

学校代码: 10251
学 号: 045090179

華東理工大學

硕 士 学 位 论 文

题 目 玉米秸秆同步糖化与发酵生产微生物油脂

专 业 生物工程

研究方向 生物质能源

姓 名 刘威

导 师 鲍杰教授 于占春高级工程师

定稿时间: 2012 年 4 月 10 日

分类号: Q815 密级: _____

UDC: _____

华东理工大学

硕士专业学位论文

玉米秸秆同步糖化与发酵生产微生物油脂

刘威

指导教师姓名: 鲍杰 教授 于占春 高级工程师

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: 2012-4-10 论文答辩日期: 2012-5-21

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: 储矩教授

评 阅 人: 钱江潮研究员 张小希高级工程师

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

玉米秸秆同步糖化与发酵生产微生物油脂

摘要

本研究以玉米秸秆为起始原料,在经过干式稀酸预处理和生物脱毒后,利用皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 进行同步糖化与发酵生产微生物油脂。本研究对同步糖化发酵方式 (SSF) 和分步糖化发酵方式 (SHF) 进行了比较,在 10% 固含量下,SSF 和 SHF 产油量分别为 3.03 g/L 和 1.00 g/L,SSF 优于 SHF。同时,对预糖化时间、纤维素酶的添加量、氮源添加量、溶氧水平以及固含量进行了一系列的条件优化。实验结果表明,同步糖化与发酵生产微生物油脂最优化的条件为预糖化 6 h,纤维素酶加量为 7.0 FPU/g DM(干物质),硫酸铵加量为 0.5 g/L,溶氧水平 (DO) 为 20%;并在 15% 固含量条件下,最佳产油量达到 4.02 g/L。另外,还对同步糖化发酵产油过程在 50 L 规模进行了放大,最终产油量达到 3.23 g/L。最后,本研究还对纤维素酶进行了回收尝试,回收了 3-4 FPU/g DM 的酶活,并将回收的纤维素酶和水再次用于新一轮的同步糖化发酵过程。本研究提供了一种利用玉米秸秆生产微生物油脂的有效方法,并首次实现了用同步糖化发酵技术进行木质纤维素微生物油脂发酵以及纤维素酶的循环使用,这为微生物油脂资源提供了一个有效的低成本的来源。

关键词: 微生物油脂; 玉米秸秆; 皮状丝孢酵母; 同步糖化发酵; 纤维素酶回收

Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*

Abstract

Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) is the most commonly practiced operation in lignocellulose bioconversion to avoid the sugar product inhibition to cellulase enzymes. In this study, for the first time SSF was tested on microbial lipid fermentation using the diluted acid pretreated and biodetoxified corn stover as the feedstock. The results show that SSF was more effective than the separate hydrolysis and fermentation (SHF) on lipid accumulation of *Trichosporon cutaneum* CX1 cells in both the small scale (5L) and the enlarged scale (50L) bioreactors. The solutions for the oxygen transfer and the lipid extraction in SSF practically worked well. The result also shows that the cellulase enzyme could be partially recycled in the SSF. The present study provided a practical and efficient way for microbial lipid production from lignocellulose material.

Key words: microbial lipid; simultaneous saccharification and fermentation (SSF); corn stover; *Trichosporon cutaneum*; cellulase recycling

目录

前言	1
第一章 综述	2
1.1 木质纤维素类生物质炼制概述	2
1.1.1 木质纤维素类生物质简述	2
1.1.2 木质纤维素类生物炼制	3
1.2 生物柴油概述	3
1.2.1 生物柴油的应用	3
1.2.2 生物柴油的价值和意义	3
1.3 微生物油脂概述	4
1.3.1 微生物油脂的应用	5
1.3.2 酵母产油发酵	6
1.3.3 油脂发酵的关键限值因素	6
1.4 利用木质纤维素生产微生物油脂的研究现状	7
1.4.1 菌种的选择和利用	7
1.4.2 发酵方式	7
1.4.3 微生物油脂的放大研究	8
1.5 木质纤维素生物转化的工艺研究	9
1.5.1 木质纤维素原料的前处理	9
1.5.2 木质纤维素原料的预处理	9
1.5.3 木质纤维素原料的脱毒	9
1.5.4 木质纤维素类原料的酶水解	10
1.5.5 微生物油脂的水解液发酵	10
1.6 同步糖化发酵技术概述	10
1.6.1 同步糖化发酵技术的应用	10
1.6.2 同步糖化发酵技术的价值和意义	11
1.7 中试规模的油脂发酵	11
1.8 纤维素酶的循环利用	12
1.9 本课题的研究内容与意义	12
1.9.1 研究课题的意义	12
1.9.2 研究课题的内容	13

第二章 材料与方法.....	14
2.1 材料和菌种.....	14
2.1.1 玉米秸秆材料.....	14
2.1.2 菌种和培养基.....	14
2.1.3 菌种保存.....	14
2.1.4 种子培养.....	14
2.2 实验仪器和试剂.....	14
2.2.1 实验仪器和设备.....	14
2.2.2 实验试剂.....	16
2.3 微生物油脂生产工艺流程.....	17
2.3.1 玉米秸秆前处理.....	17
2.3.2 玉米秸秆预处理.....	18
2.3.3 玉米秸秆生物脱毒.....	18
2.3.4 玉米秸秆水解液制备.....	19
2.3.5 玉米秸秆水解液发酵.....	19
2.4 玉米秸秆同步糖化发酵.....	20
2.5 检测方法.....	21
2.5.1 葡萄糖和木糖浓度的测定.....	21
2.5.2 油脂量的测定.....	21
2.5.3 氨氮的测定.....	21
2.5.4 总氮的测定.....	22
2.5.5 玉米秸秆中纤维测定方法.....	22
2.6 油脂得率的计算.....	25
第三章 实验结果和讨论.....	27
3.1 水解液发酵和同步糖化发酵的.....	27
3.2 10%固含量下同步糖化发酵中发酵参数的优化.....	28
3.2.1 预糖化时间对同步糖化发酵产油的影响.....	28
3.2.2 纤维素酶加量对同步糖化发酵产油的影响.....	30
3.2.3 硫酸铵加量和溶氧水平对同步糖化发酵产油的影响.....	33
3.2.4 不同固含量对同步糖化发酵产油的影响.....	34
3.3 在 50L 反应器中同步糖化发酵的放大.....	35
3.4 纤维素酶的循环利用.....	36
第四章 结论与展望.....	39
4.1 结论.....	39

4.2 展望.....	40
参考文献.....	41
致谢.....	46

前言

随着能源日益短缺，石油危机日益加重，可再生能源的开发成为当下的热点问题。由于生物柴油具有较好的流变特性，较高的能量密度以及与现行石化汽油和柴油等液体能源产品相似的特性而倍受人们的关注。除此之外，生物柴油还具有易降解，运输安全方便，可再生等特性，是极具潜力的未来燃料。生物油脂资源缺乏导致生物柴油产业发展缓慢。产油微生物是指可以在适宜的条件下，通过代谢环境中的碳水化合物，合成并贮存超过其细胞自身干重 20% 以上的油脂组分的微生物。产油微生物细胞积累的油脂组分与植物油脂具有高度相似性，是一种优质的合成生物柴油的油脂资源，利用微生物发酵生产油脂关键在于廉价的发酵底物。目前，大多数微生物发酵生产油脂的底物都是淀粉类、糖类、环境和工业废弃物，但高昂的原料成本大大限制了微生物油脂发酵的规模化发展。因此，本研究以玉米秸秆为起始原料，在经过干式稀酸预处理和生物脱毒后，利用皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 进行同步糖化与发酵生产微生物油脂。并对同步糖化发酵方式和水解液发酵方式进行了比较，证明了同步糖化发酵方式有利于皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 积累油脂。另外，本课题还对同步糖化发酵产油进行了优化，获得了最佳的产油条件，还对同步糖化发酵产油在 5L 和 50L 规模进行了验证，并且解决了在低固含量下的氧气传递过程。最后，本课题还对纤维素酶进行了回收尝试，并且回收纤维素酶也达到了一定的效果。

第 1 章 文献综述

1.1 木质纤维素类生物质炼制

生物质能源的利用方法一般分为两类，一类是直接燃烧，获取热量，如广大农村地区利用木柴、秸秆等作为炉灶燃料，但是这种原始的方法利用效率非常低；另一类是利用先进的技术将生物质加工或转化成固体、液体或气体形式的各种燃料来使用。目前，生物质能源的利用方法有：第一，成型的固体生物质作为固体燃料与煤炭混配作为发电用固体燃料，第二，利用生物发酵法将生物质转化为乙醇，第三，大量种植油料作物或林木开发生物柴油，第四，将生物质转化成氢气或沼气等气体燃料。

目前，已经工业化的生物质转化为乙醇项目，主要是利用淀粉或糖类直接发酵生产乙醇，主要包括玉米淀粉生产乙醇，木薯淀粉生产乙醇，甘蔗生产乙醇等，也有一部分利用甜高粱和桉树生产乙醇；例如，丹麦利用甘蔗生产乙醇，每年乙醇产量约为 3.2 万吨，美国每年利用玉米淀粉生产乙醇，产量约为 5300 万吨。除此之外，巴西、日本、德国、澳大利亚、加拿大、印度、菲律宾等国均已研究和开发出利用各种生物质转化生产乙醇的工艺。

我国也于 2001 年 9 月 19 日创立了吉林燃料乙醇有限责任公司，其公司地处中国东北部风景秀丽的吉林市，年产乙醇 60 万吨。2011 年，我国又准备在上海舟山投产一个以木薯淀粉为原料生产燃料乙醇的大型发酵工厂。但是，这些工业化的生物乙醇均是以淀粉为原料，这样会对我国的粮食供给产生极大的影响，因此，以玉米秸秆、麦秆、稻秆以及甜高粱为原料的第二代生物乙醇成为了近年来的研究热点。

1.1.1 木质纤维素类生物质简介

生物质资源主要包括农业废弃物和农作物，如玉米、甘蔗、甜菜、甜高粱、木薯等含有丰富淀粉类和糖类的作物果实以及秸秆、稻壳、麸皮等含有纤维素和半纤维素的茎叶部等，可将其中所含的纤维素和半纤维素转化成可利用的糖类；木材及林业废弃物，如桉树、白杨等速生林种以及其他林种，还包括芦苇、苜蓿、一枝黄花等草木类，以及木材加工后的废料、锯木、落叶、树皮等；油料植物，如花生、黄豆、油菜以及油桐等；水生藻类，如小球藻、浮萍等藻类；城市垃圾及工业废弃物。

由图 1.1 木质纤维素微观结构图可以看出，木质纤维素由半纤维素、纤维素和木质素三部分组成，其中纤维素主要是成束的纤维结构，非常紧密，而半纤维素则主要附着在纤维素成束结构上，而木质素则与半纤维素连接组成一种支架结构将纤维素成束结构紧密的连接在一起。正是由于木质纤维素这种特殊结构导致了纤维素不宜被纤维素酶附着，为了破坏这种致密的结构，必需通过化学、物理或生物的方法使纤维素曝露出纤维

素酶的附着位点，有利于纤维素的水解。

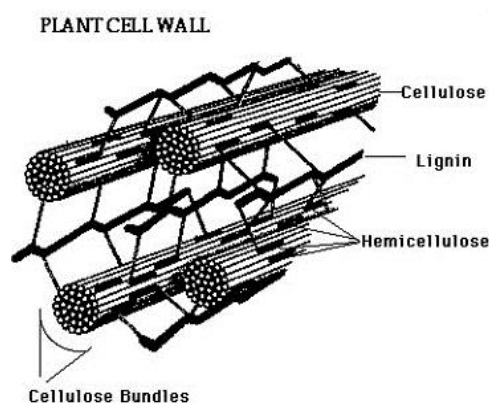


图1.1 木质纤维素的微观结构图

Fig.1.1 The microstructure of lignocellulose

1.1.2 木质纤维素类生物质炼制

自然界中存在着大量的生物质，生物质炼制的主要方向是生产生物质能源。另外，还有一些生物质原料非常有潜力替代石油，例如木本油料、薯类、甘蔗、甜高粱、秸秆以及其他多种纤维素原料等^[2]。因此，如何利用好生物质能源是我们未来实现可持续发展的利用再生能源的重点。另一方面，与其他可再生能源如水能、太阳能、风能等相比，生物质能源比较易于存储和运输，其主要成分和利用方式也与化石燃料近似。因此，对于现有的成熟的针对化石燃料的设备和技術，不需要做大规模的工业设施和技术的改动便可用于生物质能源的利用。

以木质纤维素为原料的第二代燃料乙醇成为生物质炼制的热点，美国的农、林业废弃物每年约有10亿多吨^[3,4]，我国农作物秸秆每年约产生7亿吨，林业废弃物每年约产生1千多万吨^[5,6]，工业固体废弃物和城市垃圾每年约产生8.2亿吨^[7,8]。目前，美国、巴西和中国成为世界前三大燃料乙醇生产国^[9,10]。

1.2 生物柴油概述

1.2.1 生物柴油的应用

由于过去十年全球石油价格不断飙升，生物柴油产业得到了发展的迅速，全世界各国中，欧盟在使用生物柴油量最大，产量最多。美国生物柴油的产量也在大幅上升，2006年增长到2.5亿加仑，2007年增长到4.5亿加仑，据美国国家生物柴油委员会统计，有更多的生物柴油工厂正在建设当中，在建工厂的年生产潜力约为17亿加仑，2011年美国总体对生物柴油的依赖度大幅上升。

1.2.2 生物柴油的价值和意义

最早的生物柴油原料主要是植物油，如棕榈油、大豆油、花生油等，而最早使用生

物柴油的发动机是于 1900 年开发的，它主要以花生油作为燃料，到了第二次世界大战时，由于海上石油运输被封锁，生物柴油被当作应急燃料用于机械化部队的使用。但是，随着廉价的石化柴油出现，尤其是石化柴油具有的低黏着性，使得柴油发动机不再使用生物柴油作为燃料，与此同时，汽车开发商通过改进发动机的引擎，使得现行的发动机更加适合石化柴油的使用。因此，生物柴油退出了历史舞台，但是，随着 1973 年在美国华尔街操作下，石油出口国油价开始大幅上涨，使得生物柴油又一次进入了人们视野。

1.3 微生物油脂概述

生物油脂资源缺乏导致生物柴油产业发展缓慢^[12]。目前，大多数微生物发酵生产油脂的底物都是淀粉、葡萄糖或糖蜜等价格昂贵的碳源，这样高昂的原料成本大大限制了微生物油脂发酵的产业化发展^[13]。最近，又出现了以利用甜高粱、甘油以及活性污泥等低廉的农作物和环境、工业废弃物为碳源的产油发酵过程，例如，Economou等^[14]用高山被孢霉*Mortierella isabellina*以甜高粱作物基质进行半固体发酵。Easterling等^[15]用粘红酵母*Rhodotorula glutinis* 分别以葡萄糖、木糖、甘油为碳源进行发酵。Angerbauer等^[16]用斯达油脂酵母*Lipomyces starkeyi*以活性污泥为基质进行发酵。Chanika等^[17]用粘红酵母*Rhodotorula glutinis*以甘油为碳源，硫酸铵为氮源进行发酵研究。

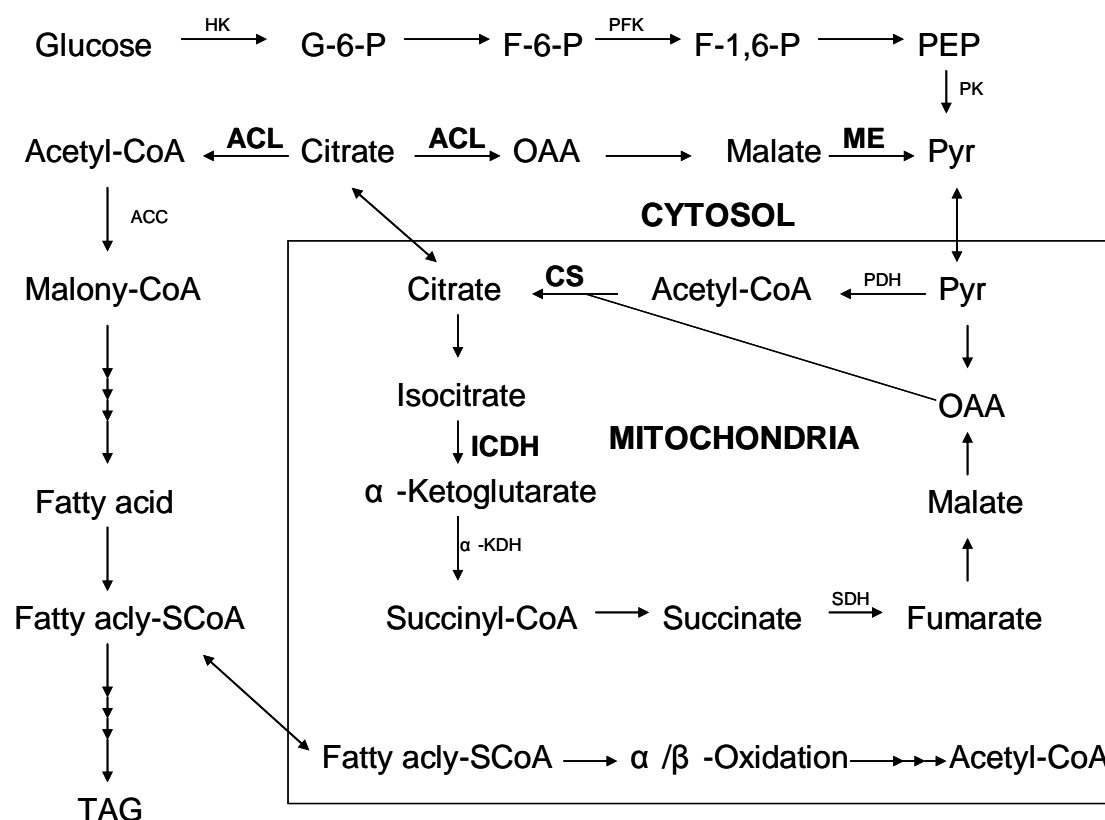


图 1.2 产油酵母油脂积累代谢调控简图

Fig. 1.2. Metabolic regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms

1.3.1 微生物油脂的应用

木质纤维素原料是自然界最为丰富的碳水化合物资源，因此，利用廉价、丰富的木质纤维素原料生产微生物油脂具有广阔的应用前景。目前，利用木质纤维素原料生产微生物油脂已有研究报道。例如，Chen等^[20]筛选出了一种能够广泛耐受木质纤维素降解物的一株皮状丝孢酵母CX1。微生物发酵木质纤维素原料生产油脂的工艺主要包括原料的预处理、预处理原料的脱毒处理、纤维素的酶解与油脂发酵，以及微生物油脂的提取等步骤。但是，大部分研究主要集中在先将预处理后的木质纤维素原料进行酶解，而后利用产油微生物发酵木质纤维素原料的酶解液生产油脂。将木质纤维素原料的酶解与油脂发酵分开，尽管使各工段的最佳反应条件得到了最大程度的保证（酶解温度为50°C，发酵温度为30°C），但固液分离工序的增加以及反应器的增加，势必增加了微生物油脂的生产成本。而直接对脱毒后的木质纤维素原料直接进行同步糖化与油脂发酵，目前还未见报道。

