

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

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

# 华东理工大学

## 学位论文

基于玉米秸秆水解液的皮状丝孢酵母

油脂发酵的研究

黄 潇

指导教师姓名: 鲍杰教授、华东理工大学

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2011-4-18 论文答辩日期: 2011-5-20

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: (姓名、职称)

评 阅 人: (姓名、职称)

---

## 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：

年 月 日

## 基于玉米秸秆水解液的皮状丝孢酵母油脂发酵的研究

### 摘要

生物柴油是当今能源危机下一种重要的石化能源的替代能源，而微生物油脂又是生产生物柴油的一种很有潜力的原料。生物油脂生产的商业化应用的主要瓶颈是成本问题，如何有效的降低成本成为关键前提。由于自然界中存在大量廉价的以农业废弃物为主要形式的木质纤维素，这些可以作为底物被用于生产生物油脂，从而代替淀粉基原料有效降低生产成本。在本研究中，玉米秸秆水解液被用作一株皮状丝孢酵母诱变菌 CX1 的原料经过发酵生产油脂。首先，本文探讨了影响使用木质纤维素水解液为原料的油脂发酵效果的关键因素，逐一排查了包括溶氧、pH、碳氮比、温度以及抑制物等因素的影响。结果表明，利用玉米秸秆水解液生产生物油脂的过程中存在两个重要问题制约着油脂的生产：其一是由于玉米秸秆原料中存在的丰富氮源使得水解液中的初始碳氮比很低；其二是玉米秸秆在预处理过程中产生的各种抑制物存在于水解液中，对皮状丝孢酵母的菌体生长和油脂积累都有明显的抑制作用。针对这两大问题，本研究引入了生物脱毒的方法，对经过预处理过程后的玉米秸秆进行脱毒，去除关键抑制物。结果表明，生物脱毒不仅可以去除玉米秸秆水解液中的主要抑制物，而且具有一定的脱氮效果从而提高了碳氮比，这样油脂的生产水平得到了显著的提高。由于预处理的强化是一种工业可行的增加木质纤维素转化率以提高碳氮比的有效方法，而强化的预处理过程会产生浓度更高的抑制物使得菌体无法生长，因此生物脱毒为预处理的强化从而提高碳氮比提供了有效的解决途径。这样，生物脱毒和预处理强化相结合的方法被应用于玉米秸秆为原料的微生物油脂生产过程中，优化的油脂产率为  $1.31 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ，菌体含油率为 23.5%，相比于未经脱毒和预处理强化处理的玉米秸秆，油脂产率和菌体含油率都提高了一倍。

**关键词：**微生物油脂；油脂酵母；皮状丝孢酵母 CX1；玉米秸秆水解液；碳氮比

## Lipid Production by *Trichosporon cutaneum* Using Corn Stover Hydrolysate

### Abstract

Microbial lipid is a potential feedstock for biodiesel production, and the key barrier for the commercial utilization is its production cost. One important way to reduce the cost is to use the cheap lignocellulose biomass feedstock such as agricultural residues instead of the starch based feedstock. In this work, corn stover (CS) hydrolysate was used as the feedstock for lipid fermentation using a mutant *Trichosporon cutaneum* CX1 strain. Several factors effecting the lipid production in CS hydrolysate including Diluted Oxygen (DO), pH, carbon-to-nitrogen molar ratio (C/N ratio), temperature and inhibitors generated from the pretreatment process. The results showed that there were two major factors limiting lipid production in hydrolysate: one is the low initial C/N ratio; the other one is various kinds of inhibitors present. The application of biotransformation after the pretreatment process was found the function of not only removing the major inhibitors but also promoting the C/N ratio by reducing certain amount of nitrogen content. Then the combination of biotransformation and pretreatment intensification was attempted to get enhanced glucose transformation from cellulose and higher initial C/N ratio. The optimized lipid productivity and lipid content were  $1.31 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  and 23.5% respectively, doubled than that using common pretreated CS.

**Keywords:** microbial lipid; oleaginous yeast; *Trichosporon cutaneum* CX1; corn stover hydrolysate; C/N molar ratio

## 目录

前言 .....	1
第 1 章 文献综述 .....	2
1.1 生物柴油概述 .....	2
1.1.1 开发生物柴油的意义 .....	2
1.1.2 生物柴油的历史和现状 .....	2
1.1.3 生物柴油的原料 .....	3
1.2 微生物油脂概述 .....	5
1.2.1 微生物油脂的研究历史 .....	5
1.2.2 微生物油脂的生产菌 .....	6
1.2.3 微生物油脂的合成 .....	7
1.3 以木质纤维素为原料的微生物油脂生产 .....	10
1.3.1 木质纤维素概述 .....	10
1.3.2 木质纤维素转化为可利用糖 .....	11
1.3.3 木质纤维素油脂生产基本工艺 .....	12
1.3.4 木质纤维素处理中产生的抑制物 .....	12
1.3.5 木质纤维素水解液中抑制物的脱除 .....	14
1.4 课题研究的意义与内容 .....	15
第 2 章 材料与方法 .....	17
2.1 材料与设备 .....	17
2.1.1 菌种 .....	17
2.1.2 实验试剂 .....	17
2.1.3 培养基 .....	18
2.2 培养方法 .....	20
2.2.1 菌种保藏 .....	20
2.2.2 种子培养 .....	20
2.2.3 发酵实验 .....	20
2.3 水解液制备方法 .....	20
2.3.1 玉米秸秆的前处理 .....	20
2.3.2 原料预处理 .....	20

2.3.3 预处理后原料的脱毒.....	21
2.3.4 原料的糖化水解.....	21
2.4 分析方法.....	21
2.4.1 糖浓度和水解液中抑制物浓度的测定.....	21
2.4.2 水解液中氨氮测定.....	22
2.4.3 水解液中总氮测定.....	23
2.4.4 水解液中 C/N 比计算.....	24
2.4.5 菌体浓度的测定.....	24
2.4.6 菌体干重的测定.....	24
2.4.7 油脂量测定.....	24
2.4.8 油脂脂肪酸组成测定.....	24
2.4.9 油脂染色观察.....	24
第 3 章 实验结果.....	26
3.1 发酵过程中影响油脂积累的关键因素.....	26
3.1.1 不同发酵条件对油脂发酵的影响.....	26
3.1.2 水解液中 C/N 对油脂发酵的影响.....	29
3.1.3 油脂积累关键因素小结.....	34
3.2 水解液中抑制物的影响及预处理强度增加.....	34
3.2.1 合成培养基中添加抑制物对菌株生长的影响.....	34
3.2.2 预处理强度增大对水解液中糖和抑制物的影响.....	36
3.2.3 经不同预处理强度处理后的水解液油脂发酵情况.....	36
3.3 生物脱毒.....	38
3.3.1 生物脱毒的优势.....	38
3.3.2 预处理强度的进一步提高.....	40
3.3.3 脱毒程度的确定.....	41
3.3.4 3.0%酸浓度预处理强度下的发酵特征.....	42
3.4 生物油脂.....	43
3.4.1 生物油脂的脂肪酸组成.....	43
3.4.2 菌体菌体内油脂的苏丹黑染色.....	44
第 4 章 结论和展望.....	45
参考文献.....	47
致谢.....	54

## 前言

当今社会，能源问题是国际社会存在的普遍问题，日益严峻的能源短缺问题正在困扰或者威胁着许多国家的发展。因此，可再生能源的研究和开发正是当下的热点问题。生物柴油由于其具有高的能量密度、燃烧充分、好的润滑性能等被液体能源产品所期望的特性而倍受青睐，同时它还具有易降解、方便安全运输、可再生和含硫量低等环境友好的特性，是非常理想的化石燃料的未来替代品。然而，制约生物柴油工业应用和大规模生产的主要问题是成本问题，如利用植物油脂的生物柴油生产，原料成本占总成本的 70% 以上。自然界中存在一类微生物能将碳水化合物等转化为自身油脂而储存起来，油脂积累达到自身重量 20% 以上的被称为产油微生物，部分菌种油脂含量甚至可以超过干重的 70%。微生物油脂可以被连续生产而不需要大面积土地，同时微生物生长不受气候和季节影响且生产周期短，这样微生物油脂成为生物柴油非常有潜力的一种生产底物。

为了增大微生物油脂大规模生产的可行性，原料问题首当其冲。含木质纤维素的农林业废弃物原料广泛存在于自然界中，而且其价格便宜，通常被低效率的焚烧。在一定的物理化学条件下，木质纤维素可以被转化为微生物可利用的底物。因此，利用木质纤维素衍生糖类的油脂酵母，可以为微生物油脂的大规模生产提供经济可行性。

本课题利用一株皮状丝孢酵母的诱变菌株 CX1 以玉米秸秆水解液为原料，通过仅添加廉价无机盐而接近实际生产应用的发酵手段，研究酵母在原水解液中油脂生产的实际问题。一方面，玉米秸秆存在着丰富的氮源，导致水解液的初始碳氮比处于很低水平，对油脂的积累非常不利。另一方面，在处理玉米秸秆的过程中，要经历高温高压预处理反应来破坏顽固的纤维素结构，同时各种抑制物在此条件下由各种五碳糖、六碳糖等组分转化而产生。这些抑制物对于菌体的生长和产油都具有十分严重的影响和抑制。因此本研究针对这两方面的问题，寻找工业可行的方法。经生物脱毒处理，抑制物抑制效应解除，同时碳氮比得到一定提升。在生物脱毒的基础上，增强预处理作用的强度则有利于一定程度提高碳氮比，这样油脂的积累情况有了明显的提升。这两种方法的联合运用，为将来利用木质纤维素为原料生产油脂的研究提供了可行的工业化方法，建立了良好的基础。

## 第 1 章 文献综述

### 1.1 生物柴油概述

#### 1.1.1 开发生物柴油的意义

当今社会最大的问题就是日益减少至接近枯竭的能源，而化石能源是支撑社会发展和文明进程的最主要能源形式。国际能源协会预测，世界范围内对能源总的需求量将在未来的 25 年内上升 50%。另外，世界油产品的日需求量在 2006 年已经达到 8430 万桶/天，到了 2007 年，这一数字增长到 8580 万桶/天<sup>[1]</sup>。石油基燃料因为日益增加的需求和再生困难导致资源告罄，目前已经被广泛地认为不可持续。由于对汽油和柴油的需求量大增以及伴随的配套精炼能力限制，油价在过去的三年里持续攀升，NYMEX 原油期货价格在 2005 年 6 月达到 60 美元/桶的高价，在 2005 年 8 月，超过了 65 美元/桶的历史高位，而到了 2006 年 7 月 13 日<sup>[2]</sup>，国际原油期货价格更是达到 78.4 美元/桶的最高峰。

另外，化石燃料燃烧所排放的大量二氧化碳，被认为是全球气候变暖的主要原因。当前大气层中二氧化碳含量为 383 ppm，而在不远的将来，二氧化碳的水平会随着化石燃料燃烧量的增加和土地利用率的变化而持续攀升。IPCC 预测 2100 年大气中二氧化碳浓度将达到 541-970 ppm。如果煤、沥青砂、甲烷水合物等化石燃料被持续使用，2100 年二氧化碳排放量将超过此前预测的水平<sup>[3]</sup>。化石燃料被认为是环境污染的主要来源，人们迫切地需要发展替代能源的炼制，同时炼制过程也必须满足持续、可再生、环境友好的要求。

在当今油价高涨、燃料资源日益枯竭的情况下，作为一种可短时间内再生的、杰出的化石基柴油替代能源，生物柴油吸引了人们越来越多的注意力。生物柴油燃料是来源于植物油脂和动物脂肪等长链脂肪酸的单甲基酯化产物。许多研究表明生物柴油的特性非常接近于传统的柴油燃料<sup>[4-6]</sup>。因此生物柴油可以被理想地用于柴油发动机内，而不需或仅需很少地修饰。生物柴油比传统的柴油有更高的十六烷值和 10-11% 的氧气，并且不包含芳香物质和硫。这些特性使得生物柴油燃烧后不会与传统柴油一样伴随着一氧化碳、烃类和污染性颗粒物等会造成环境污染的物质的释放<sup>[7,8]</sup>。但是生物柴油面临大规模生产的经济性的挑战，即要求净能源输出、可大量生产并且具有经济竞争力，且不以减少食物供应为代价。

#### 1.1.2 生物柴油的历史和现状

当 1900 年巴黎展览会展出由 Rudolph Diesel 设计的使用花生油作为燃料的柴油发动机时，植物油脂就被开始使用于发动机引擎中。在十九世纪三、四十年代的第二次世界大战中，植物油脂被当作应急燃料使用<sup>[9]</sup>。尽管起初体现出了优势，但是当使用时间延长时，发动机出现了一系列严重的引擎问题，如腐蚀润滑油、植物油氧化聚合化及活塞

环黏着等<sup>[10,11]</sup>。加上廉价的石油基柴油的出现和其黏着性的降低，柴油发动机不再将植物油脂作为燃料使用，同时汽车生产商也改进了发动机引擎，以适应石油基柴油的特性。这样几十年内植物油脂都不再被用作发动机燃料。1973 年，阿拉伯石油市场油价开始上涨，汽油和柴油价格突然增加 4 倍，此时生物柴油又再一次进入人们视野。从 1973 年开始，许多不同来源的油脂被用于生产生物柴油。

在过去的十年中全球范围内生物柴油工业发展迅速，欧盟在生物柴油产量方面首屈一指。2006 年欧盟生物柴油总产量从 2005 年的 320 万吨增加到 490 万吨，增加了 54%，延续了上一年 65% 的高增长率。这样，从 2004 年到 2006 年，欧盟生物柴油的产量从 190 万吨增长到了 490 万吨，产量翻倍，加速了欧盟生物柴油市场的扩张。美国近几年内生物柴油的产量也大幅提升，从 2000 年的 200 万加仑增长到 2006 年的 2.5 亿加仑，再到 2007 年的 4.5 亿加仑。尽管 2006 年的 2.5 亿加仑的产量仍然少于欧盟，但是在 2004 到 2006 年期间，平均每年有 1.13 亿加仑的增长量。根据美国国家生物柴油委员会的报道，在 2007 年初有 105 座工厂运行，年生产能力达到 8.64 亿加仑。如果在建的工厂完工并加入生产，年生产能力将增加 17 亿加仑<sup>[12,13]</sup>。生物柴油生产能力的快速增长不仅发生在发达国家，在发展中国家（例如巴西、中国、阿根廷、印度尼西亚、马来西亚等）同样增长迅速。世界生物柴油市场预计在 2016 年达到 370 亿加仑，年增长率达到 42% 左右。未来十年，欧盟仍然是生物柴油生产、加工和消费的主体，美国市场紧随其后<sup>[14]</sup>。

### 1.1.3 生物柴油的原料

当前制备生物柴油主要采用化学法，即动植物油脂在高温下通过酸碱催化反应，和甲醇等低碳醇发生转酯化反应，得到相应的脂肪酸甲酯，如图1.1。在不同来源的油脂转酯化过程中，三酰甘油和通常为甲醇或乙醇的醇类发生反应，生成脂肪酸甲酯和甘油。整个反应过程包含三个连续的可逆反应：1，三酰甘油转化为二酰甘油；2，二酰甘油转化为单酰甘油；3，甘油从单酰甘油中释放<sup>[15]</sup>。在这三个步骤中，脂肪酸甲酯都被释放用作生物柴油的粗产物，进而进入到下游纯化环节。用作反应的醇油比为3:1，但是为了提高反应的产物转化效率通常加入过量的醇。同时为了增加反应的可行性，催化剂也被使用。总之，转酯化反应的效率决定于许多因素，如使用的醇的种类、醇油比、温度、试剂种类和纯度以及催化剂的用量等<sup>[16]</sup>。

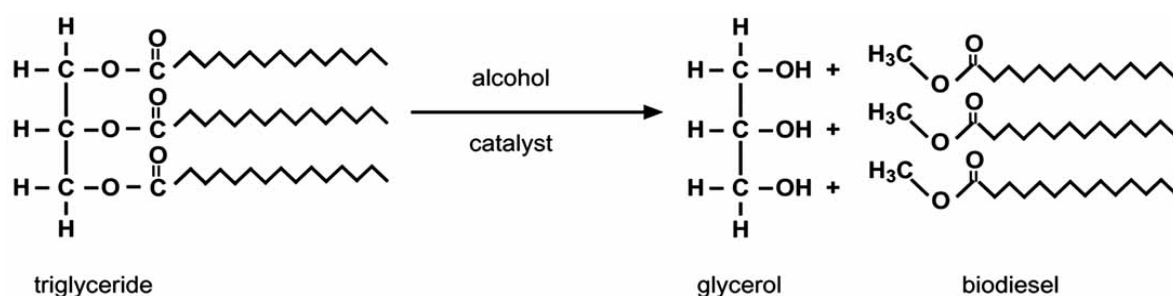


图1.1 三酰甘油在醇催化下的转酯化反应

Fig. 1.1 Transesterification of triglyceride with alcohol

用于生产生物柴油的主要来源是大豆油、菜籽油、棕榈油以及初榨橄榄油等<sup>[17,18]</sup>。在美国95%的生物柴油使用大豆油作为生产原料，而欧洲市场则更偏向于使用油菜籽和加拿大油菜作为生产原料。Sommerville计算了2005年的大豆油平均产量为450磅/英亩，低于加拿大菜籽油产量650磅/英亩<sup>[19]</sup>。加拿大和美国每年收获700万到1000万吨油菜籽，因此在北美油菜籽被认为是一种更具前景的原料而发展成为主要的经济作物。在东南亚地区，生产生物柴油的主要原料为提取自棕榈树种子的棕榈油。棕榈油的产量仅次于大豆油，并且有超过的趋势。一些亚洲国家政府正聚焦于用棕榈油来生产生物柴油来迎合欧洲国家对生物柴油的大量需求，他们的生物柴油产量已经超过了10万吨/年。越来越多的国家，包括哥伦比亚、韩国、印度、土耳其及其他的一些欧洲国家，正在使用生物柴油替代化石燃料作为能源。马来西亚立法规定本国所有的柴油都需要添加5%的棕榈油。由于棕榈油含有较高的饱和脂肪酸，基于棕榈油的生物柴油体现出较高的倾点温度（约为15°C）而仅适用于热带地区，不适用于环境温度低于倾点温度的低温严寒地区。但是通过石油基柴油和棕榈油基的柴油以3:2体积比混合后，这个问题即得到了改善<sup>[20]</sup>。一些地区的政府和公司则在考虑用热带地区常见的麻风树作为生产生物柴油的原料，这种植物可以生产在荒地且单位土地油脂产量是大豆的四倍，玉米的十倍。其他可以作为生产生物柴油原料的植物，包括*Balanites aegyptiaca*<sup>[21]</sup>、棉籽、葵花籽、大麻、亚麻、芥末等，甚至藻类。

利用藻类生产生物柴油也体现出了一些优势，例如较高的生长速率和较大的单位面积产率。有些藻类因其具有高含油率而非常适合于生物柴油的生产。美国国家可再生能源实验室（NREL）报告基于藻类的单位面积油脂产率是大豆的200倍<sup>[22]</sup>。与其他的油料作物不同的是，微藻生长的非常快速，通常可以在24小时内得到生物量的倍增，在指数生长期生物量倍增时间短至3.5小时，而油脂含量可以超过80%<sup>[23,24]</sup>。不同种类的微藻可以产出不同种类的油脂和碳水化合物，但不是所有的微藻油脂都适合于生物柴油的生产<sup>[25-27]</sup>。值得注意的是，遗传和代谢工程对微藻柴油生产的经济性有非常大的影响<sup>[28-30]</sup>。

尽管以植物作为原料的生物柴油体现出了一些环境效益，但是也出现了一些担忧。在菲律宾、印度尼西亚等国家，大面积的热带森林遭到砍伐用于种植有经济效益的作物，特别是棕榈树<sup>[31]</sup>。在美国和欧洲，生物柴油的生产主要利用高质量的食物级植物油例如豆油和菜籽油为原料，这样生物柴油的成本主要决定于原料油脂的价格，而食物级油脂的高价则严重导致了生物柴油生产的经济不可行性。不幸的是，随着最近几年植物油价格的攀升，生物柴油的经济可行性每况愈下。在20世纪90年代，生物柴油生产中原料成本占总成本的60-75%<sup>[32]</sup>，但是当今却占到总成本的85%<sup>[33,34]</sup>。Haas进行了一项调查表明生物柴油的生产成本价格和原料价格之间存在线性的关系，即植物油价每升高0.22美元/公斤，生物柴油成本提高0.02美元/升<sup>[33]</sup>。更为严重的是有人认为生物柴油会加大世界粮食供应的压力，这样寻找制造生物柴油的替代原料迫在眉睫，例如来源于畜产品加工厂和餐馆等的废弃动植物油。最近几年，越来越多的注意力被集中于开发微生物油脂，从而作为生物柴油生产的原料。微生物油脂，通常被称作单菌体油脂，是由产油微生物如

