变后的菌株发酵 48h，收集细胞，20mg/100ml Tris-HCl(pH7.3)重新悬浮，匀浆 4 分钟，测蛋白和酶活。

测定酶活的体系：50mM Tris-HCl (pH7.3)，10mM MgCl<sub>2</sub>，0.5mM NADP，4mM L-苹果酸。最终体积为 1 ml，OD340 测定酶活<sup>[53-55]</sup>。

酶活的计算公式如下：

$$\text{酶活(U/mg)} = \frac{\Delta\text{OD}/\text{min} \times V_t \times df}{6.22 \times 1.0 \times V_s \times C} \quad \text{公式 (2-1)}$$

V<sub>t</sub>:总体积(0.2ml); V<sub>s</sub>: 样品体积(0.01ml);

6.22:在测定条件下 NADH 的毫摩尔消光系数(mmol/cm);

1.0:光程(cm); df: 稀释因子

C:在溶液中的酶浓度

### 第 3 章 实验结果

#### 3.1 产油能力初筛

一般文献中较为常见的产油菌种分别是*Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon cutaneum*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodosporidium toruloides*, *Lipomyces starkeyi*, *Cryptococcus albidum*。所以我们从普通菌种保藏中心购买了这10种菌(表2.1)。它们的细胞含油率一般是在发酵4天后达到32-63%。我们选择这10种菌有两个原因：第一，细胞含油率比较高。第二，具有很高的生长速率和利用碳源范围非常广泛。

培养基中碳、氮源种类及浓度是影响微生物油脂含量的主要因素之一。而葡萄糖通常是菌体细胞生长和油脂合成的最适碳源，在我们对于这10种菌不太了解的基础上，决定首先以葡萄糖为碳源，在限氮条件下发酵培养，对十种产油酵母菌进行初步筛选。

以葡萄糖为唯一碳源，在限氮培养基中培养十种酵母菌，通过测定菌液吸光度和菌干重观察其生长曲线，测定产油量及产油率。

##### 3.1.1 通过测定菌液吸光度(OD)生长测定曲线

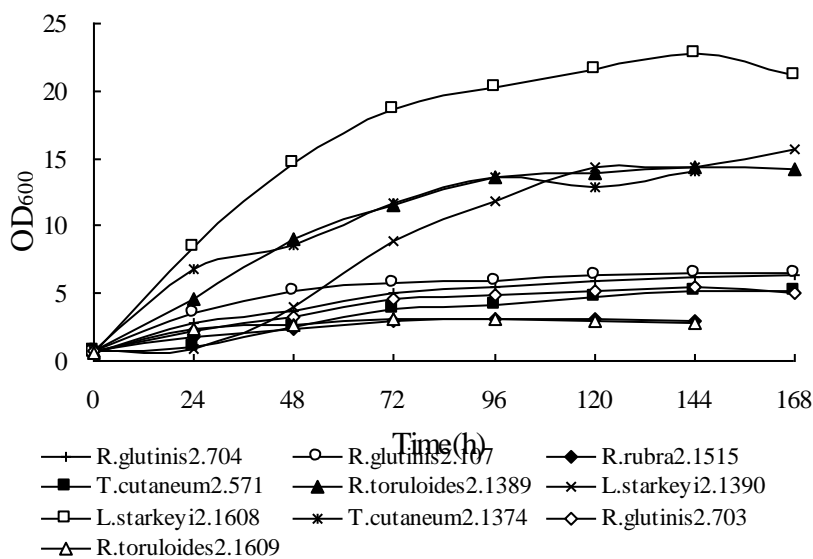


图 3.1 十种酵母菌在以葡萄糖为唯一碳源，限氮培养基中的吸光度生长曲线

Fig.3.1 The OD<sub>600</sub> of ten yeasts in the nitrogen-limited medium under the glucose as carbon source

versus fermentation time

图 3.1 为十种产油酵母菌以葡萄糖为唯一碳源时的生长曲线。从图中可以看出, *L.starkeyi* 2.1390, *L.starkeyi* 2.1608 从 0 小时达到对数生长期, 在 96 小时生长达到稳定。 *R. glutinis* 2.107、 *R. glutinis* 2.703、 *R. glutinis* 2.704、 *T. cutaneum* 2.571、 *R. rubra*1515、 *R. toruloides* 2.1609 六种菌在生长 72h 时到达稳定期, 但油脂酵母 *L.starkeyi* 2.1390 生长延滞期较长, 到 48 小时才开始生长。

### 3.1.2 通过测定菌干重(DCM)测定生长曲线

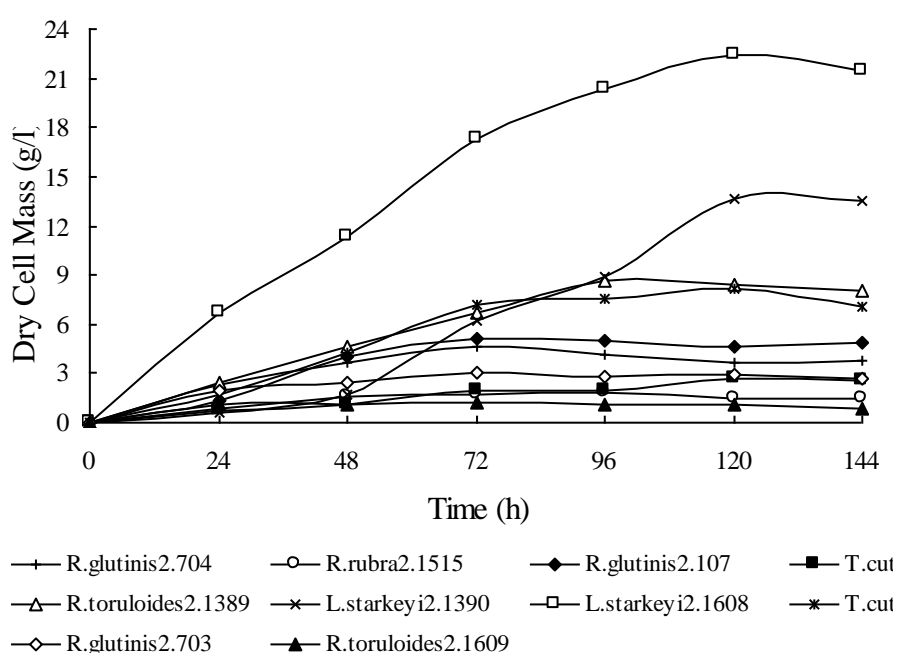


图 3.2 十种酵母菌在以葡萄糖为唯一碳源, 限氮培养基中的菌干重生长曲线

Fig.3.2 The DCM of ten yeasts in the nitrogen-limited medium under the glucose as carbon source

versus fermentation time

图 3.2 为十种产油酵母菌以葡萄糖为唯一碳源时菌干重的变化曲线。皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* 2.1374、红冬孢酵母 *R. toruloides* 2.1389、油脂酵母 *L. starkeyi* 2.1390、*L. starkeyi* 2.1608 的最大生物量分别是 8.15 g/L、8.6 g/L、13.65 g/L 和 22.4 g/L。从图 3-2 与图 3-1 中可以看出菌液吸光度与菌干重基本成线性关系(菌液吸光度与菌干重关系图见图 2.1), 因此在以下实验中主要采用测定菌液吸光度的方法来检测菌的生长情况。

## 3.1.3 几种菌的产油情况

选取生长情况较好的 6 个菌种测定了收集得到的细胞的含油量, 含油率和油脂的产率。表 3.1 为几种产油酵母菌细胞的含油量含油率以及油脂的产率。从表中可以看出, *T.cutaneum* 2.1374 发酵液的含油量含油率都是最高, 分别是 2.75g/L 和 39.8%。几种菌的含油量为 0.52-2.29 g/L, 含油率为 13.0-9.8%

**表3.1 6种产油酵母在培养96h后细胞干重, 含油量, 含油率和油脂产率**

Table 3.1 The dry cell mass (DCM), lipid in medium, lipid productivity and lipid in cells of these six oleaginous yeast strains after cultured 96h in the nitrogen-limited medium

菌体编号	菌体干重 (g/L)	含油量 (g/L)	含油率 (wt. %)	油脂产率 (g/100g Glucose)
<i>T.cutaneum</i> 2.1374	2.75	1.09	39.8	10.1
<i>L.starkeyi</i> 2.1608	9.35	2.04	21.8	10.5
<i>L.starkeyi</i> 2.1390	6.16	2.29	37.2	10.6
<i>R.glutinis</i> 2.107	4.01	0.52	13.0	4.92
<i>R.glutinis</i> 2.704	5.49	0.92	16.7	2.78
<i>R.toruloides</i> 2.1389	4.26	1.67	39.3	12.6

## 3.1.4 油脂脂肪酸组成分析

将这十种产油酵母生产的油脂用气相-质谱联用检测其成分, 结果表明其组成的碳链长度为 16~18, 与植物油组成类似, 是生产生物柴油的很好的原料。各种产油酵母菌所产油脂脂肪酸的组成见表 3.2。

**表 3.2 十种产油酵母菌所产油脂脂肪酸的组成**

Table 3.2 Major fatty acid components of the oleaginous yeast lipids by GC-MS analysis

菌种	油脂脂肪酸组成
<i>R. glutinis</i> 2.107	棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸
<i>R. glutinis</i> 2.703	棕榈酸、硬脂酸、油酸
<i>R. glutinis</i> 2.704	棕榈酸、硬脂酸、油酸
<i>T. cutaneum</i> 2.571	棕榈酸、硬脂酸、油酸
<i>T. cutaneum</i> 2.1374	棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸
<i>R. rubra</i> 1515	棕榈酸、硬脂酸、油酸
<i>R. toruloides</i> 2.1389	棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸
<i>R. toruloides</i> 2.1609	棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸
<i>L. starkeyi</i> 2.1390	棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸

最后根据生长曲线(图 3.1、图 3.2)、产油情况(表 3.1)和油脂脂肪酸组成分析(表 3.2), 我们选出了六种生长情况较好、产油率较高的菌株: 粘红酵母 *R. glutinis* 2.107、*R. glutinis* 2.704、皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* 2.1374、红冬孢酵母 *R. toruloides* 2.1389、油脂酵母 *L. starkeyi* 2.1390、*L. starkeyi* 2.1608, 进一步进行分别以葡萄糖和木糖作为唯一碳源的发酵实验。

### 3.2 分别以葡萄糖和木糖为唯一碳源发酵

由于水解液中的主要碳源是葡萄糖和木糖, 所以我们需要知道挑选出来的这 6 株菌是否能够代谢木糖, 所以下面用筛选出来的六个菌种分别以葡萄糖和木糖为唯一碳源, 在限氮培养基中培养酵母菌, 通过测定吸光度观察其生长曲线。

#### 3.2.1 以葡萄糖为唯一碳源

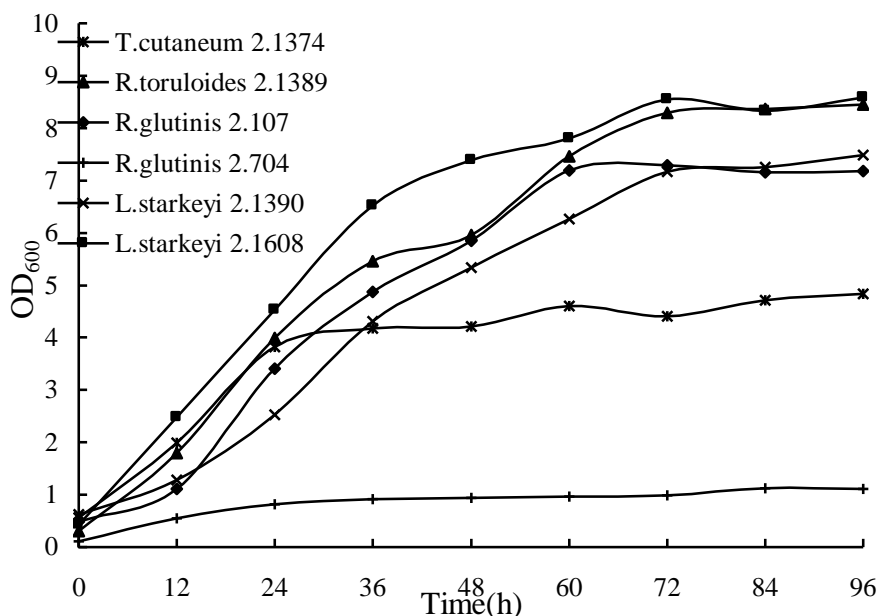


图 3.3 以葡萄糖为唯一碳源时在限氮培养基中产油酵母菌的生长曲线

Fig.3.3 The growth of six yeasts in the nitrogen-limited medium versus fermentation time