表 1.1 各种产油微生物的含油率

Table 1.1. Lipid content of several oleaginous microorganisms

菌种	含油量（%干重）	菌种	含油量（%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

Lin Hui 等^[15]利用霉菌 *Aspergillus oryzae* A-4 在小麦秆和麦麸按比例混合的固体培养基上进行固态产油发酵的研究。条件优化后油脂得率可达 62.87mg/g DM。Feiyan Xue 等^[16]开发了一种新的共发酵方式，即利用粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* 和微藻钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* 混合培养。总生物量和总油脂得率都得到了显著提高，总生物量达到 1.6 g/L，73%的 COD 被消耗。在光氧化压力或者其他环境压力下，许多微藻能够生产甘油三酯，其含油率在 20%-50%。在叶绿体中通过一系列的酶可以合成脂肪酸，其中最关键的酶是乙酰辅酶 A 羧化酶（ACCase）^[17]。Lu-Jing Ren 等^[18]发现通过增加

acetyl-CoA 和 NADPH 可以提高油脂的含量, 也改变了脂肪酸的组成。其中, 通过添加乙醇使油脂含量增加了 35%, 产量达到 19 g/L, 通过添加苹果酸可以使 DHA 含量从 35% 增加至 60%。N-乙酰氨基葡萄糖是组成壳聚糖的单体, Siguo Wu 等^[19]研究发现在 22 °C 下以 N-乙酰氨基葡萄糖作为碳源, 隐球酵母 *Cryptococcus curvatus* 的含油率可以达到 54.2%。

1.3.2 酵母产油脂发酵

Chen 等^[20]筛选出了一种能够广泛耐受木质纤维素降解物的一株皮状丝孢酵母 CX1。Xue, F.Y.等^[21]用粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* 酵母以味精废水中添加葡萄糖的方式进行产油发酵, 生物量最高达到 25 g/L, 含油率达到 20%, 降解了 45% 的 COD。其中, 葡萄糖添加方式分为三种, 即初始添加 4% 的葡萄糖; 初始添加 2% 葡萄糖, 发酵过程再添加 2% 葡萄糖; 三阶段以不同速度流加葡萄糖。Ch.N. Economou 等^[22]用深黄被孢霉 *Mortierella isabellina* 霉菌以甜高粱作物基质进行半固体发酵, 含水量为 92% 时, 产油量达到 0.11 g/g 干物质。Emily R. Easterling 等^[23]用粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* 酵母以不同的碳源进行发酵, 碳源分别是葡萄糖、木糖、甘油、葡萄糖和木糖、木糖和甘油以及葡萄糖和甘油。最终甘油三酯占细胞干重的比率分别为 16%、12%、25%、10%、21% 以及 34%。Angerbauer C. 等^[24]用斯达油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 酵母以活性污泥为基质进行发酵, 研究发现, 在 C/N 比为 150 时含油率达到 68%, 在 C/N 比为 60 时含油率达到 40%, 在 pH 5.0 是油脂量最大, 在 PH6.5 时油脂得率最大。未处理的污泥斯达油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 酵母无法正常生长。与酸处理、碱处理和热处理相比较, 经过超声处理的污泥产油最大, 达到 1 g/L。Chanika Saenge 等^[26]用粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* 酵母以甘油为碳源, 硫酸铵为氮源, 吐温 20 为表面活性剂进行发酵研究, 发现 C/N 比对生物量、油脂含量和类胡萝卜素产量影响最大。经过响应曲面分析, 对于生物量, 最优条件为甘油浓度为 8.5%, C/N 比为 60; 对于油脂含量和类胡萝卜素产量, 最有条件为甘油浓度 9.5%, C/N 比为 85。在反补发酵过程中, 最高油脂产量 6.05 g/L, 油脂含量为 60.7%, 类胡萝卜素产量为 135.25 mg/L。

1.3.3 油脂发酵的关键限制因素

Milan Certik 等^[27]研究发现刺孢小克银汉霉 *Cunninghamella echinulata* 霉菌利用有机氮源时油脂含量增加。有机氮源中的铵离子能够迅速增加 ACC、ME、ACL 的酶活; NaNO_3 能够增加 GPD 和 PGD 的酶活; 无机氮源能够增加 NADP-ICD 的酶活。氮源不断增加使 ACC、ME、ACL 的酶活下降, 油脂含量下降; 相反, 使 GPD 和 PGD 的酶活增加, 生物量增加。实验表明, 绝大部分的乙酰辅酶 A 被用于经由 ACC、ME、ACL (可能也有 GPD) 将 NADPH 转到油脂合成途径过程中。D'Elia, C. 等^[28]开发的一种用于液体样品的过硫酸盐氧化测定总氮量的方法。其总氮量包括样品中一切无机氮源和有机氮源, 即包括凯氏定氮法测定的所有的氮源。这是一种快速有效测定总氮量的方法。Fakas, S. 等^[29]用刺孢小克银汉霉 *Cunninghamella echinulata* 霉菌以西红柿水解液中的有机氮源和葡萄糖进行发酵。研究发现, 去除水解液中的氮源使葡萄糖摄取量迅速降低, 产油

减少。因此有机氮更有利于葡萄糖的摄取和油脂的积累, 含油率达到 48%, 油脂产量为 8.7 g/L。Folch, J. 等^[30] 开发的一种快速有效的提油方法, 即氯仿甲醇萃取法。Wu, S. 等^[31] 研究发现圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* 酵母在硫限制条件下也可提高含油率, 增加油脂产量。在初始 C/S 比为 46750 条件下, 含油率达到 58.3%; 在初始 C/S 比 11380 条件下, 即使 C/N 比在 28.3 到 5.7 范围内, 含油率仍为 57%。C.N. Economou 等^[32] 用深黄被孢霉 *Mortierella isabellina* 霉菌在甜高粱水解液中进行批式发酵, C/N 比在 43-53 范围内, 含油率在 43%-51% 之间, 油脂产量在 2.2-9.3g/L。实验建立的数学模型能够准确预测生物量的增加、油脂的积累量以及碳源和氮源的消耗量。模型假设高糖浓度抑制菌体生长, 葡萄糖只用于生长和产油, 葡萄糖耗尽时消耗油脂。Wu S.等^[33] 用圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* 酵母在磷限制条件下也可提高含油率, 增加油脂产量。在 C/N 比为 6.1, C/P 比为 9552 的条件下, 含油量为 62.2%, 油脂得率为 0.203 g/g 葡萄糖。

Higashiyama K.等^[34]用高山被孢霉 *Mortierella alpina* 1S-4 霉菌在 50L 发酵罐中生产花生四烯酸。发酵过程中的高氧浓度通过通入高纯度氧气和增加发酵罐内压力来实现。在氧浓度 10-15 ppm 下花生四烯酸的得率是在氧浓度 7 ppm 下的 1.6 倍。以通入高纯度氧气的方法将氧浓度升至 20-50 ppm 时, 菌体由丝状转变为球状, 此时, 传质较差, 花生四烯酸得率急剧下降。以加压方式维持氧浓度在 15-20 ppm 时, 菌体形态不变, 但是花生四烯酸得率逐渐下降。Zhanyou Chi 等^[35] 用裂殖壶菌 *Schizochytrium limacinum* SR21 微藻在不同氧浓度下发酵生产 DHA。高的溶氧有利于细胞个数的增加, 低的溶氧有利于油脂的积累, 溶氧与细胞数量呈正相关, 与油脂积累呈负相关。通过两阶段溶氧控制, 最终达到生物量 37.9 g/L, 油脂产量 6.56 g/L。Pieter J. Verbelen 等^[36] 研究了啤酒厂生产前期预充氧气过程中, 在氧化应激压力下, 酵母的代谢调控情况。研究表明, 在预充氧后, 前 3 h 内, 氧气敏感的转录因子 *Hap1* 和 *Rox1* 开始表达, 前 45 min 内, 氧化应激压力敏感的 *YAP1* 大量表达, 麦角固醇和不饱和脂肪酸随着 *ERG1*、*ERG11* 和 *OLE1* 的表达而增加。Hongwei Liu 等^[37] 对模式生物斯达油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 酵母不同发酵阶段, 即发酵 8 h、24 h 和 96 h, 进行了蛋白质组学的研究。实验对 289 种蛋白进行了分析, 在严格的对比和半定量分析后, 发现有 81 种蛋白有较明显的变化。

1.4 利用木质纤维素生产微生物油脂的研究现状

1.4.1 菌种的选择与利用

Yu 等^[38]研究了利用小麦秸秆经过稀酸预处理后获得的水解液中发酵生产微生物油脂的过程。在所获得的水解液中六碳糖浓度为 24.3 g/L, 五碳糖浓度为 4.9 g/L, 同时在水解液中还存在这各种的抑制物, 例如乙酸、糠醛、羟甲基糠醛。Yu 等研究了五种产油酵母在小麦秸秆水解液中发酵的情况, 这五种产油酵母分别是隐球酵母 *Cryptococcus curvatus*, 粘红酵母 *Rhodotorula glutinis*, 圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides*, 斯达

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 以及亚罗酵母 *Yarrowia lipolytica*。所有的酵母都能在脱毒后的水解液中正常的生长和产油，而在未脱毒的水解液中，除了圆红冬孢酵母其它四种酵母也能正常生长。其中，隐球酵母 *Cryptococcus curvatus* 在脱毒水解液中油脂产量达 4.2 g/L，在未脱毒的水解液中油脂产量达 5.8 g/L。另外，Yu 等对糠醛和羟甲基糠醛的抑制作用也进行了研究，羟甲基糠醛在 3 g/L 以上会对隐球酵母 *Cryptococcus curvatus* 的生长和产油有明显的抑制作用，糠醛在 1 g/L 以上会对隐球酵母 *Cryptococcus curvatus* 的生长和产油有明显的抑制作用。Huang 等^[39]利用水稻秸秆经过硫酸处理后获得的水解液进行微生物油脂发酵，所用的菌种为发酵性丝孢酵母 *Trichosporon fermentans* 在未经过脱毒的水解液中发酵结果很差，油脂产量为 1.7 g/L，与单一碳源的合成培养基相比结果极低。Huang 等利用了经过了 overliming，浓缩法以及 Amberlite XAD-4 离子交换树脂吸附三个过程，除去了水解液中的各种抑制物。最终，在发酵 8 天后菌体干重达到了 28.6 g/L，油脂产量达到了 11.5 g/L，含油率达到了 40.1%。另外，发酵性丝孢酵母 *Trichosporon fermentans* 除了能够利用水稻秸秆水解液，还能利用甘露糖、半乳糖以及纤维二糖。

1.4.2 发酵方式

目前，在微生物油脂发酵过程所用到的发酵方式主要是批式发酵和分批补料发酵，对于同步糖化发酵法生产微生物油脂还未见报道。批式发酵和分批补料发酵主要是用于木质纤维素水解液的液态发酵过程，这种方式发酵时间长，工序多，操作繁杂，并且要进行固液分离过程。为了避免这些弊端，需要在发酵方式上进行尝试，如何将纤维素酶糖化过程和水解液发酵过程耦合在一个反应器中成为改进木质纤维素生产微生物油脂的关键。通过同步糖化发酵方式，将大大减少纤维素酶糖化过程底物抑制效应，避免了固液分离过程。同时，将木质纤维素原料的酶解与油脂发酵分开，虽然使各工段的最佳反应条件得到了最大程度的保证，可以确保酶解温度为 50°C，pH 4.8，发酵温度为 30°C，pH 4.8，但是通过增加一个同步糖化发酵的预酶解过程，可以使酶解和油脂发酵过程尽可能的条件最优化，因此，含有预酶解的同步糖化发酵过程是一个可行性极高的利用木质纤维素生产微生物油脂的方法。

1.4.3 微生物油脂发酵的放大研究

Li 等^[40]用圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* Y4 酵母进行了批式发酵，细胞干重达到 150 g/L；进行了反补发酵，用时 25 天，细胞干重达到 151.5 g/L，含油率 48%。在 15 L 发酵罐中，反补发酵用时 134 h，细胞干重 106.5 g/L，含油率 67.5%，油脂产率 0.54 g/L/h。Zhao 等^[41]用圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* Y4 分别以菊芋提取物和水解物作为底物在 15L 发酵罐中生产油脂。利用菊芋提取物在分批补料过程下最终油脂浓度到达 39.6 g/L，细胞含油率达到 56.5%。Ren LJ 等^[42]在 500 L 发酵罐中进行微藻裂殖壶菌 *Schizochytrium sp.*，通过三阶段通气控制，即发酵 0-24 h 通气量 0.4 vvm，24-96 h 通气量 0.6 vvm，96 h 至结束通气量 0.4 vvm，使细胞密度达到 71 g/L，油脂量达 35.75 g/L，DHA 含量达 48.95%。DHA 含量比始终保持通气量 0.4 vvm 增加了 11.21%。

1.5 木质纤维素生物转化的工艺流程

木质纤维素生产微生物油脂工艺过程主要分为物料前处理、预处理、预处理后物料的脱毒、物料的酶解和微生物发酵及产物提取这六个环节。

1.5.1 木质纤维素原料的前处理

木质纤维素原料要经过前处理工段，分别有粉碎、洗涤、压榨和烘干四道工序。其中，在木质纤维素原料收获后首先要清洗除去附着在物料中的泥沙，然后将其粉碎以降低颗粒的粒径尺寸，木质纤维素原料经过粉碎后，其粒径尺寸大小一般为10-30 mm，颗粒度的大小对后续的预处理过程、糖化过程和发酵过程的影响比较大，颗粒度越小，越有利于木质纤维素原料的预处理和糖化，进而影响发酵效果，因此，降低物料的粒径尺寸，提高物料比表面积是提高微生物油脂产率的重要环节。

1.5.2 木质纤维素原料的预处理

木质纤维素原料的预处理是通过物理、化学或生物的方法打破木质纤维素牢固致密的分子结构，打开紧密包裹纤维素组分的木质素组分和半纤维素组分，进一步破坏纤维素致密的微晶结构，是纤维素上的附着位点尽可能的充分暴露，从而利于纤维素酶附着到纤维素上进行酶解反应。传统的预处理方法主要有：稀酸预处理、蒸汽膨爆、氨纤维膨爆、有机溶剂提取等，本研究所使用的与处理方法为干式稀硫酸预处理法。其主要方法是将浓度3%的稀硫酸按固液比1:2与木质纤维素原料混合，预浸过夜，然后以190°C的高温在预处理反应器中处理3分钟。

1.5.3 预处理后原料的脱毒

预处理后会产生一系列的抑制微生物生长的有害物质，其中包括糠醛、羟甲基糠醛、甲酸、乙酸、丙酸等，根据不同的木质纤维素原料其预处理后产生的抑制物组分和浓度不相同，通过不同的预处理方法其产生的抑制物组分和浓度亦不同，因此，对于不同的木质纤维素原料（如玉米秸秆、麦秆、杨树、桉树等）以及不同的预处理方法（如稀酸预处理、蒸汽膨爆预处理、氨纤维膨爆预处理、生物预处理等）所产生的预处理物料其纤维素、半纤维素含量以及抑制物组分和含量皆不相同，因此对于下游的脱毒过程要求也不相同。一般的预处理后物料的脱毒方法主要有化学法、物理法和生物法，例如，水洗脱毒、overliming 脱毒以及生物脱毒，但是，水洗脱毒存在着用水量极大，废水污染严重等问题，overliming 脱毒法存在着消耗大量的碱和酸，成本极高，废水污染严重等，因此，预处理后物料的脱毒是制约木质纤维素利用的一个关键工段，如何开发出一种低能耗、低功耗、低排放、低成本的新型脱毒方法至关重要。而一种新型的生物脱毒方法已经被开发，本实验室筛选出了一株能同时耐受多种抑制物的煤油霉菌暗膜囊菌 *Amorphotheca resinae* ZN1，这株菌能够有效的代谢糠醛、羟甲基糠醛以及乙酸，不仅耐受抑制物浓度高而且在抑制物协同抑制的情况下也能成功代谢抑制物，并且此菌可以在静态下培养，真正达到极低能耗、极低功耗、零排放以及极低成本。