酵母、霉菌、细菌等在一定的条件下积累产生的，微藻也可以算作此类<sup>[35]</sup>。这类油脂和动植物油脂组成相似，适合被用作生物柴油生产。除此之外，它还有很多方面的优势，例如：短的生产周期，较少的劳动力要求，较少受到季节、地域以及气候的影响以及容易放大生产等<sup>[36]</sup>。尽管利用微生物油脂生产生物柴油还存在各种问题需要解决，但是它是一种很有潜力和优势的原料。

## 1.2 微生物油脂概述

### 1.2.1 微生物油脂的研究历史

微生物油脂的研究可以追溯到19世纪70年代，使用微生物油脂作为商品油的尝试贯穿了上世纪始终，尤其在两次世界大战期间德国不遗余力研究微生物油脂以保证油产品的需求。毋庸置疑，很多具有优势的油脂生产菌的筛选工作都是在德国在1920年到1945年之间进展的。在其他国家如美国和英国等，微生物油脂的开发则出现于19世纪50年代末期。但是，1945年后农业的显著发展，意味着油脂和其他食物的大量廉价供应。很多人都认为来源于微生物的油脂不可能与大豆油、菜籽油和葵花籽油等作物油脂在价格上抗衡，于是用于微生物油脂生产的生物技术一度被停止研发。到了20世纪60年代，由于酵母可以以廉价的石油炼制废料烷烃为底物生长，对单菌体蛋白的研究重新唤起了大家的兴趣。当时单菌体蛋白主要被大型炼油厂用作廉价的动物饲料和人类消费品。单菌体蛋白的生产不仅是一个很新颖的想法，它同样也带来了生物过程技术的大发展，例如出现了2500立方的发酵单元。Ratledge认为，如果单菌体蛋白每吨可以带来大约300美元的经济效益，那么用微生物生产的单菌体油脂也可以带来同样吸引人的经济效益。但不幸的是，在发展单菌体蛋白技术的同时，人们没有预料到20世纪后半叶农业的大发展。伴随农业技术的发展，作物种类增加、产率提高，这样大大降低了动物饲料如大豆饼等的价格。在1960年到1990年，饲料价格基本没有增长。19世纪70年代石油输出国组织（OPEC）提高了油价，这使得单菌体蛋白生产的经济性雪上加霜，根本不能与作物饲料竞争，人们也不再使用烷烃作为原料生产单菌体蛋白。

尽管有证据证实微生物油脂不可能与商业植物油在成本上竞争，但是在生产高附加值油脂上利用微生物产油有优势。不同的蛋白组分通常很少影响到营养质量，但油脂并不是这样。不同类型的油脂价格相差很大，少到0.3美元每公斤，多到100美元每公斤。如果生产特异高附加值油脂的微生物可以被发现，那么商业开发仍然有实际性。从19世纪80年代初期，单菌体油脂的生产倾向于生产高附加值油脂，这些油脂因为来源稀少而在市场上有着很高的价格。另一个微生物油脂的可行性分析是基于估算微生物可以积累的油脂含量，也就是说，微生物菌体能积累的油脂越多，商业应用的价值就越大。而油脂的产量和质量在不同的微生物之间差别也非常显著。在微生物油脂研究特别是酵母油脂的综述上，分类了高产的油脂酵母和低产的油脂酵母，例如酿酒酵母和产烷假丝酵母不会积累高于生物量10%以上的油脂，而圆红冬孢酵母和丝氏油脂酵母却可以积累约占生物量70%甚至更多的油脂。另外，这些油脂大部分以三酰基甘油的形式存在，在化学

组成上和商业油脂及脂肪非常类似。那些可以积累在自身生物量20%以上油脂的微生物，被定义为产油微生物<sup>[37]</sup>。

### 1.2.2 微生物油脂的生产菌

有许多种微生物都可以储藏油脂，例如微藻、细菌、真菌以及酵母等，但不是所有的菌种都适合用于生产生物柴油（如表 1.1）。产油微生物内，油脂的积累通常由基因构造决定，不同菌甚至同种菌的不同菌株的最大含油率差别很大。在不同的微生物菌体内和在不同的条件下（如温度，pH，培养时间等），油脂含量和组成也不尽相同<sup>[38-40]</sup>。

表 1.1 几种微生物的含油率

Table 1.1 Lipid content of several oleaginous microorganisms

菌种	含油率 (%干重)	菌种	含油率 (%干重)
微藻		酵母	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	55-77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
细菌		真菌	
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25	<i>Hunicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

#### 1.2.2.1 微藻

微藻是一种在光能驱动下利用二氧化碳为原料合成生物油脂的微生物<sup>[24,41]</sup>，它也可以合成其他类型的可再生生物燃料，例如甲烷和氢气等<sup>[25,42-45]</sup>。研究表明，许多微藻富含  $\omega 3$  和  $\omega 6$  脂肪酸<sup>[46]</sup>，必须氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸等。大部分微藻的油脂成分是三酰甘油，脂肪酸主要组成成分为 C16 和 C18，并且和其他植物油一样含有硬脂酸、油酸、亚油酸、棕榈酸等成分<sup>[40]</sup>。微藻可以非常快速地生长并积累大量油脂，在 24 小时内的生物量往往可以翻倍。微藻菌体的平均含油率在 1%-70%之间，在适宜的条件下甚至可以达到干重的 90%<sup>[24,47]</sup>。到目前为止以干重计算，微藻市场每年产出大约 5000 吨，约 12 亿美元/年的销售额<sup>[48-50]</sup>。相比于其他能源作物，微藻由于具有高光合效率、高生物量产出以及快速生长的特性而被认为是一种非常好的生物柴油合成原料。

#### 1.2.2.2 细菌

尽管微藻具有很高的含油率，但是他们比细菌需要更大的占地面积和更长的发酵时间。表1.1显示几乎所有的细菌含油率都低于微藻，在其干重的20%-40%，例如 *Acinetobacter calcoaceticus*和*Arthrobacter sp.*分别为38%和40%。细菌在生产生物柴油方

面具有相对较高的生长速率和易于培养的优势（通常仅需12-24小时即可达到很大的生物量）。油脂积累细菌，特别是那些放射菌类能在生长限制的条件下，利用像葡萄糖类的单一碳源合成相当多的脂肪酸（大约占菌体干重的70%），并且将他们以甘油三酯的形式储存于菌体内<sup>[38]</sup>。但是大部分细菌不是油脂产生菌，仅仅一部分细菌可以积累复杂的油脂<sup>[51]</sup>。另外，存储于菌体外膜的油脂难以被提取。因此在实际生物柴油的生产中，利用产油脂细菌作为原料没有太大意义。

### 1.2.2.3 酵母和真菌

从十九世纪八十年代开始，酵母和真菌（主要是霉菌）被认为是理想的产油微生物<sup>[52,53]</sup>。一些酵母菌，例如*Rhodotorula glutinis*和*Lipomyces starkeyi*可以积累高达干重的70%的油脂。当产油酵母*Cryptococcus albidus*在氮限制的条件下培养，能够积累高于干重的60%的油脂。这些油脂通常由90%的三酰甘油组成，其中饱和脂肪酸占44%，和许多植物油很相似<sup>[54]</sup>。油脂酵母和霉菌积累的油脂富含多不饱和脂肪酸，或者具有特殊的结构，主要有：油酸（18:1）、亚油酸（18:2）、棕榈酸（16:0）、棕榈油酸（16:1）<sup>[55]</sup>。例如非常著名的油脂生产酵母*Rhodosporidium toruloides* Y4主要积累由C16和C18长链脂肪酸组成的油脂<sup>[56]</sup>。最近有报道称，该菌种通过摇瓶分批补料培养25天，可以达到151.5 g/L的干重和48.0%的含油率<sup>[57]</sup>。丝状真菌*Mortierella alliacea* YN-15在50L的发酵罐中，可以在菌丝内以三酰甘油的形式积累多不饱和脂肪酸，菌体干重达到46.1 g/L，油脂产量为19.5 g/L，多不饱和脂肪酸为7.1 g/L<sup>[58,59]</sup>。基于这些数据，油脂酵母和真菌被认为是很有潜力的生产生物油脂的生产菌。

## 1.2.3 微生物油脂的合成

### 1.2.3.1 微生物油脂的合成过程

合成三酰甘油是动植物和微生物中普遍存在的初级代谢途径的一部分，其中磷脂酸（PA）和甘油二酯（DAG）是两个关键的中间代谢产物。首先，甘油-3-磷酸（DHAP）通过酰基转移酶（GAT）在sn-1位酰化成溶血磷脂酸（LPA）。作为另外一条途径，DHAP在酰基转移酶（DHAPAT）作用下在sn-1位酰化成1-acyl-DHAP，再被还原酶（ADR）还原成LPA。其次，LPA在磷脂酸磷酸酶（PAP）作用下去磷酸化成DAG。最后，由DAG转化为三酰甘油（TAG）的酰基转移反应由多种脂肪酰基转移酶完成。在酿酒酵母中主要是Dga1P和Lro1P两种酶催化，Dga1P是标准的甘油二酯酰基转移酶（DAGAT），同GAT和DHAPAT一样以脂肪酰CoA为酰基供体。而Lro1P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。

### 1.2.3.2 微生物油脂代谢调控

利用产油微生物积累单菌体油脂已经超过了100年，但是为什么其中只有一部分微生物可以生产并积累油脂？为什么部分产油菌种可以积累比其他菌种更多的油脂？仅仅在20年前，这种产油菌种的积累油脂过程的机理才开始被探索<sup>[60]</sup>。例如在600种酵母中，只有不到30种可以积累超过其自身生物量20%的油脂<sup>[60,61]</sup>。*Rhodotorula spp.*和*Cryptococcus curvatus*可以积累自身生物量40%-70%的油脂，而*Saccharomyces cerevisiae*和食物酵母*Candida utilis*在相同条件下仅能积累自身生物量5%-10%的油脂。以下可以解释此现象。

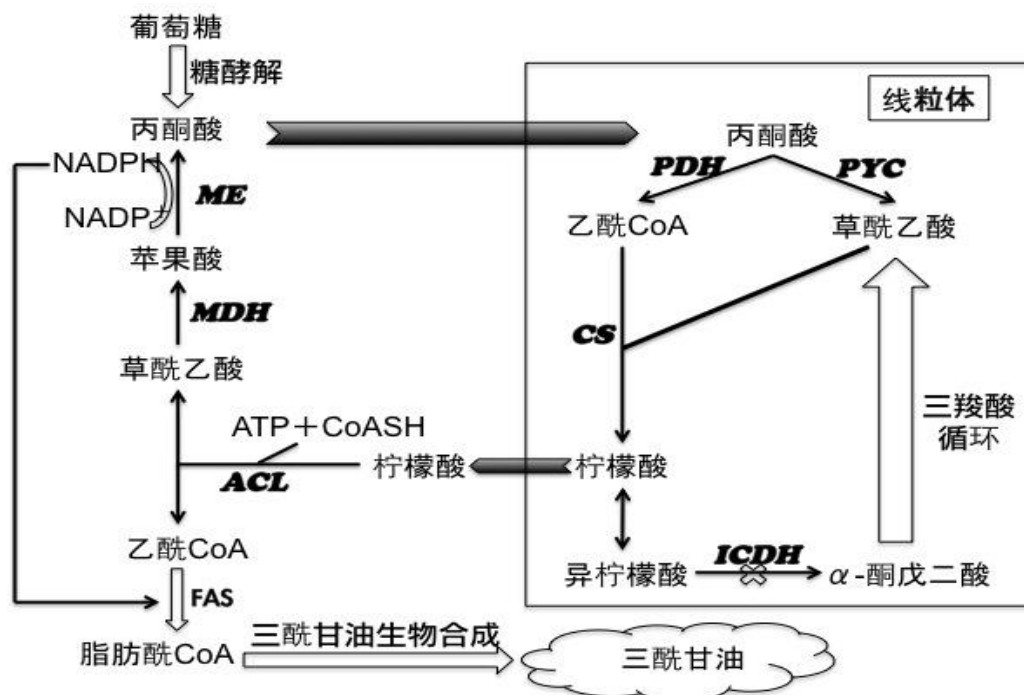


图1.2 油脂积累代谢调控简图

Fig. 1.2 Metabolic regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms

产油微生物的油脂积累通常开始于培养基中氮源消耗殆尽的时候，此时要求有多余的碳源被菌体吸收进而转化成三酰甘油，油脂以与生长相同的速率合成于菌体生长平衡的阶段。当氮源供给受到限制时，菌体繁殖被抑制，现存的菌体不能继续分裂，导致多余的碳源得以以油脂的形式储存于菌体内。这个过程包含了微生物代谢相关的一系列生理生化反应。首先当氮源限制时，菌体内的腺苷一磷酸（AMP）脱氨酶活性增加，大量的AMP被AMP脱氨酶转化为肌苷一磷酸（IMP）和氨。而产油酵母线粒体中，异柠檬酸脱氢酶（ICDH）是AMP依赖性的脱氢酶。这样AMP的大量降低将减弱甚至完全停止该酶的活性，从而形成对缺氮的一种应激反应。在这种情况下，三羧酸循环（TCA）中，异柠檬酸不再被代谢为2-酮戊二酸，使得TCA陷入低迷，代谢途径发生改变。通过线粒体内膜上的转移酶，使得积累的柠檬酸转运进入菌体溶胶中，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。这样在氮源枯竭、TCA停滞的情况下将葡萄糖代谢为大量的乙酰CoA，紧接着在脂肪酸合成酶（FAS）的作用下合成脂肪酰CoA。苹果酸酶和ACL这两种关键酶对油脂的合成有重要影响。许多微生物，例如酵母、

真菌等,其菌体油脂的合成与ACL酶活有强烈的相关性<sup>[62]</sup>,但是仍然有一小部分的酵母具有ACL酶活却仅积累非常少的油脂。总之ACL是油脂积累开始的先决条件,但是它的存在并不必要地导致油脂积累,它不是唯一的重要因素<sup>[61]</sup>。实际上其它的酶对于油脂的合成也有至关重要的作用。脂肪酸是菌体内极易被消耗的物质,要获得积累需要源源不断的如NADPH等的还原力供应<sup>[63]</sup>。由柠檬酸裂解形成的草酰乙酸首先由苹果酸脱氢酶还原成苹果酸,再在苹果酸酶作用下氧化脱羧形成丙酮酸并伴随NADPH的释放。合成1 mol的C18脂肪酸,需要16 mol的NADPH。线粒体中的丙酮酸既可以通过丙酮酸脱氢酶产生乙酰CoA,又可以在丙酮酸羧化酶的作用下产生草酰乙酸,这两个产物在柠檬酸合酶的催化下形成柠檬酸,为ACL提供底物,完成TCA合成调控中重要的代谢循环。

### 1.2.3.3 影响油脂合成的条件

除了碳源充足而氮源限制的高碳氮比条件被油脂积累过程需要外,其它条件如温度,pH和溶氧等也会对油脂的合成造成一定影响。

油脂生成的最适温度在25°C左右,适宜的温度可以促进微生物油脂的合成,温度过高或过低都会对其造成阻碍。由于菌体对外界环境温度变化有一定的适应性,温度的变化可以引起微生物油脂脂肪酸组成成分的变化。通常,长链脂肪酸比短链脂肪酸熔点高而饱和脂肪酸比不饱和脂肪酸熔点高,因此当菌株从低温转移到高温生长时,菌体膜中饱和脂肪酸和长链脂肪酸含量增加;而当温度降低时,不饱和脂肪酸和短链脂肪酸含量增加,主要是油酸和棕榈油酸等含量增加。这些变化都是为了满足菌体膜正常流动性和通透性的需要<sup>[64]</sup>。

pH值对于微生物产油也有一定的影响,一般情况下最适油脂合成pH值与其最适生长pH值一致;不同微生物油脂积累的最适pH值不同,酵母为3.5-6.0而霉菌为中性至偏碱性;产油酵母培养基最初pH值越接近中性稳定期菌体油脂含量也越高<sup>[65]</sup>。

产油微生物利用糖类底物合成油脂和不饱和脂肪酸时都需要氧气参与,因此该过程需供氧充足。在供氧不足的情况下,甘油三酯的合成会严重受阻,并引起磷脂和游离脂肪酸的大量积累。

适量的无机盐和微量元素的使用可以提高菌体油脂合成速度和油脂产量。利用油脂酵母*Lipomyces starkeyi*生产油脂过程中,铁离子的添加可以加快油脂合成速度,锌离子的添加可以提高油脂产量<sup>[66]</sup>。同时需要说明的是,微生物体内的油脂在外界条件改变时,也可能被降解。例如对于*Mortierella isabellina*当培养基中碳源耗尽时就会大量分解储存的油脂。对于*C. echinulata*,还需要丰富的Fe<sup>3+</sup>和Mg<sup>2+</sup>才会启动油脂降解。另外,乙醇、乙酸盐、乙醛等脂肪酸合成中间产物能形成中间产物C<sub>2</sub>化合物而利于油脂的积累。就油脂的理论产率,以生成棕榈酸为例,油脂基于葡萄糖的理论得率为36.1% (wt./wt.);以生成硬脂酸为例,油脂基于葡萄糖的理论得率为35.1% (wt./wt.)。

### 1.3 以木质纤维素为原料的微生物油脂生产

#### 1.3.1 木质纤维素概述

每年有 $2.5 \times 10^{21}$ Btu（英国热力学单位=055.05585焦）的太阳能传向地球表面，这个能量是当前人类每年能量总需求量 $2.0 \times 10^{17}$ Btu的大约1.2万倍，也是预计到2050年人类每年需求量的大约4000倍<sup>[67]</sup>。到达地球表面通过光合作用储存的太阳能是世界能源需求量的10倍。世界范围内，陆地上的植物每年达到 $1.3 \times 10^{10}$ 公吨干重，相当于 $7 \times 10^9$ 公吨煤燃烧释放的能量，能够提供世界上三分之二的能源总需求。每年农业来源或其它来源的木质纤维素原料大约在1.8亿吨左右<sup>[67]</sup>。

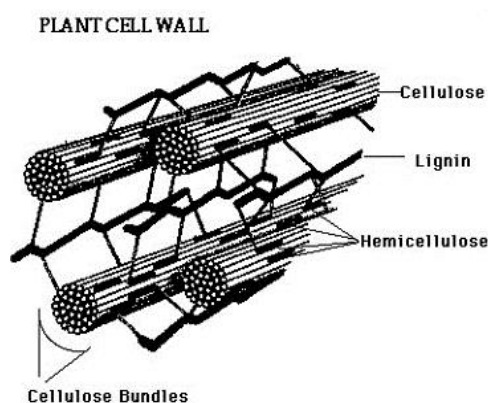


图1.3 木质纤维素的结构

Fig.1.3 The structure of lignocellulose

许多发酵产物如糖类、有机酸、表面活性剂、胶、溶剂或饮料软化剂等，其成本往往决定于碳水化合物原材料的成本，恰好木质纤维素类农林业废物是世界上最大的碳水化合物供应源。这样，能够将每年数十亿吨的生物质转化为生物燃料的技术被急切需求。根据美国农业部和能源部报告，到20世纪中期柳枝稷和杂种白杨等终年生植物以及玉米秸秆可以提供约13亿吨生物质，以供生物能源生产所需<sup>[68]</sup>。世界木材的消耗量在每年35亿公吨，比1960年增长65%。木材和其他的木质纤维素由纤维素（不可溶的 $\beta$ -1,4葡聚糖纤维）、半纤维素（非纤维多糖，包括木聚糖、葡聚糖、甘露聚糖）和木质素（一种复杂的多酚结构）组成。被子植物木质主要包含42%-50%的纤维素、25%-35%的半纤维素和20%-25%的木质素以及5%-8%的提取物。这个木质纤维素池是森林生态系统中的主要碳源储存地，包含了地球上20%的碳源，提供了生物能源生产的大量可再生原料。世界粮农组织评估认为农业来源的木质纤维素废料相当丰富。世界范围内每年有大约29亿吨谷类作物、1.6亿吨豆类作物、1400万吨油脂类作物和5.4亿吨种植作物废料产生<sup>[69]</sup>。除了上述木质纤维素废料以外，每年全世界产出约6亿吨棕榈油树，但仅仅10%变成了棕榈油和棕榈核油，剩下的90%（空果、纤维、叶、干、核和棕榈油研磨渣等）被当作垃圾扔掉。许多种类的木质纤维素原料，包括小麦秆、水稻秆、棕榈叶、玉米棒、玉米芯、玉米皮等有不同量的纤维素组份。估计每年有1.5万亿吨的木质纤维素产出，可以为对环境友好的新材料提供用之不竭的原料<sup>[70]</sup>。因此在生物能源生产方面，将大量的木质纤维素原料转化为可发酵用的糖类具有广阔的应用前景。