## 3.2.2 以木糖为唯一碳源

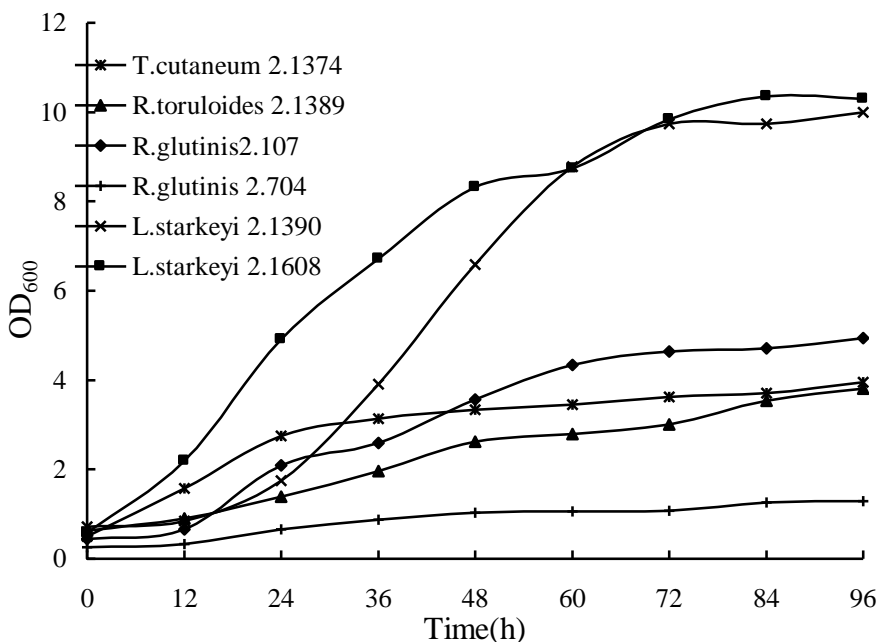


图 3.4 以木糖为唯一碳源时在限氮培养基中产油酵母菌的生长曲线

Fig.3.4 The growth of six yeasts in the nitrogen-limited medium under xylose as carbon source versus fermentation time

由图 3.3 和图 3.4 可以看出,这六种菌都可以利用葡萄糖和木糖为碳源进行生长,但无论是哪一种产油酵母菌,以葡萄糖为唯一碳源都要比以木糖为唯一碳源时生长得好。

## 3.3 木质纤维素降解产物对产油酵母菌生长的影响

根据前面文献综述的内容知道,木质纤维素的结构非常的紧密,要想酶水解得到产油酵母生长可以利用的单糖,一定的物理和化学的预处理步骤还是非常必要的,通过这些步骤可以打断木质素和半纤维素的外壳,使纤维素由微晶纤维素转换成无定形纤维素,这样就可以使酶能够充分的和底物接触。但是在预处理的过程中会产生各种抑制物。这主要包括木糖降解的糠醛和葡萄糖降解的5-羟甲基糠醛,木质素会降解成香兰素,丁香醛和4-羟基苯甲醛。所以我们把这些抑制物分成了3类,如表3.3所示。由于有关于产油酵母菌的抑制物发酵的文献非常少见,所以有必要对抑制物对产油酵母发酵情况的影响做一个比较深入的了解。

本实验中所挑选抑制物的浓度及梯度的选择参考了酿酒酵母抑制物发酵的相关文

献, 并且其后我们又检测了稀酸预处理的酶水解液中各抑制物组分的含量, 结果如表 3.4 所示, 在这两个基础上选定了以下抑制物的浓度梯度。

在限氮培养基(将发酵培养基中 50g/L 葡萄糖换成 30g/L 葡萄糖和 20g/L 木糖, 其他成分浓度不变)中分别加入不同浓度梯度的乙酸、甲酸、乙酰丙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛(HMF)、香兰素、4-羟基苯甲醛七种抑制物, 培养 96h 后, 分别考察对菌体的生长, 耗糖和产油的影响。

表 3.3 选取的七种抑制物

Table 3.3 The inhibitors selected

抑制物种类	抑制物名称
脂肪酸	乙酸
	甲酸
	乙酰丙酸
糠醛类	糠醛
	5-羟甲基糠醛(HMF)
芳香族化合物	香兰素
	4-羟基苯甲醛

表 3.4 稀酸预处理酶水解液中抑制物浓度

Table 3.4 Concentrations of major components in lignocellulosic hydrolytate

抑制物	浓度(g/L)
乙酸	9.1
乙酰丙酸	1.49
甲酸	2.56
糠醛	0.32
5-羟甲基糠醛	1.01
香兰素	0.061
4-羟基苯甲醛	0.103

产油酵母菌对于抑制物质的抗性取决于它对抑制物的转化能力。根据前两个阶段的实验结果, 我们筛选出了六种产油酵母菌(见表3.4), 进行抑制物的实验。

表 3.5 通过初筛得到的六个菌种

Table 3.5 The oleaginous microorganisms after preliminary screening

序号	菌种保藏编号	菌株名称
1	2.107	粘红酵母
2	2.704	<i>Rhodotorula glutinis</i>
3	2.1374	皮状丝孢酵母 <i>Trichosporon cutaneum</i>
4	2.1389	红冬孢酵母 <i>Rhodospiridium toruloides</i>
5	2.1390	油脂酵母
6	2.1608	<i>Lipomyces starkeyi</i>

### 3.3.1 有机酸

乙酸，甲酸和乙酰丙酸是水解液中三种主要的脂肪酸。乙酸是半纤维素的乙酰基水解的产物，甲酸是木质素和纤维素的降解产物。乙酰丙酸是D-葡萄糖和D-甘露糖氧化的最终产物。理论上存在两条生成甲酸的路径，一条是木糖氧化的最终产物，另一条是D-葡萄糖和D-木糖的氧化产物。所有的这些抑制物都产生在预处理这一步里。

#### 3.3.1.1 乙酸

我们选取乙酸的浓度分别为5 g/L、10 g/L和15 g/L。在乙酸的浓度达到5 g/L时，除*T. cutaneum* 2.1374外，其他5种酵母菌均不生长。

图3.5反应了在加入5 g/L的乙酸后，*T. cutaneum* 2.1374 的发酵情况。可以看出，当加入5 g/L的乙酸后，对菌体的生长，葡萄糖，木糖的消耗和油脂的生成都有明显的抑制作用。但是在发酵96小时之后，细胞干重达到3.68 g/L，要高于不添加乙酸的情况(2.75 g/L)。油脂的生成也要略高于不添加乙酸的情况，分别是1.12 g/L和1.09 g/L。这一结果充分表明当培养集中的乙酸浓度低于一定的值后，乙酸就不再作为抑制物，而是参加了菌体的生长代谢，并且作为碳源被菌体利用。

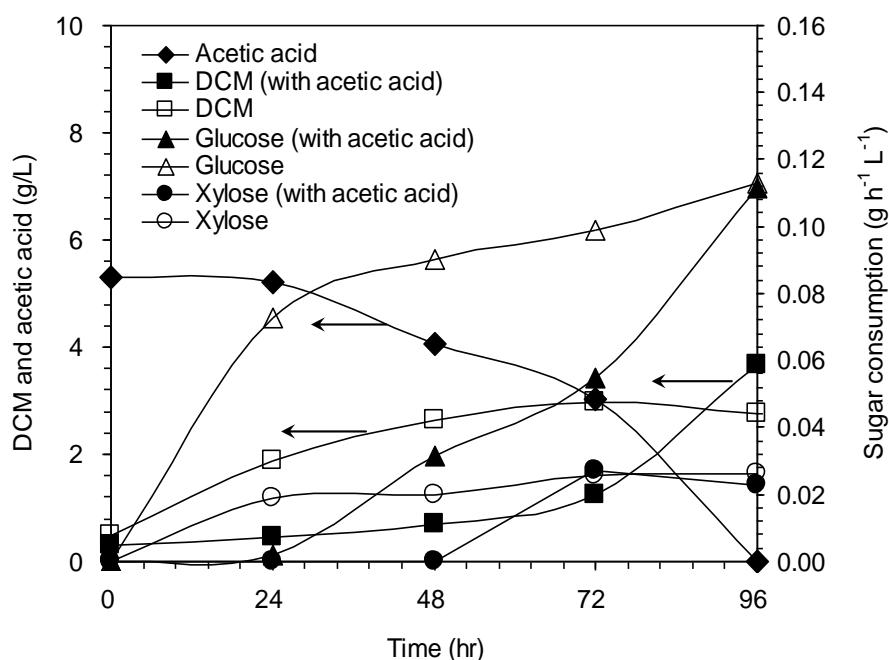


图 3.5 添加 5g/L 乙酸钠后 *T. cutaneum* 2.1374 的发酵情况

Fig.3.5 Time course of the *T. cutaneum* 2.1374 fermentation under the acetic acid inhibition

3.3.1.2 甲酸

表 3.6 为加入 0、1、3、5 g/L 的甲酸后菌体的代谢情况。

表 3.6 添加不同浓度的甲酸后六种菌的代谢情况

Table 3.6 The fermentation of six strains under the inhibition of formic acid in the nitrogen-limited medium

菌体编号	甲酸 (g/L)	菌体干重 (g/L)	含油量 (g/L)	含油率 (wt. %)	油脂得率 (g/100g)
<i>T. cutaneum</i> 2.1374	0	2.75	1.09	39.7	10.1
	1	4.85	1.04	21.5	6.00
	3	3.58	0.63	17.5	5.30
	5	3.02	0.60	20.0	6.30
<i>L. starkeyi</i> 2.1608	0	9.35	2.04	21.8	10.5
	1	6.31	0.98	15.5	10.2
	3	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
<i>L. starkeyi</i> 2.1390	0	6.16	2.29	37.2	10.6
	1	0.27	0.078	28.9	5.61
	3	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
<i>R. glutinis</i> 2.107	0	6.84	0.78	11.4	4.92
	1	2.38	0.12	5.04	2.28
	3	-	-	-	-
	5	-	-	-	-

<i>R. glutinis</i> 2.704	0	7.42	0.68	9.16	2.78
	1	2.13	0.06	2.82	0.69
	3	1.23	0.04	3.25	0.69
	5	-	-	-	-
<i>R. toruloides</i> 2.1389	0	4.26	1.67	39.2	12.6
	1	2.71	0.20	7.38	1.92
	3	1.73	0.16	9.25	2.17
	5	-	-	-	-

同乙酸类似，除了 *T. cutaneum* 2.1374，其他五种菌的生长都被强烈的抑制。当甲酸的浓度达到 3 g/L，*L. starkeyi* 2.1390，*L. starkeyi* 2.160 和 *R. glutinis* 2.107 的生长被完全抑制，没有油脂生成。*R. glutinis* 2.704 和 *R. toruloides* 2.1389 只有少量的生长，并且几乎没有油脂生成。当甲酸的浓度达到 5 g/L 时，所有的菌体的生长都被完全抑制，而 *T. cutaneum* 2.1374 却几乎不受什么影响。当甲酸浓度在 1 g/L 时细胞干重甚至达到了 4.85 g/L。

### 3.3.1.3 乙酰丙酸

表 3.7 为加入 0、1、5、10 g/L 的乙酰丙酸后菌体的代谢情况。

表 3.7 添加不同浓度的乙酰丙酸后六种菌的代谢情况

Table 3.7 The fermentation of six strains under the inhibition of levulinic acid in the nitrogen-limited medium

