

分类号: Q815 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 学位论文

循环利用发酵废水的反复批次发酵模式

在微生物油脂中的应用

王玉梅

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2012-4-10 论文答辩日期: 2012-5-23

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: 张小希

评 阅 人: 张小希 教授级高级工程师

李志敏 副教授

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：

2012 年 月 日

循环利用发酵废水的反复批次发酵模式在微生物油脂中的应用

摘要

生物柴油是急剧减少的化石燃料的良好的替代能源，微生物油脂被看做生物柴油生产的在成本和质量等各方面具有优势的原料。但由于微生物油脂是胞内产物，而菌体浓度在发酵过程中产量较低，所以，微生物油脂在发酵分离后会产生大量的废水。本研究中，以皮状丝孢酵母 CX 1 为菌种，采用伴有细胞分离和发酵废水循环利用的反复批次发酵方式，减少水的利用及废水排量。循环利用发酵废水的反复批次发酵方式，即在每一批次的发酵结束后，通过离心分离或絮凝分离的方法，将细胞和发酵液上清分开，发酵液上清作为下一批次发酵的液体继续使用。壳聚糖作为一种天然的絮凝剂，对皮状丝孢酵母 CX 1 表现出较好的絮凝效果，结果表明絮凝分离的方法可以作为一种良好的替代离心分离的细胞分离方法。并且将絮凝沉降替代离心后，整个反复批次发酵过程不易染菌，方便节能。采用这种循环利用发酵废水的发酵方式，经过 4 个批次的循环，能够节约 70% 的水，而油脂的量没有明显的减少。此外，将这种发酵方式应用于菊粉为原料基质，皮状丝孢酵母 CX 1 也表现出较好的油脂发酵效果。研究中发现，皮状丝孢酵母 CX 1 能产生水解菊粉的酶类，可以不需额外加入菊粉酶，直接将菊粉发酵转化为油脂。循环利用发酵废水的反复批次发酵模式为微生物油脂中减少水的用量以及废水的排放提供了一个切实可行的方案。

关键词：发酵模式；微生物油脂；皮状丝孢酵母 CX1；絮凝；水循环利用

Repeated Batch Fermentation Recycling Waste Water of Fermentation with Cell Separation for Lipid production

Abstract

Biodiesel is a good alternative for fossil fuels, and microbial oil is particularly the most potential raw material of biodiesel production. Large waste water disposal was the major problem in microbial lipid fermentation because of the intrinsic property of low and intracellular product (lipid) yield. In this study, the repeated batch fermentation with water recycling and cell separation was investigated for the reduction of the waste water generated in the lipid fermentation of an oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* CX1 strain. In the repeated batch fermentation, the waste fermentation broth was recycled in the next batch operation after the cells were separated with the fermentation broth using two different methods, centrifugation and flocculation. Besides, chitosan showed great effectiveness as a natural flocculant for the flocculation of *Trichosporon cutaneum* CX1. And the result showed that flocculation can be a good replacement of centrifugation as a separation method. Furthermore, when flocculation method was applied, it is an easy way for saving energy and lowering the risk of contamination. The result also showed that at least 70% of the waste water was reduced using the proposed operation in the substrate of glucose and inulin, while lipid production maintained satisfactory in the initial four circles. Furthermore, it is suggested that *T. cutaneum* CX1 cells might produce certain naturally occurring inulin hydrolyzing enzyme(s) for obtaining fructose and glucose from inulin directly. The proposed fermentation method provided a practical option for reducing the waste water generation of microbial lipid fermentations.

Key words: Fermentation mode; microbial lipid; *Trichosporon cutaneum* CX1; flocculation; waste water recirculation

目录

前言.....	1
第 1 章 文献综述.....	3
1.1 生物柴油概述.....	3
1.1.1 生物柴油的发展意义.....	3
1.1.2 生物柴油发展历程和现状.....	3
1.1.3 生物柴油生产的原料.....	4
1.2 微生物油脂.....	5
1.2.1 微生物油脂的发展历史.....	5
1.2.2 生产微生物油脂的微生物.....	6
1.2.3 微生物油脂生产的不同底物原料.....	8
1.2.4 产油微生物中油脂积累途径及影响油脂积累的因素.....	10
1.2.5 提高油脂积累的培养模式.....	16
1.2.6 含油微生物的收获方式及发酵废水的处理.....	20
1.3 循环利用发酵废水的反复批次发酵模式.....	21
1.3.1 循环利用发酵废水的反复批次发酵模式的发展.....	21
1.3.2 循环利用发酵废水的反复批次发酵模式的应用.....	21
1.4 课题研究的意义与内容.....	22
第 2 章 材料与方法.....	25
2.1 材料与设备.....	25
2.1.1 菌种.....	25
2.1.2 实验试剂.....	25
2.1.3 培养基.....	26
2.1.4 实验仪器.....	26
2.2 实验方法.....	27
2.2.1 菌种保藏.....	27
2.2.2 种子培养.....	27
2.2.3 发酵和细胞分离实验.....	27
2.2.4 絮凝效率评价试验.....	28
2.2.5 絮凝剂对菌体生长和产油影响试验.....	28
2.3 分析与测定方法.....	28

2.3.1 糖浓度的测定.....	28
2.3.2 菌体浓度测定.....	29
2.3.3 菌体干重测定.....	29
2.3.4 油脂量测定.....	29
2.3.5 蛋白含量测定.....	29
第 3 章 实验结果与讨论.....	31
3.1 葡萄糖为底物的循环利用发酵液上清的发酵研究.....	31
3.1.1 葡萄糖为底物的循环利用发酵液上清的 2 批次发酵实验探索.....	31
3.1.2 葡萄糖为底物的循环利用发酵液上清的多批次发酵实验.....	32
3.2 菊粉为底物的循环利用发酵液上清的研究.....	34
3.2.1 菊粉为底物的循环利用发酵液上清的多批次反复发酵实验.....	34
3.2.2 糖化酶的添加对皮状丝孢酵母酵母 CX1 生产油脂的影响.....	37
3.3 絮凝分离的适用性及条件探索.....	38
3.3.1 不同絮凝剂的量对絮凝效果的影响.....	38
3.3.2 不同细胞量下的絮凝效果.....	39
3.3.3 絮凝剂对细胞生长的影响.....	40
3.3.4 絮凝剂对细胞产油的影响.....	41
3.3.5 絮凝剂对糖化酶酶活的影响.....	42
3.4 絮凝分离在反复批次发酵模式中的应用.....	43
3.4.1 絮凝分离反复批次发酵模式在葡萄糖为底物时的应用.....	43
3.4.2 絮凝分离反复批次发酵模式在菊粉为底物时的应用.....	44
3.4.3 不同底物、不同分离方法下循环利用发酵液上清的反复批次发酵方式比较..	45
第 4 章 结论与展望.....	47
4.1 结论.....	47
4.1.1 以葡萄糖为底物的微生物油脂发酵.....	47
4.1.2 以菊粉为底物的微生物油脂发酵.....	47
4.1.3 絮凝分离油脂酵母的可行性.....	47
4.1.4 絮凝分离和反复批次发酵结合.....	47
4.1.5 循环利用发酵废水的发酵模式作用.....	48
4.2 展望.....	48
参考文献.....	49
致谢.....	57
硕士期间发表的文章.....	58

前言

由于化石燃料的急剧减少，人们对燃料的需求却持续增加，同时燃烧化石燃料会带来严重的环境问题。在这种能源危机的情况下，生物柴油作为一种可再生及经济可行的替代能源，备受人们关注，然而，原料成本是实现生物柴油大规模发展的主要瓶颈。生产生物柴油的原料通常是可食用的植物油，价格高昂，而且会造成“与人争粮”的局面，进一步造成经济和社会的不稳定。同时，包括酵母、霉菌、细菌和藻类在内的一类微生物可以积累超过自身干重 20% 的油脂，组成类似植物油脂，同时具有生产所需周期短、需要的条件温和、不受耕地和环境限制、劳动力需要量少等一系列的优点，被现在的研究者们认为是生物柴油最具应用价值的生产原料。

迄今为止，人们对微生物油脂从多个方面进行了持续的研究。包括微生物油脂生产的代谢路径的探索，不同产油微生物的发现和耐高温、耐木质纤维素原料中的抑制物的菌种的选育，发酵培养条件的探索，包括氮限制中的最适 C/N 比的优化，替代氮限制的磷限制、硫限制、锌限制等替代营养限制的研究，溶氧水平的控制等。而这众多研究方面中最重要的研究就是，探索替代高成本的葡萄糖的底物原料来生产微生物油脂和采用不同的发酵方式来提高菌体的浓度和油脂的产量，进一步降低油脂的成本。

对于微生物油脂生产的原材料，目前的研究报道有很多，包括农林废弃物，其他非粮原料，以及一些工业的废弃物中的有机物质。目前，据文献报导的微生物油脂的发酵方式主要有液体发酵以及少量的固态发酵。液体深层发酵最常见的有分批发酵、不同方式的补料发酵、连续发酵以及两阶段发酵。也有一些研究利用细胞的成球化等一些新型的方法进行油脂的生产。

尽管目前微生物油脂的研究几乎涉及微生物油脂生产的各个方面，但是关于油脂细胞的收获方法以及怎样减少微生物油脂生产过程中的废水量，或者重复利用油脂发酵后的剩余废水的研究很少。同时，在采用木质纤维素原料或菊芋等生产油脂时，都需要额外添加水解酶类获得可发酵利用的糖，而这些酶的价格昂贵，这样就部分抵消了原料的廉价所带来的优点。所以，怎样减少水用量，减少废水量，以及简易快速的收获细胞，回收利用水解酶类至关重要。

本文所研究的伴有细胞分离的反复批次发酵，是通过反复利用去除产物后的发酵上清的的发酵方式生产油脂的发酵模式，这样就可以节约水用量，减少废水排放。同时这种发酵方式对一些特殊的原材料，如纤维素原料和菊粉原料的发酵具有特殊的优势，可以回用发酵液中的水解酶类。

本文主要主要研究连续的新型发酵模式对油脂生产的影响，包括这种新型发酵模式对以葡萄糖和菊粉为碳源的合成培养基的发酵的影响；采用絮凝沉降的方法代替离心分离的分离方法，以实现最终连续循环的过程。这种新型的发酵模式具有很多的优点：可

以形成一个循环的体系，使培养基质反复利用，从而达到节水的目的；通过此种发酵模式，可以省去反复的种子培养的时间，从而节约时间，节约成本；并且在纤维素油脂发酵等特殊原料发酵中将具有重要意义。

第 1 章 文献综述

1.1 生物柴油概述

1.1.1 生物柴油的发展意义

现在世界各国都面临日益减少的石油化石燃料和环境保护问题的共同的挑战。然而，随着消耗需求的快速增加，石油燃料却在减少，以至于接近枯竭，所以必须减少对石化燃料的依赖，把国家依靠石油进口的经济和能源安全威胁降到最低^[1]。

此外，化石燃料的利用，释放大量的温室气体—二氧化碳，导致了气候的重大变化，全球气候逐渐变暖。继而产生大量的负面作用，冰川融化，海平面上升，生物多样性的减少，甚至一些动物的灭亡^[2, 3]。有研究指出，由于温室气体的排放所产生的环境问题可能会减少一个国家高达 20% 的国民生产总值（GDP）^[4]。因此，现在的首要任务就是找到可替代的能源供应技术，提供大量的可再生的、清洁的能源，以应对不断上升的能源需求的挑战，减少温室气体的排放。

在众多可选择的替代能源中，只有来源于生物基原料的燃料，能够满足可再生以及经济可行的要求。而在生物乙醇、生物甲醇、生物氢等生物燃料中，生物柴油在化学结构和能量含量上与传统意义上的柴油具有相似性，更受大家的关注。而且，生物柴油作为燃料时，传统的柴油机不需要做任何改动，在德国、意大利和马来西亚等国，生物柴油和传统的柴油相混合，作为一种商业的运输燃料出售^[5, 6]。此外，生物柴油在燃烧时，可以排放出更少量的废弃物，如未燃烧的碳氢化合物，一氧化碳和一些颗粒物，同时不产生硫化物和致癌物。因此，被认为是一种清洁能源，有优良的生物可降解性和润滑性^[7]。

1.1.2 生物柴油发展历程和现状

1900 年，Rudolph Diesel 发明了压缩点火的发动机，花生油被用来测试驱动其发明的发动机引擎。然而，后来，由于当时廉价易得的石油，蔬菜油脂作为燃料的功能也就被忽略了^[8]。近期，由于人们意识到石油资源是有限的，并且会产生有害环境的气体，所以，植物油脂再次回到人们寻找的压缩点火的发动机引擎的燃料的范围内。但是，由于植物油脂本身的高粘度和低挥发性，长期使用植物油脂作为燃料将产生一系列不同的问题，如沉积物淤积，活塞环卡住，发动机熄火等^[9]。因此，希望改进植物油脂来改善其作为燃料的性能。经过一系列化学和热力学的方法的尝试后，最合适的降低粘度的方法是化学处理过程，即转酯化反应。由植物油和低级醇合成的甘油三酯，具有和矿物油脂相似的性能^[8]。

二十一世纪后，生物柴油迅速成为新兴产业并在全球崛起。世界生物柴油的总产量也迅速在三年内由 2004 年开始的 2.196×10^9 L 提高为 2007 的 9.841×10^9 L，平均年增长

量为 $2.548 \times 10^9 \text{ L}^{[10]}$ 。据美国的生物柴油协会在 2007 年的统计资料表明，美国的来源于生物基的柴油的总产能可达到 1093×10^4 吨/年^[11]。引人注目的是，不只是在像美国这样的发达国家，中国、印度、马来西亚等发展中国家，也都出台生物柴油的发展长期的规划，同时制定政策予以扶持。

1.1.3 生物柴油生产的原料

根据美国试验与材料协会 (ASTM) 的定义，生物柴油是由来源于可再生的植物油和动物脂肪的脂肪酸烷基酯组成的，满足 ASTM D6751 的标准的燃料。生物柴油的化学制备过程是一个转酯化反应过程，即在高温、催化剂的条件下，三酰甘油 (TAG) 和短链的一元醇反应，生成脂肪酸烷基酯 (FAAE, 生物柴油) 和甘油，如图 1.1^[12]所示。反应分为三个可逆的步骤：第一步，甘油三酯和醇基反应生成一分子的 FAAE 和二脂酰甘油 (DAG)；第二步，二脂酰甘油和另一分子的醇反应，再释放出一分子的 FAAE 和一分子的单酰甘油 (MAG)；第三步，单酰甘油醇解形成甘油和 FAAE。三个步骤中的 FAAE 都被作为生物柴油收集，进而纯化^[12]。生物柴油自身的化学组成决定在其所用的原料油脂的组成。

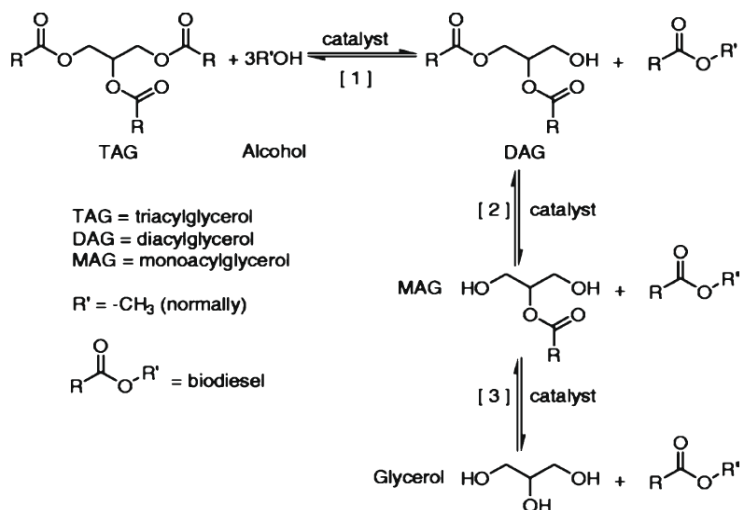


图 1.1 甘油三酯生成生物柴油的转酯化反应

Fig. 1.1 Transesterification of triacylglycerols to yield fatty acid alkyl esters (biodiesel)

在 2007 年，世界生物柴油的主要原材料是油菜籽油，占总原料量的 48%，产量为 460 万公吨^[13]。一般情况下，生物柴油生产所用的原料，由于生产所在地的气候环境、可收获性的不同而各不相同。一个地区最常见的原料是当地最充足的商品油脂。因此，在欧洲，生物柴油生产最常用的是油菜籽油和葵花油，热带地区棕榈油为主要原料，而在美国，动物脂肪和大豆油则常被用作生物柴油生产的原料^[14]。然而，即使将所有这些原料都综合起来，也达不到完全替代柴油的目的。因此，开发生物柴油生产的其他原料也越来越多的引起人们的重视。

一般来说，生物柴油生产的原料概括起来主要分为以下几类：植物种子油；动物油脂；低附加值的原料，如烹饪废油、皂脚；微生物油脂等。目前，农业方面主要通过技

术手段增加各种含油籽粒的产量或籽粒的含油率^[15]。例如,我国通过运用“底物竞争”的基因调控技术,开发了含油量大幅提高的“超级”油菜,并使得使用油菜籽为原料的生物柴油的不饱和甲酯的含量降低^[16]。现在,一种不可食用的麻疯树种子受到大家的关注。麻疯树种子的含油率可高达 30%,其属于大戟科的多年生,有毒的灌木。据国家发改委的相关资料显示,2008 年贵州成功完成了 60 万亩的麻疯树种植任务;云南也与中石油合作,在 2007 年建成了 40 万亩的生物柴油原料-麻风树林的示范基地^[17]。此外,光皮树种子等含油木本植物的种子也可以成为原料。

动物油脂包括一系列来源于动物的油脂,如牛肉、猪肉、鸡肉,以及其他鱼油(如废鲑鱼油^[18])和昆虫油脂^[19]等。但由于饱和脂肪酸含量较高,用其作为原料生产出的物柴油冬季使用较困难,因为他们的冷滤点较高,如牛肉油和猪肉油为原料的生物柴油的冷滤点都为 8°C^[20, 21]。因此,不宜作为生物柴油生产原料。废弃的油脂,不论是废弃的食用油^[22]、酸化油^[23]还是粮食加工的副产油^[17],作为生物柴油发展的原料都是可行的。但需要建立健全的收集机制,并需要经过除水等预处理措施。

然而,现代生物柴油的原料成本已经从上世纪 90 年代的 60-75% 提高到 85%。并且生物柴油的生产不能和粮食供应相冲突,这就要求在可食用的植物油及油脂工业以外,寻找其他不受气候环境影响,不占用耕地的廉价的油脂作为其生产的原料油。此时,微生物油脂重新燃起人们的研究热情。微生物油脂是产油微生物在体内积累的油脂,在文献中,也常叫做单细胞油脂。用微生物获得生物柴油是一个十分有应用前景的生物柴油生产的替代方法。首先,大量的微生物,如微藻、细菌、真菌、酵母等可以积累细胞干重大部分重量的胞内油脂。并且,这些微生物油脂,各方面性能和植物油脂相似,同样是生物柴油生产的良好材料。此外,微生物生长速度快,周期短,能够利用的底物范围广,如其可以利用单位产量相对于油菜高很多的甘蔗,这样,生物柴油的生产就可以占用更少的耕地,并且需要的劳动力少^[24, 25]。

1.2 微生物油脂

1.2.1 微生物油脂的发展历史

早在 19 世纪 70 年代中期,德国科学家就曾尝试使用酵母等微生物生产的油脂作为市场中商品油脂的来源。两次世界大战之间,德国为研究微生物可以生产大量油脂的过程做了巨大的贡献。很多适于油脂生产的微生物菌种就是在其间由德国研究者发现的。但是,由于 1945 年以后,由于农业技术的发展,粮油供应的价格降低,人们意识到从微生物来源的油脂无法和大宗的商品油脂,如大豆油等相竞争。于是,在那一时期,关于微生物油脂的所有方面的研究几乎处于停滞阶段。

上世纪 60 年代初期,人们对利用可以在石油炼制过程中产生的副产物,如烷基烃等廉价的原材料中生长的酵母生产单细胞蛋白产生了兴趣。在这样一个单细胞蛋白的时代,很多生产油脂的公司,转而生产这种简单的可作为动物饲料的单细胞蛋白。单细胞蛋白这样一个新颖的想法的实践同时促进了过程生物技术的革新。可以将甲烷或甲醇直

接转化成单细胞蛋白，同时建成了体积为 1500 立方米的反应器^[26]。Ratledge 在 1976 年和 1978 年相继指出，若单细胞蛋白具有每吨 300 美元的商业价值，单细胞油脂同样具有较高的商业效益。但是在接下来的几十年里，由于农业技术的发展，农作物产量的增加，使得动物饲料的原材料的价格下降，如豆饼粉从 1960 年以后的 30 年中的价格就没有涨过。加之，石油输出国输出石油的价格的增加，使得以烷烃作为原料的单细胞蛋白产业不复存在。

尽管普遍认为，在成本方面，微生物油脂很难和商品植物油相抗衡。但对于生产具有高附加值的微生物油脂，具有商业价值。因为其不像单细胞蛋白一样，仅仅只是蛋白质，营养价值不会有太大的改变，但油脂的价格，则可能从不到 1 美元每千克到高于 100 美元每千克不等。具有高附加值的油脂，由于其来源少，市场价格高，所以在 20 世纪 80 年代，微生物油脂（单细胞油脂），迅速转向具有高附加值的产量高的产品，含有 γ -亚麻酸等具有保健功效的食品和饮料最初由英国、日本推出^[27]。但是，不同的微生物所产生的油脂的质量和产量差别很大，例如，酵母，分为高产油的和低产油的，一些酵母，如假丝酵母和酿酒酵母，其积累的油脂量不可能超过其自身干重的 10%，而其他一些酵母，如粘红酵母和斯达油脂酵母，其可积累超过自身干重 70% 的油脂。此外，油脂的主要形式是三脂酰甘油，和商业的油脂的组成相当。这些能够积累的油脂量超过本身干重 20% 的微生物，认为是产油微生物^[26]。