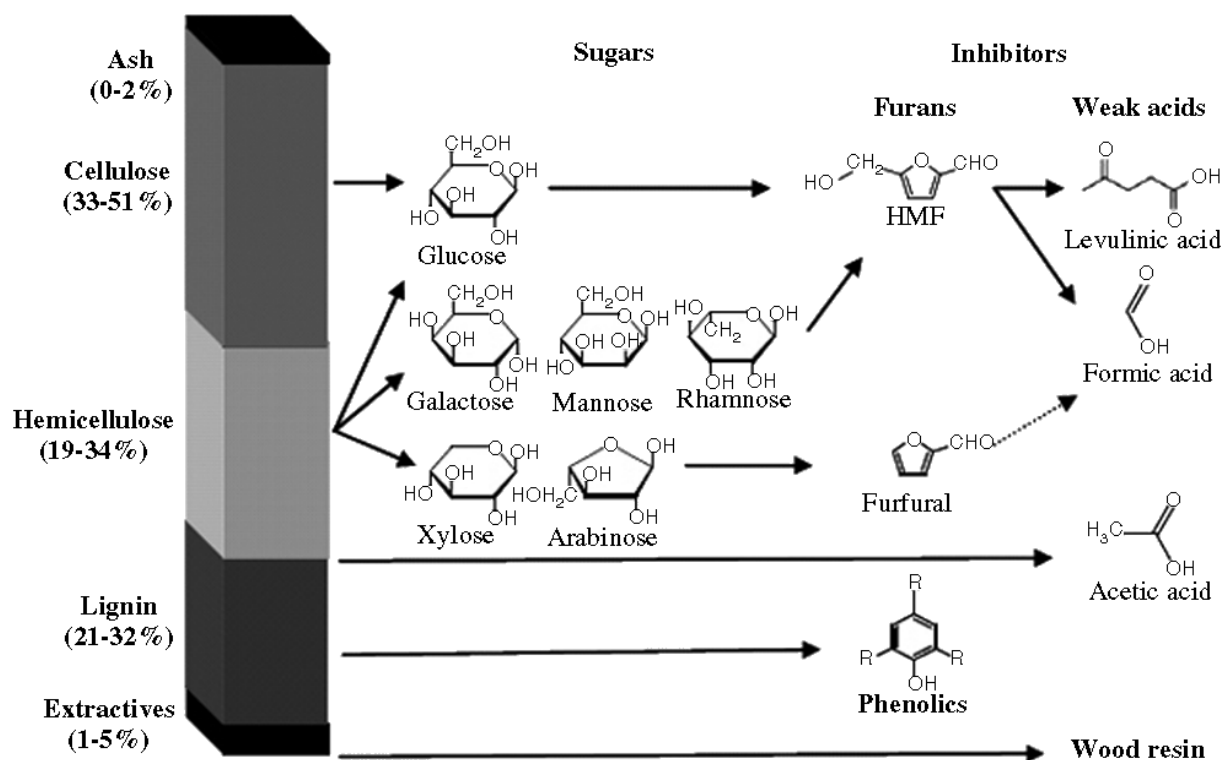


图1.3 木质纤维素的组成及主要水解产物和抑制物

Fig.1.3. Composition of lignocellulose and main hydrolysis products and inhibitors

1.5.4 木质纤维素原料的酶水解

纤维素酶是一种复合酶，它主要有三类酶组分，分别是纤维素外切酶、纤维素内切酶以及糖苷酶，而木质纤维素原料的酶水解过程正是这三种酶协同作用分解纤维素的酶催化过程。木质纤维素原料的酶水解过程是在50°C温度下使纤维素和半纤维素通过纤维素酶转化为可溶性的六碳糖（如葡萄糖）和五碳糖（如木糖）等。经预处理后的木质纤维素原料由于纤维素酶附着位点暴露出来，使得纤维素酶与物料容易结合起来并水解获得六碳糖组分，纤维素酶法水解纤维素其反应条件温和，在pH 4.8，50°C下常压进行，转化率较高，但是纤维素酶的用量较大和成本较高，这成为酶法水解纤维素过程商业化的主要制约因素。

1.5.5 木质纤维素水解液发酵

利用木质纤维素水解液发酵生产微生物油脂的过程主要是通过产油微生物代谢水解液中的五碳糖和六碳糖并产生和积累油脂，产生的微生物油脂其脂肪酸组成和植物油脂相类似，主要储存在微生物细胞内，其发酵结果与微生物生长和代谢环境有关，而影响其生长和代谢环境的条件主要是一系列发酵条件，例如温度、pH、溶氧、初始糖浓度、初始氮源含量等。

1.6 同步糖化发酵技术应用及意义

1.6.1 同步糖化发酵技术的应用

Zhang J 等^[43]开发了一种干式烯酸预处理方法,并用此方法对玉米秸秆粉末进行了预处理,然后通过同步糖化发酵技术利用耐高温的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 进行乙醇发酵最终获得了较高的乙醇产量和得率,同时开发的螺带搅拌浆较好的解决了在超高固体含量下的传质与传热问题,最终为高固体含量下同步糖化发酵产乙醇提供了可靠的保证。Zhang J 等^[44]开发出了一种超低功耗,超低能耗生物脱除玉米秸秆预处理后抑制物的方法,这种方法是通过筛选出的煤油霉菌暗膜囊菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 将由预处理工段产生的乙酸、糠醛、羟甲基糠醛等抑制物除去以实现后续同步糖化发酵过程的顺利进行,该方法低成本,零废水排放,是一个极其有效的脱毒方法。

Yang 等^[45]通过蒸汽膨爆和碱性过氧化氢法,成功将半纤维素和木质素移除,纤维素含量达到 73.2%。通过分批补料的方法最终还原糖浓度达到 220 g/L,葡萄糖浓度达到 175 g/L,纤维二糖浓度达到 22 g/L,木糖浓度达到 20 g/L。Kim Olofsson 等^[46]认为基因工程菌酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, TMB3400 可以利用木糖,但是葡萄糖与木糖在胞外转运至胞内的过程存在竞争转运载体的可能。研究发现,通过控制酶解速度略低于该菌种摄取糖的最大速度时,有利于木糖的利用,因此,设计了酶解速度的模型,并根据此模型,设计了三阶段分别控制不同加酶速度下的发酵过程,最终使 85% 以上的木糖得到充分利用。

1.6.2 同步糖化发酵技术的价值和意义

同步糖化发酵技术可以有效解决酶解过程产生的酶解产物对酶解反应的抑制,提高了酶解产率和酶解效果,另外,将酶解糖化过程和发酵过程合并成一步操作既节省了反应设备的投入,又节省了反应过程总时间,提高了效率,实现了一锅法。因此,同步糖化发酵技术可以有效的提高产物的总产量,是一个非常有价值的技术路线。

1.7 微生物油脂发酵的放大研究

Zhao 等^[47]用圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* Y4 分别以菊芋提取物和水解物作为底物在 15 L 发酵罐中生产油脂。利用菊芋提取物在分批补料过程下最终油脂产量达 39.6 g/L,细胞含油率达到 56.5%。Yasser Elbahloul 等^[43]用基因工程菌大肠杆菌 *Escherichia coli* p(Microdiesel)在中试规模 100 L 下进行四次分批补料培养,最终干细胞浓度达到 61.0 g/L,脂肪酸乙酯含量占细胞干重的 25.4%。Ren LJ 等^[48]在 500 L 发酵罐中进行微藻裂殖壶菌 *Schizochytrium sp.*,通过三阶段通气控制,即发酵 0-24 h 通气量 0.4 vvm, 24-96 h 通气量 0.6 vvm, 96 h 至结束通气量 0.4 vvm,使细胞密度达到 71 g/L,油脂量达 35.75 g/L, DHA 含量达 48.95%。DHA 含量比一直保持通气量 0.4 vvm 的发酵方式增加了 11.21%。Li 等^[49]用圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* Y4 酵母进行了批次发酵,细胞干重达到 150 g/L;进行了反补发酵,用时 25 天,细胞干重达到 151.5 g/L,含油率 48%。在 15L 发酵罐中,反补发酵用时 134 h,细胞干重 106.5 g/L,含油率 67.5%,油脂产率 0.54 g/L/h。

1.8 纤维素酶的循环利用

纤维素酶的成本是制约木质纤维素发酵生产微生物油脂的主要因素。通过纤维素酶的回收利用可极大降低纤维素酶的用量，继而降低微生物油脂的生产成本。本工作主要是对同步糖化发酵生产微生物油脂过程进行了优化和放大，并实现了纤维素酶的回收利用。

Tu等^[50]研究发现,经过有机溶剂预处理后获得的软木水解液中可以有效的回收纤维素酶,这为实现生物转化产乙醇商业化方面,降低纤维素酶成本提供了可行的方案。Tu等通过响应曲面分析法优化了温度, pH, 离子强度以及表面活性剂浓度等条件,获得了最有利于蛋白和纤维素酶恢复活力的条件。最优化的条件为44.4°C, pH 5.3 以及 0.5%吐温80。通过在水解后的残渣中回收纤维素酶,并将其循环使用,每次糖化开始时加入相同量的纤维素酶,糖化结束后回收纤维素酶,经过三次循环,三次水解过程的总得率提高了25%。其原理主要是水解后残渣中的纤维素酶通过解吸附作用游离到液体中,再和新加入的纤维素酶混合后再吸附到木质纤维素中,进行酶解。Zhu等^[51]通过了一个非常简单的方法测量吸附在纤维素类物质或预处理后木质纤维素上的纤维素酶量。这个方法首先将吸附的纤维素酶置于10 M的NaOH中在121°C作用20分钟,使纤维素酶失去活性,接着用茚三酮作用氨基酸将纤维素酶中的氨基酸释放出来,通过测定氨基酸的量确定纤维素酶量。木质纤维素中的主要成分是纤维素、半纤维素以及木质素,这些物质都不会影响茚三酮的作用。Zhu等研究了一系列纤维素酶解吸附的方法,包括改变pH,使用洗涤剂,高浓度盐溶液以及多元醇等。最终通过调节pH至13.0,并用72%乙二醇在中性pH下洗脱可以最有效的实现纤维素酶的解吸附。在循环回收纤维素酶时,调节pH至10.0可以保证纤维素酶的解吸附,并且成本较低,研究发现在pH 10.0时可以使预处理后玉米秸秆中吸附的纤维素酶回收90%以上。

1.9 课题的内容和意义

1.9.1 研究课题的内容

研究内容主要集中在玉米秸秆木质纤维素为底物的油脂发酵,结合同步糖化发酵技术,在较低的纤维素酶用量的基础上实现廉价底物的较有优势的油脂产量。方案主要分为四个方面,第一方面为稀酸预处理后原料经脱毒后,糖化反应的尝试;第二方面为同步糖化油脂发酵各种发酵条件的优化;第三方面为碳氮比对同步糖化油脂发酵的影响;第四方面为同步糖化油脂发酵后发酵醪中酶的回收的尝试。

工艺技术路线主要分为玉米秸秆前处理、玉米秸秆预处理、玉米秸秆生物脱毒、木质纤维素糖化发酵以及发酵醪离心萃取。其中,玉米秸秆前处理分为粉碎、洗涤、压榨和烘干四道工序。玉米秸秆预处理主要是在高温高压下破坏秸秆的致密结构。玉米秸秆的生物脱毒主要是通过煤油霉菌暗膜囊菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 将由预处理产生的

乙酸、糠醛、羟甲基糠醛等抑制物除去。木质纤维素糖化发酵工段主要是进行木质纤维素同步糖化油脂发酵获得目的产物。发酵醪离心萃取主要是通过离心、破碎、萃取及旋蒸技术，实现纤维素酶的回收和目的产物的分离。预期研究成果为实现以玉米秸秆木质纤维素为底物的同步糖化油脂发酵，并且实现纤维素酶的循环利用。研究结果具备两个创新点，即首次尝试木质纤维素同步糖化发酵产微生物油脂和这个发酵过程中纤维素酶的回收。

1.9.2 课题研究的意义

实现用玉米秸秆作为底物的同步糖化发酵产油脂，构建起优化的同步糖化发酵体系。同时，通过纤维素酶的回收利用从而降低纤维素酶的用量。该研究提供的利用玉米秸秆生产微生物油脂的方法，首次实现了用同步糖化发酵技术进行木质纤维素微生物油脂发酵以及纤维素酶的循环使用，这为微生物油脂资源提供了一个有效的低成本的来源。

第 2 章 实验材料和方法

2.1 材料和菌种

2.1.1 玉米秸秆材料

本实验玉米秸秆原料来源于山东潍坊，纤维素含量为 33.4%。

2.1.2 菌种和培养基

本实验发酵所用油脂酵母为皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1，生物脱毒所用霉菌为煤油霉菌暗膜囊菌 *Amorphotheca resinae* ZN1。

PDA培养基的组成为葡萄糖20 g/L、马铃薯200 g/L、琼脂粉 20 g/L，并在115℃下灭菌20分钟。

YPD培养基的组成为葡萄糖20 g/L、酵母粉10 g/L、琼脂粉15 g/L、蛋白胨20 g/L，并在115℃下灭菌20分钟。

合成培养基的组成为木糖7.8 g/L、葡萄糖38 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 g/L，调节pH值在5.8~6.0范围内，并在115℃下灭菌20分钟。

种子培养基的组成为葡萄糖20 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 g/L、酵母粉0.5 g/L，调节pH值在5.8~6.0范围内，并在115℃下灭菌20分钟。

玉米秸秆水解液培养基获得方法为通过硫酸浓度3.0%，反应温度190℃，反应时间3 min的稀酸预处理方法处理秸秆，后加入7FPU/g DM的纤维素酶进行水解，水解48 h后，在4000 rpm转速下离心分离3分钟，最后得到水解上清液。并在发酵前加入各种无机盐溶液，最终达到 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L， $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g/L。

2.1.3 菌种保藏

将种子接入YPD培养基中，在30℃，180 rpm条件下培养24 h后取出，再将培养液与60%甘油各0.5 mL混合后分装到冻存管中，并保藏于-80℃冰箱中。当需要使用菌种时，从-80℃冰箱中取一支冻存菌种，用划线法将菌种接于YPD固体平板上，在30℃下静置培养24 h，后将生长完好的YPD固体平板存放于4℃冰箱中保存，在2个星期之内可挑取YPD固体平板上的菌落接种使用。

2.1.4 种子培养

将 YPD 固体平板上的单个菌落在超净工作台中用牙签挑取接入到 20 mL YPD 液体培养基中，摇瓶在 30℃，180 rpm 条件下发酵 24 h。之后，再以体积比 10%接种量移取 2 mL 种子液接入到 20 mL 玉米秸秆水解液中，摇瓶在 30℃，180rpm 条件下培养 24 h。之后，再以体积比 10%接种量将 20 mL 玉米秸秆水解液全部扩大接入到 200 mL 水解液中，摇瓶在 30℃，180 rpm 条件下发酵 18 h，其中水解液中必须补加无机盐溶液，最终

达到 0.5g/L $MgSO_4$ 和 0.5g/L $(NH_4)_2SO_4$ 。

2.2 实验仪器和试剂

2.2.1 实验仪器和设备

见表 2.1 实验仪器和设备

表2.1 实验仪器和设备

Table 2.1. Experiment equipment

仪器名称	规格	生产厂家
电子天平	BS423S	梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司
电子天平	BS224	梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司
立式压力蒸气灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博迅实业有限公司
恒温恒湿培养箱	GHP-9160	上海一恒科技有限公司
落地恒温振荡摇床	HZ-9311K	太仓华利达有限公司
分光光度计	722N	上海精科实业有限公司
核酸蛋白质分析仪	DU-800	Beckman公司
超声波细胞破碎仪	JY92-II	宁波新芝生物科技有限公司
小型高速离心机	5424	Eppendorf公司
移液器	Research	Eppendorf公司
微型摇床	5430	Eppendorf公司
高速冷冻离心机	J-26	Beckman公司
恒温水槽	SDC-6	宁波新芝生物科技有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科技有限公司
制冰机	XB-70	宁波新芝生物科技有限公司
旋转蒸发仪	RE-201D	上海科兴仪器有限公司
超低温冰箱	Forma-86C	Thermo公司
冰箱	BCD-239VC	海尔公司
pH计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
单人单面洁净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
高效液相色谱	LC-20AD	岛津公司
5L发酵罐	Biotech -5L	上海保兴生物设备工程有限公司
超纯水纯化系统	Milli-Q Synthesis	Millipore公司
3L四连发酵罐	Biotech-4BG	上海保兴生物设备工程有限公司

2.2.2 实验试剂

见表 2.2 试剂

表 2.2 试剂

Table 2.2. 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
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
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
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司
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 HAMPSHIR
蛋白胨	AR	国药集团化学试剂有限公司

