

分类号: _____

密级: _____

UDC: _____

华东理工大学 学位论文

金属离子对皮状丝孢酵母油脂发酵的影响
及玉米芯残渣生产微生物油脂

崔振阳

指导教师姓名: 鲍杰教授、华东理工大学

申请学位级别: 硕士 专业名称: 发酵工程

论文定稿日期: _____ 论文答辩日期: _____

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: (姓名、职称)

评 阅 人: (姓名、职称)

作 者 声 明

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

论文作者签名：

年 月 日

金属离子对皮状丝孢酵母油脂发酵的影响及玉米芯残渣生产微生物油脂

摘要

本研究包括两个方面，一个是金属离子对皮状丝孢酵母 (*Trichosporon caudatum*) 进行油脂发酵过程的影响，另一个是玉米芯残渣作为原料生产微生物油脂。在金属离子影响部分，考察了 7 种金属离子对油脂发酵的影响，结果表明它们对油脂发酵的影响可分为 3 类。 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 对酵母油脂发酵没有影响， Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 抑制酵母的生长和产油， Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 促进酵母的生长，并且不降低酵母含油率。当 Fe^{3+} 浓度为 0.15 g/L 时，酵母的菌体干重、酵母含油率及油脂产量分别提高了 38.6%、11%和 60%，分别为 12.2g/L，33.2%和 4.0 g/L；证明 Fe^{3+} 可提高酵母油脂产量。在玉米芯残渣生产微生物油脂部分，首先玉米芯残渣可直接被酶水解，且得到高糖浓度的水解液，其次发现 *T. caudatum* 可在水解液中进行油脂发酵。玉米浆 (CSL) 是几种有机氮源中最能提高酵母在水解液中的发酵速率；随着 CSL 浓度的提高，油脂产量显著提高，且酵母含油率没有明显下降。当初始 C/N 合适时，高糖浓度的水解液可以发酵得到 12.3 g/L 的油脂，酵母含油率在 32%，油脂的生产速率为 0.06 g/L/h；油脂的脂肪酸组分中含量最高的是油酸(70%左右)，其次是软脂酸和硬脂酸。该部分实验证明玉米芯残渣转可生能作为生物柴油的原料的微生物油脂，为生物柴油的生产提供了更多的原料选择。

关键词：皮状丝孢酵母；微生物油脂；金属离子；玉米芯残渣；培养基优化

Effect of metal ion on lipid fermentation by *Trichosporon cutaneum* and lipid fermentation using corncob residual

Abstract

This research includes two parts, one is about effect of metal ions on lipid fermentation by *Trichosporon cutaneum*, the other one is about microbial lipid production from corncob residue. First, Seven metal ions were tested in medium with the same C/N for microbial lipid production. Fe^{2+} and Fe^{3+} can promote the growth of yeast, and do not reduce the yeast oil-bearing rate. When the concentration of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was 0.15 g/L, the dry cell weight (DCW), lipid content and lipid were 12.2 g/L, 33.2% and 4.0 g/L, increasing by 38.6%, 11% and 60%, respectively. Secondly, Corncob residue is a solid waste from the xylose production process using corncob, and can directly be hydrolyzed into monosaccharides by cellulase. *Trichosporon cutaneum* 20271 was found to grow in the hydrolysate and accumulate microbial lipid. The medium composition was optimized by testing various ingredients for improvement of lipid productivity. As a result, corn steep liquor (CSL) was found to improve the yeast growth rate in hydrolysate. With the increase of CSL, yeast growth rate and lipid production has improved significantly, and lipid content of the yeast didn't change. When sugars' concentration was higher in hydrolysate, the culture resulted in (DCW), lipid titer, lipid content and lipid productivity of 38.4 g/L, 12.3 g/L, 32% and 0.064 g/L/h respectively.

Key words: *Trichosporon cutaneum*, microbial lipid, metal ion, corncob residual, medium optimization

目录

前言	1
第 1 章 文献综述	2
1.1 生物质能源概述	2
1.1.1 生物质能源的意义	2
1.1.2 生物质能的现状	3
1.2 生物柴油	4
1.2.1 生物柴油的历史及现状	5
1.2.2 生物柴油存在的问题	5
1.3 微生物油脂	6
1.3.1 产油微生物的种类	6
1.3.2 微生物的油脂代谢	9
1.3.3 油脂积累路径	9
1.3.4 影响油脂积累的因素	12
1.3.5 微生物油脂发酵的原料	14
1.4 木质纤维素油脂发酵	15
1.4.1 木质纤维素的处理	15
1.4.2 木质纤维素为原料的油脂发酵	17
1.5 本课题的研究内容与意义	18
第 2 章 材料与amp;方法	20
2.1 试验材料	20
2.1.1 菌种	20
2.1.2 培养基	20
2.1.3 玉米芯残渣	20
2.1.4 纤维素酶	20
2.2 实验仪器与试剂	20
2.2.1 实验仪器	20
2.2.2 实验试剂	21
2.3 微生物油脂发酵	22
2.3.1 菌种保藏和种子培养	22
2.3.2 合成培养基发酵	22
2.3.3 玉米芯残渣水解液制备	23

2.3.4 水解液发酵.....	23
2.4 分析方法.....	23
2.4.1 菌体量测定.....	23
2.4.2 微生物油脂的提取.....	23
2.4.3 油脂组分分析.....	24
2.4.4 发酵液成分分析.....	24
2.4.5 水解液中总氮测定.....	24
第 3 章 金属离子对油脂发酵的影响.....	25
3.1 二价金属离子对油脂发酵的影响.....	25
3.1.1 镁离子对油脂发酵的影响.....	25
3.1.2 锰离子对油脂发酵的影响.....	26
3.1.3 铜离子对油脂发酵的影响.....	27
3.1.4 锌离子对油脂发酵的影响.....	28
3.1.5 钙离子对油脂发酵的影响.....	29
3.1.6 亚铁离子对油脂发酵的影响.....	30
3.2 三价铁离子对油脂发酵的影响.....	31
第 4 章 玉米芯残渣生产微生物油脂.....	34
4.1 玉米芯残渣.....	34
4.2 油脂酵母的抑制物耐受性测试与筛选.....	34
4.3 (NH ₄) ₂ SO ₄ 对酵母产油的影响.....	36
4.4 有机营养物的选择.....	39
4.5 不同单糖浓度的玉米芯残渣水解液的油脂发酵.....	41
第 5 章 结论与展望.....	45
5.1 结论.....	45
5.2 展望.....	46
参考文献.....	47
致谢.....	52

前言

人类的发展离不开能源，社会发展的越快需要的能源也就越多。化石燃料的应用给社会的快速发展提供了能量和物质的基础，给了我们一个物质极其丰富的世界；但同时也给我们带来了很大的问题。首先，化石燃料是不可再生的，总有一天被消耗完；其次，它们的利用打乱了地球上的碳平衡，大量排放温室气体，引起全球变暖、气候异常和生态失衡等一连串的问题。为了可持续发展，人们纷纷研究新能源来摆脱对化石燃料的依赖。可再生能源是最为理想的一种资源，它不仅可以从源源不断地提供能量，还可以使碳循环实现闭环，从而很好地改变地球生态环境。生物质作为地球上广泛存在的可再生资源，受到了人们的广泛关注；人们通过各种技术路线将生物质转化为燃料和化学品，为人类的可持续发展提供更多的选择。

生物柴油是目前研究的生物质能源中研究较多的一种，它占生物质能总量的 1/3 左右，并且在快速发展。生物柴油和石油基柴油相比有很多优点，它热值高，易于运输，润滑性好，可降低温室气体排放，可以和柴油任意比例混合并被柴油发动机以直接使用。目前生物柴油的主要原料是植物油，但其产量有限，且大部分被人们食用。当植物油被用来大量生产生物柴油时，引起植物油的价格上涨；这不仅提高了生物柴油的成本，还影响人们的生活质量。

为解决原材料问题，人们想到了很多办法：寻找更多的产油植物，并提高它们的油脂产量；利用各种废弃油脂，如地沟油，废弃动物油脂等；研究微生物油脂，寻找更多的产油微生物，尝试不同原料和方式的油脂发酵。微生物可以利用很多种原料，生长速率快，几乎不受季节和地域影响，容易大规模培养；所以微生物油脂是长远解决生物柴油原料问题的理想途径。木质纤维素是地球上量最多的生物质资源，有分布广、种类多、廉价等特点，作为生产微生物油脂的理想底物承载了人们的很多期待。

影响微生物油脂积累的因素有很多，首先是培养基组成，特别是 C/N 会严重影响微生物油脂的积累；其次是培养条件，pH、温度和溶氧都会一定程度地影响微生物的含油率。金属离子可以影响酵母胞内的油脂积累工程中涉及的各种酶的活性，从而影响酵母的生长和油脂积累；有很多研究表明有机小分子也会影响微生物生长和油脂的积累。本课题中，我们在合成培养基中考察了几种金属离子和有机小分子对皮状丝孢酵母油脂积累的影响，在培养基主要成分不发生变化的情况下寻找可促进酵母油脂积累的关键因子。我们还研究了利用玉米芯残渣为原料生产微生物油脂过程，玉米芯残渣很容易被纤维素酶水解而得到高糖浓度的水解液，皮装丝孢酵母可以有效地利用玉米芯残渣水解液进行油脂发酵，为玉米芯残渣的合理利用提供了更好的途径，同时为微生物油脂发酵原料的选择提供了很好的参考。

第1章 文献综述

1.1 生物质能源概述

1.1.1 生物质能源的意义

人类的发展离不开能源的驱动，能源是人类社会发展的基石。人类近现代的快速发展离不开化石燃料的利用，它们驱动了人类的技术革新，而后者则给我们一个无比丰富的世界。2011 年底，人们的燃料消费中有 87% 来自化石燃料，其中 33% 来自石油，30% 来自煤炭，剩下的则来自天然气。化石燃料是不可再生的资源，是生物质经过千万年的地质作用生成的，因此它们的储量有限。目前的石油储量只能满足人们 54 年的需求，将是人们最先利用完的化石燃料；其次是天然气，它能够供人们消耗 64 年左右；资源最多的煤炭也会在 100 年后被人们利用完全^[1]。

人们过度依赖化石燃料为社会的可持续发展带来了很大的隐患，一连串的问题逐步显现并逐渐严重。首先，由于探明储量增加缓慢和开采难度的加大，化石燃料的价格近年来急剧攀升，严重阻碍了世界的经济发展。其次，化石燃料储量在全球分别不均，石油有 80% 左右分部在中东地区；由于政治和战争的影响，国际油价变化无常，节节攀升，严重影响各国的能源安全。另外，化石燃料的使用排放大量的温室气体，造成全球气候变化，致使恶劣气象事件频发，严重影响了人们的生活和生产活动。

目前，我国的能源危机极为严重。从表 1.1 中可知，我国的能源消耗中煤炭占总量的 75% 以上，煤炭产量和消耗量占到全世界的一半左右；煤炭的利用会放出更多的温室气体、尘埃颗粒和二氧化硫，产生的雾霾和酸雨使自然环境严重恶化。除煤炭之外，石油和天然气的产量都是小于消耗量；尤其石油，我国每年消耗的石油严重依赖进口，进口量占到了总消费量的一半以上。世界原油的价格一直上涨，对我国的经济带来了很大的负面作用。想要改变能源结构和减少环境污染，我们必须从多方面出发。一方面提高能源利用效率，降低单位 GDP 的能源消耗；另一方面开发各种清洁能源，减少化石燃料的应用。

表 1.1 中国化石燃料现状

Table 1.1 The condition of fossil fuel in China.

化石燃料	消耗量	产量	储量
煤炭	16.76	19.56	645.48
石油	4.38	2.04	20.00
天然气	0.97	0.92	27.90

注：表中数据的单位为千万吨当量原油

人们对各种能源技术进行了全面的调查研究，寻找解决全球可持续发展问题的办

法。现在, 发展较快的新能源分别为风能、太阳能、水电、核能和地热能等。大规模应用时, 这些新技术需要大量的基础设施建设; 另外, 它们都是将能量转化为电能被利用, 限制了它们的适用范围。生物质是地球上继石油、煤炭和天然气之后的第四大自然资源, 生物质转化生成的能源是一种的清洁能源。生物质能源的各种特性和化石燃料的相差无几, 可以使用现有的能源基础设施^[2], 因此是另一重要的可再生物能源领域。如果生物质能够有效地转化为能源, 人们就可以大大降低对人们化石燃料的依赖; 地球上碳循环闭合即可实现, 温室气体的排放将明显减少, 对改善自然环境有重大意义。

1.1.2 生物质能的现状

生物质是植物通过光合作用将太阳能固定而生产的有机物, 是一种很有前景的清洁能源。生物质能有很多种, 有生物柴油、生物醇、生物油、沼气、生物氢气等。它和现在人们使用的化石燃料有很大不同, 理论上是不会排放 CO_2 到大气中, 因为植物的光合作用可以固定 CO_2 ; 全球的陆地植物每年可以将 4000 亿吨的 CO_2 固定到植物体内, 相当于每年化石燃料排放 CO_2 量的 10 倍以上^[3]。生物质中的碳水化合物可以转化各种生物燃料, 如醇类物质、脂肪酸酯和长链环烃等; 它们主要有可生成葡萄糖的淀粉, 来自甘蔗或甜菜的蔗糖, 组成植物细胞壁的木质纤维素等^[4]。现在, 成熟的可以商业化生产的生物质能被称作第一代生物能源, 分别有燃料乙醇和生物柴油; 其中生物乙醇是将淀粉和蔗糖通过微生物发酵的方式生产的, 而生物柴油是由植物油通过转酯化反应得到的。

生物乙醇是现在生物燃料的主要产品^[5], 占到总量的 70% 左右, 它的生产地主要在美洲的美国和巴西。其中, 美国是最大的生物乙醇生产国, 产量占到全球的一半以上; 所利用的原料为玉米淀粉, 因为美国是世界上最大的玉米生产国和出口国。其次是巴西, 占到全球总量的 30% 左右, 其燃料乙醇利用的原料则主要是巴西比较常见的甘蔗, 地处热带的巴西有大量的土地可以生产富含蔗糖的甘蔗。微生物可以直接利用蔗糖, 所以巴西生产生物乙醇的过程比较容易, 甘蔗压榨得到的甘蔗汁经简单处理既可以直接用来发酵生产乙醇。利用玉米淀粉生产乙醇的过程稍有复杂, 玉米淀粉先要经液化酶处理得到寡糖, 再经糖化酶作用生成微生物可以利用的葡萄糖, 然后经发酵生产乙醇。玉米淀粉的加工分为干法和湿法两种; 湿法加工可以先将玉米的胚芽剔除用于玉米油的提取, 因可增加玉米的商业价值而广泛应用。

生物柴油的生产主要原料是植物油, 它占目前第二大生物燃料, 占总量的 30% 左右。由于地域的不同, 生产柴油的原料也有所差异。欧洲国家普遍采用菜子油作为原料, 美国则以大豆油作为原料, 巴西的原料为蓖麻油, 东南亚各国则普遍采用棕榈油。欧洲是目前生物柴油产量最大的地区, 占全球产量的一半以上。

第一代生物能源虽然在近二十年得到了快速的发展, 人们发现它有优点也有缺陷。首先, 生物乙醇因含有氧元素而降低了氮氧化物的排放, 但这一特点也造成了它的热值偏低, 不到石油的 60%。乙醇的分离是一个很耗能的过程, 温度达到它和水的共沸点时乙醇的浓度不能够达到作为燃料的标准, 需要其他手段进一步脱水; 其次它含有乙醛,

对设备有腐蚀性，可以和汽油混合的比例较低。生物柴油目前的催化过程需要大量化学试剂，但其热值和传统柴油的热值相差无几，可以与柴油任意比例混合，是理想的生物燃料。第一代生物燃料的瓶颈在于它们的原料不足，它们使用的原料是原本用于食品和饲料行业，造成了与人争粮争地的困境，大规模发展将会使粮食价格上涨和全世界的粮食危机。目前，由于气候原因甘蔗歉收，巴西需要从国外进口燃料乙醇才能使乙醇和汽油的比例达到规定标准；欧洲每年需要进口植物油用于食用和生物柴油的生产；美国由于燃料乙醇的规模扩张，其玉米的出口量逐渐下降，引起全球玉米价格上涨。

这就使人们进入了进退两难的困境，一方面化石燃料已造成严重的环境问题而急需可再生的能源作替代品，另一方面生物燃料的发展遇到了很大的瓶颈。很多国家制定了各种节能减排的法律及法规，人们急切地需要高级的生物能源技术来解决目前的问题。在政府、组织及个人的资助之下，有很多新的生物技术得到人们研究并逐渐发展，人们尝试各种非粮的原料来生产生物燃料，如工农业废弃物、木质纤维素作物及残渣和各种藻类。这些新的生物质能源技术可分为热裂解和生物转化两种方法，产生的高级生物燃料有生物质油、生物燃气、生物丁醇等。目前，这些新的生物质燃料大都处在实验室或者中试阶段，整个过程中还有很多困难需要去克服。以现在的进展速度，十年后生物质能源的产量将会是现在的两倍左右。

1.2 生物柴油

生物柴油是通过转酯化方式将油脂和短链醇反应，生成的脂肪酸单酯，如脂肪酸甲酯或脂肪酸乙酯。甘油三酯和甲醇的转酯化反应如图所示，一分子油脂和三分子甲醇在催化剂的作用下发生反应，生成一分子甘油和三分子脂肪酸甲酯，而混合的脂肪酸单酯就是目前广泛生成使用的生物柴油。常见的转酯化反应分为酸催化反应和碱催化反应，但是这些方法不够环保；目前酶催化方法受到人们的普遍关注，每年都有很多相关报道。

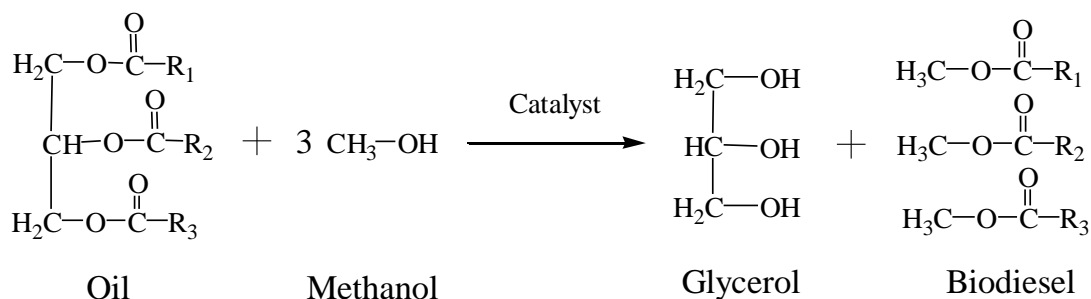


Figure 1.1 转酯化反应生成生物柴油

图 1.1 Trans-esterification for biodiesel production

生物柴油和柴油相比有很多优点，如润滑性好、热值高、无硫、无芳香环、易于运输、安全系数高等^[6]。生物柴油是一种洁净的燃料，和柴油相比可以减少 78%的温室气

体排放量；它可以和柴油以任意比例混合，并直接被柴油机使用；因此，生物柴油被认为是可以替代石油基柴油的理想燃料。

1.2.1 生物柴油的历史及现状

1988 年，生物柴油这一概念才被人们提出来，但人们利用植物油来代替柴油作为燃料可以追溯到 1900 年；在当年的巴黎世博会上，Rudolf Diesel 向人们展示了可以利用花生油作为燃料的柴油发动机，从此拉开了人们利用油脂作为燃料的序幕^[7]。当时，为了保证其非洲殖民地的能源独立，减少液体燃料和煤炭进口，法国政府对以植物油作为燃料的研究非常感兴趣，给 Rudolf Diesel 的研究提供了很大的支持。从第一次到第二次世界大战期间，为了保证自己的能源独立和燃料多元化，有很多国家报道过植物油作为燃料利用的研究，如欧洲的意大利和德国，亚洲的印度和中国，美洲的美国和巴西。世界大战结束后，随着石油时代的来临，人们有廉价的石油基燃料可以利用，植物油作为燃料渐渐地被人们忽略。

然而，地球上的石油资源分布不均，大多数国家所需的燃料都要从少数的产油国进口，为各国社会和经济的发展埋下了隐患。上世纪 70 年代，由于中东的战争和世界政治原因，两次石油危机严重影响了对石油有过度依赖的世界经济，多数发展国家的经济受到了严重抑制。有一次为了保证能源的独立，植物油作为石油替代燃料又进入各国人们的视野。1979 年，南非首先开始了生物柴油发展的计划，利用葵花籽油作为原料，通过转酯化反应后经炼制生产和石油基柴油相似的燃料。第一家生物柴油的中试工厂是由 Gaskos 公司于 1987 年建立的，两年后他们建成了年产量为 2000 万加仑的工厂，实现了生物柴油商业化生产。为减少温室气体的排放，欧洲的生物柴油产量从 1991 年逐渐增长；三年后，美国也建成了生物柴油工厂。

21 世纪以来，生物柴油取得了很快的发展；2011 年全球总产量达到了 2000 万吨以上，占到了世界生物质能的 30% 左右，加上在建产能其产量可达到 4000 万吨左右。欧洲的生物柴油发展最快，其产量达到的世界产量的 50% 左右，其次是南美的巴西，然后是美国等。目前，我国生物柴油的产量不到 100 万吨；但其发展速度很快，依据政府计划 2020 年时其产量是现在的两倍。不久的将来，我国的生物柴油将会有更大的发展空间，为我国的减排计划贡献力量。

1.2.2 生物柴油存在的问题

原料成本占目前生物柴油生产成本的比例最大^[8]，75%-80% 左右，所以生物柴油的关键是选择合适的原料。植物油是传统生物柴油的原料，有大豆油、菜子油、棕榈油和葵花籽油等，因为它们有个相对较大的产量。随着人们为减少对化石燃料的依赖和对清洁能源需求的增加，生物柴油的产量在最近几年有了大幅提高；但植物油的产量有限，其所能生产的生物柴油远达不到人们的需求。植物油不仅供应不足，并且价格一直上涨，严重影响了生物柴油的发展。因此，人们急切需要寻找其他原料来代替现在的食用植物油，解决目前生物柴油的原料困境。

同时，生物燃料和食品竞争原料的问题越来越受到人们的关注，它不仅是原料和经

济问题，还是复杂的社会问题。人们普遍认为我们不能将有限的粮食用来生产燃料，也不能为生产燃料而改变已有耕地结构，更不能破坏自然生态平衡以生产生物燃料。各国的学者都在研究非粮燃料技术，使用非粮的原料生产生物燃料。首先，人们研究了各种油料作物，已有 350 多种植物可产能用于生物产油生产的油脂，但只有少数几种被认为有进行商业化生产生物柴油的可能。麻疯树是最看好的一种油料作物^[9]，有很多优点。它可以在贫瘠的土地上生长，不和粮食作物争夺有限的耕地；它很容易生长，不需要施肥，也不需要人们太多的整理。其次，各种富含甘油三酯的物质也被人们当作生物产油的原料而广泛研究，主要有动物油脂和地沟油等废弃油脂；作为废弃物，它们几乎不需要什么成本，但它们含有过高的游离脂肪酸对转酯化反应有很大影响。

微生物油脂作为一种油脂资源，很早就被人们研究利用，也是一种生物柴油的良好原料。人们应用微生物油脂的历史最早可追溯到 18 世纪下半页，大量产油微生物的鉴定发生在上个世纪 20-40 年代的德国，德国人在两次世界大战时曾利用微生物生产所需的油脂；其后因农业的快速发展，世界各国的微生物油脂的研究几乎处于停滞状态。上世纪 80 年代之后，人们对微生物油脂的研究热情又逐渐高涨，研究主要关于可以生产高附加值的多不饱和脂肪酸，来替代对人们的健康和营养有至关作用的稀有油脂，如可可脂、DHA、ARA 和 EPA 等。同时，关于微生物积累油脂的代谢路径的各种知识也渐渐被人们了解认识；随着对相关知识认识的加深，人们开始研究利用不同底物和不同微生物发酵生产不同的微生物油脂。最近十年，微生物油脂被人们看作是生物柴油的理想原料，吸引了各国研究者的关注。

1.3 微生物油脂

微生物油脂，即微生物生长过程中积累的油脂，其中主要成分为甘油三酯，和动植物油脂的成分相仿。微生物油脂较动植物油脂有很多优点，如生产速率高，易于大规模生产，不受环境和气候的影响，不受地域的限制，可以用的原料广泛，不需要占用大量的土地资源等。

1.3.1 产油微生物的种类

当微生物体内的油脂含量超过 20% 时，该微生物就被认为是产油微生物^[10]。现已鉴定的产油微生物有很多种，几乎涵盖了大多数种类的微生物，如细菌、霉菌、酵母和微藻等。一些产油微生物见表 1.2。

表 1.2 各种产油微生物

Table 1.2 Different oleaginous microorganisms.