1.2.2 生产微生物油脂的微生物

很多微生物，如各种自养和异氧微藻、真菌、酵母和细菌等都可以积累其细胞干重大部分的油脂，如表 1.1 所示。不同种类的微生物细胞产生的油脂在含量和组成等各方面都不相同，即使是不同种属的同种微生物的细胞的含油率也不相同。即便是同一菌株，其在不同的培养条件下，含油率和油脂的组成差别也很明显。也正是微生物油脂的多样性使得其制得的生物柴油的性能有所差别，这样就可以重新组合，形成具有较高十六烷值和热值，但粘度低的生物柴油。

表 1.1 一些产油微生物的含油率

Table 1.1 Lipid content of some oleaginous microorganisms

微生物	含油率 (%干重)	参考文献
微藻		
<i>Chlorella emersonii</i>	25-63	[28]
<i>Monodus subterraneus</i>	39.3	[29]
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29-65	[30]
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77	[31]
细菌		
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40	[32]
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24	[33]
<i>Gordonia sp.</i>	72	[34]
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25	[33]
真菌		
<i>Aspergillus oryzae</i>	57	[33]
<i>Cunninghamella echinulata</i>	35	[35]
<i>Humicola lanuginosa</i>	75	[33]
<i>Mortierella isabellina</i>	53.2	[36]
酵母		
<i>Candida curvata</i>	58	[33]
<i>Cryptococcus albidus</i>	65	[33]
<i>Lipomyces starkeyi</i>	68	[37]
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	58	[36]

1.2.2.1 微藻

微藻是光自养型的微生物，其可以直接将二氧化碳转化为油脂，进而合成生物柴油^[38]。微藻的含油率高，培养占用的耕地面积少（相比与玉米种植，其耕地面积少 3.4 倍）。微藻的生长速度很快，在对数生长期，其在 4 h 以内干重可以增加一倍，其一般的倍增时间也只是 24 h。微藻的含有率比一般的藻类的含有要高^[39]，含油率在 20-60% 之间（表 1.1），在有些属中，其含有率可以接近 80%。微藻产生的油脂大都是不饱和脂肪酸，油酸（18:1），棕榈油酸（16:1），亚麻酸（18:3）等，也有少量的饱和脂肪酸，棕榈酸（16:0），硬脂酸（18:0）^[33]。藻类快速的生长周期和高的油脂含量，使得用其生产的生物柴油的效率更高。微藻可以积累大量的油脂，但相比于其他的产油微生物，由于其需要光照进行光合作用，它们需要大量的土地，并且要在较低的浓度下培养，这就意味着需要大量的水，这样就增加生产成本。

1.2.2.2 细菌

细菌中仅有少部分种类生产的油脂可以作为生物柴油的前体^[40]。而这中间仅有少量的放线菌属的细菌可以积累较高水平的油脂，如，*Acinetobacter calcoaceticus* 的菌体含油率为 38%^[41]，三脂酰甘油的主要成分是十六烷酸（16:0）以及十八碳烯酸（18:1）。其他属的细菌，如 *Gordonia sp.* 能积累干重的 72% 的油脂（表 1.1），主要组成为二十二烷酸（22:0）己酸（6:0）；而 *Streptomyces* 属的细菌只能在没有氮源的情况下才生产油脂^[42]。所以，目前有研究者通过系统生物学和代谢工程的方法来改造菌种，提高油脂的产率。Lu 等通过敲除大肠杆菌的 *fadD* 基因并过量表达乙酰辅酶 A 羧化酶的基因和硫酯酶的基因，可以使大肠杆菌生产脂肪酸的产量可以超过 2.5 g/L^[43]。尽管细菌所含的油脂含量偏低，但其具有相比去其他微生物的高生长速率（通常只要在 12-24 h 就可以获得最大生物量）以及相对容易培养的优点。

1.2.2.3 酵母和真菌

真菌同样可以作为生物柴油生产的原料油的来源，一些微生物可以生产高浓度的油脂，例如 *Humicola lanuginosa* 可以积累的油脂的量为 75%^[24]，而其他的一些真菌也都可以得到较高的不同浓度的油脂含量，*Aspergillus oryzae* 可以积累 57% 的油脂^[33]，*Mucor rouxii* 积累的油脂量为 30%。在积累的油脂中，含量最多的是亚麻酸，占到 3-17%^[44]。由真菌生产的油脂，在经氯仿-甲醇提取，酸作为催化剂的转酯化反应后，得到的脂肪酸甲酯可以直接作为生物柴油使用。

在真菌中，酵母被认为是生物柴油生产的很具有潜力的原料来源。其可以积累较高的油脂含量（大于干重的 20%），并且油脂的组成主要是三脂酰甘油。最有名的产油酵母有红酵母、丝孢酵母和耶氏酵母等。平均来说，这些酵母可以积累油脂达到自身生物量的 40%。然而，在营养限制的情况下，它们可能积累超过自身生物量 70% 的油脂。然而，不同物种之间的油脂的含量以及组成是不同的。例如，弯曲隐球酵母和浅白隐球酵母可以积累油脂达到一个相同的水平（分别为 58% 和 65%），但是它们的脂肪酸的组成则有显著的区别。弯曲隐球酵母积累大量的棕榈酸，而浅白隐球酵母则主要积累油酸。相反，红酵母属中，油脂的含量则差别显著（粘红酵母和小麦酵母能分别积累生物量的 72% 和 36% 的油脂），但是脂肪酸的组成则相似^[45]。

1.2.3 微生物油脂生产的不同底物原料

葡萄糖是微生物生长最适碳源，以其作为碳源生产微生物油脂的研究很多，含油率可高于 60%^[46]。但是以葡萄糖作原料进行规模化油脂生产，不仅成本高，而且会产生“与人争良以及与粮争地”的情况，进而引发一系列问题。因此，农林废弃物（包括各种农作物的秸秆），其他非粮原料（如木薯、菊芋等），以及一些工业的废弃物中的有机物质都被用来研究生产微生物油脂的可行性。

首先，现在以玉米秸秆、稻草等纤维素作为原料进行发酵以生产油脂的相关研究很多。木质纤维素的天然原材料主要由三部分组成，纤维素、半纤维素以及木质素。经过物理或者化学或生物的预处理后，这些原材料可以转化为微生物可以利用的单糖，如葡

葡萄糖和木糖。但同时也会产生一些抑制微生物生长和代谢的副产物，如糠醛（Fur）、5-羟甲基糠醛（5-HMF）以及乙酸等其他物质。为此，陈曦等考察了不同种属的酵母对抑制物的耐受性，并从中挑选一株对抑制物耐受性最强的皮状丝孢酵母进行化学诱变和筛选，得到本实验研究中所使用的具有抗性的皮状丝孢酵母 CX1^[47]。而大连化物所的赵宗保等考察了不同抑制物圆红冬孢酵母的发酵生产油脂的影响，发现 1 mmol/L 糠醛明显抑制菌体的生长和产油^[48]。宗敏华等用脱毒后的稻草水解液做原料，用发酵丝孢酵母作为菌种，得到的油脂含量为 40%^[49]。戴传超等筛选的具有木糖利用效果的粘红酵母，在树叶的水解液中，可以得到含油率为 29%的菌体^[50]。在采用混浊红球菌为菌种，以离子液体的方法进行预处理并经酶解后的玉米芯的水解液为原料，含油率可以达到 41%-43%，效率和直接利用葡萄糖相差不大^[51]。Ch.N. Economou 等用霉菌 *Mortierella isabellina* 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 11 g/100 g 干物质^[52]。Lin Hui 等利用霉菌 *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 62.87 mg/g DM^[53]。

其次，利用菊芋、木薯等高糖植物以及甲壳素类生物质进行油脂生产也取得一定进展。菊芋不仅耐寒，而且是耐干旱和贫瘠的高糖植物，尤其可以在盐碱地等非耕地的地区种植。赵宗保等利用经酸处理的后得到的菊芋汁为原料，以圆红冬孢酵母酵母为菌种，细胞的含油率为 40%^[54]；在以菊芋提取物和水解物作为底物，在分批补料过程下，在 15 L 发酵罐中生产油脂，最终油脂产量是 39.6 g/L，细胞含油率达到 56.5%^[55]。池振明等利用基因工程的方法，把菊粉酶基因导入高产油脂的菌株斯达油氏酵母中，菌体的含油率达 50%^[56]。木薯和菊芋一样，也是非粮原料，适应性强，产量大，也是微生物油脂生产的良好原材料。袁锦云等采用皮状丝孢酵母 B3，以木薯淀粉水解液为原料生产油脂，油脂含量可达 42.8%^[57]。

甲壳素，也是自然界含量略少于纤维素的多糖，存在于节肢动物等，其水解后可以获得 N-乙酰-D-葡萄糖胺以及氨基葡萄糖，同样可以经微生物转化后，制备生物燃料。赵宗保等研究发现在 22°C 下以 N-乙酰氨基葡萄糖作为碳源，酵母 *Cryptococcus curvatus* 的含油率可以达到 54.2%^[58]。

最后，产油微生物还可以利用一些工业废弃的有机物来生产油脂，引起具有广泛的碳源谱。宗敏华在总糖浓度为 15%的废糖蜜中油脂的产量为 12.8g/L 含油率仅为 35.3%，生物量为 36.4 g/L^[46]。Donmez 等用糖蜜为原料，解脂假丝酵母、热带假丝酵母以及粘性红圆酵母的含油率可以分别达到 60%、46%以及 69%。粗甘油作为生物柴油大量生产及商品化过程中的主要副产物，常被用作废料处理^[59]。Chanika Saenge 等用 *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，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^[60]。梁燕娜等研究者使用粗甘油为发酵底物原料培养 *C. curvatus*，菌体含油率可达到 52%^[61]。Angerbauer, C. 等尝试用 *Lipomyces starkeyi* 酵母以活性污泥为基质进行发酵，研究发现，未处理的污泥 *Lipomyces starkeyi* 酵母无法正常生长。与酸、碱处理以及热

处理相比较, 经过超声处理的污泥产油最大, 达到 1 g/L ^[37]。谭天伟等用 *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%, 降低了 45% 的 COD^[62]。总之, 各种能够被用来生产的原料, 都在被尝试作为微生物生产油脂的原料, 来降低生物油脂, 甚至生物柴油生产的成本。

1.2.4 产油微生物中油脂积累途径及影响油脂积累的因素

1.2.4.1 油脂积累的途径

油脂可以通过两种各不相同的途径积累: (1) 从头合成, 包括在一定情况下, 脂肪酸前体的合成, 例如, 乙酰辅酶 A (ACoA) 和丙二酰单酰辅酶 A (MCoA), 以及它们合成贮存脂质的途径。(2) 补救积累途径, 包括从培养基中吸收脂肪酸、油脂、TAG, 并且在细胞内以一种原始的或修饰的形式积累。这个过程需要对疏水性底物的水解, 运输细胞内释放的脂肪酸, 以 TAG 和固醇酯 (SE) 的形式的再组装, 以及在 LB 内的积累^[45]。下面以解脂耶氏酵母为模型说明油脂积累的从头合成途径和非极性脂质的合成。

酵母中非极性脂类的合成需要持续的提供辅酶 A 活化的脂肪酸来使甘油骨架进行酰化作用, 以合成 TAG 或者使甘油酯化生产 SE。从头合成中, 脂肪酸的最初的两个碳原子由细胞质的 ACoA 提供, 而 ACoA 来自三羧酸循环中 ATP- 柠檬酸裂解酶 (ACL) 裂解柠檬酸, 脂肪酸链通过添加 MCoA 单元 (内质网) 或者 ACoA (线粒体) 延长。线粒体中用于延长的 ACoA 由 β 氧化过程中油脂的断裂产生。MCoA 由乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 催化产生, 并且是脂肪酸从头合成中主要的碳原子。脂肪酸酰基链的每一步延长都需要 2 分子的 NADPH。NADPH 主要来源于苹果酸酶 (ME) 作用。这三种酶 (ACL, ACC, ME) 被认为在油脂的积累和调节的过程中起到重要的作用。

TAG 的合成通常是在 Kennedy 途径中进行的^[63]。在 TAG 合成第一步, 3-磷酸甘油 (G-3-P) 被 G-3-P 脂酰转移酶 (SCT1) 酰化, 产生溶血磷脂酸 (LPA), 其再进一步被溶血磷脂脂酰转移酶 (SLC1) 酰化产磷脂酸 (PA), 通过磷脂酸磷酸水解酶 (PAP) 的脱磷酸作用, 可以从磷脂酸 (PA) 中得到二脂酰甘油 (DAG)。编码 PAP 的基因, 在解脂耶氏酵母的基因组中有 39% 和酿酒酵母的 PAH1 的基因相同。Pah1p 属于 PAP1 酶家族, 其家族成员都需要 Mg^{2+} 作为催化活性的辅因子^[64]。在酿酒酵母中这中酶的作用由油脂、核苷酸和磷酸化作用共同调节^[65, 66]。

在 TAG 合成的最后一步, DAG 在 sn-3 被酰基化, 这是通过 ACoA 依赖型的或非 ACoA 依赖型的反应进行的 (图 1.2)。ACoA 依赖的反应由三种酶所催化: Dgalp, Are1p 和 Are2p。DGA1 编码乙酰辅酶 A 甘油二酯酰基转移酶 (ACAT), 但是和 DGAT1 亚家族编码的在植物和哺乳动物中发现的 ACoA: 胆固醇酰基转移酶同系的酶不相关。相反, 它和哺乳动物的 DGAT2 基因属于同一家族。在解脂耶氏酵母中, Dgalp 似乎是 TAG 合成中主要的酶, 负责 45% 的 DAG 的酰化作用。体内的测试显示, 这种酶优先利用油酸和棕榈酸作为调动辅酶 A 酰基化的前体。解脂耶氏酵母中 Dgalp 的作用在生长周期的过程似乎是逐渐增强, 在稳定期的时候达到最大。用荧光蛋白 EYFP 标记 Dgalp 显示, 其绝大多数位于脂质体的表面^[45]。

两种甾醇酯合酶，由 ARE1 和 ARE2 基因编码，为酿酒酵母中发现的基因的直系同源物，并且在 ACoA 依赖型机制中作为乙酰转移酶对 DAG 的乙酰化起到重大作用^[67]。Y1Are1p 有一个氨基酸序列，大约 30% 和酿酒酵母中的直系同源物相同，但是，Y1Are2p 和 Y1Are1p 的同源性较低 (17%)，并且和紫苏中的甘油二酯酰基转移酶 (DGAT) (22%)、人类的 DGAT1 (28%)、和植物 *A.thaliana* (25%) 更相似^[68]。所有的这些酶都属于乙酰辅酶 A：胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 家族，但是它们的基因比哺乳动物的 DGAT1 基因家族成员呈现出更高的序列同一性。尽管 Dgalp、Are 的序列不同，它们的蛋白在解脂耶氏酵母生长的对数期 TAG 合成所必须的最主要的酶。观察到的 DGAT 的活性可能起源于 ARE 基因从酵母中原始的 DGAT1 基因的复制。活体研究表明，Are1p 倾向于饱和的 ACoA 底物，然而 Are1p 倾向不饱和的不饱和的乙酰辅酶 A 底物，更确切的说吸收油酸合成 TAG。

在酵母中，ACoA 非依赖型的反应由 Lro1p 所催化，一种和人类的卵磷脂：胆固醇乙酰转移酶 (LCAT) 有 27% 的相同序列。这种酶具有磷脂酶和乙酰转移酶的双重作用。并不像它的人类直接同源物，酵母的 Lro1Pb 不能合成甾醇，并且并不具有磷脂：二酰甘油酯酰基转移酶的功能。DAG 的酰化作用是一个酯化反应，包括 sn-2 位基团的甘油磷脂，优先选择 PtdCho 和 PtdEtn。去除解脂耶氏酵母的 LRO1 将导致体内 TAG 水平下降 35%，Lro1p 在对数期的作用很小，但在稳定期却起了很大的作用。

SE 的形成包括脂肪酸分子和甾醇的羟基的反应。酿酒酵母体内的贮存脂质中 SE 占了 50%，但是只有少量的 SE 在解脂耶氏酵母中被合成 (2-5%)。在酿酒酵母中，乙酰辅酶 A：甾醇乙酰转移酶 Are1p 和 Are2p 是包括甾醇酯化在内的唯一的 SE 合成酶，缺少两个 ARE 基因的双重突变株不能合成 SE。同样的结果在解脂耶氏酵母中也获得。解脂耶氏酵母体内测量 SE 的积累显示 Are 蛋白相互协同作用，他们的相互作用在对数生长期更加强烈。

脂肪酸合成是由脂肪酸合成酶复合体所催化，基本的原料单元式乙酰辅酶 A 和丙二酰单酰辅酶 A。ACoA 可以以 SE 或 TAG 的形式存储。SE 的合成由 SE 合成酶所催化，此酶和人类的乙酰辅酶 A：甾醇乙酰转移酶直接同源；SE 的调用由 SE 的水解酶所催化，由此释放甾醇和游离的脂肪酸。TAG 的合成需要乙酰辅酶 A 和甘油-3-磷酸 (G-3-P)，而甘油-3-磷酸可能由甘油和二羟丙酮 (DHAP) 所产生。GUT1 编码的一种甘油激酶将甘油转化成 G-3-P，此反应发生在细胞质中。产生的 G-3-P 然后被甘油-3-磷酸脱氢酶氧化成 DHAP，甘油-3-磷酸脱氢酶由 GUT2 基因编码，产生的 DHAP 可能进入糖酵解或糖异生。三个酰基被加到 G-3-P 的骨架上，形成 TAG，这个过程包括四步酶催化的过程：

- (1) 乙酰基被加到 G-3-P 的 sn-1 位产生 LPA，催化的酶是 G-3-P 乙酰基转移酶；
- (2) 在 1-乙酰基-G-3-P 酰基转移酶 (AGAT) 的作用下第二个酰基被加到 sn-2 位置，产生 PA；
- (3) PA 然后被磷脂酸酯酶 (PAP) 脱去磷酸，产生 DAG；
- (4) 通过乙酰辅酶 A 依赖或非依赖途径在 sn-3 位上加入第三个乙酰基。在乙酰辅酶 A 非依赖性的途径中，第三个乙酰基由甘油磷脂提供，然而在乙酰辅酶 A 依赖性的途径中，由乙酰辅酶 A 提供。

TAG 的调动可以由 TAG 脂肪酶的水解作用生成游离的脂肪酸以及 DAG。游离的脂肪酸然后可能通过 β -氧化途径降解，此途径包括 POX, MFE 和 THIO 基因。这一途径包括四步酶催化的步骤。在解脂耶氏酵母中， β -氧化途径的第二步中有六种基因编码乙酰辅酶 A 氧化酶^[45]。

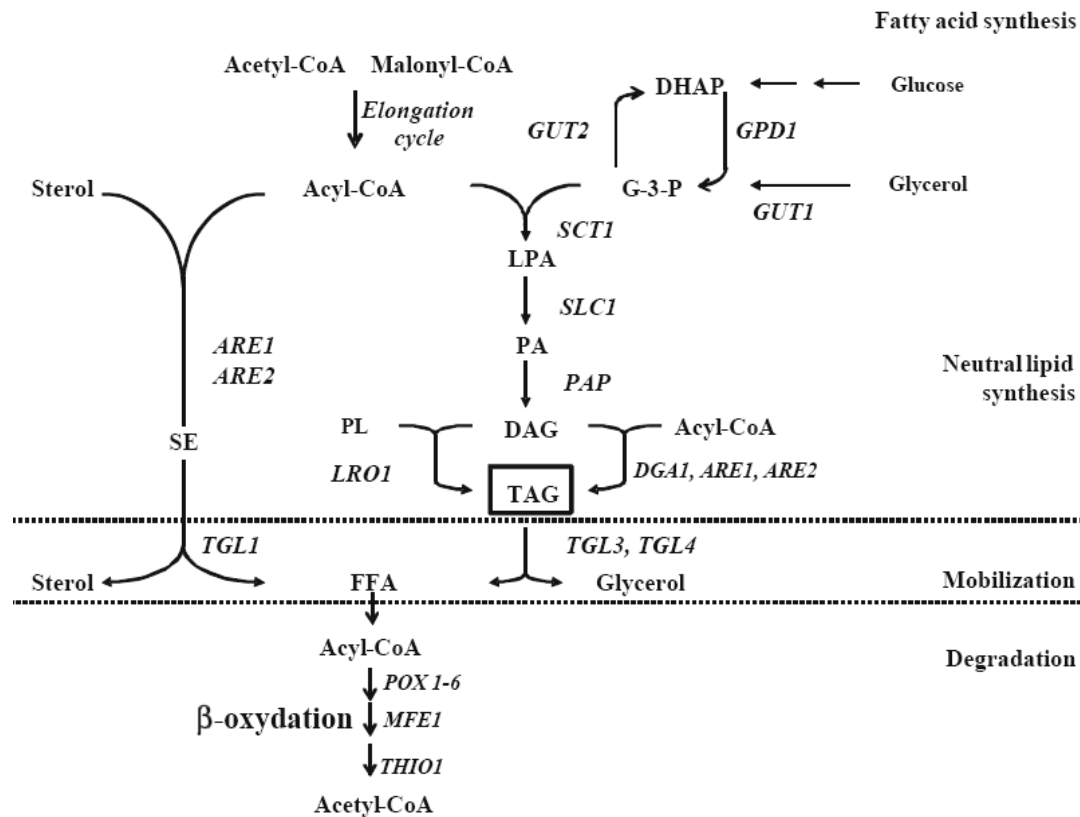


图 1.2 脂肪酸的合成以及非极性脂质的贮存和降解的各种途径的总观^[45]

Fig. 1.2 Overview of the various pathways involved in fatty acid synthesis and in the storage and degradation of non-polar lipids.