2.3 微生物油脂生产工艺流程

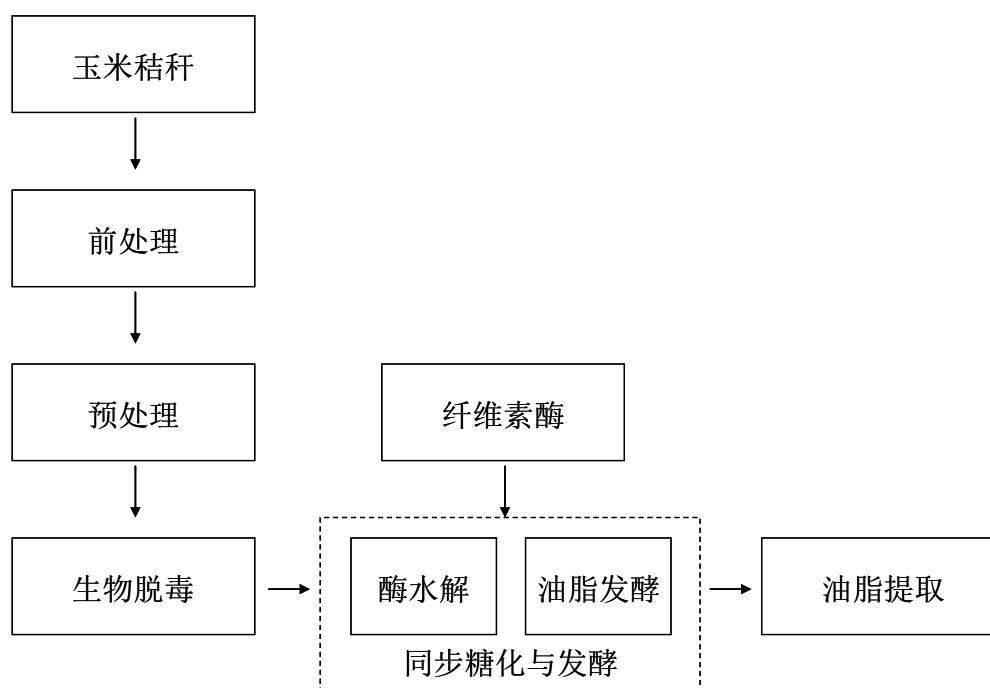


图2.1 微生物油脂生产工艺流程

Fig.2.1. Process of microbial lipid production

2.3.1 玉米秸秆前处理

玉米秸秆原料来源于山东省潍坊市，收获于 2009 年秋天。首先，玉米秸秆原料经锤式粉碎机完全粉碎，并用直径为 5 mm 的筛网筛选过滤，获得的秸秆颗粒大小在 20-60 目范围内，接着将粉碎后的玉米秸秆用自来水清洗并过板框过滤，将其中的碎石、沙土、尘土以及金属碎屑沉淀下来，然后将浮于水面上的玉米秸秆粉末捞取出，接着用压榨机压滤，压出大量的水分，压滤后的玉米秸秆粉末含水量在 60%-70% 范围内，将压滤后的玉米秸秆粉末放置在通风良好的空旷地上晾晒干，除去自由水，最后用 105 °C 烘箱烘干 8-12 h 至恒重，将至室温后封装于真空袋中储存备用。

2.3.2 玉米秸秆预处理

玉米秸秆预处理过程中所使用的预处理反应器是容积为 15L 的不锈钢反应器，它是由华东理工大学生物反应器国家重点实验室生物质能源实验室自行设计制作的高压不锈钢反应器，主要由电热高压蒸汽发生器、预处理反应釜以及物料收纳容器三部分组成。其中，预处理反应釜的形状为圆筒状，外壁装有一层加热套，加热套变压器输出电压为 80V，并有一层石棉隔热保温层，预处理反应釜底部有一个高压蒸汽分布环，电热高压蒸汽发生器中的蒸汽经分布环均匀通入到预处理反应釜内，使高压蒸汽与玉米秸秆粉末均匀混合。预处理反应釜外壁和内部均放置一个热电偶温度计，测量外壁温度的热电偶

用铁丝固定在不锈钢外壁和加热套之间,在反应釜中轴线处有一个密闭的不锈钢管由反应釜顶部深入到反应釜中而测量内部温度的热电偶则沿此不锈钢管插入到反应釜中,为保证测量内部温度的准确性,要讲不锈钢管中加入油性物质便于温度的传递。物料收纳容器为不锈钢材质的圆柱形网筒,网格大小略小于玉米秸秆粉末的颗粒大小,其体积大小略小于反应釜内容积,物料收纳容器能够紧贴在反应釜内壁放入其中,并且装卸方便。

称取 800 g 前处理后的玉米秸秆原料,在塑料箱内加 400 g (固液比 2:1) 6% 的稀硫酸,反复搅拌混合均匀,然后,将搅拌好的物料装入塑料袋内封好,在室温下预浸过夜待用,其中混合所用的稀硫酸溶液浓度为 6% (w/w),相对于固体物料的稀硫酸浓度为 3% (w/w)。将经过稀硫酸预浸过夜后的玉米秸秆粉末加入到物料收纳器中,保证物料蓬松,这样有利于蒸汽与物料的均匀混合,接着再将物料收纳器装入预处理反应釜中,加盖后将上下法兰拧紧,然后将蒸汽发生器内压力在 1.5-3.0 MPa 范围的高压水蒸汽通过蒸汽分布环从底部通入到预处理反应釜内,蒸汽不可猛烈通入,要保证预处理反应釜外壁和内部温度同步上升。当预处理反应釜内温度到达 100°C 时,停止通入蒸气并先打开排气阀放出不稳定气体,关闭排气阀,再打开反应釜底部排水阀排出冷凝水,关闭排水阀。然后,继续打开蒸汽进气阀,控制水蒸气流速,使反应釜内外温度同步升至 190°C,在此温度下维持 3 分钟。最后打开排气阀泻压,在短时间内将预处理反应釜内压力降至常压,接着打开法兰,将物料收纳器取出,并将预处理后的玉米秸秆物料倒入不锈钢筒中在自来水中降至室温,然后将冷却后的预处理后的玉米秸秆物料装入塑料袋中密封,在 -20°C 冰箱内保存备用。

2.3.3 玉米秸秆生物脱毒

将预处理后的玉米秸秆物料用 20% (w/w) CaOH 溶液调至 pH 5.0-6.0,含水量调至 60% 左右。将保存煤油霉菌暗膜囊菌 ZN1 的斜面试管用 20 mL 无菌水洗脱斜面上的孢子,洗脱三遍,然后接入到调整好 pH 和含水量的预处理后玉米秸秆物料 200 g 中,在生物脱毒反应器中,维持培养温度 25°C,静态培养 5 天,然后按 10% (w/w) 的接种量依次扩培。从试管斜面孢子接入到 200 g 预处理后玉米秸秆物料作为一级种子,所用的预处理后物料是 2% 酸浓度下的预处理物料,转接到二级种子所用的预处理后物料是 2.5% 酸浓度下的预处理物料,转接到三级种子所用的预处理后物料是 3% 酸浓度下的预处理物料,因此,生物脱毒的种子扩培过程实际上也是种子驯化过程。脱毒时间为 5 天左右,一般脱毒结束的标志是羟甲基糠醛和糠醛在脱毒物料中的浓度刚好降低为零,而乙酸的浓度要刚好低于 2 g/L,脱毒后的物料用塑料带封存于 -20°C 冰箱中待用。

2.3.4 玉米秸秆水解液的制备

玉米秸秆酶解过程所用的物料为脱毒后物料,所用纤维素酶是已经商业化的纤维素酶 Accellerase 1000(Genencor International, Rochester, NY, USA),该酶的滤纸酶活为 50.0 FPU/mL,纤维二糖酶活为 152.0 IU/mL,酶解过程所用的反应器为 5L 糖化罐,反应体系的固体含量为 10% (w/w),反应体系中纤维素酶用量为 7FPU/g 干物质,pH 控制在 4.80,温度为 50°C,酶解时间为 48 h。由于酶解糖化后的水解液中含有大量的不溶性固

体，因此，要用离心法进行固液分离，离心转速为 10000 rpm，离心时间为 10 分钟，离心后保留上清液，弃除固体残渣，固体残渣中主要是木质素和未被酶解的纤维素等，然后将上清液加入发酵时所需的各种无机盐，并将水解液调节 pH 至 5.0，并在 115°C 下灭菌 20 分钟，灭菌后的水解液再经定量滤纸过滤，除去杂质，然后存放于 4°C 冰箱中待用。

2.3.5 玉米秸秆水解液发酵

玉米秸秆水解液发酵实验是在上海保兴生物设备工程有限公司生产的 3 L 四联发酵罐中进行，具体操作如下：将发酵罐中先加入 1 L 去离子水，在灭菌过程中可以保护溶氧电极和 pH 电极，盖上发酵罐顶盖，上紧法兰，检查发酵罐顶盖与发酵罐体间的密封垫是否放置正确，于发酵罐进气口设置一个洗气瓶，洗气瓶是一个带有过滤器装有一定量去离子水的蓝口瓶，此装置的主要作用是保证通入罐体的无菌空气湿度饱和。接着用止水夹将此装置的两端入口夹紧，防止灭菌过程中发酵罐中的水倒流入蓝口瓶中。接着将酸碱瓶和消泡剂瓶的滴入口用纱布和牛皮纸包扎好，并将连接的牛筋管用止水夹夹紧，所用的酸和碱分别是浓度为 1 摩尔的氢氧化钠和硫酸。将密封好的发酵罐和酸碱消泡剂瓶放入灭菌锅中，在 115 °C 下灭菌 20 分钟，之后取出自然冷却至室温，然后将发酵罐放于 3 L 四联发酵罐磁力搅拌器上，并连接洗气瓶和酸碱消泡剂瓶，确保酸碱消泡剂能够正常泵入罐中，同时打开通气阀将无菌空气通入罐体内，接着夹紧尾气口将发酵罐中的去离子水靠内外压力差排出罐体，并将加料口处的火焰接种环点燃，将灭菌好的水解液倒入发酵罐内。当温度和通气量稳定后将种子液接入罐体中，发酵过程的装液量为 1 L，接种量 10% (v/v)，pH 为 5.0，温度为 30°C，溶氧为 20%，通气量为 1 vvm，初始转速为 300 rpm，其中溶氧可以通过与转速的串联控制实现自动控制。在发酵开始后的每 6 h 取一次样品，取样体积为 5 mL (24 小时之前) 或 35 mL (24 小时之后)，从每次取出的样品中取出 1 mL 在 10000 rpm 下的离心 5 分钟，获得的上清液稀释十倍后用高效液相色谱测量糖和抑制物的浓度，获得的菌体沉淀物用超纯水洗涤三遍后测量 OD600nm 吸光值，35 mL 样品中除了取 1 mL 测定糖和抑制物的浓度以及 OD600 nm 吸光值外，再取 30 mL 用于提取和测量油脂，当水解液中油脂产量达到最大值时发酵即可结束。

2.4 玉米秸秆同步糖化发酵

玉米秸秆同步糖化发酵实验是在上海保兴生物设备工程有限公司生产的 5 L 发酵罐中进行，具体操作如下：将清洗后的发酵罐中加入 3 L 去离子水，在灭菌过程中可以保护溶氧电极和 pH 电极，盖上发酵罐顶盖，检查发酵罐顶盖与发酵罐体间的密封垫是否放置正确，接着上紧法兰，将标定好的溶氧电极和 pH 电极沿着电极孔插入到罐体内旋紧固定好，保证搅拌浆搅拌过程不会碰触溶氧电极和 pH 电极，接着加上不锈钢灭菌罩，将蒸汽发生器中的蒸汽导入到发酵罐夹套中，打开夹套冷凝水出口阀，

将夹套中的冷凝水排除，冷凝水排干后关小冷凝水出口阀，使夹套中的压力逐渐上升同时，加热罐体中的去离子水，当温度达到 100℃ 时，将罐体底部的蒸汽阀门打开，使蒸汽同时进入罐体内，当温度达到 115℃，压力达到 0.07 兆帕时开始计时，在线灭菌 20 分钟。温度的控制通过两个蒸汽进气阀和两个蒸汽排除阀控制。另外在发酵罐进气口设置一个洗气瓶，洗气瓶是一个带有过滤器且装有一定量去离子水的蓝口瓶，此装置的主要作用是保证通入罐体的无菌空气湿度饱和，接着用止水夹将此装置的两端入口夹紧，防止灭菌过程中发酵罐中的水倒流入蓝口瓶中。接着将酸碱瓶和消泡剂瓶的滴入口用纱布和牛皮纸包扎好，并将连接的牛筋管用止水夹夹紧，所用的酸和碱分别是浓度为 1 摩尔的氢氧化钠和硫酸。将密封好的发酵罐和酸碱消泡剂瓶放入灭菌锅中，在 115℃ 下灭菌 20 分钟，之后取出自然冷却至室温。之后，将洗气瓶和酸碱消泡剂瓶连接到 5 L 发酵罐上，确保酸碱消泡剂能够正常泵入罐中，同时打开通气阀将无菌空气通入罐体内，接着夹紧尾气口将发酵罐中的去离子水靠内外压力差从出料口排出罐体，并将加料口处的火焰接种环点燃，将灭菌好的 2.1 L 去离子水倒入发酵罐内，自动控制温度至 50℃，转速 300 rpm，接着加入 750 g 含水量为 57% 的脱毒后物料，在物料加入一半时自动调节 pH 至 4.8，加入纤维素酶 42 mL，并开始计时作为预糖化过程的开始，并将剩下的物料继续均匀加入，整个物料加入时间为 1 h，加料完毕后关闭进样阀。整个加料过程要保证物料加入过程中反应体系不能过于粘稠，可实现反应体系的均匀混合。预糖化若干时间后，将温度调至是在温度 30℃，pH 调至 5.0，以 10% (v/v) 的接种量接入种子进行发酵，并打开通气阀通入空气，通气量为 0.2 vvm，控制溶氧 20%，其中溶氧可以通过与转速的串联控制实现自动控制。所接入的种子体积为 270 mL，整个反应体系液体体积为 2.8 L，种子的培养过程如下：首先将冻存管中的菌种解冻，并经过 20 mL 的种子培养液在 100 mL 三角瓶中进行活化培养，培养温度为 30℃，转速为 180 rpm，培养 24 小时后，取 2 mL 种子培养液接入到 20 mL YPD 培养基中，培养温度为 30℃，转速为 180 rpm，培养 24 小时后，取 5 mL YPD 培养液接入到 20 mL 驯化培养基中，驯化培养基为 10 mL YPD 培养液与 10 mL 水解液的混合培养基，培养条件为 30℃，180 rpm，培养 24 小时。再将 25 mL 驯化培养基全部接入到 250 mL 水解液中，培养温度为 30℃，转速为 180 rpm，培养 18 小时后作为三级种子接入到 5 L 发酵罐中。

2.5 检测方法

2.5.1 葡萄糖和木糖浓度测定

本实验葡萄糖、木糖以及糠醛、羟甲基糠醛、乙酸等抑制物的浓度由 HPLC 获得，流动相为 0.005 M H₂SO₄，流速为 0.6 mL/min，色谱柱为 Bio-rad Aminex HPX-87H 柱，柱温 65℃，检测器为 RID-10A 示差检测器。先配置糖和抑制物的浓度梯度液，然后经过 0.22 μm 滤纸过滤，再以 20 μL 进样，根据图谱中的出峰时间，可确定各物质在色谱

柱中的出峰时间, 再根据峰面积与浓度梯度的线性关系, 确定各物质标准曲线。待测定的样品, 经过 10 倍的稀释后经 0.22 μm 滤纸过滤后进样, 通过检测报告获得的出峰时间和峰面积, 计算出对应的待测样品中各组分的浓度。

2.5.2 油脂量的测定

本实验通过氯仿甲醇, 以体积比 2:1 的萃取体系, 用 20 mL 的萃取体积, 萃取破壁后样品中的油脂。以 10000 rpm 的速度离心 5 min 后, 抽取下层氯仿层, 并在旋转蒸发仪上, 以 100 rpm 转速, 0.1 Mpa 真空度, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发 5 min。之后, 再用石油醚 20 mL 萃取上一步的残渣, 在 10000 rpm 的速度下离心 10 min 后, 取上清液以相同条件进行旋转蒸发。

2.5.3 氨氮的测定

首先将所有容器都用重铬酸钾洗液清洗三遍, 将容器中的所残留的还原态的氮氧化, 清洗后再用去离子水冲洗干净, 最后再用超纯水冲洗三遍烘干备用, 所用的试剂用两种分别为试剂 A 和试剂 B, 其中试剂 B 是由另外两种试剂试剂 B1 和 B2 按体积比 100:1 (v/v) 配制而成。

配置试剂 A 时, 首先要称量苯酚 10 g, 二水合亚硝酸铁氰化钠 100 mg 溶于超纯水中, 定容至 1 L, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时测量的 pH 值应该在 7.5-7.8 范围内, 最后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光存放, 在 30 天使用完毕。配置试剂 B1 时, 首先要称取 0.4 mol 的 Na_2HPO_4 和 0.2 mol 的 NaOH 溶于超纯水中, 定容至 1 L, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时测量的 pH 值应该在 11.5-11.6 范围内, 最后在室温下存放, 在 60 天内使用完毕; 配置试剂 B2 时, 首先将标示活性氯 $\geq 5.2\%$ 的 NaClO 成品溶液和 1.6 mol 的 NaOH 分别溶于超纯水中, 降温至室温, 再将两者混合, 定容至 1 L; 然后将试剂 B1 和 B2 按 100: 1 的体积比充分混合, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时测量的 pH 值应该在 11.50-11.70 范围内, 最后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存, 在 14 天内使用完毕。配置铵标准液贮液时, 首先将优级纯氯化铵在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干 4 h, 然后称取 3.819 g 溶于水中, 定容至 1 L, 此时溶液氨氮浓度为 1.00 mg/mL。

将铵标准贮液分别在试管中稀释 10 倍、20 倍、40 倍、50 倍、100 倍, 然后分别对应加入 20 μL 稀释后的标准贮液, 然后迅速先后加入 2.5 mL 的试剂 A 和试剂 B, 在 10 秒内摇匀, 之后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴保温 30-50 分钟, 试管取出后在 630nm 处测定吸光值, 并以蒸馏水作为基准调零, 以吸光值和氨氮浓度绘制出标准曲线。

根据水解液中的氨氮含量范围, 将样品稀释 5 倍, 然后迅速先后加入 2.5 mL 的试剂 A 和试剂 B, 在 10 秒内摇匀, 之后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴保温 30-50 分钟, 试管取出后在 630 nm 处测定吸光值, 并以蒸馏水作为基准调零, 空白对照的吸光值应该在 0.010-0.040 范围内, 用测得的吸光值减去空白对照的吸光值, 然后回归到标准曲线上, 计算得到对应氨氮的含量。

2.5.4 总氮的测定

配制试剂的容器都要用重铬酸钾洗液清洗三遍, 再用清水冲洗三遍直到干净, 最后再用超纯水清新洗三次, 清新完毕后在 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干待用。

