

学校代码：10251

学 号：Y45170518

華東理工大學

碩 士 学 位 论 文

论文题目： 高产油脂皮状丝孢酵母菌株的

超离心筛选及机制分析

工程领域： 生物工程

研究方向： 生物炼制

论文作者： 卢敏萍

学校导师： 张建 副教授

企业导师： 刘鲁民 教授

定稿日期： 2020 年 05 月 20 日

分类号: Q815 密级: _____

UDC: _____

华东理工大学

学位论文

高产油脂皮状丝孢酵母菌株的超离心筛选及机制分析

卢敏萍

指导教师姓名:

鲍杰 教授 生物工程学院
张建 副教授 生物工程学院

刘鲁民 教授 青岛和协生物科技有限公司

申请学位级别: 硕士 工程领域: 生物工程

论文定稿日期: 2020.05.20 论文答辩日期: 2020.06.15

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: 董宏伟 高级工程师

评 阅 人: 高旻天 教授

黄亦钧 高级工程师

谢静莉 副研究员

华东理工大学研究生学位论文提交要求

根据校学位评定委员会要求，研究生学位论文全文（含纸质版和电子版）必须提交档案馆保存。

研究生学位论文全文电子版由档案馆按①（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

注：选择②、③或④的需经学校国家技术转移中心备案，以为学校技术转移提供服务。

学位论文作者签名：卢敏萍

2020年6月16日

指导教师签名：鲍杰

2020年6月16日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作 者 声 明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所提交的学位论文，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：

2020年6月16日

高产油脂皮状丝孢酵母菌株的超离心筛选及机制分析

摘要

用油脂微生物将木质纤维素来源的可发酵糖转化为微生物油脂,是保障生物柴油的油脂原料可持续供应的可靠方法。油脂酵母 *Trichosporon cutaneum* 是最适合木质纤维素体系油脂发酵的菌株。本实验室之前通过高通量超速离心筛选方法在木质纤维素培养体系中成功获得一株胞内密度较低的高产油脂菌株 *T. cutaneum* MS 28。本文为了验证离心筛选的可行性和普适性,在合成培养基体系中筛选,提高离心力能够更快速地筛选出一株油脂含量更高的 *T. cutaneum* MP 11。进行 30%高固含量麦秆同步糖化好氧共发酵实验,原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 仅能够利用部分葡萄糖,生产 6 g/L 油脂。筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 能够转化己糖和戊糖,分别达到 32.8 g/L 和 34.4 g/L 的高油脂产量指标,展现了出色的油脂生产能力。

显微镜观察发现超离心筛选轻细胞酵母在细胞出芽生长方式和形态方面具有明显差异,原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 呈单边顶端出芽,细胞形态为均一的单细胞椭圆形。2 株筛选菌呈多边出芽,细胞形态多样和细胞体积更大,为油脂的积累提供了更广阔的空间。酵母细胞形态可能与细胞壁的完整性有关,可以通过调节甘露聚糖、几丁质和葡聚糖的合成与分解,使结构处于动态变化以适应环境变化。透射电子显微镜观察发现,细胞体积越大和生长代谢越活跃的筛选菌株细胞壁越薄,且胞内油脂含量更高。qRT-PCR 结果表明细胞壁合成与分解相关基因差异表达,原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271,筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 细胞壁单位表面积几丁质和单糖聚合物的比值分别为 0.05, 0.09 和 0.28。高几丁质和单糖聚合物的比值有利于细胞形态的改变和油脂的积累。

2 株超离心筛选菌株胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量相比原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 更高,影响油脂合成的关键前体物质供给能力更强。研究结果发现乙酰辅酶 A, NADPH 和脂肪酸合成部分相关基因发生了不同程度的上调表达,生长和油脂积累更快 *T. cutaneum* MS 28 转录水平显著上调。甘油三酯合成最后步骤相关酶的表达差异不突出。因此用于脂肪酸从头合成的乙酰辅酶 A 和提供还原力的 NADPH 的供给量,成为提高油脂合成能力的关键因素。

综上所述,超离心筛选方法能够筛选出底物转化能力优异的油脂酵母,具有一定的推广价值。本文探究 *T. cutaneum* 利用木质纤维素生产油脂的潜力;分析不同 *T. cutaneum* 的出芽繁殖方式及细胞壁结构变化;结合分子生物学知识,进一步了解离心筛选机制对细胞形态及油脂合成代谢的影响。

关键词: 皮状丝孢酵母; 微生物油脂; 超离心筛选; 细胞壁; 细胞形态;

Study on the ultra-centrifugal screening and mechanism analysis of high lipid producing *Trichosporon cutaneum* mutant

Abstract

Oleaginous microorganism can convert fermentable sugars derived from lignocellulose into microbial lipid, which is a reliable method to ensure the sustainable supply of biodiesel lipid raw materials. The oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* is the most suitable strain for lignocellulose system oil fermentation. In this paper, a mutant strain *T. cutaneum* MS 28 with low intracellular density was successfully obtained in a lignocellulose culture system by high-throughput ultra-centrifugation screening method. The mutant strain *T. cutaneum* MP11 with higher lipid content was screened more quickly in synthetic medium, which confirmed the feasibility and universality of ultracentrifugal screening. The mutant strains can transform hexose and pentose at the high solid content of 30% wheat straw simultaneous saccharification and co-fermentation, but the parental *T. cutaneum* ACCC 20271 can only use part of glucose to produce 6 g / L lipid. *T. cutaneum* MS 28 and *T. cutaneum* MP 11 accumulated high lipid yields of 32.8 g / L and 34.4 g / L, respectively. The mutant strain has excellent lipid production capacity.

Microscopic observations show that ultra-centrifugal screening of two mutants has obvious differences in cell budding growth and morphology. The parental *T. cutaneum* ACCC 20271 had a single apical bud at the top, and the cell morphology was a uniform single cell ellipse. Both mutants had multilateral buds. Their diverse cell morphology and larger cell size provide a broader space for lipid accumulation. Yeast cell morphology may be related to the integrity of the cell wall. The cell wall can adjust the synthesis and decomposition of mannan, chitin, and glucan to make the structure change dynamically to adapt to environmental changes. Transmission electron microscopy observations showed that the mutant strains had larger cell volume and more active metabolism. At the same time, the cell wall of the mutant strain was thinner and the intracellular lipid content was higher. The results of qRT-PCR indicated that genes related to cell wall synthesis and degradation were differentially expressed. The ratio of cell wall unit surface area chitin to monosaccharide polymer in the parental strain *T. cutaneum* ACCC 20271, mutant strains *T. cutaneum* MS 28 and *T. cutaneum* MP 11 was 0.05, 0.09 and 0.28, respectively. The results show that the ratio of high chitin to monosaccharide polymer is conducive to changes in cell morphology and accumulation of lipid.

The content of acetyl-CoA and NADPH in the two mutants was higher than the parental *T. cutaneum* ACCC 20271. *T. cutaneum* MS 28 and *T. cutaneum* MP 11 have a stronger ability to supply key precursors for lipid synthesis. The results showed that some genes related to

acetyl-CoA, NADPH and fatty acid synthesis were up-regulated ,and the transcription level of two mutants were significantly different from *T. cutaneum* ACCC 20271. Therefore, the supply of acetyl-CoA and NADPH has become a key factor for improving the ability of fat synthesis.

In this article, the ultra-centrifugal screening method can obtain oleaginous yeast with excellent substrate conversion ability, which is of popularization value. First, the potential of *T. cutaneum* to produce lipids using lignocellulose was evaluated. Then, the budding propagation and cell wall structure of *T. cutaneum* mutants were analyzed. Finally, the effect of centrifugal screening mechanism on cell morphology and lipid anabolism is further understood.

Keywords: *Trichosporon cutaneum*; microbial lipid; ultra-centrifugal screening; cell wall; cell morphology;

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 前言	1
1.2 生物柴油概述	1
1.3 木质纤维素微生物油脂生产	2
1.3.1 木质纤维素生物炼制技术	2
1.3.2 微生物油脂	4
1.3.3 产油微生物	5
1.3.4 油脂酵母的筛选	6
1.3.5 高产油脂皮状丝孢酵母超离心筛选	7
1.4 油脂合成代谢途径	8
1.5 酵母的细胞壁和细胞形态	9
1.5.1 酵母细胞壁组成与修饰	9
1.5.2 酵母细胞形态	10
1.6 研究意义	11
第 2 章 超速离心筛选皮状丝孢酵母的木质纤维素油脂发酵研究	13
2.1 引言	13
2.2 实验材料与方法	13
2.2.1 原料	13
2.2.2 酶试剂	14
2.2.3 菌株和培养基	14
2.2.4 种子培养	14
2.2.5 麦秆预处理和生物脱毒	14
2.2.6 麦秆水解液和玉米粉水解液制备	14
2.2.7 油脂发酵	15
2.2.8 长发酵周期适应性驯化超速离心筛选	15
2.2.9 细胞干重及油脂测定	15
2.2.10 油脂组分测定	16
2.2.11 糖类和抑制物的高效液相色谱(HPLC)检测	16
2.2.12 细胞密度计算	16
2.3 结果和讨论	17
2.3.1 <i>T. cutaneum</i> 合成培养基长周期适应性进化及离心筛选	17
2.3.2 <i>T. cutaneum</i> 筛选前后低密度轻细胞量观察和轻重细胞比例研究	18

2.3.3	<i>T. cutaneum</i> 脂肪酸的组成	20
2.3.4	<i>T. cutaneum</i> 利用 15%固含量玉米粉水解液分步糖化发酵生产油脂	20
2.3.5	<i>T. cutaneum</i> 利用 30%固含量麦秆同步糖化共发酵生产油脂	22
2.4	小结	23
第 3 章 皮状丝孢酵母细胞形态与油脂合成生物学机制研究		25
3.1	引言	25
3.2	实验材料与方法	25
3.2.1	菌株和培养基	25
3.3.2	种子培养	26
3.3.3	麦秆预处理和生物脱毒	26
3.3.4	高效液相色谱(HPLC)检测	26
3.3.5	细胞壁组分测定	26
3.3.6	透射电子显微镜细胞观察	26
3.3.7	胞内 NADPH 和乙酰辅酶 A 含量的测定	27
3.2.8	实时荧光定量 PCR	27
3.3	结果和讨论	27
3.3.1	<i>T. cutaneum</i> MP 11 的离心转接过程细胞形态观察	27
3.3.2	<i>T. cutaneum</i> 细胞生长繁殖过程分析	29
3.3.3	<i>T. cutaneum</i> 细胞形态和细胞壁组分相关分析	31
3.3.4	<i>T. cutaneum</i> 胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量对比	33
3.3.5	<i>T. cutaneum</i> 油脂合成和细胞壁合成代谢相关基因转录水平分析	35
3.4	本章小结	37
第 4 章 结论与展望		39
4.1	结论和创新	39
4.2	展望	40
参考文献		41
硕士期间研究成果		49
致谢		50

第 1 章 绪论

1.1 前言

世界人口,工业化和城市化的快速增长导致对能源的需求不断增长。化石燃料是世界上的主要能源,根据美国能源信息署(International Energy Agency, IEA)的数据报告,2016 年全球石油总消耗量约为 354 亿桶,而世界原油探明储量大约有 16500 亿桶,按照此消耗速率估算到 2064 年所有石油储备都可能被消耗掉,2015 年中国石油消费量达到 5.43 亿吨,其中 60.6%的石油需要依赖进口^[1]。使用化石燃料产生大量二氧化碳、二氧化硫和烟尘,这是造成环境变化的关键因素。作为温室气体的主要成分,二氧化碳在大气层中的增加导致全球气候变暖^[2]。

发展可再生能源对于实现能源转型、应对能源短缺和全球变暖具有重要意义。目前,生物柴油是国际上公认的一种广泛使用的可再生生物燃料能源,在交通运输领域有替代化石柴油的潜力。生物柴油是目前国际公认应用广泛的可再生生物燃料能源,在交通运输领域具有替代化石柴油的潜能^[3]。替代燃料的重要特性应具有:经济可行,易于获得,较少的环境问题。原材料占生物柴油总生产成本的 60-75%,高昂的生产成本阻碍了其在世界大部分地区的商业化,所以选择最佳生物质原料至关重要^{[4][5]}。使用传统原料(例如植物油)可能会导致食用油短缺和食品价格上涨,由残余的农业生物质生产生物柴油将带来远远超过其经济效益的环境效益。克服地域和气候的限制,获取大量存在于人类食物链之外的纤维素生物质和其他废物,有利于稳定农民的收入,并有助于维持和改善生态和社会的可持续性^[6]。

1.2 生物柴油概述

生物柴油可以促进能源安全和社会经济发展,减少对化石燃料的依赖性。生物柴油是高度可降解,可再生和可持续的,具有与石油柴油相似的燃烧特性,是车辆和锅炉发动机的直接替代燃料。生物柴油相对于传统的化石燃料柴油有很多优点,比如减少温室气体、其它气体污染物和微粒的排放。可将生物柴油定义为“从植物油脂或动物脂肪中提取的长链脂肪酸单烷基酯”^[7]。甲醇与 TAG 在催化剂存在下进行酯交换反应,得到脂肪酸甲基酯和副产物甘油^[8]。随着石油和煤炭等化石燃料的枯竭以及气候问题的日益突出,生物柴油吸引了人类的目光。第一代生物柴油是由食用油和粮食作物生产的,常见的原料包括大豆油,葵花子油,棕榈油和菜籽油。

尽管第一代生物柴油有助于满足对替代燃料的日益增长的需求,但这与对食物的日益增长的需求相矛盾,并引发了“食物与燃料”的争论^[9]。植物油竞争粮

食作物种植的土地，水分和养分，食品价格上涨也会导致生物柴油价格不稳定。食用油为原料的生物柴油全年供应不稳定且经济上不具有竞争力，制约了生物柴油的发展。木纤维素废弃物是一种天然的可再生资源，利用微生物转化廉价而丰富的农业废物生产微生物油脂，可以确保生物柴油油脂原料的可持续供应。利用木质纤维素原料生产油脂已成为世界范围内的研究热点，引起了全球的极大关注[10][11]。

1.3 木质纤维素微生物油脂生产

1.3.1 木质纤维素生物炼制技术

生物质是地球上储量最大、年产量最高的可持续碳资源。全球木质纤维素生物量的年产量超过 2000 亿吨^[12]。中国每年的农业废料产量已超过 9 亿吨，中国一直在促进农业废弃物的有效转化和应用。由于缺乏成熟的技术和处理工艺成本昂贵，每年原地焚化大约 2 亿吨农作物秸秆，这将会造成巨大的资源损失和环境破坏^[13]。农业残留物，工业废弃物和草本植物是常用的木质纤维素原料。木质纤维素成分包含木质素，半纤维素和纤维素，此外还有一些结构性蛋白、脂类和灰分等成分^[14]。这些组分以特定方式高度紧密相互连接在一起，形成复杂的三维结构，具有很强的生物顽抗性，如图 1.1^[15]。

木质纤维素生物炼制是一个革命性的概念，是指通过生物化学的方法，将自然界的木质纤维素降解成可利用的小分子发酵单糖，利用微生物发酵转化为有益于可持续发展的能源品^[16]。木质纤维素结构的生物顽抗性阻碍了水解效率，增加了培养基配制的成本，因此提高木质纤维素生物炼制工艺经济可行性尤其重要^{[17][19]}。

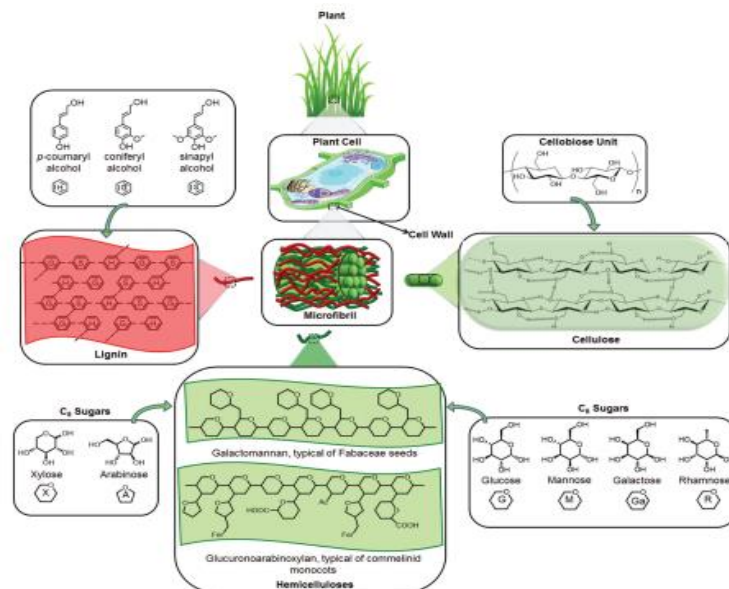


图 1.1 木质纤维素生物质的组分和结构^[15]

Fig. 1.1 Main components and structure of lignocellulose biomass

木质纤维素的顽固性被认为是经济上实现释放糖以生产生物燃料和生物基化学产品的障碍,不经过任何处理酶水解得率非常低,直接影响可发酵单糖的释放和后续生物转化^[20]。预处理主要的作用是破坏木质纤维素的天然晶体结构,相应的水解酶更容易与之结合,释放戊糖和己糖,是炼制工艺的首要环节^{[21][22]}。在许多预处理中,稀酸预处理是克服生物质难降解的有效技术之一,已被证实适用于木质纤维素生物炼制,有望实现工业化^[23]。稀酸预处理方式也存在一定缺陷,比如预处理过程会产生大量游离废水,而废水处理消耗巨大的经济能源;酸用量过大,部分被释放的糖会继续被降解成抑制物,损失可发酵单糖同时也会不利于下一步发酵过程中微生物的生长;酸催化剂的使用会导致预处理设备的腐蚀和损坏,增加设备需要维护的成本和时间等问题^[24]。

为了保证酸预处理方式效果及尽可能地克服其带来设备腐蚀和废水排放问题,本实验在稀酸预处理技术的基础上进行不断改进,zhang等人开发出一种更可靠的干式稀酸预处理技术^[25],有效地降低了预处理反应所需要的水用量,实现了游离废水的零产生,预处理物料的高固含量和物料的长期储存,减少了预处理设备腐问题带来的费用。

预处理过程会产生各种有毒性抑制剂,有害于微生物生长代谢,因此预处理后物料的脱毒是生物炼制工艺的重要环节。大多数的预处理过程是在高温高压下进行的,不可避免地会产生各种不良的有毒化合物,这可能会抑制后续的微生物发酵过程。预处理产生的主要抑制物包括酚类化合物,呋喃衍生物和有机弱酸等,形成机制如图 1.2 所示^{[26][28]}。预处理过程产生的各类抑制物成分的比例因木质纤维素生物质原料的种类,来源的不同和预处理强度大小有所差异。据目前的研究显示,抑制物作用机理主要是影响发酵微生物细胞的细胞膜完整性,转运蛋白的功能和碳代谢途径关键酶的活性等^{[29][31]}。为了保障良好的微生物生长环境,进行以去除木质纤维素来源抑制物为目的的脱毒过程是有必要的^{[32][33]}。由于常规脱毒方法存在时间长和成本高等缺陷,生物法成为了研究的热点^[34]。本实验室发现一株可以在经过干式稀酸预处理高固含量物料中生长代谢的树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1^[25],其优先利用预处理后物料中的呋喃醛类和有机酸类抑制物,后利用的葡萄糖和木糖等可发酵碳源物质,这种优异的代谢顺序为去除木质纤维素来源抑制物而保留大量的糖类物质提供可能^{[35][36]}。*A. resinae* ZN1 实现了在通气条件下进行固态固态脱毒并且无废水产生,具有脱毒周期短和脱毒完全等特点。

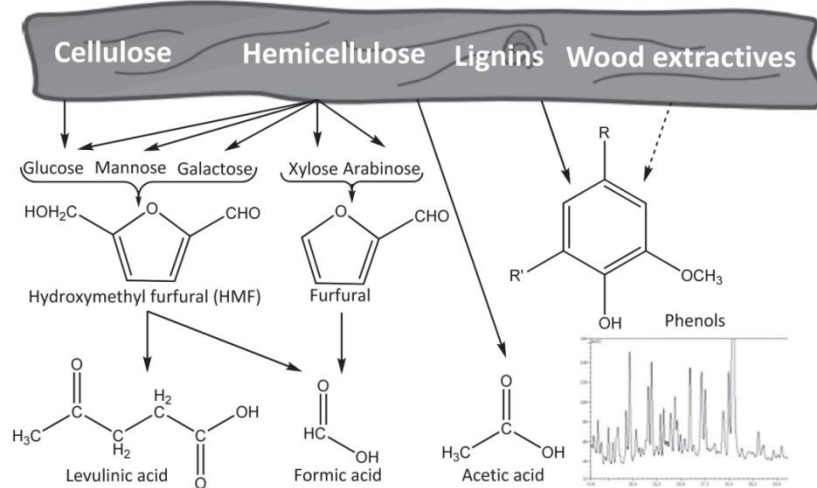


图 1.2 木质纤维素组分及主要抑制物来源^[28]