### 1.3.2 木质纤维素转化为可利用糖

纤维素是一种由  $\beta$ -D-吡喃型葡萄糖单元，经  $\beta$ -(1,4)糖苷键连接而成的同聚多糖。纤维二糖是纤维素最小的重复单元，可以被转化为葡萄糖残基。纤维素水解酶可以被分为三个主要部分：纤维素内切酶、纤维二糖水解酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶。纤维素内切酶从内部随机切割纤维素长链，而纤维二糖水解酶则攻击长链末端，释放纤维二糖。 $\beta$ -葡萄糖苷酶仅作用于纤维寡聚糖和纤维二糖，释放出葡萄糖单体，如图 1.4。

将纤维素转化为可发酵糖是生物炼制研究领域关注最多的方向，因为它是下游生物能源生产的前提。当今糖和淀粉提供了生产乙醇90%的原料，但是自然界中糖存在最多的形式是纤维素和半纤维素。木质纤维素原料可以通过水解和下游的发酵而转化成乙醇，这个过程比仅仅使用六碳糖发酵要复杂得多<sup>[71]</sup>，并且比以淀粉基和含糖作物为原料的生物乙醇生产在经济性上相差甚远。在水解过程中，生物质的纤维素部分被转化为各种糖类，然后下游的发酵将这些糖转化为乙醇。木质纤维素中10%-25%的木质素不含糖基，因此不能被转化为糖类而成为乙醇生产中的残渣。如何利用残余的木质素得到有附加值的产品是一个大的挑战。

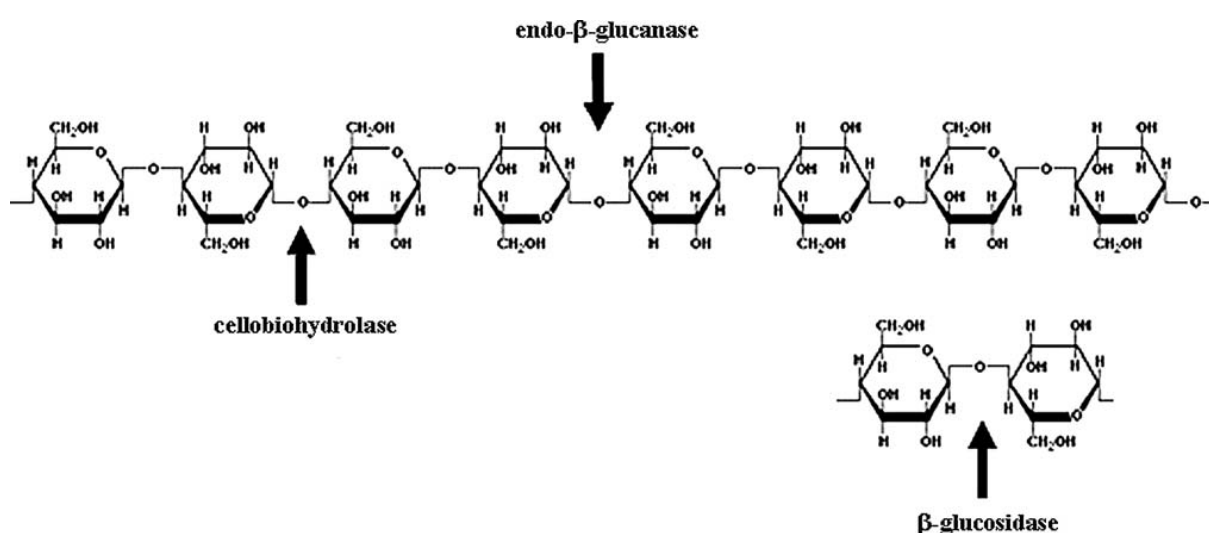


图1.4 纤维素结构和酶水解位置简图

Fig.1.4 Molecular structure of cellulose and site of action of three cellulase

半纤维素是生物质中含量第二丰富的组分，占木质纤维素的25%-35%<sup>[72]</sup>。半纤维素是由五碳糖（D-木糖，D-阿拉伯糖）、六碳糖（D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖）和糖酸组成的异聚多糖。硬木中半纤维素主要包含木聚糖，而软木中则主要包含葡甘聚糖。有多种酶可以用来降解半纤维素，例如内- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶等。像纤维素一样，半纤维素同样是一种生物炼制应用中可发酵糖的来源。

将木质纤维素转化为可利用糖后，生物柴油原料微生物油脂的生产则基于这些可利用糖为底物，转化为甘油三酯。生物柴油的生产将会基于甘油三酯的甲脂化，这样为生物柴油生产的经济性提供了一种可能的解决方式。

### 1.3.3 木质纤维素油脂生产基本工艺

由木质纤维素生产生物油脂的工艺可以分为物料前处理、预处理、生物质的水解和微生物发酵及油脂提取这四个环节。

#### 1.3.3.1 物料前处理

木质纤维素原料在收获后要先清洗以除去其中的泥沙，然后粉碎降低粒径尺寸。这样做可以便于运输，也可以增大表面积以利于下一步预处理。木质纤维素经粉碎后的大小一般为10-30mm，粒度大小对预处理、糖化和发酵的效果影响较大<sup>[73]</sup>。

#### 1.3.3.2 生物质预处理

生物质的预处理旨在利用物理、化学或生物的方法破坏木质纤维素牢固的结构，打开包裹的木质素和半纤维素，打破纤维素致密的微晶结构，从而利于纤维素酶释放到纤维素上并水解之。预处理的主要方法有：蒸汽膨爆、氨纤维膨爆、有机溶剂提取和稀酸预处理等。本研究则利用稀硫酸预处理的方法处理木质纤维素，它是一种较为传统多见的方式。用浓度在0.5%-3%的稀硫酸作为预浸原料，然后在预处理反应器中以130-200°C的高温处理15分钟。此方法的优点在于糖得率较高，催化剂的成本低且易于中和；缺点则是高的设备要求和副产物的形成。

#### 1.3.3.3 生物质的水解

生物质的水解过程是在一定的温度下使纤维素或半纤维素等高分子化合物转化为可溶性的五碳糖和六碳糖。它可以分为酸水解法和酶水解法，本研究则引用酶水解法。经预处理后的生物质物料由于纤维素或半纤维素暴露出来，使得酶与物料结合起来并水解纤维素组分。该反应条件温和，一般在pH4.8左右、45-50°C的常压下进行，转化率较高，很有商业应用前景。但是酶的较大用量和较高成本是木质纤维素转化的商业化主要瓶颈之一。

#### 1.3.3.4 生物油脂的发酵

木质纤维素水解液发酵产生生物油脂，是利用产油微生物对原料的水解产物包括五碳糖和六碳糖等进行转化，生成生物油脂的过程。通常发酵结果和所使用的微生物在特定条件下的生理生化状态密切相关，因此发酵条件如pH、溶氧、温度等因素的控制对发酵有重要作用。

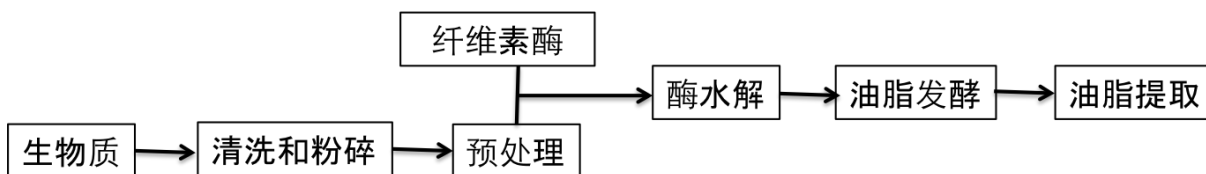


图1.5 木质纤维素生物油脂生产基本流程

Fig.1.5 Procedures of microbial lipid production using lignocellulose

### 1.3.4 木质纤维素处理中产生的抑制物

由于木质纤维素具有相当牢固的结构，因此强的物理和化学方法通常被用于破坏其固有的结构，将木质素和半纤维素分离开来，降低纤维素的结晶度和增大木质纤维素的

孔隙，同时尽可能小的破坏可利用糖成分。但是运用物理化学等强的预处理方法处理木质纤维素的过程中，会产生多种副产物（如图1.6）。D-葡萄糖主要来源于纤维素的水解；己糖如D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖和D-鼠李糖，戊糖如D-木糖和L-阿拉伯糖等从半纤维素成分中释放；但糖醛酸如葡萄糖醛酸等也从半纤维素水解中产生；木质素是一种水不溶性的芳香多聚物，包含丙苯亚基。水解处理会导致木质素和单糖的进一步降解，进而产生三种类型的抑制物：（1）呋喃衍生物（糠醛和5-羟甲基糠醛）；（2）弱酸（主要包括乙酸，甲酸和乙酰丙酸）；（3）酚类物质。

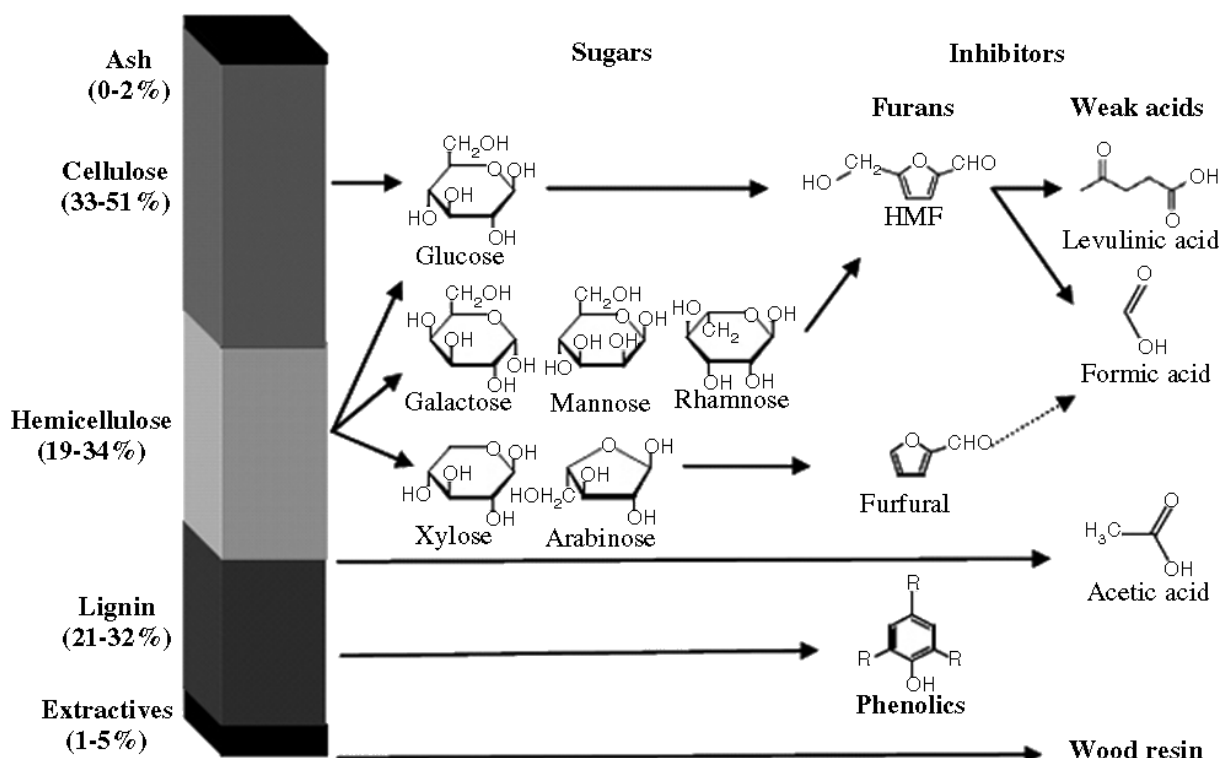


图1.6 木质纤维素平均组成及主要水解产物

Fig.1.6 Average composition of lignocellulosic biomass and main derived hydrolysis products

呋喃类抑制物中，5-羟甲基糠醛来源于己糖而糠醛来源于戊糖<sup>[74,75]</sup>。其浓度水平决定于原料的种类和预处理过程的差异。例如，水杉水解液中5-羟甲基糠醛浓度因一步或两步稀酸水解的不同而从2.0g/L变化到5.9g/L<sup>[76,77]</sup>。相反的，湿法氧化处理的麦秆却没有5-羟甲基糠醛的出现<sup>[78]</sup>。虽然糠醛通常比羟甲基糠醛在水解液中的浓度要低（1g/L左右），但是其对菌体的抑制作用很强。乙酸、甲酸和乙酰丙酸是木质纤维素水解液中非常常见的弱酸，乙酸是通过半纤维素脱乙酰基作用形成的，而甲酸和乙酰丙酸则是羟甲基糠醛的降解产物<sup>[74,75]</sup>。甲酸也可以通过糠醛在高温和酸性条件下形成<sup>[74]</sup>。许多种酚类降解物是由木质素破坏以及酸水解中的碳水化合物降解产生的<sup>[79]</sup>。由于不同的生物质原料里，木质素的甲氧基化程度和菌体壁内与纤维素、半纤维素连接的内在化学键强弱不同，酚类降解物的多少和类型通常由生物质来源决定<sup>[80]</sup>。

在呋喃类衍生物中，糠醛影响菌体的生长速率和生物量基于ATP的得率<sup>[81]</sup>，其对菌体的抑制主要取决于糠醛在水解液中的浓度。而羟甲基糠醛毒性则比糠醛相对较弱，并

且它在木质纤维素水解液中的浓度较低。酚类降解物对菌体生长有明显的抑制作用，且毒性最高，作用机理是破坏生物膜的完整性甚至分解生物膜，从而丧失菌体的选择透过性和酶作用载体的能力<sup>[81]</sup>。乙酸等弱酸对微生物的作用不但因浓度的不同而不同，而且受到发酵条件如氧浓度和pH的影响<sup>[82]</sup>。于此同时，不同菌体对抑制物的耐受能力是不同的，而且在水解液中存在的各种抑制物之间存在协同效应。对油脂酵母圆红冬孢酵母Y4耐抑制物性能测试结果表明：5-羟甲基糠醛和丁香醛对菌体抑制较弱，对羟基苯甲醛和香兰素在浓度低于10mM时对菌体毒性很弱，而糠醛及其衍生物糠醇和糠酸在浓度1mM左右能够抑制菌体45%的生长<sup>[83]</sup>。本研究所使用的产油菌皮状丝孢酵母，其对抑制物的耐受作用相对较好，低于5 g/L的乙酸对其抑制很小，羟甲基糠醛对其抑制作用不明显，但糠醛在低浓度下对其生长的影响很大<sup>[84]</sup>。

### 1.3.5 木质纤维素水解液中抑制物的脱除

为了去除预处理过程中产生的各种分解物以利于菌体的发酵过程，许多抑制物的脱除方法被尝试，包括物理法，化学法和生物法等。物理方法主要通过真空蒸发法去除水解液中的挥发性物质比如乙酸、糠醛和香兰素等。但是这种方法会从某种程度上增加非挥发性抑制物浓度，如木质素衍生物。有一种化学方法是利用pH的改变使抑制物沉淀下来，从而达到去除的目的，然后再调回发酵所需的pH。还有一种是利用活性炭或者离子交换树脂吸附抑制物，但是这种方法的成本较高不适合用于工业化。也有利用物理化学联合的方法脱除抑制物，并且取得了较好的效果，例如Huang等利用大米草水解液生产微生物油脂，使用调节pH而后浓缩吸附等物理化学方法，达到了一定的脱毒效果，油脂的生产也有明显的提高<sup>[85]</sup>。但是，这些方法都有各种各样的缺陷，包括大量清水的使用、废水的产生、木质纤维素成分的丢失和可利用糖的损耗，以及抑制物脱除不完全等等<sup>[86]</sup>。例如，作为最常用的脱毒方式水洗脱毒，大部分可转化为可利用糖的木质纤维素成分被洗掉，大量的清水被消耗而变成废水，同时废水的处理也是很麻烦的问题。

作为解决以上问题的一种方式，生物脱毒的方法被提出，即利用特定微生物正常的代谢途径如分泌过氧化物酶和漆酶等进入水解液降解抑制物成分<sup>[87,88]</sup>。生物脱毒有很多优点，例如没有纤维素固体成分的损失，用水量大量减少等。但是此方法只适用于液体水解液系统，而纤维素已经在抑制物毒性下被水解为单糖，水解过程中的酶已经被各种抑制物抑制而影响了纤维素的转化率。另外由于水解液系统的生物脱毒中，抑制物已经被大量的水稀释，脱毒菌降解速率大大减缓，水解液中存在的糖类反而可能被脱毒菌利用。这样，由于脱毒过程相当耗时，生物脱毒的应用被严重的限制。直到最近，一种新的脱毒方法被Zhang等人引入<sup>[89]</sup>，即通过一种从木质纤维素原料中自然分离到的霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1脱除原料中的抑制物。与以往生物脱毒不同的是，这种微生物在预处理后的生物原料上生长快速，直接作用于固体物料上，能够主要以抑制物为碳源而很好的防止了木质纤维素的损失。另外，由于它直接作用于固体底物，抑制物可以不经稀释而直接较快速的被微生物降解。这类脱毒菌种和脱毒方法有零能量投入，零废水排放的特点，提供了一种有效的具有工业应用前景的木质纤维素抑制物去除方法。

## 1.4 课题研究的意义与内容

生物柴油由于其可持续性、可再生性及环境友好性而在近年来倍受人们的关注，它是一种很有潜力的化石能源的替代能源。但是，生物柴油通常以食物级植物油脂作为原料，大大影响了经济性与工业可应用性，同时有可能带来粮食危机，因此生物柴油的炼制原料问题成为了其工业化的瓶颈。与此同时，有一类微生物包括藻类、酵母、细菌和霉菌等能够积累高于自身生物量 20% 甚至 70% 的油脂，油脂成分十分类似于植物油脂，而且其具有油脂积累周期短、劳动力需求少、季节气候及地域影响小、容易放大以及无耕地需求等优点。这种微生物油脂很可能成为生物柴油生产最有潜力的原料之一。然而，迄今为止很多微生物油脂的研究都是利用葡萄糖等成本高的纯糖作为底物，显然不利于其生产应用的经济性。自然界中存在着大量作为农林业废料的木质纤维素，其价格和成本非常低廉。如果能够将其转化为可供微生物利用的糖类，进而供油脂生产菌作为底物利用生产微生物油脂，无疑是一种很好的降低生物油脂生产成本，从而提高生物柴油生产经济性的有效策略。到目前为止，利用廉价的木质纤维素原料生产生物乙醇的研究已经很多，而用其生产生物油脂的研究很少。

在将木质纤维素转化为微生物可利用糖的过程中，必须有强烈的物理化学的处理方法改变木质纤维素固有的牢固结构。稀硫酸预处理是一种很常用的经典预处理方法，它能够包裹在纤维素外部具有紧密结构的木质素和半纤维素破坏，将结晶纤维素转化为无定形纤维素，从而使纤维素酶在水解过程中能够很好和纤维素结合并作用而高效率的转化为各种单糖。但是伴随着这种强烈的物理化学过程，许多种木质纤维素衍生物和降解产物出现在经预处理后的物料中，包括各种抑制物如糠醛、羟甲基糠醛和乙酸等等。这些抑制物对后续酶水解和微生物生长及油脂生产都有明显的抑制作用，因而抑制物的脱除被许多研究尝试。但是通常脱毒过程比较复杂、能耗大，或者是有污水生成而不具有工业可行性。最近一种零能量投入、零废水生成及完全作用在固态原料上的脱毒方法，被用于木质纤维素生产乙醇的过程中。目前，还没有研究利用这种工业可行的脱毒方法去除木质纤维素中抑制物对油脂发酵的影响。

氮源限制通常被认为是产油微生物油脂积累的先决条件，具有高碳氮比的培养基经常被用来产油以获得较高的油脂含量。然而，利用自然界中存在的工农业废料如泥浆、番茄渣水解液和谷氨酸钠废水等作为原料的油脂生产往往菌体含油率很低，原因就是其中具有丰富的氮源。同样，农业废料木质纤维素也具有大量氮源，来源主要为植物在生长过程中自身合成以及外界所施加的以氮肥为形式的丰富氮源。利用大米草水解液生产油脂的报道称在原水解液中仅有 14.6% 的菌体含油率被获得。