Strains	Substrate	Lipid content
Bacterium <i>Rhodococcus opacus</i> PD630	Carob waste	76.0
<i>Gordonia sp.</i> DG	Orange waste	57.8

	<i>Nocardia corallina</i>	Valerate	23.9
Yeast	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glucose	72.0
	<i>Lipomyces starkeyi</i>	Glucose	56.0
	<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	JA extract	43.3
Mold	<i>Mortierella alpina</i>	Glucose	40.0
	<i>Mortierella isabellina</i>	Raw glycerol	53.2
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Glucose	27.6
Microalgae	<i>Scenedesmus obliquus</i>	CO ₂	38.9
	<i>Schizochytrium limacium</i>	-	50.0
	<i>Chlorella vulgaris</i>	CO ₂	27.0

1.3.1.1 细菌

细菌胞内积累虽然可以积累油脂，但所产油脂大都是结构特殊的复杂酯类物质，其中常见的两种分别为 PHB 和 PHA。PHA 是由 150 多种不同的羟基羧酸组成，并储存在胞内的包含体内；人们还曾在包含体内发现其他的亲脂物质。同时，蜡脂也是细菌胞内常见的油脂组成，它作为一种储能物质广泛存在不动杆菌属 *Acinetobacter* 的细菌胞内。能够积累甘油三酯(TAG)的细菌被发现相对较晚，它们大都属于放线菌属^[11]，如分支杆菌 *Mycobacterium*、链霉菌 *Streptomyces*、红球菌 *Rhodococcus* 和诺卡氏菌 *Nocardia* 等。除了上述几种典型的产油细菌之外，还有其他属的个别菌株可以积累甘油三酯；从表 1.2 中可知，大头茶属菌 *Gordonia sp.* DG 可以积累超过菌体干重一半以上的油脂。不同的细菌它们的油脂含量有很大差异；从表 1.2 可知，*Rhodococcus opacus* PD630 利用角豆残渣发酵时胞内油脂可达到菌体干重的 76%，而 *Nocardia corallina* 利用戊酸盐时胞内的油脂含量只有 23.9%。细菌的生长速率很快，能够快速积累油脂，油脂产率较高；但是菌体浓度不能够达到很高，导致油脂产量不高；同时，细菌积累的油脂中甘油三酯的含量较低，不适于作为生物柴油的原料。有些产油细菌可以利用木质素的组成物质来积累微生物油脂，如松柏醛等。

1.3.1.2 霉菌

霉菌是人们最先利用的工业微生物，它们可以生产很多种药品和食品原料，如青霉素、红霉素等抗生素药物，还有柠檬酸、琥珀酸等食品添加剂；同时，霉菌是人们最早研究的产油微生物之一。上世纪 40 年代，人们就发现很多霉菌可以在胞内积累油脂；到 80 年代时，人们开始利用霉菌发酵生产对人健康有重要作用的多不饱和脂肪酸，如 γ -亚油酸 (GLA)。有很多霉菌的胞内油脂含量一般在 50-70%左右，并且所产油脂中的大部分为中性的 TGA，可以作为生物柴油的原料^[12]。深黄被孢霉 *Mortierella isabellina* 利用粗甘油可以积累占菌体干重 53%的 TAG，高山被孢霉 *Mortierella alpina* 在葡萄糖为碳源的培养基中可以积累自身干重 40%的甘油三酯，而匍枝根霉 *Rhizopus stolonifer* 利用葡萄糖发酵产油脂时胞内油脂含量只有 27%左右。霉菌作为一种高级真菌，对外界环境

的影响不敏感, 可以适应很多复杂环境, 对很多抑制因素有很好的耐受性。因此, 霉菌可以利用很多中原料来进行油脂发酵, 各种廉价原料被人们用来发酵生产微生物油脂, 如废糖蜜、污泥水、谷氨酸发酵废水、粗甘油、游离脂肪酸及各种农业废弃物等。各种廉价原料的利用是微生物油脂生产过中的一大优点, 为微生物油脂的大量低价生产奠定了一定的基础。

1.3.1.3 微藻

最近, 微藻吸引了大家的广泛关注, 因为它能够利用 CO_2 和水作为原料生产各种产品。有很多微藻可以积累油脂, 并且可以在各种水质的水中进行生长, 如海水、淡水及各种含有有机物的工农业废水。因此, 微藻油脂作为生物柴油的原料有很多优点, 即可以固定浓度渐增的 CO_2 , 又不会占用耕地, 被人们寄予厚望。

有些微藻可以用 CO_2 为唯一碳源进行光合自养型生长, 还可以利用有机物进行化合异养型生长。对于光合自养生长的微藻, 当 CO_2 浓度在 2% 到 15% 之间时, 它才能以最快的速度进行生长和油脂积累; 然而空气中的 CO_2 浓度只有 0.03%, 所以只利用大气中的 CO_2 不能快速地生产微生物油脂。目前, 有很多工业废气含有高浓度的 CO_2 , 如火电厂和钢铁厂等; 当利用这些工业废气生产微生物油脂时, 还可以降低 CO_2 的排放量。微藻的大规模培养有两种模式, 一种是光合反应器中培养, 另一种是露天水池培养。前一种培养方式所需的设备投资较大, 但微藻的生长速率较高; 后者设备投资低, 很容易规模培养, 但微藻生长速率低且不容易收获菌体。对于异养型微藻, 它可以在普通的发酵罐进行浸没培养, 可以利用富含有机物的工业废水; 这样就可以将废水处理和微生物油脂联合起来。

微藻可以很快地将 CO_2 转化为生物燃料, 因此微藻油脂是一种高效的生物质能源, 是生物柴油最为理想的原料。从目前的技术来看, 微藻油脂的生产还有很多困难要克服。首先, 微藻的菌体密度低, 增加了菌体收获的成本。其次, 微藻较高的含水量 (80% 左右) 对后期生物柴油生产时的转酯化反应有很大影响, 需要消耗很多能量对其进行脱水。另外, 微藻中的碳元素只有菌体干重的 50% 左右; 氮和磷元素分别占到干重的 7% 和 1%, 主要参与胞内蛋白及核酸的合成。当只用微藻来生产人们需要的油脂时, 微藻生长所需的氮源将比现在全世界制造的化肥多出很多; 人们就需要消耗相当大的能量来生产所需的氮源。

1.3.1.4 酵母

酵母是常见的产油微生物, 几百种酵母中有 30 多种是产油酵母; 最为典型的产油酵母分别属于假丝酵母属 *Candida*、隐球酵母属 *Cryptococcus*、红酵母属 *Rhodotorula*、丝孢酵母属 *Trichosporon*、油脂酵母属 *Lipomyces* 和耶氏酵母属 *Yarrowia* 等^[13]。酵母的含油率一般都在 40% 左右; 当培养过程中出现营养限制时, 有些产油酵母的油脂积累可达到菌体干重的 70%, 如黏红酵母 *Rhodotorula glutinis* 胞内油脂含量可以达到 72%。不同酵母积累的油脂脂肪酸组分有所不同, 但它们主要组分和植物油脂的组分相似, 主要有肉豆蔻酸 (C14:0)、软脂酸 (C16:0)、棕榈油酸 (C16:1)、油酸 (C18:1)、亚油酸 (C18:2)

和硬脂酸 (C18:0) 等, 可以作为生物柴油的原料^[14]。酵母的生长速率较快, 可以进行高密度培养, 从而可以快速地积累到高产量的微生物油脂。斯达氏油脂酵母通过分批补料的方式, 发酵生产微生物油脂的速率达到了 0.6 g/L/h^[15]; 通过利用高密度培养技术, 圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* Y4 的油脂生产速率可以达到 0.59 g/L/h^[16]。酵母和霉菌一样可以利用不同的低价原料进行发酵: 隐球酵母 *Cryptococcus curvatus* 可以单独利用乳清或甘油等工业副产品, 斯达氏油脂酵母 *L. starkeyi* 可以利用生活污水进行油脂发酵, *R. glutinis* 可以利用废水生产微生物油脂, *R. toruloides* 可以利用菊芋, *Rhodotorula mucilaginosa* 可以利用木薯淀粉。

1.3.2 微生物的油脂代谢

产油微生物胞内一般存在两种油脂积累的途径。一条途径是将胞外的脂肪酸转运到胞内与甘油反应合成 TAG; 另一途径是从头合成。前者, 微生物利用的是油脂、脂肪酸等疏水性的底物; 后者一般利用各种亲水性底物, 通过微生物的代谢路径产生脂肪酸合成所需的前体(乙酰-CoA 或丙二酰-CoA)及脂肪链延长过程中所需的还原力(NADPH)。不管那种合成路径, 产油微生物合成的油脂大部分是甘油三酯, 一小部分的 *steryl esters*; 它们不能够合成磷脂双分子层而被微生物整合利用, 而是在油脂小体 (LB) 内作为储能物质起来。LB 则是产油微生物胞内特有的细胞器, 有单磷脂分子层包裹, 磷脂层上嵌有不同功能的各种蛋白。有研究发现这些蛋白在油脂代谢过程中有很大的作用, 表明 LB 不是人们认为的那样——储存能量的简单细胞器。

有很多产油微生物可以利用培养基中油脂, 并且在胞内积累大量的油脂。它们可以分泌乳化剂和脂肪酶将油脂颗粒变小, 并且连在细胞表面; 然后通过多种转运方式运输到胞内。当油脂进入胞内后, 它会在胞内发生很多转化反应, 用于微生物的各种代谢路径, 如转化为微生物结构物质, 或者被降解产生能量, 或者作为储能物质被储存在胞内。当葡萄糖作为碳源时, 有些微生物胞内积累的油脂只有菌体干重的 15% 左右, 被认为不是典型的油脂微生物; 但利用游离脂肪酸或者肥皂废料时, 胞内积累的油脂达到了菌体干重的 50% 以上。这些可以利用油脂的微生物体内都有很强的油脂的代谢系统, 被认为是油脂微生物^[17]。

产油微生物胞内进行油脂的从头合成时, 胞内油脂的积累是由培养基中主要营养物质的耗尽或者限制引起的。很多中营养物质的限制会促使油脂积累, 但最常用的方法是限制氮源, 因为氮源的限制比较容易控制。当氮源不足时, 微生物的生长受到限制, 因为氮源的缺乏它们不能合成其生长必须的蛋白质和核苷酸等重要物质; 但是产油微生物可以继续吸收碳源, 并将它们转化为油脂积累在胞内。这也是产油微生物所特有的特点, 非产油微生物处于同样的培养条件下时, 它们只会将碳源转化为多糖类物质, 如糖原、葡聚糖和甘露聚糖等。

1.3.3 油脂积累路径

油脂的从头合成可以分为两个阶段: 细胞代谢及乙酰-CoA 的合成; 脂肪酸和 TAG 的合成。葡萄糖经过糖酵解途径生产丙酮酸, 丙酮酸在丙酮酸脱氢酶的作用下被转运到

线粒体内，产生乙酰-CoA，具体步骤见图 1.2。普通微生物合成脂肪酸所需要的乙酰-CoA 是从线粒体内转运出来，而乙酰-CoA 不能够直接穿过线粒体膜，它先肉碱作用生产乙酰肉碱，后者在穿过线粒体膜。线粒体膜上只有有限的乙酰肉碱，造成线粒体内的乙酰-CoA 不能够大量转运到胞质，导致普通微生物不能积累大量的油脂。这一转运途径和脂肪酸 β 氧化产生的乙酰-CoA 进入线粒体的方式差不多，只是转运方向有所不同。产油微生物胞内脂肪酸合成需要的乙酰-CoA 和普通微生物有所不同。图 1.2 为产油微生物油脂积累路径，线粒体内的乙酰-CoA 先进入三羧酸（TCA）循环生成柠檬酸；生长受到抑制时，线粒体内的柠檬酸产生积累，并被转运到细胞质内；在细胞质内，柠檬酸被柠檬酸裂解酶裂解产生乙酰-CoA 和草酰乙酸；前者被用作脂肪酸的合成，后者转化为苹果酸并在苹果酸酶（ME）进一步作用下产生丙酮酸和具有还原力的 NADPH；NADPH 则可以为脂肪酸链延长过程提供还原力^[18]。

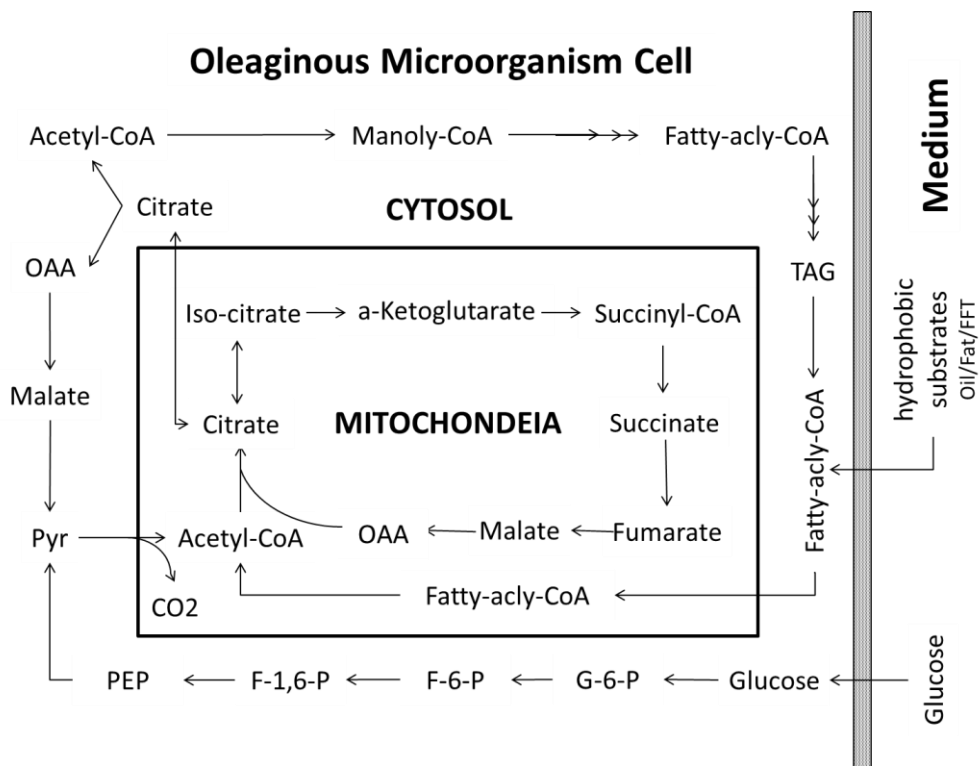


图 1-2 产油微生物胞内的油脂代谢

Figure 1.2 Lipid metabolism in oleaginous microorganism

脂肪酸合成所需的前体产生之后，就可以进行脂肪酸和甘油三酯的合成。脂肪酸的合成路径见图 1.3，乙酰-CoA 在乙酰-CoA 羧化酶（ACC）的作用下生成丙二酰-CoA，此反应是脂肪酸合成的第一步，对微生物胞内油脂的积累有重要作用，而丙二酰-CoA 作为脂肪酸链合成的开始端对脂肪酸合成十分重要。丙二酰-CoA 和乙酰-CoA 在脂肪酸合成酶（FAS）的作用下使脂肪酸链逐渐延长。酵母体内的 FAS 是以六聚体的形式存在的，包括 3 个 α 亚基和 3 个 β 亚基；细菌体内的 FAS 则是以单体的形式存在。酵母胞

内，乙酰-CoA 先和 β 亚基上的酰基转移蛋白 (ACP) 连在一起后才能进入脂肪酸延长过程；细菌胞内，乙酰-CoA 在合成酶 (KS) 作用下连接在 ACP 上^[19]。脂肪酸每延长两个碳原子需要经过很多步骤，丙二酰-CoA 和 ACP 作用在一起后，再和乙酰-ACP 反应生成 β 酮酰基 ACP，然后在还原酶 (KR) 的作用将第二个羰基转换为羟基，然后在脱氢酶 (DH) 的作用下去羟基产生碳双键，最后在烯酰 ACP 还原酶 (EAR) 的作用下通过加氢反应将双键还原成单键。这样酰基-ACP 上的碳链延长两个碳，它再和乙酰-ACP 进行下一次碳链延长的反应。

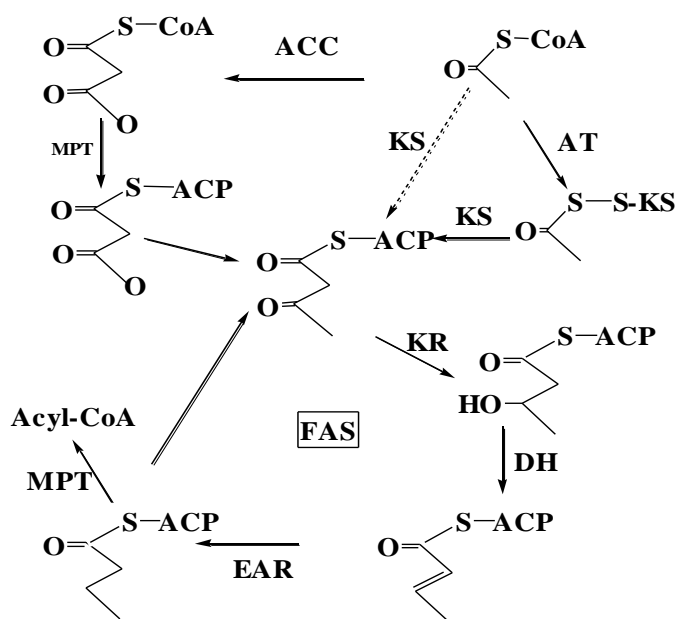


图 1.3 脂肪酸合成路径

Figure 1.3 Fatty acid synthesized in microorganism.