Fig 1.2 composition of lignocellulosic biomass and main derived hydrolysis products

生物转化而言，工业生产的可行性和经济效率将是至关重要的问题，用于木质纤维素水解的酶或生物催化剂的成本和效率受到极大关注。纤维素和半纤维素并不能直接被微生物利用，还需要进行下一步的反应将其转化成可供微生物发酵的碳源物质^[37]。纤维素酶作为生物催化剂进行糖化和发酵。纤维素酶促糖化替代传统化学处理，水解得到对应的单糖，被广泛应用于生物炼制过程^[38]。SHF（分步糖化与发酵）是指酶水解反应和微生物发酵分开，可以根据木质纤维素生物转化的需求结合^[39]。SSF（同时糖化与发酵）指酶水解反应和微生物发酵同时进行^{[40][41]}。SSF 在时间成本、反应器设备和污染风险方面具有优势。SSCF 是指同步糖化共发酵戊糖和己糖，在 SSF 的基础上改进的一种有效方法，极大提高可发酵糖的转化得率。目前木质纤维素来源的多种发酵糖类物质已经被应用于生产高附加值的生物基化学品和能源产品。Liu 等^[42]利用高固含量的玉米秸秆（30%（w/w）），在低纤维素酶用量下进行同步糖化共发酵，实现了较高的乙醇得率（84.7%）和木糖转化率（87.7%），乙醇浓度达到 85.1 g/L，35%（w/w）固含量麦秆发酵得到 101.1 g/L 乙醇浓度。Wen 等^[43]对 *C.glutamicum* 菌株进行多种代谢工程改造，通过玉米秸秆水解液分批发酵的方式，谷氨酸生产浓度达到 65.2g/L。Hou 等^{[44][45]}考察了高固含量木质纤维素的好氧发酵性能，实现了高指标的糖酸和柠檬酸生产水平，分别为 180 g/L 和 136 g/L。Qiu 等^[46]通过代谢工程将对 *P.acidilactici* ZP26 进行异源木糖代谢路径构建，使其可利用木质纤维素全糖进行共发酵，进行了高固含量脱毒小麦秸秆 SSCF，实现 127.1 g/L D-乳酸超高浓度。

1.3.2 微生物油脂

微生物油脂（单细胞油）主要成分为甘油三酯（TAG），是微生物利用碳源物质合成并在细胞内储存的一种能量物质^{[47][48]}。微生物油脂起源可以追溯到 1985 年，卷枝毛霉（*Mucor circinelloides*）在发酵过程中的积累高附加值多不饱

和脂肪酸 γ -亚麻酸 (GLA)，成为首次商业化生产的微生物油脂^[49]。由微生物发酵生产，已经被证明其使用安全性和经济可行性。微生物油脂脂肪酸组成因发酵微生物种类和碳源物质的不同而有所差异，适合于作为不同工业应用的替代原材，单细胞油的预期用途决定了提取策略高度。

微生物利用废弃油和农业废物物生产的微生物油脂，与植物种子油(大豆油，菜籽油，棕榈油，葵花籽油)组成相似，适用于作为底物合成生物柴油^{[50][51]}。为了减轻对原料(植物油或动物脂肪)可用性的严重依赖，利用微生物油脂生产的生物柴油是化石柴油的有效替代品之一。

1.3.3 产油微生物

在细胞内积累的油脂占细胞生物量的 20% 以上的微生物，被称为产油微生物^[48]。产油微生物来源广泛，主要包括酵母菌、微藻、细菌和霉菌^{[52][53]}。微生物生产油脂具有不受天气影响，不需要耕地，生命周期较短且能够利用有机废物作为碳源等优势。

(1) 微藻

微藻的含油率普遍为 30%，其利用光能，CO₂ 与水产生化学能并在叶绿体中合成蛋白质，脂质和碳水化合物^[54]。微藻主要生产二十碳五烯酸 (EPA)， ω -3 长链多不饱和脂肪酸等高价值产物。*Schizochytrium*、*Chlorella*、*Spirulina* 等微藻能积累高浓度的油脂，油脂占其干重能达到 80%。

微藻种类繁多，光合作用效率高。微藻生产油脂存在局限性：需要持续的阳光供给；培养面积需求大且周期长；细胞密度低；微藻的回收成本高等。油脂主要在光下合成，积累在胞质脂质体中，然而在不存在光的情况下重新用于极性脂质合成，很容易地被分解代谢以提供代谢能量^{[55][56]}。开放式培养微藻受天气制约，容易被污染且细胞密度低。封闭式光反应器培养成本和能量消耗比较高，目前尚未得到有效的解决，阻碍了微藻油脂工业化生产^[57]。

(2) 细菌

Rhodococcus opacus、*Bacillus subtilis*、*Acinetobacter baylyi* 等细菌都能够积累油脂^[58]。细菌能够利用多种碳源(糖，有机酸，醇，烷烃)进行生物合成。产油细菌主要应用于对含碳氢化合物的废水进行生物处理过程^[59]。通常产油细菌主要积累聚羟基链烷酸聚等特殊脂质。少数产油细菌能够积累甘油三酯，其底物转化率和油脂产量低，因此不是合成生物柴油底物的最佳产油微生物^[60]。虽然细菌生长繁殖速度快，脂肪酸主要以游离酸形式存在，有限的细胞体积和低生物量限制了油脂的生产^{[61][62]}。

(3) 霉菌

典型的几种产油霉菌：*Aspergillus terreus*，*Mucor circinelloides*，*Tolyposporium ehrenbergii*，*Mortierella alpina* 和 *Mortierella isabellina*^{[63][66]}。但大多数霉菌主要

用于生产多不饱和脂肪酸如 γ -亚麻酸 (GLA)、花生四烯酸 (ARA) 和二十二碳六稀酸 (DHA) 等在营养医学中具有很高价值的人体必须脂肪酸^[67]。据报道, *Mortierella isabellina* 能够利用廉价工业废料作为生物柴油底物的潜力, 可以在木质纤维素糖上生长并生产高达 60% 的油脂含量。

霉菌作为丝状真菌, 发酵过程中的宏观形态与油脂合成直接相关, 形态和溶氧水平的调节成为研究难点。菌丝态细胞对剪切力比较敏感, 菌丝态生长引起发酵液的粘度过高, 阻碍氧气和营养物质的传递。霉菌油脂发酵过程需要较高的调控水平, 大规模工业化生产存在一定的局限性

(4) 酵母

一些酵母具有优异的脂质积累能力, 油脂积累可能达到其生物量的 70% 以上, 并且对各种底物具有广泛的适应性。目前研究常见的油脂酵母包括: *Trichosporon cutaneum*、*Trichosporon pullulans*、*Rhodotorula glutinis*、*Lipomyces starkeyi*、*Yarrowia lipolytica* 和 *Rhodosporidium toruloides* 等^{[68][70]}。酵母油脂作为第二代生物柴油的原料方面, 过去的十年中进行了重大的研究和开发。酵母生产的三酰基甘油主要包括硬脂酸, 油酸, 亚油酸, 棕榈酸和棕榈油酸等组分, 适用于生产生物柴油。大多数油脂酵母在油脂小体的专门区域中积累甘油三酯。油脂小体由磷脂包裹, 其中嵌入了许多功能性的蛋白质^[71]。

油脂酵母具有优异的底物消耗能力, 易于培养和放大, 油脂产量稳定等优点。由于发酵培养基成本, 油脂性酵母重要优势在于能够代谢多种碳源化合物, 有效地降低了总生产成本。*Y. lipolytica* 作为油脂酵母的模型和用于代谢工程的宿主^[72]。Xu 等^[73]将酿酒酵母来源肉碱酰基转移酶在 *Y. lipolytica* 工程菌株中异源表达, 引起油脂的大量积累, 生物反应器发酵产生 66.4 g/L 油脂。

大多数油脂酵母不能有效地代谢戊糖用于油脂的生产, 且对木质纤维素生物质来源抑制剂的耐受性较低^{[74][75]}。产油微生物能够耐受抑制物, 利用木质素单体, 同时转化戊糖和己糖的能力, 对生产生物燃料具有不可估量的价值。

1.3.4 油脂酵母的筛选

筛选出高效生产油脂且脂肪酸组成理想的最佳油脂酵母, 是利用酵母生产生物柴油底物从而实现替代石化燃料的重要一步。油脂作为无色胞内产物, 发酵培养和筛选过程中难以定性和定量, 提取过程操作复杂, 效率较低。目前主要采用以下方法筛选油脂酵母:

(1) 根据对油脂酵母的应用需求, 设计特定的发酵培养基中进行特异性筛选。为了将低成本木质纤维素原料中的混合糖快速转化为经济效益高的脂质, 微生物需要对来源抑制物有一定耐受能力, 在葡萄糖消耗完之后有效利用戊糖 (木糖和阿拉伯糖), Slininger 等^[76]将木质纤维素的水解产物用作筛选介质得到油脂产量最高的菌株。氨纤维爆破预处理秸秆物料产生的抑制物比较少, 且氨可作为

额外的氮源供微生物生长，所以作为第一次筛选的介质，酸预处理的柳枝稷水解液作为第二次筛选的介质，在改造后微型反应器 96 孔板上最终从 32 株产油酵母中得到发酵性能优异的 3 株产油微生物。此方法存在一定限制性，不能保证充足的溶氧，对大量的油脂含量测定也会降低筛选的效率。

(2) 利用荧光法筛选油脂酵母：尼罗红属于亲脂性荧光染料，在特定波长下的荧光强度能反应细胞内油脂含量。荧光法技术快速，简便且环境友好。Ayadi^[77]等直接从选定的微生境中（土壤，奶酪乳制品，废水，果渣）分离出酵母菌落技术，分离出 205 株菌。初步筛选后的目的菌株在氮源限制的培养基中培养，经过尼罗红荧光染色后，定性分析对油脂含浓度。相比阳性对照菌株的荧光强度，一株 *Y. lipolytica* 油脂含量达到 64%，脂肪酶活力为 35 U/mL，表明基于荧光技术分离油性酵母的可行性。基于尼罗红荧光分光光度法原理，酵母细胞在培养基中发酵结束后，基于微孔板的高通量荧光法，用于快速筛选产油菌株以生产油脂。

(3) 通过活细胞荧光显微镜成像技术检测，测定脂质体尺寸和数量，能实时对细胞内三酰基甘油定性和定量。油脂的粗提取操作复杂，同时由于存在高度不饱和脂肪酸，通过常规方法从粗提油脂分离出三酰基甘油酯会严重影响其氧化稳定性。尼罗红荧光法测定细胞壁厚的油脂酵母具有一定难度，细胞壁阻止荧光染料的渗透，且光稳定性差。Patel 等^{[78][79]}提出了一种新颖，简单和快速的方法。LipidTOX™ Green 是一种亲脂性的绿色荧光染料，能特异性结合脂质体中的三酰基甘油酯，并具有良好的荧光特性。将从土壤样品中分离出的新菌株在装有 100 μl 的特异性培养基在微量滴定板中培养酵母，进行的活细胞荧光显微镜成像技术检测，实现单个细胞水平上油脂的积累过程的可视化。筛选得到到 *R. kratochvilovae* 菌株积累了最高的脂质含量，高达 59.69%。

1.3.5 高产油脂皮状丝孢酵母超离心筛选

Trichosporon cutaneum 是具有二态性的油脂酵母，Wang 等对 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行基因测序，发现其含有许多呋喃醛和酚醛代谢相关基因，推测出抑制物的降解途径^[80]。Hu^[81]利用木质素单体为唯一碳源进行 *T. cutaneum* ACCC 20271 油脂生产，发现其能够利用 4-羟基苯甲醛为唯一碳源积少量的油脂。研究表明 *T. cutaneum* ACCC 20271 是一株对木质纤维素来源的抑制物具有高耐受性，且对不同来源的发酵底物具有广泛适应性的油脂酵母，适用于木质纤维素油脂的生产。

T. cutaneum ACCC 20271 利用木质纤维素生产微生物油脂过程中，只能消耗较少的葡萄糖，其余多种可发酵单糖（木糖，阿拉伯糖和甘露糖等）不能被完全生物转化，含油率较低。为了提高 *T. cutaneum* ACCC 20271 油脂的积累能力实现木质纤维素的全糖利用，本实验室改进一种筛选油脂酵母的方法：超速离心筛选

[82][83]。 *T. cutaneum* ACCC 20271 在 15%脱毒玉米秸秆水解液中油脂发酵，进行适应性进化高速离心筛选。胞内油脂通常密度低于水，因此发酵 72 h 结束后高油脂含量的酵母细胞与低含油细胞形成密度差异。首先通过离心力（1000 xg）作用使较重的细胞以更快的速度沉于离心管底部，小部分油脂含量较高的轻细胞沉降较慢，甚至漂浮在液体的上方，从而实现轻重细胞的分离。每次离心后取较轻的细胞作为下一次培养的种子进行适应性进化培养，根据油脂积累能力的提高增加离心力，不断富集得到较轻即油脂合成能力更强的突变菌株。经过 70 次的离心筛选，细胞含油率由 29%提高至 55%，将筛选得到的油脂生产能力大幅度加强的菌株命名为 *T. cutaneum* MS 28。这种方法具有操作简单，高效和针对性强等特点，最重要是实现油脂酵母的高通量筛选。超速离心筛选与传统的筛选方法相比具有广泛适用性，在微生物的筛选方面具有推广意义。

为了验证超速离心筛选油脂酵母的可行性和广泛适用性，本研究在不同的发酵培养体系中进行离心筛选。除此之外，离心力提高到离心机极限，通过添加离心介质降低油脂发酵液的密度使油脂积累能力优异的轻细胞被更彻底地分离出来，得到不同的高产油脂 *T. cutaneum*，成为油脂生产工业化菌株的最佳候选者。

1.4 油脂合成代谢途径

微生物积累的油脂主要是三酰基甘油，作为合成基于单细胞油生物燃料的原料^[59]。以油脂酵母为例，氮匮乏的环境会降低胞内 AMP 浓度，进而降低了异柠檬酸脱氢酶的活性^{[84][85]}。随后，乌头酸酶催化异柠檬酸与柠檬酸达到平衡，并通过三羧酸载体将积累的柠檬酸转移至细胞质并经裂解酶（ACL）裂解，最终得到草酰乙酸和乙酰辅酶 A。而草酰乙酸经苹果酸脱氢酶和苹果酸酶的催化变成丙酮酸，同时合成了 NADPH。乙酰辅酶 A 则经乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）转化为丙二酰辅酶 A 参与脂肪酸（FA）合成。脂肪酸主要通过脂肪酸合成酶（FAS）和二碳单位实现碳链延长^[86]。首先乙酰-ACP 与丙二酰-ACP 发生缩合反应，经还原和脱水得到丁酰-ACP，在此基础上重复与丙二酰-ACP 进行缩合形成碳链延长循环。合成脂肪酸骨架中通常包含 14-16 个碳原子，需要内质网膜上延长酶或去饱和酶的参与才能得到不同类型的脂肪酸长链。在胞内甘油-3-磷酸与脂肪酸结合，经甘油-3-磷酸酰基转移酶（GAT1）和磷脂酸磷酸酶（LPIN）作用得到甘油二酯，最后由甘油二酯酰基转移酶（DGA1 和 LRO1）催化合成甘油三酯，产物以脂质体形式储存在胞内^[87]。

三酰基甘油的生产需要大量的 NADPH，其中每个脂肪酸延长步骤中有两分子 NADPH 被氧化为 NADP⁺，每个脂肪酸去饱和反应消耗一分子 NADPH。在油脂酵母当中，细胞质的 NADPH 的产生主要有三个来源：三羧酸循环过程柠檬酸经异柠檬酸转化为 α -酮戊二酸时产生 NADPH；苹果酸转化为丙酮酸时产生

NADPH；戊糖磷酸途径中的葡萄糖-6-磷酸氧化阶段和之后的非氧化阶段生成的NADPH^[88]。据报道油质微生物中脂质积累的程度与苹果酸脱氢酶的活性密切相关，通过过表达编码三酰甘油合成酶的基因和抑制 β -氧化下调脂肪酸的分解代谢来改造具有增强的脂质积累的 *Yarrowia lipolytica*。

1.5 酵母的细胞壁和细胞形态

1.5.1 酵母细胞壁组成与修饰

酵母细胞壁非常坚硬，有助于维持细胞形态和抵抗外界物理化学环境压力。酵母细胞壁通常由 D-葡聚糖，甘露糖，蛋白质和几丁质组成，如图 3 所示^[89]。葡聚糖的作用是赋予细胞弹性，通过拉伸以维持细胞形状。 β (1, 3) -D-葡聚糖-几丁质复合物为细胞内壁的重要组成部分，构成了纤维结构支架。细胞外壁的甘露糖蛋白交联物可以通过改变细胞孔隙率，从而调节细胞通透性的功能。细胞内壁与细胞壁通过 β (1, 6) -D-葡聚糖相连。几丁质有助于增强细胞壁的拉伸强度。D-葡聚糖，甘露糖蛋白和几丁质通过共价键合，缠绕在一起，有助于细胞壁模块化结构^{[90][91]}。

油脂酵母与酿酒酵母细胞壁结构组成相比，其几丁质和单糖含量有明显差异相关报道比较少。*Y. lipolytica* 是一种二态性的微生物，在酵母形态的细胞壁中发现了高含量的几丁质，这很可能与 *Y. lipolytica* 对细胞破裂的抗性有关。据文献报道，*T. cutaneum* 细胞壁的组成与酿酒酵母明显不同，但与丝状真菌的细胞壁有一些相似性，细胞壁更加复杂，如表 1.1 所示。

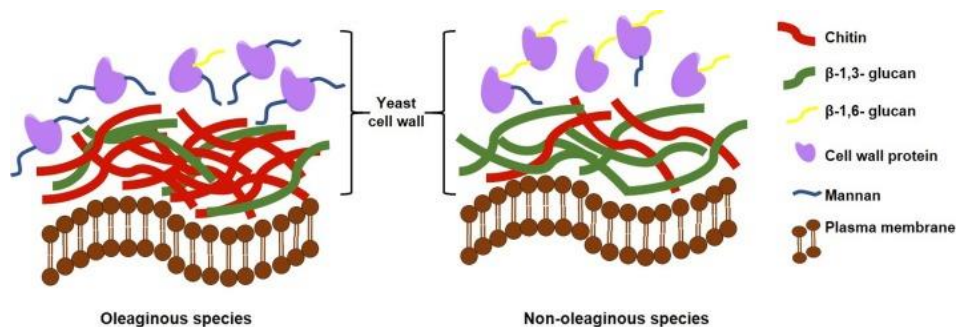


图 1.3 油脂酵母和非油脂酵母细胞壁结构比较^[89]

Fig 3.3 Comparison of cell wall structure between oleaginous yeast and non-oleaginous yeast

根据报道，粘红酵母和圆红冬孢酵母主要生产类胡萝卜素，对葡聚糖酶介导的细胞裂解不敏感，细胞壁中甘露聚糖/几丁质比值高有关^{[96][97]}。酵母细胞壁是高度动态的，会根据培养环境调节其组成。细胞壁组分受碳源类型，氮限制，pH，温度，通气速率及培养方式的影响^[98]。氮限制对酵母中油脂的积累有着密切的关系，主要是代谢通量的变化导致细胞停止生长并触发油脂的积累，所以分析产油酵母细胞生长和油脂积累的时期的细胞壁组分的变化变得非常有意义^[99]。

表 1.1 *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* 和 *T. cutaneum* 细胞壁组成Tab 1.1 Cell wall composition of *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* and *T. cutaneum*

组分/占细胞壁质量%	酿酒酵母 ^[92]	解脂耶氏酵母 ^[93]	皮状丝孢酵母 ^[94]
蛋白质	13.5	15	11
中性碳水化合物（多糖）	85	70	63
葡萄糖胺（几丁质）	3.36	7	9
碱溶性物质	33.5	38.8	34
碱不溶物质	37.3	61.2	44
单糖（葡萄糖+甘露糖）	80-90 + 10-20	60 + 40	32 + 6

