

学校代码：10251

学 号：Y45170512

華東理工大學

碩 士 学 位 论 文

论文题目：纤维素酶胁迫下超高速离心筛选皮
状丝孢酵母及微生物油脂发酵研究

工程领域：生物工程

研究方向：生物炼制

论文作者：李园园

学校教师：鲍杰 教授

企业教师：王华明 首席科学家

定稿日期：2020 年 05 月 25

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

纤维素酶胁迫下超高速离心筛选
皮状丝孢酵母及微生物油脂发酵研究

李园园

指导教师姓名: _____ 鲍杰 教授 生物工程学院

王华明 首席科学家 青岛蔚蓝生物科技有限公司

申请学位级别: _____ 硕士 _____ 专业名称: _____ 生物工程 _____

论文定稿日期: _____ 2020. 5. 25 _____ 论文答辩日期: _____ 2020. 6. 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：

年 月 日

指导教师签名：

年 月 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

纤维素酶胁迫下超高速离心筛选皮状丝孢酵母及微生物油脂发酵研究

摘要

以木质纤维素生物质为碳源发酵生产微生物油脂是生产生物柴油油脂原料的重要途径之一。皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* 是一种能够耐受木质纤维素来源抑制物的油脂酵母，对木质纤维素体系具有极好的适应性。高产油脂酵母的筛选方法普遍操作复杂、筛选效率低，因此寻找出一种简单、快速、无遗漏的高通量筛选方法十分重要。在本实验室前期研究工作中，基于不同含油率的细胞存在密度差异这一简单原理，通过高速离心筛选的方法获得了一株油脂产量提高的菌株 *T. cutaneum* MS 28。显微镜观察结果表明，*T. cutaneum* MS 28 相比于出发菌株细胞体积变大，细胞壁变薄，因此推测细胞形态与油脂积累之间有紧密联系。

T. cutaneum 酵母细胞壁主要有葡聚糖，甘露聚糖及少量的几丁质组成，纤维素酶能够降解细胞壁中的葡聚糖，影响细胞壁的生物合成。本文以 *T. cutaneum* ACCC 20271 为出发菌株，在 *T. cutaneum* ACCC 20271 发酵培养基中加入纤维素酶进行长周期的适应性进化培养，结果表明纤维素酶胁迫下的 *T. cutaneum* ACCC 20271 细胞快速改变了其细胞壁组分和细胞形态，细胞壁变薄，细胞体积迅速变大；细胞壁更薄、体积更大的 *T. cutaneum* 细胞具有更大的微生物油脂积累空间，更有利于进行营养物质的传递、生物合成和油脂积累。对纤维素酶胁迫下的 *T. cutaneum* 适应性进化的细胞采用超高速离心筛选，最终得到了一株油脂产量显著提高的突变菌株 *T. cutaneum* YY 52。对 *T. cutaneum* YY 52 在木质纤维素体系中的发酵性能进行测定，采用同步糖化与共发酵的方式，探究了 *T. cutaneum* YY 52 对不同原料、不同生物脱毒方式的发酵结果，并与出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行了比较。当 *T. cutaneum* YY 52 以小麦秸秆为原料进行发酵时，最终油脂浓度达到了 55.4 g/L；以玉米秸秆为原料进行发酵时，最终油脂浓度高达 58.4 g/L；两个发酵指标均为目前国内外纤维素原料生产微生物油脂的最高水平。

油脂属于细胞内产物，油脂提取困难是纤维素油脂工业化应用的主要问题之一。细胞壁破裂不仅耗时较长而且需要的成本较高。本文尝试在 *T. cutaneum* 酵母发酵培养基中添加纤维素酶，在得到高油脂产量的同时，细胞在发酵后期因细胞壁极薄而发生细胞破裂，从而更方便快速的提取油脂。

综上所述，本文通过在 *T. cutaneum* 酵母适应性进化的培养基中加入纤维素酶，使其细胞形态快速改变，细胞油脂积累能力增强，采用超高速离心筛选方法最终筛选出一株高产油脂酵母 *T. cutaneum* YY 52，实现了高指标的纤维素微生物油脂发酵，该方法为提高微生物油脂和微生物胞内产物产量提供了一个新思路。

关键词：皮状丝孢酵母；纤维素酶；细胞形态；纤维素油脂；超高速离心筛选

Screening *Trichosporon cutaneum* under cellulase stress by ultra-high speed centrifugation and microbial lipid fermentation

Abstract

Microbial lipid fermentation using lignocellulose is one of the important ways to produce biodiesel raw materials. *Trichosporon cutaneum* is an oleaginous yeast which can resist the inhibition of lignocellulosic source and has excellent adaptability to lignocellulose. Screening methods for high-yield oil-producing yeast are generally complex and have low screening efficiency. Therefore, it is important to find a simple, fast, and high-throughput screening method without omission. In the previous research work, based on the principle of the density difference with different lipid content, high-speed centrifugal screening method was used to obtain the *T. cutaneum* MS 28 with increased lipid production. Microscopic observations show that *T. cutaneum* MS 28 has larger cell volume and thinner cell wall than the original strain, so it is speculated that there is a close relationship between cell morphology and lipid accumulation.

The cell wall of *Trichosporon cutaneum* is mainly composed of dextran, mannan and a small amount of chitin. Cellulase can degrade glucan in the cell wall and affect biosynthesis. This article takes *T. cutaneum* ACCC 20271 as the starting strain and adds cellulase to *T. cutaneum* ACCC 20271 fermentation medium for long-term adaptive evolution. Results showed that *T. cutaneum* ACCC 20271 cells under cellulase stress rapidly changed its cell wall composition and cell morphology, the cell wall became thinner, and the cell volume became larger rapidly; *T. cutaneum* with thinner cell walls and larger volume has larger space for microbial oil accumulation, which is more conducive to the transfer of nutrients, biosynthesis and oil accumulation. Using ultra-high-speed centrifugal screening for the adaptive evolution of *T. cutaneum* under cellulase stress, a mutant strain *T. cutaneum* YY 52 with significantly improved lipid production was finally obtained. The fermentation performance of *T. cutaneum* YY 52 in the lignocellulose system was measured. When *T. cutaneum* YY 52 was fermented with wheat straw as raw material, the final lipid concentration reached 55.39 g/L. When fermented with corn stover as raw material, the final lipid concentration is as high as 58.39 g/L. Both fermentation indicators are currently the highest levels of microbial lipid production by lignocellulose.

Lipid are intracellular products, and the difficulty in extracting lipid is one of the main problems restricting the industrial application of cellulose lipid. Cell wall rupture is not only time-consuming but also costly. This article attempts to add cellulase to the *T. cutaneum* fermentation medium. While obtaining high lipid production, the cells rupture due to the

extremely thin cell wall in the late stage of fermentation, making it easier and faster to extract the oil.