本研究利用农业废料玉米秸秆作为原料通过一系列的过程转化为可利用糖类，供油脂酵母皮状丝孢酵母 CX1 利用，从而积累生物油脂。出于经济性考虑，本过程中仅仅添加少量廉价的无机盐用于发酵，而没有其它高成本的物质添加。玉米秸秆水解液首次被应用于油脂发酵的研究中，因而其确切的氮源含量和碳氮比情况都不甚清楚。本研究

则具体测定了玉米秸秆水解液中的氮源情况，探索了预处理过程中产生的各种抑制物对发酵过程的影响，并且证实了其它发酵因素的地位，找出了利用玉米秸秆水解液进行油脂发酵的瓶颈。另外，针对玉米秸秆处理过程中产生的各种抑制物，本工作首次将最近报道的新的工业可行生物脱毒技术用于油脂发酵过程。这些工作对今后利用木质纤维素原料生产生物油脂的进展有非常重要的意义。

## 第 2 章 材料与方法

### 2.1 材料与设备

#### 2.1.1 菌种

本研究课题所用油脂发酵菌种为本实验室购买的 *Trichosporon cutaneum* 2.1374 的突变菌株 *Trichosporon cutaneum* CX1。 *Trichosporon cutaneum* 2.1374 购自中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCC)，菌种保藏号为 2527。

脱毒菌种 *Amorphotheca resinae* ZN1 为本实验室从玉米秸秆中自行筛选的菌种。

#### 2.1.2 实验试剂

见表 2.1。

表 2.1 试剂

Table 2.1 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
98%浓硫酸	GR	上海菲达工贸有限公司
浓盐酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
三氟化硼	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
NaOH	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
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
苏丹黑	AR	国药集团化学试剂有限公司
二甲苯	AR	国药集团化学试剂有限公司
沙黄	AR	国药集团化学试剂有限公司
过硫酸钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硝酸钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
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
正己烷	AR	上海菲达工贸有限公司

三氯甲烷	AR	上海化学试剂有限公司
甲酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酰丙酸	AR	美国Johnson Matthey
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
亚硝基铁氰化钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸氢二钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
次氯酸钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
氯化铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
纤维素酶(酶活约 65FPU/mL)	AR	Genencor Internal, Rochester, NY, USA
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
琼脂粉	AR	中国惠心生化试剂有限公司
酵母粉	AR	OXOIDLID BASINGSTOKE HAMPSHIRE ENGLAND
蛋白胨	AR	国药集团化学试剂有限公司

### 2.1.3 培养基

#### (1) YPED培养基

酵母粉10 g/L; 葡萄糖20 g/L; 蛋白胨20 g/L; 琼脂粉15 g/L。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5.8~6.0。115 ℃下灭菌20 min。

#### (3) 合成培养基

葡萄糖38 g/L; 木糖7.8 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 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6.0。115 ℃下灭菌20 min。

#### (4) 玉米秸秆水解液发酵培养基

由华东理工大学生物质能源研究中心提供, 通过稀硫酸预处理方法处理秸秆, 加入纤维素酶进行水解, 水解后进行固液分离所得到的水解液。由于预处理强度不同, 糖的浓度和抑制物浓度也不相同。发酵时, 向水解液中加入无机盐(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 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。

#### (5) PDA 培养基

马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂粉 20 g/L。115 ℃下灭菌 20 min。

本研究所用主要实验仪器如表2.2所示。

表2.2 实验仪器

Table 2.2 Experiment equipments

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
超声波脱气机	KWT-100A	科伟达
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-26	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	上海一恒科学仪器
水槽	ZC	宁波天恒
pH 计	PHS-3C	雷磁
旋转蒸发仪	R205	上海大颜仪器设备有限公司
制冰机	XB100	GRANT 公司
生化培养箱	LRH-150	上海一恒科学仪器
超低温冰箱	86C	Thermo 公司
光学显微镜	XSP-8C	上海精密仪器仪表有限公司
蒸汽发生器	DZfZ.5Cl	上海蒸源机电
粉碎机	SF-高速粉碎机	上海科太粉碎设备厂
压榨机	无型号	上海大张环保设备有限公司
预处理反应器	2008-F39	上海东亚压力容器制造有限公司
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
5L 反应器（糖化罐）	5L	上海保兴生物设备工程有限公司
四联发酵罐	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 菌种保藏

长期保藏：种子在YPD培养基中培养24 h后，与60%甘油等体积混合后分装入冻存管中，-80°C保藏。

短期保藏：从-80°C冰箱中取一管冻存菌种，划线接种于 YPD 固体培养基平板上，培养 24 h 待长出大小合适菌落时，存放于 4°C 冰箱中保存。3 个星期之内使用。

### 2.2.2 种子培养

从斜面上挑取单菌落接种于 20/100 mL 种子培养基中，于 180 rpm、30°C 摇床培养 24 h 作为一级种子。

对于合成培养基的发酵实验，以 10%接种量将一级种子接种于 100/500 mL 种子培养基中于 180 rpm、30°C 摇床培养 24 h 作为二级种子。将二级种子以 10%接种量接入合成培养基中进行发酵实验。

对于玉米秸秆水解液的发酵实验，以 10%接种量将一级种子接种于 20/100 mL 50% 玉米秸秆水解液中，在 180 rpm、30°C 摇床培养 12-15 h 作为二级种子。将二级种子以 10%接种量接入 100/500 mL 100%玉米秸秆水解液中，于 180 rpm、30°C 摇床培养 24 h 作为三级种子。将三级种子以 10%接种量接入 1 L 水解液发酵罐中进行发酵实验。对于经脱毒处理的原料的水解液，则直接将二级种子接入水解液中进行发酵实验。

### 2.2.3 发酵实验

玉米秸秆水解液的发酵实验都在 3 L 发酵罐中进行，发酵罐的 pH、温度和溶氧可以自动控制。通常的发酵条件为：1 L 装液量，10%接种量，pH 5.0，30°C，溶氧水平 20-30%（发酵条件实验除外）。发酵开始后的 24 h 内，每 6 h 取一次 5 mL 的样品；24 h 后每 4 h 取一次 35 mL 的样品。当水解液中油脂产量达到最大时发酵结束。样品中取 1 mL 在 12,906 g 下离心 5 分钟，上清用于测量糖和抑制物含量；沉淀菌体用于测量 OD<sub>600nm</sub> 吸光值。35 mL 样品中 30 mL 用于油脂提取。

## 2.3 水解液制备方法

### 2.3.1 玉米秸秆的前处理

玉米秸秆原料于 2007 年秋天收获于吉林省，经锤式粉碎机粉碎并过直径为 5 mm 的筛网。粉碎好的秸秆颗粒大小为 20-60 目，用清水清洗去除其中的碎石、尘土以及金属物质，然后用压榨机压滤去除大量的水分并于 105°C 烘干 8-12 h 至恒重，于真空袋中储存备用。

### 2.3.2 原料预处理

#### 2.3.2.1 原料预浸

称取 800 g 粉碎干燥的玉米秸秆原料，置于大塑料箱内（25 L），缓缓倒入 400 g（固液比 2:1）一定浓度的稀硫酸（3%-7%），反复搅拌直到混合均匀。搅拌好的物料装入塑料袋内封好，在室温下放置预浸约 15-18 h 待用。加入原料中的稀硫酸的浓度分别为：

2.5%，4%，5%和6%，那么玉米秸秆中硫酸的浓度分别为：1.25%，2%，2.5%，3%。

### 2.3.2.2 预处理反应器结构

本预处理实验所用反应器为自制不锈钢反应器（15 L），由三部分组成：电热高压蒸汽发生器，预处理反应釜和物料收纳容器。反应釜为圆筒状，外壁为加热套（加热套变压器输出电压 80 V）和石棉隔热保温层。反应器外壁温度和内部温度均由热电偶测得，测量外壁温度的热电偶固定在外壁和加热套之间，而测量内部温度的热电偶沿反应釜中轴线插入。物料收纳容器为不锈钢材质的圆柱形网筒，其体积大小和反应釜内容积相同，能紧贴在反应釜内壁中，并且方便装卸。

### 2.3.2.3 预处理操作

将经过稀硫酸预浸的原料加入圆柱形物料收纳器中，再将收纳器装入反应釜，拧紧上下法兰。蒸汽发生器内的高压水蒸汽(1.5-3.0 MPa)通入反应釜，反应釜内温度到达 100°C 时，开排气阀放出不凝性气体并排出冷凝水。关闭排气阀后控制水蒸气流速，使反应釜内温度在 30 秒内升至 190°C，维持 3 分钟。最后打开排气阀泻压，使在 30 秒内预处理反应釜内压力降到常压，将物料收纳器取出倒出其中的物料于不锈钢筒中，其后放入冷水中降温。冷却至常温的预处理物料放入塑料袋中密封，于 -20°C 冰箱内保存。

### 2.3.3 预处理后原料的脱毒

将预处理后的物料用一定浓度的 NaOH 溶液调至 pH 5.5-6.0，湿度 55-60%。从保存有霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 的试管斜面中，用 20 mL 无菌水洗脱孢子，接入含有调整好 pH 和湿度的物料的生物脱毒反应器中。维持温度 25°C 和湿度 60%，培养 5 天作为种子。将作为种子的固体原料以 10%的接种量接入调整好 pH 和湿度的物料中，在生物脱毒反应器以与培养种子同样的方法，培养一定的时间。脱毒时间控制为糠醛和羟甲基糠醛在物料中的浓度刚好脱减为零。脱毒后的物料保存于 -20°C 冰箱中待用。

### 2.3.4 原料的糖化水解

对经过脱毒或者未经脱毒的玉米秸秆的糖化采用纤维素酶 Accellerase 1000(Genencor International, Rochester, NY, USA)，该酶的滤纸酶活为 65.8 FPU/mL，纤维二糖酶活为 152.0 IU/mL。糖化过程在 5 L 发酵罐（糖化罐）中进行，固体含量为 15% (w/w)，酶用量为 7 FPU/g 干重，pH 4.80，50°C 下糖化 48 h。糖化后水解液中的水不溶性固体使用 10,000 g 下离心 10 min 的方法去除，液体水解物则要在 pH 调整为 5.0 后在 115°C 下灭菌 20 min。灭菌后的水解液使用定量滤纸过滤，存放于 4°C 冰箱中待用。

## 2.4 分析方法

### 2.4.1 糖浓度和水解液中抑制物浓度的测定

水解液中糖浓度和抑制物浓度的测定采用高效液相色谱分析的方法，色谱柱为 Bio-rad Aminex HPX-87H 柱，柱温 65°C，流动相 0.005M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，流速 0.6 mL/min，检测器为 RID-10A 示差检测器。各种葡萄糖和抑制物的精确浓度梯度标准液，经过 0.22 μm

滤纸过滤后以 50  $\mu\text{L}$  体积进样。根据报告图谱中的出峰时间和峰面积，确定各种物质在色谱柱中的出峰时间和标准曲线。待测定的样品，经过一定倍数的稀释后经 0.22  $\mu\text{m}$  滤纸过滤后进样入液相色谱中，通过报告中各出峰时间的峰面积与标准曲线比对，确定待测样品中各组分的浓度。

#### 2.4.2 水解液中氨氮测定

水解液中氨氮含量通过酚-次氯酸法。

(1) 容器的清洗：所有配制试剂的容器都用重铬酸钾洗液浸洗后清水冲洗干净，并用去离子水润洗三次烘干。

(2) 试剂的配制：所有试剂都用超纯水配制。

试剂 A：苯酚 10 g/L，亚硝酸铁氰化钠  $2\text{H}_2\text{O}$  100 mg/L，37 $^{\circ}\text{C}$ 时实测 pH 为 7.5-7.8。

4 $^{\circ}\text{C}$ 避光可存 30 天以上。

试剂 B- I： $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4 M，NaOH 0.2 M，37 $^{\circ}\text{C}$ 时实测 pH 为 11.5-11.6。室温存放不超过 60 天。

试剂 B- II：NaClO 成品溶液，标示活性氯 $\geq 5.2\%$ ；NaOH 7.0-8.0%，NaOH 当量为  $1.6\pm 0.3$  M。

试剂 B：试剂 B- II：试剂 B- I =1:100(v/v)，37 $^{\circ}\text{C}$ 时实测 pH 为 11.50-11.70，混合摇匀备用，配置后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 14 天。

铵标准液贮存液：称取 3.819 g 经 100 $^{\circ}\text{C}$  干燥过的优级纯氯化铵溶解于水中，移入 1000 mL 容量瓶中，稀释至标线。此溶液每毫升含 1.00 mg 氨氮。

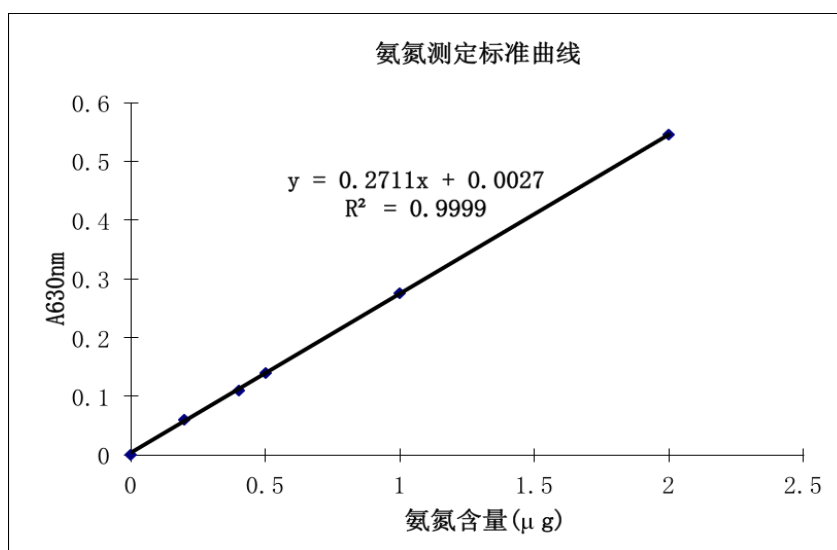


图 2.1 氨氮测定标准曲线

Fig. 2.1 The standard curve of ammonium nitrogen determination

(3) 绘制标准曲线

将铵标准贮存液进行一系列稀释, 分别为 100 倍、50 倍、40 倍、20 倍、10 倍。依次加入 20 $\mu$ L 标准溶液稀释液, 2.5 mL 的试剂 A 和 2.5 mL 的试剂 B, 10s 内立即摇匀, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温 30-50 min, 取出于 630nm 处比色测定, 蒸馏水调零。绘制标准曲线。如图 2.1, 在氨氮检测剂量 0-2  $\mu$ g 内, 氨氮含量和 A<sub>630nm</sub> 间有很好的线性相关性。

#### (4) 样品测定

根据水解液中大概氨氮含量, 调整样品稀释倍数 (经验下稀释 5 倍)。于试管中依次加入 20  $\mu$ L 样品稀释液, 2.5 mL 的试剂 A 和 2.5 mL 的试剂 B, 10s 内立即摇匀, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温 30-50 min, 取出于 630 nm 处比色测定, 蒸馏水调零。空白样品混合液吸光值为 0.010-0.040, 这决定于所用试剂的质量。用测得的 A<sub>630nm</sub> 减去空白样品吸光值, 回归到标准曲线上, 计算氨氮含量。计算公式如(2-1)所示:

$$AN = \frac{n \times (A - 0.0027)}{0.2711} \quad \text{公式(2-1)}$$

其中, AN 为样品中的氨氮含量( $\mu$ g); n 为样品稀释倍数; A 为样品在 630 nm 下的吸光值。

### 2.4.3 水解液中总氮测定

(1) 容器的清洗: 所有配制试剂的容器都用重铬酸钾洗液浸洗后清水冲洗干净, 并用超纯水润洗三次烘干。

(2) 试剂的配制: 所有试剂都用超纯水配制。

碱性  $K_2S_2O_8$ : 称取 40 g  $K_2S_2O_8$ , 15 g NaOH, 溶于超纯水中, 稀释至 1000 mL, 存放于塑料瓶内, 可存一周。

硝酸钾标准贮备液: 硝酸钾经 105-110 $^{\circ}$ C 烘干 4 h, 称取 0.7218 g, 溶于超纯水中, 移入 1000 mL 的容量瓶中, 定容, 此溶液硝酸盐氮含量为 100  $\mu$ g/mL。加入 2 mL 三氯甲烷作保护剂, 至少稳定 6 个月。

硝酸钾标准准备液: 将贮备液用无氨水稀释 10 倍而得, 即 10  $\mu$ g/mL 硝酸盐氮。

1+9 盐酸: 1 体积的盐酸+9 体积的水。

(3) 绘制标准曲线:

①分别吸收 0, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 5.00, 7.00, 8.00 mL  $KNO_3$  标准液于 25 mL 比色管中 (注意比色管质量), 用超纯水稀释至 10 mL 标线。

②加入 5 mL 碱性  $K_2S_2O_8$  溶液, 塞紧磨口塞, 用纱布裹紧。

③将比色皿置于压力蒸汽消毒器中, 加热 0.5 h, 放气使压力回零。然后升温至 120-124 $^{\circ}$ C 开始计时, 使比色管加热 0.5 h。

④自然冷却, 开阀放气, 移去外盖, 比色管冷却至室温。

⑤加入 1+9 盐酸 1 mL, 并用超纯水稀释至 25 mL 标线。

⑥在紫外分光光度计上, 以超纯水作参比, 在 220 nm 及 275 nm 处测吸光度, 用校正的吸光度  $A = A_{275} - 2A_{220}$  绘制标准曲线。

总氮测定的标准曲线由于批次间差异较大，每次样品测定都要测一次。

(4) 视样品中的总氮含量，根据经验对水解液稀释 10 倍后，取 200-500  $\mu\text{L}$  样品（含氮 20-80  $\mu\text{g}$ ）加入体系，重复上述步骤，测校正的吸光值，回归到标准曲线上，计算总含氮量。

#### 2.4.4 水解液中 C/N 比计算

水解液中的 C/N 比计算中，碳源以葡萄糖和木糖的含碳量为基准，氮源以发酵过程中消耗的氮源为基准（即发酵开始时总氮与发酵结束时总氮含量之差），基于以下公式：

$$C/N = \frac{[\text{Glu}] \times 6/180 + [\text{Xyl}] \times 5/150}{([\text{N}]_0 - [\text{N}]_1)/14} \quad \text{公式(2-2)}$$

其中，[Glu]和[Xyl]分别为水解液中初始葡萄糖和木糖浓度；[N]<sub>0</sub>为水解液中初始总氮含量；[N]<sub>1</sub>为发酵结束时水解液中剩余的总氮含量。

#### 2.4.5 菌体浓度的测定

菌体浓度采用分光光度法测 600 nm 下吸光值的方法间接测量，从样品中取出 1 mL 在 12,906 g 下离心 5 min。菌体沉淀用去离子水通过悬浮后离心的方式清洗两遍后，悬浮于 1 mL 去离子水中，使用 DU800 测量其 600 nm 下的吸光值(OD<sub>600nm</sub>)。

#### 2.4.6 菌体干重的测定

将发酵进行 24 h 后每隔 4 h 取出的 35 mL 的样品，取 30 mL 于 50 mL 离心管中，在 12,906 g 下离心 5 min。离心后的菌体用去离子水通过悬浮后离心的方式清洗两遍，悬浮在 5 mL 去离子水中，倒入平皿中于 80°C 烘箱烘大约 4 h 至恒重，去皮称重。

#### 2.4.7 油脂量测定

油脂量的测定参照酸热-有机溶剂萃取法<sup>[90]</sup>，具体操作为：加入 5 mL 4 M HCl 于含有干菌体的培养皿中，浸泡菌体 30 min 并转移至 50 mL 离心管中；之后沸水浴 10 min 并立即插入冰水混合物中速冷；然后加入 20 mL 氯仿:甲醇=2:1 的混合溶液并封口，于摇床中以 180 rpm 震荡混匀 30 min 后，10,000 g 离心 5 min；用玻璃针管取下层有机相至茄形烧瓶中，经 80°C 旋转蒸发掉有机溶剂后，烘干至恒重，去皮称重。

#### 2.4.8 油脂脂肪酸组成测定

称取提取的油脂 2 g，加入 20 mL 0.5 mol/L KOH/甲醇溶液在 65°C 水浴中加热回流 50 min。冷却后加入 80 mL 13%的三氟化硼-甲醇溶液（BF<sub>3</sub> 乙醚:无水甲醇=4:10）加热回流 5 min。冷却后再加入 10 mL 正己烷，并加入适量蒸馏水水洗分层。取最上层的正己烷相，向气质联用仪 Clarus 500（GC-MS）中进样。气质联用仪分析参数设置为：进样口温度 280°C；进样量 1 $\mu\text{L}$ ；色谱柱 PE-5 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 $\mu\text{m}$ )；分流:不分流进样口=10:1；检测器温度(FID，氢火焰离子化检测器) 300°C；载气氦气，流速 1 mL/min；升温程序为在 80°C 条件下保留 3 分钟，以 16°C/min 升温到 280°C；分析系统为 NIST MS Search 2.0<sup>[84]</sup>。