当脂肪酸合成完成后，它需要从 ACP 上脱离生成酯酰-CoA 才能够和甘油生成 TAG。TAG 的合成路径见图 1.4，首先甘油需要在甘油激酶的作用下进行磷酸化，得到 3-磷酸甘油 (G3P)；然后在 3-磷酸甘油酰基转移酶 (G3PAT) 的作用下和酯酰-CoA 发生酯化反应，生成 3-磷酸甘油单酯。这一转酯反应的酰基受体会因微生物的不同而不同，细菌只能将 G3P 作为酰基受体；除了 G3P 之外还有，酵母胞内可存在另外的酰基受体——磷酸二羟丙酮 (DHAP)。当 DHAP 作为酰基受体时，酵母胞内的酯酰-CoA 在对应的酰基转移酶 (G3PDH) 催化下生产相应酰基单酯；后者在相应还原酶 (ADR) 的作用下，生产对应的 3-磷酸甘油单酯。在其转酯酶的催化下，3-磷酸甘油单酯继续进行酯化反应，生成相应磷脂 (PA)。PA 通过去磷酸生成甘油二酯，此反应由磷脂磷酸酶催化进行的；生产的甘油二酯在二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT) 的作用下生成 TAG。

酵母胞内，TAG 的合成一般都在内质网 (ER) 和油脂小体 (LB) 内完成的。油脂积累的过程中 DGAT 的作用非常重要，它催化 TAG 合成的最后一步酯化反应，不仅对酵母油脂积累都有重要影响，还有影响酵母的生长。*Y. lipolytica* 细胞内含有三种甘油二

酯酰基转移酶，分别为 DGA1、DGA2 和 DGA3；当编码这三个蛋白的基因全被敲除后，酵母的生长受到了明显的影响，迟滞期延长，生长速率降低；结果表明油脂的合成和菌体的生长有一定的联系^[20]。油脂积累时，DGA2 的转录水平发生了明显的变化，表明 DGA2 可能与油脂积累有密切关系，并且油脂积累的调控是通过调节转录水平实现的^[21]。有研究表明 DGA1 主要处于 LB 膜上，对 LB 内油脂的积累有重要作用^[22]；它和同处于 LB 膜上的脂肪酶共同决定了 LB 内油脂量的变化。

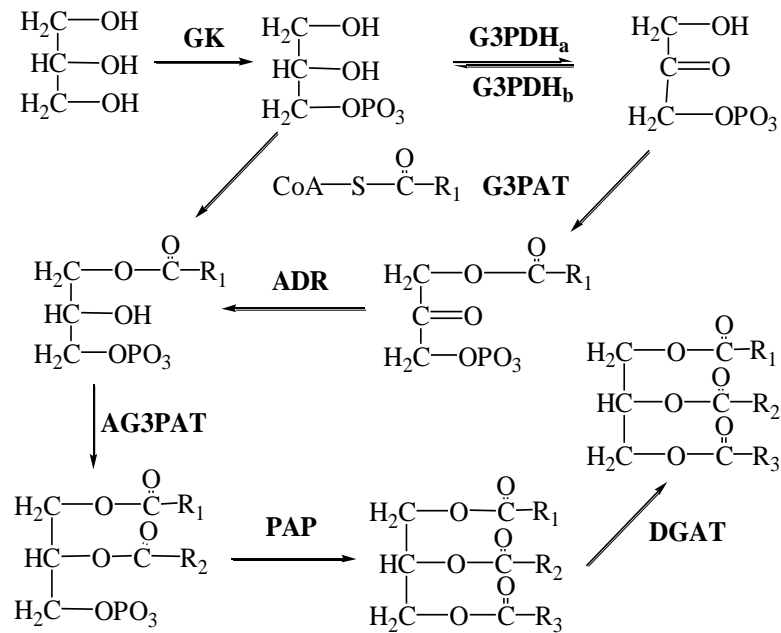


图 1.4 TAG 的合成路径

Figure 1.4 The biosynthesis route of TAG

1.3.4 影响油脂积累的因素

油脂发酵过程中影响微生物油脂积累的因素有很多种，如 pH、温度、溶氧等发酵条件，C/N、氮源、无机盐、微量元素等培养基组成，但最主要的是菌株的特性。

温度和 pH 与油脂发酵过程胞内油脂的积累有很大关系，油脂发酵的温度一般在 25-30℃之间，pH 在 3-6 之间的^[23]。当温度和 pH 发生变化时，微生物胞内油脂的脂肪酸组分会发生变化。*Y. lipolytica* 可以在 24-33℃的条件下利用胞外油脂进行生长；当温度在 19 或者 39℃时，它的生长变的十分缓慢；温度为 28℃时，胞内油脂的积累量最高^[17]。pH 会影响 *Y. lipolytica* 的生长和产油情况，并且它生长和产油的最适 pH 不同；生长最适 pH 为 6.5，而胞内油脂积累的最适 pH 为 5.5。有研究表明 *A. curvatum* 的油脂发酵不受 pH 的影响，pH 在 3.5 到 5.5 之间变化对其胞内油脂的积累没有影响^[15]。和温度和 pH 相比，培养基中的溶氧同样在一定程度上决定了微生物油脂积累情况；溶氧越高，胞内油脂含量也就越高^[24]。*R. glutinis* 利用在福氧情况下进行油脂发酵时，它的菌体量和油脂产量都有了很大的提高。所以，为得到更高的油脂产量，油脂发酵中所牵涉到的

各种培养条件的优化是十分必要的。

无机盐对微生物的生长同样十分重要，它们不仅是胞内某些结构的必要组成部分，还作为辅因子参与各种代谢反应。有研究表明，磷酸盐或硫酸盐限制可以使酵母在相对低 C/N 的培养基中积累油脂；磷和硫是酵母生长过程的必需元素，它们的限制同样抑制酵母的生长，从而促使酵母的代谢流走向油脂积累。微量元素对微生物油脂积累有很大影响，它们是油脂积累途径中某些关键酶的辅因子。曾有人研究几种二价金属离子对油脂发酵的影响^[25]，如 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 等；通过调节它们的浓度，微生物的菌体量和油脂产量都得到了明显提高。这些金属离子同时对 ATP 柠檬酸裂解酶的活性有很大影响，从而影响油脂的积累。有研究表明，苹果酸脱氢酶对 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 有依赖性，它们的存在会提高该酶活性，从而使胞内油脂增加；但 Zn^{2+} 对微生物油脂的积累有抑制作用。Takagi 等人发现盐度可以影响微藻胞内的油脂积累^[26]；当 NaCl 浓度为 1 M 时，微藻油脂含率较 0.5 M 提高 10% 左右，但过高的盐度会抑制微藻的生长。

微生物可利用的氮源可分为有机氮源和无机氮源两种；有机氮源较利于微生物的油脂积累，但不利于微生物的生长；无机氮源的作用则相反，它利于微生物的生长，但不会促进胞内油脂的积累。氮源限制时微生物油脂发酵中常用的措施，这样可以很好地使微生物很好地实现积累油脂；但，同时也会降低微生物的生长从而使油脂产量下降；所以油脂发酵都会寻找最适的 C/N。从目前的研究来看，油脂发酵时的最适 C/N 一般在 100 左右，但不同的菌种有一定的差异；同种菌株利用不同的氮源时，最适 C/N 也会发生一定的变化。氮源限制时，产油微生物可以积累油脂是由于其线粒体内的 TCA 循环代谢下调所致。氮源限制可激活 AMP 脱氨酶，该酶可分解胞内的 AMP 为微生物的生长提供氮源；而 AMP 是 TCA 循环中异柠檬酸脱氢酶催化异柠檬酸产生 α -酮戊二酸反应的辅因子，AMP 浓度降低使该反应受阻。TCA 循环受阻使线粒体的柠檬酸发生积累，后者从线粒体转到胞质中，为油脂合成提供前体原料和还原力。这种调控方式只有在产油微生物胞内才存在；普通微生物再此条件下只能停止生长，并且不积累油脂。

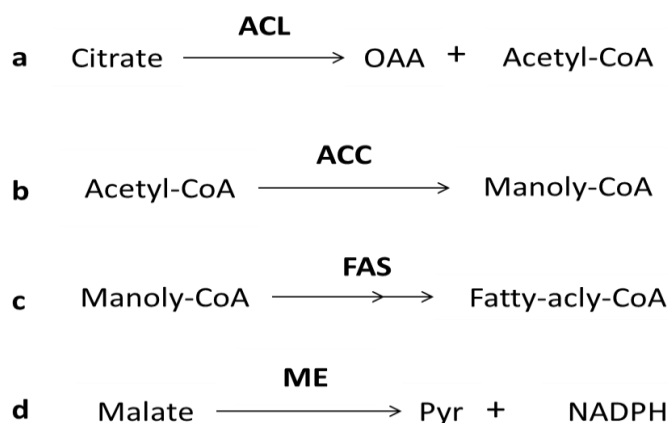


图 1-5 油脂积累的关键步骤

Figure 1.5 Key pathway of lipid synthesis in microorganisms.

油脂发酵和其它发酵一样，至关重要的是发酵菌株；优秀发酵菌株可通过两种方法得到，其一是进行菌株筛选，另一是菌株改造。菌株筛选是一种比较传统的方法，大多数发酵菌株是通过这种方法筛选得到；菌株改造借助分子生物学工具对菌株进行基因改造，它是对菌株进行一种定向的改造。目前，所有进行油脂发酵的微生物都是人们通过传统的方法筛选出来的，但这些菌株的特性并不能满足人们的需要；分子生物学的发展给人们提供了更好的方法，它可以使菌株按照人们的意愿进行改变。现在已有很多关于产油微生物的菌株改造的报道，它们都是通过各种分子生物学手段对油脂积累路径上的关键步骤进行基因改造。人们研究过的油脂积累关键步骤如图 1.5 中所示，当过表达参与反应酶的基因，或者提高它们的表达都能够一定程度地提高油脂产量。

1.3.5 微生物油脂发酵的原料

微生物油脂生产过程中，原料的转化和利用是个主要问题。产油微生物可以利用不同物质作为碳源，它们可以利用葡萄糖、木糖糖等、甘油、乙酸和乙醇等多种类型的底物发酵产油^[27]。它们在微生物细胞内通过不同代谢路径代谢，最后进入 TCA 循环，为微生物的生长提供中间代谢体和能量。

大多数的产油微生物可以利用糖类物质（单糖、二糖、聚糖等）进行油脂发酵。葡萄糖为唯一碳源时，*Cryptococcus curvatus* 通过补料发酵的方法可以快速积累油脂，油脂产率可以达到 0.47 g/L/h^[28]。有人曾研究雅致孢霉（*Thamnidium elegans*）分别利用葡萄糖、果糖和蔗糖时的代谢，发现该菌利用这三种碳源可很好地积累油脂，菌体含有率在 61-70%之间^[29]。另外，有些产油微生物可以利用五碳糖（木糖、阿拉伯糖等）进行油脂发酵，如 *R. glutinis*、*C. curvate*、*T. cutanuum*、*T. fermentans*、*L. starkeyi*、*Y. lipolytica* 等产油酵母。有研究表明 *T. cutanuum* 在一定的条件下可以同时利用葡萄糖和木糖来生产油脂^[30]，为木质纤维素来源的水解液发酵提供了很好的选择。同时，各种聚糖类物质也可以被大多数产油微生物利用，其中的木薯淀粉、菊粉及菊芋汁受到了人们的广泛研究^[31-33]。它们大都来自各种能源植物，它们可以在贫瘠的土地上生长，不和粮食作物争夺耕地，容易生长。聚糖类物质不能够直接被微生物利用，要水解成单糖或寡糖才能被细胞吸收利用，所以它们的利用要经过酸催化或酶催化的过程。有些微生物可以分泌水解酶，如毕赤酵母（*Pichia guilliermondii* Pcla22）因分泌菊粉酶可直接利用菊粉进行油脂发酵，菌体干重有 20.4 g/L，酵母含油率为 60%，油脂基于底物得率达到了 0.19 g/g^[34]。

表 1-3 不同原料的油脂发酵

Table 1.3 Lipid fermentation using different substrates.

Feedstock	Strains	Lipid content % (w/w)
Acetic acid	<i>Crypthecodinium cohnii</i>	56.0
	<i>Cryptococcus. albidus</i>	25.8
Sodium acetate	<i>Cryptococcus albidus</i>	24.5
	<i>Chlorella vulgaris</i>	19.0

SSW	<i>Lipomyces starkeyi</i>	ND
OMW	<i>Lipomyces starkeyi</i>	28.6
MGW	<i>Rhodotorula glutinis</i>	24.7
BFW	<i>Trichosporon dermatis</i>	19.1
Glycerol	<i>Schizochytrium limacinum</i>	73.3
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	43.0
Whey	<i>Mortierella isabellina</i>	25.0
	<i>Apiotrichum curvatum</i>	36.9

注：SSW：污泥污水，OMW：橄榄油厂废水，MGW：谷氨酸发酵废水，BFW：丁醇发酵废水，ND：未检测

各种糖类物质之外，微生物还可以利用很多廉价原料和工农业废弃物，具体如表 1-3 所示。异养的寇氏隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii*) 可以利用乙酸进行油脂发酵，分批补料发酵 17 天后菌体干重达到 109 g/L，含油率为 56%^[35]；*C. albidus* 可以分别利用乙酸、乙酸钠和乙醇作为油脂发酵的底物^[36]，但是菌体量和油脂产量都较低；*C. curvatus* 可利用多种短链挥发性酸发酵产油^[37]，菌体干重更低，但酵母含有都在 50% 左右。这些研究表明产油微生物可以利用有机物含量较高的废水作为油脂发酵的原料，如城市污泥污水^[38]、橄榄油废水^[39]、谷氨酸发酵废水^[40]、丁醇发酵废水等（表 1.3）。食品工业的各种副产物也可被微生物利用，如番茄渣水解液、甘油和乳清^[41]等（表 1.3）。

1.4 木质纤维素油脂发酵

1.4.1 木质纤维素的处理

木质纤维素是生物质能源的廉价原料，所以利用木质纤维素生产微生物油脂有很大的发展前景。每年全球可积累 8.5×10^{10} 吨左右的纤维素和半纤维素原料，其中农作物秸秆可超过 0.29×10^{10} 吨，木质纤维素生产燃料乙醇和丁醇的生物技术已经相对成熟，但木质纤维素进行微生物油脂的生产还处于起步阶段。

木质纤维素是一种结构致密成分复杂的大分子物质，是植物和藻类细胞壁的主要成分；其微观结构如图 1.6 所示，它的主要组分分别为纤维素、半纤维素和木质素。由于其结构致密，木质纤维素不能够被大多数微生物直接利用，经过处理之后就可以释放出微生物可利用的单糖、双糖或寡糖。木质纤维的预处理有很多种，如酸预处理、碱预处理、氨气膨爆、蒸汽膨爆预处理、离子液预处理等。通过物理化学等方法处理之后，木质纤维素的致密结构被破坏，就可以很快地被纤维素酶或者化学试剂催化水解，从而得到微生物可以利用的糖类物质。不同的预处理方法的作用机理是有所不同的；酸法预处理主要破坏木质纤维素中的半纤维素结构，因为稳定性较差的半纤维素在酸的作用下很容易发生水解；碱法预处理主要是将其中的木质素去除，因为木质素较易溶于碱性液体；

氨气和蒸汽膨爆方法主要是通过物理作用将木质纤维素的晶体结构破坏；离子液体法是这些方法中最为温和的，在常温下即可将木质纤维素中不同的大分子聚合物溶解，从而破坏木质纤维素结构。

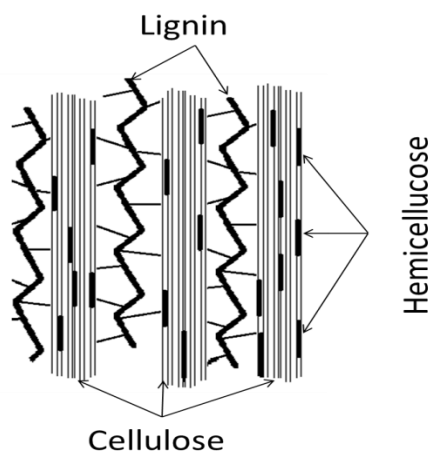


图 1.6 木质纤维素的微观结构

Figure 1.6 The microstructure of lignocellulose.

木质纤维素的预处理过程虽然能够破坏其结构，但同时会产生多种有机小分子物质；其中呋喃类有糠醛和羟甲基糠醛等，有机酸类有乙酸、甲酸和乙酰丙酸等，芳香类的香兰素、四羟基苯甲醛^[42]。这些抑制物会对很多微生物的生长和发酵有抑制作用，如乙醇、乳酸和微生物油脂等各种生物炼制过程。为了使微生物发酵正常进行和速率提高，人们依据抑制物的物理化学性质研究了不同的抑制物去除方法，具体方法见表 1.4。这些方法中，最常使用的是碱处理脱毒、水洗脱毒和生物脱毒；前两种方法需要大量的化学试剂和水资源，与生物炼制的绿色属性相矛盾，并且会降低可利用底物浓度和有益营养物质。生物脱毒是利用某些微生物体内的特殊代谢路径将各种抑制物代谢来达到脱除抑制物的目的，但现在的生物脱毒过程一般由霉菌参与，导致脱毒过程缓慢，并且为后续发酵引入杂菌。所以，想利用目前的预处理方式处理的物料进行生物炼制，就必须寻找更好的脱毒方式，或者改进现有的脱毒方法，再者就要筛选对抑制物有高耐受性的菌株。

表 1.4 抑制物脱除方法

Table 1.4 Methods to detoxification of inhibitors from lignin-cellulose.

Technique	Procedure	References
Chemical additives	Alkali ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaOH , NH_4OH)	[43,44]
	Reducing agents (Dithionite, Dithiothreitol, Sulfite)	[45]
Microbial treatment	<i>C. ligniaria</i> , <i>T. reesei</i> , <i>U. thermosphaericus</i> , <i>A. resinae</i> ZN1	[46-48]
Wash	Water	[49]

Enzymatic treatment	Laccase, Peroxidase	[50,51]
Heating and vaporization	Evaporation, Heat treatment	[52,53]
LL Extraction	Ethyl acetate, Tri-alkyl-amine, SF Extraction	[52,54,55]
LS Extraction	Activated carbon, Ion exchange, Lignin	[56-58]

注：SF Extraction: Supercritical fluid extraction. SF Extraction: 超临界流体萃取。

1.4.2 木质纤维素为原料的油脂发酵

木质纤维素通过厌氧发酵进行的生物炼制过程已经得到很好的发展，它们不仅可以利用水解液进行发酵，还可以进行同步糖化发酵（SSF）。SSF 可以使发酵体系的固含量提高到 30-40%，高底物浓度从而得到更高的产物浓度。张建等人利用稀酸预处理的玉米秸秆进行乙醇同步糖化发酵；当固含量和纤维素酶用量分别为 30% 和 30 FPU/g DM 时，乙醇浓度达到了 64.6 g/L，是理论得率的 80% 以上^[59]。同样原料，赵凯等人利用乳酸片球菌（*Pediococcus acidilactici*）进行乳酸发酵，乳酸浓度可以达到 100 g/L 以上，乳酸的率为 70% 左右^[60]。微生物油脂发酵是好氧发酵，培养基中的溶氧和油脂产量有很大关系；SSF 发酵溶氧受到限制，所以油脂发酵通常利用木质纤维素水解液进行发酵。最近有关于 SSF 方式进行油脂发酵的报道，刘威等人以 15% 固含量的玉米秸秆进行油脂发酵，得到 4 g/L 左右的油脂产量^[61]。另外，油脂发酵产生的油脂是在胞内，细胞裂解后经萃取才能得到油脂；SSF 发酵时，体系内过多的不溶性物料残渣给油脂萃取增加了困难。

如表 1.5 所示，有很多种木质纤维素被人们拿来作为微生物油脂发酵的原料，如麦秆、稻草、稻壳、玉米秸秆、玉米芯、玉米皮、杨树叶、高粱渣等^[27]。从表 1.5 可知，当 *T. fermentans* 利用稻草水解液进行油脂发酵时，油脂产量相对较高，有 11.5 g/L 左右^[62]，但其菌体含油率不是最高；*M. isabellina* 利用稻壳水解液发酵时，菌体含油率最高，能够达到 64.3%^[63]。研究表明，不同的原料对油脂的生产有很大影响；有些物料的水解液中氮源浓度过高，从而不利于油脂的积累；所以木质纤维素油脂发酵的原料选择时整个过程的重要环节，需要人们不断的研究与探索。

表 1.5 木质纤维素油脂发酵

Table 1.5 Microbial conversion of lignocellulosic biomass into oils.