In summary, in this paper, by adding cellulase to the adaptive evolution medium of *T. cutaneum*, the cell morphology is rapidly changed, and lipid accumulation ability is enhanced. The ultra-high speed centrifugal screening method is used to finally screen a high-yield lipid yeast *T. cutaneum* YY 52, which achieves high-index cellulose microbial lipid fermentation, this method provides a new idea for improving the production of microbial lipid and microbial intracellular products

Keywords: *Trichosporon cutaneum*; cellulase; cell morphology; cellulosic lipid; ultra-high speed centrifugation screening

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 生物柴油发展概述.....	1
1.2 产油微生物及高产油脂菌株筛选方法.....	2
1.2.1 产油微生物概述.....	2
1.2.2 高产油脂菌株的筛选.....	3
1.2.3 离心筛选皮状丝孢酵母.....	4
1.3 木质纤维素生物炼制生产微生物油脂.....	5
1.3.1 木质纤维素预处理.....	6
1.3.2 木质纤维素生物脱毒.....	7
1.3.3 木质纤维素水解糖化及发酵.....	8
1.3.4 木质纤维素生物炼制微生物油脂.....	8
1.4 酵母细胞形态及细胞壁代谢.....	9
1.4.1 酵母细胞形态.....	9
1.4.2 酵母细胞壁代谢.....	9
1.5 本论文的立题依据及主要研究内容.....	10
第 2 章 纤维素酶胁迫下皮状丝孢酵母菌株的适应性进化与超高速离心筛 选.....	12
2.1 引言.....	12
2.2 实验材料.....	13
2.2.1 原料.....	13
2.2.2 纤维素酶.....	13
2.2.3 菌株及培养基.....	13
2.3 实验方法.....	13
2.3.1 种子培养.....	13
2.3.2 小麦秸秆预处理.....	13
2.3.3 预处理小麦秸秆生物脱毒.....	14
2.3.4 水解液制备.....	14
2.3.5 纤维素酶胁迫下 <i>T. cutaneum</i> 酵母的适应性进化与超高速离心筛选.....	14
2.3.6 筛选菌株 <i>T. cutaneum</i> YY 52 高产油脂稳定性验证.....	14

2.3.7	发酵后期细胞因细胞壁极薄而发生破裂的可行性探究.....	15
2.3.8	葡萄糖含量测定.....	15
2.3.9	菌体干重及油脂测定.....	15
2.3.10	细胞形态观察.....	16
2.3.11	细胞壁组分测定.....	16
2.4	结果与讨论.....	16
2.4.1	纤维素酶胁迫下 <i>T. cutaneum</i> 酵母的适应性进化与超高速离心筛选.....	16
2.4.2	适应性进化与超高速筛选过程中不同转接次数的细胞形态观察.....	18
2.4.3	<i>T. cutaneum</i> YY 52 高产油脂稳定性验证.....	19
2.4.4	不同时期 <i>T. cutaneum</i> YY 52 与 <i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 细胞形态对比.....	20
2.4.5	细胞壁组分测定.....	21
2.4.6	发酵后期细胞因细胞壁极薄而发生破裂的可行性探究.....	22
2.4.7	发酵后期细胞因细胞壁极薄而发生破裂的可行性探究中细胞形态变化.....	23
2.5	本章小结.....	25
第 3 章 <i>T. cutaneum</i> YY 52 木质纤维素原料同步糖化共发酵生产油脂.....		26
3.1	引言.....	26
3.2	实验材料.....	27
3.2.1	原料.....	27
3.2.2	菌株及培养基.....	27
3.3	实验方法.....	27
3.3.1	种子培养.....	27
3.3.2	小麦秸秆及玉米秸秆预处理.....	27
3.3.3	预处理小麦秸秆与玉米秸秆生物脱毒.....	27
3.3.4	同步糖化与共发酵.....	28
3.3.5	高效液相色谱(HPLC)分析.....	28
3.3.6	油脂测定.....	28
3.4	结果与讨论.....	29
3.4.1	静态生物脱毒小麦秸秆的 SSCF 发酵性能.....	29
3.4.2	快速生物脱毒小麦秸秆的 SSCF 发酵性能.....	30
3.4.3	静态生物脱毒玉米秸秆的 SSCF 发酵性能.....	31
3.4.4	快速生物脱毒玉米秸秆的 SSCF 发酵性能.....	32
3.4.5	纤维素油脂产量对比.....	33
3.5	本章小结.....	35

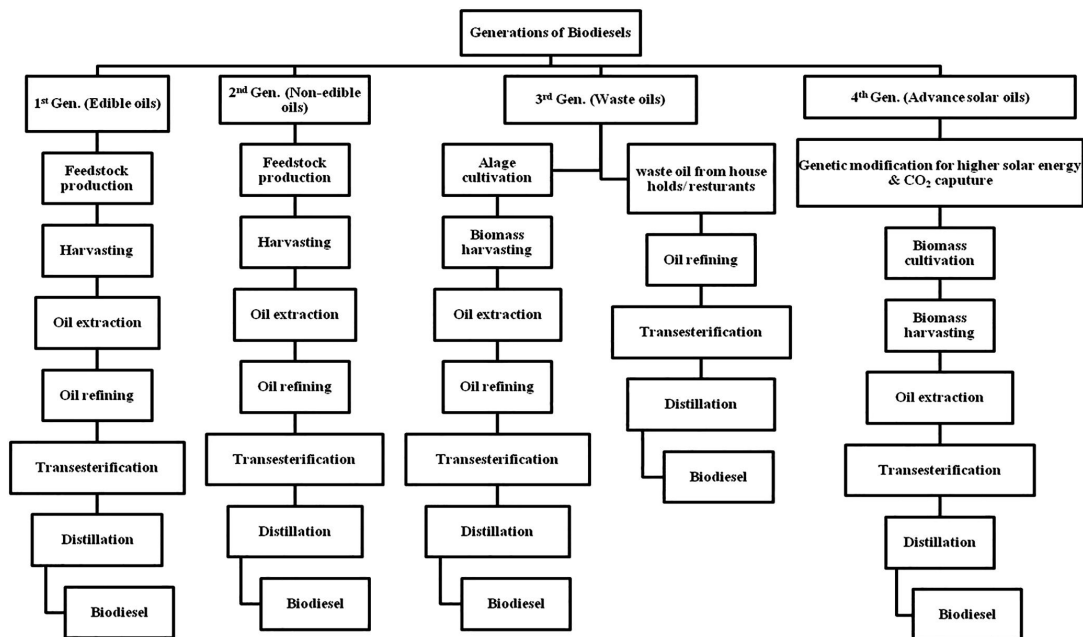
第 4 章 结论与展望.....	36
4.1 结论和创新点.....	36
4.2 展望.....	37
参考文献.....	38
硕士期间研究成果.....	47
致谢.....	48