1.2.4.2 产油酵母中油脂积累的可能的生物化学和调节

产油微生物在培养基中一种元素成为限制因素，而碳源（例如葡萄糖）过量的情况下开始积累油脂。多种因素可能诱导油脂的产生。在微生物中研究由油脂积累经常使用的是氮源限制。氮源限制是可控制的最简单的条件，并且是诱导油脂积累的最有效的限制类型。在生长期，碳流在四种大分子池中分配（糖，油脂，核酸，蛋白质）。氮是细胞增殖过程中蛋白质和核酸合成所必须的。因此，这个过程被氮限制所减慢。然而，在氮限制的情况下，催化的生长速率迅速减慢，但碳源的同化作用则逐渐减慢。这就促使碳流优先的流向油脂的合成，导致细胞内不连续的脂质体内的油脂的积累。如果非产油微生物被放在同样的营养限制的培养基中，进一步的细胞生长趋向于结束，伴随着碳源流向细胞的维持，但在这种情况下，碳源被转化成各种多糖，包括糖原，各种葡聚糖和甘露聚糖。

在生长期（生长的同时生物量增加）和油脂合成期（由于营养的限制生长速率下降，并且把过量的碳源转化为油脂的生产）的转化过程中，一些途径被抑制（核酸和蛋白质的合成），而其他的途径被促进（三脂酰甘油和脂肪酸的合成）。这种转化是由氮源限制的形成所促进的。另外，在油脂积累期，前体（乙酰辅酶 A、丙二酰单酰辅酶 A 和甘油）和能量（ATP/NADPH）都是油脂合成所必需的。在此，我们将描述调节油脂积累的主要的酶的作用。

AMP 脱氨酶在培养基中氮源耗尽的时候被激活，此过程发生在产油微生物生长期。AMP 脱氨酶催化下面的反应^[69]： $AMP \rightarrow IMP + NH_4^+$

AMP 脱氨酶的激活降低了线粒体中 AMP 的浓度，并且增加了细胞内铵根离子的浓度。AMP 浓度的降低抑制了异柠檬酸脱氢酶，在以柠檬酸水平阻碍了柠檬酸循环。顺乌头酸调节线粒体内柠檬酸的积累，由柠檬酸/苹果酸循环调节其从线粒体中离开。

下面的反应为脂肪酸的合成提供了大量的乙酰辅酶 A。乙酰辅酶 A 由细胞质中的 ATP-柠檬酸裂解酶（ACL）裂解从线粒体中来的柠檬酸。

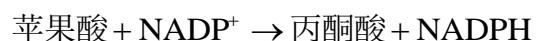


非产油酵母，例如酿酒酵母，是没有这种酶的，但在解脂耶氏酵母中存在。人类的 ACL 由一个单一的蛋白组成，由一个单一的基因编码，但是解脂耶氏酵母和粗糙链霉菌都由两个亚基组成，Aclap 和 Aclbp，分别由 ACL1 和 ACL2 编码。这种酶需要铵根离子激活，并且依赖于单磷酸或双磷酸腺苷。然而，在氮源缺乏的情况下，铵根离子是很少的，于是激活了 AMP 脱氨酶。

除了 ACoA 外，脂肪酸的合成还需要连续不断地供给 MCoA 和 NADPH，MCoA 也可以从乙酰辅酶 A 合成，由乙酰辅酶 A 羧化酶（Acc1p）催化的反应得到： $\text{乙酰CoA} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \rightarrow \text{丙二酰单酰CoA} + \text{ADP} + \text{Pi}$ 。

在动物细胞中，此酶由三羧酸循环的一些中间产物，如柠檬酸所激活。在酵母中，Acc1p 由柠檬酸的浓度变构激活。在解脂耶氏酵母中，此酶由 ACC1 基因编码，即大家所知的 YALIOC11407g。

NADPH 是脂肪酸合酶（FAS）的功能所必需的。大家都认为 NADPH 的浓度由苹果酸酶（ME）的活性所控制。此酶催化的下面的反应：



第一个证明 ME 参与油脂积累过程的证据是在卷枝毛霉中用芝麻酚抑制该酶的活性后，将导致油脂从细胞量的 25% 减少到 2%^[70]。Ratledge 等因此论证了 ME 在油脂积累期活性的降低和油脂积累程度的正相关的关系。卷枝毛霉中，ME 的过量表达最近显示增加了油脂积累 2.5 倍，其过量表达是通过构建的甘油醛-3-磷酸的强启动子控制的基因的表达来实现的^[71]。在解脂耶氏酵母中，此酶的基因由 MAE1 基因编码。然而，初步

的研究结果表明, 解脂耶氏酵母中, NADPH 的浓度并不是油脂积累的限制因素^[45]。

1.2.4.3 影响油脂积累的因素

油脂的积累主要取决于微生物的生理, 营养的限制和环境的情况, 例如温度和 pH。同时也被次级代谢产物, 如柠檬酸和乙醇所影响。

从生长向油脂积累的转化的发生通常发生在培养基中的碳源过剩的同时, 一种营养因素的限制影响了生长。解脂耶氏酵母是一种可以积累油脂超过细胞干重 50% 的产油酵母。解脂耶氏酵母和非产油酵母酿酒酵母有不同的生理学的进化过程。酿酒酵母代谢葡萄糖很迅速, 对甘油则较差一些, 对脂肪酸则更差。酿酒酵母利用脂肪酸并不十分迅速。事实上, 酿酒酵母利用脂肪酸为底物时的倍增时间是 4 h。普遍认为造成这种差的油脂利用效率的原因是 β 氧化的能力限制。酿酒酵母不能利用油脂 (TAG 和脂肪酸的混合物) 是因为它没有分配脂肪酶的能力。对于酿酒酵母, 碳源过量的情况下, 将诱导代谢从氧化向氧化还原代谢转变, 从而生成乙醇。在好氧的分批发酵过程中, 酿酒酵母产乙醇的葡萄糖-乙醇的转化产率为 $0.548 \text{ mol}_{\text{etoh}}/\text{mol}_{\text{glc}}$, 最大比生长速率为 0.43 h^{-1} , 平均的乙醇的体积产率是 $3.3 \text{ g/l h}^{[72]}$ 。

解脂耶氏酵母在葡萄糖上生长的最大比生长速率是 $0.26 \text{ h}^{-1[72]}$, 在油酸上生长的最大比生长速率是 $0.33 \text{ h}^{-1[73]}$ 。在碳源过量、营养限制的条件下, 解脂耶氏酵母可以产生大量的三羧酸循环的代谢中间产物, 例如柠檬酸 (CA)、异柠檬酸 (ICA), α 酮戊二酸和丙酮酸。它把过量的碳转化为 TAG。与酿酒酵母相比, 解脂耶氏酵母是一种严格好氧的酵母, 不能生产乙醇。依赖于 C/N, 可以观察到不同的可以控制的代谢类型: 纯粹的生长, 有机酸的产生或者将过量的碳转化成油脂 (三脂酰甘油和甾酯)。通过监测生长, 解脂耶氏酵母中过量的碳源既可以转化成有机酸的生产, 又可以转化成油脂的生产 (TAG, SE)。

油脂的积累, 以油脂的产生曲线, 数量, 产率和转化率来看, 由多种操作条件所影响, 例如本身的营养限制, pH, 通气和温度条件等。假丝酵母 sp.107, 圆红冬孢酵母和解脂耶氏酵母用于油脂积累的已发表的数值如表 1.2 所示, 都是在营养限制的本质下进行的, 如: 氮、镁、锌、铁或磷。但是, 氮源限制是最常用的诱导油脂积累的方法, 并且给出了最好的相对于葡萄糖的转化率, 达到 0.22 g/g 。

这里, 我们将重点讨论氮限制, 这种对油脂积累最有效的营养限制条件。根据酵母的代谢, 培养策略包括两个阶段。第一阶段是生长阶段。酵母的生长然后被氮源限制所减慢, 油脂积累期开始。在分批发酵过程中, 葡萄糖向油脂的总的转化率决定于生长期的持续时间和向积累期的过渡。生长期的时间决定于 C/N。因此, 总体的底物-油脂转化率决定于分批发酵的初始 C/N。对产油酵母圆红冬孢酵母来说, 当 C/N 比从 150 增加到 350 时, 葡萄糖-油脂的转化率从 0.25 到 0.4 ($\text{Cmol}_{\text{lip}}/\text{Cmol}_{\text{glu}}^{-1}$)。然而, 当 C/N 超过 350 时, 将产生严重的氮源限制, 导致细胞在能够进入油脂积累期之前, 细胞的生存能力将快速下降^[74]。

表 1.2 根据营养限制的性质得到的油脂的含量和产率：

假丝酵母 sp.107 (a)，圆红冬孢酵母 (b)，解脂耶氏酵母 (c)

Table1.2 Lipid content and lipid yield as a function of the nature of nutrient limitation for *Candida* sp. 107 (a) *Rhodotorula glutinis* (b) and *Yarrowia lipolytica* (c).

限制因素	酵母	培养模式	含油率 (%)	最大产率 (g/g)	参考文献
氮	a	批式培养	37%	0.22	[75]
氮	c	连续培养	28%	0.11	[76]
氮	c	补料批式	38.6%	0.22	[77]
氮	c	批式	11%	0.017	[78]
氮	b	补料批式	72%	0.255	[72]
碳	a	批式培养	14%	0.07	[75]
磷	b	批式培养	62.2%	0.205	[79]
磷	a	批式培养	31%	0.15	[75]
磷和氮	a	批式培养	35%	0.052	[75]
镁	a	批式培养	32.3%	0.10	[75]
锌	b	批式培养	34%	0.22	[74]
铁	b	批式培养	45%	0.12	[74]

一般来说，适于油脂积累的最适 C/N 比可以由 $\frac{Y_{X/S}}{q}$ ($\text{Cmol}_x \text{Cmol}_{\text{sub}}^{-1}$)，q 是生物质

的含氮量 (NmolCmol^{-1})， $Y_{X/S}$ 是理论的生物质相对于底物的产率，可以表达为在碳源限制，并且没有副产物产生的条件下， Cmol 生物质/ Cmol 底物^[80]。

如果碳源不是限制因素（以过量的形式存在），碳源的吸收仅由细胞内底物运输系统所限制。在这种情况下，培养基中氮源浓度的限制将诱导油脂的积累。发现解脂耶氏酵母中促使油脂生产的临界碳源浓度大约是 10^{-3}mol^{-1} ^[72]。氮源浓度超过阈值是很重要的，这样可以阻止下一级代谢产物（柠檬酸）的产生，否则，将影响油脂的积累。

相反，如果细胞外供给的碳源被消耗掉，贮存的油脂将被调动。因此，油脂的积累总是依赖于碳源底物的流向。在这种情况下，油脂的积累总是伴随着柠檬酸的产生。这些发现强调了掌控碳源和氮源的流向的重要性，这可以获得最佳的油脂的积累，并减少柠檬酸的产生。

除了营养因素的限制以外，小分子也可以调控微生物油脂的生产，近年来有许多报道。Papanikolaou 等发现橙精油的添加可以大幅度降低酵母 *Y. lipolytica* 的生物量，使饱和脂肪酸量增加^[81]。Kimura 等研究了香料对 *L. starkeyi* 产油的影响情况，结果表明，小分子物质如茴香脑等提高产油微生物的生长和油脂积累，提高量为 10-46%^[82]。赵宗保等考察了色醇对 *L. starkeyi* 产油的影响，其可以使油脂量提高 13.9%^[83]。小分子化合物

调节油脂的生产，简单易行，而且可以用于研究油脂的代谢调控机理。

油脂的组成可以通过调整温度来改变^[84]。脂肪酸的成分，取决于培养的温度，因为饱和度随着培养的温度的降低额减少。例如，圆红冬孢酵母在 15°C 可生产 $0.44 \text{ g}_{\text{AGI}} \text{ g}_{\text{AG}}^{-1}$ 饱和的脂肪酸，但在 30°C 则为 $0.44 \text{ g}_{\text{AGI}} \text{ g}_{\text{AG}}^{-1}$ ^[73]。这种油脂成分的调整可能是由于在低温下脱饱和酶的稳定性的增加，而其他的酶则没有观察到这种现象。然而，低温并不适合油脂的生产，因为它同时也导致细胞内的活性和代谢的大幅度的降低。对于脂肪酸成分的调整的基因调整的替代措施还不多。其中的一种替代措施是使用生长的抑制剂，例如，浅蓝菌素，或者是天然的杀菌剂，例如，香科的提取物。

1.2.5 提高油脂积累的培养模式

对于不同的产油微生物，其产油的代谢路径不同，但针对于较复杂的解脂耶氏酵母，作为产油微生物的模型来说，考虑到这种酵母能产生大量的中间代谢产物，积累大量的油脂并且可以把他们通过 β 氧化降解。可以根据在氮流一定的情况下的不同的 C/N，划分成四种不同的代谢状态（图 1.3）。第一种情况是碳流比生长所需要的少。在这种情况下，如果细胞有贮存的油脂，他们将通过调用贮存的脂类来补充这部分缺少的碳（图 1.3，情况 a）。第二种情况是，在限定的氮流速率的情况下，恰好能获得最适的碳流达到最大生长速率。这种情况下将导致最大的生物量的生产（图 1.3，情况 b）。第三种情况是，在一个有高的 C/N 比的培养基中，流入过量的碳源，从而导致生物量的降低和高水平的优势的产生（图 1.3，情况 c）。第四种情况是由一个更高的 C/N 造成，导致油脂积累的抑制，形成次级产物（图 1.3，情况 d）。如果所要的最终产物是油脂，那么过程就应该保证所吸收的碳源最大程度的转化为油脂，减少副产物（柠檬酸）的生产，增加油脂的合成，是细胞保持在状态 c^[45]。

经常使用三种各不相同的培养模式：分批培养，补料分批培养以及连续培养，以前出版文献的大多数过程都是分批培养。

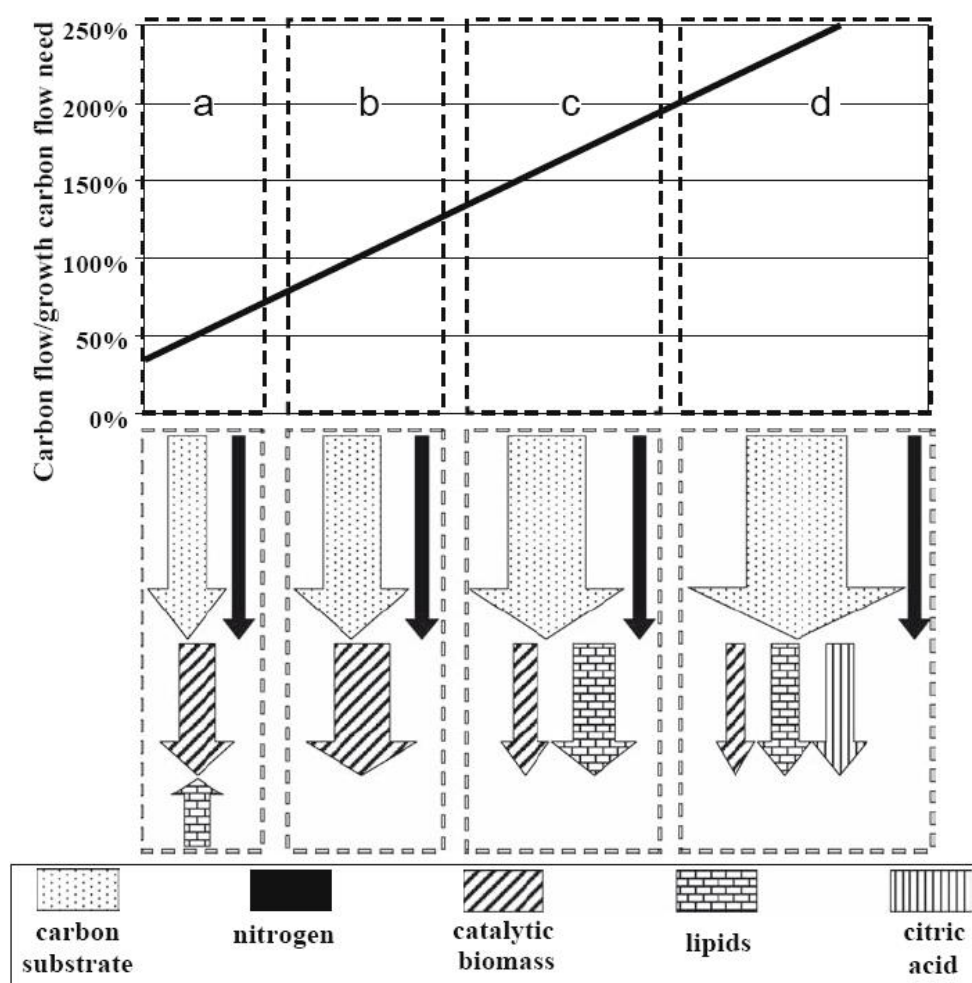


图 1.3 在固定碳流的情况下根据碳流做出的酵母的活动图^[45]

Fig. 1.3 Yeast activity as a function of carbon flow rate for a fixed nitrogen flow rate.

1.2.5.1 分批培养模式

在分批培养中，微量元素和碳源最初在反应器中混合，拥有一个高的 C/N 以提高油脂的积累。由于氮源从培养的开始就被积极的消耗， r_C/r_N （剩余的碳与剩余的氮的比）不断地增加，趋向于无穷大。这种模式下，生长保持是对数生长，同时氮源不限制（图 1.3，情况 b）。Granger 给出，在 30°C 葡萄糖上培养圆红冬孢酵母，氮源的限制将导致底物的消耗速率下降 4 倍，油脂产生速率增加 2 到 3 倍。微生物的代谢然后转移到图 1.3 的情况 c。然而，柠檬酸的产生是根据 r_C/r_N 来诱导的，从而导致了微生物的代谢向情况 d 转移（图 1.3）。柠檬酸的产生降低了从碳源到油脂的总的转化率。因此，转化率主要取决于生长期生物质的组成和油脂积累期积累的油脂的比率。所以，控制消耗的碳源和氮源的比率是阻止柠檬酸的产生所必须的，从而可以看出在连续培养和补料分批培养中调节 r_C/r_N 的重要性^[45]。

目前，文献报道的产油发酵方式主要为批式发酵，但是在批式培养过程中，菌体生长要受到培养基中初始营养物浓度的限制。但简单的提高限制性营养基质的浓度，可能

不仅达不到提高菌体量的效果,反而会对细胞的生长产生毒害作用。这就是说,用批式发酵的方法很难得到较高的菌体浓度和油脂产量。所以,连续培养,补料分批培养以及一些其他的培养方式也常研究。

1.2.5.2 连续培养模式

C. curvata D 在以葡糖糖和木糖为培养基连续培养的条件下油脂的产率分别为 0.16 和 0.27 g L⁻¹h⁻¹[85]。Raledge 等采用在稀释率为 0.02 h⁻¹ 的连续培养时,细胞的含油率为 35%,但当提高稀释率为 0.1 h⁻¹ 细胞的含油率降低为 15%^[86]。Ykema 等采用乳清废弃物为原料,采用部分 *Apiotrichum curvatum* 细胞循环的连续发酵模式进行油脂的生产^[87]。

Ykema 等已经建立了在连续培养解脂耶氏酵母过程中油脂生产的模式。在连续培养时,对于一个固定的稀释率来说,培养基中的 C/N 以及是 rC/rN 恒定的。对于低的稀释率,中间的 C/N 可以促进油脂的积累,得到的油脂和生物质的浓度要比在更高的稀释率下高。实际上,在一个相似的 rC/rN, 的的比生长速率有利于油脂的生产。因此,过程的优化包括在最适的 C/N 下,确定最佳的稀释率(图 1.4)^[45]。

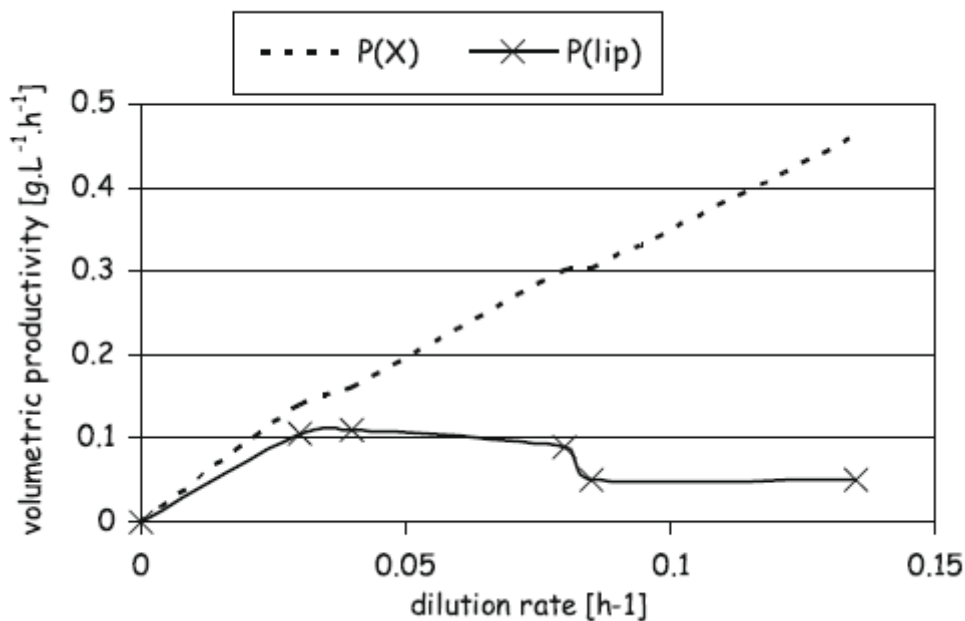


图 1.4 解脂耶氏酵母在工业甘油培养时生物量和油脂的体积产率—稀释率图

Fig. 1.4 Volumetric productivity of *Y. lipolytica* biomass P(X) and lipid P(lip) plotted against dilution rate on industrial glycerol.