需要配制的试剂有碱性 $K_2S_2O_8$ 溶液、硝酸钾标准母液、硝酸钾标准液、1+9 盐酸溶液。称取 15g NaOH 和 40 g $K_2S_2O_8$ 溶于超纯水中，混匀并稀释至 1 L，存放于广口瓶内加盖封存，即获得碱性 $K_2S_2O_8$ 溶液。先将硝酸钾经 105 °C 烘干 4 h，之后称取 0.7218 g 硝酸钾固体，溶于超纯水中，混匀后移入 1 L 的容量瓶中，定容至 1 L，即获得硝酸钾标准母液，溶液中的硝酸盐氮含量为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。向配好之后的硝酸钾标准母液中加入 2 mL 三氯甲烷保护剂，可以稳定使用 6 个月。将硝酸钾标准母液用超纯水稀释 10 倍，即可获得硝酸钾标准液，溶液中的硝酸盐氮含量为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。按体积比 1: 9 将盐酸和超纯水混匀，即获得 1+9 盐酸溶液。

标准曲线的绘制：首先，分别吸取 0, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 5.00, 7.00, 8.00 mL KNO_3 标准液移入 25 mL 比色管中，用超纯水稀释至 10 mL 刻度标线。再加入 5 mL 碱性 $K_2S_2O_8$ 溶液，用玻璃磨口塞将管口塞紧，后用纱布裹紧，并用棉线将纱布捆扎结实，防止瓶塞蹦出。然后，将比色管按竖直方向全部置于压力蒸汽消毒器中，加热 0.5 h，放气后升温至 120-124 °C 开始计时，使比色管在此温度内加热 0.5 h。结束后，自然冷却至室温，开阀放气，取出比色管。

其次，将反应后的比色管中加入 1+9 盐酸 1 mL，再用超纯水稀释至 25 mL 标线，反复震荡混匀。之后在紫外分光光度计上，以超纯水作参比，在 220 nm 和 275 nm 处分别测量其吸光值，用公式 $A=A_{275}-2A_{220}$ 获得矫正后的吸光值，再以此吸光值和对应的总氮浓度绘制标准曲线。由于标准曲线批次间差异较大，每次样品测定总氮都要测一次标准曲线。

测定实验样品中的总氮含量时，先将样品稀释 10 倍后，取 400 μL 加入到上述反应体系中，在上述步骤中将 KNO_3 标准液替换成样品，定容至 10 mL 刻度标线，之后重复标准曲线的实验步骤。获得矫正后吸光值，在通过标准曲线回归计算，得到对应的总含氮量。

2.5.5 玉米秸秆中纤维测定方法

本方法可直接测定玉米秸秆中的纤维素、半纤维素。所需要的试剂如下：

中性洗涤剂为十二烷基硫酸钠溶液，浓度为 30 g/L，配制方法如下：称取 37.22 g 乙二胺四乙酸二钠 (Na_2EDTA) 和 13.62 g 四硼酸钠 ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)，将这两种药品放入到 1 L 烧杯中，并加入少量水，加热直至溶解，之后再加入 60 g 十二烷基硫酸钠和 20 mL 乙二醇乙醚，将其溶解并混合均匀，接着称取 9.3 g 无水磷酸氢二钠放入另一个烧杯中并加入少量水，将其加热溶解后倒入前面的 1 L 烧杯中，混合均匀后倒入 2 L 容量瓶中定容至刻度线处，此时该中性洗涤剂的 pH 应该在 6.9-7.0 范围内。

酸性洗涤剂溶液为十六烷三甲基溴化胺溶液，配制方法如下：首先称取 40 g 十六烷三甲基溴化胺 (CTAB) 溶于 2 L 稀硫酸溶液中，搅拌加热使其溶解即可获得，其中稀硫酸溶液浓度为 0.50 mol/L，先用量筒称量取 98% 浓硫酸 54 mL，慢慢加入已装有一定量水的烧杯中，冷却后加入到 2 L 容量瓶中，定容至刻度即可。

72% 硫酸溶液，其配置方法如下：用量筒称量 367.3 mL 98% 浓硫酸，缓慢倒入装有

100 mL 去离子水的 500 mL 容量瓶中，冷却后定容至刻度线。

α -淀粉酶：活力为 17,400 U/mL，1U 表示 30 分钟内该淀粉酶可水解 1 mg 可溶性淀粉。无水亚硫酸钠 (Na_2SO_3) 浓度为 10 g/L。丙酮用量为 250 mL。

玉米秸秆中纤维测定方法如下：首先，准备滤袋和样品，将待测的玉米秸秆样品烘干过筛，使样品粒径大小控制在 60 目至 40 目之间，然后用耐溶剂的记号笔在滤袋上写好编号，准确称取 1.0 g 左右的样品装于滤袋中，不可太满，质量记作 m ，接着在距离滤袋边缘大 5 mm 左右的地方用封口机封口，之后将样品在滤袋中均匀分布展平，此时封口后滤袋和样品的总质量记作 M ，封口后的滤袋质量即为 $M-m$ ，记作 m_1 。取一个空白滤袋，将空白袋子校正系数设为 C_1 ，烘干后质量记作 m_3 ，未封口滤袋质量记作 m_0 ，此时 $C_1 = m_3/m_0$ 。

将处理好的滤袋放入滤袋架上托盘上，然后将装有滤袋的支架放入纤维分析仪消煮器中，并在顶部将金属压锤放上，以确保消煮过程中支架不会浮起，向 2 L 中性洗涤剂溶液中加入 4.0 mL 热稳定 α -淀粉酶和无水亚硫酸钠 20 g，将其混匀后倒入纤维分析仪消煮器中。之后，打开搅拌和加热开关，确保滤袋支架上下运动正常，盖上消煮器盖并压紧盖子保证完全密封好，加热并维持消煮器内溶液温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ ，从加热升温到恒温过程消煮 75 分钟。

消煮结束时关闭加热和搅拌开关，慢慢的打开排液阀将热的溶液排完，由于消煮器中的溶液是有压力的，因此，一定要将废液阀打开，当压力释放完后再将盖子打开，当热的溶液排完之后，打开消煮器盖，同时关闭排液阀，然后将把 2 L 预先加热到 85 $^{\circ}\text{C}$ -90 $^{\circ}\text{C}$ 的去离子水倒入其中进行淋洗，淋洗前一定要加入 4.0 mL α -淀粉酶，并充分淋洗两遍，淋洗过程中要盖上消煮器盖但不需要旋紧，然后打开搅拌开关，此时，不需要打开加热开关，搅拌 3-5 分钟后，将废液排掉，重复两次，第三次不加 α -淀粉酶只用去离子水淋洗，总共淋洗三次。最后一次淋洗过后，将常温下的去离子水加入消煮器中，同样打开搅拌开关，使容器冷却，为下轮实验做好准备。

取出放有滤袋的支架，并取出滤袋，轻轻挤压滤袋去掉多余的水，然后将滤袋放入 250 mL 烧杯中，加丙酮 100 mL，使液面覆没滤袋，静置浸泡 3-5 分钟，然后取出滤袋并轻轻挤压去掉多余的丙酮，并将滤袋在通风橱中自然干燥 24 小时，待完全干燥后将其放入到 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干 3 小时，放入烘箱前要确保丙酮完全挥发掉，防止丙酮在烘箱中爆破。烘干后的滤袋迅速放入干燥器中冷却至室温，然后称重记作 m_2 。将第一次洗涤后袋中剩余的样品干重记作 $m_4 = (m_2 - (m_1 \times C_1))$ ，将第一次洗涤后的空白滤袋质量记作 m_3 ，空白袋子校正系数设为 C_2 ，并将其继续做空白测定。

之后，进行第二次洗涤，将放有滤袋的托盘放入滤袋支架中，再将其放入消煮器中，然后将金属压锤放在顶部，以确保消煮过程中滤袋支架不浮起，并加入 2L 酸性洗涤剂溶液，确保加入酸性洗涤剂溶液将托盘滤袋支架完全浸没，打开搅拌和加热开关，确保滤袋支架正常搅拌，盖上消煮器盖并将其密封完全，加热并维持消煮器内溶液温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ ，从加热升温到恒温过程消煮 60 分钟。

消煮结束时关闭加热和搅拌开关，慢慢的打开排液阀将热的溶液排完，由于消煮器中的溶液是有压力的，因此，一定要将废液阀打开，当压力释放完后再将盖子打开，当热的溶液排完之后，打开消煮器盖，同时关闭排液阀，然后将把 2 L 预先加热到 85 ℃-90 ℃ 的去离子水倒入其中进行淋洗，并充分淋洗两遍，淋洗过程中要盖上消煮器盖但不需要旋紧，然后打开搅拌开关，此时，不需要打开加热开关，搅拌 3-5 分钟后，将废液排掉，重复两次，三次只用去离子水淋洗，总共淋洗三次。最后一次淋洗过后，将常温下的去离子水加入消煮器中，同样打开搅拌开关，使容器冷却，为下轮实验做好准备。

取出放有滤袋的支架，并取出滤袋，轻轻挤压滤袋去掉多余的水，然后将滤袋放入 250 mL 烧杯中，加丙酮 100 mL，使液面覆没滤袋，静置浸泡 3-5 分钟，然后取出滤袋并轻轻挤压去掉多余的丙酮，并将滤袋在通风橱中自然干燥 24 小时，待完全干燥后将其放入到 105 ℃ 烘箱烘干 3 小时，放入烘箱前要确保丙酮完全挥发掉，防止丙酮在烘箱中爆破。烘干后的滤袋迅速放入干燥器中冷却至室温，然后称重记作 m_5 。将第二次洗涤后袋中剩余的样品干重记作 $m_7 = (m_5 - (m_1 \times C_1 \times C_2))$ ，将第二次洗涤后的空白滤袋质量记作 m_6 ，空白袋子校正系数设为 C_3 ，并将其继续做空白测定。

将第二次洗涤后的样品滤袋放入到 3 L 烧杯中，并加入 250 mL 72% 硫酸，确保将滤袋完全浸没浸没，此时的滤袋必须完全干燥，并且冷却至室温后才能加入浓硫酸，如果滤袋中存在水分，会使浓硫酸遇水后产生大量的热，这样将容易氧化袋子中的样品，使样品如同烧焦一般，最终影响其测定结果。将 1 L 烧杯套放到 3 L 烧杯中，下压 1 L 烧杯使滤袋完全浸没，然后上提 1 L 烧杯使滤袋上下搅拌，将 1 L 烧杯上下提压重复 30 次，用时约 30 分钟，之后，静置 3 小时。

静置完成后将硫酸倒掉并用去离子水冲洗除掉浓酸，直到将其淋洗至 pH 为中性，然后用 250 mL 丙酮淋洗 3 分钟以除掉去离子水，然后取出滤袋并轻轻挤压去掉多余的丙酮，并将滤袋在通风橱中自然干燥 24 小时，待完全干燥后将其放入到 105 ℃ 烘箱烘干 3 小时，放入烘箱前要确保丙酮完全挥发掉，防止丙酮在烘箱中爆破。烘干后的滤袋迅速放入干燥器中冷却至室温，然后称重记作 m_8 。

样品中的中性洗涤纤维其质量分数 $NDF(\%) = (m_2 - (m_1 \times C_1)) \times 100 / m$ ，中性洗涤纤维主要包括纤维素、半纤维素、木质素和灰分，其中： m_1 为空袋质量； m 为样品质量； m_2 为提取处理后样品残渣+滤袋质量； C_1 为空白袋子校正系数=烘干后质量 m_3 /原来质量 m_0 ；所有质量单位均为 g。

样品中的酸性洗涤纤维其质量分数 $ADF(\%) = (m_5 - (m_1 \times C_1 \times C_2)) \times 100 / m_4$ ，酸性洗涤纤维主要包括木质素、纤维素和灰分，其中： m_4 为样品质量； m_5 为提取处理后样品残渣+滤袋质量； C_2 为空白袋子校正系数=烘干后质量 m_6 /原来质量 m_3 ；所有质量单位均为 g。

样品中的酸性洗涤木质素其质量分数 $ADL(\%) = (m_8 - (m_1 \times C_1 \times C_2 \times C_3)) \times 100 / m_7$ ，酸性洗涤木质素主要包括灰分和木质素，其中： m_8 为提取烘干后滤袋+样品质量； C_3

为空白袋子校正系数=烘干后质量 m_9 /原来质量 m_6 ; m_7 为样品质量; 所有质量单位均为 g。

由此可计算得到, 半纤维素(%)=NDF (%) - ADF (%) * NDF (%); 纤维素(%)=ADF (%) * NDF (%) - ADL (%) * ADF (%) * NDF (%)

2.5.6 纤维素酶的测定

首先, 称取 50 mg Whatman NO.1 滤纸条, 剪成长 1cm 宽 6cm 的纸条, 卷好后放入试管中, 并加入 1.0 mL 0.05M 的柠檬素酸缓冲液, 确保淹没滤纸卷; 然后, 将试管放入到 50 °C 水浴锅中预热 5 分钟, 接着加入纤维素酶液 0.5 mL 混匀, 纤维素酶液事先用 0.05 M 柠檬酸缓冲液适当稀释, 稀释倍数需摸索, 每个稀释度下做一组平行。同时, 做三组对照, 分别是底物空白对照、背景空白对照和酶空白对照, 做法如下: 向一试管加 50 mg 滤纸和 1.5 mL 柠檬酸缓冲液做底物空白对照; 向另一试管加 1.5 mL 柠檬酸缓冲液做背景空白对照; 向一组试管, 加入 1.0 mL 柠檬酸缓冲液和对应于稀释倍数的稀释酶液 0.5 mL 做酶空白对照。最后, 将所有试管在 50 °C 水浴锅中保温酶解 60 分钟, 之后将试管取出, 并迅速加入 3.0 mL DNS 试剂, 摇匀终止反应, 并在沸水浴中煮沸 5 分钟, 然后在冰水浴中迅速冷却, 使酶失活, 最后用比色法在 540 nm 测定试管中的吸光值, 并用葡萄糖标准曲线折算出葡萄糖浓度, 对照以 200 μ L 显色液和 2.5 mL 去离子水混匀后为准。

纤维素酶活的计算过程, 首先计算获得各试管中产生的葡萄糖的浓度 (mg/0.5mL), 然后以所产生的葡萄糖浓度为横坐标, 酶的稀释度为纵坐标计算出产生 2 mg 葡萄糖时的纤维素酶的浓度, 在根据公式计算出酶活大小。酶活(FPU/mL)=0.37/产生 2.0mg 葡萄糖时的酶浓度

2.6 油脂得率的计算

油脂产量 = ($\rho \times$ [油脂]) / ([发酵液] \times (1-[固含量]));

油脂基于干秸秆的得率 = ([油脂产量] \times [发酵醪]) / [秸秆]

其中, [油脂]是样品中所含油脂的质量, 单位 g; [发酵液]是样品的质量, 单位 kg; [固含量]是反应体系的固体含量; [发酵醪]是发酵体系总体积, 单位 L; [秸秆]是发酵体系总干秸秆的质量, 单位 kg; ρ 为水的密度, 约为 1.0 kg/L; 油脂产量是单位体积发酵液中油脂的质量, 单位 g/L; 油脂基于干秸秆的得率是单位质量干玉米秸秆中油脂的质量, 单位 g/kg。

第 3 章 实验结果与讨论

3.1 玉米秸秆水解液分步糖化发酵和同步糖化发酵的比较

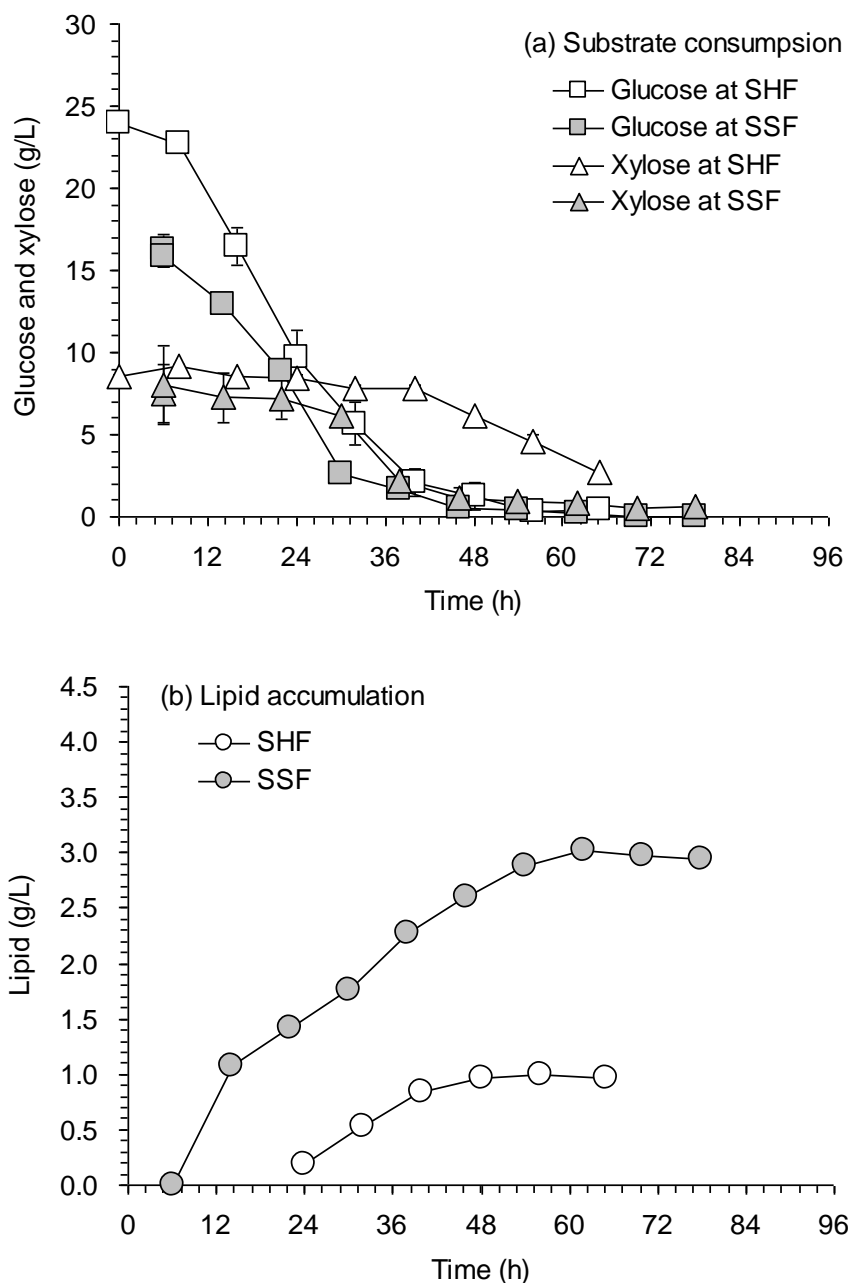


图 3.1 水解液发酵和同步糖化发酵对微生物产油的影响 (a) 底物的消耗 (b) 油脂的积累

Fig. 3.1. Comparison of SHF and SSF for microbial lipid fermentation. (a) Substrate consumption; (b) Lipid accumulation.