菌体编号	乙酰丙酸 (g/L)	菌体干重 (g/L)	含油量 (g/L)	含油率 (wt. %)	油脂得率 (g/100g)
<i>T. cutaneum</i> 2.1374	0	2.75	1.09	39.7	10.1
	1	2.88	0.79	27.5	6.0
	5	4.20	1.19	28.3	6.3
	10	4.34	1.08	25.0	5.4
<i>L. starkeyi</i> 2.1608	0	9.35	2.04	21.8	10.5
	1	7.93	0.74	9.33	5.22
	5	6.26	0.72	11.5	6.74
	10	2.98	0.24	8.05	5.05
<i>L. starkeyi</i> 2.1390	0	6.163	2.29	37.2	10.6
	1	2.99	0.48	16.1	4.41
	5	2.90	0.30	10.3	2.89
	10	-	-	-	-
<i>R. glutinis</i> 2.107	0	6.84	0.78	11.4	4.92
	1	4.91	0.40	8.15	3.02
	5	5.12	0.36	7.03	2.27
	10	3.56	0.26	7.30	2.30
<i>R. glutinis</i> 2.704	0	7.419	0.68	9.16	2.78
	1	4.13	0.52	12.6	3.44
	5	4.36	0.44	10.1	2.87
	10	3.91	0.34	8.70	2.86

<i>R.toruloides</i> 2.1389	0	4.256	1.67	39.2	12.6
	1	4.20	1.38	32.9	7.75
	5	4.60	1.40	30.4	5.92
	10	3.83	0.73	19.1	4.11

乙酰丙酸对菌体发酵的影响与乙酸和甲酸不同，当乙酰丙酸的浓度达到10 g/L时，都没有对菌体的代谢产生显著的影响，这个浓度远远高于乙酸和甲酸的上限浓度。乙酰丙酸的存在对*T. cutaneum* 2.1374 的代谢甚至有促进作用，当乙酰丙酸的浓度是10 g/L时，最大的细胞干重和含油量分别是4.34 g/L和1.19 g/L。

### 3.3.2 呋喃类物质

糠醛和 5-羟甲基糠醛是木糖和葡萄糖的主要降解产物，并且是现在已知的乙醇发酵的主要抑制物。

#### 3.3.2.1 糠醛

表 3.8 为加入 0、0.5、1、2g/L 的糠醛后菌体的代谢情况。

表 3.8 添加不同浓度的糠醛后六种菌的代谢情况

Table 3.8 The fermentation of six strains under the inhibition of furfural in the nitrogen-limited medium

菌体编号	糠醛 (g/L)	菌体干重 (g/L)	含油量 (g/L)	含油率 (wt. %)	油脂得率 (g/100g)
<i>T. cutaneum</i> 2.1374	0	2.75	1.09	39.7	10.1
	0.5	2.94	1.25	42.5	12.3
	1	1.76	0.54	30.6	6.76
	2	-	-	-	-
<i>L. starkeyi</i> 2.1608	0	9.35	2.04	21.8	10.5
	0.5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
<i>L. starkeyi</i> 2.1390	0	6.16	2.29	37.2	10.6
	0.5	5.41	1.64	30.3	9.26
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
<i>R. glutinis</i> 2.107	0	6.84	0.78	11.4	4.92
	0.5	3.63	0.20	5.51	2.05
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
<i>R. glutinis</i> 2.704	0	7.419	0.68	9.16	2.78
	0.5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-

<i>R.toruloides</i> 2.1389	0	4.256	1.67	39.2	12.6
	0.5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-

从表3.8中我们可以看出糠醛强烈抑制了6种菌的生长和发酵。*T. cutaneum* 2.1374显示了最好的糠醛的抗性,但是当糠醛的浓度达到2 g/L时,生长也被完全抑制。当糠醛的浓度是0.5 g/L时,细胞干重和含油量达到最大,分别是2.94 g/L 和1.25 g/L。当糠醛的浓度低于1 g/L, *R. glutinis* 2.107 和 *L. starkeyi* 2.1390 才能够生长;*L. starkeyi* 2.1608, *R. glutinis* 2.704和*R. toruloides* 2.1389 在糠醛浓度是0.5 g/L就已经不能够生长,被完全抑制。

### 3.3.2.2 5-羟甲基糠醛(HMF)

表 3.9 为加入 0、0.5、1、2g/L 的 5-羟甲基糠醛后菌体的代谢情况。

表 3.9 添加不同浓度的 5-羟甲基糠醛后六种菌的代谢情况

Table 3.9 The fermentation of six strains under the inhibition of 5-HMF in the nitrogen-limited medium

菌体编号	5-HMF (g/L)	细胞干重 (g/L)	含油量 (g/L)	含油率 (wt. %)	油脂得率 (g/100g)
<i>T. cutaneum</i> 2.1374	0	2.75	1.09	39.7	10.1
	0.5	1.78	0.83	46.8	10.1
	1	2.58	1.14	44.2	12.0
	2	2.37	1.04	43.8	10.1
<i>L. starkeyi</i> 2.1608	0	9.35	2.00	21.8	10.5
	0.5	9.50	2.26	23.8	11.2
	1	8.44	2.08	24.6	11.9
	2	-	-	-	-
<i>L. starkeyi</i> 2.1390	0	6.16	2.29	37.2	10.6
	0.5	7.09	2.22	31.3	8.95
	1	5.51	2.00	36.3	6.69
	2	-	-	-	-
<i>R. glutinis</i> 2.107	0	6.84	0.78	11.4	4.92
	0.5	5.11	0.56	11.0	4.27
	1	3.05	0.20	6.56	2.12
	2	2.93	0.24	8.19	2.31
<i>R. glutinis</i> 2.704	0	7.42	0.68	9.16	2.78
	0.5	5.29	0.34	6.43	2.03
	1	3.86	0.24	6.22	1.96
	2	3.12	0.14	4.49	1.40
<i>R.toruloides</i> 2.1389	0	4.26	1.67	39.2	12.6
	0.5	3.39	0.76	22.4	6.20
	1	2.42	0.40	16.5	4.02
	2	1.90	0.28	14.7	3.25

5-HMF 对菌体的代谢又与糠醛完全不同。从表 3.9 中我们可以看出 5- HMF 对菌体

的代谢影响不是非常明显。5-HMF 对 *T. cutaneum* 2.1374 没有特别显著的影响。只有 *L. starkeyi* 2.1608 和 *L. starkeyi* 2.1390 的生长代谢受到了影响。

### 3.3.3 芳香类化合物

木质素是一个复杂的酚类化合物聚合体。由三个单体：p-香豆基醇，松柏醇，芥子醇通过烷基-芳香基，烷基-烷基和芳香基-芳香醚组成。在预处理尤其是酸预处理的过程中木质素可以被转化成各种芳香族化合物。木质素降解的酚类化合物是乙醇发酵的强烈抑制剂，但是对于油脂酵母的发酵的影响却不确定。

#### 3.3.3.1 香兰素

表 3.10 为加入 0、0.5、1、2g/L 的香兰素后菌体的代谢情况。

**表 3.10 添加不同浓度的香兰素后六种菌的代谢情况**

Table 3.10 The fermentation of six strains under the inhibition of vanillin in the nitrogen-limited medium

菌种编号	香兰素 (g/L)	细胞干重 (g/L)	含油量 (g/L)	含油率 (wt. %)	油脂得率 (g/100g)
<i>T. cutaneum</i> 2.1374	0	2.75	1.09	39.7	10.1
	0.5	3.39	1.24	36.6	10.4
	1	3.41	1.17	34.2	10.9
	2	2.50	0.98	39.2	10.2
<i>L. starkeyi</i> 2.1608	0	9.35	2.04	21.8	10.5
	0.5	7.60	1.58	20.8	9.62
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
<i>L. starkeyi</i> 2.1390	0	6.16	2.29	37.2	10.6
	0.5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
<i>R. glutinis</i> 2.107	0	6.84	0.78	11.4	4.92
	0.5	3.58	0.3	8.38	3.21
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
<i>R. glutinis</i> 2.704	0	7.42	0.68	9.16	2.78
	0.5	2.96	0.46	15.5	4.40
	1	1.65	0.27	16.4	6.03
	2	-	-	-	-
<i>R. toruloides</i> 2.1389	0	4.26	1.67	39.2	12.6
	0.5	1.92	0.36	18.8	4.46
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-

从表 3.10 我们可以看出，加入香兰素，除了 *T. cutaneum* 2.1374，对菌体的生长和

油脂的生成都有强烈的抑制。当香兰素的浓度为 0.5 g/L 时就已经完全抑制了 *L. starkeyi* 2.1608, *R. toruloides* 2.1389 和 *R. glutinis* 2.107 的生长。*L. starkeyi* 2.1390 有较好的香兰素抗性。当加入 0.5 g/L 的香兰素后 DCM 和含油量分别是 3.41 g/L 和 1.17 g/L, 比不添加香兰素要高。

### 3.3.3.2 4-羟基苯甲醛

表 3.11 为加入 0、0.5、1、1.5g/L 的 4-羟基苯甲醛后菌体的代谢情况。

**表 3.11 添加不同浓度的 4-羟基苯甲醛后六种菌的代谢情况**

Table 3.11 The fermentation of six strains under the inhibition of hydroxybenzaldehyde in the nitrogen-limited medium

菌种编号	4-羟基苯甲醛 (g/L)	细胞干重 (g/L)	含油量 (g/L)	含油率 (wt. %)	油脂得率 (g/100g)
<i>T. cutaneum</i> 2.1374	0	2.75	1.09	39.7	10.1
	0.5	2.30	0.78	34.0	7.98
	1	2.11	0.62	29.4	6.12
	1.5	1.32	0.48	36.5	5.64
<i>L. starkeyi</i> 2.1608	0	9.35	2.00	21.4	10.5
	0.5	10.58	2.93	27.7	11.1
	1	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-
<i>L. starkeyi</i> 2.1390	0	6.16	2.29	37.2	10.6
	0.5	6.00	2.30	38.3	10.3
	1	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-
<i>R. glutinis</i> 2.107	0	6.84	0.78	11.4	4.92
	0.5	3.44	0.38	11.0	3.65
	1	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-
<i>R. glutinis</i> 2.704	0	7.42	0.68	9.16	2.78
	0.5	5.01	0.30	5.99	2.41
	1	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-
<i>R. toruloides</i> 2.1389	0	4.26	1.67	39.2	12.6
	0.5	2.21	0.34	15.4	3.82
	1	5.93	1.68	28.3	8.15
	1.5	-	-	-	-

从表 3.11 中我们可以看出 4-羟基苯甲醛对菌体发酵的影响没有香兰素强。尽管随着 4-羟基苯甲醛浓度的升高菌体生长被不同程度的抑制, 但是 *T. cutaneum* 2.1374 还是显示了对 4-羟基苯甲醛的最强的抗性。其它的菌到 1.5 g/L 时就已经不生长了。

综上所述, 皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* 2.1374 的生长情况和产油情况较好, 并且在添加 7 种抑制物的培养基中的生长情况说明其对抑制物表现出很好的抗抑制能力。该菌

种成为使用木质纤维素的酶水解液生产油脂的优选菌种。

### 3.3.4 *T. cutaneum* 2.1374 在稀酸预处理的水解液中的发酵情况

以 2.1.3 中所提及的酶水解液为培养基对 *T. cutaneum* 2.1374 的发酵情况进行考察。在水解液中添加与合成培养基相同浓度的无机盐。由于该水解液是稀酸预处理，故其中抑制物的浓度较高，菌体不能直接生长，所以以相同糖含量的合成培养基对水解液做一个 80%, 60%, 40% 和 20% 梯度稀释。菌体的生长，糖代谢和油脂产生情况如图 3.6 所示。

从图中我们可以看到除了 20% 的稀释梯度外，其他的每一个稀释梯度都存在一个很明显的生长延滞期。随着稀释倍数的上升延滞期的时间也越长：在 20% 和 40% 时不存在生长延滞期；60% 延滞期是 24h；当稀释度达到 80% 时菌体就不生长了。Fig3.6(b) 中关于乙酸的代谢和发酵开始有一个很有意思的相关性。当乙酸的浓度低于 2 g/L 时，菌体的发酵就开始了。这个与在合成培养基中添加乙酸钠时菌体的代谢情况吻合。Fig3.6 (e) 中看到，在水解液中油脂的生产情况要比合成培养基中低许多。