1.2.5.3 补料分批培养模式

补料分批发酵可以达到较高的菌体浓度,从而提高单位体积的油脂量。梁燕娜等在以甘油为底物, *C. curvatus* 为菌种,产油时,批式发酵时生物量为 6 g/L (20 g/L 甘油),提高甘油浓度到 40 g/L 后,菌体收到显著的抑制;但在甘油的初始浓度为 30 g/L,经多次补料后,菌体干重可以达到 30 g/L 以上^[61]。

R. glutinis 在通入富含氧气的补料分批发酵的产率达到 $0.88 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ^[88]; Jie Zhang 等在 30 L 的发酵罐中, 采用补料批式的发酵方法, 以葡萄糖为底物, *Cryptococcus curvatus* O3 为菌种, 进行微生物油脂的发酵, 发酵进行 185 h 时, 细胞量, 含油率和油脂产率分别为 104.1 kg m^{-3} , 827 g kg^{-1} , and $0.47 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ^[89]。赵宗保等用 15 L 的反应器, 培养圆红冬孢酵母 Y4 达 134 h 时, 细胞的干重, 油脂含量和油脂的产率分别为 106.5 g l^{-1} , 67.5% (w/w) 和 $0.54 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ^[90]。赵宗保等利用不同方式的补料批式方式培养, 用 *R. toruloides* 生产油脂时, 间歇补料的产率为 $0.36 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, 恒定葡萄糖浓度的补料的产率为 $0.57 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, 反复批式发酵的产率为 $0.55 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ^[91]。

使用酵母生产油脂可以保证油脂的生产是有效地, 并且是可再生的。如果要控制油脂的生产, 那么调节环境的变量使代谢状态达到稳定是必须的。这种稳定的状态可以通过精确控制营养流的流速来获得。营养流速控制的越精确, 代谢状态的控制越好, 就越适于生产, 这和蛋白质的生产过程是一样的。

在补料分批培养中, 氮和碳流都被监控以控制最适的比生长速率和 r_C/r_N 。如图 1.5^[45] 所示, 对解脂耶氏酵母在 28°C 以葡萄糖为底物进行补料分批培养时经历了 3 个阶段: 纯粹的生长期 (i), 过渡期 (ii), 油脂积累期 (iii)。

在生长期, 酵母代谢将使碳源的在四种主要的大分子池中进行分配, 同时伴随着生物量的生长 (没有大分子复合物的积累的)。这一时期和图 1.3 的情况 b 相符合。

过渡期和氮源的限制的建立相符, 将过量的碳转化成积累的油脂。这一时期和情况 b 向情况 c 转变的情况相符合。油脂积累期是最广的, 和在恒定的氮的限制的条件下建立的油脂的积累是一致的, 此时的 C/N 为 20 Cmol/Nmol。

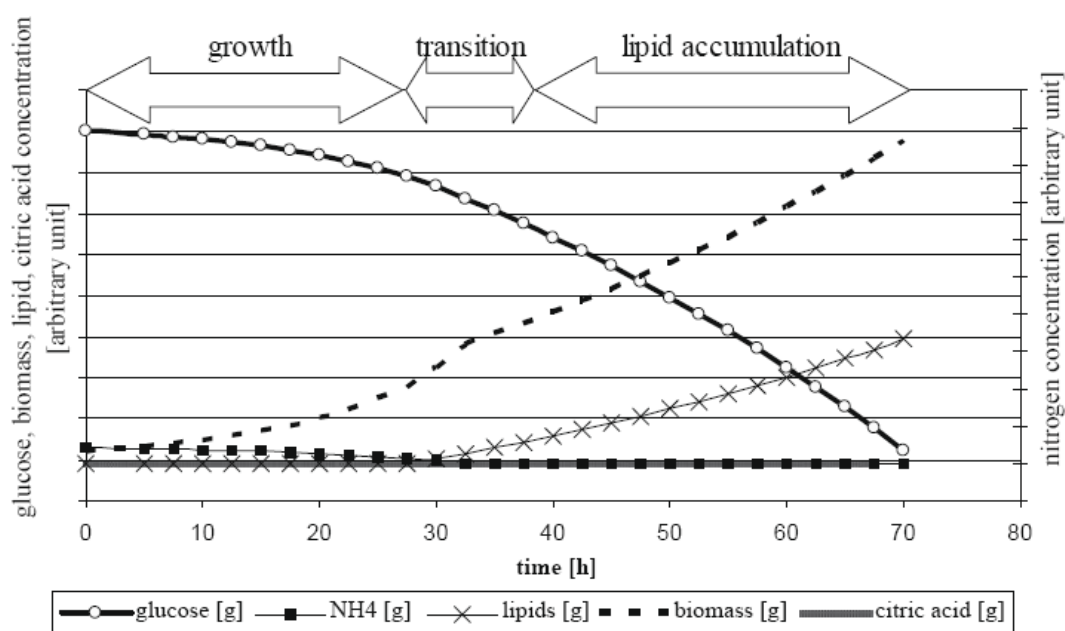


图 1.5 补料分批培养解脂耶氏酵母的模型和预测^[45]

Fig. 1.5 Modeling and prediction for a fed-batch culture of *Y. lipolytica*.

1.2.5.4 两阶段培养模式

Ming-Jie Jin 等采用两阶段培养高山被孢霉生产花生四烯酸的过程中,采用两阶段的条件控制策略,当在培养 5 天以后,将转速降低和通气量提高,转速由 180 rpm 降低到 140 rpm,通气量由 0.6 vvm 提高到 1.0 vvm^[92]。这样,可以降低对菌丝的破坏,并延长稳定期的时间。Michael J. Hall 等采用两阶段培养假丝酵母 107,其过程为,在第一个反应器中,采用氮限制的培养基进行培养,然后把所有的培养液按比例 37.5%(v/v) 转接入第二阶段,之后加入葡萄糖进行油脂的积累,得到较好的结果^[93]。赵宗保等同样采用两阶段发酵法生产微生物油脂,其过程的区别为,在第一阶段菌体生长到一定程度后,离心分离,直接将菌体细胞转入下一阶段的培养,之后加入葡萄糖进行油脂的生产,其在圆红冬孢酵母和斯达油脂酵母中都取得了较好的应用^[94, 95]。

1.2.5.5 固态发酵模式

除液体深层发酵的模式外,近期,科研工作者们也正在探索将固态发酵模式用在微生物油脂的发酵过程中。陈洪章等用蒸汽彭爆预处理的小麦秸秆为原料,接种一株既可以分泌纤维素酶又可以生产油脂的菌株,最终的油脂得率达到 42 mg/g 干物质^[96]。Vayenas 等应用一种半固态的发酵模式,使甜高粱转化为微生物油脂,油脂得率是 110 mg/g 干物质^[52]。赵宇华等以小麦秸秆为底物,米曲霉 *Aspergillus oryzae* 为菌种生产微生物油脂,得到的油脂得率是 62 mg/g 干物质^[53]。

然而固态发酵放大过程中遇到很多问题,这些问题必须在放大之前在实验室规模上得到逐一解决。迄今为止,对大规模固态发酵中微生物的生长和油脂合成的影响因素研究较少。两个主要因素是:质量传递(包括氧传递到细胞内部和基质及酶在固体内部的传递)和发酵过程中热量的移除。一般来说,研发出合适的固态发酵涉及到如下多个步骤:(i)分离,筛选和选择合适的微生物;(ii)在实验室规模上优化物理-环境因素,营养参数,确定成熟的流程操作;(iii)中试放大研究;(iv)商业放大;(v)建立工厂,解决运行过程中遇到的任何问题;(vi)日常运行生产微生物代谢物。放大后遇到的问题主要是:生物量的变化,大量种子液的制备,灭菌,通气,搅拌,维持热和水平衡,pH 控制,避免污染,均匀性,后处理,废水和废弃物处理。然而固态发酵生产多聚不饱和脂肪酸仍然是一种行之有效的方法,其风险投资和成本可能大幅降低^[97]。

1.2.6 含油微生物的收获方式及发酵废水的处理

尽管各国的研究者们都在应用农林废弃物等廉价、易得的原料来生产微生物油脂,以降低生物柴油的生产成本。并研究各种发酵方式对油脂生产的影响,希望在短时间内得到较高的产率。但是除此之外,还有两点需要引起人们注意,并集中研究的问题,那就是含油微生物的收获方式,以及最后油脂提取后的废液的处理。

微生物油脂,包括微藻油脂和酵母来源的油脂等,目前转化为生物柴油在经济上不可行的一个主要的原因就是,高的成本价格的含油细胞的收获。虽然目前很多的分离方法正在发展,但最常用的方法还是离心分离的方法。Zittelli 等研究表明,对于在开放的池塘的微藻来说,离心分离花费大约占成本的 30%^[98]。所以, Sina Salim 等采用生物絮

凝的方法来收获分离微藻细胞^[99]。Chunjie Xia 等采用调节 pH 的方法, 使 *Mucor circinelloides* 细胞成球化, 这样可以更容易的收获含油的微生物菌体^[100]。

另一方面, 微生物油脂时存在于微生物细胞内的产物, 所以这就意味着, 在微生物细胞被收获后, 会产生大量的废弃的溶液。如果油脂发酵过程可以生产出 60-80 g/L 的生物量, 这也就意味着发酵体积 90% 以上的发酵液将被作为废弃物抛弃。这样的废水中, 含有很多未被微生物利用的有机质, 若直接抛弃会造成环境污染, 所以必须建立一个厌氧的污水处理系统来进行处理, 这无形中增加了生产成本^[101]。

1.3 循环利用发酵废水的反复批次发酵模式

1.3.1 循环利用发酵废水的反复批次发酵模式的发展

一般的工业发酵过程都是一个非常耗水的过程, 而发酵废液也是具有很高的生化需氧量 (BOD) 的废水。这些大量的污水的处理, 不仅费用高昂, 而且需要投入大容量高功率的处理设备。所以, 对发酵工艺来说, 不仅要节约本来已经较高的生产成本, 而且要限制发酵废液的 BOD 的值, 减少废水处理的费用。这就要求在发酵的过程中, 减少发酵废水的排放, 提高相对于排出的单位废水的产率。从这些方面考虑, 循环利用发酵废水是很具有经济意义的^[102]。

发酵废水的回用的另一个优点是得到高的底物转化率, 这对于生产时需要某一特定的底物 (碳源或氮源) 的高浓度的发酵过程更具优势。如生产氨基酸的发酵需要较高的氮源, 生产微生物油脂的发酵需要较高的碳源^[103]。此外, 这种发酵方式的优点就是减少新鲜水的用量。这一优点在通常情况的经济效益不是那么明显, 但是在水资源相对匮乏的地区, 这一优势是显而易见的。

循环利用发酵废水的最主要的障碍, 可能就是发酵过程中抑制物的积累, 包括发酵培养基的组成, 细胞的代谢过程和裂解过程的分泌物, 这些物质的积累都有可导致抑制物的累积。而这些抑制物的积累可能会导致发酵性能降低。尽管, 在理论上, 人们已经从生物化学的角度讨论了回收发酵废液的可能的障碍, 并且提出了一系列的解决问题的方法^[104], 但是在各种产品的发酵过程中, 真正进行发酵液回收利用的尝试很少。

1.3.2 循环利用发酵废水的反复批次发酵模式的应用

目前报道的关于反复循环利用发酵废水的这种反复批次发酵模式虽然自 20 世纪 80 年代就有报道, 但数量不多, 并且仅限于很少一部分发酵产品。Babu P 等在 1991 年时, 研究胞内青霉素酰胺酶的发酵时, 采用回收 40-60% 的发酵废液的方法, 循环进行了 3 次, 并且对产物的合成无任何抑制作用^[105]。大肠杆菌在回收的发酵液配制的培养基中生长不好, 这是由于乙酸的积累达到了一个抑制水平, 抑制了大肠杆菌的生长; 但相同的发酵废液在培养 *Candida brussicae* 时则不会产生这种现象^[106]。赖氨酸生产的发酵废液被回用后, 可以代替 10% 的新鲜培养基, 并且对赖氨酸的生产无影响^[102]。

这种循环利用发酵废水的反复批次发酵方式应用最多的还是在乙醇生产工艺过程中。在连续培养酿酒酵母进行乙醇发酵的过程中, 原位的回收乙醇并且进行全部的未发

酵利用的培养基的回收利用。结果发现在连续进行了 40 天后, 未发酵的糖以及离子的浓度最终达到了抑制浓度, 而且这种抑制作用可以通过添加酶解和离子去除的两个步骤来解除^[107]。赵堂明采用葡萄酒白兰地生产后的蒸馏乏水重新进行白兰地的发酵生产, 得到了很好的效果^[108]。赵紫华等采用粗制复合酶对酒糟进行处理后, 作为营养重新利用, 可节约酒精生产成本 50 元/吨^[109]。而对乙醇生产过程中产生的蒸馏废水, 大家分别采用不同的方法进行处理后进行回用, 并取得较好的结果。包括超滤^[110]、微滤^[111]、生物絮凝^[112], 以及两阶段的厌氧发酵^[113]等方法处理发酵后的蒸馏废水后, 发酵废液可以循环利用十个批次以上, 并且乙醇的产量和采用自来水配制的培养基的结果基本相当。

近年来, 在其他方面的发酵过程中, 这种反复利用发酵废液的研究也有报道。柠檬酸发酵工业中排放的发酵废水—中和废水, 由最初的生产单细胞蛋白等转向循环利用, 结果证明循环利用是可行的, 对柠檬酸的生产基本无影响, 但对发酵培养基的物理流变性能等具有一定的影响^[114]。在威兰胶的生产过程中, 循环利用纯化过程产生的废水, 对产品的产量以及发酵液的粘度等特性的影响都在可允许的范围内^[115]。

但在微生物油脂的生产过程的反复循环利用模式的报道很少。Tzu-Yin Hsiao 等采用培养产油酵母 *Apiotrichum curvatum* 研究过反复利用发酵培养基对微生物产油的影响^[103]。其结果表明, 在合成培养基中, 每次回收 75% 的废水和盐离子, 发酵可以连续进行 7 个周期, 并且不影响油脂的产量。但当应用于乳清渗透液时, 只能维持两到三次, 发酵性能大大降低。但是其采用的分离方法为常规的离心分离, 并且每个周期之前都要进行灭菌处理, 同时对其他生产微生物油脂的菌株是否具有相似的特征, 并没有进行研究过。

1.4 课题研究的意义与内容

生物柴油是可再生、可持续发展且具有环境友好特点的备受人们关注的石油燃料的替代能源, 然而, 原料成本是生物柴油发展的主要瓶颈。生产生物柴油的原料通常是可食用的植物油, 价格高昂, 而且会造成“与人争粮”的局面, 进一步造成经济和社会的不稳定。同时, 包括细菌、霉菌、酵母以及藻类在内的一类微生物可以积累超过自身干重 20% 的油脂, 组成类似植物油脂, 同时具有生产所需周期短、需要的条件温和、不受耕地和环境限制、劳动力需要量少等一系列的优点, 而成为生物柴油生产过程中最具有实际应用价值的原料。

迄今为止, 科研工作者们对微生物油脂从多个方面进行了研究。包括微生物油脂生产的代谢路径的探索, 不同产油微生物的发现和耐高温、耐木质纤维素原料中的抑制物的菌种的选育, 发酵培养条件的探索, 包括氮限制中的最适 C/N 比的优化, 替代氮限制的磷限制、硫限制、锌限制等替代营养限制的研究, 溶氧水平的控制等。而这众多研究方面中最重要的研究就是, 探索替代高成本的葡萄糖的底物原料来生产微生物油脂和采用不同的发酵方式来提高菌体的浓度和油脂的产量, 进一步降低油脂的成本。

对于微生物油脂生产的原材料, 目前的研究报道有很多, 包括农林废弃物, 其他非

粮原料, 以及一些工业的废弃物中的有机物质。木质纤维素生物基原料来源丰富、价格低廉, 常被用作废弃物所抛弃, 所以应用木质纤维素进行能源化利用引起人们的极大兴趣, 越来越多的研究将纤维素原料转化为生物油脂, 或直接转化贮藏于微生物体内的生物柴油。另一方面, 含有高糖量的、适合在恶劣环境下生长的菊芋、木薯等也被用作微生物油脂生产的原材料。同时, 还有一些工业副产物, 如甘油、乳清渗透物、活性污泥等也被用作微生物油脂生产的原材料。这在整个过程中, 人们克服了一系列的困难, 包括通过各种工程途径, 使原料的 C/N 适宜微生物的生长和产油等。

目前, 据文献报导的微生物油脂的发酵方式主要有液体发酵以及少量的固态发酵。液体深层发酵最常见的有: 分批发酵、连续发酵、不同方式的补料发酵、两阶段发酵。也有一些研究利用细胞的成球化等一些新型的方法进行油脂的生产。

尽管目前微生物油脂的研究几乎涉及微生物油脂生产的各个方面, 但是关于油脂细胞的收获方法以及怎样减少微生物油脂生产过程中的废水量, 或者重复利用油脂发酵上清废水的研究很少。同时, 在采用木质纤维素原料或菊芋等生产油脂时, 都需要额外添加水解酶类获得可发酵利用的糖, 而这些酶的价格昂贵, 这样就部分抵消了原料的廉价所带来的优点。所以, 怎样减少水的用量, 减少废水量, 以及简易快速的收获细胞, 回收利用水解酶类至关重要。

本文所研究的伴有细胞分离的反复批次发酵, 是通过反复利用去除产物后的发酵上清的的发酵方式生产油脂的发酵模式, 这样就可以节约水用量, 减少废水的排放。同时这种发酵方式对一些特殊的原材料, 如纤维素原料和菊粉原料的发酵具有特殊的优势, 可以回用发酵液中的水解酶类。

反复利用去除发酵产物后的发酵上清液生产油脂的发酵模式是指, 在批式发酵进行结束后, 采用离心分离或絮凝沉降等其他分离方法, 将含有油脂的菌体和发酵液上清分离, 菌体用于油脂的提取, 在发酵液的上清添加发酵基质进行下一批次的发酵, 连续循环多个批次。

这种发酵方式在以纤维素为原料的油脂发酵中具有重要的意义。目前报道的在利用纤维质生物原料进行发酵中通过预处理、脱毒等工艺后, 已经取得较好的成果, 油脂产量是脱毒之前的 2 倍, 但在这一过程中仍有一系列的问题: 纤维素的酶用量大, 使油脂成本升高; 纤维素发酵时, 利用水解糖化液进行发酵时, 采用糖化—离心—上清发酵的程序复杂; 同时若要采用和纤维素乙醇发酵工艺的同步糖化发酵^[8]时, 由于溶氧等各种限制性因素, 很难达到高固含量的发酵。应用这种新型的发酵模式, 就可以解决以上两个问题, 首先可以实现酶的重复利用, 降低成本; 其次通过反复的培养模式最终达到高固含量纤维质材料发酵的目的。

本文主要研究连续的新型发酵模式对油脂生产的影响, 包括这种新型发酵模式对以葡糖糖和菊粉为碳源的合成培养基的发酵的影响; 采用絮凝沉降的方法代替离心分离的分离方法, 以实现最终连续循环的过程。这种新型的循环利用发酵废水的发酵模式有很多的优点: 可以形成一个循环的体系, 使培养基反复利用, 从而达到节水的目的; 通

过此种发酵模式，可以省去反复的种子培养的时间，从而节约时间，节约成本。

第 2 章 材料与方法

2.1 材料与设备

2.1.1 菌种

本实验室从出发菌株 CGMCC 的皮状丝孢酵母 2.1374, 自行筛选的突变菌株皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX1。

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
98%浓硫酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
浓盐酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司
NaOH	AR	上海振兴化工厂
消泡剂	AR	上海飞达贸易有限公司
葡萄糖	食品级	秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司
菊粉	食品级	朗瑞精细化学品有限公司
D-葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
琼脂	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
甲醇	AR	上海振兴化工一厂
三氯甲烷	AR	上海化学试剂有限公司
壳聚糖	BR	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
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
丙三醇	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司

95%乙醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
考马斯亮蓝G250	AR	上海申能博彩公司
牛血清蛋白	AR	天根生化
	Lot number	
糖化酶	7201417190	购买于杰能科生物有限公司（中国苏州）
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

其中，菊粉通过在其酸水解液中测定还原糖浓度，方法为，加入 5 M 的硫酸调节 pH 到 1-2，然后在 100°C 水浴两个小时，通过 HPLC 测得的还原糖的量为，1 g 菊粉水解产生 0.23 g 的葡萄糖和 0.78 g 的果糖。称取 1 g 壳聚糖（脱乙酰度 80-95%）溶解于 100 ml 的 1% 的醋酸溶液，获得作为絮凝剂的壳聚糖醋酸溶液。

2.1.3 培养基

YPD 培养基：葡萄糖 20 g/L，蛋白胨 10 g/L，酵母粉（Yeast Exact, YE）10 g/L，琼脂粉 10 g/L，pH 值为 5.8~6.0，115 °C，灭菌 20 min。

种子培养基：酵母粉 0.5 g/L，葡萄糖 20 g/L，(NH₄)₂SO₄ 5.0 g/L，MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L，KH₂PO₄ 1.0 g/L，pH 值为 5.8~6.0，115 °C，灭菌 20 min。

发酵培养基：葡萄糖或菊粉，(NH₄)₂SO₄ 的量根据实验中具体的碳氮比确定，KH₂PO₄ 1.0 g/L，MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L，YE 0.5 g/L，115 °C，灭菌 20 min。

2.1.4 实验仪器

如表 2.2 所示。

表2.2 实验仪器

Table 2.2 Experiment equipment

仪器名称	规格	生产厂家
电子天平	BS423S	北京赛多利斯
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore公司
超声波脱气机	KWT-100A	科伟达
高效液相色谱	LC-20AD	岛津
洁净工作台	100级SW-CJ-IBU	上海博迅公司
生化培养箱	LRH-150	上海一恒科学仪器
超低温冰箱	86C	Thermo公司
气浴恒温振荡器	SHZ-82	金坛亿通电子

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
分光光度计	DU-800	Beckman公司
台式低速冷冻离心机	5415R	Eppendorf公司
高速冷冻离心机	J-26	Beckman公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9203A	上海一恒科学仪器
旋转蒸发仪	R205	上海大颜仪器设备有限公司
水槽	ZC	宁波天恒
pH计	PHS-3C	雷磁
制冰机	XB100	GRANT公司
冰箱	BCD-215KA	海尔公司
旋涡混合仪	XW-80A	江苏海门市其林贝尔公司
落地恒温振荡摇床	HZ-9311K	太仓华利达
蠕动泵	BT-100-1J	保定兰格恒流泵有限公司
四联发酵罐	BIOTECH-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 菌种保藏