#### 2.4.9 油脂染色观察

涂少量经稀释的菌悬液于载玻片上，热固定后滴入 2 滴苏丹黑染液染色 2 min，然

---

后用二甲苯洗涤载玻片至洗出液无色，再用沙黄复染 30 s 后清水冲去沙黄染液。于油镜下观察，菌体内的油脂颗粒会被苏丹黑染成黑色，菌体其它成分则为红色。

### 第 3 章 实验结果

#### 3.1 发酵过程中影响油脂积累的关键因素

##### 3.1.1 不同发酵条件对油脂发酵的影响

由于各种发酵条件如 pH、溶氧和温度等都会对产油酵母的油脂积累产生各种影响<sup>[91,92]</sup>, 因此本实验在玉米秸秆水解液中考察 *Trichosporon cutaneum* CX1 的菌体生长和油脂积累对这些变化的发酵条件的敏感程度。

##### 3.1.1.1 溶氧

表3.11 不同溶氧水平对水解液中油脂发酵的影响

Table 3.11 The effects of different DO level on the lipid fermentation in CS hydrolysate

不同溶氧水平 (%)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g菌体)	菌体得率 (g/100g糖)	油脂得率 (g/100g糖)
0-10	7.76	0.87	11.2	18.0	2.0
10-20	9.42	1.13	11.9	20.5	2.4
20-30	9.76	1.47	15.1	25.7	3.9

由于发酵过程中培养基(水解液)中的溶解氧浓度通常和菌体的生理状态紧密相关, 而菌体的耗氧情况在不断的变化中, 因此很难将溶氧水平控制在固定的数值下, 这里将溶氧控制在不同的水平区间内。*T. cutaneum*是一种好氧菌, 因此将溶氧浓度设置在0以上。但是菌体的氧气需求比较旺盛, 将溶氧维持在较高水平意味着更高的氧气供应。氧气供应的提高需要通过增加搅拌转速或者提高通气量和氧气纯度来实现, 这样发酵过程中的能耗也增加。就工业化成本考虑, 溶氧水平越低越有利。20-30%的溶氧水平是发酵过程中设备可以达到的最高水平。在表3.11中显示, 当溶氧水平从0-10%升高到10-20%再到20-30%的过程中, 菌体干重、油脂产量和含油率都逐渐增加; 就生物量和油脂基于糖的得率而言, 高水平的溶氧利于糖向菌体和油脂的转化。

虽然上述实验说明, 高的溶氧水平有利于菌体生长和油脂合成, 但是较高的溶氧水平在工业上往往以高能耗为代价。考虑到需要氧气参与的三羧酸循环在油脂合成途径中需要被抑制, 而脂肪酸从头合成不需要氧气参与, 因此推测油脂合成阶段氧气需求量少, 而大量的氧气需求在菌体生长旺盛的前阶段。根据经验, 水解液中的菌体达到稳定期一般在24 h左右, 而且从24 h开始菌体的需氧量开始下降。本实验则探索在菌体进入对数后期稳定期开始时, 也即油脂合成开始时, 不同水平的溶氧对菌体产油和生长的影响。于是, 本实验在24 h之前, 维持溶氧水平在20-30%之间; 24 h之后溶氧则分别维持在不同水平下, 即0以下, 0-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%。

表3.12 24 h后不同溶氧水平对水解液中油脂发酵的影响

Table 3.12 The effects of different DO level after 24 h on the lipid fermentation in CS hydrolysate

24 h 后不同溶氧水平 (%)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g 菌体)	菌体得率 (g/100g 糖)	油脂得率 (g/100g 糖)
0以下	6.46	0.94	14.6	32.3	4.7
0-10	9.89	1.47	14.9	24.7	3.7
10-20	10.33	1.32	12.8	27.2	3.5
20-30	9.76	1.47	15.1	25.7	3.9
30-40	9.38	1.52	16.2	20.5	3.3

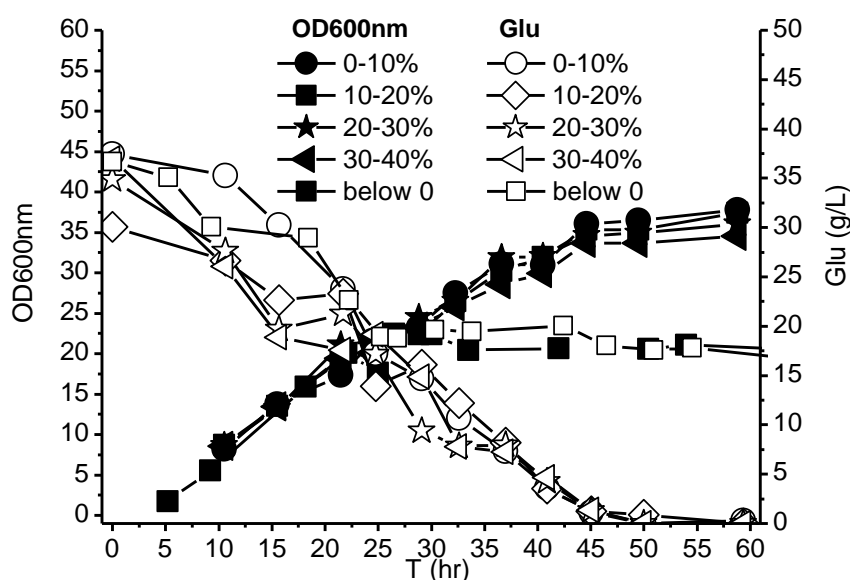


图3.11 24 h后不同溶氧水平对水解液中菌体生长的影响

Fig. 3.11 The effects of different DO level after 24 h on the cell growth in CS hydrolysate

如表3.12所示，24 h后溶氧水平在0以上的四组实验，菌体干重和油脂产量以及菌体和油脂基于糖得率相差不大，说明发酵后阶段对溶氧水平的变化不敏感。但是，24 h后溶氧水平在0以下的发酵，其菌体干重和油脂产量则有明显减少。如图3.11，24 h溶氧跌至0以下后，菌体对糖的消耗停止，表征菌体生长的OD值也不再增长。说明*T. cutaneum* CX1在培养基中溶氧为0时，停止对葡萄糖的吸收和利用，从而菌体生长停止。但是从菌体得率、油脂得率和菌体含油率三项指标来看，24 h后溶氧水平降到0与其他高于0的几个溶氧水平相比并无劣势。这表明后阶段即油脂积累期溶氧水平对油脂积累并无较大影响，但是溶氧水平低于0则会导致糖吸收的停止，从而菌体生长和油脂的继续积累受到遏制。

### 3.1.1.2 pH值

由于玉米秸秆经稀硫酸处理得到的水解液呈酸性，并且pH 4.0下菌体难以生长。故基于过程可行性考虑将发酵过程中，水解液的pH值被分别调节为4.5, 5.0, 5.5, 6.0，考察不同pH值对发酵的影响。

**表3.13 不同pH值对水解液中油脂发酵的影响**

Table 3.13 The effects of different pH on the lipid fermentation in CS hydrolysate

pH值	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g菌体)	菌体得率 (g/100g糖)	油脂得率 (g/100g糖)
4.5	10.24	2.24	21.8	27.3	6.0
5.0	10.71	2.12	19.8	28.2	5.6
5.5	11.29	1.69	15.0	29.7	4.5
6.0	11.46	1.65	14.4	30.2	4.3

如表3.13所示，随着pH值的升高菌体干重和菌体基于糖的得率都上升，但油脂产量、含油率和油脂基于糖得率都下降。这表明，低pH值对于菌体油脂的积累有利而对于菌体生长不利。鉴于糖化过程中对pH要求接近5.0，pH4.5和pH5.0油脂发酵情况相差不大，此后发酵中固定pH为5.0。

### 3.1.1.3 温度

温度高于 37°C 时 *T. cutaneum* CX1 会受到较大的抑制甚至无法生长，而温度低于 25°C 的发酵工业可行性差，特别对于生物能源生产更不实际。因此本实验温度的考察范围为 25-35°C。

**表3.14 不同温度对水解液中发酵的影响**

Table 3.14 The effects of different pH on the fermentation in CS hydrolysate

温度(°C)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g菌体)	菌体得率 (g/100g糖)	油脂得率 (g/100g糖)
25	11.29	1.99	23.5	23.5	4.1
30	11.14	1.74	22.7	22.7	3.6
35	8.04	1.44	17.5	17.5	3.1

如表 3.14 所示，随着温度的升高菌体干重和菌体基于糖得率下降，同时油脂产量、含油率和油脂基于糖得率都下降。说明无论是菌体生长还是油脂积累都需要较低的温度。但是 25°C 和 30°C 下的发酵数据差异不大，而工业生产中两个温度需要的能耗差别很大，所以以后发酵选择在 30°C 下进行。

### 3.1.1.4 YE添加

YE 中含有菌体生长所需的因子和离子，在合成培养基中 YE 的添加对菌体生长和产油都有很明显的促进作用。因此，在水解液中考察添加一定量的 YE (0.5 和 1.0 g/L) 对菌体产油发酵的影响。

**表3.15 不同YE加量对水解液中油脂发酵的影响**

Table 3.15 The effects of different YE addition on the lipid fermentation in CS hydrolysate

YE (g/L)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g菌体)	菌体得率 (g/100g糖)	油脂得率 (g/100g糖)
0	12.23	2.04	16.7	25.6	4.3
0.5	13.45	1.94	14.4	31.0	4.5
1	15.40	1.87	12.1	32.8	4.0

如表 3.15 所示, 在玉米秸秆水解液中添加 YE 有利于菌体生长, 但是不利于油脂的积累。原因可能是, 玉米秸秆中本身含有丰富的离子和营养因子, 不需要靠 YE 来提供。而 YE 中含有一定的氮源 (在 10% 左右), YE 的添加反而增加了氮源使得 C/N 比有一定的下降, 不利于菌体油脂的积累。

### 3.1.1.5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>添加量

硫酸铵是一种重要的速效氮源, 对菌体生长和油脂的积累存在一定的作用。但是过量的硫酸铵会增加水解液的含氮量, 从而降低C/N比不利于产油。本实验探索的硫酸铵添加剂量分别为: 0, 0.5和1 g/L。

如表3.16所示, 0.5 g/L和1 g/L的硫酸铵添加量对于油脂的积累和菌体的生长没有明显的影响, 而当水解液中不添加硫酸铵时, 菌体的生长和油脂的积累情况都变差。因此, 确定发酵中硫酸铵的加量为0.5 g/L。

表3.16 不同硫酸铵加量对水解液中油脂发酵的影响

Table 3.16 The effects of different ammonium sulfate addition on the lipid fermentation in CS hydrolysate

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g菌体)	菌体得率 (g/100g糖)	油脂得率 (g/100g糖)
0	9.64	1.27	13.1	22.4	2.9
0.5	12.23	2.04	16.7	25.6	4.3
1	11.80	2.02	17.1	25.9	4.4

## 3.1.2 水解液中 C/N 对油脂发酵的影响

### 3.1.2.1 C/N比的计算

玉米秸秆原料中木质纤维素含有三种主要成分，包括纤维素、半纤维素和木质素，水解后不仅仅产生葡萄糖，还包括木糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖和纤维二糖等。经测试，这些糖类都可以被 *T. cutaneum* 利用。但是，半乳糖、阿拉伯糖、纤维二糖和甘露糖等在木质纤维素水解液中的含量不高，而且含量检测需要特殊的色谱柱，因此在 C/N 比的计算中碳源以两种主要的糖类葡萄糖和木糖为基准。

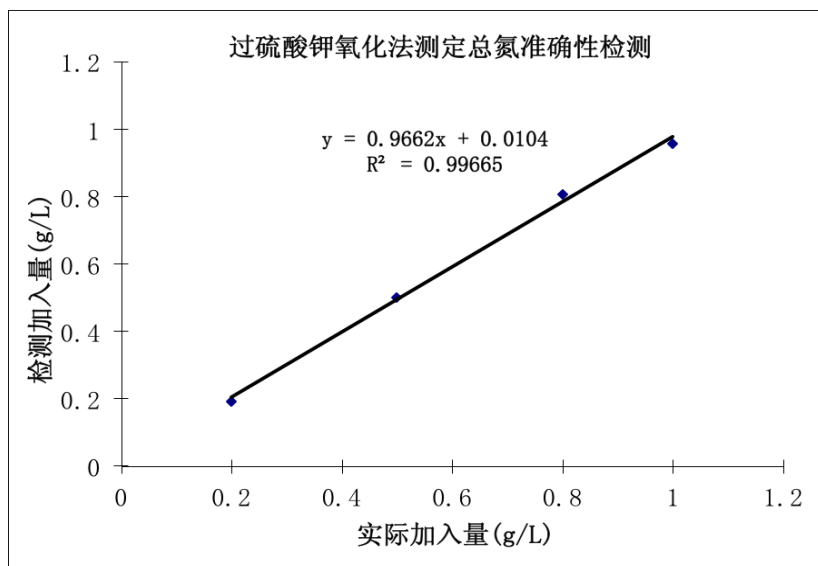


图3.12 总氮测定准确性检验

Fig. 3.12 Accuracy test of total nitrogen content determination

氮源则通过过硫酸钾氧化法测定总氮为基准，该方法测定相对较快而且同批次可以测定的样品数量多，但是该方法氮源的检出范围窄，容易受杂质物质如糖类的影响。由于水解液的成分比较复杂容易对过硫酸钾氧化法的测定造成干扰，而且其颜色很深，因此本实验通过增加稀释倍数的方法减小影响。这样，较高的稀释倍数就要求周围环境中杂质氮源的干扰降到最小，容器的清洗非常关键，本实验中的所有容器均采用重铬酸钾洗液清洗，溶液配制和测定用水均使用超纯水。

为保证该方法用于测量水解液中总氮含量的可行性与准确性，本实验对过硫酸钾氧化法进行了准确度检验。即在水解液样品里分别加入 0.2 g/L, 0.5 g/L, 0.8 g/L 和 1.0 g/L 的氨态氮，通过将测量加入量和实际加入量进行比较来检验该方法的准确性。如图 3.12 所示，测定值与实际值之间有很好的线性相关性， $R^2$  值达到了 0.9967，说明该方法适合于检测水解液中总氮含量。

C/N 比的计算中，氮源含量为发酵前水解液中的初始总氮含量与发酵结束时水解液中的总氮残余量的差值，发酵结束时间为油脂产量达到最大值时的时间，公式如(2-2)。在 2.5% 稀硫酸预处理条件下产生的水解液中，经计算 C/N 比为 30.6。

### 3.1.2.2 不同初始C/N比对发酵的影响

计算得到的2.5%稀硫酸预处理水解液中的C/N比为30.6，尽管实际的C/N比比计算值偏大，但相比于产油酵母油脂积累的培养基C/N比要求而言，相去甚远。在利用合成培

培养基发酵生产生物油脂的研究中，通常C/N比达到500左右<sup>[93]</sup>；而油脂发酵的培养基C/N比最基本的要求也在100左右，如果低于这个值一般会使产油微生物的菌体含油率在20%以下<sup>[94,95]</sup>。很多利用工农业废料如泥浆、番茄加工废料水解液和谷氨酸钠废料等作为原料生产生物油脂的研究，都报道了这些废料中较多的含氮量，不加糖提高C/N比的情况下含油率都在20%以下<sup>[94,96,97]</sup>。同样，利用大米草水解液作为原料生产生物油脂的研究也报道了原水解液中14.6%的低含油率<sup>[85]</sup>。为探究具有同样低C/N比的玉米秸秆水解液其产油情况，以及其油脂积累受C/N比因素的影响程度，本研究通过向水解液中外加葡萄糖达到不同的初始C/N比的方法考察C/N比对油脂积累的影响。

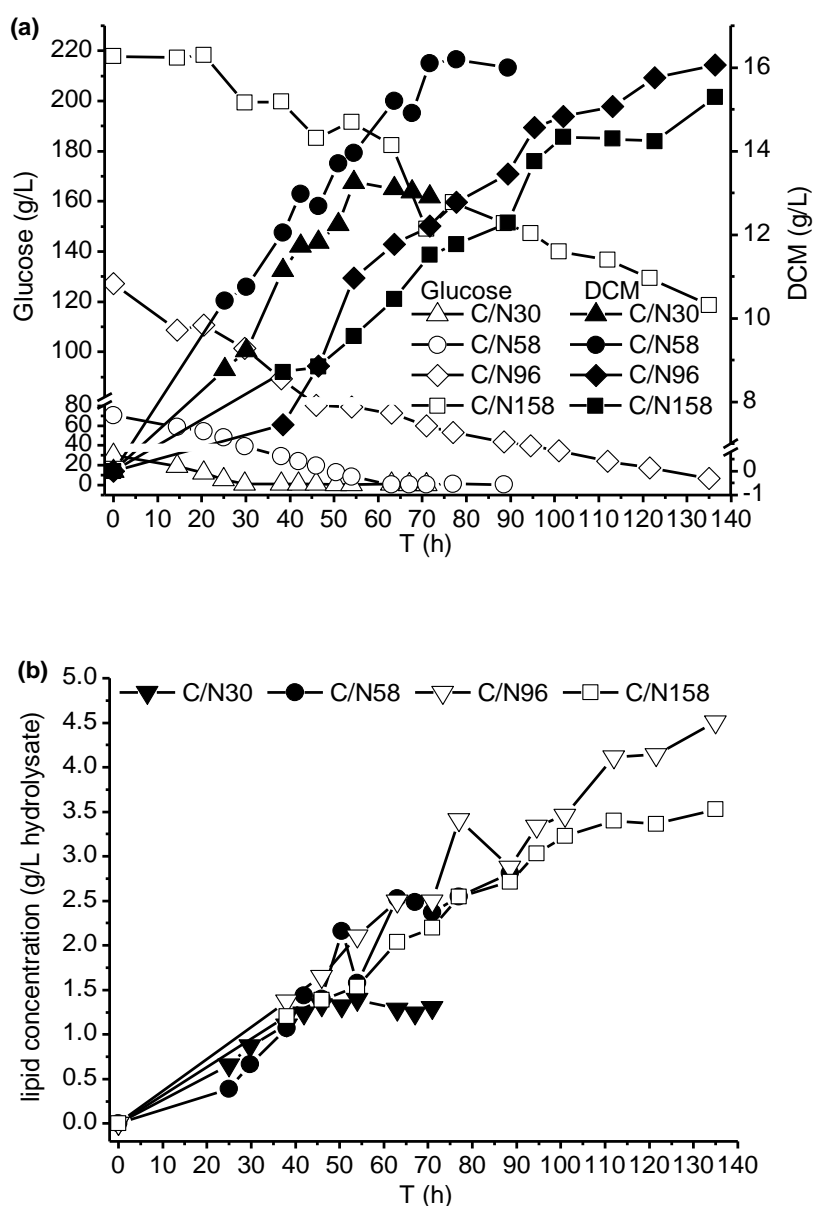


图 3.13 在不同初始 C/N 比下的水解液油脂发酵情况

Fig. 3.13 Fermentation profile under different initial C/N ratio in CS hydrolysate

表3.17 不同初始C/N比对水解液中油脂发酵的影响

Table 3.17 The effects of different C/N ratio on the lipid fermentation in CS hydrolysate

C/N 比 (mol/mol)	初始葡萄糖 浓度 (g/L)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g 菌体)	菌体得率 (g/100g 糖)	油脂得率 (g/100g 糖)
30.6	30.06	13.25	1.40	10.5	30.1	3.2
58.6	70.67	17.35	2.81	16.2	13.2	3.4
96.7	127.14	16.06	4.51	28.1	15.3	3.7
158.6	217.88	15.29	3.53	23.1	20.9	3.5

如表 3.17 所示, 在原水解液中 C/N 比 30.6 的情况下, 菌体含油率仅为 10% 左右。随初始 C/N 比从 30 到 96 增加的过程中, 生物量先从 13.25 g/L 增加到 17.35 g/L 而后稳定在这个水平, 菌体含油率从 10.5% 增加到 28.1%, 油脂产量从 1.40 g/L 增加到 4.51 g/L。Fig.3.13(a) 中显示, 初始 C/N 比 30 的水解液中, 30 h 左右葡萄糖已经耗完, 菌体的生长还未到达稳定期; 初始 C/N 比 71 的水解液中, 70 h 左右葡萄糖耗完, 菌体的生长刚好到达稳定期; 初始 C/N 比 127 的水解液中, 140h 左右葡萄糖耗完, 菌体生长已于 100h 左右进入稳定期。Fig.3.13(b) 中, 随初始 C/N 比从 30 到 71 到 127 的提高, 油脂合成曲线得以类似直线的延续。这表明, 水解液中初始 C/N 比很低, 在生长到达稳定时糖浓度已经很低, 而油脂积累的条件是氮源限制而碳源充足, 这是水解液油脂发酵产量偏低的主要原因。