1.5.2 酵母细胞形态

酵母以出芽方式繁殖。母体细胞成熟后通过单边或者多边途径萌发芽体，芽细胞伸长至某种程度，脱离形成新的个体。未脱落的子细胞也能够产生新芽体，形成长细胞链或分枝。酵母有性繁殖通过细胞间相互接触和融合，产生的双倍体细胞核经减数分裂得到 4-8 个单倍体细胞（子囊孢子）。酵母细胞中，细胞核需要细胞质来实现复制所需的基本功能，导致酵母在 G2 期（DNA 合成后期）呈现出多种基本形态（图 1.3）^[100]。第一种形态型是菌丝态合胞体，合胞体是指为一个包含许多核的细胞，第二种形态是典型的酿酒酵母椭圆形或球形单细胞形态，单核细胞通过出芽分裂进行繁殖。第三种形态是细胞交配后形成的子囊孢子。

酵母形式单细胞到菌丝态，酵母可能呈现出不同大小和形状，与培养过程中的物理化学性质（包括 pH，温度和溶解氧浓度），外压（压力和搅拌）或营养条件（碳和氮源质以及金属离子的浓度）等因素有关^{[101][102]}。Andreishcheva 等^[103]研究解脂耶氏酵母对高盐度（9%NaCl, 1.5 M）的适应培养中，伴随着细胞形状和大小的快速变化，细胞逐渐变得越来越圆并且尺寸减小，平衡外部环境中升高的渗透压。在分批补料生物反应器中增加的空气和氧气压力，影响局部溶解氧的张力从而抑制酿酒酵母细胞的代谢活性，导致细胞尺寸变小和老化细胞数量增加。Wang 等^[104]考察了在摇瓶培养中添加不同含量酵母提取物调节可同化氮，导致皮状丝孢酵母由椭圆形态与细长菌丝形态之间转变，影响了发酵液的流变学、传质性能及油脂积累性能，研究发现椭圆形态则更为适宜用于高含量油脂的生产，作为生物柴油生产的原料。

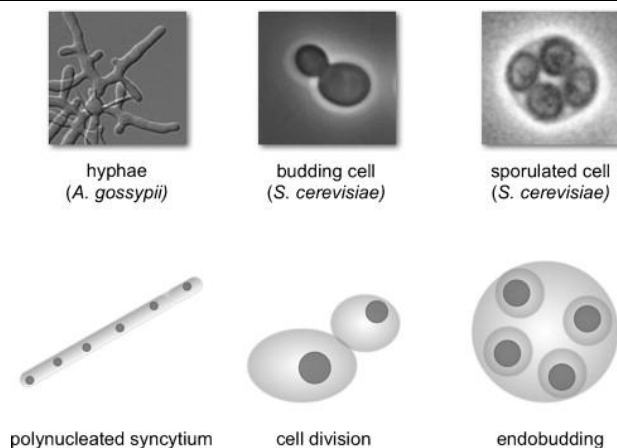
图 1.4 酵母基本细胞形态类型^[100]

Fig 1.4 Basic cell morphology of yeast

解脂耶氏酵母被用作酵母中二态性研究的模型系统,在生物技术应用方面具有重要性。在二态转换期间通常会出现几种中间形态,引起流变学变化,热量和传质速率,导致发酵性能的改变。因此,优化生物过程中形态观察对监测和控制至关重要。目前从遗传操作而产生的形态学转变(特别是油脂生物合成)没有得到解决。

1.6 研究意义

为了满足不断增长的能源需求,降低对石化能源的依赖性及缓解过度使用化石能源导致环境恶化的压力,全世界对基于生物质的可持续液体燃料的开发和利用产生极大的兴趣。通过油脂酵母实现油脂生产的可持续和经济性可行性,需要大量廉价的生长底物。木质纤维素生物质是最丰富的天然聚合物,木质纤维素来源戊糖和己糖同时利用的油脂发酵过程具有极大的吸引力。木质纤维素油脂生产的三个关键步骤是发酵培养基制备,发酵过程和下游加工,发酵菌株的油脂积累性能直接影响油脂的产量,因此筛选出高产油脂酵母是实现木质纤维素全糖利用的重要一步。油脂储存在胞内难以直接标记和测定,如何能快速高通量筛选出油脂酵母是研究的热点之一。

Trichosporon cutaneum 具有二态性,是能够耐受木质纤维素来源抑制物的油脂酵母。*T. cutaneum* ACCC 20271 利用木质纤维素生产微生物油脂过程中,只能消耗较少的葡萄糖,其余多种可发酵单糖(木糖,阿拉伯糖和甘露糖等)不能被完全生物转化,含油率较低。本实验室基于胞内油脂密度差异影响细胞的漂浮特性原理,提出了特异性分离轻细胞的超离心筛选法。在玉米秸秆水解液中进行 *T. cutaneum* ACCC 20271 适应性进化离心筛选,在逐代转接过程中增加离心力,富集得到超强油脂积累菌株 *T. cutaneum* MS 28。为了验证离心筛选的普适性,本研究将筛选培养基换成氮限制的合成培养基,提高至 2 倍筛选离心力达到离心机极限和添加无菌超纯水作为离心介质降低离心过程的发酵液密度以实现轻重细胞

的彻底分离，仍然能够更高效地筛选出油脂积累性能优异的突变菌。超离心筛选得到的突变菌株均能实现木质纤维素全糖利用，具有广阔的价值和意义。

通过细胞形态观察发现 2 株超速离心筛选酵母与原始菌株存在明显的差异：细胞尺寸显著增大，生长繁殖过程中母细胞呈多边出芽，油脂积累的空间得到提升。酵母从单细胞椭圆形态胞到菌丝态之间的转变，呈现出不同大小和形状，与培养过程中的 pH，温度、溶解氧浓度，压力或营养条件等因素有关。细胞壁有助于维持细胞形态和抵抗外界物理化学环境压力，透射电子显微镜观察发现筛选菌细胞壁比原始菌株薄得多，从指数期到稳定期细胞壁呈变厚趋势。通过测定甘油三酯合成过程的重要前体物质的供给能力，结合对油脂合成和细胞壁合成分解相关基因转录水平分析，探究细胞壁组分对油脂酵母细胞形态的变化和油脂积累过程的影响，深入地对离心筛选高产油酵母机制进行探讨，对产油菌株的开发和提高油脂生产浓度具有重要的借鉴意义。

第 2 章 超速离心筛选皮状丝孢酵母的木质纤维素油脂发酵研究

2.1 引言

随着石油和煤炭等化石燃料的枯竭以及气候问题的日益突出,生产清洁可再生能源已成为研究的热点。用油脂微生物将木质纤维素来源的可发酵糖转化为微生物油脂,是保障生物柴油的油脂原料可持续供应的可靠方法,有助于农业废弃物可持续利用和提高商业化生产生物柴油替代化石燃料的经济可行性。预处理过程木质纤维素原料降解产生的抑制物不利于微生物生长代谢,*T. cutaneum* 是一类对不同来源的发酵底物具有广泛适用性的典型油脂酵母,能够降解和部分转化抑制物,具有生产木质纤维素油脂的潜能。

筛选出油脂积累能力较强的理想油脂酵母是实现木质纤维素全糖转化的重要一步。据文献报道油脂作为能量物质储存在胞内,高油脂含量酵母 *Y. lipolytica* 经过离心之后,不会沉降到底部,反而会漂浮在发酵液上层。本实验室 Hu 等提出一种新的高通量油脂酵母筛选方法:超速离心筛选法。*T. cutaneum* ACCC 20271 在玉米秸秆水解液进行发酵生产胞内油脂,油脂积累能力不同的细胞之间产生密度差异。将发酵液在一定离心力下进行离心,少量油脂含量高的较轻细胞和大量含量低的重细胞得到有效地分离,选取离心后的上层液体作为种子接种到新鲜的培养基继续驯化培养,通过不断淘汰重细胞,富集得到油脂发酵性能优异的菌株 *T. cutaneum* MS 28。此筛选方法克服了传统筛选方法操作复杂,试剂和设备成本高等困难,筛选过程操作方便且具有针对性,实现高油脂含量酵母的高通量筛选。

本研究为了验证超速离心筛选油脂酵母的可行性和广泛适用性,以 *T. cutaneum* ACCC 20271 为出发菌株,设计了不含毒性的氮限制合成培养基作为离心筛选的发酵培养体系,摇瓶发酵时间延长至 120 h,同时将离心力提高至离心机极限 43000 $\times g$,并添加离心介质降低油脂发酵液的密度,更彻底地分离出油脂生产能力突出的 *T. cutaneum* MP 11。比较 2 株高产油脂酵母 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 与出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 的发酵性能,进行 15%固含量玉米粉分步糖化发酵与 30%固含量脱毒麦秆同步糖化共发酵生产油脂。

2.2 实验材料与方法

2.2.1 原料

小麦秸秆产自山东滨州(2018 年夏季收获)。水洗麦秆,除去一些杂质后,常温晾晒后收集。通过孔径为 10 mm 的锤式粉碎机对麦秆进行粉碎,然后将物料分装在普通的密闭塑料袋,进行常温储存。通过两步酸解法测定麦秆纤维素与半纤维素含量。

2.2.2 酶试剂

纤维素酶 Cellic CTec 2 来自 Novozymes(中国)生物技术有限公司。分别根据依据 NREL、Ghose 和 Bradford 方法测定滤纸酶活为 203.2 FPU/mL, 纤维二糖酶活为 4900 CBU/mL, Cellic CTec 2 的蛋白浓度为 87.3 mg/mL。

2.2.3 菌株和培养基

油脂发酵菌株: 皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* ACCC 20271 为原始菌株, 购自中国农业微生物菌株保藏管理中心。

高产油脂超离心筛选酵母: 皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11。*T. cutaneum* MS 28 为本实验室胡明珊同学在 15%玉米秸秆水解液中适应性驯化离心筛选获得的油脂积累能力增强的菌株。*T. cutaneum* MP 11 为本研究在普通合成培养基发酵中离心筛选获得的超油脂生产菌株。

脱毒菌株: *Amorphotheca resinae* ZN1 为筛选获得的一株优异的生物脱毒霉菌, 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心保藏, 编号为 CGMCC 7452。

种子培养基: YPD 培养基, 培养基成分为 Glucose 20 g/L, Yeast Extracts 10 g/L, Peptone 20 g/L, Agar 20 g/L。

油脂酵母 *T. cutaneum* 筛选培养基: 合成培养基, Glucose 60 g/L, Yeast Extracts 1.0 g/L, KH_2PO_4 2.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.44 g/L。

2.3.4 种子培养

从-80 °C 菌种保藏冰箱中拿出保种管, 待菌液融化后划线接种于 YPD 固体培养基。30°C 培养大约 30 h, 挑取单菌落于 20 mL YPD 培养基中活化 24 h。然后接种于 50 mL YPD 培养基, 活化 24 h 得到二级种子。摇床培养参数: 30 °C, 180 rpm。接种量: 10%。

2.3.5 麦秆预处理和生物脱毒

将水洗粉碎后的小麦秸秆与 7.6% (w/w) 稀酸以 2:1 (w/w) 的比例加入到 20 L 预处理反应器中, 在 50 rpm 条件下搅拌 3 min, 充分混合。产生的蒸汽使温度达到 175 °C 时, 在 50 rpm 转速条件下维持 5 min。得到麦秆物料含水量在大约 50%, 整个过程无废水产生。

预处理后麦秆物料首先要经过 PSB-80JX 碟式磨浆机粉碎处理, 磨浆的目的是去除一些超长的纤维, 然后向预处理的小麦秸秆加入 20% (w/v) 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 充分搅拌, 调节 pH 至 5.0~5.5, 适于生物脱毒菌的生长。将树脂枝孢霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 孢子的斜面加入到预处理后的物料中, 28 °C 静态培养 4-5 天后, 作为脱毒种子。将脱毒种子以 10% 接种量接入含有新鲜预处理后麦秆物料的 15 L 生物反应器中, 通气量为 0.8 vvm, 脱毒 36 h 左右, 直至完全去除麦秆物料的 5-羟甲基糠醛和糠醛。脱毒后的物料置于-20°C 冰箱保藏。

2.3.6 麦秆水解液和玉米粉水解液制备

经过预处理和生物脱毒后, 制备 15% 固含量的水解液。然后按照 6 mg 纤维素蛋白/g 麦秆干固体添加纤维素酶, 50 °C 下糖化, 控制 pH 为 4.8, 搅拌转速为 150 rpm, 糖化

时间为 48h。糖化水解结束后进行离心。上层澄清液进行 115 °C, 20 min 灭菌后, 在超净工作台过滤以进一步去除木质素残渣, 制备得到 15% 麦秆水解液。

玉米粉和去离子水经 115 °C 灭菌 20 min, 加入淀粉酶在恒温水浴摇床 90 °C, 50 rpm 糊化 2 h, 淀粉酶用量为 22 wu/gDM (Dry Material, 玉米粉干物料)。至玉米粉糊化后, 加入糖化酶 (10 wu/gDM) 在 50 °C 条件下进行糖化反应 5 h。糖化完全后离心 (10000 rpm, 10 min), 去掉不溶性残渣。将分离得到的糖化液进行 115 °C 灭菌 20 min, 过滤制备得到 20% 固含量玉米粉水解液。

2.3.7 油脂发酵

分步糖化与发酵 (SSF): 在 3 L 发酵罐上进行 15% 玉米粉水解液 *T. cutaneum* 油脂发酵。10% 种子液接种至含玉米粉水解糖培养基的 3 L 发酵罐中。营养盐浓度为: 1.0 g/L KH_2PO_4 、0.5 g/L YE、0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 0.22 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。发酵参数: 30 °C, 600 rpm, 通气量为 1 vvm, 添加 6 M HCl 溶液控制 pH 值为 5.0, 120 h。添加少量的消泡剂防止冲罐。

同步糖化与共发酵 (SSCF): 在 3 L 发酵罐上进行 30% 固含量麦秆 *T. cutaneum* 油脂发酵。首先在配置有特殊螺带式桨叶的 5 L 发酵罐上进行 30% 固含量小麦秸秆预糖化, 以 6 mg 纤维素蛋白/g 麦秆干固体添加纤维素酶, 50 °C 糖化, 150 rpm, 控制 pH 为 4.8, 预糖化时间为 12 h。将经过预糖化的 30% 固含量小麦秸秆糖化液转移至 3 L 发酵罐, 营养盐和发酵参数参考 SSF 过程。

2.3.8 长发酵周期适应性驯化超速离心筛选

以 *T. cutaneum* ACCC 20271 为出发菌株, 在合成培养基中进行长发酵周期的离心筛选。将 5 mL 培养的活化菌液接入含有 50 mL 新鲜合成培养基中, 180 rpm, 30 °C, 120 h 培养后, 将 25 mL 培养结束的发酵液收集至 50 mL 无菌离心管。发酵液经离心力作用, 5 mL 上层的菌液转接到含有 50 mL 新鲜合成培养基, 进行油脂发酵。重复以上步骤。

从低离心力 1000 xg 开始转接培养, 测定每次发酵的葡萄糖消耗量, 菌液 OD_{600} 和油脂浓度, 不断提高离心力进行离心转接。将离心力提高至 1000 xg, 离心 2 min。转接培养第 11 次, 细胞含油率有明显的提高。维持此 1000 xg 离心力进行离心筛选, 油脂积累得到大幅度增强后, 提高至离心机最高离心力 43000 xg, 离心 2 min。发酵液经离心后表面漂浮大量的细胞, 需要添加一定量无菌超纯水, 降低发酵液的粘度, 使优势菌株不断富集在液体上方, 劣势菌体沉淀在下方。

2.3.9 细胞干重及油脂测定

液体发酵: 取 25 mL 发酵液, 10000 rpm, 离心 5 min。去除上层液体, 用超纯水重悬细胞, 同样转速离心 5 min, 此步骤目的是去除可溶性杂质和营养物质。重悬细胞菌液全部转至干净且已知重量的平皿, 然后平皿置于 60 °C 的恒温干燥箱, 过夜烘干。称取含有干细胞物质 (DCW) 的平皿, 计算出干细胞重量并记录下来。将 6 mL HCl (4 mol/L) 溶液添加至烘干后含干细胞的平皿, 浸泡菌体 2 h 后, 浸泡后的细胞进行 100 °C

酸水解反应 10 min, 直至细胞完全裂解。置冰上冷却 10 min, 加入 20 mL 氯仿-甲醇(2:1, v/v) 溶液进行成分混合, 盖紧并用封口膜封紧, 然后放置于 30 °C 摇床中, 180 rpm, 萃取 1 h。离心 5 min, 油脂溶于下层的氯仿相。用注射器回收下层的氯仿相于已知重量 50 mL 的旋转蒸发瓶中, 用旋转蒸发仪在 80 °C 条件下从有机氯仿相中浓缩油脂, 将旋蒸瓶置于 60 °C 恒温培养箱烘干多余的水分, 称量并计算出油脂的重量。利用差重法计算油脂重量和细胞干重, 细胞含油率等于油脂重量除以细胞干重。

同步糖化与共发酵 (SSCF): 将 10 g 发酵液离心后 (10000 rpm, 10 min), 上层细胞 (包含可溶性木质素) 置于干净的平皿。60 °C 的恒温过夜烘干。可溶性木质素会对油脂的产生一些影响, 通过多次测定发酵 0 h 油脂产量消除误差。油脂的提取方法见上述步骤。

2.3.10 油脂组分测定

添加 5 mL 0.5 M KOH-甲醇溶液, 水浴摇床 50 °C, 2 h, 完全皂化。添加三氟化硼-甲醇 (4:10, v/v) 继续进行酯化反应。加入 4 mL 正己烷震荡后, 加入 2 mL 饱和 NaCl 溶液, 经离心得到脂肪酸甲酯。取上层溶液, 用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 测定脂肪酸组分。GC-MS 测定参数: 注射口温度为 280 °C, 进样量 0.4 μ L; 氦气作为载气, 流速为 1 mL/min; 色谱柱 Agilent 19091J-433(30 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m), 不分流进样; 火焰离子化检测器 (FID) 温度 120 °C; 升温程序: 80 °C 维持 3 min 后, 以 16 °C/min 的速率升温至 280 °C, 维持 8 min。分析系统为 NITS MS Search 2.0。

2.3.11 糖类和抑制物的高效液相色谱(HPLC)检测

主要检测两种典型的抑制物: 糠醛和 5-羟甲基糠醛。在摇床中浸提预处理后麦秆物料 2 h 后, 离心获得上层清液, 稀释后经过 0.22 μ m 滤膜过滤。检测器使用日本岛津公司 SPD-20A 型 UV/Vis 紫外检测器, 色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H 柱(Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 流动相为 5 M H₂SO₄, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 65 °C, 进样量 20 μ L。

检测木质纤维素来源葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖和甘露糖。发酵液经离心和 0.22 μ m 滤膜过滤 2 次。色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H 柱(Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 流动相为灭菌超纯水, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 80 °C, 进样量 20 μ L。

2.3.12 细胞密度计算

用安东帕公司的密度仪 DMA4500M (澳大利亚, 格拉茨) 测定发酵液密度。

2.3 结果和讨论

2.3.1 *T. cutaneum* 合成培养基长周期适应性进化及离心筛选

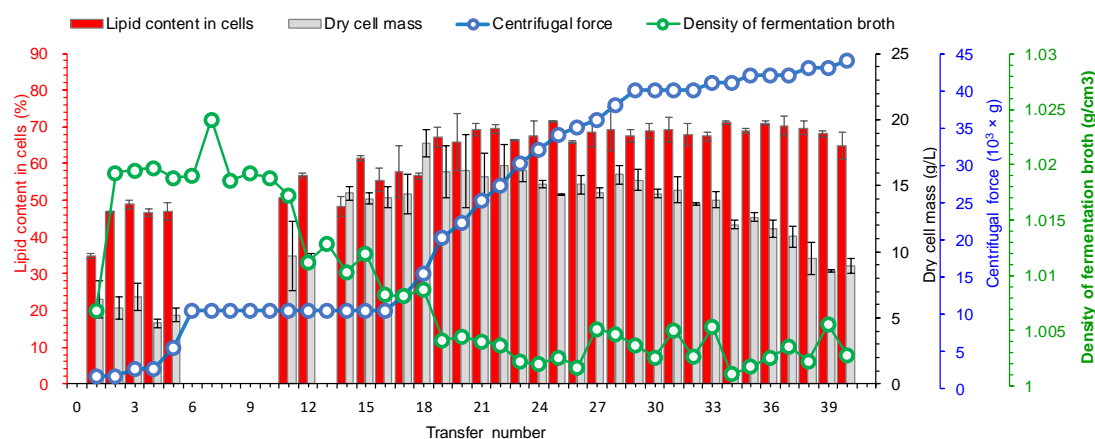


图 2.1 *T. cutaneum* 的适应性进化超离心筛选

Fig 2.1 Adaptive evolution and ultra-centrifugal screening of *T. cutaneum*

合成培养基: Glucose 60 g/L, Yeast Extracts 1.0 g/L, KH_2PO_4 2.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.44 g/L。培养条件: 30 °C, 10%接种量, 180 rpm, 120 h。(1) 低离心力筛选: 离心转接至第 21 次。筛选条件: 离心力 1000-25000 xg, 离心时间 2 min。(2) 高离心力低发酵液密度筛选条件: 离心力 25000-43000 xg, 3 min, 发酵液/无菌水: 2: 1~1:2。