第 1 章 文献综述

能源是人类长期生存和发展的重要基础。目前,大部分可利用能源主要来自于化石燃料,随着全球经济的快速发展,在化石资源匮乏的同时,造成了严重的环境污染及温室效应。为缓解这些问题,开发利用可持续再生的能源是一种有效的策略。生物柴油的燃料性能与石油基柴油十分相似,其能够很好的替代石化能源^[1]。传统的生物柴油主要是由动植物油脂经过一系列反应后得到,随着生物柴油的需求量逐渐增加,以该方法生产生物柴油已不现实^[2,3]。木质纤维素生物质资源具有廉价、来源广泛、污染少且可再生的优点,以木质纤维素为原料进行生物炼制生产生物柴油具有良好的发展前景^[4,5]。

1.1 生物柴油发展概述

与化石资源相比,生物柴油具有缓解环境污染和可持续发展的潜力^[6]。生物柴油是由 10-11 %的氧,及微量的氮组成,不含硫元素^[7]。生物柴油中的氧含量是一重要指标,可提高发动机的燃烧效率。生物柴油燃烧后产生的未完全燃烧碳氢化合物和聚环芳烃的总排放量分别比常规柴油低 90 %和 75-90 %^{[8],[9]}。此外,生物柴油具有更好的润滑性,从而促进了发动机部件的平稳运转,减少了发动机磨损并延长了发动机寿命^[10]。EASAC (European Academies Science Advisory Council) 将生物柴油的进化分为四代^[12-14]: 第一代生物柴油是由食用原料生产的,主要来自橄榄、棕榈、大豆等油类作物^[15]; 第二代生物柴油是以马华油、茶油等非粮食作物生产的^[16]; 第三代生物柴油主要由微生物发酵和废油产生^[17], 第三代生物柴油的主要优点是温室效应较小、生产率高、油脂百分比较高和对食品供应的影响较小,主要缺点是投资量较大、采油困难等^[18]; 第四代生物柴油指通过使用原材料将太阳能转化为生物柴油,这种转换方法是一个新的研究领域,生产技术尚不成熟。不同代生物柴油的生产工艺如图 1.1 所示, 四代生物柴油的进化主要集中在生物柴油质量的提高,降低对环境的损害,致力于替代化石燃料。若能增加生物柴油的使用量,将会大量减少污染物和可移动致癌物^[19]。通常采用酯交换、热解和超临界流体法生产生物柴油,在这些方法中,生物柴油生产最多使用的是酯交换反应生产生物柴油,甘油作为副产物^[20]。

图 1.1 四代生物柴油生产工艺^[14]Fig. 1.1 Fourth-generation biodiesel production process^[14]

1.2 产油微生物及高产油脂菌株筛选方法

1.2.1 产油微生物概述

一些微生物能够利用糖或有机化合物等碳源生产油脂，其中有些含油率可达 20% 以上，这类微生物被称之为产油微生物^[21]。目前在细菌、霉菌、酵母和藻类中都存在可产油的菌株，主要以霉菌类和酵母类等真核生物为主。产油微生物积累的油脂中，甘油三酯为主要的组分，含量最高，其次是磷脂。微生物在一些营养物质如氮元素缺乏时，菌株开始积累油脂。产油微生物油脂的产量和组分不仅与菌株种类有关，培养环境也是重要的影响因素^[22]。

(1) 产油细菌

产油细菌能够在高含量葡萄糖环境中合成不饱和甘油酯，但绝大多数细菌仅仅只能积累一些复杂类脂，产物主要积累在细胞的外膜，提取难度较大，因而工业化的难度较大^[21]。但经过多方面研究发现有极少数的细菌同样能够在体内合成甘油三酯，有报道称，在土壤中分离得到的一种红球菌细胞含油率可达 70%^[24]。某些原核细菌如最常见的大肠杆菌，因其背景简单，易于培养，且在基因工程方面的操作十分成熟，因此利用基因操作的方法对其进行分子改造生产生物柴油具有一定的可行性，但改造大肠杆菌生产脂肪酸甲酯的产量（1.28 g/L）较低^[25]。

(2) 产油藻类

一般能够产油的藻类其细胞含油率大多在 20%~50% 之间^[26]。但是在特定的培养条件下，油脂含量可达 75% 以上^[27]。微藻合成的脂肪酸种类较多，一般多为不饱和的脂肪酸，如 EPA，DHA 等，常见的产油微藻有螺旋藻和硅藻^[28-30]。以含油藻类为菌株生

产油脂是目前生物柴油的一大来源,此外,微藻体内的某些长链脂肪酸、蛋白质和色素在食品和医疗领域有一定的应用价值^[31]。培养微藻所需的光照、水、碳源等物质是主要的限制因素,较大规模的培养微藻必须利用太阳光,导致地域,气候变化等因素对微藻的生长都有影响,这是工业化生产需要解决的一大问题。

(3) 产油霉菌

某些霉菌由于能够合成一些具有特殊功能的多不饱和脂肪酸而被广泛研究,如花生四烯酸及 γ -亚麻酸等物质。常见的油脂霉菌有:高山被孢霉菌、水霉、轮枝霉等。Xue等人^[32]经过紫外线复合诱变得一株高产油脂的霉菌菌株,其生物量可以达到 28.8 g/L,油脂的产量能达至 15.7 g/L,花生四烯酸可达 623 mg/L。深黄被孢霉菌在一个缺乏氮源的环境中进行发酵,其生物量可以达到 35.9 g/L,油脂产量可达 18.1 g/L,且 γ -亚麻酸在油脂中的质量分数达到 3.5%^[33]。

(4) 产油酵母

酵母一直被认为是合成微生物油脂的模式菌株,酵母中产生的油脂组分与植物油组分相近,因此能够生产生物柴油。酵母的高含油量、培养难度低以及能利用不同底物的特点使其成为微生物油脂进行工业化生产的优良选择。大多数油脂酵母产生的是 C16 及 C18 的长链脂肪酸。目前,已研究报道的油脂酵母约有 70 多种^[34],研究较多的几种酵母包括:皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)、斯达氏油脂酵母(*Lipomyces starkeyi*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、出芽丝孢酵母(*Trichosporon pullulans*)、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)、圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*)等。在酵母中,有些微生物产油含量高达自身干重的 70%,例如粘红酵母,斯巴达酵母,皮状丝孢酵母。目前,影响油脂酵母生产的主要问题有:发酵菌株、生产原料、及胞内油脂的回收困难等^{[35][36][37]}。

1.2.2 高产油脂菌株的筛选

对于高产油脂菌株的筛选,利用分子生物学手段对油脂菌株进行改造提高油脂产量是一种最为常见的筛选方法,但该方法可能存在操作困难,筛选周期较长等问题,因此寻找其他合适的筛选方法同样重要。目前,常用的一些其他筛选方法主要包括以下几种:

(1) 染色法筛选高产油脂菌株。

染色法主要是利用脂溶性染料或与油脂特异性结合的荧光染料对酵母染色后,通过亮度或荧光强度判断细胞内的油脂含量,从而实现筛选。Ma^[38]等人利用苏丹黑染色法,通过在多种菌株中观察细胞内油脂的亮度,筛选出高产油脂的菌株。Rostron^[39]等人通过尼罗红荧光染色法快速的筛选出经过基因工程改造过的高产油脂 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株。Kimura^[40]等人通过优化尼罗红染色及数据处理的关系,建立了一种使用尼罗红荧光探针快速评估微生物细胞内脂质含量的方法,该方法能够适用于多种油脂微生物的筛选。Aurélie^[41]等人利用尼罗红染料对 *Rhodotorula slooffiae* 染色,然后通过共聚焦显微镜观察发现细胞内油脂小体具有多种形态,并以此为依据筛选出含有更多油脂小体的高产油菌株。染色法筛选仅能在少数细胞或者菌落中应用,难以实现细胞或菌

落数较多的高通量筛选，因此适用快速评判。

(2) 诱变法筛选高产油脂菌株。

目前，主要方法有常压等离子体诱变 (ARTP)、紫外诱变及化学试剂诱变等。Cao^[42]等人通过 ARTP 诱变技术可以有效的诱导 DNA 发生多种损伤，从而提高 *Chlorella vulgaris* 的突变率，最终获得了具有遗传稳定性的突变高产油脂菌株。Chandra^[43]等人通过 UV 诱变的方法，筛选出高脂质含量的 *Lyngbya* 菌株，并推断 UV 诱导可能使 *Lyngbya* 体内合成紫外线保护剂及增加细胞内油脂的饱和度。Patel^[44]等人利用化学试剂 EMS 诱变的方法，从八种不同菌株中，筛选出了一株油脂及其他碳水化合物产量均增加的菌株。诱变方法筛选高产油脂微生物能够在短时间内提高细胞的突变率，但突变是随机发生的，突变方向难以掌控。

(3) 特定培养基筛选菌株。

某些油脂微生物能够在特殊的环境中生长从而被筛选出来。Li^[45]等人通过在不添加任何碳源的培养基中培养从不同地方获得的土壤样品，观察这些菌株的生长情况，由于培养基中没有碳源，细胞内的油脂作为一种能源储存物质用以提供细胞生长，因此油脂积累和生长正相关，最终得到高产菌株。Tanimura^[46]等人在 1000 多株菌株中，逐步以葡萄糖，木糖及阿拉伯糖为碳源进行培养筛选，最终筛选得到具有同时利用三种碳源能力的菌株。Li^[47]等人将经过诱变的 *Rhodotorula glutinis* 培养在添加了浅蓝菌素的平板培养基中，在该培养基中生长需具有较高的脂肪酸酶活力，因此能够筛选出油脂含量显著提高的菌株。

1.2.3 离心筛选皮状丝孢酵母

上述传统的油脂菌株筛选方法通常具有一定的局限性，存在筛选数量有限导致效率较低且操作较为复杂等问题，为了能够高效快速的筛选出高产油脂的酵母细胞，本实验室选取了一种新的筛选方法：高速离心筛选法。该方法的建立以胞内油脂含量高的酵母菌株能够漂浮在发酵培养基上表面为依据^[48]，并对本实验室的 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行了高速离心筛选。

T. cutaneum ACCC 20271 通过在木质纤维素中长期驯化转接培养，对木质纤维素中的抑制物具有良好的耐受性，并且能够利用木质纤维素生产油脂，但油脂产量较低，因此筛选高产油脂的 *T. cutaneum* 酵母以木质纤维素为底物生产油脂具有重要意义。油脂的密度低于水，当对 *T. cutaneum* ACCC 20271 发酵结束后的发酵液进行离心后，细胞内油脂含量高时能够漂浮在发酵培养基的上层，低油脂含量的细胞则沉于底部，取最上层发酵液转接至新的培养基中，不断提高离心转速，进行长周期离心转接，最终在高离心转速下筛选得到高产油脂的菌株。基于此原理，首先对 *T. cutaneum* ACCC 20271 在低转速下进行离心，由于初始菌株细胞含油率都较低，因此即使在低转速进行离心，大部分细胞仍将沉在发酵液底部，只有少量油脂含量高的细胞留在上层，将上层的细胞转接至新的培养基中进行发酵，发酵结束后继续以相同的低转速进行离心并转接，如此几次反复，漂浮在上层的细胞逐渐增多，随后提高离心转速可使油脂含量更高的细胞漂浮在上

层，油脂含量相对较低的细胞再次沉入底部；通过提高离心转速，经过较长时间的转接筛选，最终在高离心转速下筛选出油脂含量显著提高的菌株 *T. cutaneum* MS 28。离心筛选法能够快速、高效的区分出油脂含量差异大的菌株，将油脂含量高的细胞筛选出来。该方法操作简单且能在较短时间内筛选出油脂产量显著提高的菌株，为其他油脂微生物的筛选提供了重要的理论依据。

1.3 木质纤维素生物炼制生产微生物油脂

生物质资源主要有农业残留物、林业残留物两种形式，包括作物秸秆、果壳、经济林业产品、废木材等。一般，生物质由三大组分构成：纤维素（葡萄糖聚合物）、半纤维素（戊糖的杂多体，如木糖和少量己糖）和木质素（无定形芳香大分子）^[49]。典型的木质纤维素具有 30 %-50 % 的纤维素、20 %-35 % 的半纤维素和 15 %-30 % 的木质素，同时有少量的灰分，蛋白质等组分^{[50]、[51]}，图 1.2 显示了木质纤维素的组分及结构。中国拥有丰富的木质纤维素资源，平均约 9 亿吨树枝和森林废物以及 7 亿吨农作物秸秆。因此，利用木质纤维素生物质材料制备高附加值产品和液体燃料具有很大的发展潜力^[52]。

生物炼制是利用生物质原料生产生物基产品的炼制过程^[53]，其可以分为 4 种类型^[54]：
 （1）通过秸秆等存在大量纤维素的物质进行生物炼制；（2）利用农作物进行生物炼制；
 （3）利用草、绿色植物等天然原料进行生物炼制；（4）热化学生物炼制，指首先将生物质通过热化学的方法进行转化，随后再利用生物方法将生物质转化成生物基产品。生物炼制主要有四个步骤：（1）对木质纤维素原料进行预处理，（2）预处理后的原料进行生物脱毒，（3）水解糖化脱毒物料，（4）发酵。