长期贮藏：YPD培养基，活化培养24 h，在1 ml的冻存中加入0.5 ml的甘油和0.5 ml的菌体，混合后，置于-80°C长期保藏。

短期贮藏：取长期贮藏的酵母菌，划线于固体 YPD 培养基平板中，置于 30 °C 培养箱中培养 24 h，待长出的菌落大小合适时，4 °C 保藏。并于 2 星期内使用。

2.2.2 种子培养

一级种子的制备，从短期贮藏的平板上，用牙签挑单菌落，接种于100 ml液体种子培养基中，与30°C摇床中，180 rpm，培养24 h。

在100/500 ml的摇瓶体系中，以10% (v/v) 的接种量接入一级种子，与30°C摇床中，180 rpm，培养24 h，用作二级种子。

2.2.3 发酵和细胞分离实验

所有发酵实验在保兴公司生产的3 L的发酵罐体系中进行，其pH、溶氧（DO）、温度都是自动控制的。发酵条件为：将二级种子以10%的接种量接入发酵罐中，控制pH为5.0，通气量为0.8 vvm，溶氧大于20%，30 °C发酵。定期取样35 ml，其中1 ml用于离心，测定菌浓和上清液中的还原糖含量；30 ml在10,000 rpm离心5 min，菌体用于油脂的提取。

在反复批次发酵实验中，每个批次发酵结束后，取100 ml的发酵液作为下一个批次的种子，其他的发酵液通过分离，将发酵液上清重新添加到发酵罐中，并添加发酵培养基相同的物质，控制发酵条件进行下一个批次的发酵实验。

发酵液中细胞分离的方法为离心分离和絮凝分离。离心分离的方法是，在无菌的条件下，采用4,000 rpm的条件下，离心5 min，把上清和菌体进行分离。对于絮凝分离，在上一批次的发酵实验结束后，取出下一批次的种子后，停止通气，加入适量的絮凝剂，300 rpm搅拌3 min，关闭搅拌，让菌体自由絮凝下降，30 min后，絮凝的菌体沉到罐底，将上清用蠕动泵泵入另一罐中，添加营养，继续发酵。

2.2.4 絮凝效率评价试验

根据郭晨等的对絮凝评估的方法^[116]，采用 25 ml 的发酵液体系，在容器的高径比为 H:D=6 的情况下，分别加入不同量的 10 g/L 壳聚糖醋酸(1%)溶液，迅速混匀后静置，不同的时间点取样，在 600 nm 下测吸光度 OD；并测量明显的分层界面的高度。

计算：

$$\text{絮凝率(Flocculation Rate, FR)} = \frac{OD_{0\min} - OD_{t\min}}{OD_{0\min}} \quad (\text{公式 1})$$

$$\text{沉降率(Sedimentation Rate, SR)} = \frac{H_{0\min} - H_{t\min}}{H_{0\min}} \quad (\text{公式 2})$$

其中 $OD_{0\min}$, 0 时刻的 OD 值； $OD_{t\min}$, t 时刻的 OD 值； $H_{0\min}$, 0 时刻的液面高度； $H_{t\min}$, t 时刻时界面的高度。

2.2.5 絮凝剂对菌体生长和产油影响试验

絮凝剂对菌体生长的影响试验，在 50/250 ml 的体系中，在初始时分别加入不同量的壳聚糖醋酸絮凝剂，30°C，180 rpm 的条件下培养，定期取样，测定菌体浓度，即 600 nm 下的吸光值。

絮凝剂对微生物菌体产油的影响：在 3 L 的发酵罐中，用发酵培养基，控制培养条件，将菌体培养至 24 h，取出，转接至 35/50 ml 体系，加入不同量的絮凝剂，30°C，180 rpm，继续培养 72 h，测定菌体含有率。

2.3 分析与测定方法

2.3.1 糖浓度的测定

培养基中的糖浓度的测定使用高效液相色谱（岛津）进行分析，检测器是示差检测器（RID-10A），色谱柱是Bio-rad Aminex HPX-87H柱，柱温 65°C，流动相采用 0.005 M H₂SO₄，流速 0.6 ml/min。

经精确配制并稀释的标准糖溶液，经 0.22 μm 的滤膜过滤后，按照从低到高的浓度梯度进样 20 μL。根据谱图，获得各类糖的出峰时间，同时根据峰面积的大小和浓度的关系，做出标准曲线。

待测样品，同样经0.22 μm 的滤膜过滤后，以相同的进样体积进样，对比标准曲线中的出峰时间，根据峰面积和标准曲线计算出样品中的糖浓度大小。发酵过程中的葡萄糖和果糖的浓度都可以直接通过液相测出。

而以菊粉为原料的发酵上清中总糖的浓度的测定，则需要根据文献^[117]进行水解，即将样品通过加入 5 M 的硫酸调节 pH 到 1-2，然后在 100°C，水浴两个小时，再通过 HPLC 测得水解后的葡萄糖和果糖的量，从而计算出总糖的量。

2.3.2 菌体浓度测定

菌体浓度通过采用分光光度法进行间接测定，即测得在波长 600 nm 时的吸光值 (OD)。将 1 ml 样品在 12,000 rpm 离心 5 min，菌体重新用去离子水悬浮后，离心，重复两次进行清洗，最后用 1 ml 去离子水悬浮，使用 DU800，以去离子水为空白对照，测得 600 nm 的吸光值。

2.3.3 菌体干重测定

每 12 h 取样 35 ml，其中 30 ml 的发酵液，10,000 rpm 离心 5 min，用去离子水洗涤两次，用 5 ml 去离子水重新悬浮后置于平皿中，在 80°C 的条件下烘干至恒重，采用差重法测的干重。

2.3.4 油脂量测定

测定油脂的方法为酸热法裂解细胞—有机溶剂萃取的方法^[118]，具体操作过程为：在含有烘干后菌体的培养皿里加入 4 M HCl 共 5 ml，浸泡 30 min，转移至离心管中 (50 ml)。沸水浴中持续煮沸 10 min，并迅速放入冰水的混合物中进行速冷，待冷却至室温后，添加 20 ml 萃取剂 (甲醇:氯仿=1:2)，混合并封口，置于恒温气浴摇床中，180 rpm 震荡 30 min，10,000 rpm 离心 5 min；下层有机相通过玻璃针管抽取后，转移到茄形烧瓶中，在 80°C 下通过旋转蒸发，代替文献中相对较弱的用于动物脂肪提取的真空干燥的方法，除掉氯仿等萃取剂，烘干至恒重，采用差重法，计算油脂的含量。结合菌体干重的数据，计算出菌体细胞的含油率。

2.3.5 蛋白含量测定

蛋白含量测定采用 Bradford 法^[119]。

(1) 配制 Bradford 试剂：称 100 mg 考马斯亮蓝 G-250，溶解于 50 ml 95% (wt/vol) 的乙醇，加入 85% (wt/vol) 的磷酸 100 ml，定容至 1 L，用 Whatman 1 号滤纸过滤，终溶液中的考马斯亮蓝 G-250 的含量为 0.01% (wt/vol)，乙醇的量为 4.7% (wt/vol) 磷酸的量为 8.5% (wt/vol)，此即 Bradford 试剂，放置于棕色试剂瓶内，并在 4°C 避光保存。

(2) 标准曲线的建立

准确称量 0.1002 g (实际测量值) 标准牛血清蛋白 (BSA)，超纯水溶解，定容在经重铬酸钾洗液清洗干净的 100 ml 容量瓶中，混匀后，以 500 μ L 的体积分装在 1.5 ml 的离心管中，-80°C 保存。

取出一支约为 1 mg/ml BSA 标准溶液，融化后，震荡混匀。在试管中分别加入 0、2.5、5、7.5、10 和 12.5 μ L，用超纯水补充至 0.2 ml。分别加 2 ml Bradford 试剂，混匀，静置 5 min，在 595 nm 出测吸光值。根据 BSA 的加入量和吸光值测定蛋白浓度标准曲线。如图 2.1 所示。

(3) 样品的测定

取 200 μL 的样品，加入 2 ml Bradford 试剂，混匀，静置 5 min，在 595 nm 出测吸光值，根据标准曲线计算出蛋白质含量。

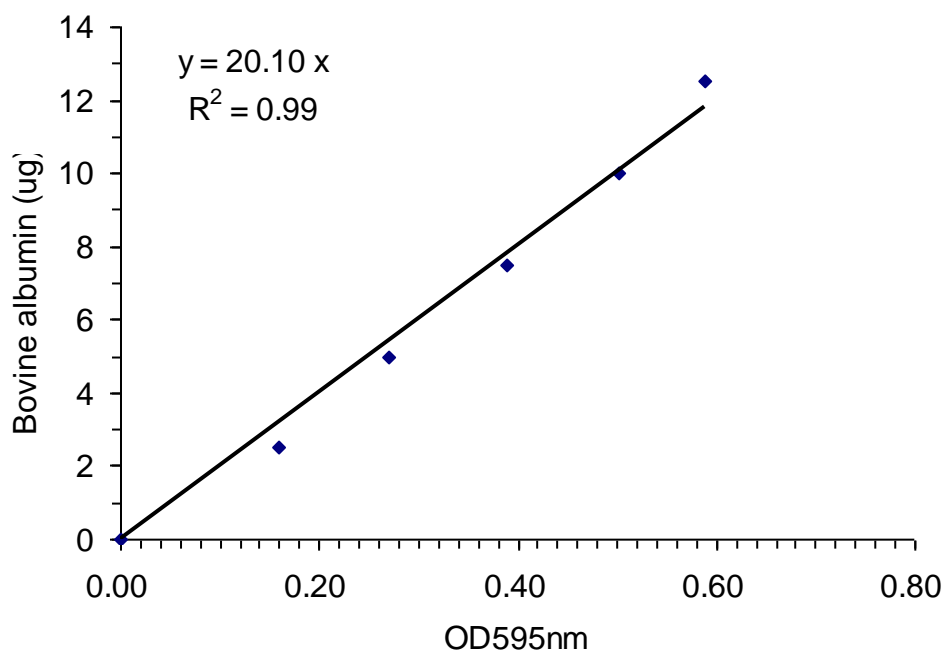


图 2.1 Bradford 法测定蛋白质的标准曲线

Fig. 2.1 The standard curve of protein concentration determined by Bradford method

2.3.6 糖化酶酶活测定

以菊粉为基质，糖化酶的酶活为 20 U/ml，其中液体糖化酶的酶活单位定义为：在标准条件下（60 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 4.0）单位时间内（分钟）生产 1 微摩尔还原糖所需要的酶量为 1 U。反应条件如下：100 μL 稀释的糖化酶酶液和 900 μL 1% 菊粉（溶解于 0.1 M 醋酸钠缓冲液，pH 4.0），在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min，然后迅速加入 3 ml DNS，以阻止反应的进行，在 540 nm 条件下测定吸光值。同样方法以加入煮沸失活的酶液作为对照。在测定上清中的酶活时，采用水解菊粉的糖化实验来判断上清中残余的酶活。

第 3 章 实验结果与讨论

3.1 葡萄糖为底物的循环利用发酵液上清的发酵研究

3.1.1 葡萄糖为底物的循环利用发酵液上清的 2 批次发酵实验探索

由于油脂发酵时，含油细胞的干重仅为 60-80 g/L，这就意味着在发酵结束后，有 90% 以上的发酵物将被作为有机废弃物抛弃。为了减少废水的排放，保护环境，节约用水，采用循环利用发酵液上清的反复批次发酵实验。首先在以葡萄糖为底物，进行 2 个批次发酵实验，探索其对菌体生长和油脂生产的影响。

培养基中葡萄糖和硫酸铵的浓度分别为 27.5 g/L 和 0.3 g/L。当发酵进行到糖耗完时 (54 h)，取出发酵基质，离心分离，上清中加入 750 g/L 的葡萄糖调至初糖浓度，同时加入相同浓度的其他物质。采用 10% 种子量，加入罐中进行第二批次的发酵，发酵 64 小时，发酵结果如图 3.1 所示。

如图 3.1 所示，在两个批次的发酵过程中，油脂的产量相当，均为 2.4 g/L，但菌体干重减少 18%，由 9.45 g/L 降低到 7.71 g/L，但同时糖耗减少 37%，所以单位菌体的含油率、菌体以及油脂相对于糖的得率都增大。

分析可能的原因并通过相应的实验得出（数据略）：(1)种子的情况：第一次发酵剩余的菌体作为种子与新培养的种子的差别以及接种量的差别的影响。新鲜的种子相比于反复利用的种子，油脂得率降低，含油率明显降低，但菌体得率略有增加，糖耗在相同的时间内可以耗完。而在糖耗方面，5%、10% 和 20% 的接种量基本无差别，5% 和 10% 的接种量各方面的指标差别不大，20% 的接种量的菌体得率降低、油脂含量略有增高。(2)培养基的不同组成：新鲜培养基与反复发酵模式回收利用水以及不同基质的添加的区别。反复批次发酵模式中采用回收利用发酵废液，其中可能含有大量的代谢产物，影响菌体的生长与产油。而且，在第二批次中 YE 的添加具有重要作用，不添加 YE 糖耗较少，但 YE 的添加量在 0.5-1.1 g/L 的范围内对结果的影响不显著。新鲜培养基的发酵过程中，菌体得率略有增加，但油脂的量稍有减少。

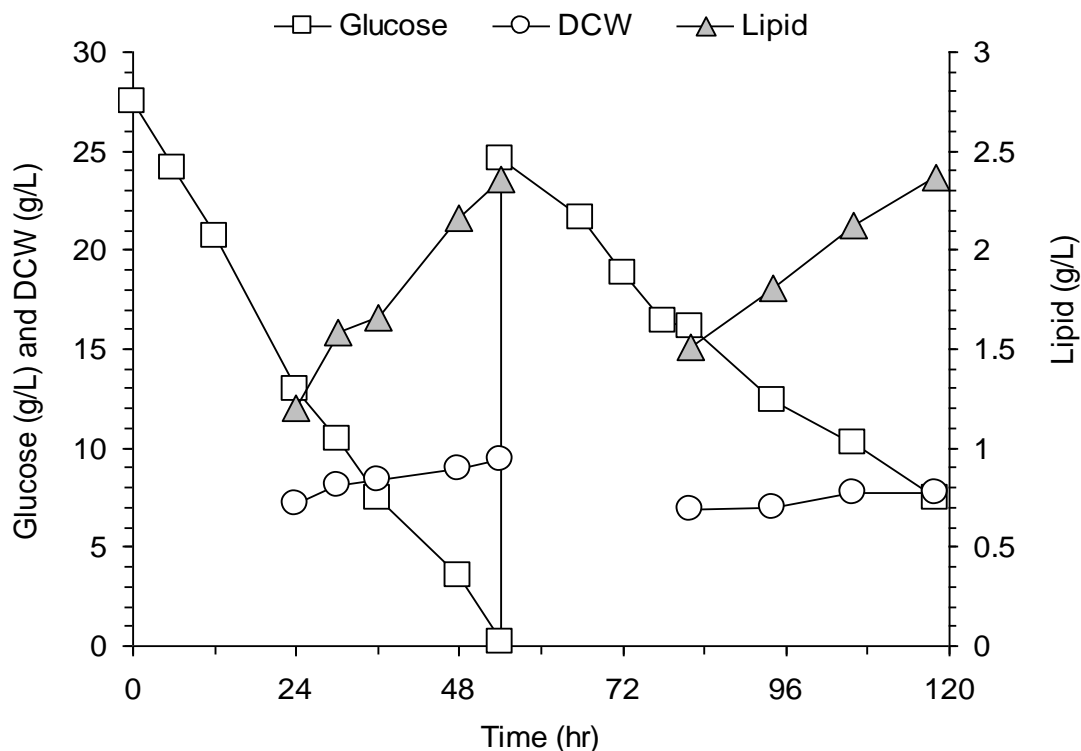


图 3.1 葡萄糖为底物 2 次反复发酵模式

Figure 3.1 Lipid fermentation under 2 stages of the new mode using glucose as substrate

3.1.2 葡萄糖为底物的循环利用发酵液上清的多批次发酵实验

在以葡萄糖为底物的培养基进行油脂的发酵时，采用 2 个批次的循环利用发酵上清对发酵结果影响较小，所以探索多次循环利用发酵上清的可行性，以进一步节省水资源，进而节约发酵成本。同时将只利用前一批次的发酵菌体作为种子，但以不回用发酵液上清的批次发酵实验作为对照，更加明确的探讨反复多次回用上清对菌体生长和油脂生产的影响。发酵结果如图 3.2 所示。

如图 3.2 所示，在反复批次发酵的最初 5 个批次，不具有明显的差别。图 3.2(a) 显示，在采用细胞分离和反复回用上清的反复批次发酵中，油脂在前 5 个批次的产量稳定在 1.6-1.8 g/L，但在第 6 个周期时降低到 1.5 g/L 以下。图 3.2(b) 显示，在只采用前一批次的发酵液作为下一批次的菌种，而不回用发酵液上清的实验中，在整个 6 个批次中，尽管第一个批次的产量略微高一点，但油脂产量基本保持不变，稳定在 1.4-1.5 g/L。糖耗速率，不论是否回收利用发酵废液，都有所下降。每个批次的干重则有所不同，在采用细胞分离和反复回用上清的反复批次发酵过程中，菌体干重随着培养批次的增加而降低，但在作为对照的未回用上清的反复批次发酵中，干重在每个批次的差别并不明显。

对于回用发酵液上清的反复批次发酵中，油脂和细胞干重在后期的几个批次中有所降低的原因，可能是由于每个批次所用的种子都是前一批次发酵后的细胞，活力下降，所以，表现为糖耗速率降低，进而是菌体干重和油脂水平降低。另一方面，回用的发酵液中的代谢后的产物，将不可避免的影响菌体的生长和葡萄糖的代谢速率。

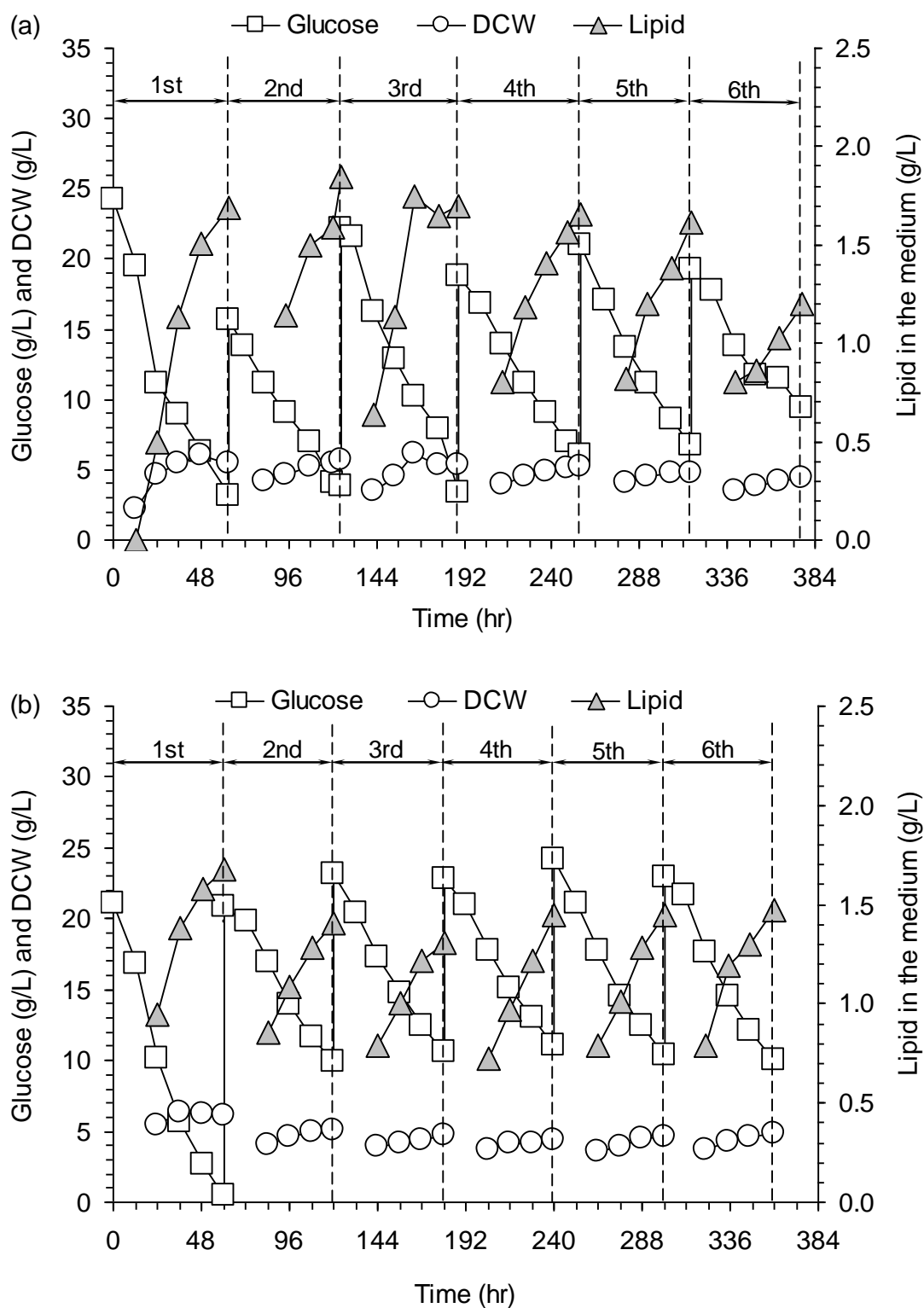


图 3.2 以葡萄糖为底物反复批次发酵生产油脂的过程曲线

(a) 循环利用水的反复批次培养 (b) 作为对照的不包括细胞离心和回用水的反复批次培养

Fig. 3.2 Repeated batch fermentation of glucose for lipid production with water recycling and cell separation. (a) with cell separation using centrifugation and water recycling. (b) without cell separation and water recycling.