初步筛选出符合培养体系的产油微生物之后, 找到合适的筛选方法进一步提高油脂发酵能力以及快速准确地分离出最佳菌株显得尤为重要。油脂以油脂小体形式存在于细胞内, 测定油脂含量的常规方法需要多步实验处理步骤。油脂发酵培养过程中, 有限氮耗竭引起的营养饥饿, 会引起过量的碳源转化为甘油三酯。胞内油脂含量的不同形成密度差异影响细胞的漂浮情况, 通过测定发酵液的密度可以观察油脂积累的变化。选择氮限制合成培养基作为发酵体系, 刺激油脂的合成, 取发酵 120 h 小时结束后的发酵液体进行离心, 筛选出较轻的细胞作为种子继续进行培养。此过程涉及三个筛选压力: 营养物质限制, 长达 120 h 培养可能引起的油脂降解和离心过程中细胞受到离心力的损伤。整个筛选过程可以分为两个阶段, 如图 2.1:

低离心力筛选阶段: *T. cutaneum* ACCC 20271 在合成培养基中培养, 由于营养元素的匮乏及离心转接的原因, 接种的细胞量变少导致离心转接前几次的生物量即细胞的干重较低。前期测定的含油率偏高且误差比较大, 用密度仪测定发酵液的密度更能反映油脂积累状态。提高离心转速, 第 11 次转接培养发酵液密度明显下降。此阶段细胞干重提高至 9.66 g/L, 含油率由 34%上升至 50.6%, 说明离心转接产生了良好的效果。保持离心力不变, 含油率开始稳定提高, 发酵液密度快速下降。

高离心力低发酵液密度筛选阶段: 这个阶段是离心力高速提升的阶段。上一阶段中最高含油率达到 68%, 将发酵液在 25000 xg 的离心作用下, 大部分细胞都漂浮起来, 甚至在液体表面, 此时增加离心力或延长离心时间, 都不能使所有的细胞沉降至底部。为

了降低离心介质的密度，发酵液与无菌超纯水以一定的比例混匀后离心，使较轻细胞进一步被淘汰出来，富集出油脂积累能力最突出的菌株。随着逐代转接，细胞含油率提升至 70% 左右。培养结束发酵液的密度接近 1，几乎等于水的密度，筛选得到高产油脂酵母 *T. cutaneum* MP 11 的细胞体积比出发菌株大几十倍。后期增加发酵液稀释倍数，提高离心力至离心机极限，突变菌株含油率基本不变，干细胞重量却下降了。分析其原因：（1）细胞体积变大后生长阶段需要更多的氮源合成蛋白质和遗传物质，导致细胞量降低；（2）43000 xg 离心过程会对细胞造成损伤；（3）重细胞最大程度离心沉降，意味着新一轮培养的种子量下降。

T. cutaneum ACCC 20271 正常转接培养 120 h 只能消耗少量的葡萄糖，筛选过程中发酵液的残糖降为 40 g/L，油脂浓度从 2.1 g/L 提高至 11.5 g/L。*T. cutaneum* ACCC 20271 在适应性驯化过程通过发生突变以响应生存环境的变化，离心筛选法能够特异性分离出油脂生产优异的菌株 *T. cutaneum* MP 11。结果显示超速离心筛选的方法具有广泛适应性和针对性，不局限于木质纤维素水解液培养体系。

2.3.2 *T. cutaneum* 筛选前后低密度轻细胞量观察和轻重细胞比例研究

T. cutaneum 在 15% 脱毒麦秆水解液摇床发酵 72 h，每 24 h 取样，离心后观察细胞量，如图 2.2。发酵前 24 h 是油脂合成的前期，主要是酵母的生长和繁殖阶段。*T. cutaneum* 利用氮源、碳源，甚至是胞内油脂等营养物质进行 DNA 的复制，蛋白质的合成和细胞的分裂进行增殖。此阶段细胞尺寸会变宽或者变长，胞内油脂含量较低导致胞内密度较大，在离心力的作用下很快沉降底部。当培养基中的有限氮源被快速消耗完（大约 24 h 后），腺苷一磷酸脱氨酶活性增加，合成大量的乙酰 CoA，快速进行脂肪酸和油脂的合成。油脂合成的中期 48 h，部分油脂生产能力较强的酵母细胞已经积累了甘油三酯，胞内的密度较 24 h 低，经离心后轻细胞漂浮在离心管液体上层。*T. cutaneum* ACCC 20271 发酵液离心后上层肉眼观察不到聚集。*T. cutaneum* MP 11 和 *T. cutaneum* MS 28 均部分漂起来，并且 *T. cutaneum* MP 11 明显更多。发酵后期 72 h，高产油脂的 *T. cutaneum* MP 11 几乎都漂浮在上方，只有少部分胞内比较空的重细胞和吸附了木质纤维素颗粒的细胞沉降下来，*T. cutaneum* ACCC 20271 发酵液观察不到漂浮细胞，说明油脂含量较低，达不到离心后具有漂浮特性的油脂密度。

油脂酵母在胞内积累油脂作为能量物质，在氮限制的条件下，能快速地将过量的碳源转化为油脂，为了进一步表征油脂含量与漂浮特性呈正比关系，定量表示培养过程中的油脂含量高的轻细胞和油脂含量低的重细胞的比例变化，本实验将 *T. cutaneum* 在氮含量更低的合成培养中进行培养，避免木质纤维素原料中杂质对测定产生的误差。*T. cutaneum* 快速生长的时期每隔 6 h 取 10 mL 发酵液，油脂合成时期每隔 12 h 取样 10 mL。将发酵液进行高速离心后，取上层漂浮液体 1 mL。将离心液和轻细胞去除后，加入 9 mL 水混匀重细胞。测定细胞密度 OD₆₀₀，比较轻重细胞生物量。

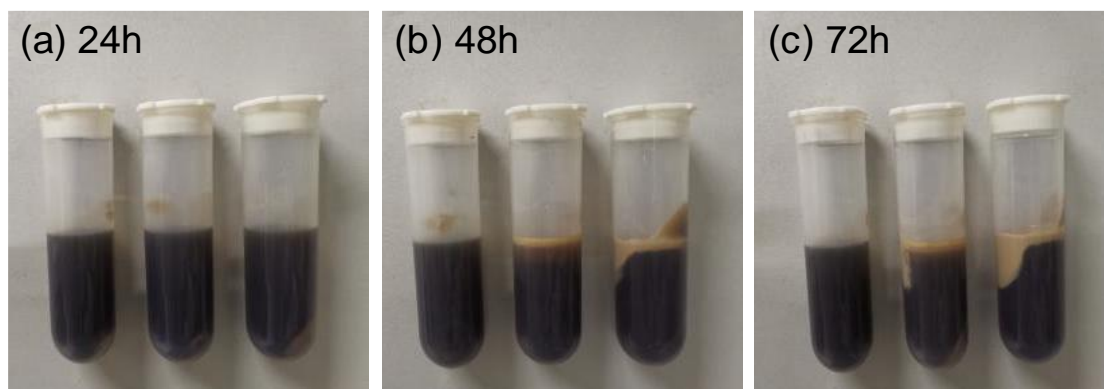


图 2.2 *T. cutaneum* 发酵不同阶段轻细胞量

Fig 2.2 *T. cutaneum* light cell mass at different stages of fermentation

(a)24 h, (b)48 h, (c)72 h, 每张图片中的发酵液的菌株从左到右分别是 *T. cutaneum* ACCC 20271, *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11。培养条件: 15%脱毒麦秆水解液, 10%接种量, 营养盐 Yeast Extracts 0.5g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.22 g/L, 30 °C, 180 rpm, 离心条件: 15000 rpm, 5 min。

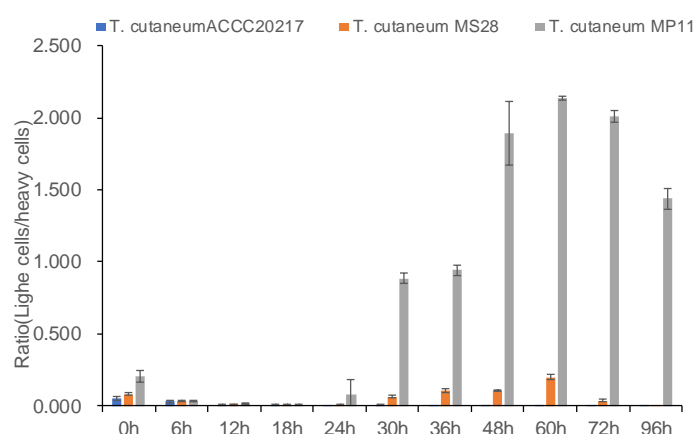


图 2.3 *T. cutaneum* 轻重细胞比值变化过程

Fig 2.3 *T. cutaneum* light to heavy cell ratio

合成培养基: Glucose 60 g/L, Yeast Extracts 1.0 g/L, KH_2PO_4 2.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.44 g/L. 30 °C, 10%接种量, 180 rpm, 96 h. 离心条件: 15000 rpm, 5 min。

如图 2.3 结果显示: 第一阶段是 *T. cutaneum* 的生长繁殖时期, 细胞生物量快速上升, 同时轻重细胞比例降低。由于合成培养基中的氮源不断被消耗, 可以观察到 *T. cutaneum* MP 11 在第 24 h 前已经进入了的油脂积累时期, 轻细胞明显变多, 说明 *T. cutaneum* MP 11 能够将碳源进行高效转化。发酵第 30 h, *T. cutaneum* MS 28 积累的油脂含量足以在离心力作用下漂浮在液体表面, 而出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 维持不变, 油脂含量过低被离心下来。随着发酵进行, 胞内积累了更多的油脂, 轻细胞量不断上升, 筛选菌株均在第 60 h 比值达到最高, 此时大部分细胞胞内填满了油脂小体。发酵后期, 由

于培养环境的恶化，轻细胞胞内油脂合成停止，通过调控细胞壁的合成代谢来响应环境的变化，同时可能代谢自身储存的油脂维持活力，导致部分细胞胞内密度和细胞壁结构发生改变，导致离心后重细胞量增加。

2.3.3 *T. cutaneum* 脂肪酸的组成

单细胞油来源生物柴油要求酵母油中含有理想的脂肪酸成分。影响生物柴油性能的主要因素是碳原子数及其种类。随着链长的增加，单脂肪酸的十六烷值、沸点、热值和粘度都增加，不饱和键的存在会降低单脂肪酸的性能。十六烷值高的长链饱和脂肪酸是点火性能的主要指标，其燃烧性能较好，但粘度过高会导致燃料雾化不良问题。在 15% 固含量玉米水解液中培养 *T. cutaneum*。油脂发酵后期 96 h, *T. cutaneum* MP 11 和 *T. cutaneum* MS 28 基本已经消耗完葡萄糖和木糖。收集细胞并提取油脂，分别进行皂化和转酯化反应后，测定脂肪酸的组成，如下表 2.1:

表 2.1 *T. cutaneum* 脂肪酸的组成

Tab 2.1 *T. cutaneum* fatty acid composition

油脂发酵菌株	棕榈酸 (C16:0)	软脂酸 (C16:1)	硬脂酸 (C18:0)	油酸 (C18:1)	亚油酸 (C18:2)	其他脂 肪酸
<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271	24.4	5.6	14.4	42.8	6.0	6.8
<i>T. cutaneum</i> MS 28	29.8	1.0	20.5	42.4	0.9	5.4
<i>T. cutaneum</i> MP 11	31.0	2.2	18.2	41.6	1.5	5.5

结果显示，C16、C18 的长链脂肪酸占总脂肪酸含量的 94.6% 以上。*T. cutaneum* 筛选菌株的脂肪酸组成变化规律相似。油酸含量最高，其次为棕榈酸和硬脂酸。结果表明了 *T. cutaneum* 筛选菌株的饱和脂肪酸含量高于出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271，说明筛选菌生产的油脂具有更高的十六烷值，生产的生物柴油燃烧性能更好。同时，利用木质纤维素生产的油脂可以作为生物柴油合成的前体。

2.3.4 *T. cutaneum* 利用 15% 固含量玉米粉水解液分步糖化发酵生产油脂

以玉米淀粉为原料生产微生物油脂，探究 2 株筛选菌株和出发菌株的发酵性能。加工后玉米粉在淀粉酶和糖化酶的作用下水解生产葡萄糖，玉米粉水解液中还含有少量的氨基酸等营养物质，有利于微生物的生长。15% 固含量玉米粉水解液作为培养基，在 3 L 的发酵罐上进行 *T. cutaneum* 好氧油脂发酵：

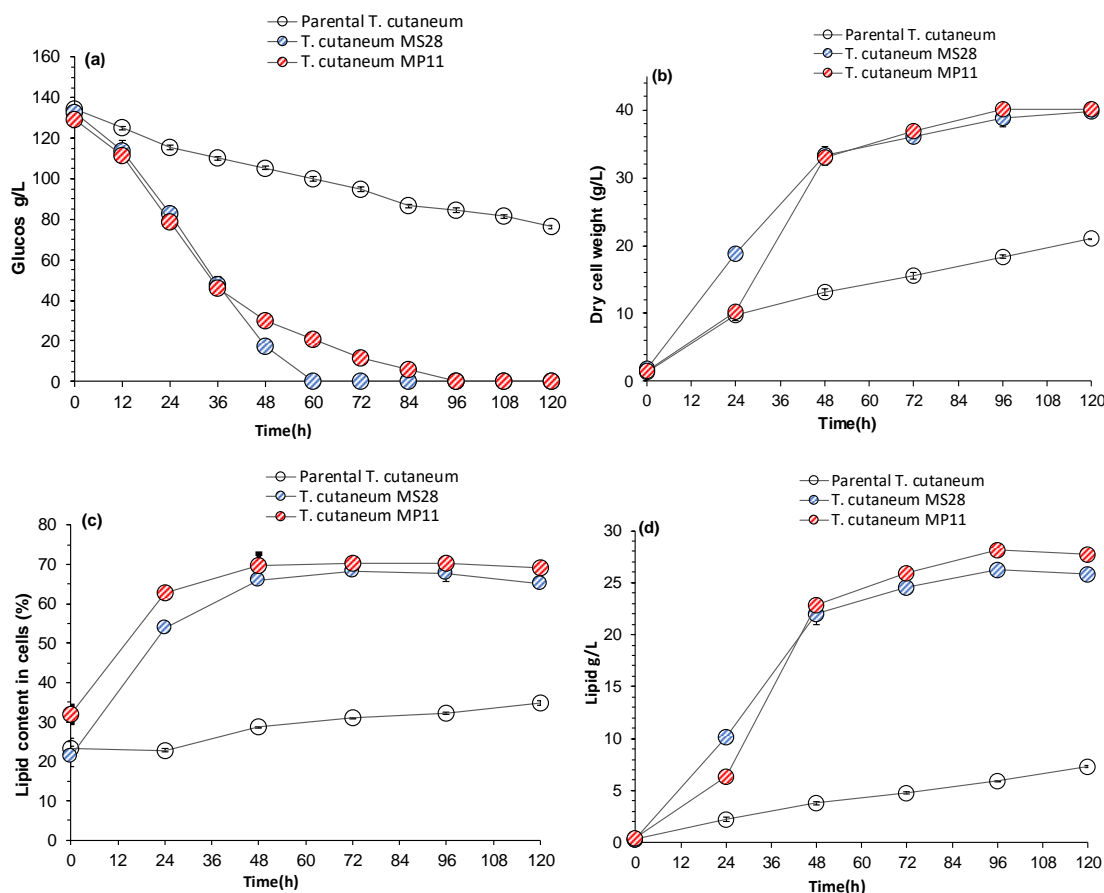


图 2.4 *T. cutaneum* 利用 15%固含量玉米粉水解液油脂发酵

Fig 2.4 corn flour hydrolysate for lipid fermentation by *T. cutaneum*

(a) 葡萄糖; (b) 细胞干重; (c) 细胞含油率; (d) 油脂浓度。糊化条件: 淀粉酶 22 wu/, 90 °C, 2 h。糖化条件: 糖化酶 10 wu/g 干物料, 50°C, 4 h。发酵条件: 15%固含量玉米粉水解液, 10%接种量, 30 °C, 600 rpm, 1 vvm, pH 5.0, 120 h。营养盐添加量: Glucose 60 g/L, Yeast Extracts 1.0 g/L, KH₂PO₄ 2.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.44 g/L。

15%固含量玉米粉水解液初糖大约 140 g/L。在氮源有限的情况下, 3 株发酵菌能够快速进入油脂合成代谢, 取第 24 h 的发酵液提取和测定油脂浓度发现了高油脂含量。培养基不含毒性物质, 延滞期非常短。

结果显示, *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 能够快速利用葡萄糖, 相较于原始菌株均表现出高效转化碳源的能力。*T. cutaneum* MS 28 在第 60 h 消耗完所有的葡萄糖, *T. cutaneum* MP 11 需要更多的时间才能把葡萄糖耗完, 原始菌株发酵 120 h 结束还剩下 76 g/L 葡萄糖。观察细胞干重结果显示, *T. cutaneum* MS 28 的生长繁殖速度更快, *T. cutaneum* MP 11 稍慢, 但是细胞含油率始终比 *T. cutaneum* MS 28 高。在观察细胞分裂和油脂积累过程发酵 *T. cutaneum* MP 11 细胞尺寸最大呈长棒状, *T. cutaneum* MS 28 次之呈长杆状, 出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 始终呈小的球状。观察发酵细胞尺寸越小, 细胞分裂的速度更快, 合成的细胞壁越厚, 酵母细胞壁的厚度在一定程度上影响细胞干重。

随着发酵的延长,葡萄糖逐渐向油脂转化,*T. cutaneum* MP 11 表现出最高的甘油三酯积累能力,第 96 h 细胞干重达到 40.1 g/L,得到 28.2 g/L 油脂浓度,含油率为 70.3%,离心收集 *T. cutaneum* MP 11 过程中,转速达到最高,轻细胞仍有很大一部分无法沉降下来,去除上清液时损失了大量轻细胞,所以测得的油脂产量偏低。*T. cutaneum* MS 28 细胞含油率最高达到 68.3%,油脂产量为 26.3 g/L,细胞干重 38.9 g/L。出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 始终显示较低的油脂产量,发酵 120 h 后,细胞干重为 21.0 g/L,积累油脂 7.3 g/L,细胞含油率只有 34.8%。相较于出发菌株,2 株筛选菌株能够更快速地利用葡萄糖,生产更高浓度的微生物油脂,具有极大的优势。*T. cutaneum* MP 11 的油脂生产能力比 *T. cutaneum* MS 28 强,更适合作为发酵菌株用于生产微生物油脂。筛选菌株在发酵第 96 h 实现了油脂的最大积累,为了维持细胞活力,开始分解少量内源的油脂,导致油脂含量有所下降。

2.3.5 *T. cutaneum* 利用 30%固含量麦秆同步糖化共发酵生产油脂

干式稀酸预处理后的小麦秸秆物料含有抑制微生物生长的化合物,其中呋喃化合物(糠醛和 5-羟甲基糠醛)的毒性最强,一般的微生物都无法降解和转化。抑制物存在会降低纤维素酶活性,阻碍可发酵糖的释放。利用 *Amorphotheca resinae* ZN1 对预处理麦秆进行生物脱毒,去除毒性较强的呋喃化合物。为了得到高浓度的木质纤维素油脂产量,本研究进行 30%高固含量麦秆的同步糖化共发酵:糖化和油脂发酵同步进行,油脂好氧发酵在 3 L 的发酵罐进行,用高效液相色谱测定每 12 h 发酵液的残留糖浓度,测定结果如下图 2.5:

经过 12 h 预糖化后,培养基中各初糖平均浓度:葡萄糖 85.0 g/L,木糖 18.5 g/L,甘露糖+阿拉伯糖 2.9 g/L,半乳糖 1.2 g/L。由于培养基中存在少量的毒性较低的抑制物,细胞有一段延滞期。细胞延滞期基本不消耗糖同时纤维素水解继续释放葡萄糖,引起 12h 内葡萄糖含量有所上升。*T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 的糖耗迅速增加,接近 72h 葡萄糖被完全转化,木糖浓度在 36h 左右开始降低,直至阿拉伯糖,甘露糖和半乳糖逐步被转化。油脂发酵 120 h 所有的糖被完全消耗,实现了木质纤维素全糖化发酵生产油脂。出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 糖利用能力低,只能利用少部分的葡萄糖,油脂转化率也低。木质纤维素油脂发酵结果显示,出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 生产油脂 6 g/L,而筛选菌 *T. cutaneum* MS 28 积累了 32.8 g/L 油脂,*T. cutaneum* MP 11 积累 34.4 g/L 油脂。*T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 能够同时转化戊糖和己糖生产高浓度木质纤维素油脂,提高了生物柴油油脂原料商业化生产的潜力。*T. cutaneum* MP 11 更适合作为发酵菌株应用于木质纤维素油脂生产。

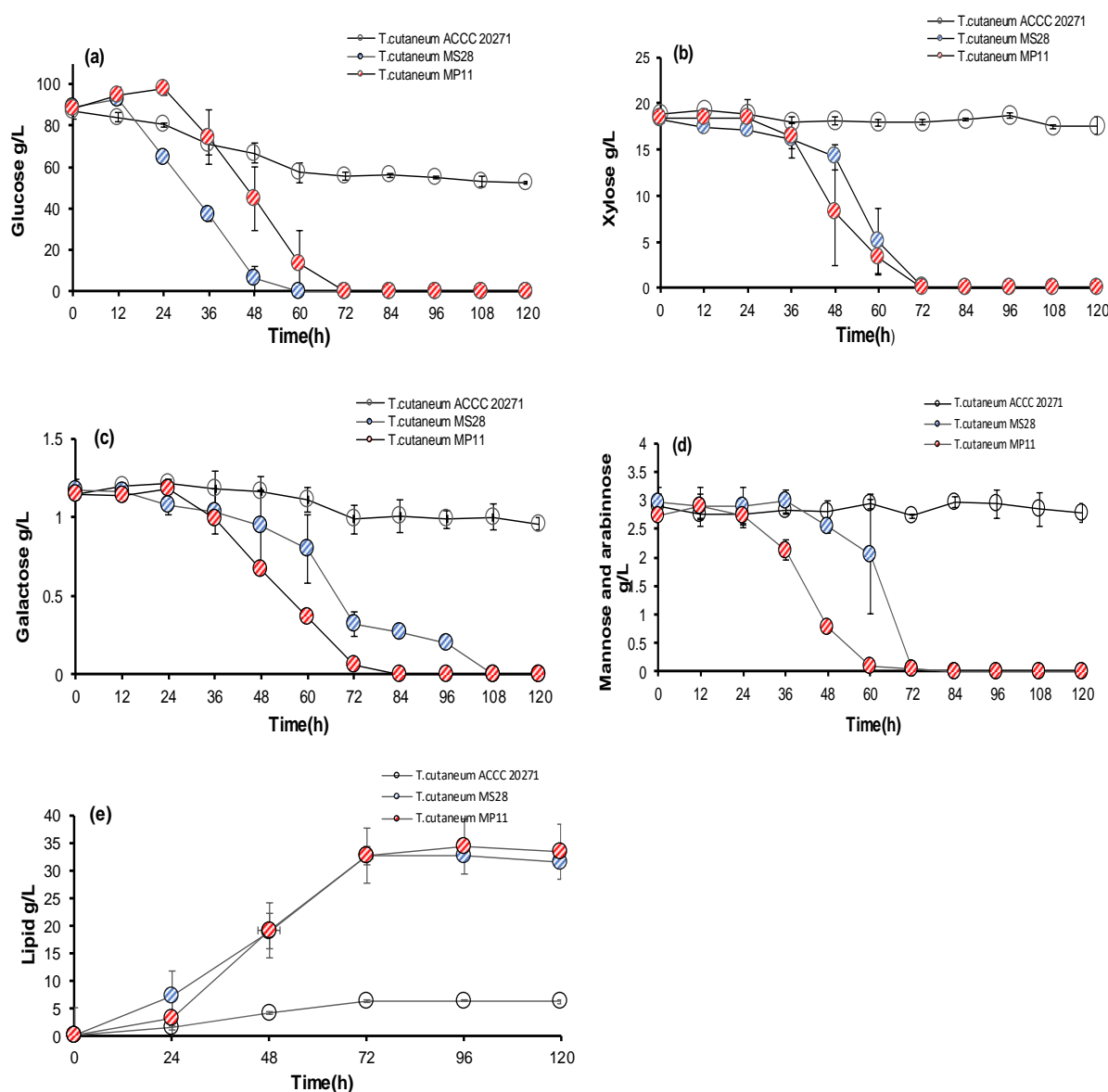


图 2.5 *T. cutaneum* 利用 30%固含量麦秸同步糖化共发酵生产油脂

Figure 2.5 15% solid content wheat straw simultaneous saccharification and co-fermentation for lipid production by *T. cutaneum*

(a) 葡萄糖；(b) 木糖；(c) 半乳糖；(d) 甘露糖+阿拉伯糖；(e) 油脂浓度。预糖化条件：30%固含量脱毒小麦秸秆，6 mg 纤维素酶蛋白/g 干物料，50 °C，12 h，pH 4.8，150 rpm，5 L 发酵罐。发酵条件：10%接种量，30 °C，600 rpm，1 vvm，pH 5.0，120 h，3 L 发酵罐。营养盐添加量：Glucose 60 g/L，Yeast Extracts 1.0 g/L，KH₂PO₄ 2.0 g/L，MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L，(NH₄)₂SO₄ 0.44 g/L。

2.4 小结

木质纤维素生物质是最丰富的天然聚合物，木质纤维素来源戊糖和己糖同时利用的油脂发酵过程具有极大的吸引力。本章研究主要验证超速离心筛选高产油脂酵母的可行性和探究筛选菌株利用木质纤维素发酵产油的性能。*T. cutaneum* ACCC 20271 在设计

的低氮合成培养基中进行适应性进化离心筛选，同时提高筛选离心力和添加无菌超纯水降低离心发酵液密度，能更快速富集得到最佳油脂积累 *T. cutaneum*。

(1) *T. cutaneum* ACCC 20271 在合成培养基体系适应性驯化过程，通过发生突变以响应生存环境的变化。细胞油脂含量达到一定程度，离心后具有漂浮的特性，快速增加离心力至 43000 xg，特异性分离得到油脂生产能力优异的菌株 *T. cutaneum* MP 11，细胞含有率达到 70%。同时，观察发酵液密度能快速有效地判断筛选过程中的变化，节约油脂提取操作时间和成本。结果说明超离心筛选方法具有普适性和针对性，能够实现高通量快速筛选，不局限于木质纤维素水解液培养体系。实验结果为高效生产油脂菌株的筛选提高了良好的借鉴和理论指导。

(2) 甘油三酯主要以油脂小体形式积累在酵母细胞内，细胞形态变化和细胞尺寸增加，为油脂积累提供更多的空间。筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 的饱和脂肪酸含量比出发菌株高，具有更高的十六烷值。同时，利用木质纤维素原料生产的油脂主要包含 C16 和 C18 长链脂肪酸，是理想的生物柴油前体。

(3) 15%固含量玉米粉水解液的 *T. cutaneum* 好氧发酵培养表明，筛选菌株的油脂积累性能增强，含油率大幅度提高。进行 30%高固含量麦秆同步糖化好氧共发酵试验，原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 仅能够利用部分葡萄糖，生产油脂 6 g/L。筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 能够同时利用木质纤维素来源己糖和戊糖进行油脂生产，*T. cutaneum* MS 28 积累 32.8 g/L 油脂，*T. cutaneum* MP 11 积累 34.4 g/L 油脂。*T. cutaneum* MP 11 油脂生产能力更强，适合作为发酵菌株应用于木质纤维素油脂生产，具有重要的工业应用价值。

第 3 章 皮状丝孢酵母细胞形态与油脂生物合成机制研究

3.1 引言

油脂酵母 *Trichosporon cutaneum* 对发酵底物具有广泛适应性，能够降解和部分转化抑制物，最适合木质纤维素体系油脂发酵的菌株。在不同适应性进化培养体系中进行油脂的积累，结合超速离心筛选方法，不断富集得到油脂生产能力优异的菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11，能够实现木质纤维素来源单糖完成转化。利用显微镜观察发现超速离心筛选轻细胞酵母在细胞分裂的形态方面具有明显差异：细胞生长繁殖过程呈现多边出芽；细胞的尺寸更大，为油脂的积累提供了更宽广的空间，细胞壁的厚度随着环境的改变高度动态变化^[105]。

细胞核需要细胞质来实现复制所需的基本功能，导致酵母在 DNA 合成后期呈现出多种基本形态。目前已有研究表明，酵母细胞在培养过程中的物理化学性质、外界压力和营养条件等因素均可引起细胞形态的变化，酵母形态可能与细胞壁的完整性相关，可以通过调节甘露聚糖、几丁质和葡聚糖的合成与分解，使结构处于动态变化以适应环境变化。油脂酵母具有刚性结构的细胞壁，有利于维持细胞形态和抵抗外界物理化学环境压力。皮状丝孢酵母生长过程中多种细胞形态的变化，细胞壁的合成代谢更为复杂。葡聚糖赋予细胞弹性，通过拉伸以维持细胞形状。甘露糖蛋白交联物可以通过改变细胞孔隙率，从而调节细胞通透性的功能。几丁质在有助于增强细胞壁的拉伸强度和外壁厚度。细胞壁几丁质的增加是酵母细胞的一种补偿机制，可以使细胞壁重塑以抵抗细胞的裂解。

氮限制对油脂的积累有着密切的关系，主要是代谢通量变化调控细胞的生长，同时触发油脂的积累。产油酵母细胞生长繁殖方式的差异和细胞壁组分的变化对细胞形态改变有重要影响，细胞体积的增大促进代谢能力提高，为油脂的储存提高更广阔的空间。本章利用分子生物学手段分析离心筛选菌株产生巨大差异的原因，主要按照以下几个部分展开：（1）*T. cutaneum* 生长繁殖方式与细胞形态的关系；（2）细胞壁组分的变化与油脂合成的关系；（3）细胞内油脂积累前体物质的供给能力探究；（4）油脂合成代谢和细胞壁合成分解相关基因转录水平分析。

3.2 实验材料与方法

3.2.1 菌株和培养基

T. cutaneum ACCC 20271 为原始菌株，来自中国农业微生物菌株保藏管理中心。

T. cutaneum MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 为高产油脂超速离心筛选酵母。*T. cutaneum* MS 28 为本实验室胡明珊同志在 15%固含量玉米秸秆水解液中适应性驯化离心筛选获得的油脂积累能力增强的菌株。*T. cutaneum* MP 11 为本研究过程在普通合成培养基发酵中离心筛选获得的超油脂生产菌株。

YPD 培养基：培养基成分为 Glucose 20 g/L, Yeast Extracts 10 g/L, Peptone 20 g/L, Agar 20 g/L。

合成培养基，Glucose 60 g/L, Yeast Extracts 0.5 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.22 g/L。

3.3.2 种子培养

从 -80°C 菌种保藏冰箱中拿出保种管，待菌液融化后划线接种于 YPD 固体培养基。 30°C 培养大约 30，挑取单菌落于 20 mL YPD 培养基中活化 24 h。然后接种于 50 mL YPD 培养基，活化 24 h 得到二级种子。摇床培养参数： 30°C ，180 rpm。接种量：10%。

3.3.3 麦秆预处理和生物脱毒

具体操作详见 2.3.5 和 2.3.6。

3.3.4 高效液相色谱(HPLC)检测

检测细胞壁单糖含量。细胞壁经过两步酸解后，加入 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 中和，上层清液经过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤 2 次。检测器色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H 柱(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，流动相为无菌超纯水，流速为 0.6 mL/min，柱温为 80°C ，进样量 20 μL 。

3.3.5 细胞壁组分测定

在合成培养基中培养 *T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11， 30°C ，180 rpm 摇床培养。在油脂合成前期 24 h 取发酵液 100 mL，收集菌体。重悬细胞 2 次，在 -80°C 超低温冰箱预冻 24 h。将菌体进行真空冷冻干燥 48 h。

主要利用两步酸解法测定细胞壁单糖聚合物含量。加入 1 mL 72%硫酸溶液与 100 mg 干菌体混合。用玻璃棒在 30°C 水浴温度下进行充分搅拌。高浓度硫酸低温反应 60 min，裂解细胞壁结构。加入 28 mL 去离子水将浓硫酸稀释至 4%稀硫酸，用纱布包扎并颠倒混匀之后，在 121°C 的灭菌锅进行第二步酸解 60 min。取出试管，混匀后取出 5 mL 溶液，加碳酸钙粉末进行中和反应，10000 rpm 离心 5 min，用 HPLC 测定酸溶液的葡萄糖和甘露糖的浓度。单糖聚合物与单糖的换算系数为 0.9。

称取 50 mg 冻干粉置于旋蒸瓶，添加 10 mL 6 M HCl 溶液， 105°C 下酸解 24 h。将酸解得到混合液在 50°C 条件进行旋转蒸发后，加入无菌水 5 mL 进行充分溶解。取 0.5 mL 样品与 0.5 mL Solution A (1.5 M Na_2CO_3 溶于 40 g/L 乙酰丙酮)进行 1:1 混合均匀，煮沸 20 min。与 0.5 mL Solution B (1.6 g 对甲基氨基甲醛溶于 30 mL 饱和盐酸及 30 mL 乙醇溶液)，3.5 mL 乙醇溶液充分混匀，放置 60 min。利用分光光度计在 520 nm 波长下进行检测。N-乙酰葡萄糖胺标准曲线计算几丁质含量。

3.3.6 透射电子显微镜细胞观察

在合成培养基中培养 *T. cutaneum*， 30°C ，180 rpm 摇床培养。发酵不同时期 24 h、72 h 收集菌液，与戊二醛溶液进行 1:1 混合，在低转速 5000 rpm 下离心 5 min 收集细胞，再用新鲜混合液（4%多聚甲醛和 3%戊二醛溶于磷酸缓冲液）进行重悬，置于 4°C 冰箱进行固定 8 h。将固定后的细胞样品送至上海师范大学进行脱水、包埋、固化、超

薄切片和染色。采用透射电子显微镜（仪器型号 FEI Tecnai Spirit G2 BioTWIN）进行细胞壁的观察。

3.3.7 胞内 NADPH 和乙酰辅酶 A 含量的测定

在合成培养基中培养 *T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11, 30 °C, 180 rpm 摇床培养。发酵时间 24 h、48 h 和 72 h 收集菌体, 超纯水重悬 2 次。稀释一定倍数后, 用血球计数板计算菌体浓度, 取一千万个细胞于 1.5 mL 离心管中, 送至苏州科铭技术有限公司进行测定。

3.2.8 实时荧光定量 PCR

在合成培养基上培养 *T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 至油脂合成前期 24 h, 4 °C 离心机 13000 rpm 离心 5 min, 收集细胞至 50 mL 离心管, 加入超纯水进行细胞重悬 2 次（整个过程在冰上操作）, 去除上清保留至 -80 °C 超低温冰箱。研钵, 研棒及药勺置于 200 °C 恒温烘箱维持 8 h, 去除 RNA 酶。向研钵中加入液氮进行冷冻, 然后将坚硬的细胞块置于研钵中, 用研棒进行研磨, 加入液氮 2-3 次冷冻并研磨充分至粉末状。离心管经过去 RNA 酶处理, 添加 Trizol 试剂提取总 RNA, 氯仿进行分离到水相。水相与等体积异丙醇混合得到 RNA, 经过 75% 酒精清洗, 干燥 RNA。去 RNA 酶水进行溶解, 测定波长 260 nm/280 nm 比值评价 RNA 样品。总 RNA 样品为模板, ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒反转录合成样品 cDNA。以样品 cDNA 为模板, SYBR Green 为荧光染料, 用 CFX96™ Real-Time System C10000™ Thermal Cycler 进行 DNA 扩增反应。

3.3 结果和讨论

3.3.1 *T. cutaneum* MP 11 的离心转接过程细胞形态观察

在氮限制普通合成培养基体系中进行 *T. cutaneum* ACCC 20271 适应性进化离心筛选, 得到细胞含有率达到 70% 的 *T. cutaneum* MP 11。预处理后木质纤维素水解液成分比较复杂, 含有一定量的氮等微生物生长必须营养物质, 可能会影响细胞合成代谢和细胞形态。*T. cutaneum* MP 11 将油脂储存在胞内脂质体, 脂质体在细胞生长过程中是高度变化的。在 15% 固含量脱毒小麦秸秆中继续培养 *T. cutaneum* MP 11, 发酵液高转速进行离心, 密度较轻的轻细胞作为种子转接新鲜的培养基中, 继续进行油脂积累。为了观察离心转接过程中细胞的分裂, 形态变化和油脂积累的过程, 油脂合成前期 24 h 内每间隔 3 h, 油脂合成期每隔 24 h 取样观察。

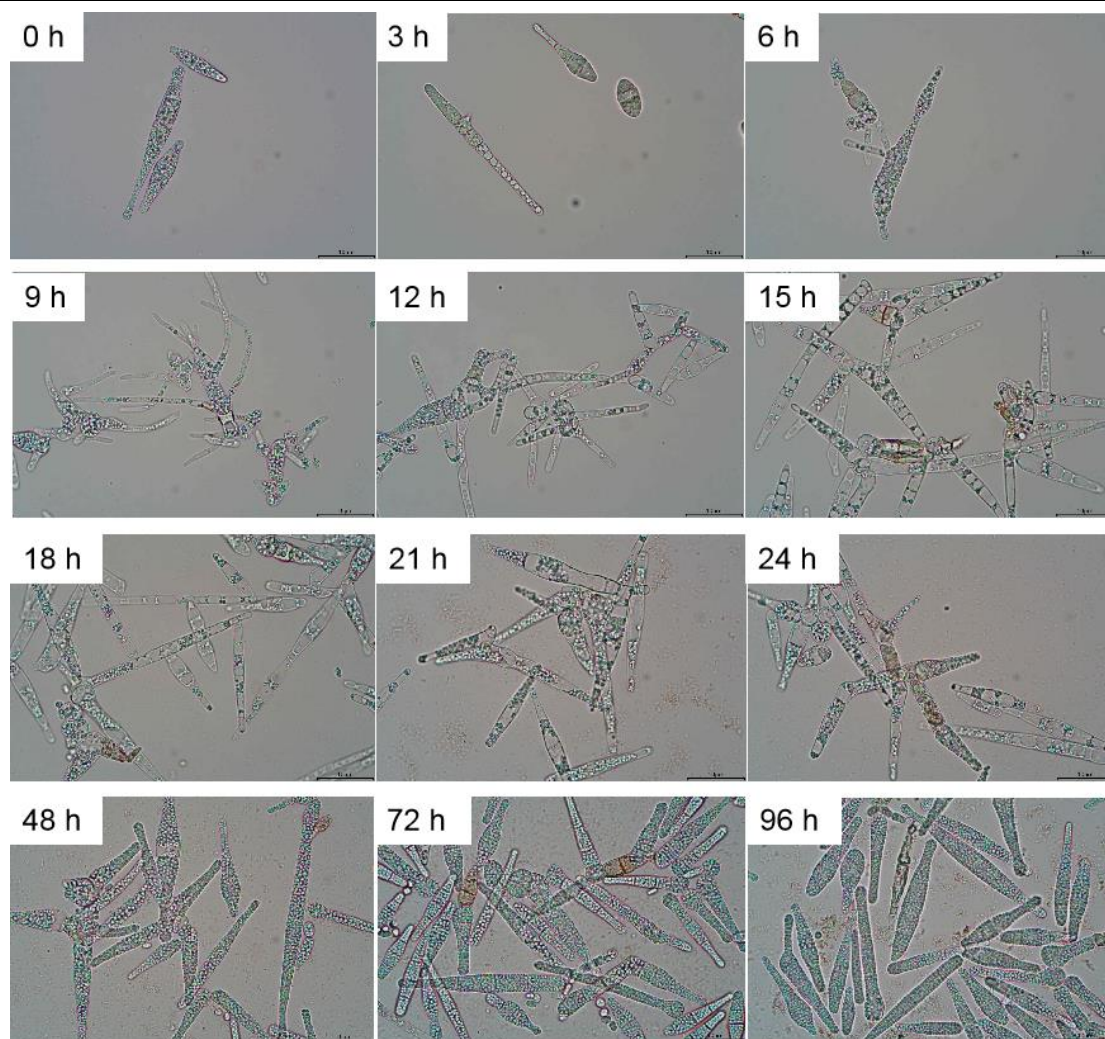


图 3.1 *T. cutaneum* MP 11 油脂积累过程观察

Fig 3.1 Observation of *T. cutaneum* MP11 lipid accumulation

发酵条件：15%固含量小麦秸秆水解液，10%接种量，30 ℃，180 rpm，96 h；营养盐添加量：Yeast Extracts 0.5 g/L， KH_2PO_4 1.0 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.22 g/L；离心转速：43000 xg。