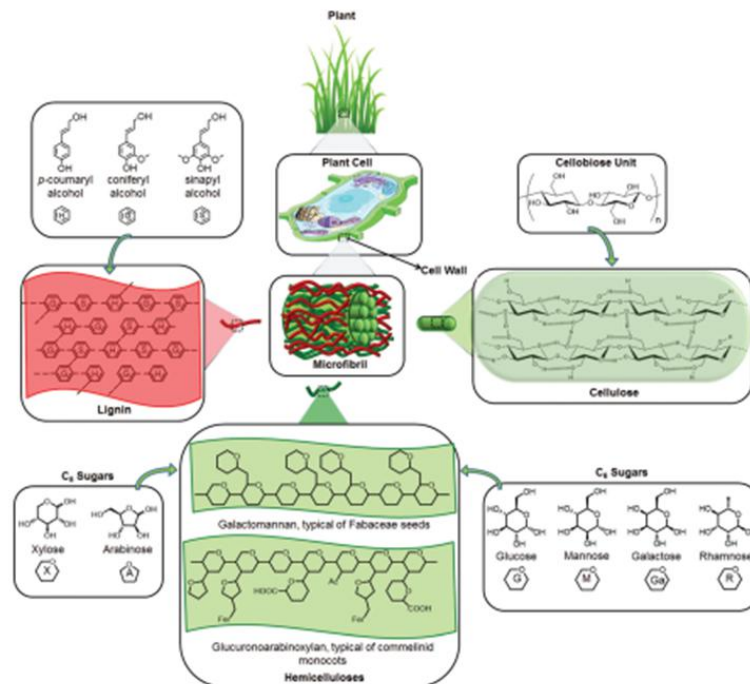


图 1.2 木质纤维素生物质的结构和组分^[52]

Fig. 1.2 Main structure and components of lignocellulose biomass^[52]

1.3.1 木质纤维素预处理

木质纤维素因高度顽抗性难以实现微生物对其直接转化利用^{[55],[56]}。纤维素是经 β -(1-4)-糖苷键连接在一起的线性聚合物,是目前存在的含量最高的聚合物,具有许多有益的特性,例如生物相容性,立体规整性,亲水性和反应性羟基,除非在高温下或在某些催化剂存在下,否则该聚合物不溶于水,它独特的聚合物链以有序的束缚排列和高度结晶的结构导致其稳定的特性,并且其结构决定了细胞壁的框架^[57-59]。半纤维素是由不同的多糖组成的混合物,包括直链和支链的多糖,以连接不同数量的乙酰基和甲基,该多糖具有低聚合度,并且没有结晶区域,因此它相对容易降解为单糖,例如阿拉伯糖,木糖,半乳糖,岩藻糖,右旋糖或葡糖醛酸等^{[60],[61]}。木质素会干扰水解过程,它具有三维多晶网状结构,属于多酚类聚合物^{[62],[63]},这种聚合物以苯基丙烷为单体通过化学键连接形成,缺乏重复单元的规则性和有序性^{[64],[65]}。预处理过程对生物炼制的总体成本及后续工艺条件有很大的影响,预处理工艺改变了木质纤维素的微观结构、宏观结构和化学成分。预处理方法应符合以下几点要求^{[66]-[68]}:(1)避免还原糖的损失和降解;(2)有利于后续水解发酵的研究;(3)避免有害副产品,这些副产品不利于随后的发酵和糖化过程;(4)避免使用化学试剂污染环境或严重腐蚀设备;(5)减少固体残留物的产生,或充分利用这些材料以避免浪费或污染;(6)控制费用和评估经济可行性。

目前,木质纤维素预处理最常见的类型有以下几种^[67](图 1.3):(1)物理预处理:比如机械预处理,脉冲电能预处理,物理方法有助于减小颗粒尺寸,影响纤维素的结晶结构及提高表面积^[69]。物理方法一般应用于底物的初步处理或与其他预处理方法共同使用。(2)化学预处理:由酸、碱等化学物质改变木质纤维素生物质的天然结构。一般根据木质纤维素原料选择使用的化学物质。(3)物理化学预处理:如蒸汽爆炸预处理,这是一种常见的预处理生物质自动水解技术,其中生物质颗粒在 160~270°C 的热蒸汽作用下维持特定的时间,维持时间通常从几秒钟到几分钟,一旦过程完成,压力就会释放,导致水分蒸发和木质纤维素的消化^[70];氨纤维爆破法,利用无水氨在高压下解离形成铵离子和氢氧离子,引起温度迅速升高,然后导致生物质膨胀,致使纤维素的结晶稳定性下降^[71-73]。(4)生物预处理:生物预处理利用不同的微生物(褐色、白色及软腐真菌)或生物制品(酶)选择性降解木质素和半纤维素,但存在需要控制微生物生长条件或难以保证酶的稳定性、可重用性等问题^{[74],[75]}。预处理的最终选择取决于木质纤维素生物质的理化性质,不同的生物质需要不同的预处理方法来克服其天然顽固性,提高糖化效率^{[76],[77]}。

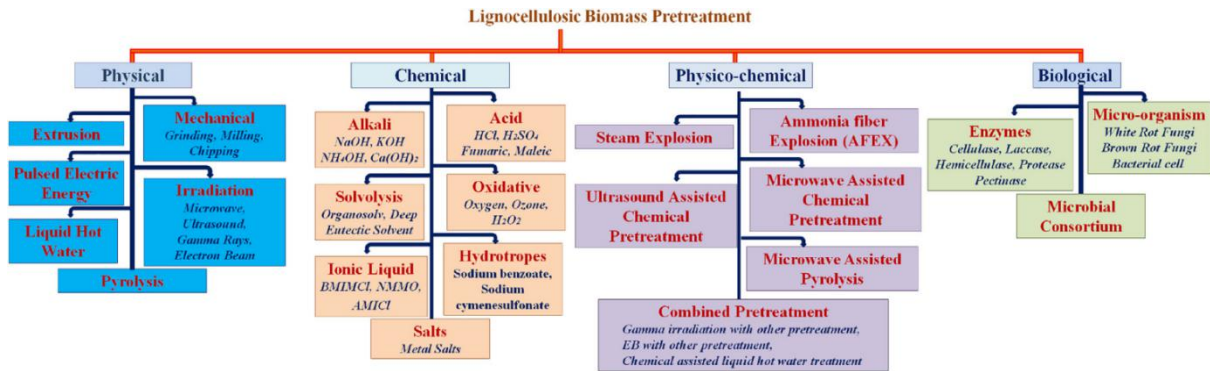


图 1.3 木质纤维素生物质预处理方法的分类^[67]

Fig. 1.3 Classification of lignocellulosic biomass pretreatment methods^[67]

1.3.2 木质纤维素生物脱毒

木质纤维素原料需要经过预处理才能被微生物进行转化，因为它们的碳水化合物成分与木质素有关，而微生物不能直接利用木质素^[50]。预处理后一个重要问题是木质纤维素生物质会产生多种不利于微生物生长的抑制物，包括羟甲基糠醛(HMF)、糠醛、香草醛和丁香醛，抑制物的存在限制了微生物的生长进而影响产物的产量，抑制物的来源及生成过程如图 1.4 所示^[61]。脱毒即是对物料中的抑制物进行脱除。常见脱毒方法包括水洗、过中和、微生物降解^{[78],[79]}。其中通过微生物降解的方法能耗更低，条件更温和，有毒性副产物更少，因此具备在实际生产中应用的潜力。目前，本实验室已筛选出两种不同的菌株，树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN 1^[78] 及宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN 89，两种菌株均能够在木质纤维素原料中优先降解抑制物，且脱毒过程中都不需要添加营养物质，只需合理控制时间，就能在不消耗可发酵糖的情况下将木质纤维素原料中的抑制物高效脱除。