由于在水解液中发酵的情况不理想，所以我们开始考虑用物理和化学诱变的方法对菌体做一个改造，以提高 *T. cutaneum* 2.1374 在水解液中的发酵效率。

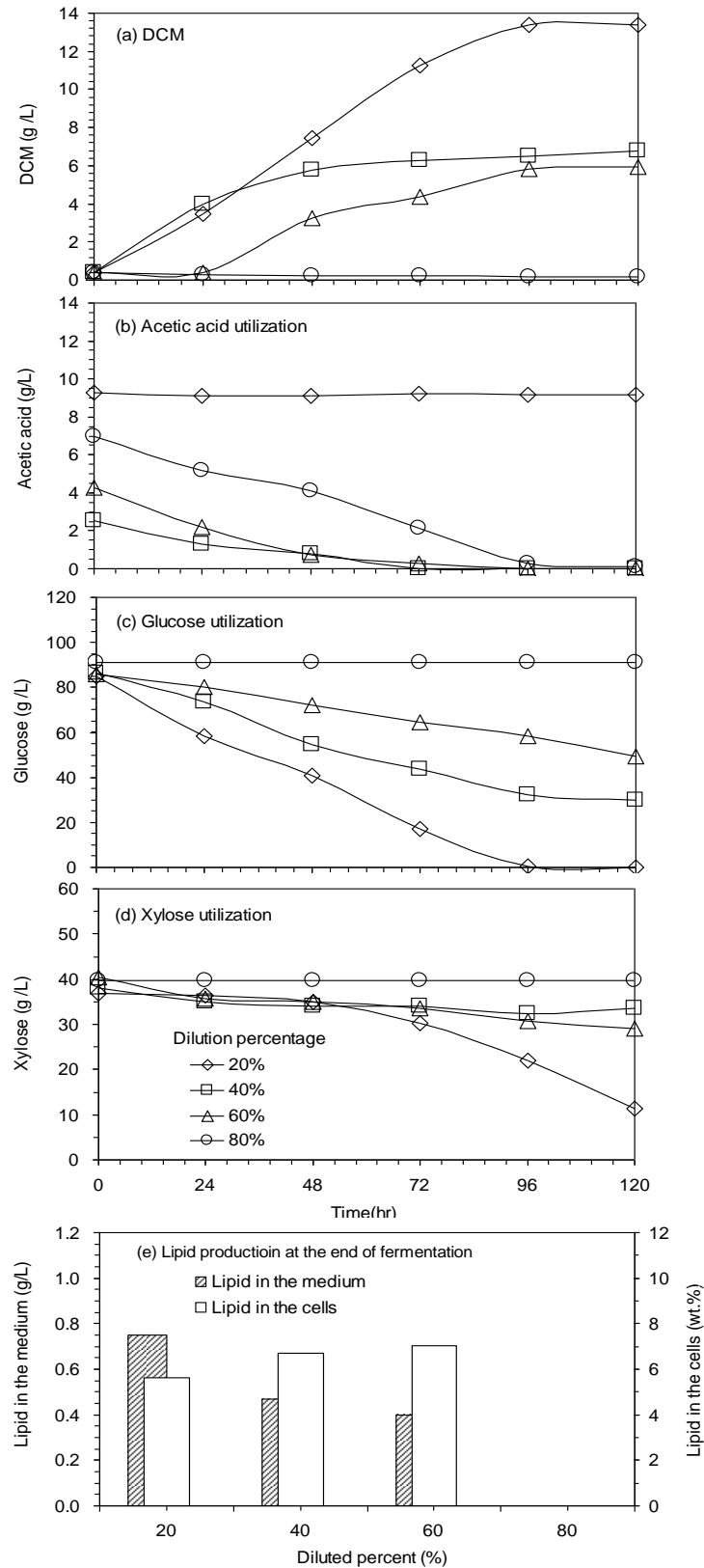


图 3.6 *T. cutaneum* 2.1374 在稀酸预处理的水解液中的发酵，糖消耗和油脂产生情况

Fig.3.6 Time course of the *T. cutaneum* 2.1374 in lignocellulosic hydrolysate fermentation. Fig. 3.6(a), 3.6(b), 3.6(c) and 3.6(d) indicate the concentration change of DCM, acetic acid, glucose, xylose verse fermentation time, respectively. Fig 3.6(e) indicate lipid production at the end of fermentation.

### 3.4 以芝麻酚为抗性筛选标志高通量筛选生物油脂高产菌株及其发酵情况

#### 3.4.1 以芝麻酚为抗性筛选标志高通量筛选生物油脂高产菌株

产油微生物油脂合成代谢调控中有两个关键酶，即柠檬酸裂解酶(ACL)和苹果酸酶(ME)。脂肪酸合成不仅需要连续供给乙酰 CoA 用于碳链延伸，还需要提供足够的 NADPH。每一个乙酰 CoA 单元在新生脂肪酸碳链上延伸时需消耗两当量的 NADPH 用于还原反应。研究表明，产油微生物油脂积累的多少与 ME 的代谢调控有关，如果 ME 受到抑制，则油脂积累下降。这是因为虽然微生物代谢途径中有许多生成 NADPH 的过程，但 FAS 几乎只能利用由 ME 产生的 NADPH。在相关文章中阐述<sup>[56]</sup>，在生产油脂的代谢路径中，苹果酸酶是代谢调控的关键酶，其酶活与油脂的含量成正相关性。而芝麻酚是该酶的强烈抑制剂。故采用芝麻酚作为抗性筛选的标志进行抗性筛选。

##### 3.4.1.1 芝麻酚对出发菌株抑制浓度的确定

在发酵培养基中加入不同浓度的芝麻酚，使其最终浓度分别为 0 g/L, 0.3 g/L, 0.5 g/L, 0.8 g/L, 1.0 g/L, 1.2 g/L, 1.4 g/L, 1.6 g/L, 1.8 g/L, 2.0 g/L 从中选出对皮状丝孢酵母生长完全抑制的最小浓度。(做了两套实验：一套在平板中，一套在摇瓶中)。

结论如下：芝麻酚对菌体的生长产生明显抑制。在摇瓶中浓度为 0.8 g/L 菌体即不生长。平板上 1.6 g/L 菌体不生长。确定这两个浓度为筛选浓度。

##### 3.4.1.2 菌体的前处理

100mL 锥形瓶内装 YPD 培养基 20mL，在摇床转速 180rpm 和 30℃ 条件下培养 24 小时，再经离心(10000r/min)、生理盐水冲洗、再离心(10000r/min)反复三次后，用生理盐水重新悬浮，取 5ml，加入 0.05g 的氯化锂处理 6 小时。

##### 3.4.1.3 诱变

将用氯化锂处理过的菌液加入 5ml 的培养皿中，加转子搅拌均匀后，紫外诱变，紫外灯功率 30W，照射距离 10cm，照射时间为 60s, 90s 和 120s。稀释涂板，计算致死率。最终计算得到的致死率如表 3.12 所示。

表 3.12 紫外诱变的致死率

Table 3.12 The fatality rate of UV induction of mutation

诱变时间(s)	致死率(%)
60	20.0
90	77.6
120	83.6

##### 3.4.1.4 诱变后培养

稀释涂平板后发现：在加入 1.6g/L 的芝麻酚的平板上，诱变后的菌种都没有生长，估计这个浓度过高。但是以 2% 的接种量接入加入 0.8 g/L 的芝麻酚的摇瓶里，诱变后的菌体生长良好，培养 4 天后测三个诱变剂量的 OD，发现诱变 120s 的菌体生长最好。将 120s 的菌液稀释涂布，准备初筛。

#### 3.4.1.5 用 96 孔深孔板做高通量的初筛

将 96 孔深孔板灭菌，每小格加入 1ml 的发酵培养基，其中含 0.8g/L 的芝麻酚，用牙签逐个挑取平板上的单菌落，放入小孔中，30°C, 180 rpm 培养 4 天。

将第一格加入没有经过诱变的菌落作为对照，待菌体生长起来后用酶标仪检测 OD<sub>612</sub>，挑选出比原始菌体 OD<sub>612</sub> 高的进行甘油管和平板划线保存。初筛总共 1045 株，挑选出 120 株进行复筛。

#### 3.4.1.6 复筛

筛选步骤：从划好的斜面上挑取单菌落接种于液体种子培养基中培养(30 °C, 180rpm, 24h) → 接种于限氮培养基中培养 96h(30 °C, 180rpm)，接种量为 10% → 发酵结束测定油脂。合成培养基筛选结果如表 3.13

表 3.13 合成培养基中筛选结果

Table 3.13 The results of screening in nitrogen-limited medium

菌体编号	菌体干重(g/L)	含油量(g/L)	含油率(wt. %)
4-19	5.63	2.41	42.72
4-17	5.48	2.45	44.62
11-3	5.72	2.62	45.8
8-6	5.56	2.30	41.37
出发菌	6.21	2.46	39.65

从表 3.13 可以看出，11-3 为最优的诱变菌株。由于我们的最终目的是在木质纤维素的水解液中获得高产菌株，故再将这些菌在水解液中进行一次筛选。筛选步骤同上。所用水解液组分如表 2.6 所示。

表 3.14 蒸汽膨爆预处理的水解液中筛选结果

Table 3.14 The results of screening in lignocellulosic hydrolysate

菌体编号	菌体干重(g/L)	含油量(g/L)	含油率(wt. %)
4-19	5.22	2.25	43.10
4-17	5.15	2.18	42.33
11-3	5.28	2.32	43.94
8-6	5.10	2.00	39.22
出发菌	6.47	2.28	35.24

从表 3.14 可以看出，11-3 仍然为最优的诱变菌株。而后续的稳定性的试验证明获得的

该菌株是稳定的。

### 3.4.1.7 苹果酸酶活测定

由于我们诱变是针对于抑制苹果酸的酶活来设计和进行的，所以在筛选结束后非常有必要测定苹果酸酶的活性，来证实诱变是否按照我们的既定路线来进行。计算酶活如表 3.15 所示

表 3.15 未诱变和诱变后菌株苹果酸酶酶活的测定

Table 3.15 The enzyme activity of malic acid in non-mutagenic and mutagenic strains

菌株	蛋白含量(g/L)	比活(U/mg 蛋白)
未诱变	1.455±0.028	0.74±0.011
诱变	1.194±0.021	1.45±0.035

从表中看到，苹果酸酶的酶活提高将近 1 倍，可见此次诱变实验是按照设计的路线进行的，最终达到了目的。

### 3.4.2 在摇瓶中对最佳发酵条件进行优化

产油微生物在培养基中碳源充足而某些营养成分(特别是氮源)缺乏时，菌体细胞分裂速度锐减，代谢活动转为以消耗碳源并合成和积累油脂为主。在油脂积累期，微生物基本上不再进行细胞繁殖，而是将过量的碳水化合物转化为油脂。因此，培养基的组成对于最终的油脂产量具有比较大的影响，而且改变发酵的条件对于菌体的代谢也有比较大的影响。

我们用诱变获得的高产菌株对培养基的组成和发酵条件两个方面进行优化，以期获得最大的油脂产量。在水解液中加入不同的氮源和无机盐，种子以 10% 的接种量接入水解液，发酵 96h 收集菌体，测定 OD，菌体干重，消耗的葡萄糖和木糖的量以及油脂的产生情况。

对于培养基的优化主要考虑两个方面(1)不同氮源对发酵的影响(2)C/N 对发酵的影响。

对于发酵条件主要考虑两个方面(1)不同起始 pH 的影响(2)不同溶氧条件的影响。

所有的条件都做两个平行样，标准差计算公式：

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

公式 (3-1)

#### 3.4.2.1 对培养基的优化

##### 3.4.2.1.1 向水解液中添加无机氮源和有机氮源对发酵的影响

据报道，有机氮源有利于菌体细胞的增殖，而无机氮源则有利于脂肪酸的合成<sup>[57]</sup>，因此，我们向水解液中添加不同的有机氮源和无机氮源，添加氮源的浓度均为 2g/L，考察对发酵产油的影响。