Strains	Carbon source	Biomass (g/L)	Lipid content %	Reference
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Wheat straw	17.2	33.5	[64]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Sugarcane bagasse	11.4	58.5	[65]
<i>Trichosporon fermentans</i>	Rice straw	28.6	40.1	[62]
<i>Mortierella isabellina</i>	Rice hulls	5.6	64.3	[63]
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Corn stover	15.4	23.5	[66]

<i>Rhodotorula toruloides</i> Y4	Corn stover	15.2	36.4	[67]
<i>Trichosporon dermatis</i>	Corn cobs	24.4	40.1	[68]
<i>Mortierella isabellina</i>	Corn fiber	18.2	45.7	[69]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Populus leaves	18.1	34.2	[70]
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Sorghum bagasse	5.6	46.4	[71]

1.5 本课题的研究内容与意义

课题研究内容包括两个方面，一方面是关于金属离子对皮状丝孢酵母油脂发酵过程的影响，另一方面是关于该酵母利用玉米芯残渣为原料进行油脂发酵尝试。

当处于营养限制的状态时，微生物生长受到限制才会将底物转化为油脂储于胞内；如果不出现营养限制，微生物只会将底物转化为生长所需的能量和各种中间体。人们对很多营养限制状态做过油脂发酵的研究，如氮、硫或磷等限制因素；采用营养限制的方法虽能够促进微生物胞内油脂的积累，但不利于微生物的生长。有很多小分子物质可以影响微生物胞内的酶活性，从而改变微生物的代谢路径；所以我们考察各种金属离子对皮装丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 进行油脂发酵的影响，寻找可以在营养条件一样的情况下促进酵母生长且不影响油脂积累的关键因子。从已有的文献报道出发，找出油脂积累路径中的关键酶，如柠檬酸裂解酶 (ACL)、苹果酸酶 (ME) 和脂肪酸合成酶 (FAS) 等。二价金属离子是各种酶常见的辅因子，可以影响很多胞内酶的酶活性。因此，我们挑选了 7 中金属离子， Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} ，考察它们对 *T. cutaneum* 油脂积累的影响。

目前，有很多关于以木质纤维素为原料进行油脂发酵的研究；但这一过程还存在很多问题需要人们解决，如原料的预处理和水解液中氮源浓度高。首先，经过预处理之后木质纤维素才能被纤维素酶水解得到可发酵糖，预处理过程需要投入大量的能量，并且会产生各种抑制物。其次，木质纤维素原料得到的水解液中糖浓度大都在 50 g/L 以下，人们通过将水解液浓缩来提高糖浓度，使发酵的初始 C/N 提高，从而使微生物油脂产量提高。不经预处理或者温和的预处理后，有很多含有纤维素或半纤维素工业废弃物可以被纤维素酶水解得到可发酵糖；其中和很多原料的纤维素含量很高，经过酶解后可得到高浓度的糖。玉米芯残渣是工业生产木糖过程中产生的工业废弃物，它的纤维素含量可超过 50%，水解液中的葡萄糖可以达到 100 g/L 以上；所以我们尝试利用它生产微生物油脂。首先，我们对发酵菌种进行了筛选，以确定在玉米芯残渣水解液中进行油脂发酵的菌种；然后，尝试了不同氮源对油脂发酵的影响，以确定该过程合适的氮源；最后，通过改变纤维素的酶用量提高水解液中的葡萄糖浓度，进一步提高油脂的产量，并确定合适的纤维素酶用量。我们还检测了玉米芯残渣所生产微生物油脂的脂肪酸组分，确定它可否作为生物柴油原料。

首先，本课题关于金属离子对 *T. cutaneum* 进行油脂发酵的影响研究发现 Fe^{3+} 可以

在 C/N 相同的情况下促进酵母的生长，并且不会抑制酵母胞内的油脂积累，很好地提高了油脂产量，为 *T. cutaneum* 的油脂发酵过程提供了提高油脂产量的方法策略。其次，课题中关于利用玉米芯残渣生产微生物油脂的研究证明玉米芯残渣可以很好地作为油脂发酵的原料，为微生物油脂生产提供了更多的原料选择，并且将玉米芯残渣的无害处微生物油脂的发酵很好地结合起来。

第2章 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 菌种

实验所用菌种：皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* 20271，购自中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)；粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* 2.703、*Rhodotorula glutinis* 2.704 和圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* 2.1609 购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)；斯达氏油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 70295 购自德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ)。

2.1.2 培养基

YPD 培养基：葡萄糖 20 g/L，YE 10 g/L，蛋白胨 20 g/L。

固体 YPD 培养基为添加 1.5% 琼脂的 YPD 培养基。

合成培养基：葡萄糖 60 g/L，YE 1.0 g/L， KH_2PO_4 1.0 g/L，其它营养盐适量添加，如 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 MnCl_2 、 FeSO_4 、 FeCl_3 、 CuSO_4 、 CaCl_2 等。

2.1.3 玉米芯残渣

试验中所用玉米芯残渣由山东康地恩生物集团提供，其含水量为 72% 左右，干物料中含有 52.2% 左右的纤维素和 3% 左右的半纤维素，呈酸性。

2.1.4 纤维素酶

试验中所用的纤维素酶由上海尤特尔公司提供的固体纤维素酶 Youtell #6，酶活为 135 FPU/g。

2.2 实验仪器与试剂

2.2.1 实验仪器

试验中用到的仪器见表 2.1。

表 2.1 实验仪器

Table 2.1 Experiment equipment.

仪器	型号	生产商
超纯水机	Milli-Q Synthesis	Millipore
核酸蛋白质分析仪	DU-800	Beckman
自动高温灭菌锅	YXQ-LS-75S II	上海博迅实业有限公司
全自动高压灭菌锅	TOMY-SX-700	天美科技有限公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器

隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器
气浴恒温摇床	HZ-9310KB	太仓华利达有限公司
粉碎机	HR2094	飞利浦家庭电器有限公司
冷柜	BC/BD-625GA	河南新飞电器有限公司
冰箱	BCD-239VC	海尔电气
制冰机	XB-70	宁波新芝生物科技
台式离心机	5415R	Eppendorf
大型超高速离心机	J-26	Beckman
旋转蒸发器	RE-201D	上海科兴仪器有限公司
电子天平	BS224S	梅特勒公司
电子天平	BS223S	梅特勒公司
高效液相色谱	LC-20AD	岛津公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化有限公司
超声波脱气机	KWT-100A	科伟达公司
四联发酵罐	Biotech-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司
5 L 反应器	Biotech-5 L	上海保兴生物设备工程有限公司
50 L 反应器	Biotech-50 L	上海保兴生物设备工程有限公司
电子计重器	AOS-15A	上海三积分电子有限公司

2.2.2 实验试剂

实验中用到的试剂见表 2.2。

表 2.2 试剂

Table 2.2 Reagents

试剂	规格	生产商
浓硫酸	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
木糖	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
糠醛	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
羟甲基糠醛	AR	比利时 Acros
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
甲酸	AR	上海振兴化工厂
乙酰丙酸	AR	美国 Johnson Matthey
MgSO ₄	AR	上海美兴化工有限公司
MnSO ₄	AR	中国惠兴生化试剂有限公司

CuSO ₄	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
FeSO ₄	AR	国药集团化学试剂有限公司
FeCl ₃	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
CaCl ₂	AR	上海振兴化工厂
KH ₂ PO ₄	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
(NH ₄) ₂ SO ₄	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
YE	AR	OXOIDLID BASINGSTOKE HAMPSHIRE ENGLAND
蛋白胨	AR	国药集团化学试剂有限公司
玉米浆	AR	中国惠心生化试剂有限公司
尿素	AR	国药集团化学试剂有限公司
消泡剂	-	上海飞达贸易公司
浓盐酸	AR	上海振兴化工厂
KS2O8	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
氯仿	AR	上海化学试剂有限公司
甲醇	AR	上海振兴化工一厂
三氟化硼	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
正己烷	AR	上海菲达工贸有限公司
氯化钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
乙腈	HPLC	上海星可生化有限公司

2.3 微生物油脂发酵

2.3.1 菌种保藏和种子培养

从固体 YPD 培养基中挑取单菌落，接种到装有 20 mL YPD 培养基的 100 mL 摇瓶中，30℃ 下 180 rpm 的摇床中培养 24 h；然后将灭过菌的 60% 的甘油加到培养物中，使甘油含量达到 30%；最后将混合好的培养基分装到已灭菌的保存管内，液氮快速冷冻后置于 -80℃ 的冰箱内保存。

取一个菌种保存管，溶解后接种到含有 20 mL YPD 培养基的 100 mL 摇瓶中，30℃ 下 180 rpm 摇床中对菌种活化 12 h，然后以 10% 的接种量转接到相应量的 YPD 培养基中扩大培养 24 h，作为油脂发酵的种子。

2.3.2 合成培养基发酵

摇瓶发酵：将 2.3.1 中的菌种以 10% 的接种量接种到发酵培养基中进行油脂发酵，500 mL 摇瓶装液量为 50 mL，温度为 30℃，摇床转速为 180 rpm。

3 L 发酵罐发酵：种子制备的方法见 2.3.1 中，10% 接种量接种到 1L 合成培养基中，温度为 30℃，溶氧为 20%，pH 保持在 5.0。

2.3.3 玉米芯残渣水解液制备

发酵罐的在线灭菌：5 L 发酵罐中加入 3.5 L 左右的自来水以保护 pH 电极，将标定好零点和斜率的 pH 电极放入发酵罐相应位置，拧好发酵罐上盖上的各个螺母保证好发酵罐的密封性；然后用灭菌罩将发酵罐的上半部分紧密密封；最后将蒸汽发生器产生的 0.3 MPa 左右的蒸汽通入发酵罐夹套，对发酵罐进行升温灭菌；当灭菌罩内的冷空气排净后，关紧罩上的排气阀，控制夹套的蒸汽进口及出口使灭菌罩内的压力保持在 0.08-0.09 MPa 之间，保压保温 20 min。

玉米芯残渣水解：将发酵罐内的水通过底部排料阀排掉，关紧阀门后将灭过菌的一定体积的去离子水通过加料口加到罐内；然后开启发酵罐的搅拌桨，转速为 300 rpm，再将灭好菌的玉米芯残渣分批加到发酵罐内；当预料加到所需量的 70% 左右，通过加酸碱的蠕动泵将罐内的 pH 控制在 4.8 左右；当发酵罐的温度稳定在 50℃ 左右时，加入适量的纤维素酶，通过物料的水解降低体系的粘度；然后再将剩余的物料分几次加入，使最后的体系固含量为 15%；保持 pH 和温度将水解过程持续 48 h 或者 72 h。

水解液处理：玉米芯残渣水解过程结束后，通过高速离心去除其中的固体残渣；上清液置于灭菌锅内，115℃ 灭菌 20 min；然后在洁净工作台内将灭菌后的水解液通过滤纸除去产生的沉淀，最后置于 4℃ 冰箱内备用。

2.3.4 水解液发酵

水解液发酵时，培养基为添加与合成培养基相同浓度的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ， KH_2PO_4 ，不同氮源添加相应浓度。种子培养和发酵培养条件和 2.3.2 中的合成培养基发酵条件相同。

2.4 分析方法

2.4.1 菌体量测定

OD_{600} 的测定：取 1 mL 发酵液，用台式离心机在 13000 rpm 下离心 5 min 后除去上清液，然后用去离子水将菌体洗涤 2 次，最后用 1 mL 去离子水将菌体悬浮起来，在 600 nm 下测定吸光值。去离子水作空白对照。

菌体干重 (DCW) 测定：取 30 mL 发酵液，超高速离心机 10000 rpm 离心 5 min 后除上清，用去离子水洗涤 2 次，然后用 6 mL 去离子水将菌体转移到称过重量的培养皿内，置于 80℃ 的烘箱内至衡重，用差重法测定 DCW。

2.4.2 微生物油脂的提取

用 5 mL 的 4 M 盐酸将 2.4.1 中的干菌体浸泡，用移液器吹成浊液后转移到 50 mL 离心管内，并用 1 mL 盐酸将培养皿洗涤一次，洗涤液一并移至离心管内。将离心管置于沸水中反应 10 min，然后置于冰上快速冷却菌液，使酵母细胞裂解；然后加入氯仿：甲醇 (2:1, v/v) 20 mL，用封口膜将离心管封紧后在 180 rpm 的摇床上震荡 1 h；之后 10000 rpm 离心 5 min 使混合液分层；用注射器将含有油脂的氯仿层抽到圆底烧瓶内，

在 80℃ 下通过旋转蒸发将氯仿去除，然后将烧瓶置于 80℃ 烘箱内烘至衡重；差重法测定油脂产量。

2.4.3 油脂组分分析

取 2.4.2 中提取的油脂，加入 5 mL 0.5 M 的 KOH 甲醇溶液到烧瓶内，在 60℃ 的水浴摇床内反应 1-2 h；待油脂完全皂化后加入 4 mL 三氟化硼甲醇溶液（4:10, v/v），进行 30 min 左右的酯化反应；冷却后分别加入 2 mL 正己烷和饱和氯化钠，充分震荡后 10000 rpm 条件下离心 5 min 使反应体系分层；取体系上层含有脂肪酸甲酯的正己烷层，利用气相色谱-质谱联用仪（GC-MS）测定脂肪酸组分。

GC-MS 参数：进样口温度 280℃；进样量 1μL；色谱柱 PE-5 (30 m×0.25 mm×0.25μm)；分流：不分流进样口=10:1；检测器温度(FID, 氢火焰离子化检测器) 300℃；载气氦气，流速 1 mL/min；升温程序为在 80℃ 条件下保留 3 min，以 16℃/min 升温到 280℃；分析系统为 NIST MS Search 2.0。

2.4.4 发酵液成分分析

发酵过程中使用 HPLC 测定发酵液的组分浓度变化情况，分别有葡萄糖、木糖、甲酸、乙酸、乳酸、糠醛和羟甲基糠醛。5 mM 的 H₂SO₄ 为流动相，流速为 6 mL/min，色谱柱为氢柱，柱温为 65℃，检测器为示差检测器。

每种物质都利用标准品测好它们浓度与峰面积相关的标准曲线；样品测定要经过稀释和过滤后进样检测。

2.4.5 水解液中总氮测定

水解液中的氮源测定采用过硫酸钾硝化法测定。

试剂的配制：测定过程中需要的溶液有 KNO₃、碱式 K₂S₂O₈ 和 10% HCl，所用的器皿都用重铬酸钾洗液清洗干净。

(1) KNO₃ 标准溶液：KNO₃ 首先在 105℃ 的烘箱内烘干，然后用不含氮的超纯水配制成 100 μg N /L 的 KNO₃ 溶液作为储备液；加入 CHCl₃ 作为保护剂后，可保存 6 个月。储备液稀释 10 倍后用于标准曲线的测定。

(2) 碱式 K₂S₂O₈：先称量 15 g 的 NaOH 溶解，溶液冷却后加入 40 g 的 K₂S₂O₈，定容到 1 L 后置于超声清洗仪中溶解完全。

(3) 10% HCl：在 9 体积的超纯水中加入 1 体积的浓盐酸配制而成。

测定步骤：将 40μL 样品加到 25 mL 试管内并用超纯水定容到 10 mL，然后加 5 mL 碱性过硫酸钾溶液进行硝化反应（120℃，30 min），冷却后加入 1 mL 10%（v/v）HCl 中和剩余的碱，最后加水定容到 25 mL，分别在 220 nm 和 275 nm 下测定吸光值。根据公式： $A=A_{220}-2\times A_{275}$ ，算出样品的吸光值 A，然后通过标准曲线公式计算出样品中的总氮量。

第3章 金属离子对油脂发酵的影响

3.1 二价金属离子对油脂发酵的影响

3.1.1 镁离子对油脂发酵的影响

微生物代谢过程中很多种酶的活性都需要金属离子作为辅因子，金属可以影响它们的酶活性质，从而可以影响微生物胞内的油脂积累。 Mg^{2+} 是胞内大部分酶的辅因子，如糖酵解和呼吸作用过程中的一些关键酶；同时，油脂积累过程中的关键酶（苹果酸酶 ME）受到 Mg^{2+} 的很大影响。

合成培养基中分别添加 0、0.25、0.5、1.0、1.5 和 2.0 g/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，然后进行油脂发酵实验，以寻找 Mg^{2+} 对油脂发酵影响的规律及最适浓度；图 3.1 是发酵 96 h 的结果。

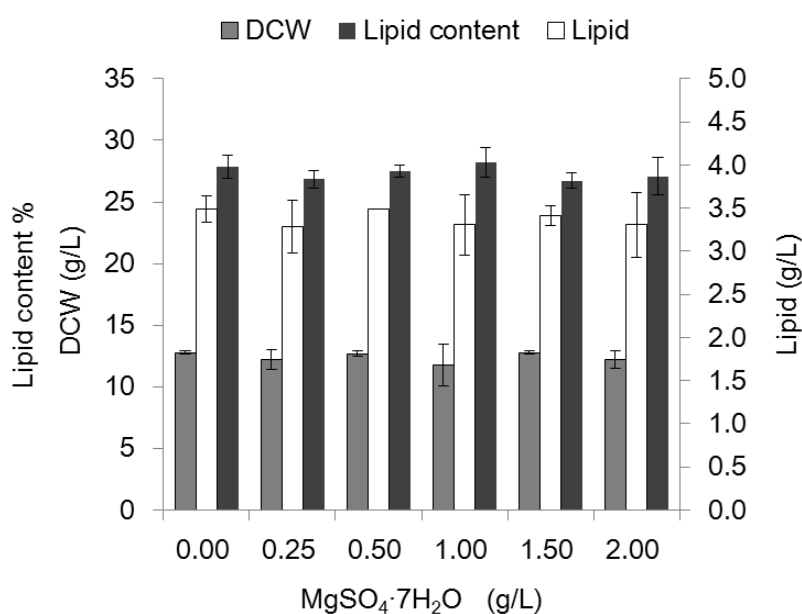


图 3.1 Mg^{2+} 对油脂发酵的影响

Figure 3.1 Effect of Mg^{2+} on lipid fermentation.

从图 3.1 可知， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度从 0 g/L 增加到 2.0 g/L 时，皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 的菌体量(DCW)一直保持在 11 g/L 左右；酵母的含油率(Lipid content)同样不受 Mg^{2+} 的影响，一直处于 26-28%之间；所以，胞内油脂积累量 (Lipid) 几乎一致，在 3.3-3.5 g/L 之间。有研究表明， Mg^{2+} 在一定浓度下可以促进斯达油脂酵母 (*Lipomyces starkeyi*) 的油脂发酵。当在基础培养基中添加 Mg^{2+} 时，酵母菌体干重和油

脂产量较不添加时都有很大提高, 酵母含油率也从 20% 提高到 35% 左右, 说明 Mg^{2+} 可以同时促进 *L. starkeyi* 的生长和油脂积累^[72]。对于 *T. cutaneum*, 不同浓度的 Mg^{2+} 对酵母的生长和油脂积累没有明显影响。本实验所用的培养基利用 1.0 g/L 的 YE 作为氮源, 而 YE 中含有多种类型的营养; 这样 *T. cutaneum* 就可以在不添加 Mg^{2+} 的情况下能够很好地生长, 从而没能在试验中表现 Mg^{2+} 对酵母生长和产油的促进作用。还有, Mg^{2+} 的加入不会影响酵母的糖耗速率, 从而油脂基于底物的得率 (Y_{LS}) 和菌体得率 (Y_{XS}) 也没有发生明显变化。

3.1.2 锰离子对油脂发酵的影响

有研究表明, Mn^{2+} 比 Mg^{2+} 更能促进苹果酸酶 (ME) 的活性, 可以促进胞内苹果酸进行脱氢反应为油脂的合成提供还原力 (NADPH)。合成培养基中添加的 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 的浓度分别为 0、0.1、0.2、0.5 和 1.0 g/L, 油脂发酵 96 h 的结果见图 3.2。

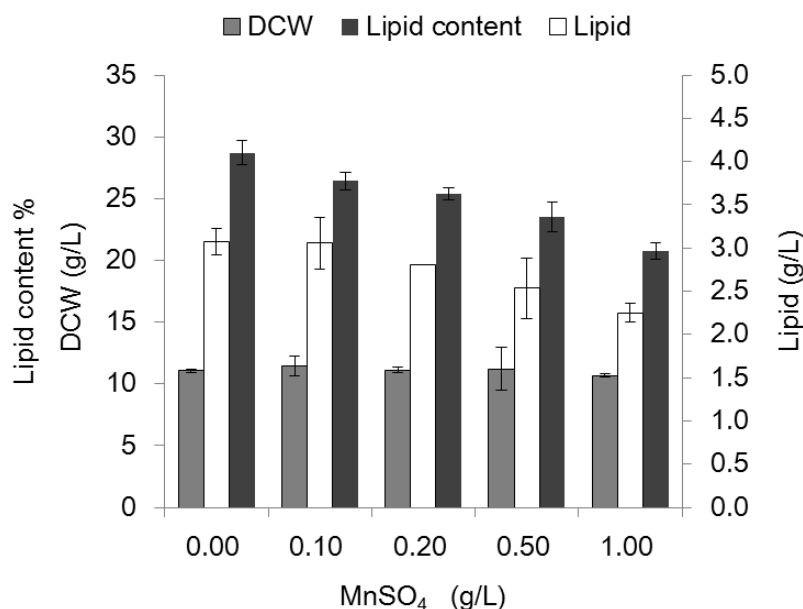


图 3.2 Mn^{2+} 对油脂发酵的影响

Figure 3.2 Effect of Mn^{2+} on lipid fermentation.

从图 3.2 可知, 随着 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 浓度的增加, DCW 保持在 10.7-11.4 g/L 之间; 但是 *T. cutaneum* 的含油率逐渐下降, 从开始的 29% 下降到最后的 21%; 油脂产量从 3.2 g/L 下降到 2.2 g/L。培养基中添加 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 对酵母的生长, 既没有促进作用又没有抑制作用; 但是, Mn^{2+} 明显抑制胞内油脂的积累, 这和实验预期有很大出入。有可能是因为 Mn^{2+} 虽然可提高了 ME 的活性, 并且提供更多的 NADPH; 但, 同时它却抑制了油脂积累途径中其他关键酶的活性, 从而使该反应成为限制步骤, 最终是油脂积累路径的通量下降。有研究同样发现 Mn^{2+} 同样不利于发酵性丝孢酵母 (*Trichosporon fermentans*) 胞

内油脂的积累；当 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的浓度从 0 g/L 增加到 10 g/L 时，酵母的含油率从 45.6% 下降到 30% 左右^[73]。

随着 Mn^{2+} 浓度的变化，*T. cutaneum* 耗糖速率有先降低在上升的趋势；故 $Y_{X/S}$ 从开始的 0.3 先增加到 0.33，又下降到 0.26，而 $Y_{L/S}$ 从 0.85 一直下降到 0.54。这就表明高浓度的 Mn^{2+} 对底物转化为菌体和油脂都有不利影响。

3.1.3 铜离子对油脂发酵的影响

3.1.2 的实验结果证明 Mn^{2+} 不能够促进 *T. cutaneum* 胞内油脂的积累，于是尝试在培养基中添加同为二价金属离子的 Cu^{2+} ，考察它对酵母油脂发酵影响。油脂发酵 96 h 的结果见图 3.3。

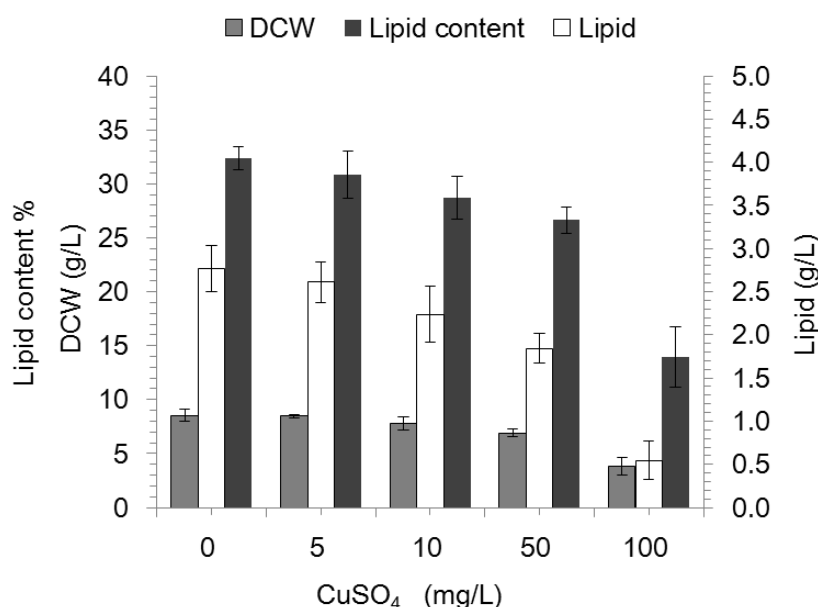


图 3.3 Cu^{2+} 对油脂发酵的影响

Figure 3.3 Effect of Cu^{2+} on lipid fermentation.