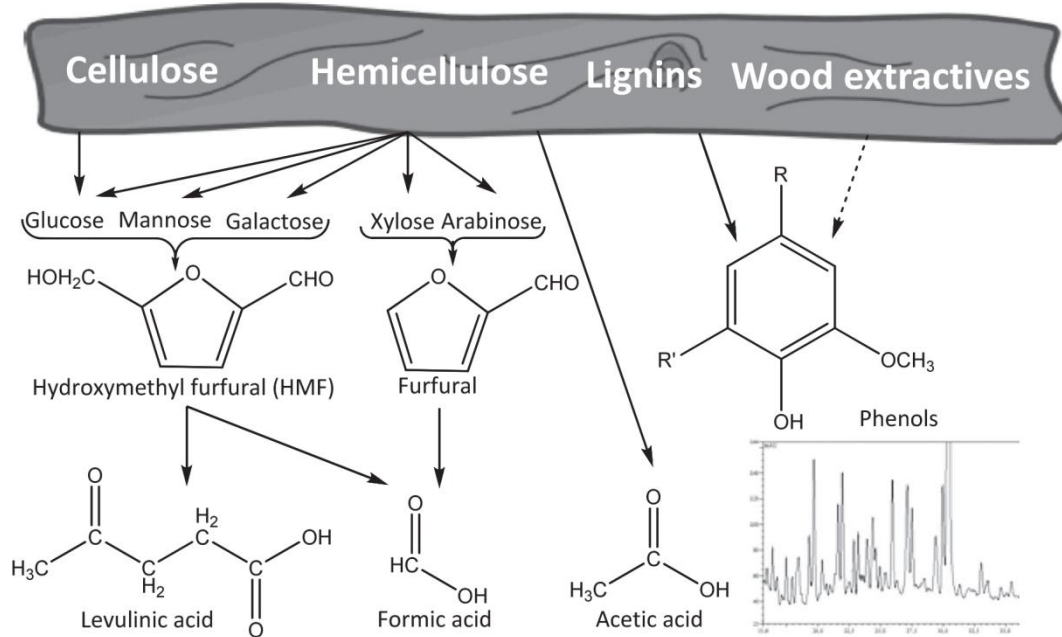


图 1.4 木质纤维素组分及主要抑制物来源^[76]

Fig. 1.4 Average composition of lignocellulosic biomass and main derived hydrolysis products^[76]

1.3.3 木质纤维素水解糖化及发酵

目前, 纤维素生物乙醇、纤维素油脂及其他生物基产品在商业规模上的一个主要限制条件是木质纤维素降解成还原糖, 即酶解是关键和昂贵的步骤之一, 相关酶或生物催化剂的成本和活性也因此受到高度关注。与化学处理相比酶水解方式反应更为温和, 能够避免单糖的过度降解, 还原糖得率更高。

生物炼制中的微生物发酵有: 分步糖化与发酵 (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)、同步糖化与发酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)、同步糖化与共发酵 (Simultaneous Saccharification and Co-fermentation, SSCF)。SHF 指糖化与发酵分步进行, 优点在于能充分糖化与发酵, 但糖化后高浓度的糖对微生物菌株生长有较强的抑制作用^[80]。SSF 指酶和纤维素原料及发酵菌种一同加入, 使糖化与发酵共同进行, SSF 的优点在于解除了高糖浓度的底物抑制作用, 节约成本, 不足之处在于糖化与发酵温度不同, 以发酵条件控制温度, 致使糖化效率较低^{[81],[82]}。本文采用先将木质纤维素进行预糖化, 然后接入发酵菌株开始 SSF 的同步糖化与共发酵方法, 不仅提高了糖化效率, 同时又能在没有高糖浓度抑制下进行最优条件的发酵。

1.3.4 木质纤维素生物炼制微生物油脂

近年来, 利用木质纤维素进行生物炼制更多的是致力于纤维素乙醇的研究, 同时具有较成熟的纤维素乙醇工业化生产技术。在木质纤维素炼制微生物油脂的研究中, 一方面由于抑制物对产油微生物生长的抑制效果明显, 多数研究致力于提高发酵菌株对抑制物的耐受性^{[83],[84]}, 另一方面, 因为木质纤维素中含有多种可供发酵菌株利用的碳水化合物, 如水解后含量最多的葡萄糖, 木糖, 少量阿拉伯糖, 半乳糖等, 但目前能够同时利用这几种单糖作为发酵底物的油脂菌株寥寥无几。因此, 筛选出具有抑制物耐受性、可同时利用木质纤维素来源的多种单糖及能够高产油脂的菌株对于纤维素油脂工业化应用具有重大意义。在本实验室之前的研究中, 比较了多种产油酵母对抑制物的耐受能力, 主要有 *Rhodospiridium toruloides* (圆红冬孢酵母)、*Rhodotorula glutinis* (粘红酵母)、*Lipomyces starkeyi* (斯巴达酵母)、*Trichosporon cutaneum* (皮状丝孢酵母) 等, 结果表明 *Trichosporon cutaneum* (皮状丝孢酵母) 对木质纤维素来源的抑制物具有良好的耐受性且有很高的生物量^[85-86]。Huang 等人证明了 *T. cutaneum* 在木质纤维素水解液中能够进行生长并合成油^[88]。Liu 等人实现了 *T. cutaneum* 利用木质纤维素原料生产油脂, 在 50 L 生物反应器中进行同步糖化发酵后, 得到 3.23 g/L 的油脂浓度^[89]。Gao^[86] 等人探究了 *T. cutaneum* 在玉米芯残渣中的发酵性能, 通过分步糖化发酵油脂浓度提高至 12.3 g/L。Hu^[90] 等人根据细胞密度差异利用离心的方法得到一株高产菌株 *T. cutaneum* MS 28, 最终油脂浓度可达 20.66 g/L。上述研究表明, *T. cutaneum* 酵母具有非常大的油脂生产潜力, 本研究致力于通过不断优化筛选的条件, 从而得到油脂产量更高的高产油脂菌株。

1.4 酵母细胞形态及细胞壁代谢

1.4.1 酵母细胞形态

酵母的形态因种而异，一般为圆形和丝状两种形态，也有如三角形，藕节状，腊肠形等形态。酵母能利用有机物进行发酵，细胞形态的变化是衡量生长与发酵性能的重要参数。一般来说，细胞尺寸越大，其胞内细胞器亚单位数量越多，胞内细胞器越大，调控生物合成过程的 DNA、蛋白质及特定基因的 mRNA 等相关物质的含量也更高，因此整个生物合成过程效率更高^[91]，此外体积更大的细胞其容纳胞内产物的空间更大。