但从图 3.2 可以说明, 回用发酵液上清的反复批次发酵模式在以葡萄糖为底物时具有可行性。同时, 有实验数据显示, 尽管每次回用种子, 在后期种子的活力会有所下降, 但当培养基中无碳源时, 细胞会消耗体内的油脂维持生长, 生物量略有增加, 仍可以作为种子继续进行油脂生产。

3.2 菊粉为底物的循环利用发酵液上清的研究

3.2.1 菊粉为底物的循环利用发酵液上清的多批次反复发酵实验

菊粉是由 α -D-呋喃果糖通过 β -2,1 糖苷键连接的聚合物, 并且被用来作为微生物油脂生产的原料。伴有细胞分离和发酵液上清回用的反复批次发酵成功地应用于葡萄糖为底物的油脂发酵过程中。所以, 同样测试了这种发酵方式在以菊粉为底物的发酵过程中应用的可行性。图 3.3 显示了以菊粉为底物的循环利用上清, 以及对照试验的发酵结果。

由图 3.3 可以看出, 在发酵液上清循环利用的多批次发酵中, 油脂的产量和细胞的生长(细胞干重)都比对照要低, 但差异不是很大(在两种不同的发酵模式中, 油脂的产量都在 1.5 g/L 左右, 细胞干重大约在 5 g/L)。这可能和以葡萄糖为底物的发酵中的原因一样, 是代谢产物的积累导致了这种差异。

但在发酵过程中, 值得注意的是, 菊粉可直接作为原料被皮状丝孢酵母利用, 而不需要额外加入菊粉酶等酶类, 把菊粉水解为可发酵利用的葡萄糖和果糖。图 3.4 显示, 葡萄糖和果糖在发酵过程中持续、稳定、快速地产生出来, 这表明, 在发酵体系中可能有菊粉酶的存在。这很有可能是由于皮状丝孢酵母 CX1 可以产生降解菊粉的酶, 这样就可以把菊粉催化分解成可发酵利用的葡萄糖和果糖, 进而这些糖被皮状丝孢酵母利用, 发酵生产油脂。从图 3.4 还可以看出, 果糖的浓度在两种发酵模式的后几个批次在中有差别。伴有细胞的分离和发酵液回收利用的果糖浓度明显比对照的要高出很多。这可能是由于在反复回收利用发酵液上清的过程中, 发酵液中的可分解菊粉的酶类同时被回用, 这就促使回用发酵液的过程比对照实验有更高的菊粉酶酶活。

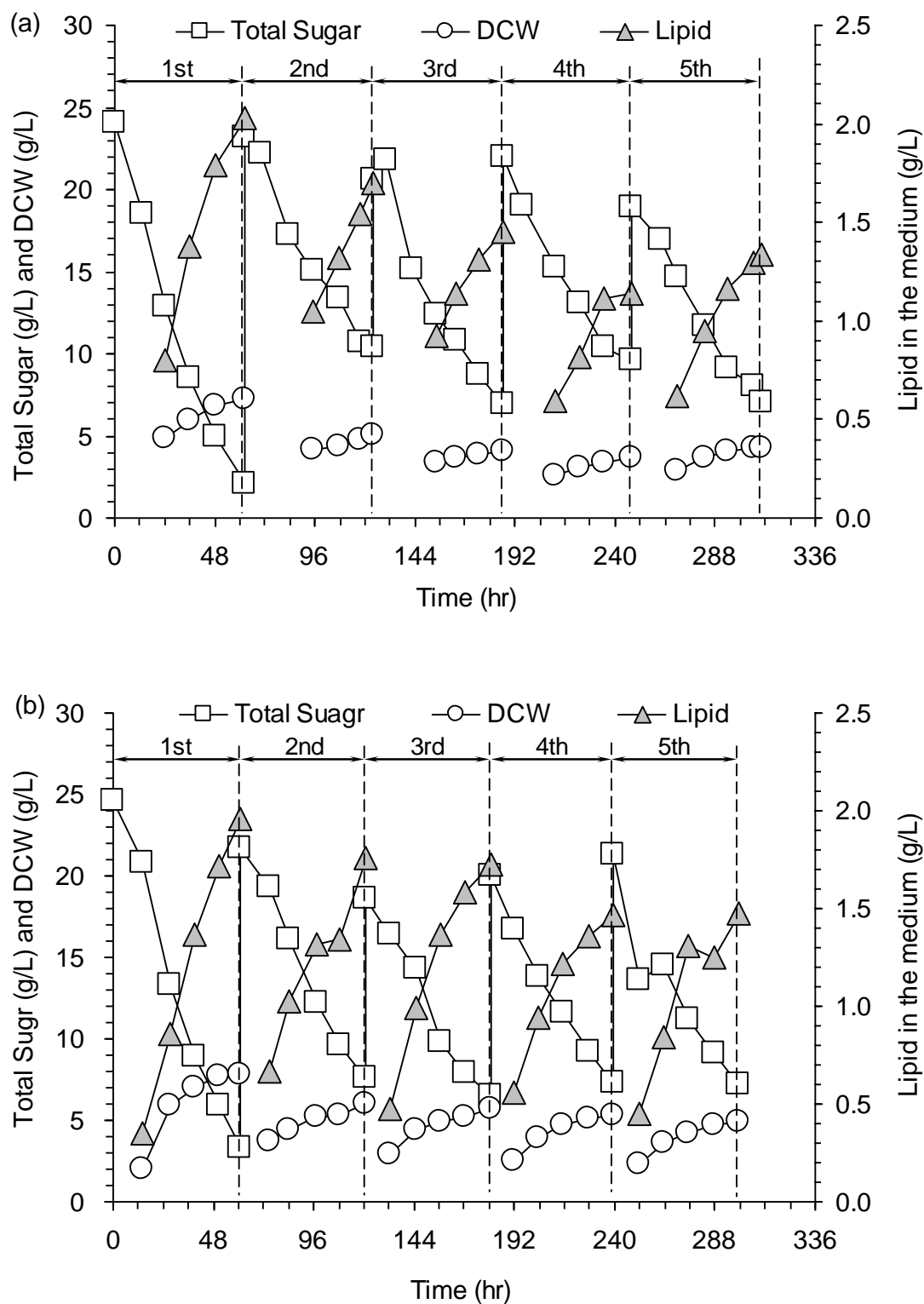


图 3.3 以菊粉为底物反复批次发酵生产油脂的过程曲线

(a)循环利用水的反复批次培养(b)作为对照的不包括细胞离心和回用水的反复批次培养

Fig. 3.2 Repeated batch fermentation of inulin for lipid production with water recycling and cell separation. (a) with cell separation using centrifugation and water recycling. (b) without cell separation and water recycling.

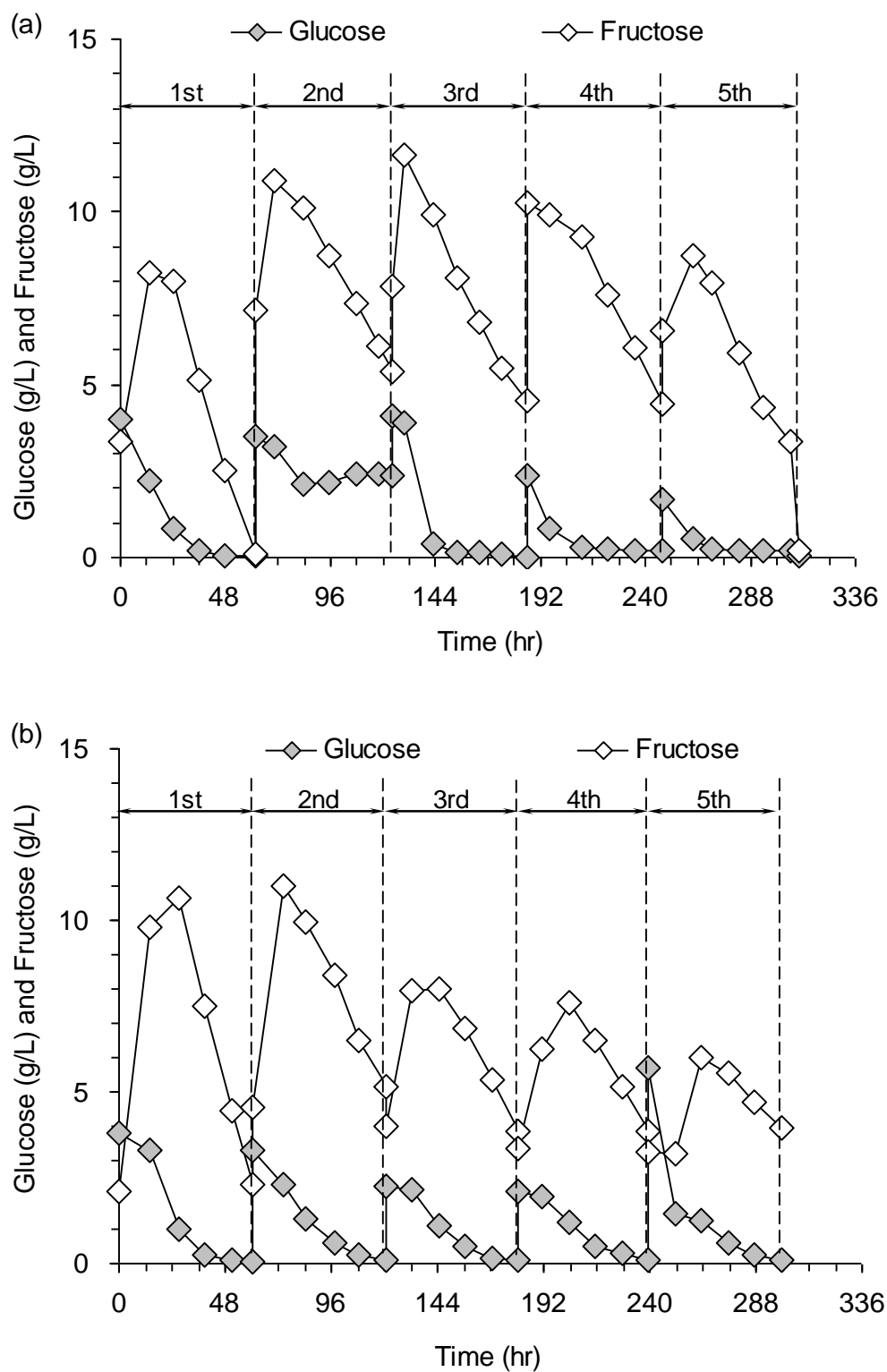


图 3.4 以菊粉为底物的反复批次发酵糖浓度曲线

(a)伴有细胞分离和水回收的反复批次发酵(b)作为对照的不包括细胞离心和回用水的反复批次培养

Fig. 3.4 The time course of the glucose and fructose concentration in the fermentation broth using inulin substrate (a) With cell separation by centrifugation and water recycling. (b) Without cell separation and water recycling

3.2.2 糖化酶的添加对皮状丝孢酵母 CX1 生产油脂的影响

为了验证皮状丝孢酵母是否具有产酶能力，以及不添加菊粉酶进行糖化对其发酵生产油脂的影响，以 5% 的菊粉为原料，以本实验室所发现的能够水解菊粉的新型糖化酶为菊粉水解酶，在(1)不添加酶；(2)加入 0.05 ml/g 菊粉的糖化酶进行糖化 47 h；(3)加入 0.1 M 的硫酸进行完全水解的情况，加入 0.5 g/L 的硫酸铵，30°C，通气量为 0.8 VVM，3 L 的发酵罐进行发酵。发酵初始和结束时发酵液中的表观糖浓度，以及发酵的油脂的产量如表 3.1 所示。

表 3.1 以菊粉为底物不同水解条件的油脂发酵结果

Table 3.1 The result of lipid fermentation using inulin as substrate under different hydrolyse condition

条件	初始糖浓度(g/L)		残糖浓度(g/L)		干重 (g/L)	油脂量 (g/L)	含油率 (g/g)
	葡萄糖	果糖	葡萄糖	果糖			
(1)不加酶	4.98	7.13	0	0.16	14.56	3.85	0.26
(2)加酶糖化 47 h	4.70	27.30	0	3.81	11.83	2.47	0.21
(3)酸水解	9.37	33.94	0.72	11.70	8.16	2.27	0.28

由表 3.1 可以看出，采用 0.1 M 的酸水解在 0 h 时的葡萄糖和果糖浓度最高，加入糖化酶水解 47 h 后，得到的糖浓度仅为，葡萄糖 4.7 g/L，果糖 27.3 g/L，水解效率仅为 60%。而不加酶的发酵液中，葡萄糖和果糖的浓度仅为 4.98 g/L 和 7.13 g/L，为其初始的游离糖浓度。而发酵结束后，采用酸水解的残糖最多，而不加酶的的残糖量最少，糖耗速度快。相应的，在相同时间内生成的菌体量和油脂量最多，加酶糖化 47 h 的发酵结果比不加酶进行发酵的略差，但略高于酸水解的结果。但含油率，在这三种条件下，差别不大。

酸水解的初始总糖含量为 43.4 g/L，初糖含量较高，可能对细胞的生长产生抑制作用，而在不加酶的情况下，体系中游离的糖浓度较低，可以被菌体快速利用，从而进一步加速了菊粉的水解，所以这足以说明皮状丝孢酵母自身可以产生水解菊粉的酶，而且这样一直使糖浓度维持在一个稳定的水平，对油脂的生产有利，这和 Zhao 等得出的结论一致^[91]。由于三种情况的初始糖浓度和氮源含量一致，所以，细胞的含油率差别不大。

当菊粉的含量提高后，达到 15% 的含量时，即培养液中理论总糖量为 165 g/L 时，在不添加酶的情况下，同样可以进行油脂的发酵生产。并且并没有显示出高糖浓度抑制效应。表 3.2 显示的是 15% 菊粉含量的情况下，0.22 g/L 的硫酸铵加量下，不添加菊粉酶和 0.05 ml/g 菊粉的糖化酶进行预糖化 0 h 和 5 h 的结果。而且不加酶和加酶进行较短时间的预糖化的发酵结果差别不大。

表 3.2 高菊粉含量下的油脂发酵结果

Table 3.2 Lipid fermentation result under high load of inulin

条件	残糖浓度(g/L)	干重(g/L)	油脂量(g/L)	含油率(g/g)
(1)不加酶	0.50	30.86	5.47	0.18
(2)加酶糖化 0 h	0	29.18	5.55	0.17
(3)加酶糖化 5 h	0.80	30.42	5.33	0.18

3.3 絮凝分离的适用性及条件探索

为了寻求代替高能耗的离心分离的方法,同时保证在无菌的条件下实现油脂细胞分离的简便、连续性,探寻了絮凝沉降的收获细胞的方法替代离心分离的方法的可行性。絮凝可以由不同的类别的絮凝剂的作用形成^[120]。一些金属离子,包括镁离子、钙离子、铝离子等,乙醇、丙酮、单宁等有机物也都是良好的絮凝剂;很多不同系列的聚合物絮凝剂都可以达到很好的絮凝效果。并且由于高聚物的絮凝效率高、所需的絮凝剂的量少,絮凝工艺成本低,并且阳离子或者阴离子聚合物,以及阳离子聚合物结合无机盐,在复杂的培养基体系中都显示了较好的絮凝效果,所以高聚物絮凝剂是现在普遍采用的絮凝剂。Hughes 等研究发现壳聚糖是一种尤其有效的絮凝剂^[121],其在复杂的发酵体系中,对不同的微生物都可达到很好的絮凝效果。为此,本文选用壳聚糖作为絮凝剂,研究了包括絮凝剂的用量;絮凝剂对不同量细胞的絮凝效果;絮凝剂对菌体生长和产油的影响。希望可以用较少的、廉价的、天然的絮凝剂实现这一目的,同时不会对细胞的生长及生产油脂产生负面影响。

3.3.1 不同絮凝剂的量对絮凝效果的影响

对于成功的絮凝所需的絮凝剂的量取决于微生物细胞及所处的培养基环境。在缓冲液体系中的微生物,所需的絮凝剂的量是十分有限的,但在培养基中的微生物的絮凝可能需要的量是缓冲液的 40 倍^[122]。为了以最少的絮凝剂的量达到最好的絮凝效果,研究了不同絮凝剂的量对皮状丝孢酵母絮凝效果的影响。将 0.250 ml、0.375 ml、0.500 ml、1.000 ml 的 10 g/L 的壳聚糖醋酸絮凝剂分别加入到 25 ml 发酵液中,通过测 OD 值的变化和沉降高度的变化,计算出絮凝率和沉降率,实验结果如图 3.5 所示。

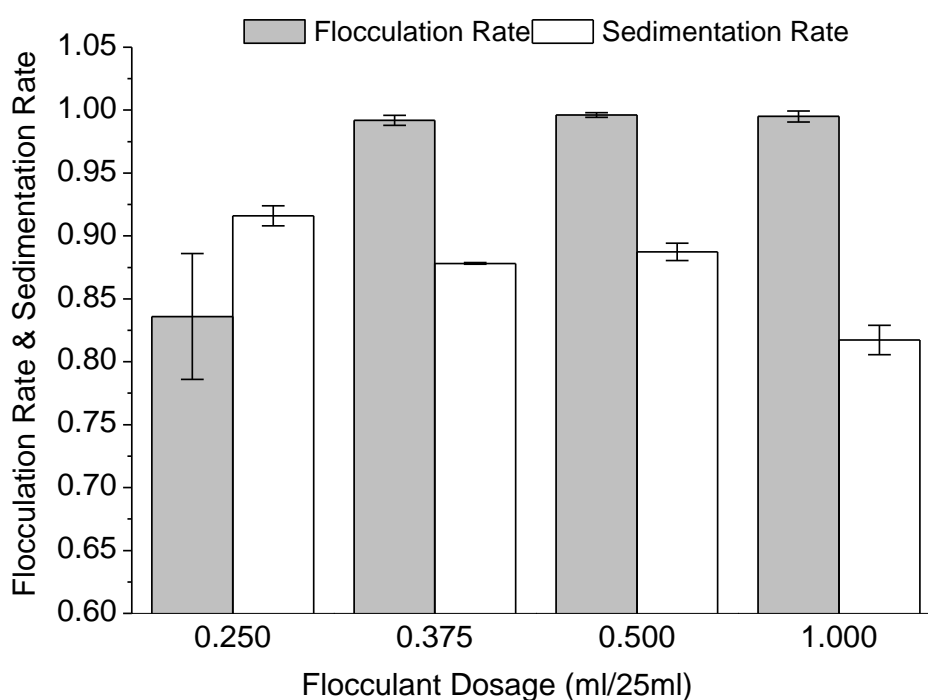


图 3.5 不同量的絮凝剂对细胞絮凝效果的影响

Figure 3.5 Flocculation rate and sedimentation rate under different dosages of flocculant

从图 3.5 中可以看出, 随着絮凝剂加入量的增多, 絮凝率增高, 且在 25 ml 的发酵液中加入 0.375-1.000 ml 时絮凝率均达到 99% 以上。但沉降率随絮凝剂的加入量的增加逐渐下降, 0.375/25 ml 和 0.500/25 ml 的沉降率相当, 都大于 85%。综合两者的结果, 选择絮凝剂的加入量为 0.375/25 ml, 可以达到较好的絮凝沉降效果。

3.3.2 不同细胞量下的絮凝效果

絮凝剂的加入量不同对一定量的细胞的絮凝效果影响不同, 为探究在不同的细胞量下, 0.375/25 ml 的絮凝剂能否达到良好的絮凝效果。在不同的细胞量下, 即细胞 OD 值分别为 20、30、40 的情况下分别加入 0.375/25 ml 的絮凝剂, 观察并计算絮凝率和沉降率, 实验结果如图 3.6 所示。从图中可以看出, 在不同的细胞量下, 加入 0.375/25 ml 的絮凝剂, 絮凝率均可达到 99% 以上, 沉降率随絮凝剂的加入量的增多, 逐渐降低, 但均在 85% 以上, 可以达到较好的絮凝效果。

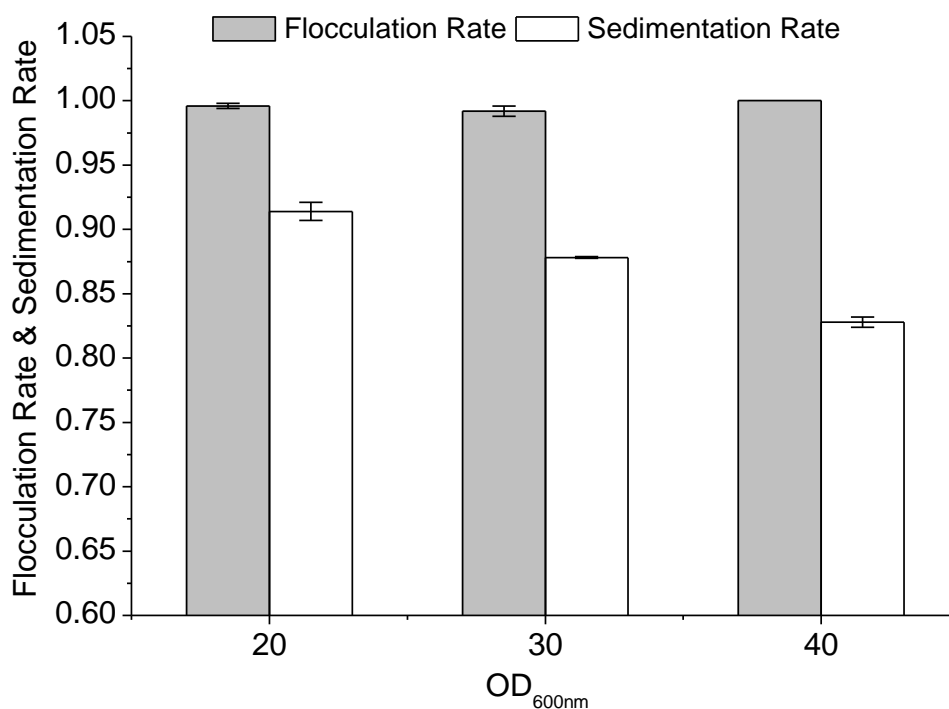


图 3.6 不同细胞量下絮凝效果

Figure 3.6 The result of flocculation under different amounts of cell

3.3.3 絮凝剂对细胞生长的影响

10 g/L 的壳聚糖醋酸溶液作为絮凝剂对不同生物量皮状丝孢酵母的絮凝效果较好。但絮凝剂的加入对皮状丝孢酵母的生长和油脂生产的影响却不知道。为此，首先探究了不同量的絮凝剂的加入量对皮状丝孢酵母生长的影响，在接种时加入不同量的絮凝剂，然后进行摇瓶的发酵，结果如图 3.7 所示。