从上图可知，当 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度从 0 mg/L 逐渐增加到 100 mg/L 的过程中，DCW 从 8.5 g/L 下降到 3.8 g/L；酵母含油率从最高的 32% 逐渐下降到 14%；油脂产量同样在逐渐下降，从 2.8 g/L 下降到 0.54 g/L。结果表明， Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 一样不利于酵母胞内油脂的积累，但 Cu^{2+} 会严重抑制酵母的生长。K. Jernejc 等人研究黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 时发现，当培养基中只添加 Mg^{2+} 时， Cu^{2+} 会使 *A. niger* 胞内油脂含量从 12% 下降到 6% 左右，同时使培养基中柠檬酸发生明显积累。有研究表明 Cu^{2+} 可以和 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 竞争 ME 上的位点，从而抑制 ME 的活性，这有可能是其不利于微生物胞内油脂积累的原因。同时，有些研究表明少量的 Cu^{2+} 可以促进产油酵母胞内油脂的积累，但 Cu^{2+} 的添加量相对较少。所以，对于微生物油脂积累， Cu^{2+} 有可能对不同的微生物产生不同的影响。

随着 Cu^{2+} 浓度的增加, *T. cutaneum* 消耗的葡萄糖从 38 g/L 左右下降到 20 g/L 左右, 底物的消耗被 Cu^{2+} 抑制的程度很大; 但是 $Y_{X/S}$ 从 0.22 g/g 增加到最后的 0.73 g/g, 同时 $Y_{L/S}$ 从 0.075 g/g 增加到最后的 0.12 g/g。这样的结果表明, Cu^{2+} 通过抑制葡萄糖代谢途径来抑制酵母的生长, 但是却提高了底物的转化效率; 原因有可能是 Cu^{2+} 的抑制作用下, 一些复杂的代谢路径被明显抑制, 从而提高了尚能够进行的, 并且相对简单代谢路径的转化效率。

3.1.4 锌离子对油脂发酵的影响

同为二价金属离子的 Zn^{2+} 是很多胞内化合物的组成部分, 并且是很多酶的辅因子, 所以在合成培养基中添加不同浓度的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 来考察 Zn^{2+} 对 *T. cutaneum* 进行油脂发酵的影响。实验结果如图 3.4 所示, 图中数据同样是 96 h 的发酵结果。

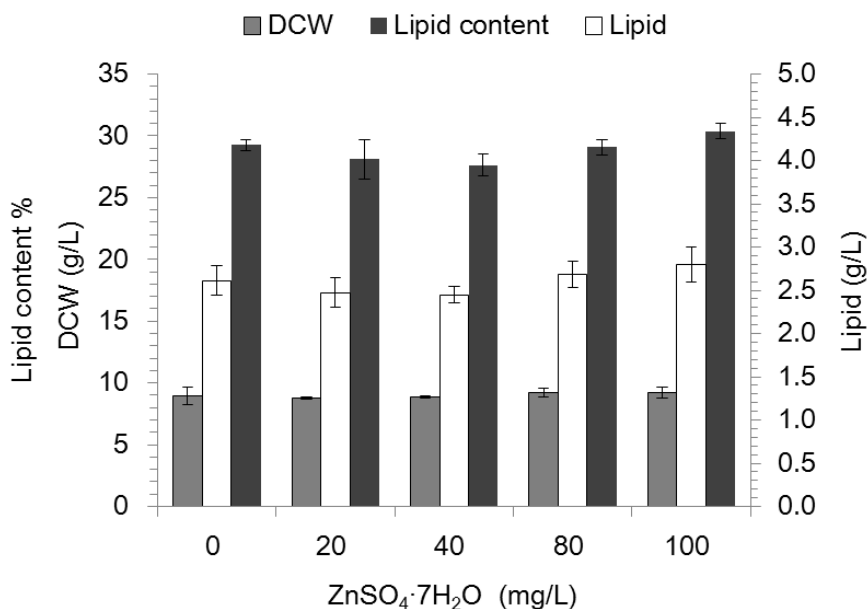


图 3.4 Zn^{2+} 对油脂发酵的影响

Figure 3.4 Effect of Zn^{2+} on lipid fermentation.

从图中可看出, 随着培养基中 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度从 0 mg/L 增加到 100 mg/L 时, DCW 一直 9 g/L 左右, 没有明显变化; 酵母含油率的变化也很微小, 在 27.6% 和 30.4% 之间; 因此, 油脂产量变化不大, 在 2.4 g/L 和 2.8 g/L 之间。为了更好地说明 Zn^{2+} 对酵母产油的影响, 高浓度的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加到培养基中, 但酵母的生长受到了 Zn^{2+} 的抑制; 当培养基中 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度大于 500 mg/L 时, 酵母就不能够生长。实验结果表明, 少量的 Zn^{2+} 对 *T. cutaneum* 的生长和油脂积累没有明显影响; 但是 Zn^{2+} 浓度过高时, 它对酵母的毒性明显增加, 从而使酵母的生长完全停止。该结果和 Zn^{2+} 对 *T. fermentans* 的影响稍有不同; 当 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度小于 10 mg/L 时, *T. fermentans* 的含油率就会 45%

左右下降到 30% 以下^[73]。

当在培养基中添加的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度在 100 mg/L 以下时, 葡萄糖的消耗量没有明显变化, $Y_{X/S}$ 和 $Y_{L/S}$ 都没有明显变化, 分别为 0.23 g/g 和 0.069 g/g。经过该实验发现, Zn^{2+} 不能促进 *T. cutaneum* 的油脂发酵过程。

3.1.5 钙离子对油脂发酵的影响

Ca^{2+} 作为常见的二价金属离子, 它可以改变细胞透性, 从而控制膜上物质转运; 它还可以促使细胞线粒体内 ATP 的合成, 为微生物的生长提供更多的能量, 从而促进微生物生长。合成培养基中分别添加 0、0.1、0.5、1.0、2.0 和 4.0 g/L 的 CaCl_2 , 考察 Ca^{2+} 对 *T. cutaneum* 油脂发酵过程的影响, 实验结果如图 3.5 所示。

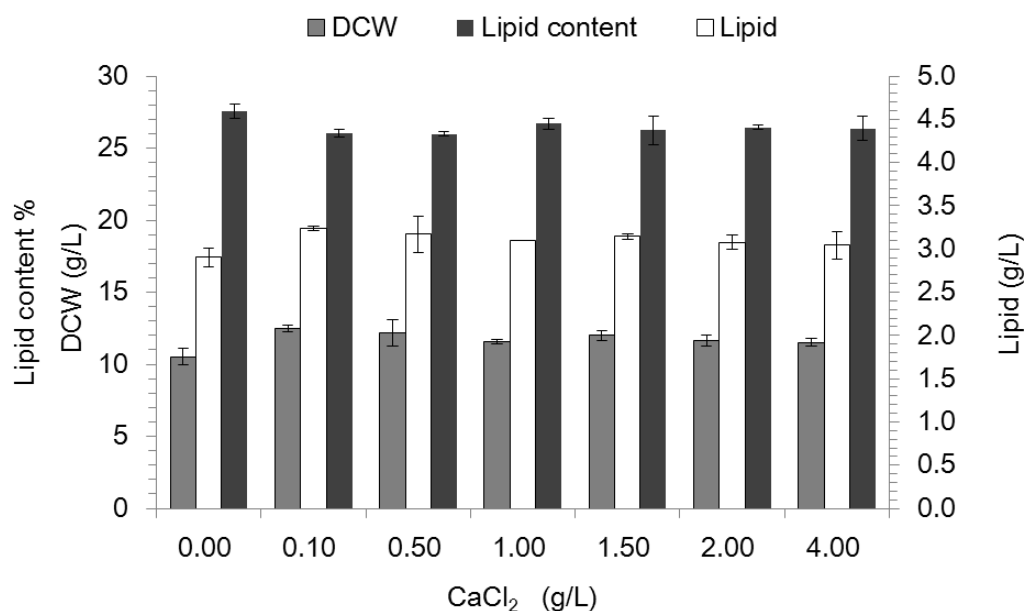


图 3.5 Ca^{2+} 对油脂发酵的影响

Figure 3.5 Effect of Ca^{2+} on lipid fermentation.

从上图可知, 当合成培养基中添加 CaCl_2 时, DCW 较不添加时高出 15-20%, 即从 10.5 g/L 提高到 11.5-12.5 g/L; 酵母的含有率保持在 26-27% 之间, 没有明显变化; 油脂产量在 2.9-3.1 g/L 左右; 但是不添加 CaCl_2 时, 油脂产量为最低, 只有 2.9 g/L。所以, 当 CaCl_2 浓度小于 4.0 g/L 时, Ca^{2+} 对 *T. cutaneum* 在合成培养基中的生长和其胞内油脂的积累的影响很小。

培养基中添加 4.0 g/L 的 CaCl_2 时, 尽管 *T. cutaneum* 的 DCW 和油脂产量分别提高了 1 和 0.1 g/L, 但酵母消耗的葡萄糖反而比对照组 (不添加 CaCl_2) 少, 从 33.6 g/L 下降到 30.6 g/L; 因此, $Y_{X/S}$ 从 0.31 g/g 提高到 0.37 g/g, 同时 $Y_{L/S}$ 从 0.087 g/g 变成 0.099 g/g。实验结果说明 Ca^{2+} 虽然对油脂产量的影响不大, 但可以提高 *T. cutaneum* 对底物的转化

率。

3.1.6 亚铁离子对油脂发酵的影响

铁元素是可以组成硫铁蛋白，参与细胞呼吸作用的电子传递，并且是一些酶不可或缺的辅因子^[74]，因此它是微生物必不可少的元素。合成培养基中添加 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，浓度分别为 0、20、50、100、150、200 和 500 mg/L，以考察 Fe^{2+} 对 *T. cutaneum* 油脂发酵的影响。图 3.6 是发酵 96 h 的结果。

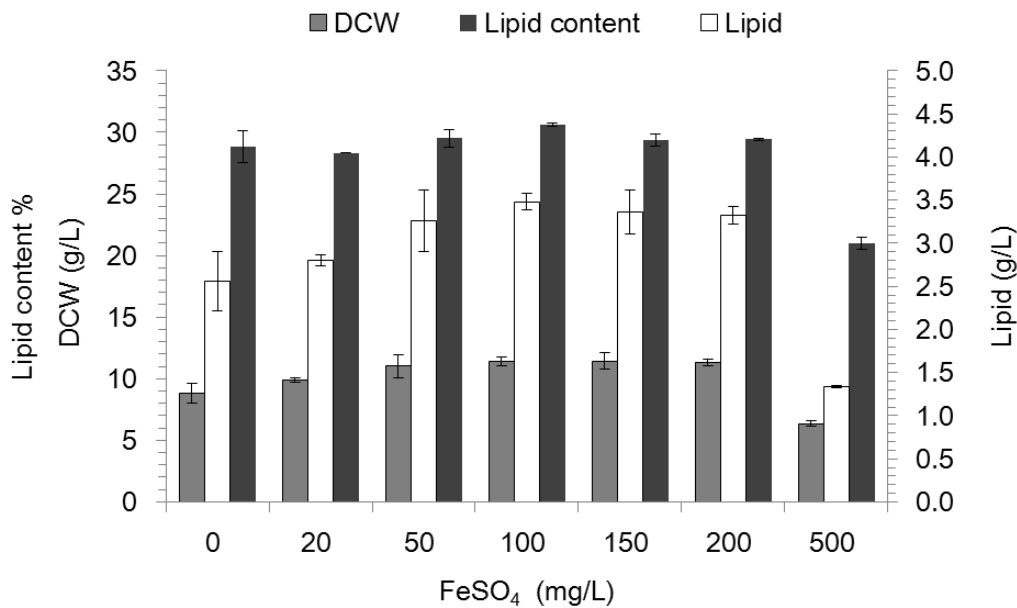


图 3.6 Fe^{2+} 对油脂发酵的影响

Figure 3.6 Effect of Fe^{2+} on lipid fermentation.

从图中可看出，随着 Fe^{2+} 浓度的增加，DCW 先增加再降低；当 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 100-150 mg/L 之间时，DCW 从开始的 8.8 g/L 增加到 11.4 g/L，提高了接近 30%。当 Fe^{2+} 浓度较低时，酵母含油率几乎不发生变化，都在 29-30.1% 之间；而其浓度高时，酵母的含油率下降明显，只有 21%。油脂产量先随着 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度的增加而增加，然后再下降；当 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 100、150 或者 200 mg/L 时，油脂产量都在 3.3 g/L 以上，较对照试验提高 27% 左右。此试验结果表明，浓度适当的 Fe^{2+} 可以明显促进酵母的生长，并且不影响酵母的含油率，从而有效地促进油脂的生产；其浓度过高时，则既不利于酵母的生长也不利于油脂积累。

当 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度小于 200 mg/L 时，*T. cutaneum* 的糖耗速率较对照组试验有一定的提高；当其浓度为 500 mg/L 时，酵母的糖耗速率明显下降；表明 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 通过影响酵母对底物的利用速率来影响酵母的生长。随着 Fe^{2+} 浓度的增加， $Y_{X/S}$ 呈上升趋势；当 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 500 mg/L 时， $Y_{X/S}$ 较对照组增大了 55%。 $Y_{L/S}$ 则是随着 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

的增加先增大后减小；从对照组的 0.068 g/g 增加到 0.084 g/g，然后有下降到 0.77 g/g。所以，适当浓度的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 不仅可通过提高酵母的糖代谢来提高酵母，还可以提高葡萄糖转化为菌体和油脂的转化率。

3.2 三价铁离子对油脂发酵的影响

3.2.1 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 对发酵影响的比较

从 3.1 的实验结果可知， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加到合成培养基中会促进酵母的生长和油脂积累；但是，实验过程中发现 FeSO_4 溶液很容易被氧化为 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ，从而使溶液颜色变橙黄色。为了探索 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 促进酵母生长的原因， $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 被添加到合成培养基中，考察 Fe^{3+} 对酵母产油的影响，并和 Fe^{2+} 进行对比。培养基中 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度都分别为 0.10、0.15、和 0.20 g/L，其发酵结果见表 3.1。

表 3.1 Effect of Fe^{3+} or Fe^{2+} on lipid fermentation

Table 3.1 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 分别对酵母产油的影响

Parameter	Control	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)			$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g/L)		
	-	0.10	0.15	0.20	0.10	0.15	0.20
DCW (g/L)	8.8±0.8	10.2±0.1	10.4±0.2	10.4±0.0	11.9±0.2	12.2±0.6	11.4±0.3
Lipid (g/L)	2.5±0.3	2.9±0.0	3.0±0.0	2.9±0.2	3.9±0.1	4.0±0.2	3.7±0.1
Lipid content (%, w/w)	28.9±1.3	28.5±0.5	28.9±0.1	28.1±1.5	32.5±0.5	33.2±0.0	32.7±0.2
$Y_{X/S}$ (% w/w)	23.6±1.2	28.1±2.3	29.3±0.5	31.3±3.3	32.3±0.9	31.8±1.5	33.8±2.4
$Y_{L/S}$ (% w/w)	6.8±0.6	7.4±0.7	7.8±0.1	8.1±0.3	9.5±0.1	9.5±0.4	9.9±0.6

从表中可以明显看出， Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 都可以促进 *T. cutaneum* 的生长；并且只添加 Fe^{3+} 时，酵母的生长情况更好。当 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的浓度为 0.15 g/L 时，DCW 达到了最高（12.2 g/L），是对照组的 1.38 倍。只添加 Fe^{2+} 时，酵母的含油率没有明显变化，说明 Fe^{2+} 不能够促进酵母胞内的油脂积累；但只添加 Fe^{3+} ，酵母的含油率较对照组有 10% 的提高，说明 Fe^{3+} 可以促进酵母油脂的积累。培养基中只添加 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，其浓度为 0.15 g/L 时，油脂产量最高（4.0 g/L），较对照组有 60% 的提高；而只添加 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，其浓度同样为 0.15 g/L 时，油脂产量相对较高（3.0 g/L）。

Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 一样，它可能通过提高酵母的糖耗速率促进酵母的生长和油脂积累。当 Fe 浓度相同时， Fe^{3+} 对酵母的油脂发酵的促进作用更加明显；表明 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对酵母油脂发酵的促进作用有可能是由于发酵过程中 Fe^{2+} 氧化后产生的 Fe^{3+} 导致。 Fe^{2+} 在耗氧发酵的过程中被缓慢氧化为 Fe^{3+} 是很难避免的，所以 Fe^{2+} 能否单独促进 *T. cutaneum* 的生长还需要进一步的实验来验证。

从表 3.1 还可以看出, 培养基中添加 Fe^{3+} 时, $Y_{X/S}$ 和 $Y_{L/S}$ 都有很大的提高 (35% 以上), 表明 Fe^{3+} 非常有利于葡萄糖转化为酵母干重和油脂的转化率。 Fe^{3+} 有可能通过有效地促进酵母的氧化磷酸化反应, 使酵母利用较少的底物释放更多的能量, 从而促进酵母的生长。同时, Fe^{3+} 可以十分有效的提高酵母油脂代谢路径通量, 从而使底物更多地流向油脂的积累; 或者它可以抑制其他代谢路径的活性, 从而降低酵母油脂发酵过程中的副产物生成, 最终使 $Y_{L/S}$ 得到较大的提高。

3.2.2 3 L 发酵罐实验

实验过程中发现, *T. cutaneum* 在摇瓶中进行油脂过程中培养基的 pH 会下降; 当培养基中添加 Fe^{3+} 时, 它的 pH 下降的幅度与对照组不一样。这表明当培养基中含有 Fe 离子时, 酵母在摇瓶中进行发酵所处的 pH 条件和对照组不同。为了在同样 pH 条件下考察 Fe^{3+} 离子的影响, 我们利用可以准确控制 pH 发酵罐进行油脂发酵, 验证 Fe^{3+} 对 *T. cutaneum* 生长和产油的影响。当合成培养基中 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 0.15 g/L 时, *T. cutaneum* 在 3 L 发酵罐内的实验结果如图 3.7 所示。

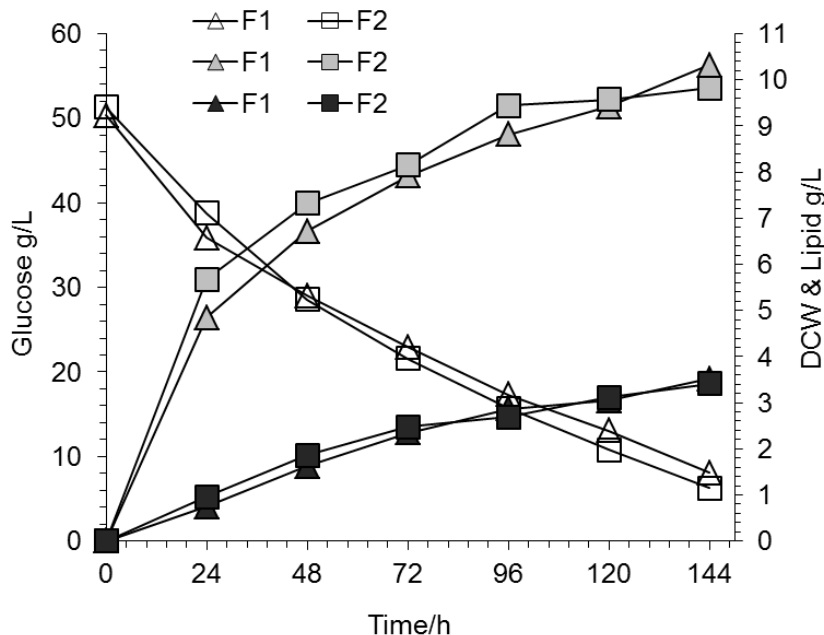


图 3.7 3 L 发酵罐内 Fe^{3+} 对油脂发酵的影响

Figure 3.7 Effect of Fe^{3+} on lipid fermentation in 3 L bioreactor.