酵母的细胞形态除自身的遗传特性决定外，生活环境及培养时间等对于细胞形态的变化同样具有很大影响。当生活环境不同时，一方面酵母首先通过调控细胞周期及与形态相关的基因等方式维持细胞形态的稳定，另一方面酵母也可以主动调节其细胞大小，但关于这种调节的分子机制仍不清楚^[92]。研究发现营养丰富程度影响着酿酒酵母的细胞体积和生长速度^[93]。此外培养基中的碳源不同，细胞形态也会不同：酿酒酵母以甘油-乙醇为碳源培养一段时间，再转入以葡萄糖为碳源的培养基后，酿酒酵母的出芽量迅速减少，细胞体积变大^[94]。耶氏酵母的培养条件变化可导致细胞形态快速改变，其具有酵母态与菌丝态两种形态，环境变化能使两种形态互相转化，营养物质、溶氧、PH、转速等与生长相关的参数对耶氏酵母的细胞形态都有影响，控制合适的培养条件可使酵母态与菌丝态两种形态同时存在，不同形态的耶氏酵母发酵产物及发酵性能也不相同，一般耶氏酵母多以酵母态进行产品发酵^[95]。

1.4.2 酵母细胞壁代谢

酵母细胞壁能保护细胞不受外界环境伤害及维持细胞间的识别，除了具有抵抗性和刚性外，酵母细胞壁还具有较高的弹性，以调节细胞的生长和形态变化^[95]。酵母细胞壁由三部分构成，一般最外部分是为露聚糖，中间部分为蛋白质层，葡聚糖为最内层。细胞壁的组成及组分比例根据酵母菌株种类不同而有所变化^[96]。

细胞壁的合成与分解受外界培养条件的影响，进而引起细胞形态及其压力耐受性等细胞壁功能特性的改变。同时，细胞壁可改变相关蛋白的表达以对应环境的变化：营养物质、pH 值、温度以及抗真菌药物等都会引起酵母细胞壁生物合成酶、结构蛋白和重塑酶的表达变化^{[97],[98]}。Ene^[99]等人发现在高渗透压环境时，*Candida albicans*（白假丝酵母）的细胞壁具有很强的生化灵活性，将 *Candida albicans* 置于高渗透压环境后，导致细胞体积突然变小且细胞壁厚度迅速增加。

目前，关于改造细胞壁以提高细胞产物产量的相关研究较少。Li^[100]等人通过破坏 CWP2 基因后（CWP2 能够编码细胞壁的主要组分-甘聚糖蛋白）发现，异源重组 *Saccharomyces cerevisiae* 的细胞壁变薄，细胞壁的通透性增加，但细胞的生长没有受到影响，最重要的是异源纤维素酶活性提高了 85.9%，证明了通过调节细胞壁蛋白基因提高 *Saccharomyces cerevisiae* 外源蛋白产量的可行性。而关于通过影响细胞壁的生物合成，提高微生物胞内产物的研究尚未有报道。本研究通过在 *T. cutaneum* 酵母培养基中加入

合适剂量的纤维素酶，从而部分水解 *T. cutaneum* 酵母细胞壁且不影响细胞正常生长，这使得细胞壁厚度降低，但通透性提高，更有利于细胞吸收外界环境中的营养物质；同时细胞壁组分改变将引起细胞形态发生变化，体积变大的细胞中含有更多调控生物能合成过程的酶与 mRNA 等物质，且有更大的油脂储存空间，因此油脂积累变多，利用超高速离心筛选的方法最终得到高产油菌株。

1.5 本论文的立题依据及主要研究内容

生物柴油是一种典型的绿色能源，具有可再生性及环保性的优点，能够很好的代替化石燃料。目前，生物柴油发展的主要瓶颈是生产原料，以动植物油脂或油料作物为原料生产生物柴油的传统方法不仅成本昂贵，而且来源不足，存在与人争粮争地的问题。因此非粮作物诸如木质纤维素、有机废弃物等成为生产生物柴油原料的优良选择。其中，木质纤维素在我国分布十分广泛，产量极高，且含有丰富的碳水化合物，以木质纤维素为原料生产生物柴油具有十分广阔的应用前景。油脂微生物生产生物柴油具有不受天气和地域影响、生产周期短和对环境污染小等优点。目前大多数微生物油脂发酵仍是以葡萄糖等纯糖作为碳源，成本较高，木质纤维素水解后可产生多种可供微生物发酵利用的单糖，因此以木质纤维素为底物进行微生物油脂发酵具有极大的发展潜力。

本实验室的前期工作表明，*Trichosporon cutaneum* 是一种能够耐受木质纤维素来源抑制物的油脂酵母，对木质纤维素体系具有良好的适应性，其能以木质纤维素为原料进行发酵生产油脂。以 *T. cutaneum* ACCC 20271 为出发菌株，通过高速离心筛选获得了油脂积累能力提高的菌株 *T. cutaneum* MS 28，其油脂产量相比于出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 明显增加。然而，*T. cutaneum* MS 28 细胞密度低于发酵液密度，在高转速下，大部分细胞经离心后均漂浮在发酵液的上层，高速离心筛选已不能继续获得更轻的细胞，限制了油脂产量的进一步提高。

对比 *T. cutaneum* MS 28 与 *T. cutaneum* ACCC 20271 发现，*T. cutaneum* MS 28 细胞形态发生了一些改变。TEM 镜检发现 *T. cutaneum* MS 28 细胞壁厚度降低，细胞体积变大；通过 qRT-PCR 方法表明 *T. cutaneum* MS 28 关于细胞壁合成与分解的一些关键基因发生了显著的差异表达。因此推测 *T. cutaneum* 酵母细胞壁生物合成、细胞形态及油脂积累三者之间具有紧密联系，我们尝试发现一种新的有效的进化压力，进一步提高 *T. cutaneum* 酵母在木质纤维素体系中发酵的油脂产量。

T. cutaneum 细胞壁组成与典型的酵母一致，主要分为甘露聚糖外层，蛋白质中间层，葡聚糖内层三部分，在 *T. cutaneum* 发酵培养基中加入纤维素酶，因纤维素酶能够酶解细胞壁中的葡聚糖，降低细胞外壁强度，使细胞形态发生改变。不同形态的细胞油脂积累能力不同，细胞含油率不同其密度也存在差异，含油率更高的细胞密度更低，因此将发酵结束后的发酵液离心时，含油率更高的细胞更容易漂浮在液体的上层。基于以上原理，本文首次尝试在 *T. cutaneum* ACCC 20271 生长的麦秆水解液中加入适宜剂量的纤维素酶，在纤维素酶胁迫下对 *T. cutaneum* 进行长期的适应性进化，并采用超高速离