所添加的无机氮源包括： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ， $\text{NH}_4\text{Cl}$  和尿素

有机氮源包括：酵母粉，蛋白胨和谷氨酸钠

最终的实验结果如表 3.16 所示。

表 3.16 无机氮源和有机氮源对发酵的影响

Table 3.16 The effect of inorganic nitrogen and organic nitrogen on the fermentation

氮源	DCM (g/L)	含油量 (g/L)	葡萄糖消耗量 (g/L)	木糖消耗量 (g/L)	含油率 (%)	油脂得率 (g/ 100g 糖)
YE	5.57±0.13	1.73±0.071	62.07±0.014	5.74±0.16	31.06	2.55
蛋白胨	4.93±0.42	1.90±0.140	61.98±0.064	6.04±0.46	38.54	2.79
谷氨酸钠	4.99±0.035	1.91±0.071	61.9±0.0070	5.59±0.092	38.24	2.83
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.74±0.26	1.98±0.01	62.00±0.014	5.9±0.092	43.42	2.92
NH <sub>4</sub> Cl	5.51±0.14	1.9±0.056	61.99±0.010	6.55±0.007	34.51	2.77
尿素	4.9±0.028	1.98±0.14	61.90±0.057	5.79±0.19	40.41	2.93

从表中可以看出，对于菌体生长而言，无机氮源和有机氮源的效果差别不是非常大，分别是添加 YE 和 NH<sub>4</sub>Cl 能够获得最高的 DCM。对于油脂的生成，无机氮源要比有机氮源的效果好，细胞的含油量要高些。对于糖的消耗也没有太大的影响。综合最后的含油率，油脂得率和经济成本，选择(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为最佳的氮源。

#### 3.4.2.1.2 不同 C/N 对发酵的影响

微生物在体内积累大量的脂类会受到培养基中碳氮比的影响。一般来讲，细胞生长需要充足的氮源，而油脂合成一般是在氮源匮乏的条件下才开始，而且，油脂积累的最适碳氮比会随着菌株的不同而有所不同<sup>[58]</sup>。因此，需要在培养基中系统调整无机氮浓度以改变碳氮比，考察菌体内油脂积累情况。

由于水解液中的糖浓度是固定不变的，因此只有向水解液中添加不同浓度的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 来达到改变 C/N 的目的。所添加的硫酸铵的浓度分别是 0.5, 1, 2, 4g/L, 折算出的 C/N 分别是 348, 174, 87, 43, 实验结果如表 3.17 所示。

表 3.17 C/N 对发酵的影响

Table 3.17 The effect of C/N on the fermentation

C/N	DCM (g/L)	含油量 (g/L)	葡萄糖消耗量 (g/L)	木糖消耗量 (g/L)	含油率 (%)	油脂得率 (g/ 100g 糖)
43	6.89±0.68	2.88±0.11	61.94±0.042	8.19±0.87	41.77	4.11
87	4.74±0.26	1.98±0.01	62.00±0.014	5.90±0.092	43.42	2.92
174	4.47±0.42	2.14±0.17	61.91±0.021	5.54±0.057	47.87	3.17
348	4.90±0.15	1.96±0.11	61.97±0.042	5.91±0.13	40.00	2.89

从表中可以看出，C/N 是 43 时菌体生长最快，发酵最终 DCM 最高，达到了 6.89 g/L, C/N174 时含油量最高，综合考虑结果，最佳 C/N 是 174，能够获得最大的含油率和比较高的油脂得率。过高(348)菌体生长缓慢；过低(43)菌体都利用碳源生长，而不是积累

油脂，所以都不是最佳的发酵的条件，与文献报道一致。

### 3.4.2.2 对发酵条件的优化

#### 3.4.2.2.1 不同起始 pH 对发酵的影响

发酵培养基起始pH对菌体的生长与油脂产生有着密切的关系。用稀HCl或稀NaOH将培养基调至不同的pH，发酵96h后的结果表明，初始pH控制在5时较为合适，发酵效果最好，能够获得最大的含油率和油脂得率。起始pH为4时，菌体表现为不生长，估计pH过低抑制了菌体的生长。pH在6-9增长中，对于菌体生长和发酵的影响不是非常明显，而且过高的pH不利于菌体的发酵。所以在以后水解液发酵中选取的发酵初始pH为5。

表 3.18 不同 pH 对发酵的影响

Table 3.18 The effect of pH on the fermentation

初始DCM pH (g/L)	含油量 (g/L)	葡萄糖消耗量 (g/L)	木糖消耗量 (g/L)	含油率 (%)	油脂得率 (g/ 100g 糖)
4 -	-	-	-	-	-
5 5.67±0.68	3.12±0.17	62±0.028	6.47±0.071	55.03	4.56
6 7.59±0.035	3.31±0.014	61.85±0.071	8.77±0.085	43.64	4.39
7 8.02±0.045	3.08±0.13	61.75±0.03	8.72±0.034	38.4	4.37
8 8.3±0.061	3.22±0.24	62.51	9.38	38.8	4.48
9 7.105±0.52	2.95±0.092	62.51	9.38	41.52	4.10

#### 3.4.2.2.1 不同装液量对发酵的影响

250ml 的摇瓶分别装水解液 25, 50, 75, 100ml。结果如表 3.19 所示。

表 3.19 不同装液量对发酵的影响

Table 3.19 The effect of medium volume on the fermentation

装液量 (ml)	DCM (g/L)	含油量 (g/L)	葡萄糖消耗量 (g/L)	木糖消耗量 (g/L)	含油率 (%)	油脂得率 (g/ 100g 糖)
25	12.86±0.021	4.13±0.021	65.26	7.36	32.13	5.61
50	4.80±0.043	2.08±0.26	65.26	3.32±0.35	43.38	3.03
75	4.54±0.045	1.52±0.13	65.26	3.23±0.014	33.52	2.22
100	4.26±0.52	0.86±0.092	65.26	3.26±0.11	20.09	1.23

从表中可以看出，装液量对发酵影响极大。以250 mL三角瓶中的不同装液量来表示不同的溶氧量。当装液量为25ml，溶氧很高，菌体利用碳源飞速生长，发酵结束后DCM是其他装液量的3倍，但是油脂的产量却不是很高，表明过高的溶氧导致菌体利用碳源生长而不积累油脂。当装液量是100mL时，菌体生长又过慢，几乎没有积累油脂。50mL时菌体的油脂量保持一个较高状态，说明溶氧是影响菌体生长和油脂积累的重要因素，一个合适溶氧量能够有利于发酵和产物的形成。因此，选取装液量为50mL最佳装液量。

综上所述，对于培养基的优化，向水解液中添加无机氮源要比添加有机氮源效果好；

在无机氮源中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 效果最好；C/N178为最佳；对于发酵条件优化，起始pH为5时最好；在250mL三角瓶中装液量50mL为最佳装液量。

### 3.4.3 合成培养基在 2L 发酵罐中对最佳发酵条件进行优化放大

以上的实验结果实在摇瓶中得到的，我们对其进行一定的放大，在 2L 发酵罐中重复了上述实验。

由于水解液的原料进行了更换，所以酶水解液的组成成分发生了变化，我们首先用合成培养基模拟水解液的条件进行一系列的摸索实验。

培养基的组成如下：葡萄糖 38 g/L，木糖 7.8 g/L，乙酸 2.6g/L，乙酰丙酸 2.8g/L， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g/L。

#### 3.4.3.1 起始 pH 对发酵的影响

选择的起始 pH 为 5，6。发酵罐的 pH 由稀硫酸和 NaOH 控制。发酵曲线如图 3.7 所示。由于培养基中的葡萄糖没有消耗完，所以木糖没有任何消耗，故在图中没有列出。

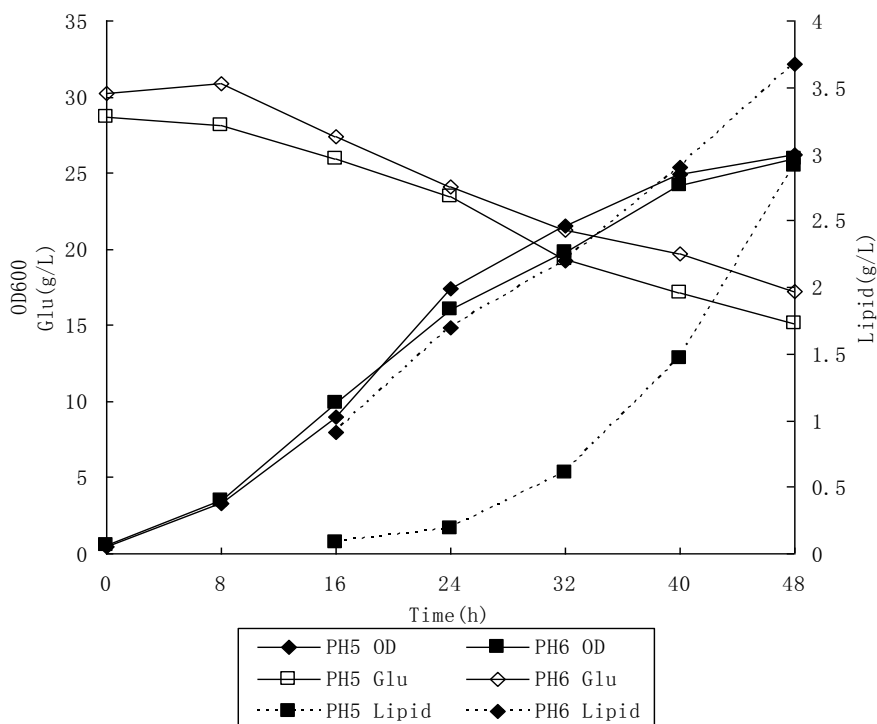


图 3.7 不同起始 pH 对发酵的影响

Fig. 3.7 The effect of pH on the fermentation

表 3.20 不同起始 pH 对发酵的影响

Table 3.20 The effect of pH on the fermentation

pH	细胞干重 (g/L)	葡萄糖消耗量 (g/L)	含油量 (g/L)	Y(X/G) (g/g)	油脂得率 (g/100g 糖)	含油率 %
5	12.65	13.50	2.91	0.93	0.22	22.97

6    12.53                    13.04                    3.68                    0.96                    0.28                    29.33

从图 3.7 和表 3.20 可以看出，对于菌体生长和葡萄糖的消耗，pH5 和 6 差别不大，但是对于油脂的积累有比较大的影响。pH6 时的含油量，含油率和油脂得率比较高。这个与在摇瓶中做水解液的情况是不同的。所以得出结论，对于水解液和合成培养基而言，最适的初始 pH 是不同的。对于合成培养基是 6，而水解液是 5。

### 3.4.3.2 通气量(VVM)对发酵的影响

改变通气速率，其作用是增加液体中夹持气体体积的平均成分。但是在常速搅拌下，增加通气速率以提高氧的传递速率是一种递减性的，即当气流速度越大，再增加其速度对氧的溶解度的提高作用越小。并且当系统被气流引起泛液时，传质速率会显著下降，使泡沫增多，罐的有效利用率减小。所以找到一个合适的通气量对发酵还是非常有意义的。培养基初始 pH6，我们选择的 VVM 分别是 0, 0.38, 0.76 和 1.14，对应的初始通气量是 0, 25, 50 和 75L/h。发酵曲线如图 3.8 所示。