注: F1 为对照试验, F2 为添加 0.15 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的实验组, 图中白色图标表示葡萄糖浓度变化, 灰色图标为菌体干重 (DCW), 黑色图标为油脂产量。30°C, DO 10%, pH 5.0。

从上图可明显看出, 实验组和对照在发酵罐内的葡萄糖消耗、生长和油脂积累情况基本一致。发酵进行到 144 h, DCW 达到 10 g/L 左右, 油脂产量为 3.5 g/L 左右, 酵母的含有率在 30% 左右。该结果和摇瓶中的结果有明显的差异; 摇瓶中发酵 96 h 时, *T.*

cutaneum 就可以消耗 40 g/L 的葡萄糖，而发酵罐中酵母发酵 96 h 才消耗 33 g/L 的葡萄糖。从实验结果得出，酵母在发酵罐内的糖耗速率较摇瓶内的慢。黄萧等人的研究表明 *T. cutaneum* 在较高的 pH 时的生长和糖耗速率都会加快^[66]，而发酵罐内的 pH 比摇瓶内的高，所以生长变差的原因肯定不是 pH 控制在 5 引起的。溶氧对微生物的生长有很大影响，而发酵罐内保持在 10% 左右的培养基溶氧有可能是限制酵母生长的原因。

我们通过调节转速将溶氧保持在 25% 以上，排除发酵罐内酵母生长的限制；然后考察 Fe^{3+} 对酵母在发酵罐内发酵的影响，结果如图 3.8 所示。从图 3.8 可知，当溶氧控制在 25% 以上时，实验组和对照组的生长情况明显变好，DCW 在发酵 96 h 就分别达到了 11.5 和 9.5 g/L。酵母最终的含油率都在 30% 左右，油脂产量分别达到了 4.0 和 3.0 g/L。实验组比对照组的 DCW 和油脂产量都提高 30% 左右，说明 Fe^{3+} 可以在 C/N 相同的情况促进酵母的生长，从而提高油脂的产量。

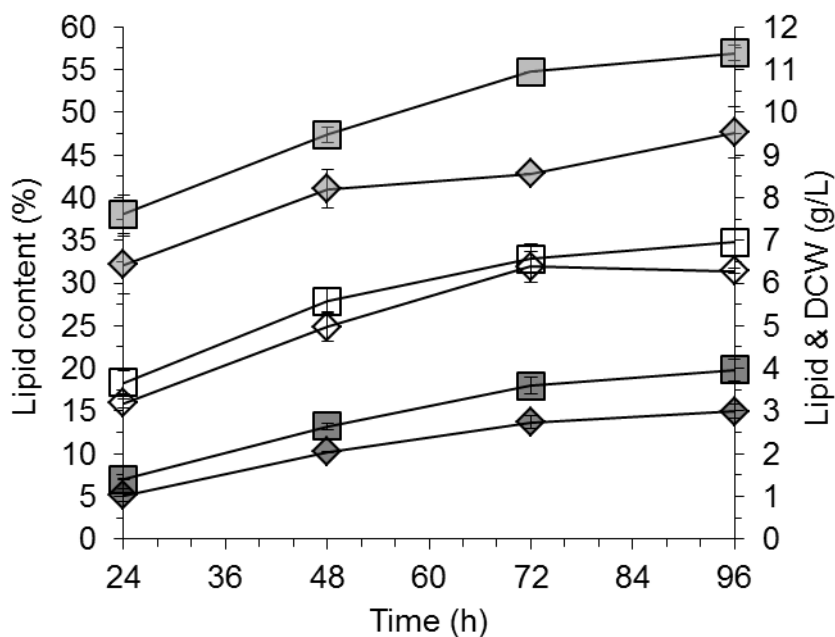


图 3.8 发酵罐中 Fe^{3+} 对酵母发酵的影响

Figure 3.8 Effect of Fe^{3+} on lipid fermentation in bioreactor.

注：□为对照试验，◇为添加 0.15 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的实验组，图中白色图标表示葡萄糖浓度变化，灰色图标为菌体干重 (DCW)，黑色图标为油脂产量。30°C， $\text{DO} \geq 10\%$ ，pH 5.0。

第4章 玉米芯残渣生产微生物油脂

4.1 玉米芯残渣

玉米芯是一种产量较大的木质纤维素农业副产物，半纤维素（木聚糖）含量较高，近年来在工业上得到了较多的应用，一般用来提取木糖并合成木糖醇、糠醛等。玉米芯残渣是木糖或糠醛工业生产过程中产生的固体废弃物，纤维素含量占其干重的一半以上，但盐分含量高、呈酸性，大量堆积会对环境产生污染，必须进行进一步的处理。玉米芯残渣的主要成分是提取半纤维素后的纤维素残渣，可以直接被纤维素酶水解，进而利用酿酒酵母（*S. cerevisiae*）发酵乙醇^[75]，而拜氏梭菌（*C. beijerinckii*）发酵丁醇^[76]。

4.2 油脂酵母的抑制物耐受性测试与筛选

木质纤维素原料的预处理过程会产生很多种物质，它们会抑制微生物的生长；因此，木质纤维素原料应用于微生物发酵时，需要通过各种方式去除各种抑制物。常见的抑制物有呋喃类的糠醛、羟甲基糠醛，有机酸类的甲酸、乙酸和乙酰丙酸，还有一些酚类物质^[77]。酚类抑制物是预处理过程中由木质素分解产生，它们因为溶解度低而附着在不溶固体表面，所以玉米芯残渣中可能存在一定浓度的酚类抑制物。玉米芯残渣经纤维素酶水解液得到的水解液中主要为葡萄糖和木糖，还有 1 g/L 左右的乙酸，没有检测到呋喃类抑制物，酚类物质因无合适方法而没有进行检测。

原料脱毒过程耗时耗水，增加过程成本，还会降低水解液中的可利用糖浓度。所以，我们首先利用几种产油酵母在不脱毒的玉米芯残渣水解液中尝试进行产油发酵，它们分别为皮状丝孢酵母（*T. cutaneum* 20271）、圆红冬孢酵母（*R. toruloides* 2.1609）、斯达氏油脂酵母（*L. starkeyi* 70295）各一株，还有两株不同的粘红酵母（*R. glutinis* 2.703, 2.704）。实验发现只有 *T. cutaneum* 20271 能够在水解液中生长，其他酵母在水解液中都慢慢凋亡；说明皮状丝孢酵母能够正常生长，表明它有很好的抗逆性，能够用于木质纤维素等复杂体系的发酵生产过程；也说明水解液中存在没有被检测到抑制物，它们可以抑制另外几种酵母的生长。*T. cutaneum* 20271 的油脂发酵结果见图 4.1。

图 4.1 表明 *T. cutaneum* (ACCC 20271) 虽然能够在水解液中发酵，但发酵 120 h 后只消耗了 23 g/L 左右的葡萄糖，发酵速率较为缓慢，原因可能是水解液中存在其他的抑制物抑制酵母的发酵，或者水解液中营养匮乏使酵母生长缓慢。当添加 0.5 g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时，*T. cutaneum* 20271 在水解液和合成培养基中的生长情况基本一致，水解液中没有发现酵母有较长的迟滞期，表明水解液中存在的抑制物不会明显抑制 *T. cutaneum* 的生长。通过种子驯化来进一步提高酵母对水解液的耐受性和发酵速率是一种木质纤维素生物炼制中常用的方法^[78]，然而图 1 表明 *T. cutaneum* 经 50% 水解液驯化 24 h 后在水解液中

的生长情况并没有明显提高，表明种子驯化不能够提高酵母在水解液中的发酵速率。

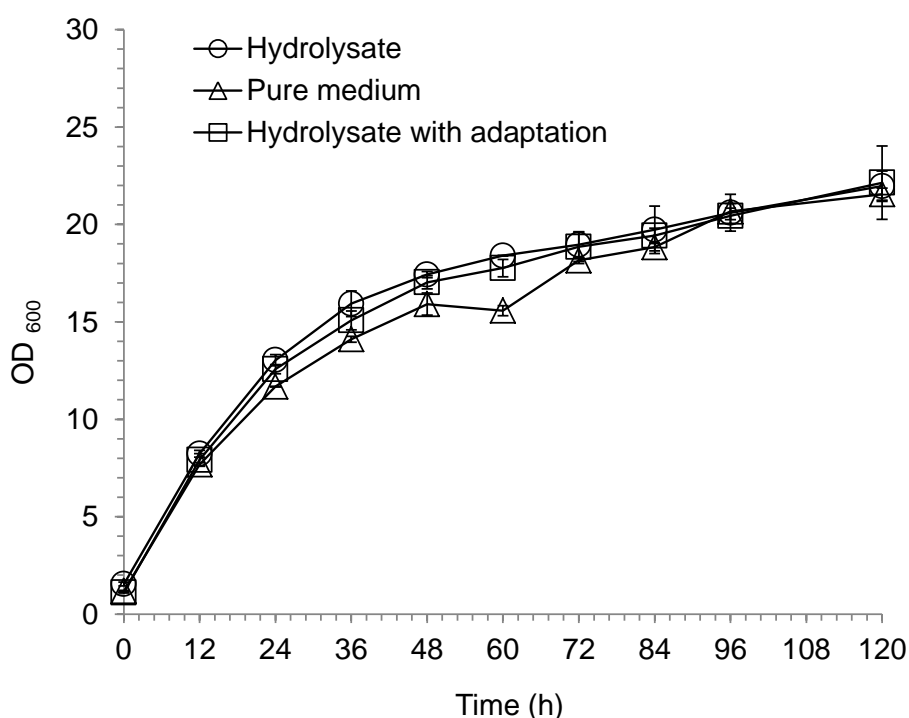


图 4.1 皮状丝孢酵母分别利用水解液和合成培养基的油脂发酵

Figure 4.1 Lipid fermentation by *Trichosporon cutaneum* using hydrolysate or artificial hydrolysate.

表 1 所示发酵 120 h 的油脂发酵参数表明，三种情况下的酵母菌体量（DCW）都在 12 g/L 左右，但是合成培养基发酵的酵母细胞含油率（33%）明显比水解液中的高（26%），油脂产量从 3 g/L 增加到 4 g/L。经测定水解液中含有 0.15 g/L 左右的总氮，所以水解液中酵母含油率下降可能发酵的初始 C/N 下降所致。低 C/N 下，由于不存在氮限制或氮饥饿的状态，酵母会更多的利用底物进行生长，但不会积累较多的油脂，从而使含油率下降；水解液中发酵时的菌体得率（ $Y_{X/S}$ ）比合成培养基中的高，但油脂得率（ $Y_{L/S}$ ）则偏低（表 4.1）。

表 4.1 皮状丝孢酵母利用水解液或合成培养基的油脂发酵

Table 4.1 Lipid fermentation using hydrolysate or pure medium by *Trichosporon cutaneum*

Medium	DCW (g/L)	Lipid titer (g/L)	Lipid content (%)	$Y_{L/S}$ (%)	$Y_{X/S}$ (%)
Hydrolysate	11.7±0.6	3.0±0.1	25.5±0.8	14.4±0.3	42.0±0.8
Pure medium	12.4±0.2	4.1±0.1	33.5±1.4	16.1±0.5	32.0±1.0
Hydrolysate after adaptation	11.1±0.4	3.0±0.1	26.9±0.1	14.1±0.0	38.2±0.2

上述实验表明, 皮状丝孢酵母能够在玉米芯残渣水解液中发酵生产微生物油脂, 但是速率偏慢。水解液中的抑制物虽然能够抑制其它四种酵母的生长, 但不会明显抑制 *T. cutaneum* 的生长。种子驯化不能促进 *T. cutaneum* 在水解液中的发酵, 合成培养基中酵母的生长和水解液中相当, 进一步表明水解液中的抑制物不会抑制 *T. cutaneum* 的生长。我们猜测水解液中的营养不足导致酵母在水解液中生长缓慢, 因此下面从添加不同的营养物质来寻找 *T. cutaneum* 利用玉米芯残渣水解液进行油脂发酵的合适营养物质。

4.3 (NH₄)₂SO₄ 对酵母产油的影响

作为常见且微生物可以快速利用的氮源, (NH₄)₂SO₄ 首先被用来考察对酵母在水解液中进行油脂发酵的影响; 因此我们将水解液中(NH₄)₂SO₄ 浓度从 0 g/L 增加到 5.0 g/L, 以确定油脂发酵过程中的(NH₄)₂SO₄ 浓度, 结果见图 4.2。

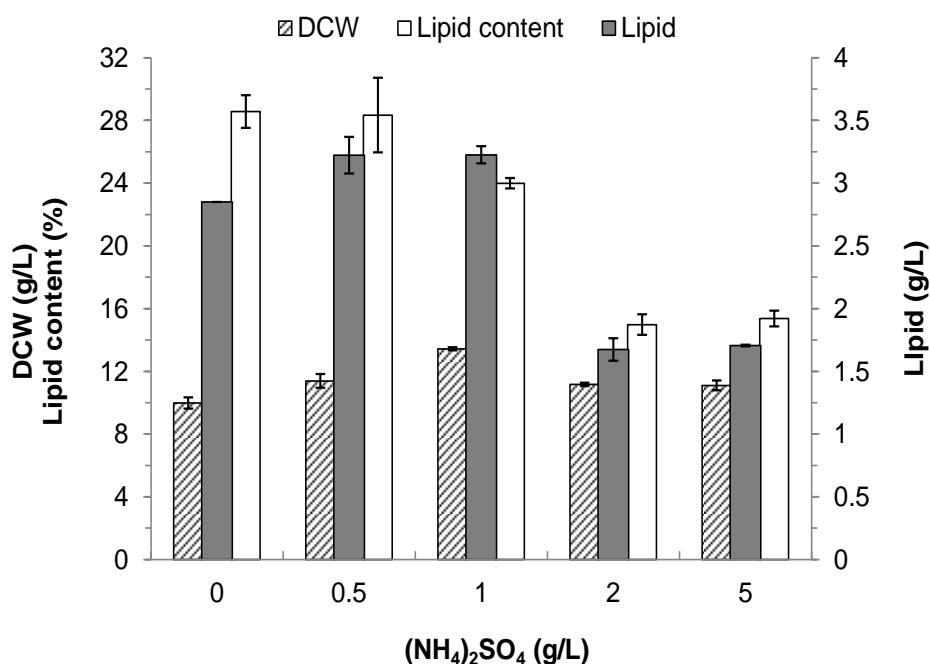


图 4.2 (NH₄)₂SO₄ 对油脂发酵的影响

Figure 4.2 Effect of (NH₄)₂SO₄ on the lipid fermentation.

^a Glucose was consumed during fermentation. Figure 2 Effect of (NH₄)₂SO₄ on the lipid fermentation. ^a Glucose was consumed during fermentation. Hydrolysis condition of corncob residue: Solid loading 15%; Youtell #6 7FPU/g DM; 50 °C; pH 4.8; 48 h. All cultures were performed at 30 °C and 180 rpm for 120 h.

图 4.2 表明, DCW 随(NH₄)₂SO₄ 浓度的增加先增后降, 而酵母含油率逐渐下降。当(NH₄)₂SO₄ 浓度为 1.0 g/L 时, 菌体量和微生物油脂产量最高, 分别为 13.4 g/L 和 3.23 g/L, 但酵母含油率只有 24%。当(NH₄)₂SO₄ 浓度为 2.0 g/L 或 5.0 g/L 时, DCW 下降到 11 g/L 左右, 含油率下降到 15% 左右。实验表明高浓度(NH₄)₂SO₄ 不利于酵母在玉米芯残渣水

解液中的油脂发酵。随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加，酵母在 120 h 时消耗的底物越多，然而 $Y_{L/S}$ 逐渐下降，从 17.4% 下降到 4.5%（表 4.2）。*T. cutaneum* 消耗了葡萄糖，但并没有转化为菌体量和油脂。

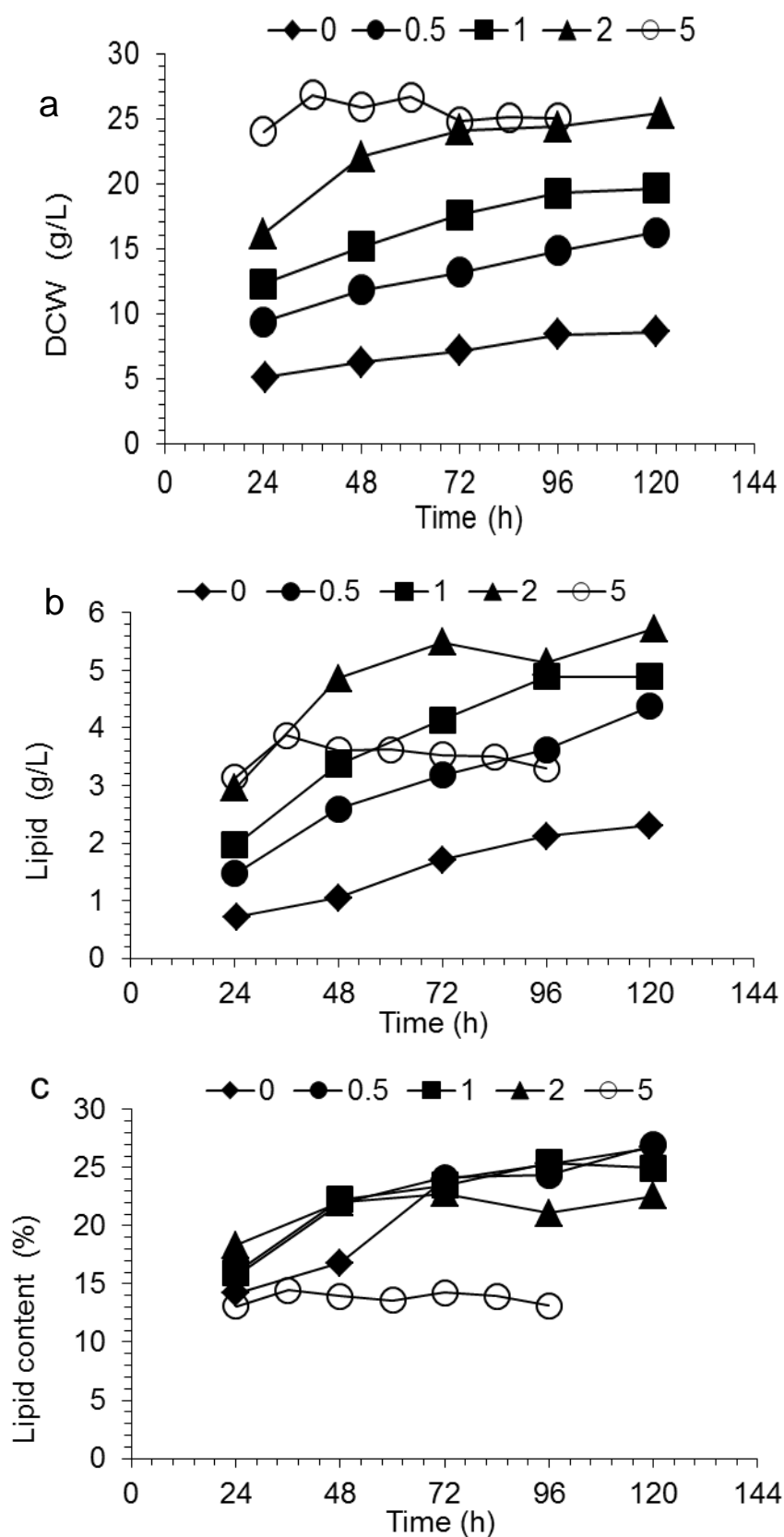
表 4.2 摇瓶中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对油脂发酵的影响

Table 4.2 Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on lipid fermentation in flask.

	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)				
	0	0.5	1.0	2.0	5.0
Substrate consume a (g/L)	16.4±0.7	26.4±0.6	35.7±0.1	36.6±0.5	34.7±0.1
DCW (g/L)	10.0±0.4	11.4±0.4	13.4±0.1	11.2±0.11	11.1±0.3
Lipid titer (g/L)	2.8±0.0	3.2±0.2	3.2±0.1	1.7±0.1	1.7±0.0
Lipid content (%)	28.6±1.0	28.3±2.4	24.0±0.3	15.0±0.7	15.4±0.5
YL/S (%)	17.4±1.0	12.2±1.0	9.0±0.0	4.5±0.0	4.9±0.0

另外观察到，高浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 实验结束时 pH 值出现明显下降。有研究曾发现皮状丝孢酵母利用玉米秸秆水解液进行油脂发酵时，酵母的 DCW 会随着 pH 值降低而降低^[66]。另有皮状丝孢酵母利用木薯淀粉生产微生物油脂的研究发现，pH<6.0 时菌体干重和油脂产量随着初始 pH 的降低而降低^[79]。所以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度高时，酵母生长变差的原因有可能是发酵液的 pH 较低。pH 值对细胞膜的渗透性有很大影响，它可影响微生物对培养基中离子的吸收和利用，最终影响酵母对底物的利用和产物的生成。发酵过程中积累酸性代谢产物会使发酵液的 pH 下降，如乙酸、甲酸、乳酸或者柠檬酸等；但实验中并没有检测到有机酸的积累。Buurman 等人研究发现，大肠杆菌的在高浓度 NH_4^+ 环境下，需要一种额外的运转系统负责的吸收 NH_4^+ 和质子的泵出^[80]，从而使培养环境 pH 下降。皮状丝孢酵母胞内可能存在同样机制，吸收培养基中 NH_4^+ 的同时排出 H^+ ，使培养基的 pH 降低，同时也降低细胞对能量的利用效率，最终导致细胞的生长变慢并降低油脂的产量。

控制 pH 为 5 时， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在发酵罐内对 *T. cutaneum* 油脂发酵的影响如图 4.3 所示。随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加，酵母的生长速率和 DCW 逐渐提高； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 5 g/L 时，DCW 超过了 25 g/L。油脂产量随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的提高先增加后降低；当其浓度为 2 g/L 时，油脂产量在 96 h 可超过 5 g/L；油脂产率随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加而增加。当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 5 g/L，酵母可在 36 h 内耗完底物；其后，胞内油脂因被降解而降低。酵母的含油率随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的提高而降低；但其浓度小于 2 g/L 时，酵母含油率的变化不大。实验结果表明，pH 一定时，高浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 可以促进酵母的生长，但是不利于油脂的积累。该结果与很多研究报道相同，即低 C/N 利于生长而不利于油脂积累。

图 4.3 3-L 发酵罐内 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对油脂发酵的影响Figure 4.3 Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on lipid fermentation in 3-L bioreactor.(a)Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on DCW, (b) Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on Lipd, (c) Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on Lipid

content.

4.4 有机营养物的选择

从 3.2 的结果可知, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 不适合作为油脂发酵的营养物质, 因为过高添加会明显降低发酵液 pH 值不利于酵母在水解液中的生长, 同时显著降低酵母的含油率。为寻找合适的营养物质, 我们在水解液中分别添加三种含有缓释氮源的有机营养物, 分别为蛋白胨、酵母提取物 (YE) 和玉米浆 (CSL), 结果见表 1。

表 4.3 摇瓶中营养物质对油脂发酵的影响

Table 4.3 Effect of nutrition added on lipid fermentation ^a.