值得注意的是, 当 C/N 比继续增加到 158 时, 却没有导致油脂合成量的进一步增加, 反而菌体干重, 菌体油脂含量和油脂产量都有一定的下降。原因是水解液中存在相对丰富的氮源, 达到这个 C/N 比时水解液中的糖浓度为 217.88 g/L。可能在此葡萄糖浓度下, 皮状丝孢酵母的生长与油脂积累都受到一定的抑制作用。报道中, 其他油脂酵母在 200 g/L 糖浓度以上也表现出了类似的现象<sup>[98]</sup>。也有报道称, 高浓度的糖抑制了油脂合成关键酶柠檬酸裂解酶的酶活, 从而抑制了油脂的合成<sup>[99]</sup>。

如图 3.13, 在初始 C/N 比 30 的水解液中, 虽然葡萄糖在 30 h 左右已经耗完, 但是菌体仍然在生长。原因是水解液中存在其他类型的碳源, 包括纤维二糖、半乳糖等寡糖和乙酸, 木糖等, 在葡萄糖耗净后为菌体的生长提供了碳源和能源。同时这也进一步反映了水解液中碳源和氮源比例对油脂合成的不利, 即 30 h 后碳源枯竭而氮源依然可供菌体利用继续生长, 结果是发酵油脂产量和菌体含油率分别仅为加糖后 C/N 比 96 下数值的 31% 和 37.4%。根据 C/N 比 30、58 和 96 下油脂生产的趋势, 如果不是因为高于 200 g/L 的糖的添加量对菌体的抑制作用, C/N 比在 158 下的油脂产量和菌体含油率应该会继续提高。这些现象表明了 C/N 比因素对于菌体油脂合成的重要影响, 它相比于之前不同发酵条件对菌体生长和油脂积累的影响, 要显著很多。

玉米秸秆中的丰富氮源主要可能来源于玉米的种质创新和生长过程中的大量施肥, 这是玉米秸秆物料所固有的特性。为了提高玉米秸秆水解液中的 C/N 比, 有两条途径: 一条是提高含碳量, 另外一条是降低含氮量。提高含碳量可以采用补糖等方法, 但是对于玉米秸秆工业可行的只能是增加木质纤维素的转化率, 进而提高初始糖浓度; 降低氮源含量方面需要找到工业可行的脱氮方法, 同时又不造成糖的损失。

### 3.1.2.3 间歇补糖方式增加C/N比对发酵的影响

在不同初始 C/N 比实验中，当初始糖浓度高于 200 g/L 时，体现了对菌体生长和产油的抑制作用。因此，本实验考察通过间歇补糖的方法提高糖浓度进而提高 C/N 比的效果。

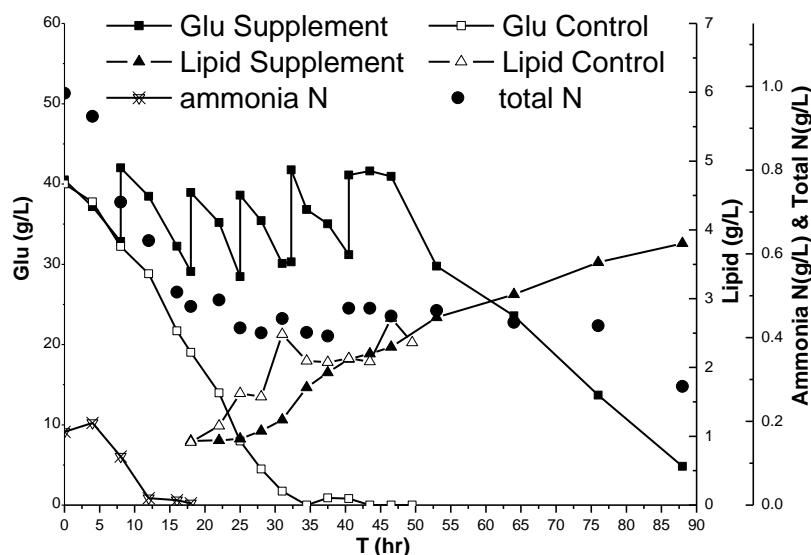


图3.14 间歇补糖对水解液油脂发酵的影响

Fig. 3.14 Effects of intermittent glucose supplement on lipid fermentation in CS hydrolysate

如图 3.14 所示，当通过间歇补糖的方式将初始糖浓度维持在 30-40 g/L 时，油脂在 30 h 菌体生长进入稳定期后得到了持续的积累。从氮源的利用看，水解液中的氨态氮在开始的 15 h 内首先被消耗完，总氮含量在 24 h 后也趋于平稳，以难利用或者不可利用的氮源形式存在。在氮源耗竭的 25 h 以后，油脂体现出了较快的直线积累。由于发酵体积及取样次数限制，总共的补糖次数为 5 次，直到糖利用殆尽油脂仍然体现出了持续的积累。从表 3.18 的数据分析，总共糖耗 93.8 g，油脂产量和含油率分别为 3.8 g/L 和 21.1%，这两个参数水平介于表 3.17 中初始补糖量在 70 g/L 和 127 g/L 之间。说明通过间歇补糖的方式增加 C/N 比可以有效增加菌体内的油脂积累。

表3.18 间歇补糖对水解液中油脂发酵的影响

Table 3.18 Effects of interval glucose supplementation on the lipid fermentation in CS hydrolysate

补糖方式	总糖耗 (g/L)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g菌体)	菌体得率 (g/100g糖)	油脂得率 (g/100g糖)
不补糖对照	52.80	17.67	2.07	11.8	33.1	3.9
间歇补糖	93.80	18.00	3.80	21.1	19.2	4.1

从图 3.14 中可以看出，油脂在 30-50 h 的积累速度快于 50 h 以后，而 30-50 h 与 50 h 以后不同的是，前者糖浓度维持在 30-40 g/L 后者糖浓度则低于 30 g/L，另外前者中残余的可利用氮源高于后者。可能的原因有两方面：一个是合适的糖浓度范围对油脂的积

累有效；另一个是合适的较高的 C/N 比对油脂合成有效，而非水解液中无可利用氮源。

### 3.1.2.4 不同糖浓度水平对发酵产油的影响

为了考察水解液中不同糖浓度水平对油脂积累的影响，本实验通过间歇补糖使水解液中的糖浓度维持在不同的水平上：20-30 g/L 和 10-20 g/L。

表3.19 不同糖浓度水平对水解液中油脂发酵的影响

Table 3.19 Effects of different sugar levels on the lipid fermentation in CS hydrolysate

糖浓度范围 (g/L)	总糖耗 (g/L)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g菌体)	菌体得率 (g/100g糖)	油脂得率 (g/100g糖)
10-20	86.50	19.01	3.43	18.2	21.9	4.0
20-30	99.50	17.78	3.18	17.9	17.9	3.2

从表 3.19 可以看出，尽管较低水平的糖浓度下油脂的积累情况好于较高水平的糖浓度，但两种糖浓度水平(10-20 和 20-30)之间对油脂积累的影响差别不大。因此，糖浓度水平的差异不是影响油脂合成的主要因素，那么推断可能油脂的积累仍然需要一定少量的可利用氮，可利用氮的完全耗竭对油脂的积累也不利。

### 3.1.3 油脂积累关键因素小结

通过以上实验，充分反映出 C/N 比对于 *T. cutaneum* 在水解液中积累油脂过程的重要性。尽管不同的发酵条件如 pH、温度、溶氧、YE 添加和硫酸铵添加等对油脂积累过程有或多或少的的影响，但与 C/N 比因素的影响相比其影响较小。发酵过程取最适的发酵条件和最适的工业应用条件：pH 5.0，溶氧 20-30%，温度 30°C，硫酸铵 0.5 g/L。

由于水解液中存在较高浓度（近 1 g/L）的总氮含量，要达到高于 100 甚至 200 的 C/N 比需要的糖浓度很高，对菌体的生长和油脂积累都会产生不利的的影响。通过间歇补料的方法补糖可以避免高糖浓度的抑制。但是，对于工业应用过程来讲，葡萄糖的补入会带来很高的成本使得其过程不具有工业可行性。因此，如何增加木质纤维素的转化率从而提高糖浓度和脱除玉米秸秆原料中的氮源，成为工业可行的提高水解液发酵生产油脂水平的关键。

## 3.2 水解液中抑制物的影响及预处理强度增加

### 3.2.1 合成培养基中添加抑制物对菌株生长的影响

在预处理过程中由于高温高压处理导致木质纤维素组分产生出多种衍生物，这些衍生物如甲酸、乙酸、糠醛、羟甲基糠醛等对菌体的生长都会产生各种程度的抑制。本实验通过向合成培养基中添加一定浓度组合的抑制物（甲酸 3 g/L，乙酸 3 g/L，乙酰丙酸 5 g/L，5-羟甲基糠醛 1 g/L，糠醛 1 g/L，香兰素 0.2 g/L，对羟基苯甲醛 0.2 g/L），考察其在成分较单一的合成培养基中对菌体生长的影响。

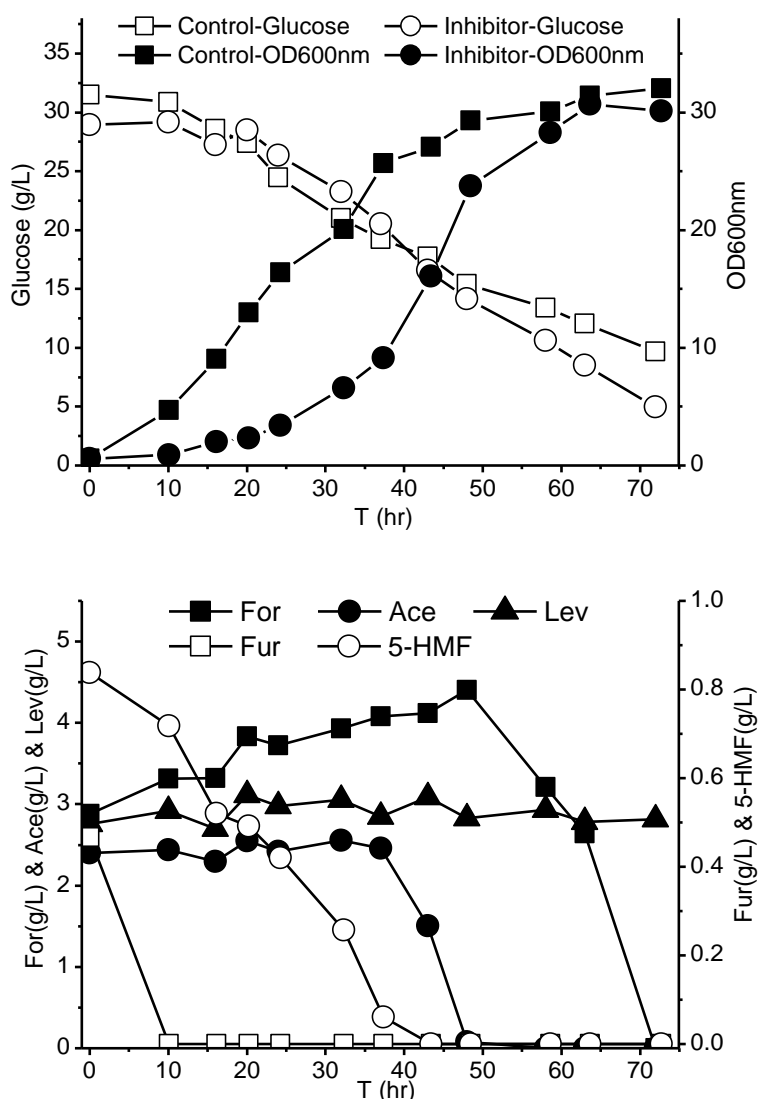


图3.21 合成培养基中几种抑制物对发酵的影响

Fig. 3.21 Effects of several inhibitors on cell growth in synthesized medium

如图3.21反映了液相分析可以检测出的几种抑制物，包括糠醛、5-羟甲基糠醛、甲酸、乙酸和乙酰丙酸，它们降解的先后顺序为糠醛>5-羟甲基糠醛>乙酸>甲酸，而乙酰丙酸则不被消耗。就这几种抑制物的毒性而言，糠醛对菌体的损伤最大，而它最先被菌株所降解；乙酰丙酸对菌体生长基本没有影响，它就不被菌体降解。由此推测，菌体对各种抑制物的降解是一种对自身的保护机制。从糖耗情况看，添加抑制物和不添加抑制物糖耗速率基本一致，但是添加抑制物比不添加抑制物最终会消耗更多的糖。从菌体生长情况看，添加抑制物之初，即各种毒性较强抑制物消耗的同时，菌体的生长受到了明显的抑制；而在大部分抑制物降解后，菌体又能快速生长，使得最终的OD值加与不加抑制物两种发酵相当。由此，猜测在毒性较强的抑制物消耗的时候，糖被菌体用于抵抗抑制物带来的胁迫和修复菌体损伤；而抑制物的抑制去除后，菌体则体现快速的生长。

### 3.2.2 预处理强度增大对水解液中糖和抑制物的影响

预处理强度的增加，往往会带来木质纤维素结构的进一步破坏，纤维素结构能够被更好的暴露，结晶态的纤维素能够被转化为更多非结晶态的纤维素，这样使得纤维素酶在水解过程中能够更好的作用，将纤维素或半纤维素成分分解为可利用的单糖进而提高纤维素酶的转化效率。但是，预处理强度的增大往往是物理化学处理过程的加深过程，这样更多的抑制物被释放出来，对后续发酵过程菌体的生长起强烈的抑制作用。决定预处理强度的主要参数包括：温度，处理时间和稀硫酸浓度。其中最重要的参数是稀硫酸的浓度，本实验就以稀硫酸浓度为标志定义不同的预处理强度，即稀硫酸用量梯度为：1.25%，2.5%，3.0%。表 3.21 反映了伴随预处理强度的加深，玉米秸秆物料水解后的水解液中糖浓度和抑制物组分含量的变化。

**表3.21 不同预处理强度下水解液的组成**

Table 3.21 The composition of CS hydrolysate under different pretreatment severity

预处理强度 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 浓度)	葡萄糖(g/L)	木糖(g/L)	乙酸(g/L)	糠醛 (g/L)	羟甲基糠醛 (g/L)
1.25%	23.89	11.63	2.99	0	0
2.5%	31.87	13.02	3.54	0.28	0.49
3.0%	42.29	14.86	5.12	0.73	0.69

如表 3.21 所示，乙酸、糠醛和羟甲基糠醛是玉米秸秆水解液中可以通过液相检出的三种抑制物。随着预处理强度的逐渐增加，水解液中的葡萄糖和木糖的含量都逐渐升高，而乙酸、糠醛和羟甲基糠醛的浓度也如预期中逐渐增大。

### 3.2.3 经不同预处理强度处理后的水解液油脂发酵情况

将三种不同预处理强度下的水解液的初始糖浓度补齐到同一水平，以排除不同糖浓度的影响，然后进行油脂发酵。如图 3.22，当预处理强度逐渐加深时，预处理过程中硫酸浓度从 1.25% 到 2.5% 增加的过程中，葡萄糖的利用速率下降，菌体生长受到抑制而干重下降，同时油脂产量也有大幅度的下降。而当预处理强度加深到硫酸使用量为 3.0% 时，菌体受到严重抑制而无法生长。三种预处理强度下水解液中可利用总氮水平相当，说明预处理强度对水解液中氮源影响较小。

从表 3.22 中可以看出，随预处理强度的加深，菌体干重、油脂产量、油脂基于糖得率和菌体基于糖得率都有明显的下降。但是 1.25% 和 2.5% 酸浓度的预处理，其菌体含油率相差不大，主要是因为两者 C/N 比相差不大。需要指出的是，在合成培养基中加入 3 g/L 乙酸、1 g/L 糠醛和 1 g/L 羟甲基糠醛，这个抑制物含量水平下菌体生长虽然受到了一定的抑制，但是还是能够抵抗胁迫而生长起来。在 3.0% 酸浓度预处理下的水解液，糠醛和羟甲基糠醛的浓度低于这个水平，只有乙酸多于 5 g/L，菌体却无法生长。这个现象可能有两方面原因：一方面，乙酸多于 5 g/L 时超出了菌株可以耐受的范围导

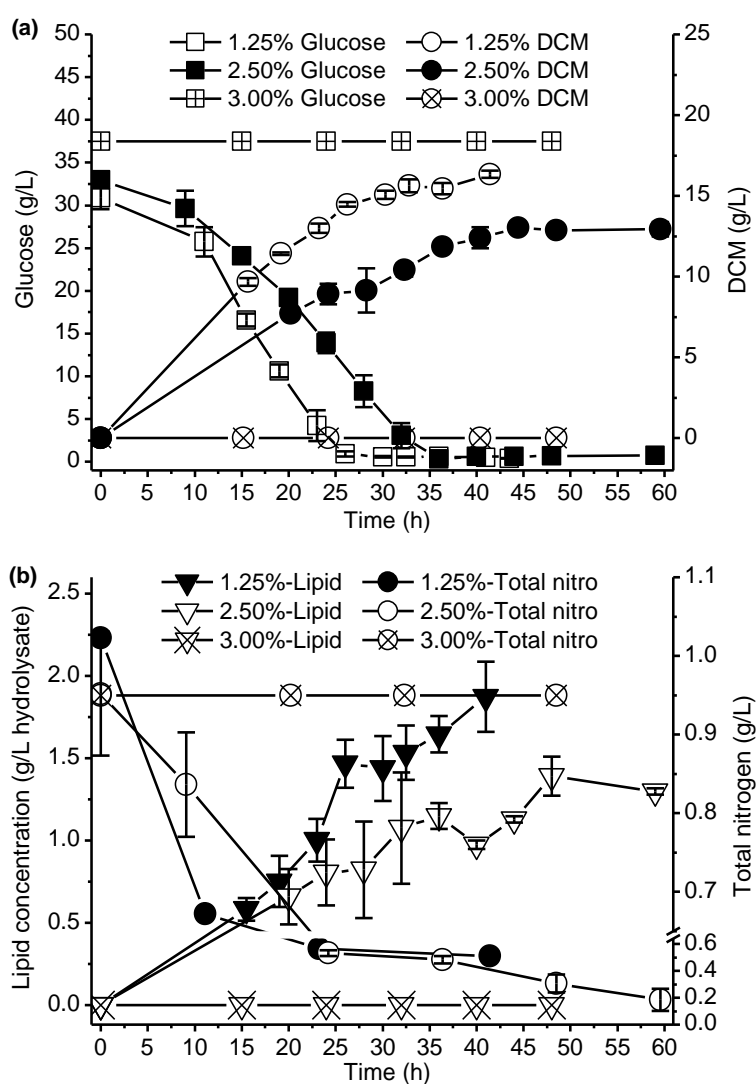


图3.22 不同预处理条件下水解液油脂发酵情况

Fig. 3.22 Fermentation profile in CS hydrolysate under different pretreatment severity

表3.22 不同预处理强度下水解液的发酵参数

Table 3.22 Fermentation parameters of CS hydrolysate under different pretreatment severity

预处理强度 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 浓度)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g菌体)	油脂得率 (g/100g糖)	菌体得率 (g/100g糖)	C/N比 (mol/mol)
1.25%	16.34±0.21	1.87±0.21	11.5±1.4	5.1±0.7	42.4±0.004	32.3±1.0
2.5%	12.87±0.21	1.39±0.12	10.8±1.1	3.0±0.3	27.9±0.002	32.7±4.4
3.0%	not grow	not grow	not grow	not grow	not grow	not grow

致其无法生长；另一方面，水解液中还存在其他种类的强抑制物，在现有的液相条件下无法被检出。总之，随着预处理过程中预处理强度的加大，水解液中抑制物的水平随之上升，对菌体生长和油脂积累都产生了很强的抑制作用。

### 3.3 生物脱毒

#### 3.3.1 生物脱毒的优势

由于预处理过程中产生了各种类型的抑制物，其浓度随着预处理强度的加深而提高，对菌体的生长和产油有严重的抑制作用。如何脱除存在在水解液中的抑制物成为关键问题，Zhang<sup>[89][89]</sup>等人提出的生物脱毒的方法很有工业应用的潜力，在利用玉米秸秆生产生物乙醇的过程中体现出了优势。因此，本实验将生物脱毒的方法利用在生物油脂生产的前处理过程中，检验其对油脂生产的作用。