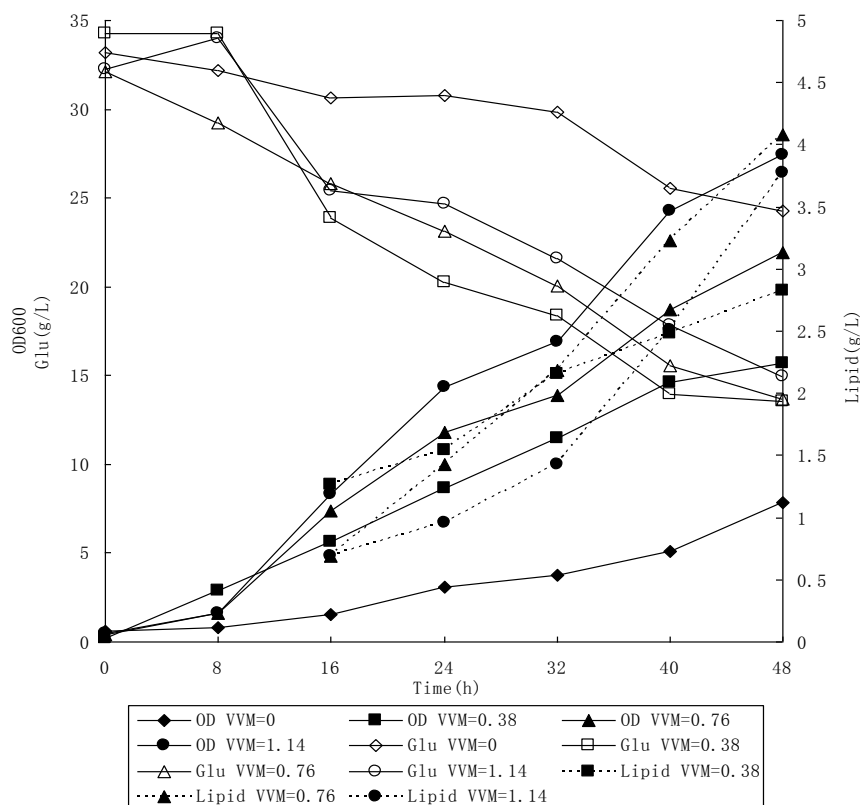


图 3.8 不同通气量(VVM)对发酵的影响

Fig. 3.8 The effect of VVM on the fermentation

表 3.21 不同通气量(VVM)对发酵的影响

Table 3.21 The effect of VVM on the fermentation

VVM (L/minL)	细胞干重 (g/L)	葡萄糖消耗量 (g/L)	含油量 (g/L)	Y(X/G) (g/g)	油脂得率 (g/100g 糖)	含油率 %
-----------------	---------------	-----------------	--------------	-----------------	--------------------	----------

0	3.82	8.87	1.93	0.43	0.079	29.62
0.38	7.58	20.7	2.83	0.366	0.136	37.33
0.76	10.59	18.44	4.08	0.574	0.218	38.55
1.14	13.23	17.33	3.77	0.763	0.218	28.53

从图 3.8 和表 3.21 可以看出, 由于 *Trichosporon cutaneum* CX2 是好氧菌, 如果不通气, 菌体根本就没有生长起来, 但是也不是通气量越高对发酵越好, 当通气量到 1.14 时, 菌体生长速度很快, 但是含油量不高, 表明菌体利用碳源生长而不是积累油脂。最佳的通气量是 0.76, 这时候菌体的含油量, 含油率和油脂产率都是最高的。以后实验均采用这个通气量。但是我们注意到葡萄糖消耗最快的是通气量是 0.38, 而且这个条件下葡萄糖消耗的是最多的。

### 3.4.3.3 溶氧(DO)对发酵的影响

对溶解氧进行控制的目的是把溶解氧浓度值稳定控制在一定的期望值或范围内。在微生物发酵过程中, 溶解氧浓度与其它过程参数的关系极为复杂, 受到生物反应器中多种物理、化学和微生物因素的影响和制约。本实验我们主要是通过固定通气量, 改变转速来达到稳定溶氧的目的。选择的溶氧分别是 5%, 10%, 20% 和 30%。

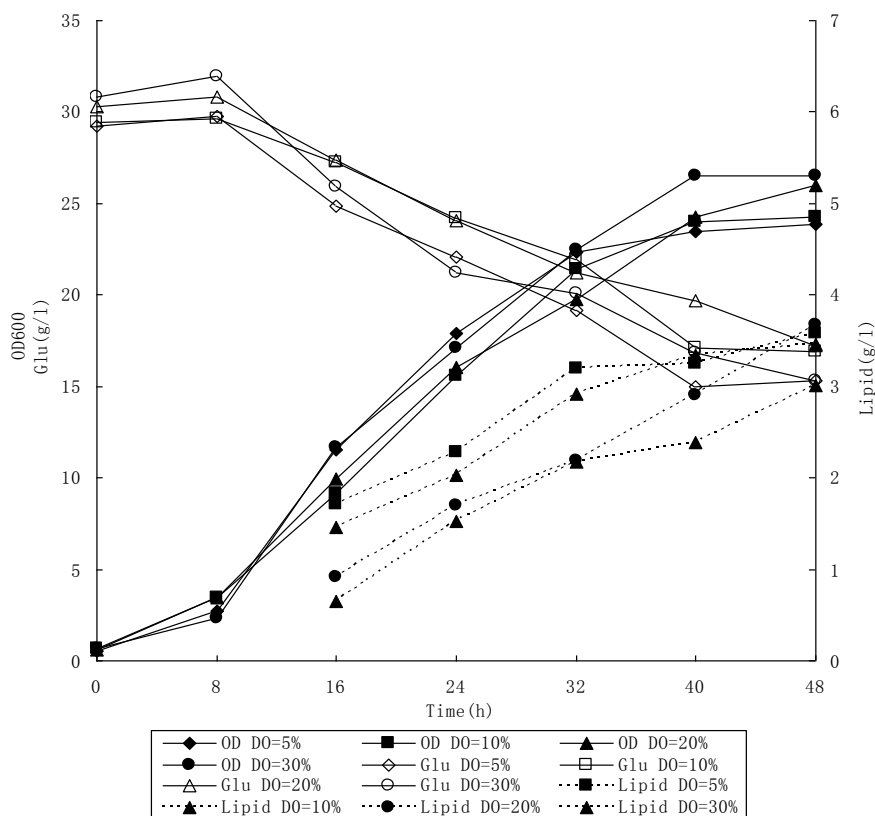


图 3.9 不同溶氧(DO)对发酵的影响

Fig. 3.9 The effect of DO on the fermentation

表 3.23 不同溶氧(DO)对发酵的影响

Table 3.23 The effect of DO on the fermentation

DO (%)	细胞干重 (g/L)	葡萄糖消耗量 (g/L)	含油量 (g/L)	Y(X/G) (g/g)	油脂得率 (g/100g 糖)	含油率 (%)
5	11.52	13.89	3.57	0.829	0.257	31.06
10	11.71	12.53	3.00	0.934	0.239	25.65
20	12.53	13.04	3.68	0.961	0.282	29.33
30	12.81	15.49	3.46	0.827	0.223	27.02

从图 3.9 和表 3.23 可以看出，当溶氧达到 20%时，菌体的含油量，含油率和油脂产率都是最高的。本实验中我们是通过将溶氧和发酵罐的搅拌速率偶联的方法控制溶氧维持在一个恒定的水平，即当溶氧低于设定值时发酵罐会自动提高搅拌速率来提高溶氧。但是由于发酵罐自身有一个反应时间，故本实验中所述的溶氧并不是严格的准确。

### 3.4.3.4 C/N 对发酵的影响

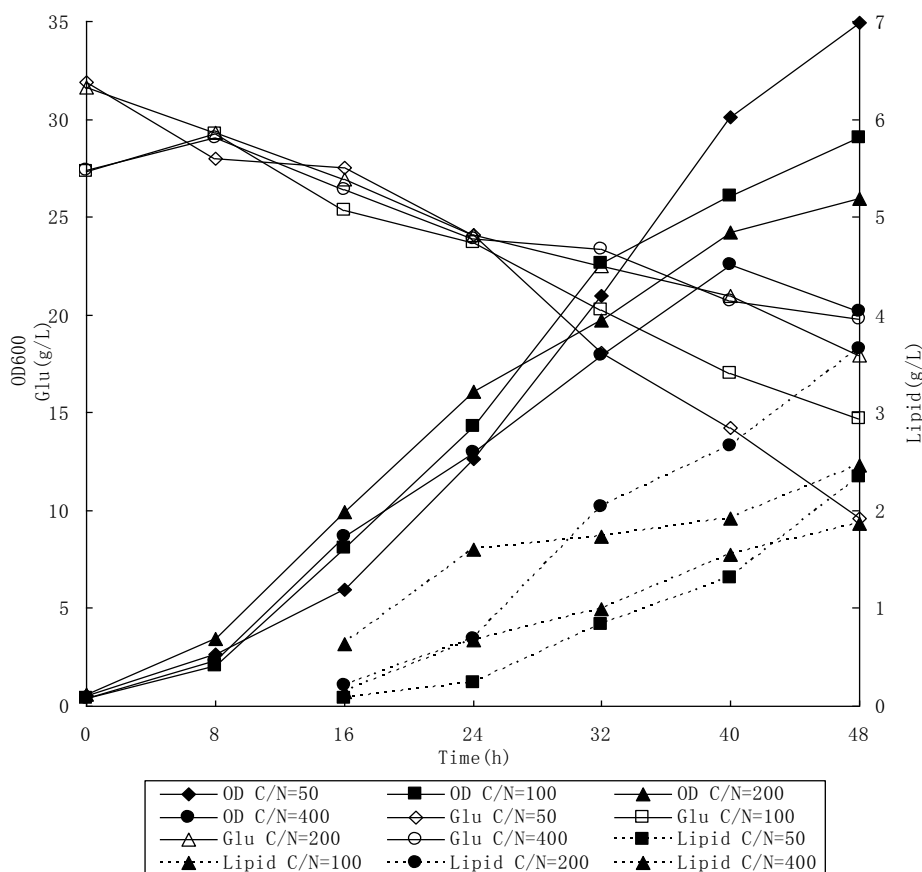


图 3.10 不同 C/N 对发酵的影响

Fig. 3.10 The effect of C/ oNn the fermentation

表 3.24 不同 C/N 对发酵的影响

Table 3.24 The effect of C/N on the fermentation

C/N	细胞干重 (g/L)	葡萄糖消耗量 (g/L)	含油量 (g/L)	Y(X/G) (g/g)	油脂得率 (g/100g 糖)	含油率 (%)
50	16.85	22.27	2.35	0.757	0.105	13.94
100	14.02	12.67	1.86	1.106	0.147	13.27
200	11.67	13.65	3.65	0.855	0.263	31.29
400	9.74	7.64	2.47	1.275	0.32	25.31

发酵罐中 C/N 实验要比摇瓶中的现象明显，即低 C/N 有利于菌体生长，高 C/N 有利于菌体积累油脂。从图 3.10 中我们看到一个很有意思的现象，高 C/N(400)在前 16h 生长速度要快于低 C/N(50, 100)，此后生长速度变慢，开始积累油脂，最终的 DCM 要比低 C/N(50)低将近一半，仅有 9.74g/L。当 C/N 为 50 菌体生长极为迅速，消耗的葡萄糖也最多，但是含油量不是最高，油脂得率是最低的，充分证实了低 C/N 有利于菌体生长而不利于积累油脂。最佳的 C/N 仍旧为 200，菌体的含油量，含油率和油脂产率都是最高的，这个与摇瓶中得到的结论是一致的。