水解液油脂发酵和同步糖化与油脂发酵的发酵方式不同。水解液油脂发酵需要进行两个步骤，即原料糖化工段和水解液发酵工段。其中，原料糖化过程酶解温度 50°C，初始纤维素酶加量为 7.0 FPU/g DM，搅拌转速 300 rpm，酶解时间 48 h。产生的糖化醪在 10000 rpm 转速下离心 10 分钟，获得上清液，115 °C 下灭菌 20 分钟，经定性滤纸过滤后获得水解液。水解液发酵过程发酵温度 30°C，pH 值 5.0，发酵时间 65 h。同步糖化与发酵生产微生物油脂过程预酶解时间为 6 h，预酶解温度 50°C，pH 值 4.8，初始纤维素酶加量为 7.0 FPU/g DM，硫酸铵浓度 0.5 g/L，预酶解结束时葡萄糖浓度为 16.92 g/L。然后，将温度降至 30°C 并接入皮状丝孢酵母，开始同步糖化与发酵。从图 6 可以看出，水解液发酵和同步糖化与油脂发酵过程，葡萄糖均随着发酵时间的延长而迅速降低，当葡萄糖浓度低于木糖浓度时，木糖开始被皮状丝孢酵母利用；并伴随着油脂浓度的逐步累积。在发酵 65 h 和 60 h 后，分步糖化发酵和同步糖化发酵过程发酵液中油脂含量分别为 0.97 和 3.03 g/L，基于干秸秆的得率分别为 6.43 和 10.04 g/kg，酶解糖化工段和发酵工段总时间分别为 113h 和 66h。实验表明，同步糖化比分步糖化发酵具有较好的优势，不仅提高了油脂的产量和基于干秸秆的得率，而且缩短了整个糖化与发酵过程的时间。

3.2 10%固含量下同步糖化发酵中发酵条件的优化

3.2.1 预糖化时间对同步糖化发酵产油的影响

根据同步糖化与油脂发酵过程不同阶段温度的不同，可以将同步糖化与发酵过程分为两个阶段，即预酶解阶段（50°C）和同步糖化与发酵阶段（30°C）。由于碳氮比对微生物油脂的发酵影响很大，因此，我们首先研究了不同的初始糖浓度（葡萄糖和木糖），即不同的预酶解时间对同步糖化与微生物油脂发酵过程的影响。

表 3.1 不同预糖化时间对同步糖化产油的影响

Table 3.1. Effects of prehydrolysis time on the lipid accumulation in SSF

	Prehydrolysis time (hours)				
	0	6	12	18	24
Initial glucose (g/L)	3.19	16.92	23.00	25.57	27.32
Xylose (g/L)	3.92	6.31	6.74	5.57	7.10
Lipid concentration (g/L)	2.95	3.03	2.85	2.50	2.79

从图 3.2a 可以看出，在 10% 的固体含量下进行同步糖化与微生物油脂发酵，在 50°C 的条件下分别预酶解 0 h、6 h、12 h、18 h 和 24 h，预酶解结束时葡萄糖浓度分别为 3.19 g/L、16.92 g/L、23.00 g/L、25.57 g/L、27.32 g/L。预酶解时间越长，开始发酵时体系的糖浓度越高。然后将温度降至 30°C 并接入皮状丝孢酵母开始同步糖化与发酵，发酵体系的葡萄糖随着发酵时间的延长而迅速降低，当葡萄糖浓度低于木糖浓度时，木糖开始

被皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 利用，同时，伴随着油脂浓度的逐步累积。

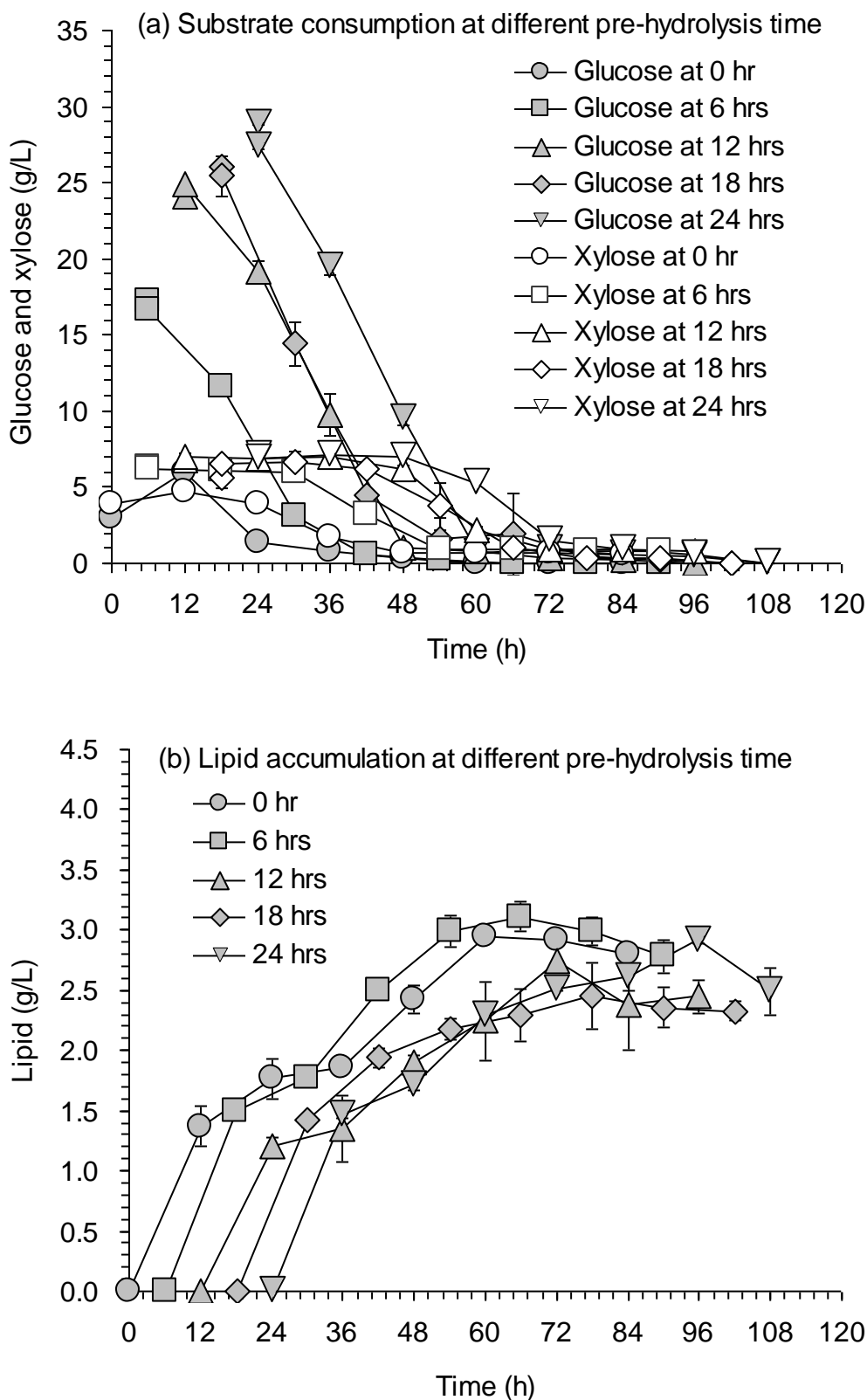


图3.2 不同预酶解时间对同步糖化发酵产油过程的影响 (a) 底物的消耗 (b) 油脂的积累

Fig. 3.2. Effect of prehydrolysis time on the lipid accumulation in SSF. (a) Substrate consumption; (b) Lipid accumulation.

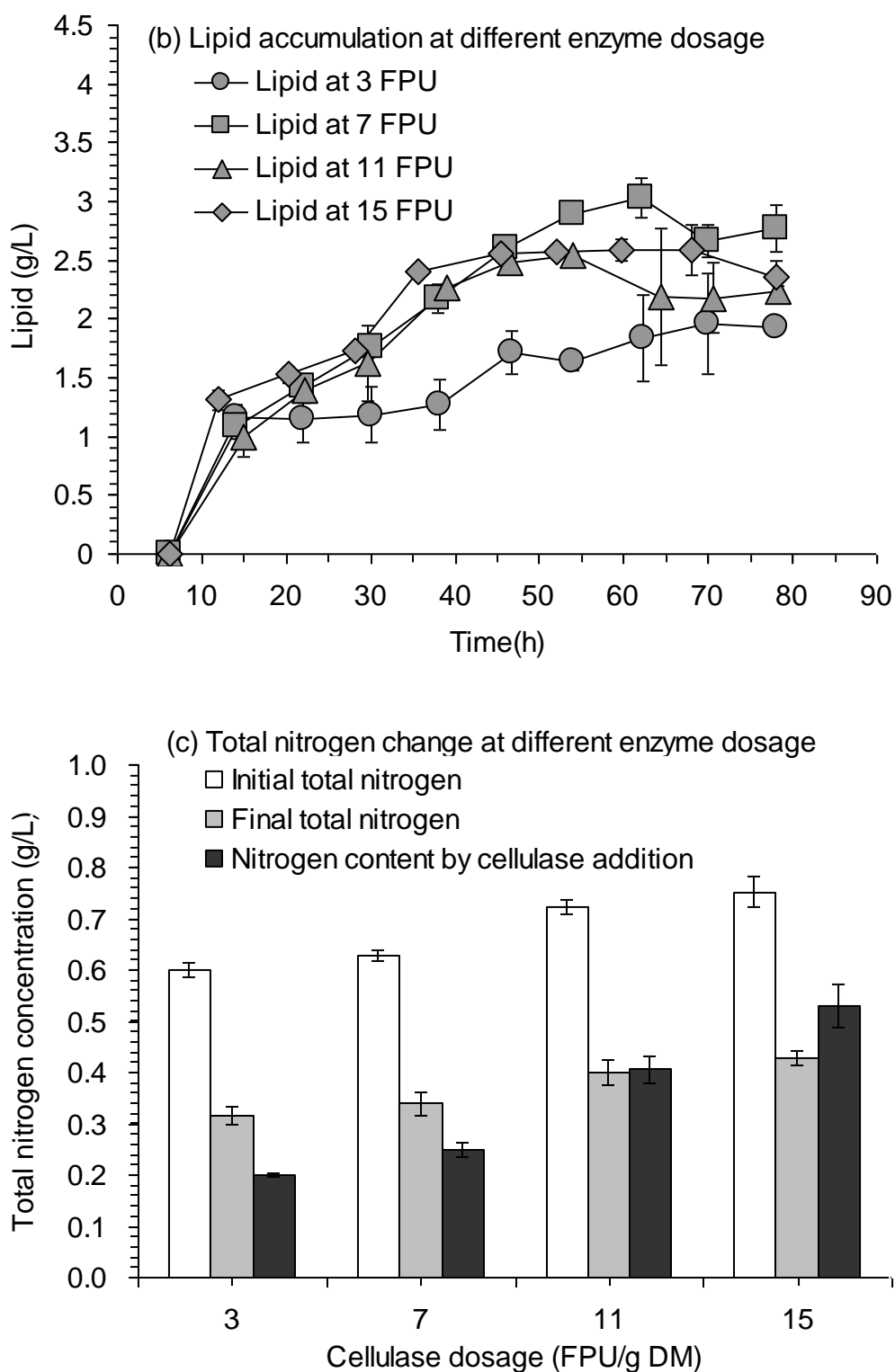


图3.3 不同纤维素酶加量对同步糖化发酵产油过程的影响 (a) 底物的消耗 (b) 油脂的积累 (c) 总氮的变化

Fig. 3.3. Effect of cellulase enzyme dosage on lipid accumulation in SSF. (a) Substrate consumption; (b) Lipid accumulation; (c) Total nitrogen change.

从图 3.3a 可以看出, 在 10% 的固体含量下进行同步糖化与油脂发酵, 在预酶解温度 50°C, 预酶解时间 6 h, pH 值 4.8, 初始纤维素酶加量分别为 3.0 FPU/g DM、7.0 FPU/g DM、11.0 FPU/g DM 和 15.0 FPU/g DM 条件下, 预酶解结束时葡萄糖浓度分别为 10.90, 16.31, 18.64, 21.65 g/L (见表 3.2), 纤维素酶加量越多, 开始发酵时体系的糖浓度越高。然后, 将温度降至 30°C 并接入皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 开始同步糖化与发酵。发酵体系的葡萄糖随着发酵时间的延长而迅速降低, 当葡萄糖浓度低于木糖浓度时, 木糖开始被皮状丝孢酵母利用; 同时, 伴随着油脂浓度的逐步累积。从图 3.3b 可以看出, 发酵 60h 后, 发酵液中油脂含量分别为 1.95 g/L、3.03 g/L、2.56 g/L 和 2.13 g/L (见表 3.2)。初始酶加量为 7.0 FPU/g DM 的同步糖化与发酵体系较有利于油脂的积累。由于不同的纤维素酶加量导致发酵初始时的葡萄糖浓度不同, 而由不同预糖化时间的实验可知不同的葡萄糖初始浓度对酵母产油发酵是有影响的, 因此, 不同纤维素酶加量首先产生了底物对产物的抑制作用。其次, 不同的纤维素酶加量导致酶解速度不同不同的酶解速度代表着不同的葡萄糖释放速度, 当葡萄糖释放速度低于菌体最大摄取葡萄糖的速度时, 将影响菌体代谢的快慢。由于, 葡萄糖释放速度与菌体最大摄取葡萄糖的速度是一个动态平衡的关系, 因此, 如何是这两个速度达到合适是另一个关键因素, 在酶加量 7.0 FPU/g DM 时, 葡萄糖释放速度与菌体最大摄取葡萄糖的速度最适合, 所以, 油脂积累量最大, 为不同的纤维素酶加量所产生的效果正是这两种因素叠加的效果。

表 3.2 不同纤维素酶加量对同步糖化产油的影响

Table 3.2. Effects of cellulase enzyme dosage on the lipid accumulation in SSF

	Cellulase enzyme dosage (FPU/g DM)			
	3	7	11	15
Initial glucose (g/L)	10.90	16.31	18.64	21.65
Xylose (g/L)	7.08	7.47	6.67	11.51
Lipid concentration (g/L)	1.95	3.03	2.56	2.13
Initial total nitrogen (g/L)	0.60	0.63	0.72	0.75
Final total nitrogen (g/L)	0.32	0.35	0.41	0.43
Nitrogen content by cellulose addition (g/L)	0.20	0.25	0.40	0.53

图 3.3c 可以看出, 在纤维素酶加量为 3.0, 7.0, 11.0 和 15.0 FPU/g DM 时, 反应体系中纤维素酶所含总氮量为 0.20, 0.25, 0.40 和 0.53 g/L (见表 3.2), 发酵初始时的总氮量为 0.60、0.63、0.72 和 0.75 g/L (见表 3.2), 发酵结束时的总氮量为 0.32, 0.35, 0.41 和 0.43 g/L (见表 3.2), 因此, 发酵过程所利用的总氮量为 0.28, 0.28, 0.31 和 0.31 g/L。随着纤维素酶加量的升高, 纤维素酶所含总氮量迅速从 0.20 g/L 增加至 0.53 g/L, 但是发酵过程中所利用的总氮量增加幅度不明显, 在 0.30±0.02 g/L 范围内。实验间接表明,

在发酵过程中,纤维素酶并没有作为氮源被菌体利用。通过加大纤维素酶用量可以从秸秆中释放出更多的氮源,但增加量从 0.28 g/L 至 0.31 g/L,仅增加了 0.03 g/L。因此,纤维素酶加量的变化主要影响同步糖化与发酵过程的初始葡萄糖浓度和葡萄糖的释放速度,但是,对整个体系总糖和对氮源的释放量影响有限,基本不改变过程中的碳氮比。

3.2.3 硫酸铵加量和溶氧水平对同步糖化发酵产油的影响

由于不同溶氧水平能够影响同步糖化与发酵阶段的菌体生长状况,进而影响同步糖化发酵产油量,因此,我们研究了不同溶氧水平对同步糖化与油脂发酵过程的影响。从表 3.3 可以看出,在 10%的固体含量下进行同步糖化与油脂发酵,在预酶解温度 50°C,预酶解时间 6 h, pH 值 4.8,初始纤维素酶加量为 7.0 FPU/g DM 条件下,预酶解时间和酶添加量都相同,所以预酶解结束时葡萄糖浓度分别为 18.22,16.16,17.66,16.28 g/L,开始发酵时体系的糖浓度基本在 16-18 g/L 之间。然后,将温度降至 30°C 并接入皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1,开始同步糖化与发酵。发酵体系的葡萄糖随着发酵时间的延长而迅速降低,当葡萄糖浓度低于木糖浓度时,木糖开始被皮状丝孢酵母利用;同时,伴随着油脂浓度的逐步累积。从表 3.3 中可以看出,发酵 60h 或 72h 后,溶氧水平从 10%到 30%,发酵液中油脂含量分别为 2.86, 3.27, 2.75 g/L。溶氧水平为 40%时,同步糖化发酵产油过程无法彻底进行,因为溶氧水平过高导致在较多固体残渣存在的情况下出现气溶胶的现象,产生的大量泡沫冲罐而终止实验进行。溶氧水平为 20%的同步糖化与发酵体系较有利于油脂的积累,但是不同溶氧水平对同步糖化发酵产油量影响并不明显,主要原因是皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 是一种兼性厌氧酵母,它在较低的溶氧水平下仍能够正常生长。