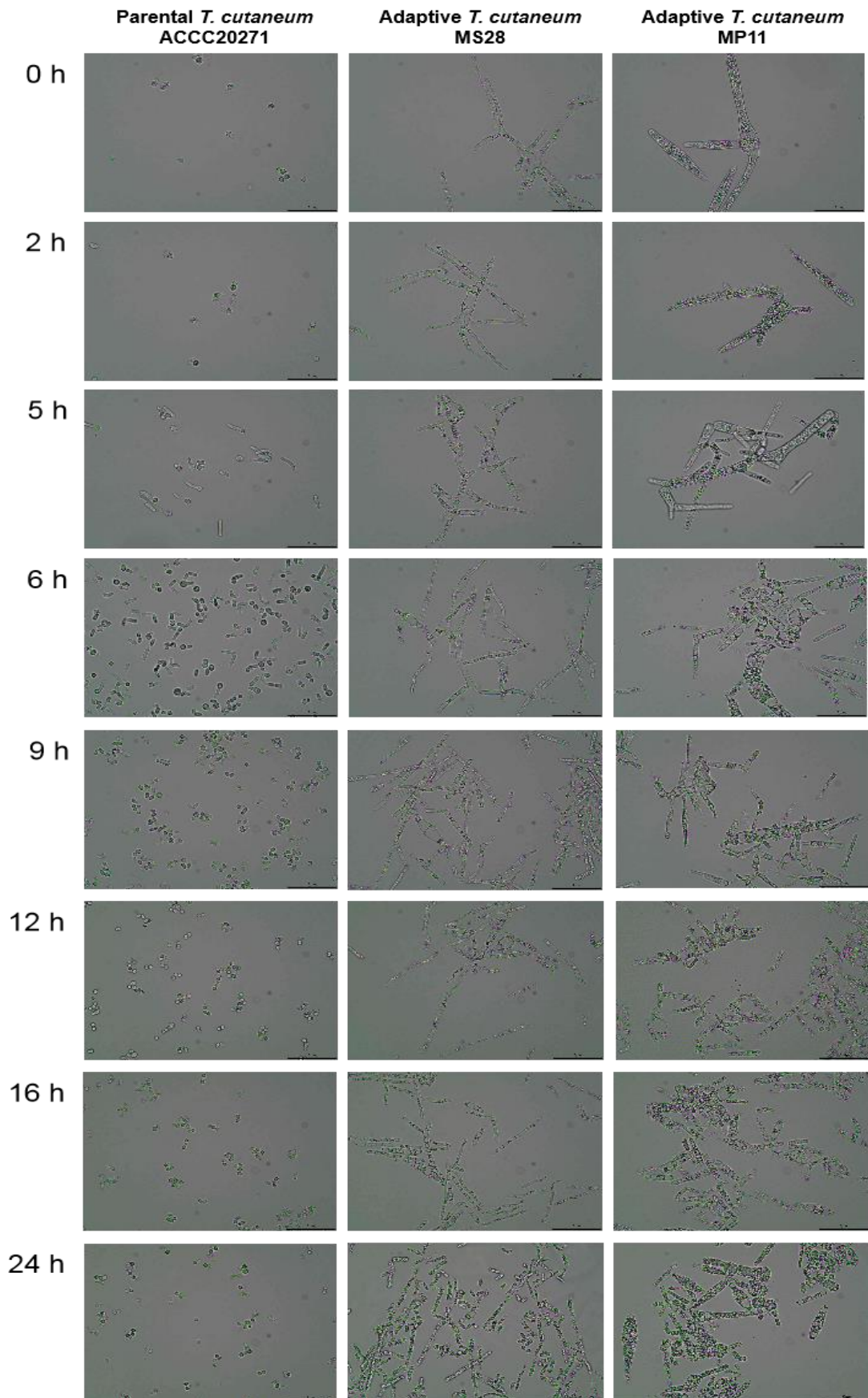
如图 3.1 结果显示，经过长周期培养的高含油脂的 *T. cutaneum* MP 11 细胞呈长棒状，此时菌体处于稳定期后期或者衰亡期，当进入新的培养环境，需要从新合成大量生长需要的酶和中间代谢物。经过一段时间的延滞期后，第 6 h 长细胞的顶端和侧边都出现芽体。随着芽体的不断伸长，与芽体连接的部分母体细胞或芽细胞从整个长细胞中断裂，脱离下来产生独立的个体细胞。芽体上还可以形成新的芽体，同时芽体细胞的尺寸开始变大，不断伸长和变宽，容纳更多的细胞器和提高油脂储存的空间。大约第 15 h 当培养基中的氮源耗尽，通过调控代谢通量，细胞停止生长同时触发油脂合成的开始。随着大量油脂小体的生成，油脂填满了整个细胞，大部分长棒状的细胞中间出现明显的横隔，有少部分从母体细胞中脱落下来，形成较小且成椭圆形的细胞，大部分长棒状的细胞发酵后期略微变短，原因可能是不利的生存培养环境导致细胞壁紧致以对抗细胞的破裂。通过以上结果显示，生长分裂方式和细胞形态影响酵母油脂合成，并发挥了关键的作用。

3.3.2 *T. cutaneum* 细胞生长繁殖过程分析

与出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 相比，离心筛选得到的高产油脂菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 细胞形态多样，尺寸更大，为油脂的积累提供更广阔的空间。根据文献报道，油脂酵母的细胞形态与细胞繁殖方式有一定的联系，促进细胞丝状生长的因素非常复杂，一般是通过调控代谢流来响应环境的变化。将形态差异明显的 3 株 *T. cutaneum* 在营养丰富的 YPD 培养基进行活化，使细胞处于快速生长状态，随后转接至氮限制的合成培养基培养，观察 24 h 内细胞形态，如图 3.2:

经过活化后的种子胞内核糖核酸含量高，代谢活力较强，因此接种至新鲜合成培养基时能够快速进入指数生长期，第 2 h 可以明显观察到芽细胞的出现。油脂酵母以出芽方式进行繁殖。母体细胞成熟后通过单边或者多边途径萌发芽体，芽细胞伸长至某种程度，脱离形成新的个体。如结果所示，*T. cutaneum* ACCC 20271 几乎呈单边出芽，萌发的芽体不断伸长随后从母体脱落继续进行生长繁殖。未脱落的子细胞也能够产生新芽体，形成长细胞链或分枝。

T. cutaneum MS 28 生长期呈多细胞长杆状，母体细胞和子细胞尺寸相差不大。*T. cutaneum* MP 11 主要呈棒状，大多数成熟的母体细胞都是呈多边出芽，芽体在脱落之前明显比母细胞尺寸更小。芽体脱落完成形成子细胞，*T. cutaneum* ACCC 20271 子细胞继续生长分裂，产生形状和大小相似的椭圆状酵母细胞；*T. cutaneum* MS 28 后期产生了大量尺寸较短的形态；大部分 *T. cutaneum* MP 11 子细胞完成脱落后继续伸长和变宽。在氮限制的培养基中，前期油脂酵母生长活跃使营养物质逐渐耗尽，同时环境条件发生改变，不利于生长，酵母细胞开始积累油脂等贮存性物质。油脂酵母 *T. cutaneum* ACCC 20271 明显能更快地前完成生长分裂产生更多的细胞个数，但稳定期（油脂合成时期）较短，由于细胞体积的限制，积累的油脂浓度较低。研究过程中还观察到，高产油脂菌株 *T. cutaneum* MP 11 于 YPD 培养基活化后代谢活跃，接种至环境条件不好的木质纤维素水解液，会进行有性生殖产生子囊孢子。

图 3.2 比较 *T. cutaneum* 生长繁殖过程Fig 3.2 Comparison of growth process of *T. cutaneum* in synthetic medium

3.3.3 *T. cutaneum* 细胞形态和细胞壁组分相关分析

通过以上研究发现改变驯化培养体系和增加离心筛选强度，能够筛选出油脂积累能力更强的菌株。在超高转速下筛选得到的突变菌株细胞体积更大，生长繁殖过程更加复杂。在一定程度上，细胞体积和油脂含量呈正比关系，原因可能是细胞体积变大容纳更多的细胞器，促进遗传物质的复制和蛋白酶的合成代谢，为油脂储存提供更大的空间。在酵母细胞分裂伸长的过程中，细胞壁结构的变化起极其重要的作用，是否会影响形态和代谢能力的巨大差异需要进一步的研究。因此本研究将 *T. cutaneum* 接种至氮限制的普通合成培养基进行发酵培养，在 24 h 指数生长末期和 72 h 稳定期两个关键的时间节点取发酵液，收集菌体进行固定和切片，TEM 观察 3 株不同的 *T. cutaneum* 的形态和细胞壁厚度：

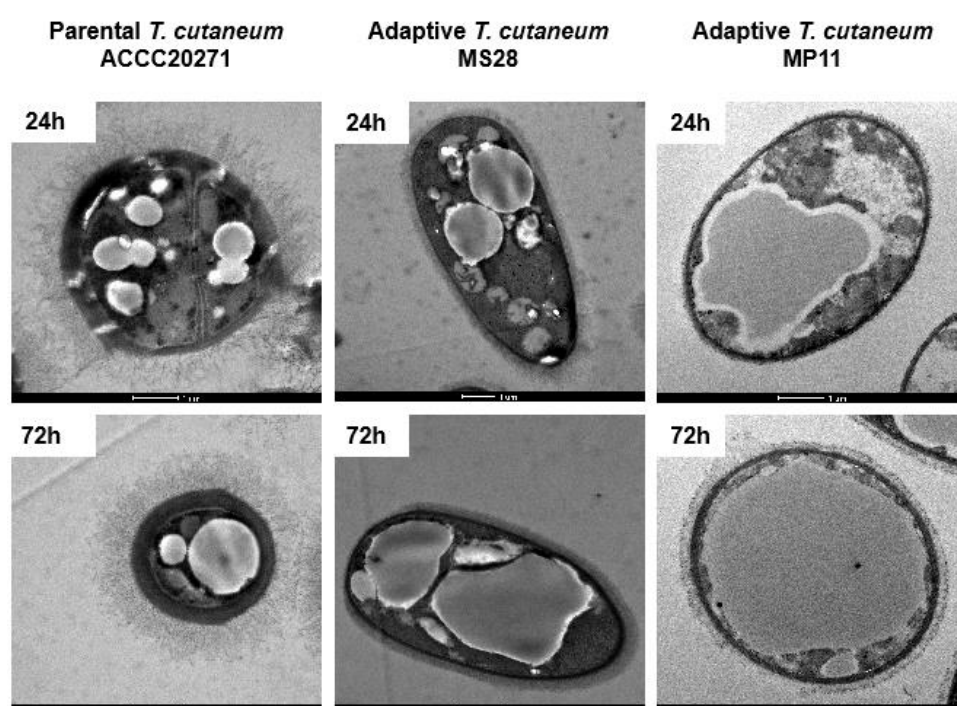


图 3.3 *T. cutaneum* 油脂合成前期和后期的细胞形态 TEM 观察

Fig 3.3 TEM observation of cell morphology of *T. cutaneum* in the early and late stages of lipid synthesis
合成培养基 Glucose 60 g/L, Yeast Extracts 0.5 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.22 g/L; 30 °C, 10%接种量, 180 rpm, 72 h.

如图 3.3 所示，*T. cutaneum* 细胞切片平面图显示，适应性进化高产油脂筛选菌株的细胞体积显著更大，胞内的油脂小体更大及其油脂占细胞空间更高。细胞壁结构受碳源，氮限制和所处的生长阶段高度调节。从快速积累油脂前期第 24 h 到营养物质消耗殆尽的稳定期第 72 h，*T. cutaneum* 细胞壁的厚度逐渐增加，结构变得更紧密，使细胞不易发生形变以防止细胞的裂解。其中发酵后期 *T. cutaneum* MP 11 细胞外壁甘露聚糖层厚度差异明显，可能是 *T. cutaneum* MP 11 油脂生产过程中细胞形态维持长棒状的原因。图 3.4 结果表明，第 24 h 油脂合成前期筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 细

胞壁明显比出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 筛选菌株更薄，尤其是细胞内壁的葡聚糖-几丁质层，这可能是影响细胞形态的重要因素。*T. cutaneum* MP 11 的细胞外壁和内壁都非常薄。

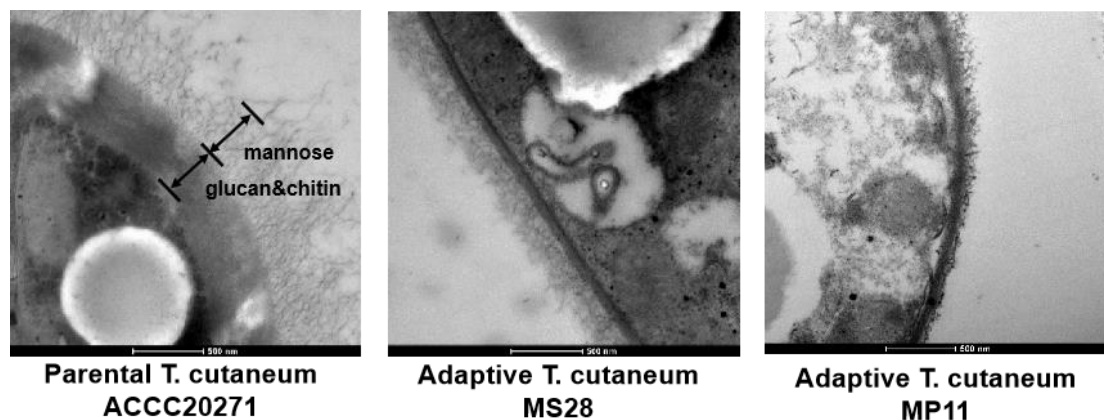


图 3.4 *T. cutaneum* 油脂合成前期细胞壁厚度 TEM 观察

Fig 3.4 TEM observation of cell wall thickness of *T. cutaneum* in the early stage of oil synthesis

TEM 结果显示，高产油脂 *T. cutaneum* 的细胞体积更大且细胞壁的厚度明显变薄，研究细胞壁组分变化能更好地了解细胞形态发生巨大改变的原因。通过 Nano Measurer 计算细胞的平均表面积和分解细胞壁结构，换算得到单位面积的葡聚糖、甘露聚糖和几丁质含量来研究细胞壁结构和厚度的变化。表 3.1 显示了原始菌株和筛选菌株在同一发酵时间点 24 h 细胞单位表面积细胞壁各组分的差异，油脂积累能力强的筛选菌株单位表面积细胞壁葡聚糖和甘露聚糖各组分含量和出发菌株相比，均大幅度降低，特别是 *T. cutaneum* MP 11 的差异最为明显。细胞壁几丁质含量较低，差异不大，出发菌株单位表面积几丁质含量最高。

表 3.1 *T. cutaneum* 油脂合成前期细胞壁组分含量比较

Tab 3.1 Comparison of the contents of cell wall components in the early stage of *T. cutaneum* lipid synthesis

Component mass per unit surface area (mg / μm^2)	Parental <i>T. cutaneum</i>	<i>T. cutaneum</i> MS 28	<i>T. cutaneum</i> MP 11
Glucan	3.30×10^{-9}	1.18×10^{-9}	6.49×10^{-10}
Mannan	2.40×10^{-9}	1.20×10^{-10}	2.28×10^{-10}
Chitin	3.34×10^{-10}	2.19×10^{-10}	2.48×10^{-10}

细胞壁的完整性会影响细胞的形态，皮状丝孢酵母以菌丝态生长，细胞壁更加复杂。细胞外壁主要是甘露糖的胞外粘性聚合物，在细胞自然生长过程中，甘露聚糖外壳提供了额外的强度，从而保护了细胞免受外界环境压力，不容易发生形态变化。同时细胞壁几丁质含量的增加是油脂酵母细胞的一种补偿机制以对保护细胞壁不被裂解。

一些低油脂含量的油脂酵母对葡聚糖酶介导的细胞裂解不敏感,可能与细胞壁中几丁质/露聚糖比值低有关。细胞壁单位表面积葡聚糖和甘露聚糖质量的降低,导致细胞壁的结构发生变化,图 3.5 结果显示,原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271, 筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 细胞壁单位表面积几丁质和单糖聚合物的比值分别为 0.05, 0.09 和 0.28。筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 几丁质与两种单糖聚合物的比值较 *T. cutaneum* ACCC 20271 明显更高,在 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 细胞发生拉伸和变大的过程中,这种细胞壁结构高度动态变化在支持细胞形态变化和保护细胞不被裂解方面有显著的作用,菌丝态生长影响了发酵液的流变学、传质性能,细胞体积增大提供代谢碳源和储存油脂的空间。

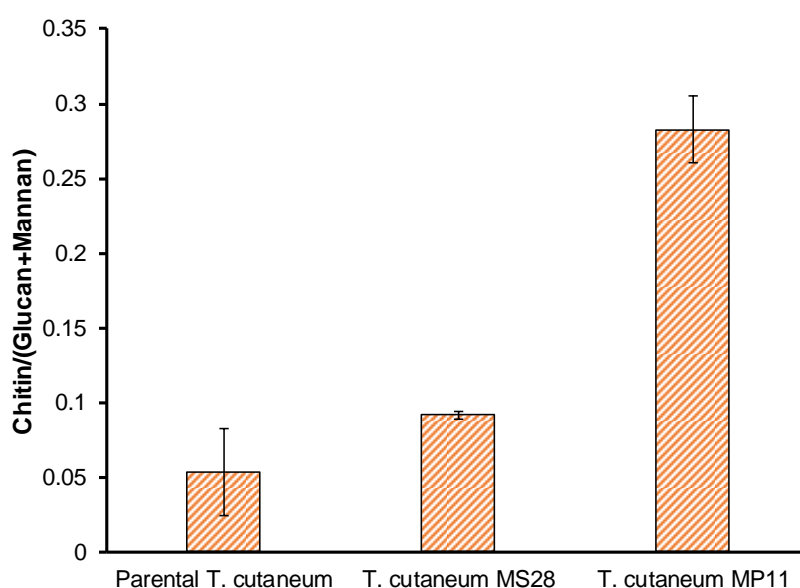


图 3.5 *T. cutaneum* 油脂合成前期细胞壁组分几丁质与单糖聚合物比值

Fig 3.5 The ratio of chitin to monosaccharide polymer in the cell wall component of *T. cutaneum* in the early stage of lipid synthesis

3.3.4 *T. cutaneum* 胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量对比

作为脂肪酸合成代谢反应的重要中间物质,测定 *T. cutaneum* 在不同时间段胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量能够反应其碳源利用和油脂合成的能力。在合成培养基进行发酵培养 72 h,取油脂合成前期 24 h,中期 48 h 和后期 72 h 的固定量细胞,提取和测定乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量:

如图 3.6 (a) 结果显示,在第 24 h 油脂合成的前期,*T. cutaneum* MP 11 和 *T. cutaneum* MS 28 胞内的 NADPH 含量非常高,尤其 *T. cutaneum* MP 11 胞内 NADPH 含量是 *T. cutaneum* ACCC 20271 的 7 倍,同时乙酰辅酶 A 的含量明显比原始菌株高,显示筛选菌株快速利用葡萄糖的能力。高产油脂筛选菌株 NADPH 含量不断降低,而原始菌株的基本不变,推测其可能随着油脂的大量积累,培养基中的葡萄糖供应不足导