#### 3.4.4 在 2L 发酵罐中对水解液的最佳发酵条件进行优化

在合成培养基中对发酵条件进行了一系列的摸索，最终得到了最佳的发酵结果。现在在水解液中对这些结果进行一次验证。

##### 3.4.4.1 pH 对发酵的影响

在水解液中选取的初始 pH 为 5, 6 和不控制(初始为 5, 发酵的过程中不加酸碱控制, 让其自然变化)。

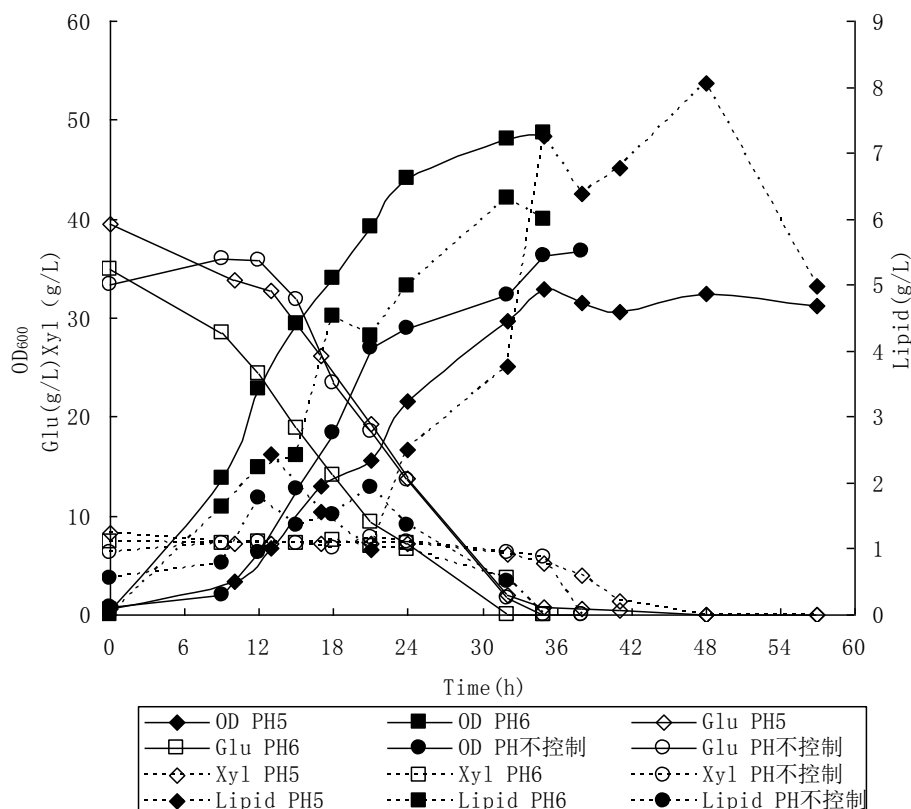


图 3.11 水解液中不同起始 pH 对发酵的影响

Fig. 3.11 The effect of pH on the fermentation in lignocellulose hydrolysate

表 3.25 水解液中不同起始 pH 对发酵的影响

Table 3.25 The effect of pH on the fermentation in lignocellulose hydrolysate

pH	细胞干重 (g/L)	总糖的消耗量 (g/L)	含油量 (g/L)	Y(X/S) (g/g)	油脂得率 (g/100g 糖)	含油率 (%)
5	15.68	47.77	8.06	0.328	0.169	51.4
6	23.17	48.64	6.32	0.599	0.163	27.3
不控制	15.57	31.59	1.92	0.493	0.013	12.3

从图 3.11 和表 3.25 中我们可以得出结论：和摇瓶中得到的结论相同，水解液的最佳起始 pH 是 5。通过发酵曲线我们发现，一般在经过 36h，水解液中的葡萄糖就消耗完毕，48h 后木糖也消耗完毕。但是在相同时间下，在合成培养基中葡萄糖都消耗不完。可见在水解液中糖的利用率要更高。经过分析发现水解液中存在的低浓度的 HMF 对发酵起到提供还原力的作用，可以促进糖的利用。此外存在的未知促进因素还需要继续研究。油脂生成存在一个最高点，pH5 是 48h，pH6 是 40h，经过该点后油脂含量急剧下降，分析原因是水解液中糖不能够再满足现有菌体的生长发酵，菌体开始调动自身积累的油脂满足代谢要求。

### 3.4.4.21 溶氧对发酵的影响

水解液初始 pH5，选择的溶氧分别是 10%，20%和 30%。

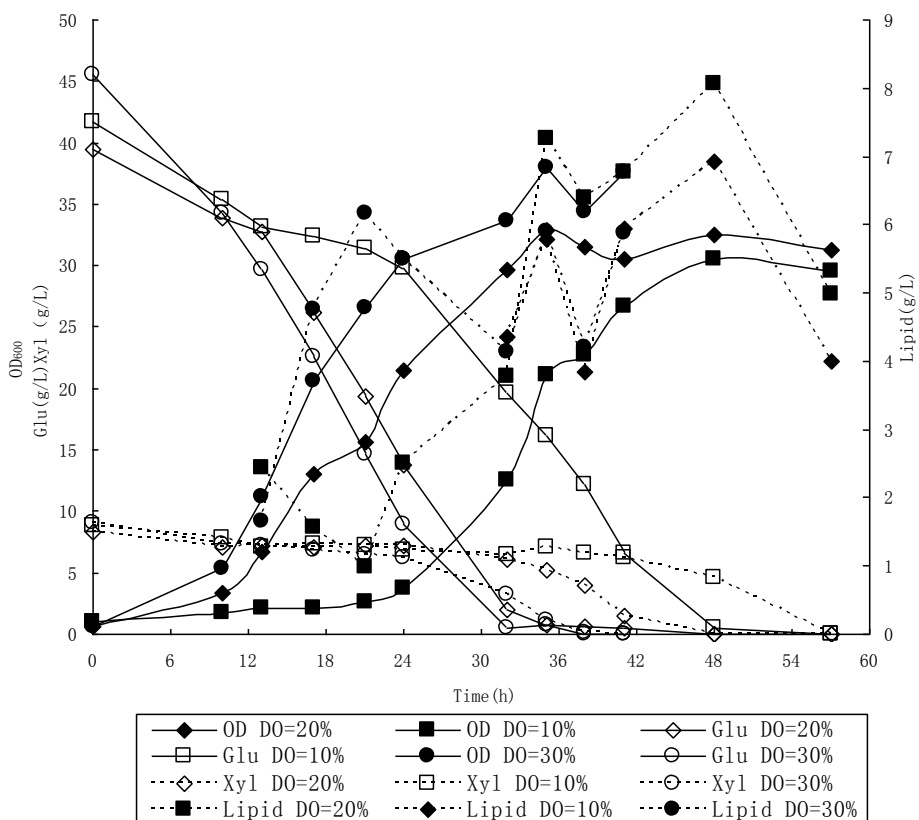


图 3.12 水解液中不同溶氧(DO)对发酵的影响

Fig. 3.12 The effect of DO on the fermentation in lignocellulose hydrolysate

表 3.26 水解液中不同溶氧(DO)对发酵的影响

Table 3.26 The effect of DO on the fermentation in lignocellulose hydrolysate

DO (%)	细胞干重 (g/L)	总糖的消耗量 (g/L)	含油量 (g/L)	Y(X/G) (g/g)	油脂得率 (g/100g 糖)	含油率 (%)
10	14.75	45.43	6.92	0.325	0.152	46.9
20	15.68	47.77	8.06	0.328	0.169	51.4
30	18.12	54.68	5.87	0.331	0.107	32.5

从图 3.12 和表 3.26 可以看出, 当溶氧达到 20% 时, 菌体的含油量, 含油率和油脂产率都是最高的。高的 DO(30%) 适合菌体生长, 不利于产油。高 DO 即 30% 时菌体消耗的糖浓度是最高的, 但是产油确实最低的, 同时 DCM 又是最高的, 所以有理由相信菌体将大量的糖用于生长而没有用来产油。所以在后续发酵中选取 20% 为最佳的 DO。

### 3.4.4.3 C/N 对发酵的影响

水解液初始 pH5, 选择的 C/N 分别是 50, 200, 400 和 800。

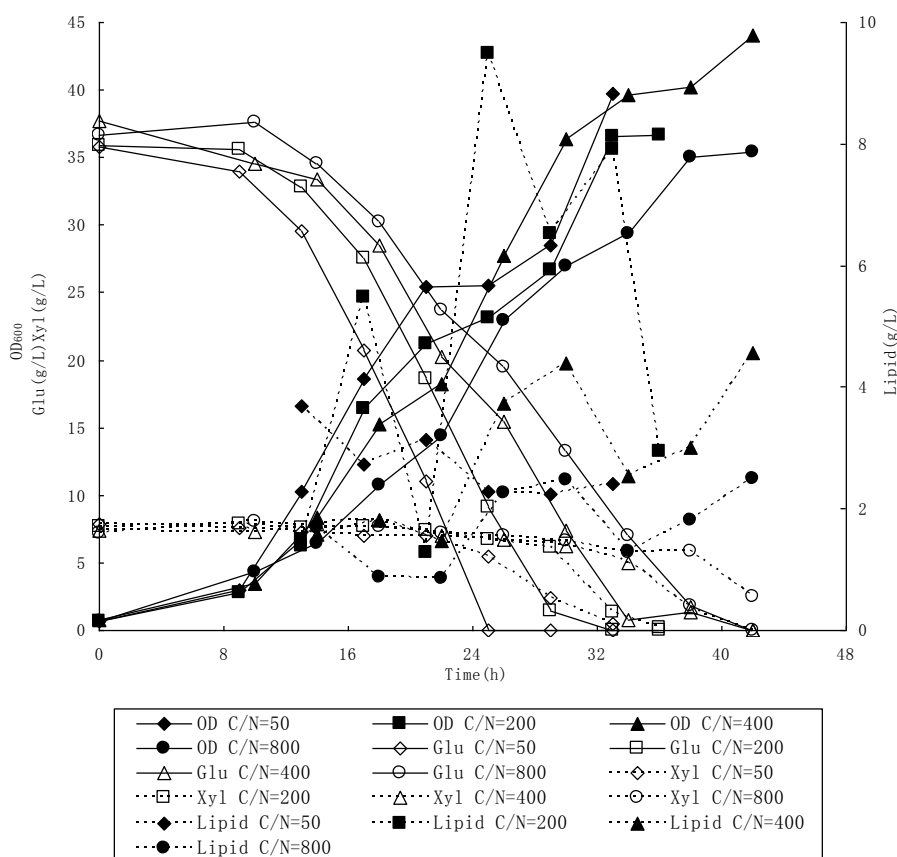


图 3.13 水解液中 C/N 对发酵的影响

Fig. 3.13 The effect of C/N on the fermentation in lignocellulose hydrolysate

表 3.27 水解液中 C/N 对发酵的影响

Table 3.27 The effect of C/N on the fermentation in lignocellulose hydrolysate

C/N	细胞干重 (g/L)	总糖的消耗量 (g/L)	含油量 (g/L)	Y(X/G) (g/g)	油脂得率 (g/100g 糖)	含油率 (%)
50	12.26	25.54	3.14	0.48	0.12	12
200	15.68	47.77	8.06	0.328	0.169	51.4
400	17.54	31.52	4.39	0.56	0.14	25
800	13.03	24.00	2.47	0.54	0.10	19