Nutrition (g/L)	DCW (g/L)	Lipid titer (g/L)	Lipid content (%)	$Y_{L/S}$ (%)	$Y_{X/S}$ (%)	
YE	0.5	9.4±0.4	2.9±0.1	30.4±0.7	14.2±0.4	46.7±0.3
	1.0	10.8±0.5	3.3±0.1	29.9±0.6	13.6±0.1	45.5±1.3
	2.0	12.9±0.9	3.8±0.3	29.4±0.1	11.5±2.5	39.1±0.1
	3.0	15.6±0.7	4.6±0.2	29.1±0.1	10.7±0.5	36.7±1.5
	5.0	17.8±0.3	4.3±0.1	24.2±0.3	8.6±0.5	35.5±1.5
Peptone	1.0	9.7±0.2	2.7±0.1	28.1±1.7	14.6±0.0	51.9±0.6
	2.0	10.4±0.2	2.9±0.1	28.1±0.8	13.6±0.1	48.3±1.9
	3.0	11.5±0.4	3.2±0.0	26.9±0.0	13.2±0.0	49.0±0.0
	4.0	11.9±0.0	3.3±0.0	27.4±0.2	12.6±0.0	45.9±0.0
	5.0	12.7±0.2	3.3±0.1	25.6±0.1	11.6±0.0	45.3±1.1
CSL	0.5	9.7±0.1	2.9±0.0	29.5±0.3	14.5±0.2	49.1±1.4
	1.0	11.1±0.4	3.3±0.1	30.1±0.1	15.6±0.4	51.8±0.3
	1.5	11.5±0.1	3.4±0.0	30.0±0.5	13.9±0.5	46.3±0.1
	2.0	12.8±0.4	3.5±0.2	27.8±2.4	13.9±2.7	50.0±3.7
	5.0	17.9±0.4	5.2±0.1	29.3±0.4	11.8±0.0	40.2±0.1

^a Fermentation conditions: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; KH_2PO_4 1.0 g/L; Concentration of YE, Peptone or CSL was same as in the table; 30 °C; 180 rpm; 120 h. ^b Carbon source came from glucose and xylose in hydrolysate, nitrogen source came from hydrolysate and nutrition. Hydrolysis condition of corncob residue: Solid loading 15%; Youtell #6 7FPU/g DM; 50 °C; pH 4.8; 48 h.

表 4.3 表明, 随着各营养物质浓度的增加, DCW 逐渐增大, 而 $Y_{L/S}$ 和 $Y_{X/S}$ 却逐渐下降。YE 和 CSL 作为营养时, 酵母都能在水解液中很好生长, DCW 最高分别能够达到 17.8 和 17.9 g/L; 蛋白胨作为营养时, 酵母的生长情况偏差, DCW 最高也只有 12.7 g/L。CSL 作为营养物质时, 油脂产量随着 CSL 的浓度增加而增加; 当其浓度为 5.0 g/L 时,

油脂产量达到了 5.24 g/L，并且酵母含油率没有明显下降。另外两种营养物质加入水解液中时，由于酵母含油率随着营养物浓度的增加而降低，油脂产量先升高后降；YE 浓度为 3.0 g/L 时，油脂产量最高 (4.56 g/L)；但当蛋白胨作为营养物质时，油脂产量最差，都在 3.0g/L 左右。初始 C/N 对酵母在水解液中发酵的影响较大，DCW 会随着 C/N 的降低而提高，而酵母含油率随着 C/N 的降低而降低。通过实验，三种不同的有机营养物中最能促进油脂发酵的为 CSL，然后是 YE，最差的是蛋白胨。

油脂的脂肪酸组成决定了其生产的生物柴油的特性^[81]，所以微生物油脂的生产不仅要考虑油脂产量还要考虑脂肪酸组分。营养物会影响酵母在水解液中的油脂产量，也有可能影响脂肪酸组分，因此我们通过 GC-MS 测定玉米芯残渣水解液中添加不同营养物时微生物油脂脂肪酸组分情况，进一步确定合适的营养物，结果如图 4.4 所示。

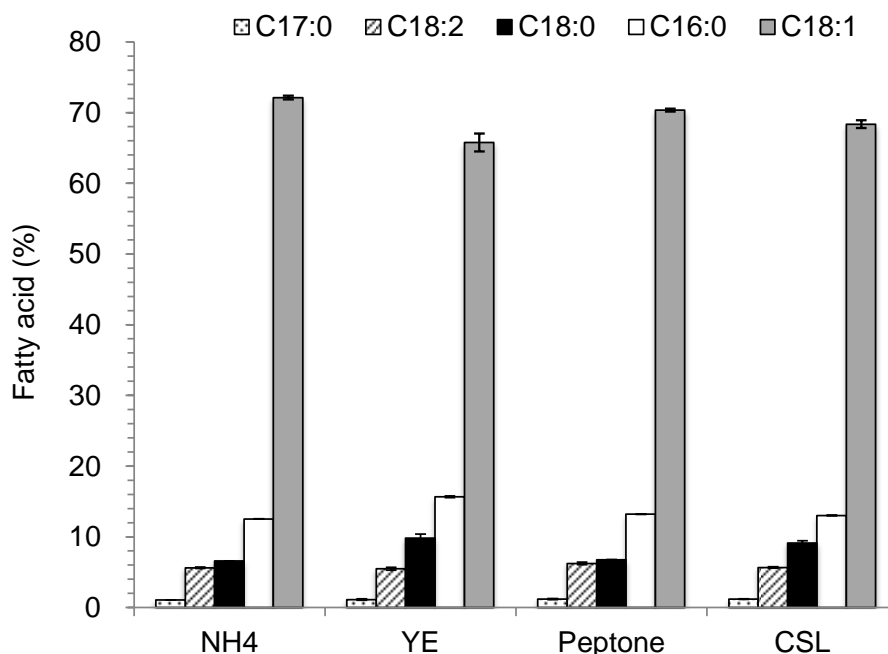


Figure 4.4 Fatty acid composition of lipid adding different nutrition in fermentation.

图 4.4 添加不同营养物时油脂脂肪酸组成情况

Lipid used here got from Part 4.3 and Part 4.4; 0.5 g/L; YE 3.0 g/L; Peptone 4.0 g/L; CSL 5.0 g/L.

从图 4.4 可知，油脂发酵时添加不同营养物对酵母胞内脂肪酸组分的影响不大；其中油酸 (C_{18:1}) 的含量最大，占总量的 70% 左右；随后依次是含量为 13% 左右的软脂酸 (C_{16:0})，含量为 7% 左右的硬脂酸 (C_{18:0})，含量为 6% 左右的亚油酸 (C_{18:2})，最后是含量为 1% 左右的珍珠酸 (C_{17:0})。有关于 NaNO₃ 和 (NH₄)₂SO₄ 对微生物油脂发酵影响的研究^[37]，其结果也表明：当微生物所利用的碳源不发生改变时，氮源几乎不会影响微生物油脂的脂肪酸组分。有研究表明，生产生物柴油的原料最好为 C18 和 C16 的单不饱和脂肪酸^[82]，这样生物柴油的粘度适中，低温性能较好，十六烷值较高等有点；所以 *T. cutaneum* 利用玉米芯残渣水解液生产的微生物油脂作生物柴油的原料应该非常适合。

玉米芯残渣水解液所产油脂的脂肪酸成分不只有图 4.4 中的五种脂肪酸，其中还有木蜡酸 ($C_{24:0}$)、花生酸 ($C_{20:0}$) 和十五烷酸 ($C_{15:0}$) 等，但它们的含量都不到总脂肪酸的 1%。由以上两个实验结果可知，当 CSL 作为营养物添加到玉米芯残渣水解液中时，*T. cutaneum* 可以更快地积累适用于生物柴油生产的微生物油脂。

4.5 不同单糖浓度的玉米芯残渣水解液的油脂发酵

T. cutaneum 利用玉米芯残渣水解液进行油脂发酵时， $Y_{L/S}$ 一直维持在 10-12 % 之间；所以提高水解液中糖浓度才能提高微生物油脂的产量。纤维素酶用量和水解时间都会影响水解液中糖浓度，它们的浓度随着纤维素酶用量的增加和水解时间的延长而增加（表 4.4）。从表中数据可知，当纤维素酶用量为 7 FPU/g DM，水解时间为 48 h，水解液中葡萄糖浓度有 62 g/L，葡萄糖得率为 60% 左右；当纤维素酶用量提高到 20 FPU/g DM 时，水解 72 h 后葡萄糖浓度 102 g/L 左右，葡萄糖得率高达 98% 左右。但是，纤维素酶用量为 3 FPU/g DM 时，水解时间延长到 72 h，葡萄糖得率也只有 40% 左右，说明过少的纤维素酶不能很好地水解玉米芯残渣。水解液中的总氮含量也随着纤维素酶用量增加而增加；但水解液含有的乙酸浓度几乎不变，保持在 1 g/L 左右。

表 4.4 不同玉米芯残渣水解液的组成

Table 4.4 The composition of hydrolysats from corncob residual.

Hydrolysates	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Acetic acid (g/L)	Total nitrogen (g/L)	Glucose yield (%)
3U	44.4±0.9	8.9±0.1	1.08±0.03	0.098±0.000	44.4±0.8
7U	59.6±0.2	10.9±0.2	1.15±0.03	0.147±0.015	59.6±0.2
10U	89.8±0.3	13.3±0.1	1.16±0.09	0.187±0.003	89.8±0.3
15U	98.9±0.7	16.6±1.2	0.95±0.01	0.269±0.003	94.6±0.7
20U	102.6±0.5	14.9±0.5	1.28±0.23	0.303±0.024	98.2±0.5

Hydrolysis conditions: 50 °C, pH 4.8, Youtell #6 at 3, 7, 10, 15, 20 FPU/g DM (3U, 7U, 10U, 15U, 20U); hydrolysis time of 7U was 48 h, others' were 72 h.

从实验结果 3.3 可知，CSL 是酵母在玉米芯残渣水解液中进行油脂发酵的良好营养物；但单独添加 5.0 g/L 的 CSL 时，发酵 120 h 后水解液中还存在残糖。铵盐是微生物能够快速利用的氮源，它可使微生物快速生长，故添加一定浓度的 $(NH_4)_2SO_4$ 来进一步提高酵母的发酵速率；高浓度 $(NH_4)_2SO_4$ 不利于酵母在摇瓶中的生长和产油，所以将 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度确定在 0.5 g/L。从 3.3 还可知，随着 CSL 浓度增加，油脂产量逐渐增加，所以我通过改变 CSL 的浓度，从 4.0 g/L 增加到 10.0 g/L，来寻找油脂发酵的最适初始 C/N，发酵结果如图 4.5 所示。

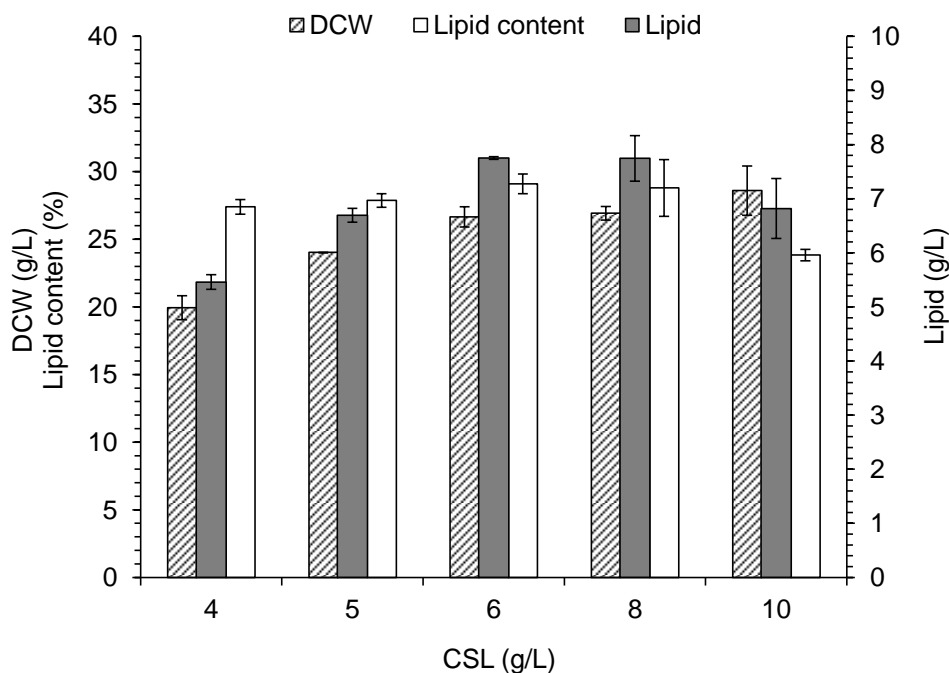


Figure 4.5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 CSL 同时添加时油脂发酵情况

Figure 4.5 Lipid fermentation using hydrolysate added $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and CSL.

Hydrolysis condition of corncob residue: Solid loading 15%; Youtell #6 7FPU/g DM; 50 °C; pH 4.8; 48 h. All cultures were performed at 30 °C and 180 rpm for 120 h.

当发酵进行 120 h 时, DCW 随着 CSL 浓度的增加逐渐增加, 从 20 g/L 左右增长到 28 g/L 左右; 其浓度在 8.0 g/L 以下时, 酵母含油率几乎不变, 维持在 28% 左右。当添加 5.0 g/L CSL 时, 酵母的 DCW 有 33% 的提高, 油脂产量有 28% 的提高。当 CSL 浓度为 6.0 g/L 时, 油脂产量在发酵进行到 120 h 时高达 7.5 g/L 左右, 酵母含油率为 29%, 油脂得率为 12.5%。当 CSL 浓度为 10 g/L 时, 酵母的含油率下降到 24%; 发酵结束时底物消耗完全, 酵母可能降解胞内积累使酵母含油率下降, 从而使油脂产量降低。此时水解液中糖浓度为 60 g/L 左右时, 当水解液中添加 0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 6 g/L CSL 可使酵母的油脂产量最高, 且含油率维持在 30% 左右; 经计算此时的初始的 C/N 在 50 左右。水解液中糖浓度不同时, 我们在水解液中添加了不同浓度的 CSL 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 使油脂发酵的初始 C/N 在 50, 结果见表 4.5。

表 4.5 不同糖浓度水解液的油脂发酵

Table 4.5 Lipid fermentation by *Trichosporon cutaneum* using different hydrolysates.

Parameters	Hydrolysates ^a				
	3U	7U	10U	15U	20U
Initial C/N ^b (mol/mol)	50	50	50	50	50
Substrates consume (g/L)	46.6±2.7	59.1±0.0	89.3±1.0	94.1±0.7	92.6±0.8

DCW (g/L)	21.7±0.5	24.6±1.1	36.1±0.0	38.4±0.3	37.6±0.3
Lipid titer (g/L)	6.4±0.2	7.1±0.3	9.2±0.2	12.3±0.3	11.7±0.1
Lipid content (%)	29.7±0.4	28.7±0.2	25.5±0.4	32.1±0.4	31.2±0.1
YL/S(%)	14.2±0.0	11.6±0.3	10.3±0.1	13.3±0.3	12.6±0.1
Lipid productivity (mg/L/h)	53.6±2.0	49.0±1.8	47.9±0.8	64.1±1.3	61.2±0.6

^a The result of fermentation using 3U hydrolysate was on the 5th d; the result of fermentation using 7U hydrolysate was on the 6th d; others were on the 8th d. ^b The carbon source was from glucose and xylose, nitrogen source was from CSL, (NH₄)₂SO₄ and hydrolysates. Hydrolysis conditions: 50 °C, pH 4.8, Youtell #6 at 3, 7, 10, 15, 20 FPU/g DM (3U, 7U, 10U, 15U, 20U); hydrolysis time of 7U was 48 h, others' were 72 h. All cultures were performed at 30 °C and 180 rpm.

由于水解液中的糖浓度有很大差异，不同水解液的发酵时间不一样。3U 水解液发酵到第 5 d 葡萄糖和木糖全部耗尽；7U 水解液在第 6 d 才发酵结束；其它水解液发酵到第 8 d 时葡萄糖消耗完全，但还有木糖剩余。高糖浓度水解液的发酵后期，发酵液出现大量泡沫；此时酵母菌浓很高，且底物耗尽可能使酵母细胞破裂，从而使发酵液粘度上升而产生泡沫。从表 5 中可知，初始 C/N 一致时，DCW 和油脂产量随着水解液中糖浓度增加而增加。不同水解液发酵时，酵母的含油率变化不大，维持在 30% 左右，只有 10U 水解液发酵时酵母含油率偏低。10U 水解液发酵到第 8 d 时，葡萄糖和木糖消耗殆尽，酵母可能分解胞内积累的油脂供其生长，导致酵母含油率偏低。当利用 15U 水解液发酵时，酵母的菌体干重达到了 38.4 g/L，油脂产量为 12.3 g/L 左右，且酵母含油率仍然有 32% 左右。纤维素酶用量为 20 FPU/g DM 时，玉米芯残渣中纤维素的转化率较 15 FPU/g DM 几乎没有变化，最终油脂产量也没有提高，所以过高的纤维素酶用量并不能得到较好的发酵结果。经试验表明，初始 C/N 一致时，酵母的含油率不会随着初糖浓度的变化而变化，保持在 30% 左右；油脂产率维持在 50 - 60 mg/L/h 之间。因此，增加水解液中的初糖浓度能够提高油脂产量。

15U 水解液发酵情况如图 4.6 所示。15U 水解液的初始葡萄糖和木糖浓度分别为 82 和 12.5 g/L 左右。当发酵进行到第 7 d 时，酵母才将葡萄糖几乎消耗完全，糖消耗速率偏低；而木糖浓度在发酵到 8 d 时还有 1.5 g/L 左右。和大部分微生物一样，皮装丝孢酵母优先利用葡萄糖进行油脂发酵，然后再消耗木糖。当葡萄糖浓度和木糖浓度相当时，皮状丝孢酵母可以同时利用这两种糖。这说明皮状丝孢酵母胞内的葡萄糖降解途径并不能完全的抑制木糖代谢路径；当葡萄糖降解路径的通量降低到一定程度时，它对木糖代谢路径的抑制性就会降低，从而出现同时利用两种糖的情况。曾有人报道过一株皮状丝孢酵母可以同时利用葡萄糖和木糖，当葡萄糖：木糖分别为 2:1、1:1 和 1:2 时都能够观察到酵母同时利用这两种糖^[30]。

菌体干重一直随着时间增长而增长，前期菌体干重以每天 5 g/L/d 的速率增长，但后期即葡萄糖耗尽后增长明显变缓慢，最后达到了 36 g/L。酵母的含油率同样随着时间

的延长而增长，从 1 d 时的 10% 左右增加到最后的 31.1%；前 4 d 增长速度较快，每天有 5% 的增长；然后增长速度放慢，每天增加只有 1% 左右。酵母的含油率在发酵初期较低，主要是由于酵母先生长然后再积累油脂。

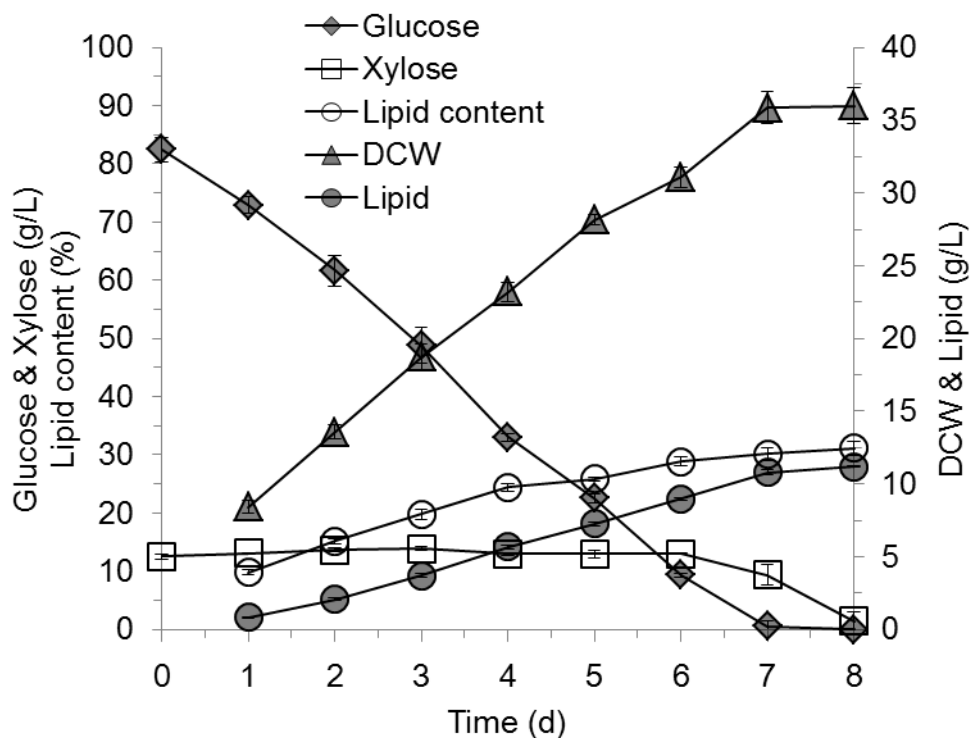


图 4.6 皮状丝孢酵母利用 15U 水解液进行的油脂发酵

Figure 4.6 Lipid fermentation using 15U hydrolysate by *T. cutaneum*.