从图 3.7 可以看出，絮凝剂的加入影响菌体生长的延至期，随着絮凝剂加入量的增加，延至期逐渐延长，但对最终菌体浓度无明显影响。在不加絮凝剂的情况下，菌体可以快速的生长，当在 50 ml 中加入 0.5 ml 的絮凝剂时，菌体没有明显的延至期，但生长相对于对照，生长缓慢。而加入量大于 1.0 ml 时，菌体在 20 h 后才开始生长。但是在 110 h 时，菌体最终的生物量差别不大。所以，壳聚糖作为絮凝剂对细胞生长的影响不大。

同时壳聚糖作为絮凝剂加入产油培养基中后，对油脂的总量和含油率都有较大的影响，都比对照的量有所提高。这也为这种特殊的反复发酵模式的连续进行提供了可行性。

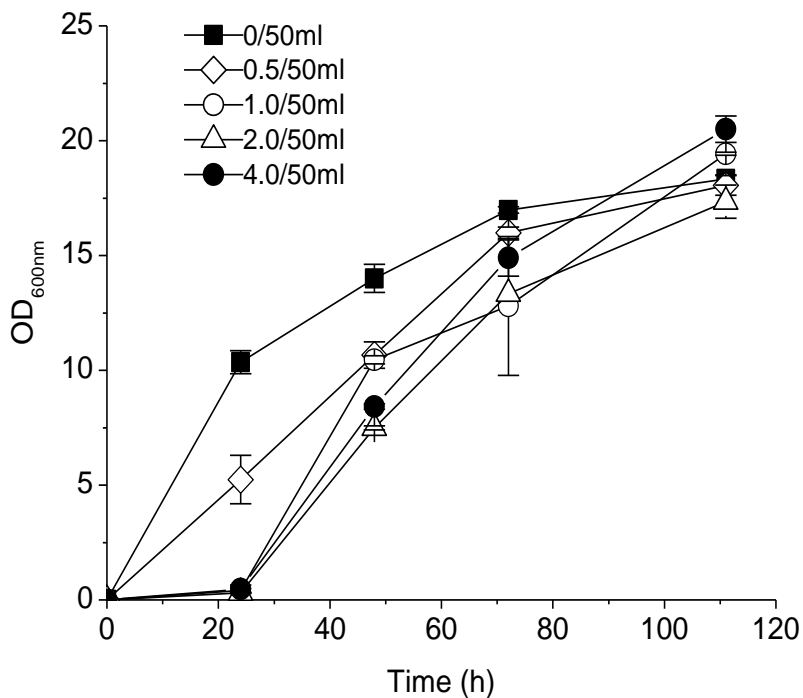


图 3.7 不同量的絮凝剂对菌体细胞生长的影响

Fig. 3.7 The effect of flocculant on the growth

3.3.4 絮凝剂对细胞产油的影响

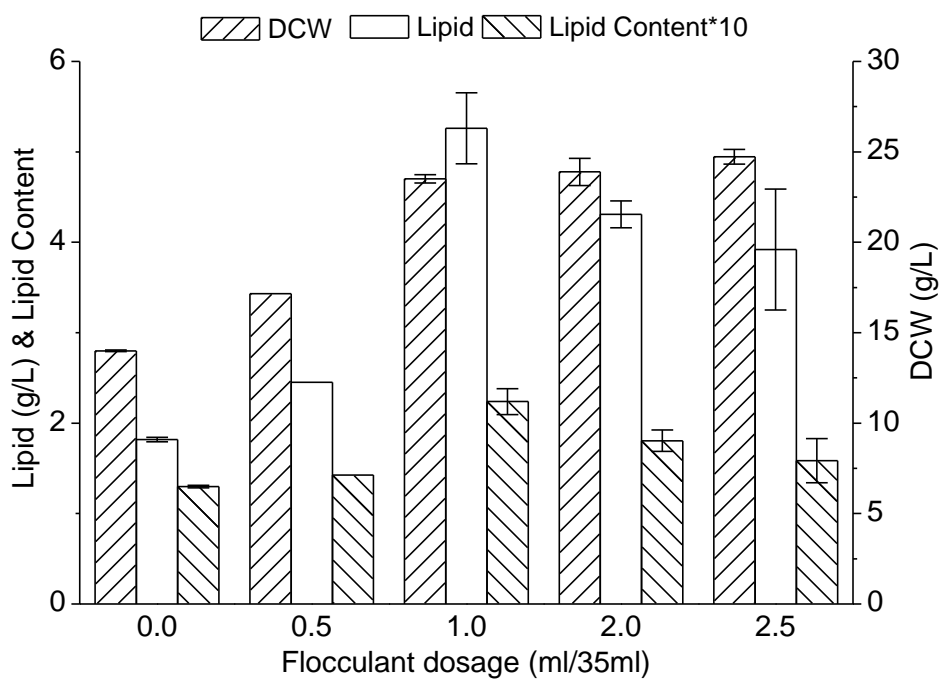


图 3.8 不同量的絮凝剂对菌体产油的影响

Fig. 3.8 The effect of flocculant on the lipid production

在探究了絮凝剂对生长的影响后，探究了絮凝剂对油脂生产的影响。不同量的絮凝剂对菌体产油的影响如图 3.8 所示。

从图 3.8 可以看出，细胞干重、油脂量和细胞的含油率都随着絮凝剂的加入量的增加而增加，当在 35 ml 中加入 1.0 ml 时，油脂产量最大，含油率最高，随后，随着絮凝剂的加入量的增加，菌体干重基本维持稳定，但是油脂量降低，这就导致细胞含油率降低，但并不低于对照的含油率。即絮凝剂的加入对细胞产油的影响不大。

3.3.5 絮凝剂对糖化酶酶活的影响

菌体细胞在利用菊粉或木质纤维素原料生产油脂时，自身会产生或另外加入用于水解原料为可利用的糖类的酶。但絮凝剂在絮凝细胞的同时是否会将上清中的酶蛋白同时絮凝结合到菌体细胞中却不知道。为此，探究了絮凝剂对糖化酶是否具有吸附。

取 40 ml 的发酵液 (OD 约为 68)，加入 1.5 ml 的糖化酶，混匀，加入 2 ml 的 10 g/L 的壳聚糖醋酸溶液，震荡混匀，静置 60 min，测量前后的 OD 值，蛋白含量，结果如表 3.3 所示。

由表 3.3 可以看出，絮凝剂的加入后，菌体绝大多数都已沉淀，絮凝率可以达到 99% 以上，而蛋白则大多数留在上清中，蛋白残留率为 88.3%。离心后，取上清加入菊粉，进行水解，水解结果如图 3.9 所示。由图 3.9 可以看出，未加入酶并且也没有经过絮凝处理的上清中糖浓度的变化不大。加入酶未经絮凝处理和经絮凝处理的水解得到的糖浓度基本一致，都可达到较高水平。这说明，经絮凝处理后，残留的蛋白量仍然保持着酶活，可以作为下一批次继续使用。

表 3.3 絮凝剂对糖化酶在上清液中的含量的影响

Table 3.3 The glucoamylase content under the condition of adding flocculant

	OD _{0 min}	OD _{60 min}	絮凝率	Pr _{0 min}	Pr _{60 min}	蛋白残留率
对照组	61.30	27.10	55.8%	1.28	1.22	95.3%
实验组	61.80	0.05	99.9%	1.28	1.13	88.3%

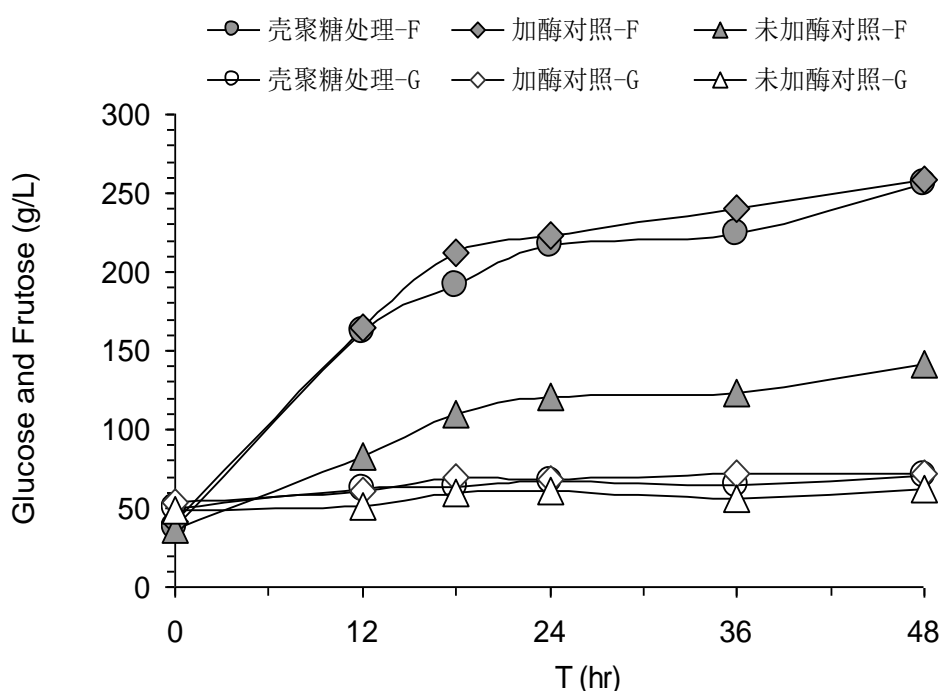


图 3.9 不同处理的发酵液上清水解菊粉结果

Fig 3.9 The effect of the fermentation liquid under different treatments to hydrolyse inulin

3.4 絮凝分离在反复批次发酵模式中的应用

3.4.1 絮凝分离反复批次发酵模式在葡萄糖为底物时的应用

絮凝分离对油脂细胞皮状丝孢酵母的絮凝效果良好，且对细胞的生长和油脂发酵的影响较小，并且不会吸附或絮凝菊粉水解酶。而絮凝分离不仅节约能量，而且可以避免采用离心分离能够带来的染菌，所以，以絮凝沉降的方法代替离心分离的方法，进行细胞的收获，进一步实现循环利用发酵液上清回用的反复批次发酵。首先，以葡萄糖为底物，探索絮凝分离在反复批次发酵模式中的应用。

图 3.10 显示了以葡萄糖为底物的采用絮凝分离的反复批次发酵的油脂生产的结果。从图中可以看出，在第 1 个周期，油脂的产量为 2.0 g/L，从第 2 周期到第 4 周期，油脂的产量有所下降，大约为 1.3 g/L，但进入到第 5 个周期后，油脂的产量会大幅度的下降，降到 0.5 g/L 以下。与采用离心分离的反复批次发酵在前 5 个周期的油脂产量都稳定在 1.7 g/L 相比，油脂的产量有所降低，而且发酵可以持续的批次减少。

油脂发酵产量的降低，可能是由于壳聚糖作为絮凝剂加入发酵液中，尽管对生长的影响较小，但由于其能够延长发酵的延至期，所以，在相同的时间内，菌体生长量会降低。此外，在发酵进行到后面的几个周期时，可以看到，细胞会结成较硬的块状，所以，其生长和产油在第 5 周期基本停止。

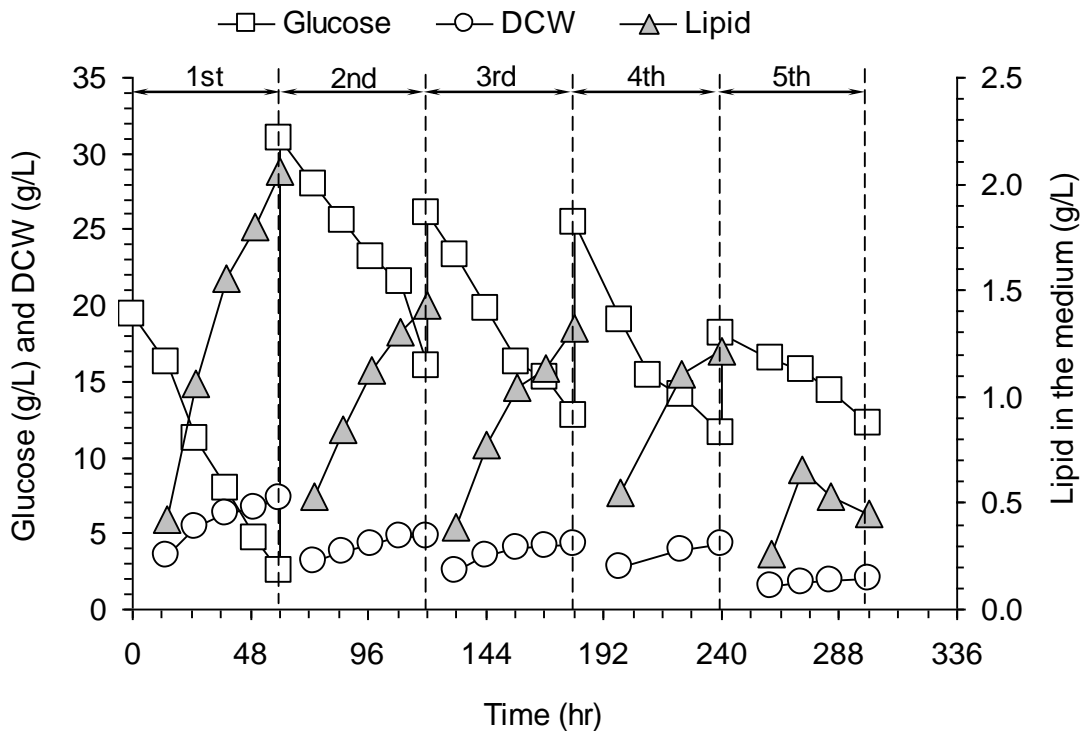


图 3.10 以葡萄糖为底物的采用絮凝分离的反复批次发酵

Fig. 3.10 Fermentation time course of glucose substrate with cell separation of flocculation

3.4.2 絮凝分离反复批次发酵模式在菊粉为底物时的应用

图 3.11 显示了以菊粉为底物,以絮凝沉降作为细胞分离方法的反复发酵模式的油脂发酵结果和过程的糖耗曲线图。和以葡萄糖为原料的絮凝作为分离方法的反复发酵模式一样,在第 1 个循环周期,糖浓度较高,为 2.35 g/L。不同的是,从第 2 个批次开始,油脂的产量急剧下降,到第 4 个周期时,产量已经下降到 0.81 g/L,而到第 5 个周期时,油脂的产量仅为 0.28 g/L。从图 3.11(b)可以看出,从第 2 个周期开始,有大量的果糖没有被利用。

在以菊粉为底物的发酵过程中,除了以葡萄糖为底物的过程中,絮凝剂和发酵副产物的影响以外,细胞要同时产生水解菊粉的酶类和发酵生产油脂的原因是油脂的产量从第 2 个周期开始就急剧下降的原因。图 3.11(b)再一次证明皮状丝孢酵母可以产生水解菊粉的酶类,尽管糖耗速率较低。

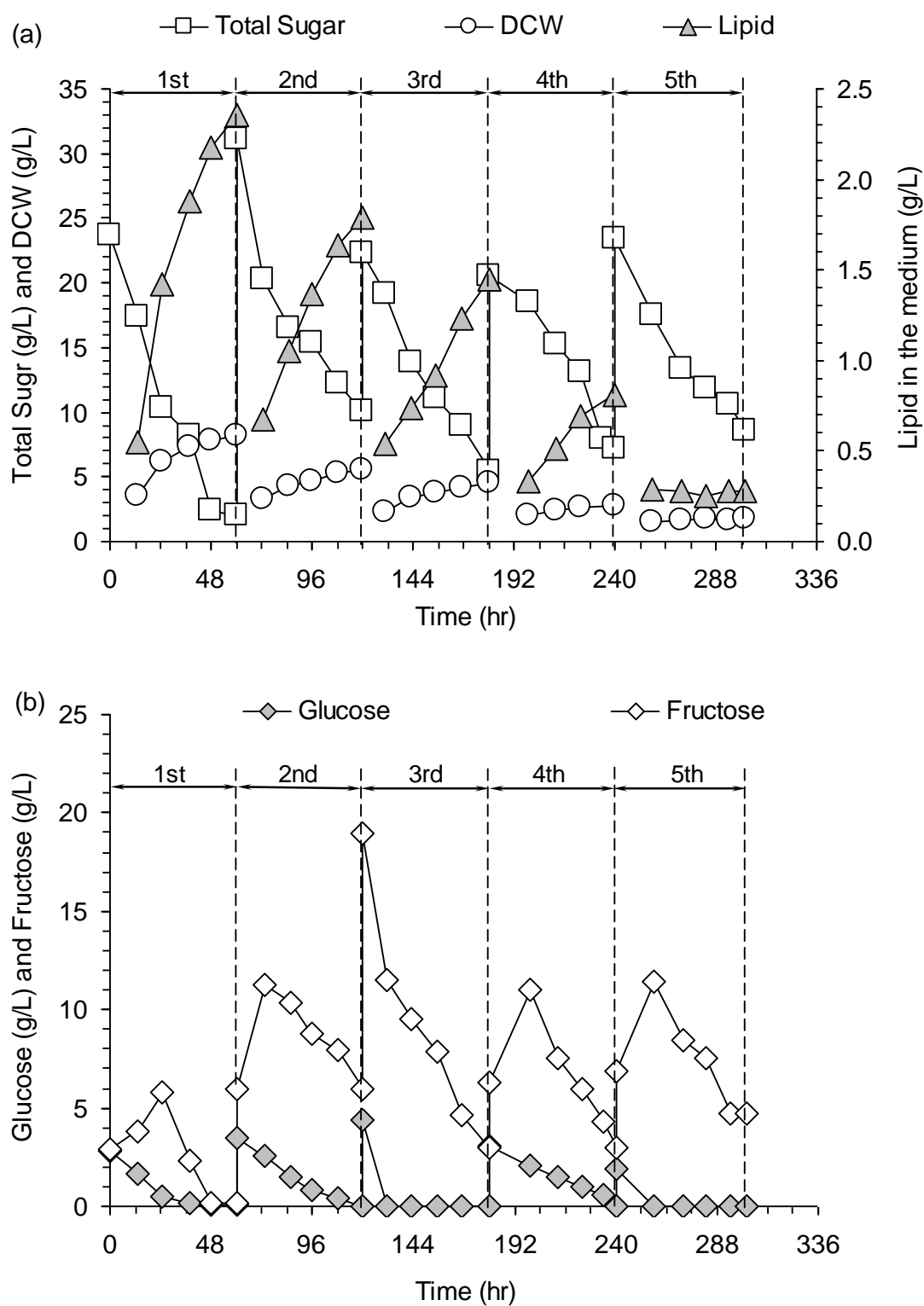


图 3.11 以菊粉为底物的采用絮凝分离的反复批次发酵

Fig. 3.11 Fermentation time course of inulin substrate with cell separation of flocculation

3.4.3 不同底物、不同分离方法下循环利用发酵液上清的反复批次发酵方式比较

对于对照实验，每个批次下来的水用量都是一致的，为 1 L，而对于以离心的方法

作为分离方法的反复批次发酵实验，第一个批次的用水量为 1 L，第二个批次开始，用水量仅需为补充前一个批次离心损耗的水，约为 50 ml；而对于絮凝分离的反复批次发酵实验，需要补充的水分比离心分离的要多 40 ml，为 90 ml。所以 5 个批次的发酵，絮凝分离的用水量为 1.36 L，为对照的 27%，而离心分离的的用水量为 1.20 L，为对照的 24%，节约的水量大于 70%。而油脂和菌体的平均产量相差不大。这说明，采用离心或絮凝的方法可以节约大量的水，减少了废水的排放及后期的环境治理，进一步降低了油脂发酵的成本。此外，絮凝的方法，代替了离心分离的方法，不易染菌，而且使细胞收获的价格降低。给将来的油脂发酵提供了较好的方式。

表 3.4 不同发酵模式下各参数对比

Table 3.4 Fermentation parameters under different modes

	分离方法	葡萄糖	菊粉
油脂产量 (g/L)	对照	1.46	1.68
	离心分离	1.70	1.53
	絮凝分离	1.30	1.34
含油率 (g/g)	对照	0.30	0.28
	离心分离	0.32	0.32
	絮凝分离	0.28	0.28
油脂产率 Y_{Ls} (g/g)	对照	0.10	0.11
	离心分离	0.11	0.11
	絮凝分离	0.10	0.07
水用量 (L)	对照	5.00	5.00
	离心分离	1.20	1.20
	絮凝分离	1.36	1.36

说明：对照：无细胞分离和发酵液回用的反复批次发酵实验；离心分离：采用细胞离心的方法进行的反复批次发酵；絮凝分离：采用絮凝分离的方法进行的反复批次发酵。

从表 3.4 可以看出，在采用离心分离的循环利用发酵废水的发酵实验中，油脂的产量和对照实验差别不大；但在以絮凝分离的反复利用发酵废水的发酵实验中，油脂的产量比对照实验的产量低，而且比离心分离的实验结果也要低。采用离心分离时，发酵后的菌体和发酵液上清分离后，上清直接回用，对油脂生成造成影响的只是积累的代谢产物，从发酵的结果来说，其影响不是很大，对油脂生成影响较大的是反复回用的作为发酵菌种的发酵液。但是在絮凝沉降的分离过程中，不仅是代谢产物的积累带来的影响，还有每个批次加入的壳聚糖醋酸絮凝剂的积累，对酵母的生长会产生一定的延至作用，所以在相同的时间内，菌体的生物量降低，在含油率基本不变的情况下，油脂总产量降低。而且在经过多个批次的发酵实验后，可以观察到加入絮凝剂沉降的发酵中酵母细胞的结块现象，这也将导致其油脂产量的降低。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