从图 3.13 和表 3.27 可以看出，当 C/N 是 200 时，菌体的含油量，含油率和油脂生产率都是最高的。这与合成培养基的上罐实验结果是一致的。

## 第 4 章 结论和展望

- (1) 以葡萄糖为唯一碳源，在限氮培养基中从 10 种菌中选取生长情况较好的 6 个菌种：粘红酵母 *R. glutinis* 2.107、*R. glutinis* 2.704、皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* 2.1374、红冬孢酵母 *R. toruloides* 2.1389 和油脂酵母 *L. starkeyi* 2.1390、*L. starkeyi* 2.1608。测定了收集得到的细胞的含油量，含油率和油脂的产率。其中 *T. cutaneum* 2.1374 发酵液的含油量含油率都是最高，分别是 2.75g/L 和 39.8%。
- (2) 在三种脂肪酸族的抑制物中，乙酸的抑制能力是最强的。当其浓度达到 5 g/L 时，六种菌只有 *T. cutaneum* 2.1374 可以生长；甲酸也是一种比较强的抑制剂。而 *T. cutaneum* 2.1374 又展现了最好的甲酸抗性；而乙酰丙酸是最弱的一种抑制剂，当其浓度达到 10 g/L 时对 *T. cutaneum* 2.1374 都没有抑制作用。
- (3) 对于呋喃族的抑制物，糠醛在比较低的浓度时对菌体的生长发酵都产生了很大的抑制作用。*T. cutaneum* 2.1374 还是对糠醛抗性最好的菌。另一方面，5-HMF 在低浓度时促进了菌体对葡萄糖的利用即有促进发酵的作用。5-HMF 对于 *T. cutaneum* 2.1374 基本上没有特别大的抑制作用。
- (4) 对于芳香族的化合物，香兰素和 4-羟基苯甲醛也是比较强的抑制剂。同样在 6 种菌中 *T. cutaneum* 2.1374 表现出了最佳的抗性。
- (5) 基于上述结论，选择 *T. cutaneum* 2.1374 为最佳的菌株在水解液中进行发酵。但是发现含油率只有 7%，效率很低。
- (6) 选取 *Trichosporon cutaneum* AS 2.1374 作为起始菌株，利用物理与化学诱变结合的方法，以苹果酸酶抑制剂芝麻酚作为筛选压力进行高通量筛选，获得了一株能够在水解液中高产的菌株 *Trichosporon cutaneum* CX2。酶学性质测定结果表明，*T. cutaneum* CX2 的苹果酸酶比活与起始菌株相比提高 1 倍。
- (7) 以 *T. cutaneum* CX2 为发酵菌株，在摇瓶中以水解液为培养基对发酵条件进行了优化，得到最佳的发酵条件：a 无机氮源要比有机氮源的效果好。b  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  是无机氮源中的最佳氮源。c 最佳 C/N 是 174，能够获得最大的含油率和比较高的油脂得率。e 水解液发酵中选取的最佳发酵初始 pH 为 5。f 50mL 时菌体的油脂量保持一个较高状态，是最佳装液量。在最佳的发酵条件下菌体的含油量和含油率分别是 3.12 g/L 和 55.03%。诱变之前菌体在最佳发酵条件下菌体的含油量和含油率分别是 2.28 g/L 和 35.24%。诱变前后二者分别提高了 36.8% 和 56.2%，可见诱变取得了很大的进步。
- (8) 以 *T. cutaneum* CX2 为发酵菌株，在 2L 发酵罐中以合成培养基对发酵条件进行了优化，得到最佳的发酵条件：a. 最佳 C/N 是 200，能够获得最大的含油率和比较高的油脂得率。b. 水解液发酵中选取的最佳发酵初始 pH 为 6。c. 最佳的通气量是 0.76。d. 最佳

的溶氧是 20%。在最佳的发酵条件下菌体的含油量和含油率分别是 4.08 g/L 和 38.55%。

(9) 以 *T. cutaneum* CX2 为发酵菌株, 在 2L 发酵罐中中以水解液对发酵条件进行了优化, 得到最佳的发酵条件: a. 最佳 C/N 是 200, 能够获得最大的含油率和比较高的油脂得率。b. 水解液发酵中选取的最佳发酵初始 pH 为 5。c. 最佳的溶氧是 20%。d. 水解液发酵中选取的最佳发酵 C/N 是 200。在最佳的发酵条件下菌体的含油量和含油率分别是 8.06 g/L 和 51.4%。

(10) 菌体在水解液中比在合成培养基中发酵效果好。经过分析发现水解液中存在的低浓度的 HMF 对发酵起到提供还原力的作用, 可以促进糖的利用。此外存在的未知促进因素还需要继续研究。

## 参考文献

- [1] 陈建省, 张春庆, 田纪春, 费美娟, 邓志英, 郭启芳, 李兴锋. 生物质能源发展的趋势及策略[J]. 山东农业科学. 2008, 4: 120-124
- [2] 刘新建, 王寒枝. 生物质能源的现状和发展前景[J]. 科学对社会的影响. 2008, 3: 5-9
- [3] 马威, 赵晓军. 我国生物质能源的开发和前景[J]. 化工时刊. 2007, 21: 72-74
- [4] 陈曦, 韩志群, 孔繁华, 胡徐腾. 生物质能源的开发与利用[J]. 化学进展, 2007, 8: 1091-1097
- [5] 张百良, 宋华民, 李世欣. 生物能源发展及科技创新机遇[J]. 农业工程学报, 2008: 24(2): 285-289
- [6] 曹稳根, 段红. 我国生物质能资源及其利用技术现状[J]. 安徽农业科学, 2008: 36(14): 6001-6003
- [7] Tyson K S. Biodiesel research progress 1992-1997[R]. NREL Technical Report, NREL/TP-580-24443, 1998
- [8] 韩德奇, 袁旦, 王尽涛等. 生物柴油的现状与发展前景[J]. 石油化工技术经济, 2002, 18(4): 32-37
- [9] 郭卫军, 闵恩泽. 发展我国生物柴油的初探[J]. 石油学报(石油加工), 2003, 19(2): 1-6
- [10] Gerpen J V. Business management for bio-diesel producers[R]. NREL Technical Report, NREL/SR-510-36342, 2004
- [11] Pizarro AVL, Enoch YP. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth[J]. Process Biochem 2003; 38:1077-82
- [12] Han HW, Cao WL, Zhang JC. Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and CO<sub>2</sub> as co-solvent[J]. Process Biochem 2005; 40:3148-51
- [13] Ratledge C, Wynn J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. Adv Appl Microbiol, 2002, 51: 1-51.
- [14] Ratledge C. Lipid biotechnology, a wonderland for the microbial physiologist[J]. J Am Oil Chem Soc, 1987, 64(12): 1647-1656
- [15] Ratledge c. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production[J]. Biochimie, 2004, 86(11): 807-815
- [16] Radedge C. Microorganisms for lipids[J]. Acta Biotechnol, 1991, 11: 429-438
- [17] Gill C O, Hall M J, Ratledge C. Lipid accumulation in an aleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture[J]. Appl Environ Microbiol, 1977, 33:231-239

- [18] Ma F, Hanna MA. Biodiesel production: a review. *Biores Technol* 1999; 70:1-15
- [19] Allen CAW, Watts KC, Ackman RG, Pegg MJ. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition[J]. *Fuel* 1999; 78:1319-26
- [20] Leung DY. Development of a clean biodiesel fuel in Hong Kong using recycled oil[J]. *Water Air Soil Pollut* 2001; 130:277-82
- [21] Tyson KS. Biodiesel research progress 1992-1997. NREL Technical Report, NREL/TP-580-24443, 1998
- [22] Gerpen J V. Business management for biodiesel producers[J]. NREL Technical Report, NREL/SR-510-36342, 2004
- [23] Ratledge C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30: 1047-1050
- [24] Sorger D, Daum G. Triacylglycerol biosynthesis in yeast[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61: 289-299
- [25] Gangar A, Karande A A, Rajasekharan R. Isolation and localization of a cytosolic 10 S triacylglycerol biosynthetic multienzyme complex from oleaginous yeast. *J Biol Chem*, 2001, 276: 10290-10298
- [26] Sangar. Triacylglycerol biosynthetic multienzyme complex from oleaginous yeast[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 10290-10298
- [27] Song Y, Wynn J, Li Y, et al. A pre-genetic study of the isoforms of malic enzyme associated with lipid accumulation in *Mucocircinelloides*[J]. *Microbiology*, 2001, 147: 1507-1515
- [28] dos Santos M M, Raghevendran V, Kotter P, et al. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments[J]. *Metab Eng*, 2004, 6: 352-363
- [29] 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(1) :153-155
- [30] Fall R, Phelps P, Spindler D. Bioconversion of xylantotriglycerides by oil-rich yeasts[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 47: 1130-1134
- [31] Tyrson K S, Bozell J, Wallace R. Biomass oil analysis: Research needs and recommendations[R]. NREL Technical Report, NREL/TP-510-34796, 2004
- [32] Ratledge C. Biochemistry, stoichiometry, substrates and economics[M]. In: Moreton R S. *Single Cell Oil*. New York: Wiley, 1988: 33-70
- [33] <http://www.eere.energy.gov/biomass/ethanol-yield-calculator.html>
- [34] 黄建忠, 施巧琴, 周晓兰等. 深黄被孢霉高产脂变株的选育及其发酵的研究[J]. *微生物学通报*, 1998, 25: 187-191
- [35] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil(SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media[J]. *Bioresour Technol*, 2004, 95: 287-291

- [36] Chandel A K, Chan E S, Rudravaram R, et al. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal[J]. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2007; 2(1): 14-32
- [37] Claassen PA, Sijtsma L, Stams AJM, de Vries SS, Weusthuis RA. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers[J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 52:741-745
- [38] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. *Adv Appl Microbiol* 2002; 51:1-51
- [39] 杜连祥. 工业微生物学实验技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992: 131-132.
- [41] 王莉, 孙玉梅, 王培忠等. 金属离子对发酵性丝孢酵母发酵产油脂的影响[J]. *大连轻工业学院学报*, 2005, 24(4): 259-262.
- [42] Tyson K S. Biodiesel research progress 1992-1997[R]. NREL Technical Report, NREL/TP-580-24443, 1998
- [43] 韩德奇, 袁旦, 王尽涛等. 生物柴油的现状与发展前景[J]. *石油化工技术经济*, 2002, 18(4): 32-37
- [44] 赵宗保. 加快微生物油脂研究为生物柴油产业提供廉价原料[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(2): 8-11
- [45] 刘淑君, 杨文博, 施安辉. 高产油脂酵母选育及摇瓶发酵条件的研究[J]. *微生物学通报*, 2000, 27(2) : 93-97
- [46] Wahlbom C F, Hahn-Hagerdal B. Furfural, 5-hydroxymethylfurfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnol Bioeng* 2002; 78:172-178
- [47] Parajo J C, Domínguez H, Domínguez J M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates[J]. *Bioresour Technol* 1998; 66: 25-40
- [48] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition[J]. *Bioresour Technol* 2000; 74:25-33
- [49] Klinker HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass[J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 66: 10-26
- [50] Larsson S, Quintana-Sainz A, Reimann A, Nilvebrant NO, Jonsson LJ. The influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Appl Biochem Biotechnol* 2000; 84/86:617-632
- [51] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, Nilvebrant NO. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood[J]. *Enzyme Microb Technol* 1999, 24:151-159
- [52] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *J*

Biochem Physiol, 1959, 37: 911-917

[53] Mari'a Lorena Falcone Ferreyra, Carlos S, Andreo, Florencio E, Podesta. Purification and physical and kinetic characterization of a photosynthetic NADP-dependent malic enzyme from the CAM plant *Aptenia cordifolia*[J]. *Plant Science* 2003,164: 95-102

[54] Heather L. Shearer, David H. Turpin, David T. Dennis. Characterization of NADP-dependent malic enzyme from developing castor oil seed endosperm[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2004, 429: 134–144

[55] Yuxiang Cheng, Tetsuo Takano, Xinxin Zhang, Song Yu, Dali Liu, Shenkui Liu. Expression, purification, and characterization of two NADP-malic enzymes of rice (*Oryza sativa* L.) in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification* 2006, 45: 200–205

[56] James P. Wynn, Andrew Kendrick<sup>1</sup>, and Colin Ratledge. Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circinelloides* via its action on malic enzyme [J]. *Lipids*, 1997, 32: 605-610

[57] 张峻, 邢来君, 王红梅. 亚麻酸高产菌株的选育及发酵产物的分离提取[J]. *微生物学通报*. 1993, 20(3) : 140-143

[58] Ratledge C, Jame P W. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. *Adv Appl Microbiol*, 2002(51): 1-51

### 攻读硕士期间发表的文章

1. Xi Chen, Zihui Li, Xiaoxi Zhang, Fengxian Hu, Dewey D. Y. Ryu, Jie Bao. 2009.  
Screening of Oleaginous Yeast Strains Tolerant to Lignocellulose Degradation Compounds.  
Applied Biochemistry and Biotechnology. Online. DOI 10.1007/s12010-008-8491-x.
2. 鲍杰, 陈曦。一种产油酵母菌株及其制备生物油脂的方法。专利, 申请号:  
200810204495.4

## 致 谢

本文是在导师鲍杰教授的精心指导和关怀下完成的。导师敏锐的思维、严谨的治学态度、丰富的科学知识、无私的敬业精神以及诲人不倦的崇高品德使我感到由衷的钦佩，令我终生难忘，受益匪浅。谨此向他致以最衷心的感谢！

鲍杰教授，胡凤仙，辛秀娟老师在实验中给了我精心的指导，在此表示衷心的感谢！

同时，实验过程中也得到博士生董宏伟，张建，楚德强，研究生荆新云，任佳，黄潇的很大帮助，同样表示由衷的感谢！