致。随着油脂合成的进行，筛选菌株的胞内乙酰辅酶 A 供应能力不断提高，油脂合成后期 72 h 具有显著差异，每 1×10^6 个 *T. cutaneum* MP 11 和 *T. cutaneum* MS 28 细胞胞内分别含有 15 n mol 和 12 n mol 乙酰辅酶 A，出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 只有小幅度提高，胞内 NADPH 含量变化的结果也显示后期的还原力不足，可能导致甘油三酯合成代谢速率降低。结合细胞形态的分析结果认为细胞体积增大为油脂积累创造了空间是合理的。

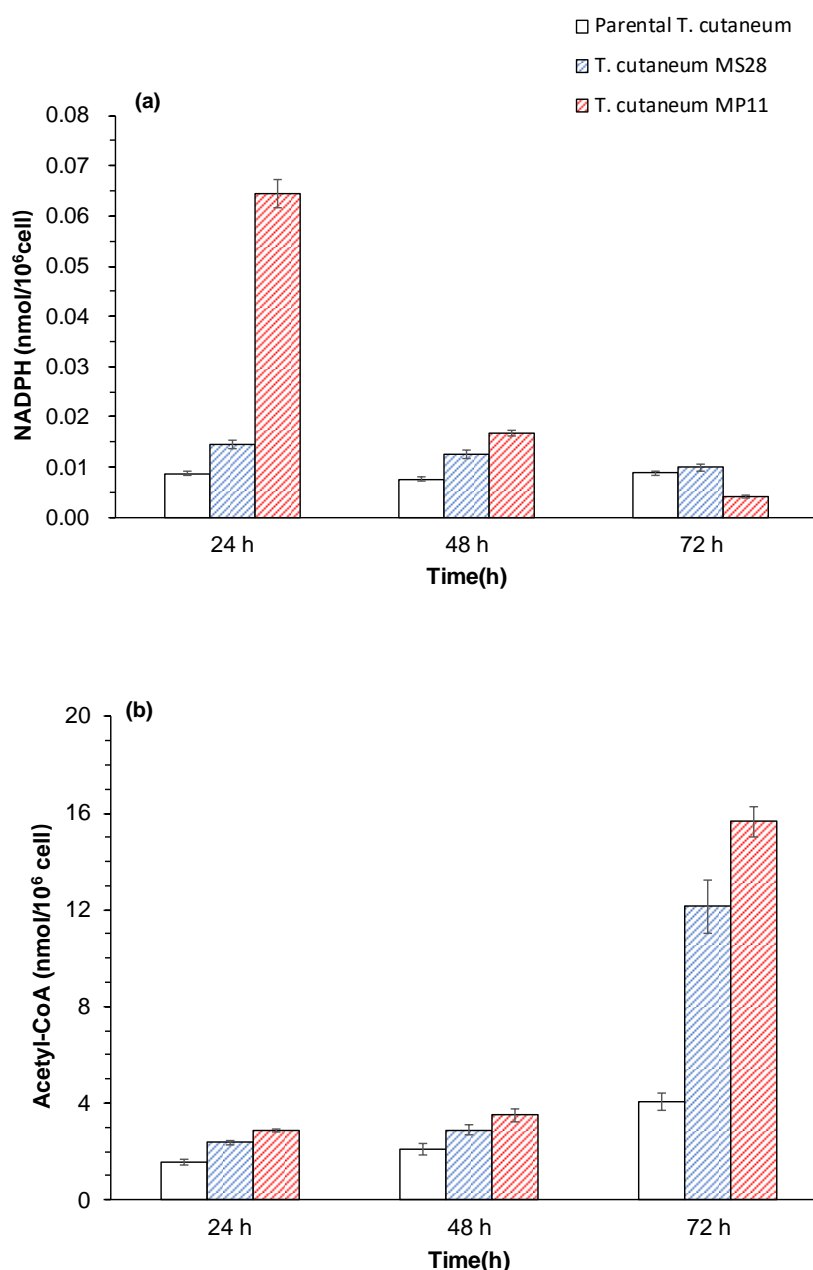


图 3.6 *T. cutaneum* 油脂合成不同时期胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量

Fig 3.6 Content of acetyl-CoA and NADPH in different stages of *T. cutaneum* lipid synthesis

3.3.5 *T. cutaneum* 油脂合成和细胞壁合成代谢相关基因转录水平分析

(1) 上文比较了 *T. cutaneum* 超速离心筛选前后菌株的发酵性能、细胞形态和细胞壁组分的变化, 显示离心筛选得到的高油脂含量发酵菌株具有优异的代谢能力, 多变的形态, 更大的细胞体积和细胞壁结构的组分变化, 且存在一定的联系。希望通过观察基因表达水平来探究细胞形态和油脂合成的关系。Zhao^[105]等根据基因的注释推测了 *T. cutaneum* 油脂合成代谢路径图, 根据油脂合成的过程选取部分关键基因进行实验, 以 *T. cutaneum* ACCC 20271 为对照菌株, β -actin 基因为内参, 探究 2 株超速筛选菌株的转录水平表达差异, 研究选取处于油脂合成快速合成时期 24 h 的细胞进行转录水平分析。

如图 3.7 结果所示, *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 油脂合成路径关键基因转录水平出现了不同程度的上调表达差异, 其中编码丙酮酸脱氢酶复合物的基因出现明显的上调表达, 丙酮酸脱氢酶复合物主要分布在线粒体中, 主要参与丙酮酸氧化脱羧得到乙酰辅酶 A 的反应, 经三羧酸循环生成柠檬酸为脂肪酸合成提供前体, 在有氧呼吸和能量代谢方面至关重要。筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 乙酰 CoA 合成路径中的编码柠檬酸裂解酶 (ACL) 的基因, 脂肪酸合成路径的编码乙酰 CoA 羧化酶

(ACC1) 和脂肪酸复合酶亚基 (FAS1 和 FAS2) 的基因分别显著上调表达 130、117、89 和 81 倍, 而这些基因参与了脂肪酸合成途径的前体供给、碳链延长等关键步骤。基因的显著上调表达使得脂肪酸合成途径大幅度增强。结合上文 *T. cutaneum* 生长繁殖的方式和细胞形态结果, 分析 2 株高产油脂菌株之间存在差异的原因可能是与 *T. cutaneum* MP 11 相比, *T. cutaneum* MS 28 有更短的延迟期和更快的生长速度, 这意味其能更早进入油脂合成阶段。

NADPH 作为甘油三酯代谢合成的重要供氢体, 主要依赖磷酸戊糖途径, 三羧酸循环和苹果酸催化过程产生。图 3.7 中 NADPH 合成的相关基因转录水平结果显示, *T. cutaneum* MS 28 中编码苹果酸酶 (ME) 基因的上调表达明显, 接近 30 倍。培养基中氮元素缺乏导致的腺苷单磷酸 (AMP) 浓度下降使异柠檬酸脱氢酶活性降低, 线粒体过剩的柠檬酸转移至细胞质中在转化为苹果酸, 经 ME 催化得到丙酮酸和 NADPH。*T. cutaneum* MP11 中编码异柠檬酸脱氢酶 (IDP1) 的基因转录水平上调显著。戊糖磷酸途径的相关基因均差异不大。

qRT-PCR 实验结果显示, 筛选菌株编码甘油三酯合成途径相关基因尤其是 DGA1 上调表达不明显。结合以上结果发现, 高产油脂菌株 *T. cutaneum* MS 28 与出发菌株相比, 在快速的油脂合成前期乙酰 CoA 和脂肪酸合成途径相关基因表达具有大幅度上调, NADPH 合成途径中 ME 基因上调表达最为明显, 说明油脂合成的还原力主要由苹果酸脱氢酶催化产生丙酮酸过程产生的 NADPH 提供。筛选菌株 *T. cutaneum* MP 11 中丙酮酸脱氢酶 PDHA、PDHB 和 LPD 基因的表达显著上调, 同时主要还原力由三羧酸循环过程产生, 分析原因可能是由于其生长繁殖速度慢或者培养接种时的种子量少, 导致第 24 h 氮源未消耗完全主要进行生长的有氧呼吸, 油脂合成途径还未启动, 而 *T.*

cutaneum MS 28 代谢速度更快，相关酶活性更强，此结果与上文细胞培养过程中的生长繁殖方式和形态差异相吻合，说明考察菌株油脂合成相关基因表达情况中取样节点非常重要。

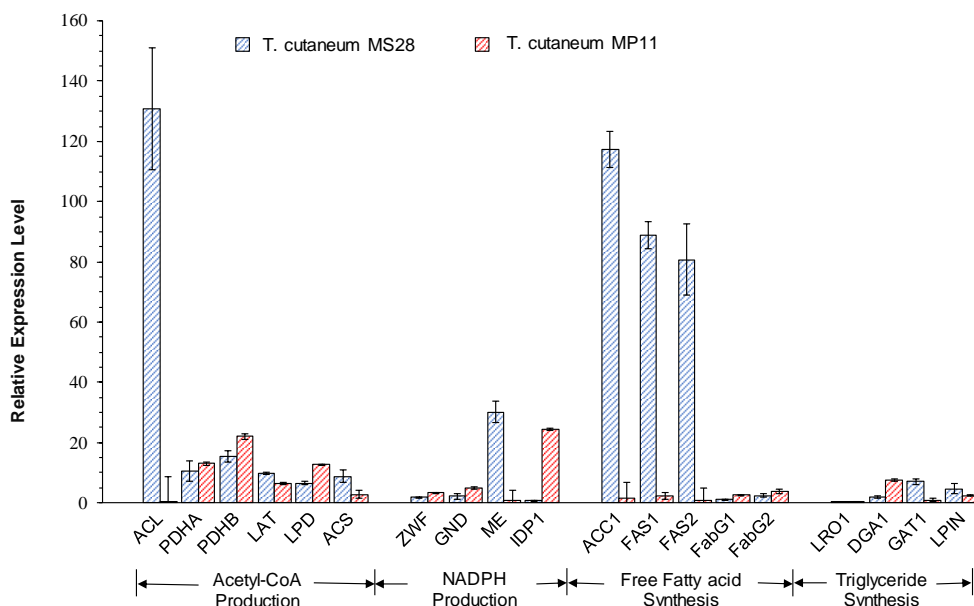


图 3.7 *T. cutaneum* 甘油三酯合成相关基因转录水平

Fig 3.7 Transcription levels of genes related to *T. cutaneum* triglyceride synthesis

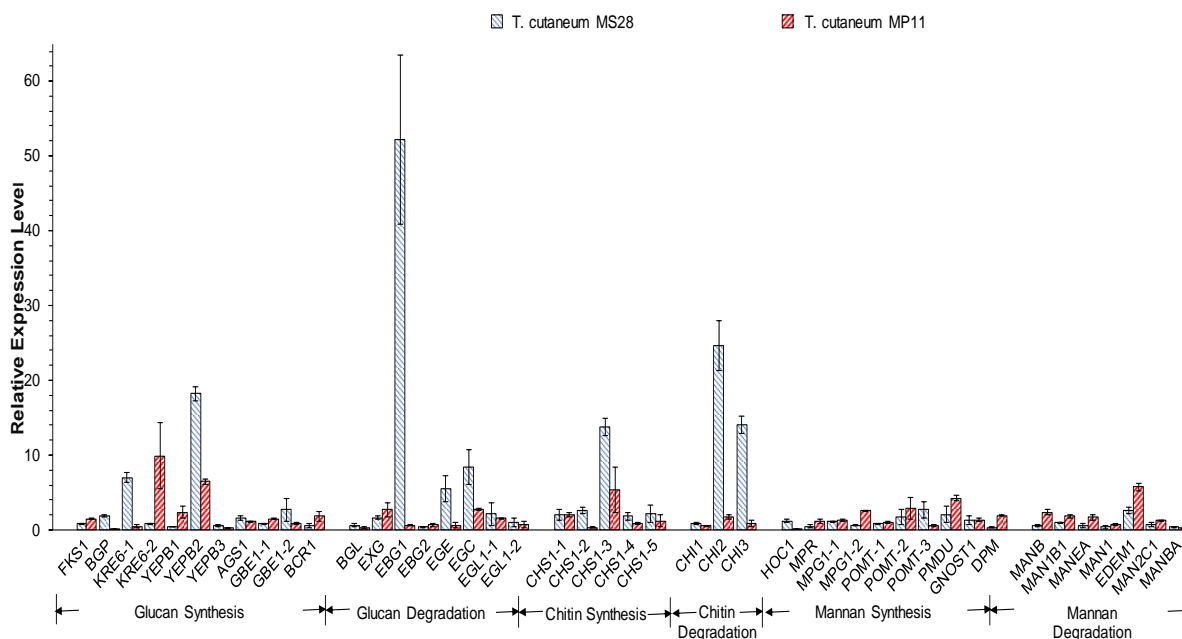


图 3.8 *T. cutaneum* 细胞壁代谢相关基因转录水平

Fig 3.8 transcription level of genes related to *T. cutaneum* cell wall metabolism

T. cutaneum 细胞壁外壁主要由甘露聚糖组成，能够调节细胞孔隙和提供额外强度，是与外界接触的第一道屏障。细胞内壁是葡聚糖-几丁质聚合物，是细胞壁的纤维

结构支架, 葡聚糖赋予细胞拉伸弹性以维持细胞形状, 几丁质则增强细胞壁强度和厚度。几丁质含量的增加是油脂酵母细胞的一种补偿机制以对保护细胞壁不被裂解。酵母的细胞壁可以通过调节甘露聚糖、几丁质和葡聚糖的合成与分解, 使结构处于动态变化以适应环境变化。qRT-PCR 实验结果显示, *T. cutaneum* 筛选菌细胞壁合成代谢相关基因出现了程度上调和下调差异表达, 其中 *T. cutaneum* MS 28 编码 β -葡聚糖合成酶 (YEPB2), β (1, 3)-葡聚糖内切酶 (EBG1), 和几丁质酶(CHI2)基因转录水平上调差异明显。*T. cutaneum* MP 11 与 *T. cutaneum* MS 28 相比, 在参与甘露聚糖降解的有关基因的表达更突出, 与切片电镜观察的细胞壁外壁甘露聚糖厚度差异明显相符合, 几丁质与甘露糖的比值有利于油脂酵母形态改变和油脂合成。

3.4 本章小结

Trichosporon cutaneum 是在生长底物利用和油脂积累方面具有优异性的二态性油脂酵母。经过不同培养体系的离心筛选得到显著差异的 2 株高产油脂菌株 *T. cutaneum* MS28 和 *T. cutaneum* MP 11, 均能同时利用戊糖和己糖实现高指标的油脂浓度。此外还发现离心筛选菌株的细胞体积都呈倍数增加, 胞内的油脂小体数量更多, 代谢更活跃。因此本章主要通过分子生物学角度分析产生这些差异的原因, 探讨生长繁殖方式和细胞壁结构组分变化与油脂酵母形态变化之间的联系, 以及其对油脂生物合成过程的影响。总结以下结论:

(1) *T. cutaneum* ACCC 20271 呈单边顶端出芽, 萌发的芽体不断伸长随后从母体脱落, 停止伸长, 然后子细胞继续分裂产生形状和大小相似的椭圆状细胞。*T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 呈多边出芽, 生长期子细胞尚未从母细胞脱落就会产生新的芽体, 分别形长细胞链和细胞团, *T. cutaneum* MS 28 母体和子细胞宽度相差不大, 芽体脱落后继续伸长或自身分裂产生新个体。*T. cutaneum* MP 11 芽体在脱落之前明显比母细胞尺寸更小, 脱落之后大部分子细胞开始伸长和变宽。通过全油脂发酵过程细胞形态观察发现, *T. cutaneum* MS 28 油脂积累中期细胞形态会变小, 而 *T. cutaneum* MP 11 基本能维持最大的细胞体积, 说明细胞形态与细胞繁殖方式有一定的联系。

(2) 利用透射电子显微镜观察 *T. cutaneum* 的细胞壁发现, 细胞体积越大和生长代谢越活跃的细胞的油脂酵母的细胞壁越薄, 同时胞内的油脂含量更高。在测定细胞壁组分发现, 原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271, 筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 细胞壁单位表面积几丁质和单糖聚合物的比值分别为 0.05, 0.09 和 0.28。几丁质和单糖聚合物的比值越高细胞壁越薄, 有助于细胞形态改变和油脂积累。*T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 细胞壁葡聚糖和甘露聚糖含量降低, 差异十分明显。细胞壁合成代谢相关基因转录水平也有不同程度地上调和下调。因此可以猜测甘露聚糖和葡聚糖的分解和几丁质的合成有利于油脂发酵, 外壁甘露聚糖改变细胞的孔隙有利于底物的吸收转化, 同时几丁质作为补偿机制, 通过赋予细胞拉伸强度以对抗细胞的破裂。

(3) 2 株超离心筛选菌株胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量相比原始菌株 *T. cutaneum*

ACCC 20271 更高,意味着影响油脂积累的关键前体物质的供给能力更强。乙酰辅酶 A, NADPH 和脂肪酸合成部分相关基因发生了不同程度的上调表达,生长和油脂积累更快 *T. cutaneum* MS 28 差异非常显著,甘油三酯合成最后阶段相关酶的表达差异不突出。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论和创新

微生物将木质纤维素来源可发酵糖转化为微生物油脂，是生物柴油生产过程中可靠的方法，有助于农业废弃物可持续利用和提高商业化生产生物柴油替代化石燃料的经济可行性。发酵菌株的油脂积累性能直接影响油脂的产量，因此筛选出高产油脂酵母是提高油脂产量的重要一步。*Trichosporon cutaneum* 是在生长底物利用和油脂积累方面具有优异性的二态性油脂酵母。*T. cutaneum* ACCC 20271 在玉米秸秆水解液进行油脂发酵，油脂积累能力不同的细胞之间产生密度差异，在离心力作用下有效地分离轻重细胞，富集得到油脂发酵性能优异的菌株 *T. cutaneum* MS 28。本研究为了验证超速离心筛选高产油脂酵母的可行性，探究筛选菌株利用木质纤维素发酵产油的性能，从分子生物学角度了解产生差异的可能因素，综合得出以下结论：

(1) *T. cutaneum* ACCC 20271 在合成培养基体系适应性驯化过程，通过发生突变以响应生存环境的变化。细胞油脂含量达到一定程度，离心后具有漂浮的特性，快速增加离心力至 43000 xg，特异性分离得到油脂生产能力优异的菌株 *T. cutaneum* MP 11，细胞含有率达到 70%。同时，观察发酵液密度能快速有效地判断筛选过程中的变化，节约油脂提取操作时间和成本。结果说明超离心筛选方法具有普适性和针对性，能够实现高通量快速筛选，不局限于木质纤维素水解液培养体系。实验结果为高效生产油脂菌株的筛选提高了良好的借鉴和理论指导。

(2) 15%固含量玉米粉水解液的油脂发酵结果显示 *T. cutaneum* 筛选菌株的发酵性能大幅度提高。30%高固含量麦秆同步糖化共发酵实验结果显示，原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 仅能够利用部分葡萄糖。筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 能够同时利用木质纤维素来源己糖和戊糖进行油脂生产，*T. cutaneum* MS 28 积累 32.8 g/L 油脂，*T. cutaneum* MP 11 积累 34.4 g/L 油脂。*T. cutaneum* MP 11 油脂生产能力更强，适合作为发酵菌株应用于木质纤维素油脂生产，具有重要的工业应用价值。筛选菌株 *T. cutaneum* MS 28 和 *T. cutaneum* MP 11 的饱和脂肪酸含量比出发菌株高，具有更高的十六烷值。同时，利用木质纤维素原料生产的油脂主要包含 C16 和 C18 长链脂肪酸，是理想的生物柴油前体。

(3) *T. cutaneum* ACCC 20271 呈单边顶端出芽，子细胞产生形状和大小相似的椭圆状细胞。*T. cutaneum* MS 28 母细胞与子细胞宽度差别不大。芽体脱落之后，它们经过伸长或自身分裂产生新细胞。*T. cutaneum* MP 11 芽体在脱落之前尺寸明显小于母细胞，脱落之后大部分子细胞开始伸长和变宽。从油脂发酵过程细胞形态观察发现细胞形态与细胞繁殖方式密切相关。利用透射电子显微镜观察 *T. cutaneum* 的细胞壁发现，细胞体积越大和生长代谢越活跃的细胞的油脂酵母的细胞壁越薄，同时胞内的油脂含量更高。几