由于不同硫酸铵浓度能够影响同步糖化与发酵阶段的总氮含量,进而影响碳氮比的变化,因此,我们研究了不同硫酸铵浓度对同步糖化与油脂发酵过程的影响。从表 3.3 可以看出,在 10%的固体含量下进行同步糖化与油脂发酵,在预酶解温度 50°C,预酶解时间 6h, pH 值 4.8,初始纤维素酶加量为 7.0 FPU/g DM 条件下,预酶解结束时葡萄糖浓度分别为 16.10,16.92,17.12,16.56 g/L,开始发酵时体系的糖浓度基本在 16-17 g/L 之间。然后,将温度降至 30°C 并接入皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1,同时加入 300 g/L 硫酸铵母液,使发酵液硫酸铵浓度至 0, 0.5, 1.0 和 5.0 g/L,开始同步糖化与发酵。发酵体系的葡萄糖随着发酵时间的延长而迅速降低,在硫酸铵浓度 0 g/L 时,由于反应体系缺乏可快速利用的氮源,葡萄糖消耗速度较慢,使发酵时间增加 12h。当葡萄糖浓度低于木糖浓度时,木糖开始被皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 利用;同时,伴随着油脂浓度的逐步累积。从表 3.3 中可以看出,发酵 60 h 或 72 h 后,发酵液中油脂含量分别为 2.98, 3.03, 2.70 和 1.36 g/L。硫酸铵浓度为 0.5 g/L 的同步糖化与发酵体系较有利于油脂的积累。主要原因是初始硫酸铵浓度不同导致同步糖化与发酵阶段的碳氮比不同。由于秸秆中含有一定的氮源使得不添加硫酸铵时的碳氮比低于最适碳氮比,而随着硫酸铵浓度的增加,碳氮比逐渐降低,进一步低于最适碳氮比,最终使油脂积累逐渐降低。

表 3.3 不同溶氧水平和硫酸铵加量对同步糖化产油的影响

Table 3.3. Effects of dissolved oxygen level and nitrogen addition on the lipid accumulation in SSF

	Dissolved oxygen (%) [#]				(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)			
	10	20	30	40	0.0	0.5	1.0	5.0
Initial glucose (g/L)	18.22	16.16	17.66	16.28	16.10	16.92	17.12	16.56
Xylose (g/L)	7.32	6.72	7.50	7.02	6.46	6.23	7.21	7.05
Lipid concentration (g/L)	2.86	3.27	2.75	/	2.98	3.03	2.70	1.36
Lipid yield (g/100g sugar)	6.92	8.02	6.62	/	7.36	7.53	6.55	3.31

[#]表示在40%溶氧水平下，同步糖化发酵产油过程无法彻底进行，因为溶氧水平过高导致在较多固体残渣存在的情况下出现气溶胶的现象，产生的大量泡沫冲罐而终止实验进行。在上述实验过程中，预糖化阶段的条件为50℃，pH4.8，预糖化时间为6小时，纤维素酶加量为7.0 FPU/g 干物质；同步糖化发酵阶段的条件为(NH₄)₂SO₄, 0-5.0g/L; MgSO₄, 0.5g/L; 30℃, DO 10-40%, pH5.0

[#]At the 40% of dissolved oxygen saturation, the SSF could not continue because of the foam formation from the 38 hours. Prehydrolysis conditions: 50℃, pH4.8, prehydrolysis time 6h, Accellerase 1000 dosage at 7.0 FPU/g DM. SSF conditions: (NH₄)₂SO₄, 0-5.0g/L; MgSO₄, 0.5g/L; 30℃, DO 10-40%, pH5.0.

3.2.4 不同固含量对同步糖化发酵产油的影响

由于不同固含量能够影响同步糖化与发酵阶段的总碳源量，在氮源不变的情况下，将影响碳氮比的变化，因此，我们研究了不同固含量对同步糖化与油脂发酵过程的影响。从图 3.4 可以看出，分别在 10%和 15%的固体含量下进行同步糖化与油脂发酵，在预酶解温度 50℃，预酶解时间 6h 和 12h，pH 值 4.8，初始纤维素酶加量为 7.0 FPU/g DM，硫酸铵加量为 0.5 g/L 条件下，预酶解结束时葡萄糖浓度分别为 16.92 和 24.28 g/L，然后，将温度降至 30℃ 并接入皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1，开始同步糖化发酵。

发酵体系的葡萄糖随着发酵时间的延长而迅速降低，当葡萄糖浓度低于木糖浓度时，木糖开始被皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 利用；同时，伴随着油脂浓度的逐步累积。从图 3.4 中可以看出，发酵 60 h 和 132 h 后，发酵液中油脂含量分别为 3.03 和 4.02 g/L。随着固含量的增加油脂产量也进一步增长，但是，发酵时间也随之延长。在 10%和 15%固含量下，油脂产率分别为 1.212 g/L/d 和 0.731 g/L/d，随着固含量的增加油脂产率反而降低。随着固含量的增加，通气条件下同步糖化发酵反应体系中氧的传递更加困难，即使降低通气量，发酵体系产生泡沫的风险也加大，当进一步提高固含量到 20%时，好氧发酵彻底不能进行。因此，如何在高固含量下实现好氧产油发酵仍是一个难题。

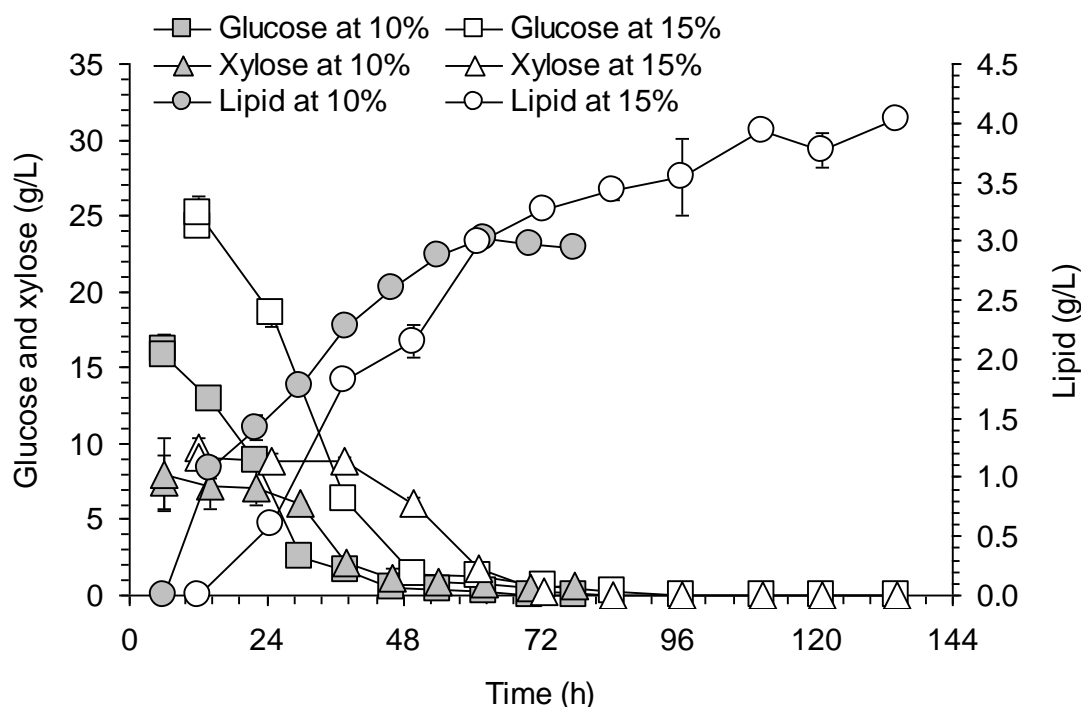


图 3.4 不同固含量下同步糖化发酵产油过程的比较

Fig. 3.4. Effect of solids loading on lipid accumulation in SSF

3.3 在 50 L 反应器中同步糖化发酵的放大

在不同的反应器尺寸下，利用预处理脱毒后的物料进行同步糖化发酵产油可以有效的考察反应器尺寸放大对发酵过程的影响。从图 3.5 可以看出，在 10% 固体含量下进行同步糖化与油脂发酵，在预酶解温度 50°C，预酶解时间 6 h 和 12 h，pH 值 4.8，初始纤维素酶加量为 7.0 FPU/g DM，硫酸铵加量为 0.5 g/L，硫酸镁加量为 0.5 g/L 条件下，5 L 和 50 L 反应器中，预酶解结束时葡萄糖浓度分别为 16.92 g/L 和 21.41 g/L，然后，将温度降至 30°C 并接入皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1，开始同步糖化与发酵。

发酵体系的葡萄糖随着发酵时间的延长而迅速降低，当葡萄糖浓度低于木糖浓度时，木糖开始被皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 利用；同时，伴随着油脂浓度的逐步累积。从图 3.5 中可以看出，发酵 60 h 后，发酵液中油脂含量分别为 3.03 g/L 和 3.23 g/L，5 L 和 50 L 反应器所用的搅拌桨均为六平直叶搅拌桨，但是 50 L 反应器为双层搅拌桨，而 5 L 反应器为单层搅拌桨。因此，从糖化结果上来看，50 L 反应器中更利于混合，糖化效果要好，从发酵结果来看，产油量差别不大。因此，对于此反应体系，在放大后仍能实现较好的传质和传热过程。

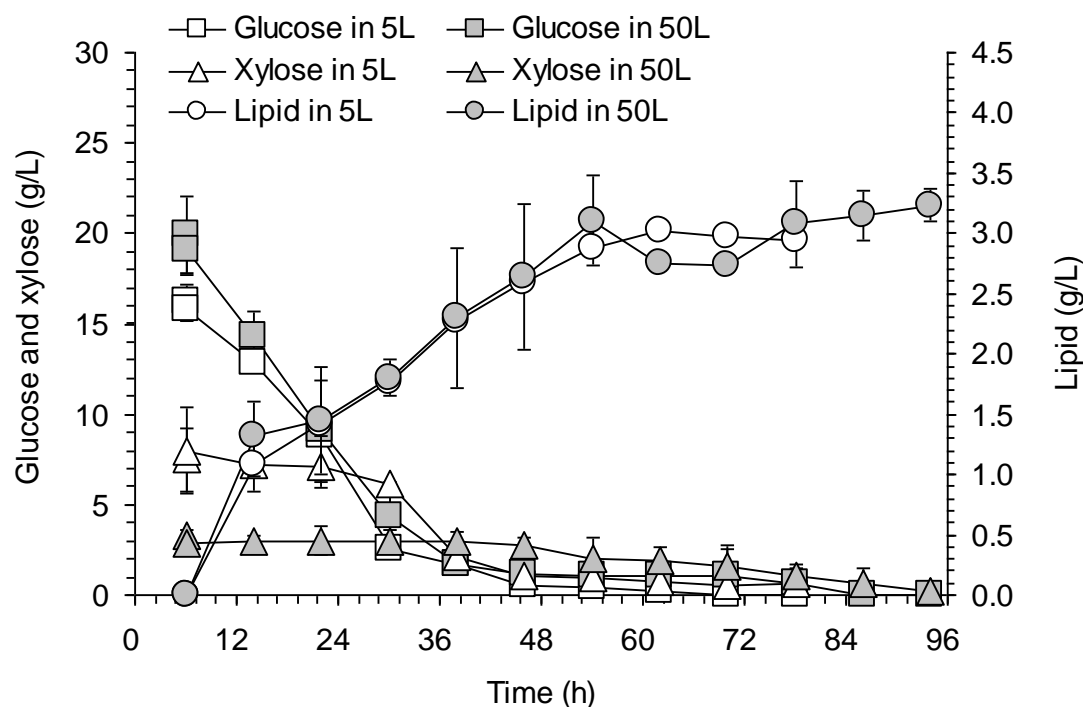


图 3.5 50 L 发酵罐中同步糖化发酵产油过程的表现

Fig. 3.5. SSF of microbial lipid in the 50 L bioreactor

3.4 纤维素酶的循环利用

纤维素酶的成本是制约利用木质纤维素生产生物燃料的关键，因此，如何有效的节约纤维素酶的使用，使纤维素酶能够循环利用，成为一个重要的研究方向。在利用预处理脱毒后的玉米秸秆物料进行同步糖化发酵产油的过程中，由于酵母油脂存在于细胞内，因此油脂的提取过程首先要进行固液分离，将皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 菌体收获，继而对菌体进行破壁提取油脂。与同步糖化发酵产乙醇相比，乙醇蒸馏过程温度远远超过 50°C，所以发酵醪中的纤维素酶被破坏，失去活性而无法回收，但是提取油脂过程首先要在较低温度下进行固液分离所以理论上可以回收大量的纤维素酶。从图 3.6b 可以看出，回收的发酵醪上清液再进行玉米秸秆的糖化，其相对酶活在 3-4 FPU/g 干物质之间，相当于回收了 7 FPU/g 干物质酶活的 40-60%之间。之所以，纤维素酶活没有全部回收是因为离心下来的固体残渣中存在着大量的木质素，而木质素对纤维素酶中的内切酶和外切酶有非常强的吸附能力，因此，会有大部分的内切酶和外切酶进入到固体残渣中。

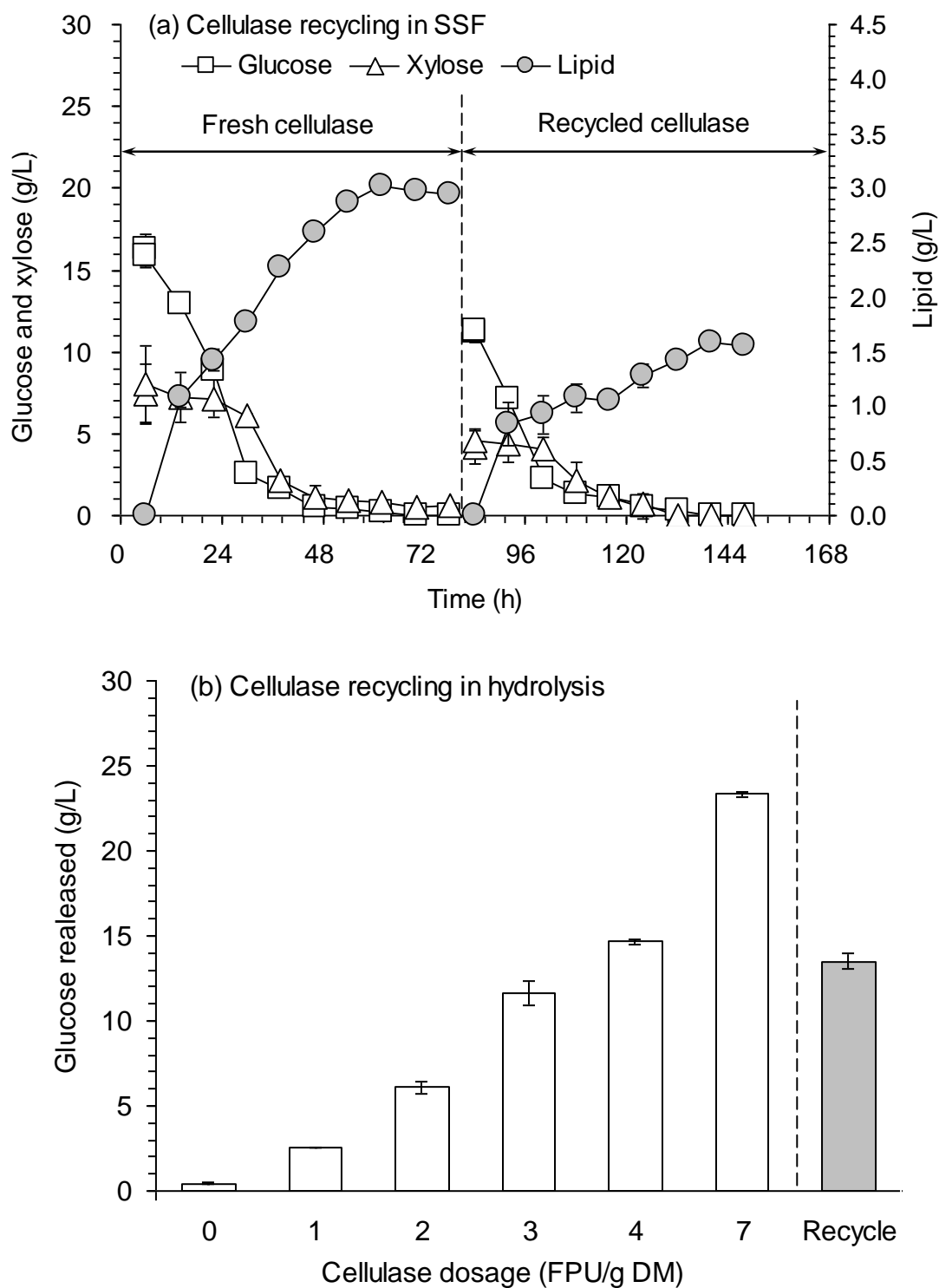


图 3.6 在同步糖化发酵过程中纤维素酶的循环使用 (a) 回收纤维素酶在同步糖化发酵过程中的表现
(b) 回收纤维素酶糖化效果

Fig. 3.6 Cellulase enzyme recycling in SSF.

(a) Cellulase recycling in SSF; (b) Cellulase recycling in hydrolysis.