第5章 结论与展望

5.1 结论

1. 金属离子对酵母产油的影响

实验中考察的 7 种金属离子对酵母产油的影响,寻找能够促进酵母产油的金属离子。实验结果表明不同的金属离子对酵母产油的影响是不同的。

(1) Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 对 *T. cutaneum* 在合成培养基中的油脂发酵没用明显影响,它们既不影响酵母的生长,也不影响酵母的含油率。

(2) Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 不利于油脂的生产。合适浓度的 Mn^{2+} 虽然不抑制酵母的生长,但是可降低酵母的含油率; Cu^{2+} 即抑制酵母的生长,又降低酵母的含油率。

(3) Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 有利于微生物油脂的生产,它们能够很好地提高酵母的生长量,同时酵母的含油率保持不变。 Fe^{3+} 对酵母产油发酵的促进作用最为明显;当 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 浓度为 0.15 g/L 时,酵母的生长量和油脂产量都提高 30% 以上,并且菌体和油脂基于底物的得率 $Y_{X/S}$ 和 $Y_{L/S}$ 分别有不同程度的提高。

2. 玉米芯残渣生产微生物油脂

玉米芯残渣是一种高纤维素含量的固体废弃物,能直接被纤维素酶水解得到含有葡萄糖的水解液。玉米芯残渣水解液中的糖浓度可以达到 100 g/L 以上,但是其中的总氮含量不到 0.3 g/L。培养基中的 C/N 对微生物油脂的积累有很大影响,C/N 越高微生物胞内的油脂积累量越高;因此,玉米芯残渣水解液应该适合微生物油脂的发酵。

(1) 通过菌种筛选,发现 *T. cutaneum* 20271 能够在其中生长并积累油脂,不像其它产油酵母那样受到玉米芯残渣水解液中抑制物的严重影响。

(2) 利用水解液进行油脂发酵时,随着硫酸铵浓度的增大,酵母在摇瓶中的生长量并不是一直增大的;当其浓度过高时,酵母的生长量下降,并且酵母含油率大幅下降。研究表明过高浓度硫酸铵使发酵液的 pH 降低,从而使酵母的生长受到抑制。

(3) 单独添加各营养物质时,CSL 最适合 *T. cutaneum* 在玉米芯残渣水解液中产油发酵;随着 CSL 浓度的增加,酵母在水解液中的生长量和油脂产量都是在不断地增加,并且酵母的含油率并没有出现明显下降。

(4) 玉米芯残渣水解液中同时添加 $(NH_4)_2SO_4$ 和 CSL 时,可以更好地促进酵母在的油脂发酵提高了菌体生长量和油脂产量,并且酵母的含油率几乎不变,同时油脂产率得到了一定提高。通过提高纤维素酶用量,油脂的产量逐渐提高。当纤维素酶用量为 15 FPU/g DM 时,菌体干重有 36 g/L,酵母含油率为 31.1%,油脂产量可以达到 12.3 g/L,油脂基于底物的得率为 0.119 g/g,油脂产率达到 0.064 g/L/h。

5.2 展望

本课题首先研究了金属离子对 *T. cutaneum* 产油发酵的影响,发现 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对酵母的油脂发酵有很大的促进作用;其次,将玉米芯残渣通过发酵的方式转化为微生物油脂。该研究结果为后续的油脂发酵研究提供了一定的基础,但研究过程中的某些方面还需要进一步的研究。

(1) 虽发现 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 在相同 C/N 条件下能够促进酵母的生长,但其对酵母作用的原因不清楚,需要进一步的实验证实。

(2) Fe^{3+} 虽能提高酵母的油脂产量和油脂得率,但它不能提高酵母的含油率。*T. cutaneum* 的含油率一直在 30%左右,需要从不同的方面寻找提高酵母含油率的方法,如培养条件与方式、各种化学物质的添加等。

(3) *T. cutaneum* 可以在含有抑制物的复杂培养基中进行油脂发酵,但它对于各种抑制物的耐受性的机理不清楚。通过对其机理的研究,应该可以进一步提高 *T. cutaneum* 对复杂环境的耐受性。

(4) 不同营养物质对 *T. cutaneum* 在玉米芯残渣水解液中的油脂发酵有不同的影响,但关于它们影响不同的原因尚不清楚。不同营养物质的组成可能是它们对油脂发酵影响不同的原因,如氨基酸组分和微量元素组成等。

(5) *T. cutaneum* 利用玉米芯残渣生产的油脂有 12 g/L 左右,但较长的发酵时间使油脂产率只有 0.06 g/L/h。因此,需要通过优化条件或者更换发酵方式来提高油脂产率。

(6) *T. cutaneum* 胞内油脂基于底物得率只有 0.1 g/g 左右,而菌体基于底物的得率有 0.4 g/g,表明酵母非油组分的得率有 0.3 g/g。所以,有必要检测菌体的各组分组成以确定底物的流向,还可以考虑其他组分的用途来提高油脂发酵过程的产出。

参考文献

- [1] BP 世界能源统计年鉴[D]. 2012.
- [2] Liao J C, Messing J. Energy Biotechnology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 287.
- [3] Geider R J, Delucia E H, Falkowski P G, et al. Primary Productivity of Planet Earth: Biological Determinants and Physical Constraints in Terrestrial and Aquatic Habitats[J]. *Global Change Biology*, 2001, 7(8): 849-882.
- [4] Blanch H W. Bioprocessing for Biofuels[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 390-395.
- [5] Clark J H, Luque R, Matharu A S. Green Chemistry, Biofuels, and Biorefinery[J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2012, 3: 183-207.
- [6] Moser B R. Biodiesel Production, Properties, and Feedstocks[M]. Springer, 2011. 285-347.
- [7] Songstad D, Lakshmanan P, Chen J, et al. Historical Perspective of Biofuels: Learning from the Past to Rediscover the Future[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2009, 45(3): 189-192.
- [8] Knothe G. Biodiesel: Current Trends and Properties[J]. *Topics in Catalysis*, 2010, 53(11-12): 714-720.
- [9] Al - Zuhair S. Production of Biodiesel: Possibilities and Challenges[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2007, 1(1): 57-66.
- [10] Ratledge C. Microorganisms for Lipids[J]. *Acta biotechnologica*, 1991, 11(5): 429-438.
- [11] Alvarez H, Steinbüchel A. Triacylglycerols in Prokaryotic Microorganisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(4): 367-376.
- [12] Vicente G, Bautista L F, Rodríguez R, et al. Biodiesel Production from Biomass of an Oleaginous Fungus[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 48(1): 22-27.
- [13] Ratledge C, Tan K-H. Oils and Fats: Production, Degradation and Utilization by Yeasts[M]. Marcel Dekker, New York, 1990.
- [14] Steen E J, Kang Y, Bokinsky G, et al. Microbial Production of Fatty-Acid-Derived Fuels and Chemicals from Plant Biomass[J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 559-562.
- [15] Moreton R. Single Cell Oil[M]. Longman Scientific & Technical, 1988.
- [16] Li Y, Zhao Z K, Bai F. High-Density Cultivation of Oleaginous Yeast *Rhodospiridium Toruloides* Y4 in Fed-Batch Culture[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(3): 312-317.
- [17] Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, et al. Single Cell Oil Production by *Yarrowia Lipolytica* Growing on an Industrial Derivative of Animal Fat in Batch Cultures[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(3): 308-312.
- [18] Ratledge C, Wynn J P. The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms[J]. *Advances in applied microbiology*, 2002, 51: 1-51.
- [19] Kosa M, Ragauskas A J. Lipids from Heterotrophic Microbes: Advances in Metabolism Research[J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(2): 53-61.
- [20] Zhang H, Damude H G, Yadav N S. Three Diacylglycerol Acyltransferases Contribute to Oil Biosynthesis and Normal Growth in *Yarrowia Lipolytica*[J]. *Yeast*, 2012, 29(1):

- 25-38.
- [21] Morin N, Cescut J, Beopoulos A, et al. Transcriptomic Analyses During the Transition from Biomass Production to Lipid Accumulation in the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27966.
- [22] Athenstaedt K, Jolivet P, Boulard C, et al. Lipid Particle Composition of the Yeast *Yarrowia Lipolytica* Depends on the Carbon Source[J]. Proteomics, 2006, 6(5): 1450-1459.
- [23] Ageitos J M, Vallejo J A, Veiga-Crespo P, et al. Oily Yeasts as Oleaginous Cell Factories[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 90(4): 1219-1227.
- [24] Li Q, Du W, Liu D. Perspectives of Microbial Oils for Biodiesel Production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(5): 749-756.
- [25] Zhao X, Kong X, Hua Y, et al. Medium Optimization for Lipid Production through Co - Fermentation of Glucose and Xylose by the Oleaginous Yeast *Lipomyces Starkeyi*[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2008, 110(5): 405-412.
- [26] Takagi M, Yoshida T. Effect of Salt Concentration on Intracellular Accumulation of Lipids and Triacylglyceride in Marine Microalgae *Dunaliella* Cells[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(3): 223-226.
- [27] Xu J, Du W, Zhao X, et al. Microbial Oil Production from Various Carbon Sources and Its Use for Biodiesel Preparation[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2013, 7(1): 65-77.
- [28] Zhang J, Fang X, Zhu X-L, et al. Microbial Lipid Production by the Oleaginous Yeast *Cryptococcus Curvatus* O3 Grown in Fed-Batch Culture[J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35(5): 1906-1911.
- [29] Papanikolaou S, Diamantopoulou P, Chatzifragkou A, et al. Suitability of Low-Cost Sugars as Substrates for Lipid Production by the Fungus *Thamnidium Elegans*[J]. Energy & Fuels, 2010, 24(7): 4078-4086.
- [30] Hu C, Wu S, Wang Q, et al. Simultaneous Utilization of Glucose and Xylose for Lipid Production by *Trichosporon Cutaneum*[J]. Biotechnol Biofuels, 2011, 4(1): 25.
- [31] Zhao C-H, Zhang T, Li M, et al. Single Cell Oil Production from Hydrolysates of Inulin and Extract of Tubers of Jerusalem Artichoke by *Rhodotorula Mucilaginosa* Tjy15a[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(7): 1121-1126.
- [32] Wang Q, Guo F-J, Rong Y-J, et al. Lipid Production from Hydrolysate of Cassava Starch by *Rhodospiridium Toruloides* 21167 for Biodiesel Making[J]. Renewable Energy, 2012, 46(0): 164-168.
- [33] Zhao C-H, Chi Z, Zhang F, et al. Direct Conversion of Inulin and Extract of Tubers of Jerusalem Artichoke into Single Cell Oil by Co-Cultures of *Rhodotorula Mucilaginosa* Tjy15a and Immobilized Inulinase-Producing Yeast Cells[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 6128-6133.
- [34] Wang G-Y, Chi Z, Song B, et al. High Level Lipid Production by a Novel Inulinase-Producing Yeast *Pichia Guilliermondii* Pcla22[J]. Bioresource Technology, 2012(0).
- [35] De Swaaf M E, Sijtsma L, Pronk J T. High - Cell - Density Fed - Batch Cultivation of the Docosahexaenoic Acid Producing Marine Alga *Cryptocodinium Cohnii*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 81(6): 666-672.
- [36] Heredia-Arroyo T, Wei W, Ruan R, et al. Mixotrophic Cultivation of *Chlorella Vulgaris*

- and Its Potential Application for the Oil Accumulation from Non-Sugar Materials[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(5): 2245-2253.
- [37] Zheng Y, Chi Z, Ahring B K, et al. Oleaginous Yeast *Cryptococcus Curvatus* for Biofuel Production: Ammonia's Effect[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2012, 37(0): 114-121.
- [38] Angerbauer C, Siebenhofer M, Mittelbach M, et al. Conversion of Sewage Sludge into Lipids by *Lipomyces Starkeyi* for Biodiesel Production[J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99(8): 3051-3056.
- [39] Yousuf A, Sannino F, Addorisio V, et al. Microbial Conversion of Olive Oil Mill Wastewaters into Lipids Suitable for Biodiesel Production[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(15): 8630-8635.
- [40] Liu J X, Yue Q Y, Gao B Y, et al. Microbial Treatment of the Monosodium Glutamate Wastewater by *Lipomyces Starkeyi* to Produce Microbial Lipid[J]. *Bioresour Technol*, 2012, 106: 69-73.
- [41] Akpinar-Bayizit A, Yilmaz-Ersan L, Ozcan T. Production of Single Cell Oil During Growth of *Aspergillus Species* on Whey[J]. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(Suppl. 1): 608.
- [42] Jönsson L J, Alriksson B, Nilvebrant N-O. Bioconversion of Lignocellulose: Inhibitors and Detoxification[J]. *Biotechnology for biofuels*, 2013, 6(1): 1-10.
- [43] Alriksson B, Horváth I S, Sjöde A, et al. Ammonium Hydroxide Detoxification of Spruce Acid Hydrolysates[A]. *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals[C]*. Springer, 2005. 911-922.
- [44] Alriksson B, Sjöde A, Nilvebrant N-O, et al. Optimal Conditions for Alkaline Detoxification of Dilute-Acid Lignocellulose Hydrolysates[A]. *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals[C]*. Springer, 2006. 599-611.
- [45] Alriksson B, Cavka A, Jönsson L J. Improving the Fermentability of Enzymatic Hydrolysates of Lignocellulose through Chemical *in-Situ* Detoxification with Reducing Agents[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1254-1263.
- [46] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. Biodetoxification of Toxins Generated from Lignocellulose Pretreatment Using a Newly Isolated Fungus, *Amorphotheca Resinae* Zn 1, and the Consequent Ethanol Fermentation[J]. *Biotechnology for biofuels*, 2010, 3(1): 26.
- [47] Nichols N N, Sharma L N, Mowery R A, et al. Fungal Metabolism of Fermentation Inhibitors Present in Corn Stover Dilute Acid Hydrolysate[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42(7): 624-630.
- [48] López M, Nichols N, Dien B, et al. Isolation of Microorganisms for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(1): 125-131.
- [49] Chu D, Zhang J, Bao J. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation of Corn Stover at High Temperature and High Solids Loading by a Thermotolerant Strain *Saccharomyces Cerevisiae* Dq1[J]. *BioEnergy Research*, 2012, 5(4): 1020-1026.
- [50] Jönsson L, Palmqvist E, Nilvebrant N-O, et al. Detoxification of Wood Hydrolysates with Laccase and Peroxidase from the White-Rot Fungus *Trametes Versicolor*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 49(6): 691-697.
- [51] Jurado M, Prieto A, Martínez-Alcalá, et al. Laccase Detoxification of Steam-Exploded Wheat Straw for Second Generation Bioethanol[J]. *Bioresource Technology*, 2009,

- 100(24): 6378-6384.
- [52] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N-O, et al. Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolyzates of Spruce[A]. Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals[C]. Springer, 1999. 91-103.
- [53] Ranatunga T D, Jervis J, Helm R F, et al. The Effect of Overliming on the Toxicity of Dilute Acid Pretreated Lignocellulosics: The Role of Inorganics, Uronic Acids and Ether-Soluble Organics[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(3): 240-247.
- [54] Persson P, Larsson S, Jönsson L J, et al. Supercritical Fluid Extraction of a Lignocellulosic Hydrolysate of Spruce for Detoxification and to Facilitate Analysis of Inhibitors[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 79(6): 694-700.
- [55] Zhu J, Yong Q, Xu Y, et al. Detoxification of Corn Stover Prehydrolyzate by Trialkylamine Extraction to Improve the Ethanol Production with *Pichia Stipitis* Cbs 5776[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1663-1668.
- [56] Parajó J, Dominguez H, Domínguez J. Improved Xylitol Production with *Debaryomyces Hansenii* Y-7426 from Raw or Detoxified Wood Hydrolysates[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21(1): 18-24.
- [57] Horváth I S, Sjöde A, Nilvebrant N-O, et al. Selection of Anion Exchangers for Detoxification of Dilute-Acid Hydrolysates from Spruce[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004, 114(1-3): 525-538.
- [58] Björklund L, Larsson S, Jönsson L J, et al. Treatment with Lignin Residue[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, 98(1-9): 563-575.
- [59] Zhang J, Chu D, Huang J, et al. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation at High Corn Stover Solids Loading in a Helical Stirring Bioreactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(4): 718-728.
- [60] Zhao K, Qiao Q, Chu D, et al. Simultaneous Saccharification and High Titer Lactic Acid Fermentation of Corn Stover Using a Newly Isolated Lactic Acid Bacterium *Pediococcus Acidilactici* Dq2[J]. Bioresource Technology, 2012.
- [61] Liu W, Wang Y, Yu Z, et al. Simultaneous Saccharification and Microbial Lipid Fermentation of Corn Stover by Oleaginous Yeast *Trichosporon Cutaneum*[J]. Bioresource Technology, 2012, 118(0): 13-18.
- [62] Huang C, Zong M H, Wu H, et al. Microbial Oil Production from Rice Straw Hydrolysate by *Trichosporon Fermentans*[J]. Bioresour Technol, 2009, 100(19): 4535-4538.
- [63] Economou C N, Aggelis G, Pavlou S, et al. Single Cell Oil Production from Rice Hulls Hydrolysate[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(20): 9737-9742.
- [64] Yu X, Zheng Y, Dorgan K M, et al. Oil Production by Oleaginous Yeasts Using the Hydrolysate from Pretreatment of Wheat Straw with Dilute Sulfuric Acid[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 6134-6140.
- [65] Tsigie Y A, Wang C Y, Truong C T, et al. Lipid Production from *Yarrowia Lipolytica* Polg Grown in Sugarcane Bagasse Hydrolysate[J]. Bioresour Technol, 2011, 102(19): 9216-9222.
- [66] Huang X, Wang Y, Liu W, et al. Biological Removal of Inhibitors Leads to the Improved Lipid Production in the Lipid Fermentation of Corn Stover Hydrolysate by *Trichosporon Cutaneum*[J]. Bioresour Technol, 2011, 102(20): 9705-9709.
- [67] Xie H, Shen H, Gong Z, et al. Enzymatic Hydrolysates of Corn Stover Pretreated by a

- N-Methylpyrrolidone-Ionic Liquid Solution for Microbial Lipid Production[J]. *Green Chemistry*, 2012, 14(4): 1202-1210.
- [68] Huang C, Chen X-F, Xiong L, et al. Oil Production by the Yeast *Trichosporon Dermatis* Cultured in Enzymatic Hydrolysates of Corncoobs[J]. *Bioresource Technology*, 2012(0).
- [69] 邢大辉, 潘安龙, 薛冬桦, et al. 深黄被孢霉利用不同碳源产油脂比较[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(2): 189.
- [70] Tao J, Dai C-C, Yang Q-Y, et al. Production of Biodiesel with Acid Hydrolysate of *Populus Euramevicana* Cv Leaves by *Rhodotorula Glutinis*[J]. *International Journal of Green Energy*, 2010, 7(4): 387-396.
- [71] Liang Y N, Tang T Y, Umagiliyage A L, et al. Utilization of Sorghum Bagasse Hydrolysates for Producing Microbial Lipids[J]. *Applied Energy*, 2012, 91(1): 451-458.
- [72] 王华, 李静, 王冬梅等. 金属离子对斯达油脂酵母发酵产油脂的影响[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(2): 67-72.
- [73] 王莉, 孙玉梅, 王培忠等. 金属离子对发酵性丝孢酵母发酵产油脂的影响[J]. *大连轻工业学院学报*, 2005, 24(4): 4.
- [74] Toledano M B, Kumar C, Le Moan N, et al. The System Biology of Thiol Redox System in *Escherichia Coli* and Yeast: Differential Functions in Oxidative Stress, Iron Metabolism and DNA Synthesis[J]. *FEBS letters*, 2007, 581(19): 3598-3607.
- [75] Liu K, Lin X, Yue J, et al. High Concentration Ethanol Production from Corncob Residues by Fed-Batch Strategy[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4952-4958.
- [76] Zhang W, Liu Z, Liu Z, et al. Butanol Production from Corncob Residue Using *Clostridium Beijerinckii* Ncimb 8052[J]. *Letters in applied microbiology*, 2012, 55(3): 240-246.
- [77] Chandel A K, Da Silva S S, Singh O V. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering toward White Biotechnology[J]. *BioEnergy Research*, 2013, 6(1): 388-401.
- [78] Oberoi H S, Vadlani P V, Brijwani K, et al. Enhanced Ethanol Production Via Fermentation of Rice Straw with Hydrolysate-Adapted *Candida Tropicalis* ATCC 13803[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(8): 1299-1306.
- [79] 袁锦云, 艾佐佐, 张志斌等. 皮状丝孢酵母 B3 利用木薯淀粉发酵生产微生物油脂[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(3): 453-460.
- [80] Buurman E T, De Mattos M J T, Neijssel O M. Futile Cycling of Ammonium Ions Via the High Affinity Potassium Uptake System (Kdp) of *Escherichia Coli*[J]. *Archives of microbiology*, 1991, 155(4): 391-395.
- [81] Ramos M J, Fernández C M, Casas A, et al. Influence of Fatty Acid Composition of Raw Materials on Biodiesel Properties[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1): 261-268.
- [82] 罗文, 袁振宏, 谭天伟等. 生物柴油理化性质与组分关系的研究[J]. *太阳能学报*, 2008, 29(7): 878-882.

致谢

本论文是在鲍杰教授的辛勤指导下完成的，鲍老师在学术上的严谨态度和对工作的认真程度都深深地影响着我，是今后工作和生活中供我学习的榜样。对于本研究课题，鲍老师提供了很多宝贵建议和指导，并为实验的顺利进行和论文的写作付出了很大的心血。在此论文完成之际，向鲍老师表达诚挚的谢意！

感谢张建老师和高老师对本研究提供的帮助。

特别感谢刘威师兄和王玉梅师姐在实验中给予的很大帮助。没有你们的带领，我不能这么快地进入研究生的状态；没有我们的讨论，就不会对课题有深刻的认识，实验思路同样不会如此清晰。相处的时间虽短，但它赋予我们的友谊很长，为我们留下的回忆很深。

感谢实验室的其他同学在这三年期间给予的无私帮助，并请原谅我不在此一一列出你们的名字。因为有你们，实验再怎么紧张，经过都一样精彩。

最后，感谢我的家人和亲友一直给予的支持！我爱你们。