4.1.1 以葡萄糖为底物的微生物油脂发酵

以葡萄糖作为底物时的 2 批次的反复批次发酵，油脂产量没有降低，但是糖耗速率减慢，这和反复利用种子，种子活力下降；以及回用发酵液上清中的代谢产物有关。

以葡萄糖作为底物时的多批次发酵实验模式中，采用离心分离的方法的发酵结果在前 5 个批次结果和对照实验基本一致，甚至油脂量有略微的提高。但当发酵进行到第六个周期时，菌体量和油脂量都是较低值，发酵无法进行下去。同样可能是由于发酵的过程中未添加新鲜的菌种，而是同时反复回用上一批发酵液作为菌种，活力下降；多次回收利用上清液，对种子的活力也有不利影响。

4.1.2 以菊粉为底物的微生物油脂发酵

以菊粉作为底物时，多次反复批次的发酵结果比对照略有下降，但相差不大。同时发现皮状丝孢酵母在利用菊粉作为底物时，不需额外添加菊粉酶，其自身可以快速的将菊粉降解为可利用的葡萄糖和果糖。此外，通过进一步的实验发现，发酵后的上清液中残留有水解菊粉的酶活，在不外加酶的情况，菊粉能得到水解。此外，在 5%-15% 的菊粉溶液的情况下，皮状丝孢酵母都可以利用都可以水解并利用其生产油脂。

4.1.3 絮凝分离油脂酵母的可行性

10 g/L 的壳聚糖醋酸溶液，对皮状丝孢酵母 CX1 的絮凝效果较好，壳聚糖的添加量为 0.375 ml/25 ml 时，絮凝率达到 99% 以上，且对不同细胞量的絮凝效果均较好。此外，絮凝剂的加入会延长细胞的延至期，但少量的絮凝剂会增加细胞的含油率。而且上清液中水解菊粉的酶类不会因絮凝沉降而减少。

4.1.4 絮凝分离和反复批次发酵结合

把絮凝沉降和反复批次发酵结合后，在以葡萄糖为底物和以菊粉为底物时，油脂的产量都会随着反复利用上清的次数的增加而降低，但降低的幅度不相同。对于葡萄糖，第二到第四个周期，产量比第一周期低，但是，基本稳定，底物周期，急剧下降到 1 g/L 一下；对于菊粉，每个周期都是逐步下降。这其中的原因出了利用离心分离时的菌种活力下降的原因和代谢产物的积累所产生的抑制以外，还有一个原因就是，絮凝剂的累积对细胞的影响，这种累积的结果致使发酵后期的细胞结块，产油降低。除此之外，对于菊粉为底物的反复回用上清的发酵试验中，酵母在产油的同时，还要生产水解菊粉的酶类，不断的将菊粉分解为可供酵母利用的葡萄糖和果糖，进一步增加了酵母菌的压力，而在以葡萄糖为底物的发酵过程中，则没有产生水解酶类的压力。

4.1.5 循环利用发酵废水的发酵模式作用

不论是利用离心分离，还是应用絮凝沉降的方法进行细胞的分离，反复批式发酵都可以节约 70% 以上的水用量，达到最初的节水的目的。同时，其他关于油脂的其他各项指标，如平均油脂产量、含油率等基本不变。同时也说明絮凝沉降是获得含油细胞的较好的方法。

4.2 展望

采用反复批次发酵的模式在葡萄糖、菊粉作为底物时取得良好的效果，节约了大量的水，但其在纤维素原料（如秸秆等）中的应用，不仅可以节约用水，减少废水排放，而且对于纤维素酶的回收利用将带来很好的效果，这样可以进一步降低微生物油脂的生产成本，值得进一步的研究应用。

对于产油微生物，如果其自身可以絮凝，或者通过基因工程的方法使其达到自絮凝，那将进一步降低发酵过程的成本，同时，对反复回用发酵培养基将产生更小的不利影响，持续的周期会增多，油脂的产量降低会减少，同时节约的水用量增加。

参考文献

- [1] 赵宗保,胡翠敏. 能源微生物油脂技术进展. 生物工程学报. 2011, 27: 427-435
- [2] Zhou X, Xiao B, Ochieng R M, *et al.* Utilization of carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass for energy in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2009, 13: 479-485
- [3] Gullison R E, Frumhoff P C, Canadell J G, *et al.* Tropical forests and climate policy. *Science-New York then Washington*. 2007, 316: 985
- [4] Nordhaus W. Economics. Critical assumptions in the Stern Review on climate change. *Science (New York, NY)*. 2007, 317: 201
- [5] Yusuf N, Kamarudin S, Yaakub Z. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*. 2011, 52: 2741-2751
- [6] Lam M K, Tan K T, Lee K T, *et al.* Malaysian palm oil: Surviving the food versus fuel dispute for a sustainable future. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2009, 13: 1456-1464
- [7] Sharma Y, Singh B. Development of biodiesel: current scenario. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2009, 13: 1646-1651
- [8] Ma F, Hanna M A. Biodiesel production: a review. *Bioresource technology*. 1999, 70: 1-15
- [9] Muniyappa P R, Brammer S C, Nouredini H. Improved conversion of plant oils and animal fats into biodiesel and co-product. *Bioresource technology*. 1996, 56: 19-24
- [10] 吴伟光, 仇焕广, 徐志刚. 生物柴油发展现状, 影响与展望. *农业工程学报*. 2009, 25: 298-302
- [11] Hoekman S K. Biofuels in the US-Challenges and Opportunities. *Renewable Energy*. 2009, 34: 14-22
- [12] Moser B R. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *Biofuels*. 2011, 285-347
- [13] Council I G. Grain market trends in the stockfeed and biodiesel industries. *Australian Grain*. 2008, 17: 30-31
- [14] Demirbas A. Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics. *Energy Conversion and Management*. 2006, 47: 2271-2282
- [15] Eathington S R C, Edwards T M, Reiter M D. Molecular markers in a commercial breeding program. *Crop Science*. 2007, 47: S-154
- [16] 沈珺珺, 迟晓元, 杨庆利. 生物柴油的研究进展. *中国生物工程杂志*. 2006, 26: 87-90
- [17] 鹿清华, 朱青, 何祚云. 我国生物柴油原料可获性及成本分析. *当代石油石化*. 2010,

18: 7

- [18] Chiou B S, El-Mashad H, Avena-Bustillos R, *et al.* Biodiesel from Waste Salmon Oil. *Trans. ASABE.* 2008, 51: 797-802
- [19] Mariod A, Klupsch S, Hussein I, *et al.* Synthesis of alkyl esters from three unconventional Sudanese oils for their use as biodiesel. *Energy & fuels.* 2006, 20: 2249-2252
- [20] Wyatt V T, Hess M A, Dunn R O, *et al.* Fuel properties and nitrogen oxide emission levels of biodiesel produced from animal fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2005, 82: 585-591
- [21] Jeong G T, Yang H S, Park D H. Optimization of transesterification of animal fat ester using response surface methodology. *Bioresource technology.* 2009, 100: 25-30
- [22] Predojevic Z J. The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of different purification steps. *Fuel.* 2008, 87: 3522-3528
- [23] Haas M J, Michalski P J, Runyon S, *et al.* Production of FAME from acid oil, a by-product of vegetable oil refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2003, 80: 97-102
- [24] Shi S, Valle - Rodríguez J O, Siewers V, *et al.* Prospects for microbial biodiesel production. *Biotechnology Journal.* 2011,
- [25] Li Q, Du W, Liu D H. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2008, 80: 749-756
- [26] Ratledge C, Wynn J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology, Vol 51.* 2002, 51: 1-51
- [27] 薛飞燕, 张栩, 谭天伟. 微生物油脂的研究进展及展望. *生物加工过程.* 2005, 3: 23-27
- [28] Illman A, Scragg A, Shales S. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology.* 2000, 27: 631-635
- [29] Khozin-Goldberg I, Cohen Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry.* 2006, 67: 696-701
- [30] Mata T M, Martins A A, Caetano N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2010, 14: 217-232
- [31] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances.* 2007, 25: 294-306
- [32] Alvarez H, Steinbüchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology.* 2002, 60: 367-376
- [33] Meng X, Yang J, Xu X, *et al.* Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy.* 2009, 34: 1-5
- [34] Gouda M K, Omar S H, Aouad L M. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using

- agro-industrial wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, 24: 1703-1711
- [35] Chen H C, Chang C C. Production of γ - Linolenic Acid by the Fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnology progress*. 1996, 12: 338-341
- [36] Liu B, Zhao Z K. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82: 775-780
- [37] Angerbauer C, Siebenhofer M, Mittelbach M, *et al.* Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource technology*. 2008, 99: 3051-3056
- [38] Carioca J O B. Biofuels: problems, challenges and perspectives. *Biotechnology Journal*. 2010, 5: 260-273
- [39] Shay E G. Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. *Biomass and Bioenergy*. 1993, 4: 227-242
- [40] Shaojin Y, Yiping Z. Research and Application of Oleaginous Microorganism. *China Foreign Energy*. 2006, 2: 90-94
- [41] Makula R, Lockwood P, Finnerty W. Comparative analysis of the lipids of *Acinetobacter* species grown on hexadecane. *Journal of bacteriology*. 1975, 121: 250
- [42] Olukoshi E R, Packter N M. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology*. 1994, 140: 931
- [43] Lu X, Vora H, Khosla C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production. *Metabolic engineering*. 2008, 10: 333-339
- [44] Somashekar D, Venkateshwaran G, Sambaiiah K, *et al.* Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. *Process Biochemistry*. 2003, 38: 1719-1724
- [45] Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, *et al.* *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in lipid research*. 2009, 48: 375-387
- [46] Zhu L Y, Zong M H, Wu H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource technology*. 2008, 99: 7881-7885
- [47] Chen X, Li Z H, Zhang X X, *et al.* Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159: 591-604
- [48] Hu C M, Zhao X, Zhao J, *et al.* Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*. 2009, 100: 4843-4847
- [49] Huang C, Zong M H, Wu H, *et al.* Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology*. 2009, 100: 4535-4538
- [50] Dai C, Tao J, Xie F, *et al.* Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula*

- glutinis* with xylose assimilating capacity. African Journal of Biotechnology. 2010, 6:
- [51] Li Q, Jiang X, He Y, *et al.* Evaluation of the biocompatible ionic liquid 1-methyl-3-methylimidazolium dimethylphosphite pretreatment of corn cob for improved saccharification. Applied microbiology and biotechnology. 2010, 87: 117-126
- [52] Economou C N, Makri A, Aggelis G, *et al.* Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. Bioresource technology. 2010, 101: 1385-1388
- [53] Hui L, Wan C, Hai-Tao D, *et al.* 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
- [54] 华艳艳, 赵鑫, 赵金. 圆红冬孢酵母发酵菊芋块茎产油脂的研究. 中国生物工程杂志. 2007, 27: 59-63
- [55] Zhao X, Wu S G, Hu C M, *et al.* Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2010, 37: 581-585
- [56] Zhao C, Cui W, Liu X, *et al.* Expression of inulinase gene in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and single cell oil production from inulin-containing materials. Metabolic engineering. 2010, 12: 510
- [57] 袁锦云, 艾佐佐, 张志斌. 皮状丝孢酵母 B3 利用木薯淀粉发酵生产微生物油脂. 生物工程学报. 2011, 27: 453-460
- [58] Wu S, Zhao X, Hu C, *et al.* Screening of fungi for microbial oil production using N-acetyl-D-glucosamine. China Biotechnol. 2008, 28: 58-62
- [59] Karatay S E, Dönmez G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. Bioresource technology. 2010, 101: 7988-7990
- [60] Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge T T, *et al.* 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
- [61] Liang Y, Cui Y, Trushenski J, *et al.* Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. Bioresource technology. 2010, 101: 7581-7586
- [62] XUE F, MIAO J, ZHANG X, *et al.* Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. Bioresource technology. 2008, 99: 5923-5927
- [63] Kennedy E P. Biosynthesis of complex lipids. 1961, vol. 20, pp.934
- [64] Carman G M, Han G S. Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. Trends in biochemical sciences. 2006, 31: 694-699
- [65] Wu W, Lin Y, Wang E, *et al.* Regulation of phosphatidate phosphatase activity from the

- yeast *Saccharomyces cerevisiae* by sphingoid bases. *Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268: 13830-13837
- [66] Wu W I, Carman G M. Regulation of phosphatidate phosphatase activity from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*. 1994, 269: 29495
- [67] Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, *et al.* Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*. 2008, 74: 7779-7789
- [68] Beopoulos A, Chardot T, Nicaud J M. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*. 2009, 91: 692-696
- [69] Ratledge C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions*. 2002, 30: 1047-1049
- [70] Wynn J P, Kendrick A, Ratledge C. Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circinelloides* via its action on malic enzyme. *Lipids*. 1997, 32: 605-610
- [71] Wynn J P, bin Abdul Hamid A, Ratledge C. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiology*. 1999, 145: 1911-1917
- [72] Alfenore S, Molina-Jouve C, Guillouet S, *et al.* Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied microbiology and biotechnology*. 2002, 60: 67-72
- [73] Papanikolaou S, Aggelis G. Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Current microbiology*. 2003, 46: 398-402
- [74] Granger L M, Pareilleux A. Caract érisation cin étique et stoechiométrique de la synthèse d'acides gras chez *Rhodotorula glutinis*. 1992,
- [75] Gill C, Ratledge C. Effect of n-alkanes on the transport of glucose in *Candida* sp. strain 107. *Biochemical Journal*. 1972, 127: 59P
- [76] Aggelis G, Komaitis M. Enhancement of single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing in the presence of *Teucrium polium* L. aqueous extract. *Biotechnology Letters*. 1999, 21: 747-749
- [77] Cescut J. Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique: physiologie et performances de procédés. 2009,
- [78] Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Chevalot I, *et al.* Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Current microbiology*. 2006, 52: 134-142
- [79] Wu S G, Hu C M, Jin G J, *et al.* Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 6124-6129
- [80] Ykema A, Verbree E, Verseveld H W, *et al.* Mathematical modelling of lipid production by oleaginous yeasts in continuous cultures. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1986, 52: 491-506
- [81] Papanikolaou S, Gortzi O, Margeli E, *et al.* Effect of Citrus essential oil addition upon

growth and cellular lipids of *Yarrowia lipolytica* yeast. European Journal of Lipid Science and Technology. 2008, 110: 997-1006

[82] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Inhibition of lipid accumulation and lipid body formation in oleaginous yeast by effective components in spices, carvacrol, eugenol, thymol, and piperine. Journal of agricultural and food chemistry. 2006, 54: 3528-3534

[83] 武双, 华艳艳, 仲崇斌. 色醇对斯达氏油脂酵母产油能力的影响. 微生物学通报. 2008, 35: 200-203

[84] Kendrick A, Ratledge C. Lipid formation in the oleaginous mould *Entomophthora exitalis* grown in continuous culture: effects of growth rate, temperature and dissolved oxygen tension on poly unsaturated fatty acids. Applied microbiology and biotechnology. 1992, 37: 18-22

[85] Evans C T, Ratledge C. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. Lipids. 1983, 18: 623-629

[86] Ratledge C, Hall M J. Accumulation of lipid by *Rhodotorula glutinis* in continuous culture. Biotechnology Letters. 1979, 1: 115-120

[87] Ykema A, Verbree E C, Kater M M, et al. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in wheypermeate. Applied microbiology and biotechnology. 1988, 29: 211-218

[88] Pan J G, Kwak M Y, Rhee J S. High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen-enriched air. Biotechnology Letters. 1986, 8: 715-718

[89] Zhang J, Fang X, Zhu X L, et al. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. Biomass and Bioenergy. 2011,

[90] Li Y, Zhao Z K, Bai F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. Enzyme and Microbial Technology. 2007, 41: 312-317

[91] Zhao X, Hu C, Wu S, et al. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2011, 38: 627-632

[92] Jin M J, Huang H, Xiao A H, et al. A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. Biotechnology Letters. 2008, 30: 1087-1091

[93] Gill C, Hall M, Ratledge C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. Applied and environmental microbiology. 1977, 33: 231-239

[94] Lin J, Shen H, Tan H, et al. Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. Journal of biotechnology. 2011, 152: 184-188

[95] 林金涛, 沈宏伟, 张泽会. 圆红冬孢酵母两阶段培养法生产微生物油脂. 生物工程

学报. 2010, 26: 997-1002

- [96] Peng X, Chen H. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. *Bioresource technology*. 2008, 99: 3885
- [97] Certik M, Shimizu S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of bioscience and bioengineering*. 1999, 87: 1-14
- [98] Zittelli G C, Rodolfi L, Biondi N, *et al.* Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*. 2006, 261: 932-943
- [99] Salim S, Bosma R, Vermuë M H, *et al.* Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of applied phycology*. 2011, 23: 849-855
- [100] Xia C, Zhang J, Zhang W, *et al.* A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnology for biofuels*. 2011, 4: 1-10
- [101] Ratledge C, Cohen Z. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*. 2008, 20: 155-160
- [102] Hsiao T Y, Glatz C E. Water reuse in the L - lysine fermentation process. *Biotechnology and bioengineering*. 1996, 49: 341-347
- [103] Hsiao T Y, Glatz C E, Glatz B A. Broth recycle in a yeast fermentation. *Biotechnology and bioengineering*. 1994, 44: 1228-1234
- [104] Murphy T, Blanch H, Wilke C. Water recycling in extractive fermentation. *Process Biochemistry*. 1982, 17: 6
- [105] Babu P, Panda T. Effect of recycling of fermentation broth for the production of penicillin amidase. *Process Biochemistry*. 1991, 26: 7-14
- [106] Yano T, Mori H, Kobayashi T, *et al.* Reusability of broth supernatant as medium. *Journal of fermentation technology*. 1980, 58: 259-266
- [107] Converti A, Perego P, Lodi A, *et al.* In-situ ethanol recovery and substrate recycling during continuous alcohol fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 1991, 7: 3-10
- [108] 赵堂明. 蒸馏乏水循环回用发酵研究. *中外葡萄与葡萄酒*. 1994, 2:
- [109] 赵紫华, 刘长利, 贺达汉. 循环式节水酒精发酵工艺的研究. *酿酒*. 2007, 34: 55-57
- [110] Kim J S, Kim B G, Lee C H. Distillery waste recycle through membrane filtration in batch alcohol fermentation. *Biotechnology Letters*. 1999, 21: 401-405
- [111] Ding Z, Zhang L, Fang Y, *et al.* Application of full permeate recycling to very high gravity ethanol fermentation from corn. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2009, 26: 719-723
- [112] Zhang W, Xiong R, Wei G. Biological flocculation treatment on distillery wastewater

- and recirculation of wastewater. *Journal of hazardous materials*. 2009, 172: 1252-1257
- [113] Zhang Q H, Lu X, Tang L, *et al.* A novel full recycling process through two-stage anaerobic treatment of distillery wastewater for bioethanol production from cassava. *Journal of hazardous materials*. 2010, 179: 635-641
- [114] 蔡永峰,卢永津. 柠檬酸中和废水循环发酵的初步研究. *天津微生物*. 1992, 8-12
- [115] 周浩然, 詹晓北, 郑志永. 威兰胶生产废液循环利用工艺. *生物加工过程*. 2009, 7: 50-53
- [116] 郭晨,龚宗富. 酵母细胞的絮凝. *化工冶金*. 1997, 18: 245-249
- [117] Gao J, Xu H, Li Q J, *et al.* Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce R, R-2, 3-butanediol. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 7076-7082
- [118] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of biological Chemistry*. 1957, 226: 497-509
- [119] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976, 72: 248-254
- [120] 谭天伟,沈忠耀. 细胞絮凝技术及在生物产品分离中的应用. *生物工程进展*. 1995, 15: 53-56
- [121] Hughes J, Ramsden D, Symes K. The flocculation of bacteria using cationic synthetic flocculants and chitosan. *Biotechnology techniques*. 1990, 4: 55-60
- [122] Weir S, Ramsden D, Hughes J, *et al.* The flocculation of yeast with chitosan in complex fermentation media: the effect of biomass concentration and mode of flocculant addition. *Biotechnology techniques*. 1993, 7: 199-204

致谢

本论文得到导师鲍杰教授的指导才得以完成，导师本人对待学术的严谨求实的态度，渊博的知识以及不断创新的思想使我受益匪浅，给我树立了良好的榜样，促使我养成良好的科研习惯，为我在今后的学术研究的道路上越走越远打下良好的基础。同时，对待工作，鲍老师更是无私无悔，对我的课题和论文都是尽心尽力，付出很多的心血，仅此毕业论文完成之时，向鲍老师表达我最诚挚的感谢！

同时，感谢胡凤仙老师对我在实验以及生活中的帮助。

特别感谢本课题组的成员，刘威同学在实验方面给予的帮助，他总是能够提出自己的想法，给予我实验方面的建议，在此对他表示由衷的谢意。

感谢刘建明师兄、黄潇师兄、张建师兄、董宏伟师兄、楚德强师兄在实验过程中给予的建议和帮助。感谢赵凯、国立浩、李传航、邢恒维、安克红、王远、崔振阳等实验室其他同学在实验及生活中给予的帮助。

最后，感谢在这三年的研究生学习过程中，一直默默支持和鼓励的亲朋好友，在此向他们表示感谢，谢谢他们的鼓舞和激励，使我顺利的完成我的研究生学业，继续向前走。

攻读硕士期间发表的文章

1. Yumei Wang, Wei Liu, Jie Bao. Repeated batch fermentation with water recycling and cell separation for microbial lipid production. Submitted to Frontier of Chemical Science and Engineering. Under Review.
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. 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.
4. 王玉梅, 刘威, 鲍杰. 伴有细胞分离的反复批次发酵模式在产油发酵中的应用. 第五届全国研究生生物质能研讨会, 2011.10.9-11, 中国, 南京.