表3.31 生物脱毒后水解液组成变化

Table 3.31 The composition of CS hydrolysate after biodetoxification

处理条件	葡萄糖(g/L)	木糖(g/L)	乙酸(g/L)	糠醛 (g/L)	羟甲基糠醛(g/L)
1.25%非脱毒	23.89	11.63	2.99	0	0
1.25%脱毒	27.65	9.35	1.62	0	0
2.5%非脱毒	31.87	13.02	3.54	0.28	0.49
2.5%脱毒	36.38	12.23	1.08	0	0

如表3.31所示，经过脱毒处理以后，水解液中的各种糖浓度得到了一定的提高，也即脱毒过程增加了木质纤维素流向糖的转化率。同时，抑制物糠醛和羟甲基糠醛被完全脱除，乙酸被脱除掉大部分。木质纤维素转化为糖的转化率提高，可能有两方面的原因：一方面是脱毒过程脱掉了大部分的抑制物，而这些抑制物本身就是纤维素酶的抑制剂，那么脱毒过程就解除了抑制剂对酶的抑制，糖化效率提高；另一方面是脱毒过程是霉菌对预处理后原料中部分物质的分解过程，在此过程中对木质纤维素可能起到了进一步的破坏作用，从而有利于纤维素酶与底物的结合，这样糖化效率也提高。但是，脱毒过程往往会带来木糖的减少，但是木糖通常被葡萄糖利用之后才被利用，对油脂合成的贡献不大。

表3.32 生物脱毒对水解液油脂发酵的优势

Table 3.32 Advantages of biodetoxification for lipid fermentation in CS hydrolysate

处理条件	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g 菌体)	菌体得率 (g/100g 糖)	油脂得率 (g/100g 糖)	C/N 比 (mol/mol)
1.25%非脱毒	16.34±0.21	1.87±0.21	11.5±1.4	42.4±0.041	5.1±0.7	32.3±1.0
1.25%脱毒	16.54±0.22	1.94±0.23	11.7±1.1	40.6±0.039	5.1±0.1	29.6±3.2
2.5%非脱毒	12.87±0.21	1.39±0.12	10.8±1.1	27.9±0.037	3.0±0.3	32.7±4.4
2.5%脱毒	15.27±0.26	2.88±0.10	18.9±0.3	33.9±0.043	6.4±0.2	40.0±5.2

从油脂发酵参数分析，如表 3.32 所示 2.5%硫酸预处理原料，经过脱毒后，抑制物对于生长的抑制被解除，其生物量从 12.87 g/L 上升到 15.27 g/L，菌体得率由 27.9 g/100g 上升到 33.9 g/100g；同时油脂的积累得到了促进，其油脂产量由 1.39 g/L 提高到 2.88 g/L，含油率由 10.8% 提高到 18.9%，油脂得率由 3.0 g/100g 提高到 6.4 g/100g。然而，对于抑

制物水平很低的 1.25% 硫酸预处理原料，脱毒处理则没有带来菌体生长和油脂积累上的差异。也就是说，脱毒的优势体现在抑制物水平高的 2.5% 的物料上，所以推测脱毒优势出现的主要原因是脱除了存在在物料上的各种抑制物。

如图 3.31，对于 2.5% 酸预处理的玉米秸秆，脱毒以后水解液中可利用氮含量下降，从未脱毒的 0.77 g/L 下降到脱毒后的 0.57 g/L，下降了 26%。然而初始葡萄糖浓度从 31.87 g/L 提高到 36.38 g/L，这样导致了水解液中初始 C/N 比的升高，从 32.7 升高到 40.0。表明生物脱毒过程有着一定的脱氮功能，可能源于脱毒过程中霉菌对玉米秸秆中部分氮源的利用，这对于油脂的积累非常有利。

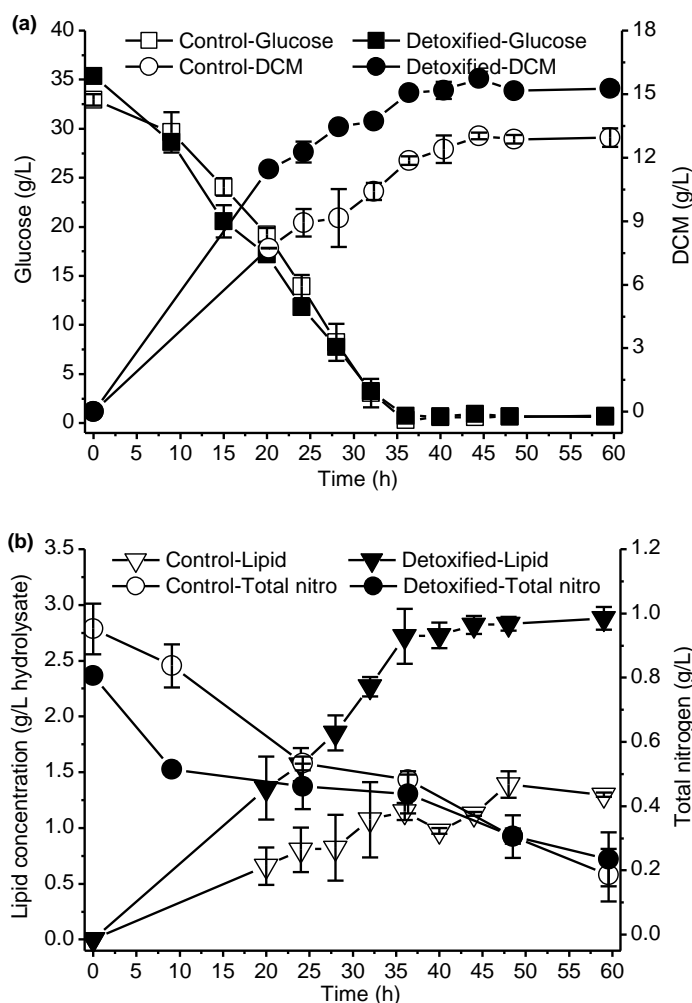


图3.31 2.5%酸处理下脱毒对水解液油脂发酵的优势

Fig. 3.31 Advantages of biotodetoxification for lipid fermentation in 2.5%-CS hydrolysate

值得注意的是，当预处理强度由 1.25% 的酸用量增加到 2.5% 的酸用量时，抑制物水平提高，发酵参数菌体基于糖的得率和油脂基于糖的得率都同时下降，分别由 42.4 g/100g 和 5.1 g/100g 下降到 27.9 g/100g 和 3.0 g/100g。然而当 2.5% 酸预处理原料经脱毒后，抑制物水平下降时，这两个参数同时上升，分别由 27.9 g/100g 和 3.0 g/100g 上升到 33.9 g/100g 和 6.4 g/100g。这暗示了当抑制物存在时，糖流向了除菌体生长和油脂积累

以外的其他途径，很可能是用来消除抑制物对其菌体的抑制甚至降解抑制物。在合成培养基中，几种抑制物首先被降解，糖被消耗但不是用于菌体生长，恰恰说明了这一点。当脱毒过程将抑制物去除以后，糖用于菌体生长和油脂积累的得率又同时增加，进一步证实了抑制物的存在会使菌体消耗一部分糖用于抵抗其胁迫。

在图 3.31 中，脱毒和非脱毒的糖耗速率基本一致，但是氮源的消耗速率，脱毒明显快于非脱毒的水解液。特别是在发酵开始的 24-30 h 以内，经脱毒处理的水解液氮源利用速率很快，这样氮源在较短的时间内下降到限制的水平。在 15 h 左右氮源耗竭，此时水解液中还有较高浓度的葡萄糖可供用于产油，油脂的积累曲线也快速上涨。但是对于未经脱毒处理的水解液，35 h 左右氮源限制才出现，此时可供利用的葡萄糖浓度已经很低，自然可用于油脂积累的葡萄糖受到了限制，油脂积累随之下降。非脱毒水解液中氮源利用速度缓慢的原因可能是，水解液中抑制物的存在使得部分碳源被利用于产能或抵抗抑制物的胁迫，而氮源由于没有菌体的生长而不被利用。这样，氮源限制时间大大延迟，不利于油脂生产。

从不同初始 C/N 比的影响实验中，我们可以看出 C/N 比 30、58 和 96 分别对应菌体含油率 10.5%、16.2% 和 28.1%，C/N 比的上升和含油率的上升有近似直线的关系。基于 2.5% 硫酸预处理的脱毒使得 C/N 比上升了 22% (从 32.7 到 40)，然而菌体的含油率上升却高达 75% (从 10.8% 到 18.9%)，明显不呈线性关系。原因很可能是，脱毒过程使得用于抵抗抑制物胁迫的那部分碳源用于菌体生长和油脂生产，实际的碳源增长要高于表观的碳源增长，这样实际的 C/N 比提高也大于表观的 C/N 比提高。

### 3.3.2 预处理强度的进一步提高

在未引入脱毒流程的情况下，预处理强度高到 3.0% 的硫酸浓度，菌体就无法在水解液中生长。而脱毒可以降解大部分抑制物，而且在经 2.5% 硫酸预处理的水解液中体现出了明显的优势。预处理强度的增加可以增加木质纤维素原料的转化率，进而一定提高水解液中的初始糖浓度，对水解液的低 C/N 比有一定的缓解作用。因此，在脱毒流程引入的前提下，预处理强度被进一步加深，硫酸浓度由 2.5% 增加到 3.0% 甚至 3.5%。

表 3.33 生物脱毒后不同预处理强度下的水解液组分

Table 3.33 The composition of CS hydrolysate under the combination between biodetoxification and pretreatment intensification

处理条件	葡萄糖(g/L)	木糖(g/L)	乙酸(g/L)	糠醛 (g/L)	羟甲基糠醛(g/L)
3.0%非脱毒	42.29	14.86	5.12	0.73	0.69
2.5%脱毒	36.38	9.35	1.62	0	0
3.0%脱毒	44.20	3.92	2.35	0	0
3.5%脱毒	44.56	12.31	1.91	0	0

表 3.33 显示，在生物脱毒背景下预处理强度的加深提高了水解液中的初始葡萄糖浓度，特别是在预处理强度由 2.5% 酸浓度提高到 3.0% 酸浓度时优势比较明显，但是当预

处理强度进一步加深到 3.5% 酸浓度时, 葡萄糖浓度就没有明显的提升。可能是因为 3.0% 酸浓度的预处理强度已经达到了木质纤维素转化率的极限。在较为强烈的预处理条件下经过脱毒, 主要的抑制物仍然能被去除殆尽。但是, 3.5% 酸浓度预处理原料的脱毒进程非常缓慢, 脱毒时间很长, 可能原因是这种强度的预处理下抑制物水平太高, 达到了脱毒菌种的耐受能力。

表3.34 生物脱毒后不同预处理强度下的水解液的发酵参数

Table 3.34 Fermentation parameters of CS hydrolysate under the combination between biodetoxification and pretreatment intensification

预处理条件 (经过脱毒)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g 菌体)	菌体得率 (g/100g 糖)	油脂得率 (g/100g 糖)	C/N 比 (mol/mol)
2.5%	15.27±0.26	2.88±0.10	18.9±0.3	33.9±0.005	6.4±0.2	40.0±5.2
3.0%	15.44±0.51	3.10±0.05	23.5±0.6	33.9±0.011	7.0±0.1	47.4±4.2
3.5%	13.28±0.43	2.70±0.33	20.4±0.8	25.5±0.008	5.4±0.4	48.5±3.9

从基于脱毒过程的各种预处理强度的水解液发酵参数来看, 未经脱毒的 3.0% 酸浓度的原料水解后菌体不能在其中生长, 而其脱毒后原料的水解液中菌体生长旺盛, 并且菌体油脂生产也达到了最佳状态。当预处理强度由 2.5% 酸浓度上升到 3.0% 酸浓度时, 生物量和菌体得率基本不变; 而 C/N 比从 40.0 提高到了 47.4, 油脂产量也由 2.88 g/L 上升到 3.10 g/L, 菌体含油率从 18.9% 上升到 23.5%。但是, 当预处理强度继续提升到 3.5% 酸浓度时, 菌体油脂产量、含油率和油脂得率都下降; 而生物量和菌体得率也下降。这样看来, 继续提高预处理强度到酸浓度 3.5%, 既不具有提高木质纤维素转化率的优势, 发酵油脂产量也下降, 故不可取。

### 3.3.3 脱毒程度的确定

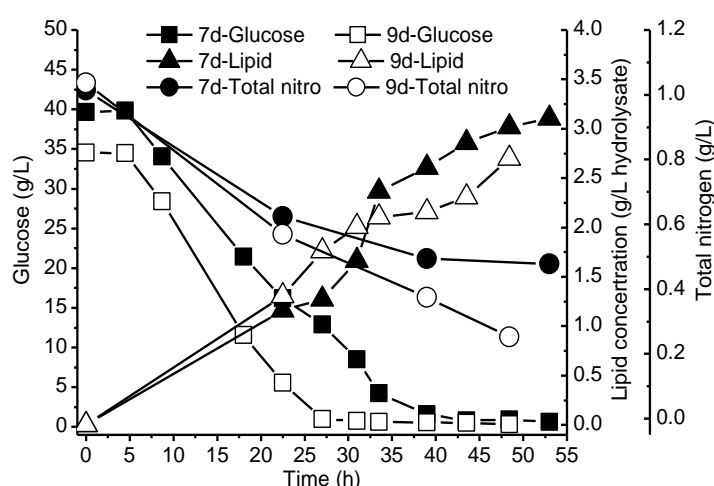


图3.32 脱毒时间延长对3.0%水解液油脂发酵的影响

Fig. 3.32 Fermentation effects of the elongation of biodetoxification days for 3.0%-CS

由于脱毒过程体现出了一定的脱氮优势, 因此本实验将脱毒时间进一步延长验证其

能否带来氮源的进一步脱除，进一步有利于油脂发酵。在 3.0% 酸浓度预处理下，每隔 2-3 天去一次脱毒样品，用水浸出物料表面的成分并液相分析其抑制物浓度，当无抑制物检出时继续延长两天。

表3.35 不同脱毒天数下的3.0%酸预处理原料水解液组分

Table 3.35 Compositions of 3.0%-CS hydrolysate under different biodetoxification days

脱毒天数 (天)	葡萄糖(g/L)	木糖(g/L)	乙酸(g/L)	糠醛 (g/L)	羟甲基糠醛 (g/L)
0	42.29	14.86	5.12	0.73	0.69
2	41.36	14.74	4.20	0.42	0.28
5	44.53	15.20	2.16	0.15	0
7	43.64	5.98	0.63	0	0
9	37.98	5.14	0.86	0	0

表3.36 脱毒时间延长下油脂发酵参数

Table 3.36 Fermentation parameters under the elongation of biodetoxification days

脱毒天数(天)	菌体干重 (g/L)	油脂产量 (g/L)	菌体含油率 (g/100g 菌体)	油脂得率 (g/100g 糖)	C/N 比 (mol/mol)
7	10.20	3.11	30.4	7.1	43.2
9	13.90	2.70	19.4	7.1	25.7

如表 3.35，两种重要的抑制物糠醛和羟甲基糠醛在脱毒 7 天的时候被完全脱除，此时乙酸的浓度也非常低。因此主要考察抑制物脱除的 7 天后，继续延长脱毒时间对油脂发酵的影响。如图 3.36，当脱毒延长的 9 天时，恰好与预期情况相反，C/N 比有较大幅度的下降，一方面因为水解液糖浓度的下降，另外一方面水解液中可利用氮源的增多。这样，延长脱毒时间导致了油脂产量和含油率的下降而不可取。分析原因可能是，当脱毒霉菌分解完抑制物以后，开始利用木质纤维素或其表面的糖类，并且将不可利用氮源转化为可利用氮源。因此，将脱毒程度定为糠醛和羟甲基糠醛刚好被脱除时。

### 3.3.4 3.0% 酸浓度预处理强度下的发酵特征

经过脱毒处理和预处理强度的联合优化，最终将预处理强度定为酸浓度 3.0%。如图 3.33 为 3.0% 预处理强度经脱毒后的水解液发酵特征。

如图 3.33 所示，木糖可以被 *T. cutaneum* 利用，但其利用在葡萄糖耗竭之后。经过脱毒处理的水解液木糖含量降低，其对 C/N 比的贡献也不大。经过脱毒和预处理强化的联合作用，使得菌体的含油率由起初 2.5% 预处理强度下的 10% 左右，提高到了 20% 以上。尽管 20% 的含油率对产油微生物来说还是很低，仅仅到达了最低的含油率标准，但是玉米秸秆水解液中本身含有丰富的氮源和很低的 C/N 比，在此 C/N 比下其他类似工作的菌体含油率也在 10% 左右。本工作将 C/N 比由 30 左右提高到大约 47，并在 C/N 比低于 100 的最低标准下，获得了 20-30% 的含油率。

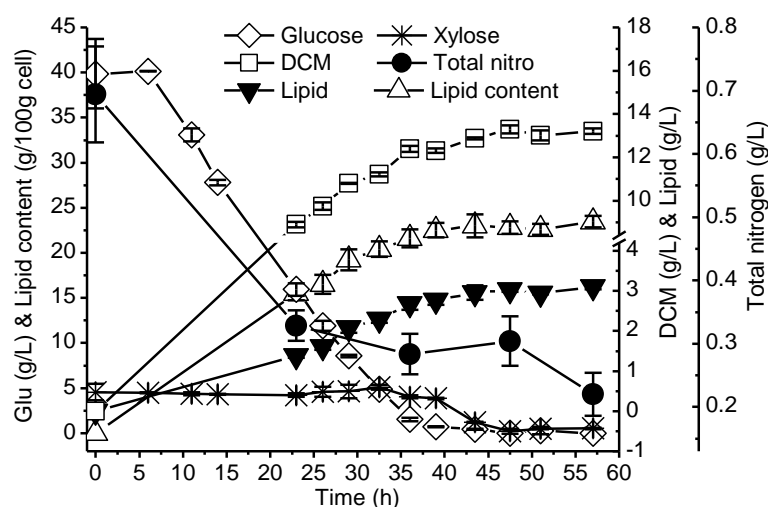


图3.33 生物脱毒下3.0%酸预处理水解液油脂发酵概况

Fig. 3.33 Fermentation profile of biodetoxified 3.0%-CS hydrolysate

同时值得注意的是，图中当菌体生长进入稳定期时（大约 30-35 h），水解液中的总糖含量已经不足 10 g/L，还与理想的碳源充足的油脂合成条件相差很远。因此今后的工作还应集中于如何利用经济的和工业可行的手段，有效提高水解液中含碳量和脱除水解液中的氮源以提高 C/N 比上面。

### 3.4 生物油脂

#### 3.4.1 生物油脂的脂肪酸组成

利用玉米秸秆水解液生产的生物油脂，经甲脂化后通过气质联用分析其脂肪酸组成。如图3.41所示，甲脂化后的生物油脂最主要的成分是油酸甲酯(18:1)占54.3%，其次是棕榈酸甲酯(16:0)占18.9%，随后是亚油酸甲酯(18:2)占9.3%和棕榈油酸甲酯(16:1)