从图 3.6a 可以看出, 在 10% 固体含量下进行同步糖化与油脂发酵, 在预酶解温度 50°C, 预酶解时间 6 h, pH 值 4.8, 初始纤维素酶加量为 7.0 FPU/g DM, 硫酸铵加量为 0.5 g/L, 硫酸镁加量为 0.5 g/L 条件下, 预酶解结束时葡萄糖浓度分别为 16.92 g/L, 然后, 将温度降至 30°C 并接入皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1, 开始同步糖化与发酵。发酵体系的葡萄糖随着发酵时间的延长而迅速降低, 当葡萄糖浓度低于木糖浓度时, 木糖开始被皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 利用; 同时, 伴随着油脂浓度的逐步累积。发酵 60 h 后, 发酵液中油脂含量为 3.03 g/L。之后将发酵醪液取出, 在转速 4000 rpm 下, 离心 3 分钟, 将上清液直接不经灭菌, 直接作为水和酶加入到灭过菌的发酵罐中, 进行第二轮同步糖化发酵。

在 10% 固体含量下进行同步糖化与油脂发酵, 在预酶解温度 50°C, 预酶解时间 6 h, pH 值 4.8, 硫酸铵加量为 0.5 g/L, 硫酸镁加量为 0.5 g/L 条件下, 预酶解结束时葡萄糖浓度为 11.32 g/L, 然后, 将温度降至 30°C 并接入皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1, 开始同步糖化与发酵。发酵体系的葡萄糖随着发酵时间的延长而迅速降低, 当葡萄糖浓度低于木糖浓度时, 木糖开始被皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 利用; 同时, 伴随着油脂浓度的逐步累积。发酵 60 h 后, 发酵液中油脂含量为 1.57 g/L。

首先, 回收酶的同步糖化发酵过程预糖化 6 h 后, 发酵初始时葡萄糖浓度降低, 发酵产油量减少, 首先是由于回收的相对酶活减少, 同时, 也有可能前一次发酵产生了代谢废物对第二次发酵过程产生了一定的抑制。但是, 总体而言对同步糖化发酵后进行纤维素酶的回收使用还是有效果的。下一步可以继续研究离心后上清液中各种纤维素酶的组分变化情况, 并依据变化情况回补相应的组分, 使其达到最初的效果。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

本课题尝试了利用预处理脱毒后的玉米秸秆物料进行同步糖化发酵产油的过程，并对同步糖化发酵方式和水解液发酵方式进行了比较，本课题证明了同步糖化发酵方式有利于皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 积累油脂。另外，本课题还对同步糖化发酵产油进行了优化，获得了最佳的产油条件，还对同步糖化发酵产油在 5 L 和 50 L 规模进行了验证，并且解决了在低固含量下的氧气传递过程。最后，本课题还对纤维素酶进行了回收尝试，并且回收纤维素酶也达到了一定的效果。

(1) 利用预处理和脱毒后的玉米秸秆物料进行分步糖化发酵和同步糖化发酵两种发酵方式进行油脂生产，结果表明，无论是从油脂产量还是从油脂产率上同步糖化发酵都占有明显的优势，可以说同步糖化发酵明显地提高了碳氮比，进而影响了油脂产量，另外，节省了糖化和发酵两个工序的总时间，提高了油脂的产率。

(2) 对低固含量下同步糖化发酵各发酵参数进行优化，可以获得在 10% 固含量下的最优产油量，通过不同的预糖化时间，不同的纤维素酶加量，不同的硫酸铵加量以及不同的溶氧水平的优化，最终获得了预糖化 6 h，纤维素酶加量 7 FPU/g DM，硫酸铵加量 0.5 g/L，溶氧水平 20%。

(3) 尝试提高固含量进行同步糖化发酵，将固含量从 10% 提高到 15%，油脂产量得到了进一步的提高，但是发酵周期延长，最终同步糖化发酵的产率有所降低。另外，随着固含量的提高，发酵体系中氧气的传递效果变差，随着发酵的进行，发酵醪液泡沫不断增加，冲罐风险加大，在较低的通气量下才能实现同步糖化发酵的正常进行。但是，随着固含量进一步的增加，在高固含量下进行好氧发酵出现了不可进行的困难。

(4) 对同步糖化发酵后的发酵醪液进行纤维素酶回收使用，通过离心获得的发酵液反补回下一批的发酵体系中作为水和酶，经过糖化评价，回收的纤维素酶相对酶活大约有 3-4 FPU/g DM，大约回收了 40%-50%，将其再利用进行发酵，仍可产油，但是，产油量大幅降低仅有原产量的一半。

(5) 通过对同步糖化发酵的放大，初步考察了 50 L 发酵规模的表现，结果表明，与 5 L 规模相比，50 L 规模下同步糖化发酵从油脂产量上相差不大，但是发酵时间要稍有延长，油脂产率有所降低。

4.2 展望

目前本课题中虽然实现了产油,但是皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 积累油脂的含油率还是很低,且基于糖的得率在 0.10 左右,仍然很低,离理论得率 0.32 相差还很大。另外,如何进一步在更高的固含量下进行产油发酵是实现利用玉米秸秆产油的必然要求,同时如何提高玉米秸秆的葡萄糖释放量,脱除玉米秸秆中的氮源,提高 C/N 也将是酵母产油的关键。

(1) 同步糖化发酵产油过程皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 的含油率还较低,大约在 20%-30%之间,与报道的 40%-50%含油率的其他产油酵母相比较低。因此,要提高皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 在同步糖化发酵体系下的含油率。

(2) 从糖转化到油脂的理论油脂得率为 0.32-0.33,目前同步糖化发酵产油过程皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 基于糖的得率在 0.10 左右,目前报道的产油酵母的基于底物油脂得率约为 0.22 左右,因此,要提高皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1 在同步糖化发酵体系下的油脂得率。

(3) 碳氮比是提高菌体含油率的关键,如何提高同步糖化发酵中的固含量,提高碳源浓度,是实现玉米秸秆同步糖化发酵产油过程工业化的必然要求。

(4) 研究在高固含量下好氧发酵的特性,设计开发能够实现高溶氧水平下的螺带桨反应器,是提高油脂产量的需要。

(5) 研究纤维素酶在发酵结束后的回收利用,进一步研究纤维素酶各组分在发酵结束后发酵醪固体和液体中变化,来实现纤维素酶回收的最大化。

(6) 玉米秸秆的同步糖化发酵产胞内油脂过程是一个自身的发酵特点,因此,通过模拟计算 5 L 和 50 L 发酵罐中的传质传热过程,确定放大过程中各工程参数的放大准则,也是实现玉米秸秆的同步糖化发酵产胞内油脂工业化的必然要求。

参考文献

- [1] 刘爱兵, 刘星剑. 生物质能的利用现状及展望. 江西林业科技. 2006, (4): 37-40
- [2] 蒋剑春. 生物质能源应用研究现状与发展前景. 林产化学与工业. 2002, 22(2): 75-80
- [3] 罗承先. 世界生物乙醇产业发展现状. 中国石化. 2007, (12): 43-45
- [4] 张扬健, 向威达, 周涛, 雷家辅. 我国燃料乙醇发展现状和趋势分析. 中国能源. 2009, (1): 31-33
- [5] 龚德词. 生物乙醇的生产与发展. 当代化工. 2009, (2): 178-181
- [6] Lynd, L.R., Elander, R.L., Wyman, C.E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. Appl. Biochem Biotechnol. 1996, (57/58): 741-761.
- [7] 王晓娟, 王斌, 冯浩, 李志义. 木质纤维素类生物质制备生物乙醇研究进展. 石油与天然气化工. 2007, (6):452-461
- [8] Wyman, C.E., Spindler, D.D., and Grohmann, K. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. Biomass. Bioenergy. 1992, 3(5):301-307
- [9] 钱伯章, 朱建芳. 纤维素乙醇发展前景和我国的进展. 化学工业. 2009, 10: 13-16
- [10] Hinman, N.D., Schell, D.J., Riley, C.J., Bergeron, P.W., and Walter, P.J. Preliminary estimate of the costs of ethanol production for SSF technology. Appl. BioChem. Biotechnol. 1992, 1(34/35): 639-649
- [11] Zhang, J., Chu, D.Q., Huang, J., Yu, Z.C., Dai, G.C., and Bao, J. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation at high corn stover solids loading in a Helical stirring Bioreactor. Biotchnol. Bioeng. 2010, 105(4):718-728
- [12] 刘波, 孙艳, 刘永红, 赵宗保; 产油微生物油脂生物合成与代谢调控研究进展; 微生物学报
- [13] 李建, 刘宏娟, 张建安, 刘建; 微生物油脂研究进展及展望; 现代化工
- [14] Tyson K S , Bozell J, Wallace R, et al . Biomass oil analysis: Research needs and recommendations[R] .NREL/TP510 34796, 2004.
- [15] Lin Hui , Cheng Wan, Ding Hai-tao , Chen Xue-jiao , Zhou Qi-fa , Zhao Yu-hua . Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. Bioresource Technology. 2010, 101, 7556–7562.
- [16] Feiyan Xue , Jinxin Miao , Xu Zhang , Tianwei Tan . A New Strategy for Lipid Production by Mix Cultivation of *Spirulina platensis* and *Rhodotorula glutinis*. Appl Biochem Biotechnol. 2010, 160:498–503.
- [17] Qiang Hu, Milton Sommerfeld, Eric Jarvis, Maria Ghirardi, Matthew Posewitz , Michael

- Seibert and Al Darzins. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*. 2008, 54, 621–639.
- [18] Lu-Jing Ren, He Huang, Ai-Hua Xiao, Min Lian, Li-Jing Jin, Xiao-Jun Ji. Enhanced docosaheptaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium sp.* HX-308. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2009, 32:837–843.
- [19] Siguo Wu, Cuimin Hu, Xin Zhao and Zongbao K. Zhao. Production of lipid from N-acetylglucosamine by *Cryptococcus curvatus*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010, 112, 727–733
- [20] Chen, X., Li, Z.H., Zhang, X.X., Hu, F.X., Ryu, D.D.Y., Bao, J. Screening of Oleaginous Yeast Strains Tolerant to Lignocellulose Degradation Compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159(3), 591-604.
- [21] Xue, F.Y., Miao, J.X., Zhang, X., Luo, H., Tan, T.W. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technology*. 2008, 99(13), 5923-5927.
- [22] Ch.N. Economou , A. Makri , G. Aggelis , S. Pavlou , D.V. Vayenas. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 1385–1388.
- [23] Emily R. Easterling, W. Todd French , Rafael Hernandez, Margarita Licha . The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis* . *Bioresource Technology*. 2009, 100 , 356–361.
- [24] Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2008a, 99(8), 3051-3056.
- [25] C. Ratledge. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*. 2004, 86(11):807-815
- [26] Chanika Saenge, Benjamas Cheirsilp, Thanwadee Tachapattaweawrakul Suksaroge and Thawien Bourtoom. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*. 2011, 46, 210–218.
- [27] Milan Certik, Jana Megova, Robert Horenitzky. Effect of nitrogen sources on the activities of lipogenic enzymes in oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1999, 45, 289–293 .
- [28] D'Elia, C., Steudler, P., Corwin, N. Determination of total nitrogen in aqueous samples using persulfate digestion. *Limnology and Oceanography*. 1977, 22(4), 760-764.
- [29] Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou, Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G. Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, 105(4),

1062-1070.

[30] Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226(1), 497-509.

[31] Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., Zhao, Z.K. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresour. Technol.* 2010.

[32] C.N. Economou, G. Aggelis, S. Pavlou, D.V. Vayenas. Modeling of Single-Cell Oil Production Under Nitrogen-Limited and Substrate Inhibition Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011, 108(5), 1049-1055

[33] Wu S, Hu C, Jin G, Zhao X, Zhao ZK. 2010. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour. Technol.* 101(15):6124-9.

[34] Higashiyama, K., Murakami, K., Tsujimura, H., Matsumoto, N., Fujikawa, S. 1999. Effects of dissolved oxygen on the morphology of an arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(4), 442-448.

[35] Zhanyou Chi, Yan Liu, Craig Frear, Shulin Chen. 2009. Study of a two-stage growth of DHA-producing marine algae *Schizochytrium limacinum* SR21 with shifting dissolved oxygen level. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:1141-1148.

[36] Pieter J. Verbelen, Sofie A. Depraetere, Joris Winderickx, Freddy R. Delvaux, Filip Delvaux. 2009. The influence of yeast oxygenation prior to brewery fermentation on yeast metabolism and the oxidative stress response. *FEMS Yeast Res* 9, 226-239.

[37] Hongwei Liu, Xin Zhao, Fangjun Wang, Xinning Jiang, Sufang Zhang, Mingliang Ye, Zongbao K. Zhao, Hanfa Zou, 2011. The proteome analysis of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *FEMS Yeast Res* 11, 42-51.

[38] Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K.M., Chen, S., 2011. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresour. Technol.* 102, 6134-6140.

[39] Huang, C., Zong, M.H., Wu, H., Liu, Q.P. 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresour. Technol.* 100, 4535-4538.

[40] Yonghong Li, Zongbao (Kent) Zhao, Fengwu Bai. 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 312-317.

[41] Xin Zhao, Siguo Wu, Cuimin Hu, Qian Wang, Yanyan Hua, Zongbao K. Zhao. 2010. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37(6):581-5.

- [42] Ren LJ, Ji XJ, Huang H, Qu L, Feng Y, Tong QQ, Ouyang PK. 2010. Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium sp.* Appl Microbiol Biotechnol. 87(5):1649-56.
- [43] Zhang J, Chu D, Huang J, Yu Z, Dai G, Bao J. 2010. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. Biotechnol Bioeng 105(4):718–728.
- [44] Zhang, J., Zhu, Z., Wang, X., Wang, N., Wang, W., Bao, J. 2010. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. Biotechnology for Biofuels, 3, 26.
- [45] Maohua Yang , Wangliang Li , Binbin Liu , Qiang Li , Jianmin Xing ,2010. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process . Bioresource Technology 101 , 4884–4888.
- [46] Kim Olofsson, Magnus Wiman, Gunnar Lidén.2010. Controlled feeding of cellulases improves conversion of xylose in simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production. Journal of Biotechnology 145, 168–175.
- [47] Yasser Elbahloul and Alexander Steinbuchel, 2010. Pilot-Scale Production of Fatty Acid Ethyl Esters by an Engineered *Escherichia coli* Strain Harboring the p(Microdiesel) Plasmid. Applied and Environmental Microbiology, 4560–4565.
- [48] Ren LJ, Ji XJ, Huang H, Qu L, Feng Y, Tong QQ, Ouyang PK. 2010. Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium sp.* Appl Microbiol Biotechnol. 87(5):1649-56.
- [49] Yonghong Li , Zongbao (Kent) Zhao, Fengwu Bai 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. Enzyme and Microbial Technology, 41,312–317.
- [50] Tu, M. B. Zhang, X. Paice, M. MacFarlane, P. Saddler, J. N. The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock. 2009. 100, 6407-6415
- [51] Zhu, Z. G. Sathitsuksanoh, N. Zhang, Y. H. P. 2009. Direct quantitative determination of adsorbed cellulase on lignocellulosic biomass with its application to study cellulase desorption for potential recycling. 134, 2267-2272
- [52] JL Guil-Guerrero, R. Navarro-Juárez, JC López-Martínez, P. Campra-Madrid, M.M. Reboloso-Fuentes. Functional properties of the biomass of three microalgal species. J Food Eng. 2004, 65(4):511-517
- [53] RA Andersen. Diversity of eukaryotic algae. Biodiversity and Conservation. 1992, 1(4):267-292
- [54] H. Iwamoto. Industrial Production of Microalgal Cell Mass and Secondary

- Products©\Major Industrial Species: Chlorella. 2004,
- [55] 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
- [56] O. Pulz, W. Gross. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biot.* 2004, 65(6):635-648
- [57] A. Steinbüchel, B. Fritsch. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol.* 1998, 16(10):419-427
- [58] MJ Abraham, RA Srinivasan. Lipid and fatty acid composition of selected fungi grown on whey medium. *J Food Sci.* 1984, 49(3):950-951
- [59] C. Ratledge. Single cell oils--have they a biotechnological future? *Trends Biotechnol.* 1993, 11(7):278-284
- [60] C Ratledge. Microbial oil and fats: an assessment of their commercial potential. *Pro. Ind Microbiol.* 1982, 16:119-206
- [61] 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
- [62] C.T. EVANS, C. RATLEDGE. Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Microbiology.* 1984, 130(7):1705
- [63] 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
- [64] 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
- [65] 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
- [66] C. Ratledge, J.P. Wynn. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology.* 2002, 51:1-44
- [67] 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
- [68] C. Ratledge. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem Soc T.* 2002, 30(6):1047-1049
- [69] 孙智谋, 周旭, 刘丽萍. 生物质能源的研究与发展. *粮食与饲料工业.* 2009, (2)

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！

感谢胡凤仙副教授和张建老师对我实验和生活方面的帮助。

特别感谢油脂组另外两位成员王玉梅、崔振阳同学的帮助，没有我们的共同协作和努力，我的工作就不可能进展的这么顺利！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、楚德强师兄、黄萧师兄、张怀庆师兄在实验中对我的建议和帮助，感谢安克红、赵凯、罗紫臣、李传航、邢恒维、何燕青、包艳文、方镇宏、张瑶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！

攻读硕士期间发表的文章

1. Liu, W., Wang, Y.M., Yu, Z., Bao, J. 2012. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresour. Technol.* BITE_10020.
2. Huang, X., Wang, Y.M., Liu, W., Bao, J. 2011. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresour. Technol.* 102, 9705-9709.
3. 刘威, 王玉梅, 鲍杰. 2011. 玉米秸秆同步糖化与发酵生产微生物油脂. 第五届全国研究生生物质能研讨会论文集.
4. 鲍杰, 刘威, 张建. 一种由木质纤维素同步糖化发酵生产微生物油脂并回收使用纤维素酶的方法. 专利, 专利号: 201210039756. 8.