丁质和单糖聚合物的比值越高细胞壁越薄，有利于细胞形态的改变和油脂的积累。结合 qRT-PCR 可以猜测甘露聚糖和葡聚糖的分解和几丁质的合成有利于油脂发酵，外壁甘露聚糖改变细胞的孔隙有利于底物的吸收转化，同时几丁质通过赋予细胞拉伸强度以对抗细胞的破裂。该结果同时为提高胞内产物的规律性技术提供新的理念。

(4) 2 株超离心筛选菌株胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量相比原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 更高，意味着影响油脂积累的关键前体物质的供给能力更强。乙酰辅酶 A，NADPH 和脂肪酸合成部分相关基因发生了不同程度的上调表达，生长和油脂积累更快 *T. cutaneum* MS 28 差异异常显著，甘油三酯合成最后步骤相关酶的表达差异不突出。

4.2 展望

本研究继续通过超速离心筛选的方法得到油脂积累能力大幅度提升的 *T. cutaneum* MP 11。结合 *T. cutaneum* 油脂积累能力，细胞形态和细胞壁组分差异的分析，发现三者之间存在一定的联系，存在的问题需要进一步的探究和展望：

(1) 在不同的培养体系进行 *T. cutaneum* 离心筛选成功，验证了此方法的可行性。超速离心筛选可以进一步推广至提高其他油脂微生物油脂积累能力。

(2) 木质纤维素油脂生产是复杂的好氧发酵过程，高产油脂筛选菌株的生长方式和形态差异影响溶氧需求等，继续优化发酵参数提高油脂的产量以满足商业化生产需求，显得非常重要。

(3) 油脂酵母细胞生长方式和细胞壁的代谢修饰，对细胞形态有重要的影响，对提高胞内油脂产量具有一定的意义。可以通过基因改造，物理化学压力和酶法调节细胞壁各组分的比值降低细胞壁的厚度，验证细胞壁对油脂酵母或者生产其他胞内产物菌株的细胞形态和目的代谢产物的意义。

(4) 筛选菌株的油脂合成相关部分基因转录水平差异明显，利用构建好的表达系统进行相关遗传操作，验证其发挥的功能及对油脂合成的影响。

参考文献

- [1] Jun Sun, Xiaoqian Xiong, Mudan Wang, et al. Microalgae biodiesel production in China: A preliminary economic analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019, 104: 296–306.
- [2] Zhiqiang Zhang, Shanying Hu, Dingjiang Chen, et al. An analysis of an ethanol-based, whole-crop refinery system in China. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2016, 24: 1609–1618.
- [3] Rujiralai Poontawee, Wichien Yongmanitchai, Savitree Limtong, et al. Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. *Process Biochemistry*. 2017, 53: 44-60.
- [4] T.M.I. Mahlia, Z.A.H.S. Syazmi, M. Mofijur, et al. Patent landscape review on biodiesel production: Technology updates. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020, 118: 109-526.
- [5] Abu Yousuf. Biodiesel from lignocellulosic biomass - Prospects and challenges. *Waste Management*. 2012, 32: 2061-2067.
- [6] Irnayuli R, et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*. 2014, 32: 1336-1360.
- [7] Ayhan Demirbas. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*. 2009, 50: 14-34.
- [8] Ma F, Hanna M A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*. 1999, 70(1): 1-15.
- [9] Muktham Radhakumari, Mohamed Taha, Esmaeil Shahsavari, et al. Pongamia pinnata seed residue e A low cost inedible resource for on-site/in-house lignocellulases and sustainable ethanol production. *Renewable Energy*. 2017, 103: 682-687.
- [10] Atabani A E, Silitonga A S, Badruddin I A, et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012, 16(4): 2070-2093.
- [11] Yan et al. Integrated lipase production and in situ biodiesel synthesis in a recombinant *Pichia pastoris* yeast: an efficient dual biocatalytic system composed of cell free enzymes and whole cell catalysts. *Biotechnology for Biofuels* 2014, 7:55
- [12] Muktham Radhakumari, Mohamed Taha, Esmaeil Shahsavari, et al. Pongamia pinnata seed residue e A low cost inedible resource for on-site/in-house lignocellulases and sustainable ethanol production. *Renewable Energy* 103 (2017) 682-687.

- [13] Zhiqiang Zhang, Shanying Hu, Dingjiang Chen, et al. An analysis of an ethanol-based, whole-crop refinery system in China. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2016, 24: 1609–1618.
- [14] Knauf M, Moniruzzaman M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. *International Sugar Journal*, 2004, 106(1263): 147-150.
- [15] Isikgor FH, Becer CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*. 2015, 6(25): 4497-4559.
- [16] van Wyk JPH. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends Biotechnology*. 2001, 19(5): 172–177.
- [17] Cateto C, Hu G, Ragauskas A. Enzymatic hydrolysis of organosolv Kanlow switchgrass and its impact on cellulose crystallinity and degree of polymerization. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4(4): 1516-1521.
- [18] Cherubini F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 2010, 51 (7): 1412-1421.
- [19] Tanimura A, Takashima M, Sugita T, et al. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2014, 153(2): 230-235.
- [20] Hong J, Ye X, Zhang YH. Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications. *Langmuir*. 2007, 23: 12535-12540.
- [21] Pan X, Xie D, Gilkes N, et al. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005, 124: 1069-1080.
- [22] Singh J, Suhag M, Dhaka A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 117: 624-631.
- [23] Kim JS, Lee YY, Kim TH. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 42-48.
- [24] Cao S, Pu Y, Studer M, et al. Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment. *Royal Society of Chemistry Advances*. 2012, 2: 10925-10936
- [25] Zhang J, Wang X, Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480–4488.
- [26] Palmqvist E, Hahnhägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 2000, 74(1): 25-33.

- [27] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, 31(1): 20.
- [28] Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 16.
- [29] Ibraheem O, Ndimba BK. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose derived inhibitory compounds. *International Journal of Biological Sciences*. 2013, 9(6): 598-612.
- [30] Modig T, Liden G, Taherzadeh MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 2002, 363: 769-776.
- [31] Hadi SM, Shahabuddin H, Rehman A. Specificity of the interaction of furfural with DNA. *Mutation Research Letters*. 1989, 225: 101-106.
- [32] Shahabuddin H, Rahman A, Hadi SM. Reaction of furfural and methylfurfural with DNA: Use of single-strand-specific nucleases. *Food and Chemical Toxicology*. 1991, 29: 719-721.
- [33] Chandel A K, Silva S S D, Singh O V. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology. *Bioenergy Research*, 2013, 6(1): 388-401.
- [34] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2011, 31(1): 20-31.
- [35] He YQ, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 19.
- [36] Gao X, Gao Q, Bao J. Tolerance response and metabolism of acetic acid by biodetoxification fungus *Amorphotheca resinae* ZN1. *Journal of Biotechnology*. 2018, 275: 31-39.
- [37] Keshwani DR, Cheng JJ. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. *Bioresource Technology*. 2009, 100: 1515-1523.
- [38] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *Journal of Biotechnology*. 2011, 156(4): 286-301.
- [39] Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*. 2003, 19(4): 1109-1117.

- [40] Cotana F, Cavalaglio G, Gelosia M, et al. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2015, 69: 424-432.
- [41] Ask M, Olofsson K, Felice TD, et al. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2012, 47(10): 1452-1459.
- [42] Gang Liu, Qiang Zhang, et al. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*(IF 3.952), 2018, 115:60-69.
- [43] Jingbai Wen, Jie Bao. Engineering *Corynebacterium glutamicum* triggers glutamic acid accumulation in biotin rich corn stover hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*(IF 5.452),2019, 12:86.
- [44] Weiliang Hou, Jie Bao. Simultaneous saccharification and aerobic fermentation of high titer cellulosic citric acid by filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 2018, 253:72–78.
- [45] Weiliang Hou, Maofen Zhang, Jie Bao. Cascade hydrolysis and fermentation of corn stover for production of high titer gluconic and xylonic acids. *Bioresource Technology*. 2018, 264:395–399.
- [46] Zhongyang Qiu, Qiuqiang Gao, Jie Bao. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresource Technology*. 2017, 245:1369-1376.
- [47] Dipesh Kumar, Bhaskar Singh, John Korstad. Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, 73: 654-671.
- [48] Sara A. Shields-Menard, Marta Amirsadeghi, et al. A review on microbial lipids as a potential biofuel. *Bioresource Technology*. 2018, 259: 451-460.
- [49] Sravan Kumar Yellapu, Bharti, Rajwinder Kaur, et al. Recent developments of downstream processing for microbial lipids and conversion to biodiesel. *Bioresource Technology*. 2018, 256: 515-528.
- [50] Omama Kamoun, Gangatharan Muralitharan, et al. Suitable carbon sources selection and ranking for biodiesel production by oleaginous *Mucor circinelloides* using multi-criteria analysis approach. *Fuel*. 2019, 257: 116-117.
- [51] M. Madani, M. Enshaeieh, A. Abdoli, et al. Single cell oil and its application for biodiesel production, *Process Safety and Environmental Protection*. 2017, 111: 747-756.
- [52] Hyun Uk Cho, Jong Moon Park. Biodiesel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes. *Bioresource Technology*. 2018, 256: 502-508.

- [53] Diptesh Mahajan, Sombuddha Sengupta, Shampa Sen, et al. Strategies to improve microbial lipid production: Optimization techniques. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019, 22: 101-321
- [54] Baharak Sajjadi, Wei-Yin Chen, Abdul. Aziz. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2018, 97: 200-232.
- [55] Stamatia Bellou, Mohammed N. Baeshen, Ahmed M. Elazzazy, et al. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*. 2014, 32(8): 1476-1493.
- [56] Kang, N.K., Kim, E.K., Kim, Y.U. et al. Increased lipid production by heterologous expression of AtWRI1 transcription factor in *Nannochloropsis salina*. *Biotechnol Biofuels*. 2017, 10: 231.
- [57] Tian-Yuan Zhang, Hong-Ying Hu, Yin-Hu Wu, et al. Promising solutions to solve the bottlenecks in the large-scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production. 2016, 60: 1602-1614.
- [58] Pedro D.M.P. Da Silva, Filipa Lima, Maria Madalena Alves, et al. Valorization of lubricant-based wastewater for bacterial neutral lipids production: Growth-linked biosynthesis. *Water Research*. 2016, 101: 17-24.
- [59] Samia Qadeer, Azeem Khalid, Shahid Mahmood, et al. Utilizing oleaginous bacteria and fungi for cleaner energy production. *Journal of Cleaner Production*. 2017, 168: 917-928.
- [60] Ashis Ranjan Behera, Kasturi Dutta, Priyanka Verma, et al. High lipid accumulating bacteria isolated from dairy effluent scum grown on dairy wastewater as potential biodiesel feedstock. *Journal of Environmental Management*. 2019, 252: 109686.
- [61] Samia Qadeer, Shahid Mahmood, Muzammil Anjum, et al. Synchronization of lipid-based biofuel production with waste treatment using oleaginous bacteria: A biorefinery concept. *Process Safety and Environmental Protection*. 2018, 115: 99-107.
- [62] Lu Liu, Junhui Chen, Phaik-Eem Lim, et al. Enhanced single cell oil production by mixed culture of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula glutinis* using cassava bagasse hydrolysate as carbon source. *Bioresource Technology*. 2018, 255: 40-148.
- [63] Omama Kamoun, et al. *Fusarium verticillioides* as a single-cell oil source for biodiesel production and dietary supplements. *Process Safety and Environmental Protection*. 2018, 118: 68-78.
- [64] Ana Karine F. Carvalho, et al. Direct transesterification of *Mucor circinelloides* biomass for biodiesel production: Effect of carbon sources on the accumulation of fungal lipids and biofuel properties. *Fuel*. 2018, 234: 789-796.
- [65] Sukanya Jeennor, et al. Diacylglycerol acyltransferase 2 of *Mortierella alpina* with

- specificity on long-chain polyunsaturated fatty acids: A potential tool for reconstituting lipids with nutritional value. *Journal of Biotechnology*. 2017, 263: 45-51.
- [66] Bo L, Zhao Z B. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82(8): 775-780.
- [67] F. Donot, A. Fontana, J.C. Baccou, et al. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and Bioenergy*. 2014, 68: 135-150.
- [68] Liu L, Pan A, Spofford C, et al. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*. 2015, 29: 36-45.
- [69] Wu S, Hu C, Jin G, et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*. 2010, 101(15): 6124.
- [70] Chen X F, Huang C, Yang X Y, et al. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. *Bioresource Technology*. 2013, 143(6): 18.
- [71] Radulovic, M., Knittelfelder, O., Cristobal-Sarramian, A., et al. The emergence of lipid droplets in yeast: Current status and experimental approaches. *Current Genetics*. 2013, 59(4): 231-242.
- [72] Ahmad M. Abdel-Mawgoud, Kelly A. Markham, Claire M. Palmer, et al. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*. 2018, 50: 192-208.
- [73] Xu P, Qiao K, Ahn WS, Stephanopoulos G. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop - in transportation fuels and oleochemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016, 113(39): 10848-10853.
- [74] Xu, P.a, Qiao, K., Stephanopoulos, G.. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017, 114(7): 1521-1530.
- [75] Zbigniew Lazar, Thierry Dulermo, Cécile Neuvéglise, et al. Hexokinase—A limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*. 2014, 26: 89-99.
- [76] Patricia J. Slininger, Bruce S. Dien, Cletus P. Kurtzman. Comparative lipid production by oleaginous yeasts in hydrolyzates of lignocellulosic biomass and process strategy for high titers. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016, 133(8): 1676-1690.
- [77] Ines Ayadi, Hafedh Belghith, Ali Gargouri, et al. Screening of new oleaginous yeasts for single cell oil production, hydrolytic potential exploitation and agro-industrial by-products valorization. *Process Safety and Environmental Protection*. 2018, 119: 104-114.
- [78] Aurélie Capus, Marianne Monnerat, Luiz Carlos Ribeiro, et al. Application of high-content image analysis for quantitatively estimating lipid accumulation in oleaginous yeasts with potential for use in biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2016, 203:

309-317.

- [79] Alok Patel, Vikas Pruthi, Parul A. Pruthi. Innovative screening approach for the identification of triacylglycerol accumulating oleaginous strains. *Renewable Energy*. 2019, 135: 936-944.
- [80] Wang J, Gao Q Q, Bao J. Genome sequence of *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271: An oleaginous yeast with excellent lignocellulose derived inhibitor tolerance. *Journal of Biotechnology*. 2016, 228: 50.
- [81] 胡明珊. 木质纤维素碳源的皮状丝孢酵母菌种筛选与微生物油脂发酵研究[D]. 华东理工大学. 2018.
- [82] 侯伟亮. 生物燃料和化学品的好氧生物炼制研究[D]. 华东理工大学. 2019.
- [83] Liu L, Pan A, Spofford C, et al. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*. 2015, 29: 36-45.
- [84] Denic V, Weissman J S. A Molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell*. 2007, 130(4): 663-77.
- [85] Vasiliki Tsakraklides, Annapurna Kamineni, Andrew L. Consiglio, et al. High-oleate yeast oil without polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, 11: 131.
- [86] Xu P, Qiao K, Ahn WS, Stephanopoulos G. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016, 113: 10848-53.
- [87] Beopoulos A, Verbeke J, Bordes F, Guicherd M, et al. Metabolic engineering for ricinoleic acid production in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014, 98:251-62.
- [88] Bu, So Young, Mashek, et al. Suppression of Long Chain Acyl-CoA Synthetase 3 Decreases Hepatic de Novo Fatty Acid Synthesis through Decreased Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(44): 32474-30483.
- [89] Mahesh Khot, Gouri Raut, Debashish Ghosh, et al. Lipid recovery from oleaginous yeasts: Perspectives and challenges for industrial applications. *Fuel*. 2020, 259: 116292.
- [90] Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P.W., et al. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270(3): 1170-1178
- [91] Kollár, R., Reinhold, B.B., Petraková, E., et al. Architecture of the yeast cell wall: $\beta(1\rightarrow6)$ glucan interconnects mannoprotein, $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272(28): 17762-17775.
- [92] Nguyen, T.H., Fleet, G.H., Rogers, P.L.. Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998, 50(2): 206-212.
- [93] Vega, R., Domínguez, A.. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of

- Yarrowia lipolytica*. Archives of Microbiology. 1986, 144(2): 124-130.
- [94] Depree, J., Emerson, G.W., Sullivan, P.A. The cell wall of the oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. Journal of General Microbiology. 1993, 139(9):2123-2133.
- [95] Aguilar-Uscanga, B., François, J.M.. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letters in Applied Microbiology. 2003, 37(3): 268-274.
- [96] Pilar Pérez, Juan C.G. Cortés, Jose Cansadob. Fission yeast cell wall biosynthesis and cell integrity signalling. The Cell Surface. 2018, 4: 1-9.
- [97] Michael Knop. Yeast cell morphology and sexual reproduction - A short overview and some considerations. Comptes Rendus Biologies. 2011, 334(8-9): 599-60.6
- [98] Gladfelter, A.S.. Nuclear anarchy: asynchronous mitosis in multinucleated fungal hyphae. Current Opinion in Microbiology. 2006, 9(6): 547-552.
- [99] O'Shea, D.G., Walsh, P.K.. The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: A study incorporating image analysis. Applied Microbiology and Biotechnology. 2000, 53(3): 316-322.
- [100] Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., tyles, C.A., et al. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. Cell. 1992, 68(6): 1077-1099.
- [101] Hood, M.E., Antonovics, J.. Mating Within the Meiotic Tetrad and the Maintenance of Genomic Heterozygosity. Genetics. 2001, 166(4): 1751-1759.
- [102] I. Belo, R. Pinheiro, M. Mota. Morphological and physiological changes in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air. Journal of Biotechnology 2005, 115 (4): 397-404.
- [103] Andreishcheva EN, Isakova EP, Sidorov NN, et al. Adaptation to salt stress in a salt-tolerant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Biochem Mosc. 1999, 64: 1061-1067.
- [104] Ya Wang , Riming Yan , Lijuan Tang, et al. Dimorphism of *Trichosporon cutaneum* and impact on its lipid production. Biotechnology for Biofuels. 2019, 12: 203.
- [105] 赵瞭. 超离心筛选皮状丝孢酵母油脂积累的分子生物学机制解析及其遗传操作 [D]. 华东理工大学. 2019.

硕士期间研究成果

待发表论文:

Min-Ping Lu¹, Mingshan Hu¹, Liao Zhao¹, Yi Zhang, Weiliang Hou, Jie Bao*. Precise and whole-throughput screening of the lightest oleaginous yeast cells from adaptive evolution of cellulosic lipid fermentation. *Energy & Environmental Science*.

致谢

年初新冠病毒在中国肆虐蔓延，彻底地改变了我们的 2020 年。我要感谢从中央地方、一线医务工作者、建设工人到每一个普通人的坚守，中国从疫情战争中取得暂时的胜利，让我们今天能够顺利返校进行毕业答辩。

2020 年是非常难忘的一年，我的硕士研究生活也即将画上句号，开启人生的下一阶段。从考研复试，直至如愿加入华东理工大学生物质能源和生物炼制实验室。在三年的学术研究工作生活中接触到许多优秀的学者，学习了新的知识，体会到科研工作的艰难与快乐。

首先我要感谢鲍老师和张老师对我的指导和鼓励，让我能够顺利进行课题实验，有机会出国参加会议学习开拓眼界。鲍老师是我的论文指导老师，我深深被他对科研事业的坚持和热爱所感染，非常感谢鲍老师！鲍老师的学术专研精神和严谨学风，都是我终生学习的。

其次我要感谢胡明姗和赵瞭师姐，侯伟亮师兄对我的课题实验过程的指导，你们总是不厌其烦地帮助我分析和解决实验过程存在的问题。感谢张翼师弟对实验的支持与帮助！感谢室友刘旭霞，刘利和刘姗姗的帮助！感谢同级方纯，李园园，郑理想，黄振和韩涛的支持，陪伴我度过这令人难忘的三年时间，期望你们都能够一切顺利，幸福美满！

最后感恩九思和阿离的 10 年的陪伴，无论何时何地都会支持我的决定，接受和忍耐我的不足。特别感谢我的家人，一直支持和鼓励我自己选择未来的方向！

卢敏萍

卷 内 备 考 表

本卷情况说明

本卷共 肆拾玖 页

立卷人_____

检查人_____

立卷时间_____