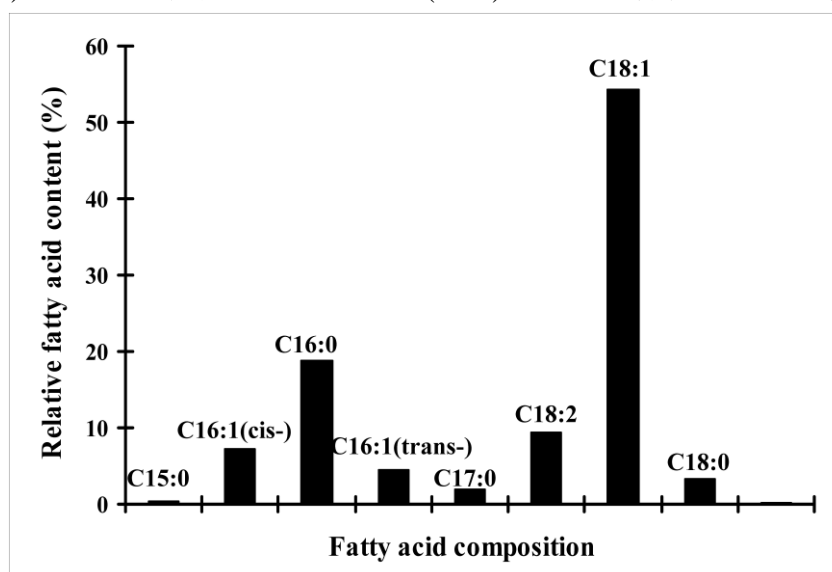


图3.41 油脂脂肪酸组成

Fig. 3.41 Fatty acid composition of the lipid extracted from the cells

占 7.2%。这个脂肪酸组成和报道的植物油如大豆油成分很相似<sup>[37]</sup>，因此可以作为很有前景的原料生产生物柴油。

### 3.4.2 菌体菌体内油脂的苏丹黑染色

油脂菌体内的油脂成分可以被苏丹黑染料染成黑色，而菌体其他成分则被番红染成红色，如图 3.42 为菌体油脂积累期染色照片。

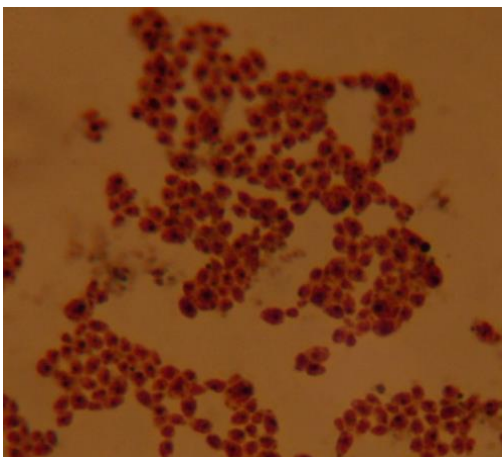


图3.42 菌体油脂的苏丹黑染色

Fig. 3.42 Cell lipid stain using sudan black

## 第 4 章 结论和展望

(1) 在利用木质纤维素水解液进行油脂生产的发酵过程中, 发酵条件如 pH, DO 和温度等对菌体生长和油脂积累都由一定程度的影响。其中, a, 相对较低的 pH 不利于菌体生长但是有利于油脂积累; b, 菌体生长需要高水平的 DO, 而油脂的积累对于溶氧的要求不高; c, 较低的温度对菌体生长和油脂积累都有利。最终发酵条件确定为: pH 5.0, DO 20-30%, 温度 30°C,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  加量为 0.5 g/L。

(2) 玉米秸秆中存在着丰富的氮源, 这导致了玉米秸秆水解液中很低的 C/N 比, 大约在 30 左右。因此原水解液中菌体的含油率仅在 10% 左右, 远低于产油脂酵母正常的含油率。通过外加葡萄糖的方式提高 C/N 比的方法, 检验 C/N 比对水解液中菌体油脂发酵的影响, 结果显示将 C/N 比提高到约 96 时, 菌体的含油率提高了近 2 倍。可见与其他发酵条件如 pH、DO 和温度等相比, C/N 比对产油发酵的重要性大于其他条件, 而成为限制水解液中油脂生产的主要因素。

(3) 预处理过程是在高温高压下破坏木质纤维素结构的过程, 会产生各种各样的抑制物, 例如乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛等。这些抑制物对菌体的生长和油脂的积累有明显的抑制作用。高的预处理强度会带来较高的木质纤维素转化为糖的转化率。预处理强度主要以稀硫酸的使用浓度为标志, 稀硫酸浓度越高, 预处理强度越强, 抑制物水平也越高。

(4) 为了获得较高的木质纤维素转化率, 需要相对较高强度的预处理过程, 但是其产生的高浓度的抑制物会强烈抑制菌体的生长甚至导致菌体无法生长。生物脱毒的方法可以去除预处理过程中产生的主要抑制物。从脱毒处理对水解液油脂发酵的结果来看, 脱毒可以提高生物量和菌体油脂产量, 增加生物量和油脂量基于糖的得率。另外, 脱毒过程也有一定的提高木质纤维素转化率和脱氮作用, 从而提高水解液中的 C/N 比, 这对油脂的发酵过程非常有利。

(5) 在生物脱毒的基础上, 预处理强度可以进一步提高, 而水解液中不会出现高浓度的抑制物抑制菌体生长。当预处理强度提高到 3.0% 的稀硫酸用量时, 油脂的生产达到最优, 菌体含油率超过 20%。继续提高预处理强度到 3.5% 稀硫酸用量则会带来油脂产量和含油率的下降。

(6) 在脱毒程度方面, 确定为玉米秸秆原料中的抑制物刚好被脱除的时间。进一步延长脱毒时间会导致水解液中可利用氮源的进一步增加, 继而 C/N 比明显下降, 不利于油脂的积累。

(7) 通过 3.0% 硫酸浓度预处理的水解液在发酵过程中, 氮源达到限制时水解液中的碳源含量已经很低, 离油脂发酵的理想条件碳源丰富而氮源限制仍相差很远, 这样 C/N 比进一步的提高仍然是制约油脂生产的关键问题。

(8) 通过预处理强度增加和生物脱毒联合的方法, 水解液油脂生产的油脂产量和菌体含

油率都提高了一倍。尽管最终的油脂含量在 20% 左右，仍然处于油脂生产的较低水平，但是利用 C/N 比很低的木质纤维素原水解液而没有其他碳源添加的条件下，达到这个提高有很重要的意义。本文所使用的两大主要方法预处理强度增加和生物脱毒都是工业应用可行的且经济的，为以后木质纤维素原料产生物油脂的研究打下了基础。如何采用经济可行的方法，提高水解液中的碳源水平或者脱除氮源是以后工作的关键。

## 参考文献

- [1] International Energy Agency. Oil Market Report. A monthly oil market and stocks assessment. <http://omrpublic.iea.org>. 2007, 13 March
- [2] <http://www.nymex.com>.
- [3] IPCC WGI Fourth Assessment Report. Intergovernmental panel on climate change. February, 2007
- [4] M. Mittelbach, B. Pokits, A. Silberholz. Production and fuel properties of fatty acid methyl esters from used frying oil. Liquid Fuels from Renewable Sources. Nashville, Tennessee. 1992
- [5] CL Peterson, DL Reece, R. Cruz, J. Thompson. A comparison of ethyl and methyl esters of vegetable oil as diesel fuel substitutes. 1992, 99-110
- [6] CL Peterson, DL Reece, BL Hammond, J. Thompson, S.M. Beck. Processing, characterization, and performance of eight fuels from lipids. Applied Engineering in Agriculture. 1997, 13(1):71-79
- [7] Vellguth G. Performance of vegetable oils and their monoesters as fuels for diesel engines. SAE Paper. 1983: 831358
- [8] D.Y.Z. Chang, J.H. Van Gerpen, I. Lee, L.A. Johnson, E.G. Hammond, S.J. Marley. Fuel properties and emissions of soybean oil esters as diesel fuel. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1996, 73(11):1549-1555
- [9] G. Knothe. Historical perspectives on vegetable oil-based diesel fuels. Inform. 2001, 12(11):1103-1107
- [10] Martinez de Vedia R. Vegetable oils diesel fuels. Diesel Power Diesel Transp. 1944, 22:1298-1304
- [11] J. Walton. The fuel possibilities of vegetable oils. Gas Oil Power. 1938, 33:167-168
- [12] M. Carriquiry. US biodiesel production: recent developments and prospects. Iowa Ag Review. 2007, 13(2)
- [13] US National Biodiesel Board.  
[http://www.biodiesel.org/pdf\\_files/fuelfactsheets/Production\\_Graph\\_Slide.pdf](http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/Production_Graph_Slide.pdf). 2008
- [14] B. Sims. Biodiesel: A global perspective. Biodiesel Magazine.  
<http://www.biodieselmagazine.com/article.jsp>. 2007
- [15] AW Schwab, GJ Dykstra, E. Selke, SC Sorenson, EH Pryde. Diesel fuel from thermal decomposition of soybean oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1988, 65(11):1781-1786

- [16] M. Fangrui, A.H. Milford. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technol.* 1999, 70(1):1-15
- [17] P. Felizardo, M.J. Neiva Correia, I. Raposo, J.F. Mendes, R. Berkemeier, J.M. Bordado. Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Manage.* 2006, 26(5):487-494
- [18] M.G. Kulkarni, A.K. Dalai. Waste cooking oil an economical source for biodiesel: A review. *Ind Eng Chem Res.* 2006, 45(9):2901-2913
- [19] Sommerville C. *Biofuels.* *Curr Biol.* 2006, 17:115-119
- [20] Y.M. Choo, Ma, A.N., Basiron Y., Yung, C.L., Cheng, S.F. US2006288637. 2006
- [21] Z. Wiesman, Herskowitz, M., Grinberg, S. WO06126206. 2006
- [22] J.T. Sears. US2007048848. 2007
- [23] FB Metting. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 1996, 17(5):477-489
- [24] P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng.* 2006, 101(2):87-96
- [25] A. Banerjee, R. Sharma, Y. Chisti, UC Banerjee. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit Rev Biotechnol.* 2002, 22(3):245-279
- [26] P. Metzger, C. Largeau. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl Microbiol Biot.* 2005, 66(5):486-496
- [27] I.A. Guschina, J.L. Harwood. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res.* 2006, 45(2):160-186
- [28] PG Roessler, LM Brown, TG Dunahay, DA Heacox, EE Jarvis, JC Schneider, SG Talbot, KG Zeiler. Genetic engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae. 1994. ACS Publications:255-270
- [29] T.G. Dunahay, E.E. Jarvis, S.S. Dais, P.G. Roessler. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Appl Biochem Biotech.* 1996, 57(1):223-231
- [30] Y. Chisti. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 2007, 25(3):294-306
- [31] D. Tilman, J. Hill, C. Lehman. Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass. *Science.* 2006, 314(5805):1598
- [32] T Krawczyk. Biodiesel-Alternative fuel make inroads but hurdles remain. *Inform.* 1996, 7:801-829
- [33] M.J. Haas, A.J. McAloon, W.C. Yee, T.A. Foglia. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresource Technol.* 2006, 97(4):671-678
- [34] Y. Zhang, MA Dube, DD McLean, M. Kates. Biodiesel production from waste cooking oil. Economic assessment and sensitivity analysis. *Bioresource Technol.* 2003, 90(3):229-240
- [35] MA Yan-ling. Microbial oils and its research advance. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering.* 2006

- [36] Wang MY Li Q. Use food industry waste to produce microbial oil. *Science and Technology of Food Industry*. 1997, 6:65-69
- [37] C. Ratledge, J. P. Wynn. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*. 2002, 51:1-51
- [38] H. Alvarez, A. Steinbchel. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biot*. 2002, 60(4):367-376
- [39] S. Papanikolaou, S. Sarantou, M. Komaitis, G. Aggelis. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *J Appl Microbiol*. 2004, 97(4):867-875
- [40] S. Papanikolaou, I. Chevalot, M. Komaitis, I. Marc, G. Aggelis. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biot*. 2002, 58(3):308-312
- [41] W. Metting John. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb Tech*. 1986, 8(7):386-394
- [42] M. Gavrilescu, Y. Chisti. Biotechnology--a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv*. 2005, 23(7-8):471-499
- [43] A.S. Fedorov, S. Kosourov, M.L. Ghirardi, M. Seibert. Continuous hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. 2005. Springer:403-412
- [44] I.K. Kapdan, F. Kargi. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Tech*. 2006, 38(5):569-582
- [45] A. Melis. Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *International journal of hydrogen energy*. 2002, 27(11):1217-1228
- [46] JL Guil-Guerrero, R. Navarro-Jurez, JC Lpez-Martnez, P. Campra-Madrid, M.M. Reboloso-Fuentes. Functional properties of the biomass of three microalgal species. *J Food Eng*. 2004, 65(4):511-517
- [47] RA Andersen. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation*. 1992, 1(4):267-292
- [48] H. Iwamoto. Industrial Production of Microalgal Cell Mass and Secondary Products. Major Industrial Species: *Chlorella*. 2004
- [49] J.A. Demello, C.A. Carmichael, E.E. Peacock, R.K. Nelson, J. Samuel Arey, C.M. Reddy. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. *Mar Pollut Bull*. 2007, 54(7):894-904
- [50] O. Pulz, W. Gross. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biot*. 2004, 65(6):635-648
- [51] A. Steinbchel, B. Fchtenbusch. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol*. 1998, 16(10):419-427

- [52] MJ Abraham, RA Srinivasan. Lipid and fatty acid composition of selected fungi grown on whey medium. *J Food Sci.* 1984, 49(3):950-951
- [53] C. Ratledge. Single cell oils--have they a biotechnological future? *Trends Biotechnol.* 1993, 11(7):278-284
- [54] C Ratledge. Microbial oil and fats: an assessment of their commercial potential. *Pro. Ind Microbial.* 1982, 16:119-206
- [55] Komaitis M, Kavadia A, Chevalot I, Blanchard F, Marc I, Aggelis G. Lipid and gamma-linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. *J Am Oil Chem Soc.* 2001, 78:341-346
- [56] C.T. EVANS, C. RATLEDGE. Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Microbiology.* 1984, 130(7):1705
- [57] Y. Li, Z.K. Zhao, F. Bai. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb Tech.* 2007, 41(3):312-317
- [58] S. Takeno, E. Sakuradani, A. Tomi, M. Inohara-Ochiai, H. Kawashima, S. Shimizu. Transformation of oil-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, using Zeocin, and application to arachidonic acid production. *J Biosci Bioeng.* 2005, 100(6):617-622
- [59] T. Aki, Y. Nagahata, K. Ishihara, Y. Tanaka, T. Morinaga, K. Higashiyama, K. Akimoto, S. Fujikawa, S. Kawamoto, S. Shigeta. Production of arachidonic acid by filamentous fungus, *Mortierella alliacea* strain YN-15. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2001, 78(6):599-604
- [60] C. Ratledge, J.P. Wynn. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology.* 2002, 51:1-44
- [61] I.P. Adams, S. Dack, F.M. Dickinson, C. Ratledge. The distinctiveness of ATP: citrate lyase from *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology.* 2002, 1597(1):36-41
- [62] C. Ratledge. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem Soc T.* 2002, 30(6):1047-1049
- [63] C. Ratledge. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie.* 2004, 86(11):807-815
- [64] 孙志芳, 高荫榆, 郑渊月. 功能性油脂的研究进展. *中国食品添加剂.* 2005, (3):4-7
- [65] 董欣荣, 曹健. 微生物功能性油脂的研究. *郑州粮食学院学报.* 1999, 20(4):10-15
- [66] 李魁, 徐玉民, 等. 真菌油脂的合成条件及预处理方法. *中国油脂.* 1996, 21(6):3-5
- [67] A.L. Demain, M. Newcomb, JH Wu. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2005, 69(1):124

- [68] Perlack RD, Wright LL, Turhollow AF, Graham RL, Stokes BJ, Erbach DC. Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply (Oak Ridge Natl. Lab., Oak Ridge, TN). 2005, ORNL Publ. No. TM-2005\_66
- [69] S. Rajaram, A. Varma. Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes. *Appl Microbiol Biot.* 1990, 34(1):141-144
- [70] J. Kim, S. Yun, Z. Ounaies. Discovery of cellulose as a smart material. *Macromolecules.* 2006, 39(12):4202-4206
- [71] Allard G De Ruyck J, Maniatis K. An externally fired evaporative gas turbine cycle for small scale biomass CHP production. In: Chartier P et al (eds) *Proceedings of the 9th European Bioenergy conference*, Pergamon, Oxford. 1996
- [72] Saha BC. Alpha-L-arabinofuranosidases-biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *BIotech Adv.* 2000, 18:403-423
- [73] KW Lin, MR Ladisch, DM Schaefer, CH Noller, V. Lechtenberg, GT Tsao. Review on effect of pretreatment on digestibility of cellulosic materials. 1981.102-106
- [74] AP Dunlop. Furfural formation and behavior. *Industrial & Engineering Chemistry.* 1948, 40(2):204-209
- [75] R.J. Ulbricht, S.J. Northup, J.A. Thomas. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology.* 1984, 4(5):843-853
- [76] S. Larsson, E. Palmqvist, B. Hahn-H gerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, N.O. Nilvebrant. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb Tech.* 1999, 24(3-4):151-159
- [77] N.O. Nilvebrant, P. Persson, A. Reimann, F. de Sousa, L. Gorton, L.J. J nsson. Limits for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. *Appl Biochem Biotech.* 2003, 107(1):615-628
- [78] H.B. Klinke, L. Olsson, A.B. Thomsen, B.K. Ahring. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. *Biotechnol Bioeng.* 2003, 81(6):738-747
- [79] T. Popoff, O. Theander. Formation of aromatic compounds from carbohydrates. Part III. Reaction of D-glucose and D-fructose in slightly acidic, aqueous solution. *Acta Chem. Scand.* 1976, 30(5):397-442
- [80] J. Prez, J. Munoz-Dorado, T. De La Rubia, J. Martinez. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology.* 2002, 5(2):53-63
- [81] E. Palmqvist, B. Hahn-H gerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technol.* 2000, 74(1):17-24
- [82] E. Palmqvist, H. Grage, N.Q. Meinander, B. Hahngerda. Main and interaction effects of

- acetic acid, furfural, and hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol Bioeng.* 1999, 63(1):46-55
- [83] C. Hu, X. Zhao, J. Zhao, S. Wu, Z.K. Zhao. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technol.* 2009, 100(20):4843-4847
- [84] X. Chen, Z. H. Li, X. X. Zhang, F. X. Hu, D. D. Y. Ryu, J. Bao. Screening of Oleaginous Yeast Strains Tolerant to Lignocellulose Degradation Compounds. *Appl Biochem Biotech.* 2009, 159(3):591-604
- [85] C. Huang, M. Zong, H. Wu, Q. Liu. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technol.* 2009, 100(19):4535-4538
- [86] Bao J Dong HW. Biofuel via biodetoxification. *Nature Chemical Biology.* 2010, 6:316-318
- [87] J. Yu, H. Stahl. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technol.* 2008, 99(17):8042-8048
- [88] N.N. Nichols, B.S. Dien, G.M. Guisado, M.J. Lpez. Bioabatement to remove inhibitors from biomass-derived sugar hydrolysates. 2005. Springer:379-390
- [89] J Zhang, Z Zhu, X Wang, N Wang, W Wang, J Bao. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels.* 2010, 3:26
- [90] J Folch, M Lees, GH Sloane-Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* 1957, 226(1):497-509
- [91] K Higashiyama, K Murakami, H Tsujimura, N Matsumoto, S Fujikawa. Effects of dissolved oxygen on the morphology of an arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. *Biotechnol Bioeng.* 1999, 63(4):442-448
- [92] M. Rossi, P. Buzzini, L. Cordisco, A. Amaretti, M. Sala, S. Raimondi, C. Ponzoni, U. M. Pagnoni, D. Matteuzzi. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *Fems Microbiol Ecol.* 2009, 69(3):363-372
- [93] YH Li, B Liu, ZB Zhao, FW Bai. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese Journal of Biotechnology.* 2006, 22(4):650-656
- [94] C. Angerbauer, M. Siebenhofer, M. Mittelbach, G. M. Guebitz. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technol.* 2008, 99(8):3051-3056
- [95] S. G. Wu, C. M. Hu, G. J. Jin, X. Zhao, Z. K. Zhao. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technol.* 2010, 101(15):6124-6129
- [96] S. Fakas, S. Papanikolaou, M. Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, G. Aggelis. Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in

*Cunninghamella echinulata*. *J Appl Microbiol.* 2008, 105(4):1062-1070

[97] F. Y. Xue, J. X. Miao, X. Zhang, H. Luo, T. W. Tan. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technol.* 2008, 99(13):5923-5927

[98] Y. H. Li, Z. B. Zhao, F. W. Bai. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb Tech.* 2007, 41(3):312-317

[99] A. Beopoulos, J. Cescut, R. Haddouche, J. L. Uribelarrea, C. Molina-Jouve, J. M. Nicaud. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res.* 2009, 48(6):375-387

## 致谢

本论文是在导师鲍杰教授的辛勤指导下完成的，他在学术上严谨求实，工作上兢兢业业，为我的实验和论文付出了很多心血。在此向鲍老师表达我真挚的谢意！

感谢辛秀娟副教授、胡凤仙副教授对我实验和生活方面的帮助。

特别感谢 Bio-lipid 小组另外两位成员王玉梅、刘威同学的帮助，没有他们对实验的付出，没有我们的共同协作和努力，我的工作就不可能有快速的进展！相信这段紧张却又快乐的研究经历会给我们每个人留下美好的回忆。

感谢董宏伟师兄、张建师兄、楚德强师兄、陈曦师姐、王修胜师兄、朱智楠师姐在实验中对我的建议和帮助，感谢张怀庆，刘建明，李传航，邢恒维，赵凯，国力浩，罗紫臣等实验室其他同学在实验中给予的帮助。

同时特别感谢我的父母对我的养育之恩，以及一直以来对我的鼓励和帮助，使我顺利完成学业。

最后还要向所有关心我的老师、同学、亲戚、朋友表示衷心的感谢！