心转接筛选, 筛选过程中纤维素酶的剂量根据细胞生长, 葡萄糖消耗, 油脂产量不断调整, 不断提高离心转速以得到含油率持续上升的细胞。当离心转速达到离心机最高转速时, 在离心发酵液中加入密度更低的玉米油作为离心筛选的介质, 以筛选出密度更低, 含油率更高的细胞, 最终我们筛选得到一株油脂产量明显提高的菌株 *T. cutaneum* YY 52。然后, 本文继续探究了 *T. cutaneum* YY 52 在不同脱毒方式下, 分别以小麦秸秆、玉米秸秆为原料时同步糖化共发酵的性能, 并与出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行对比。

微生物发酵生产油脂的一个突出问题是油脂提取困难。由于油脂是胞内产物, 油脂的获得需要破碎细胞壁, 细胞壁破裂通常是利用机械处理(如碾磨、超声、高压均质)或化学预处理(如酸、碱、洗涤剂)来完成的, 这些方法不仅能源或化学品损耗大, 且处理时间长^[35], 本论文尝试在 *T. cutaneum* 酵母发酵培养基中持续添加较高剂量的纤维素酶使发酵后期的细胞因细胞壁极薄而发生破裂, 从而更快捷的提取油脂, 同时减少细胞破壁造成的能源损耗, 节约生产成本。

第 2 章 纤维素酶胁迫下皮状丝孢酵母菌株的适应性进化与超高速离心筛选

2.1 引言

Trichosporon cutaneum 是一种优良的油脂酵母,对木质纤维素预处理后产生的多种抑制物具有良好的耐受性;同时能够利用木质纤维素糖化后存在的多种碳源如:葡萄糖,木糖,乳糖等。*T. cutaneum* 酵母发酵生产的油脂组分主要为油酸,且含量超过 70%,表明该油脂具有良好的抗氧化性及流动性,可用于生物柴油的生产^[90]。因此 *T. cutaneum* 酵母利用可再生且廉价的木质纤维素原料生产微生物油脂在工业生产中具有非常大的发展潜力。但 *T. cutaneum* ACCC 20271 利用木质纤维素作为碳源时,碳源消耗较低,油脂产量不高,因此需要经过筛选来获得油脂产量高的 *T. cutaneum* 菌株。

在本实验室前期的研究工作中,通过对 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行离心筛选,从而筛选得到了一株油脂生产能力显著提高的菌株 *T. cutaneum* MS 28。对筛选得到的 *T. cutaneum* MS 28 进行分析发现,在显微镜下无需进行细胞染色就能够清晰看到细胞内的油脂小体,通过细胞内油脂小体数量的差异初步判断油脂产量的变化。*T. cutaneum* MS 28 细胞形态相较于 *T. cutaneum* ACCC 20271 发生了明显改变,细胞体积变大,为油脂积累提供了更大的空间。TEM 电镜观察发现细胞壁相较于 *T. cutaneum* ACCC 20271 变薄,细胞壁组分中葡聚糖,甘露聚糖的含量降低。qRT-PCR 研究发现筛选高产菌株相较于 *T. cutaneum* ACCC 20271 与细胞壁中葡聚糖、甘露聚糖合成分解相关的一些基因发生了非常显著的表达差异。由此推断,细胞壁的改变与 *T. cutaneum* 油脂积累有密切的联系。细胞壁变薄可能导致细胞形态发生改变,进而为油脂积累提供更大的空间。纤维素酶能够将细胞壁中的葡聚糖水解为葡萄糖,在 *T. cutaneum* 酵母木质纤维素发酵体系中加入适量纤维素酶能够部分酶解细胞壁,从而使细胞壁变薄,同时培养基中可利用单糖增多。

本章内容主要是通过添加适宜剂量的纤维素酶以降解部分 *T. cutaneum* 酵母细胞壁,改变细胞形态,同时采用超高速离心筛选的方法进行高产油脂 *T. cutaneum* 酵母的筛选,当离心转速达到离心机最高转速后,超高速离心筛选已不能进一步提高油脂产量,因此我们在离心的发酵液中添加一种密度更小的轻介质玉米油进行离心以获取更轻,数量较少,但油脂积累量更高的菌株。

此外,为降低细胞破壁需要的成本,本章还探究了 *T. cutaneum* 酵母高产油脂的同时,通过在发酵培养基中添加纤维素酶,使得发酵后期的细胞因细胞壁极薄而发生破裂,从而更方便快速的提取油脂的可行性。

2.2 实验材料

2.2.1 原料

小麦秸秆购买于河南南阳，于 2019 年春季收获。购买的小麦秸秆首先通过孔径为 10 mm 的锤式粉碎机粉碎，然后进行水洗除去灰尘，石子等，自然晒干后收置于密封袋中常温储存备用。小麦秸秆原料的组分通过两步酸解法^[101]测定，测得纤维素、半纤维素、木质素和灰分含量分别为 33.24%、22.25 %、18.77 %和 6.24%。

2.2.2 纤维素酶

纤维素酶 Cellic CTec 2 自诺维信（中国）生物技术有限公司（Novozymes (China), Biotechnology Co., Ltd.）购买得到。纤维素酶滤纸酶活的测定方法依据 NREL LAP-006^[102]中的方法进行，得到的滤纸酶活为 203.2 FPU/mL；纤维二糖的酶活测定方法依据 Ghose^[102]进行，测得其纤维二糖酶活为 4900 CBU/mL；蛋白含量的测定方法是以牛血清蛋白（BSA）为标准品，利用考马斯亮蓝法（Bradford method）测得其酶蛋白含量为 87.31 mg/g^[103]。

2.2.3 菌株及培养基

出发菌株：*Trichosporon cutaneum* ACCC 20271，购自中国农业微生物菌株保藏管理中心(Agricultural Culture Collection of China, <http://www.accc.org.cn/>)。

小麦秸秆预处理后使用的生物脱毒菌株：树脂枝孢霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1，该菌株是由本课题组在木质纤维素秸秆中筛选出的一株能够进行高效生物脱毒的霉菌，其能在不添加任何营养物质的预处理秸秆中生长并优先消耗存在的抑制物。

树脂枝孢霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 于 PDA 平板中培养，PDA 平板：200 g/L 马铃薯汁、20 g/L 葡萄糖、20 g/L 琼脂，115°C 灭菌 20 min 后倒平板。

YPD 培养基：葡萄糖 20 g/L，酵母提取物（Yeast Extracts）10 g/L，蛋白胨 20 g/L，（YPD 平板另加琼脂 20 g/L），115°C 灭菌 20 min。

合成培养基：葡萄糖 60 g/L、YE 1 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L、(NH₄)₂SO₄ 0.22 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L。

2.3 实验方法

2.3.1 种子培养

将保存于 -80°C 冰箱中的 *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271 冻存管取出并在室温静止融化后在 YPD 平板中划线，放置于 30°C 培养箱中，生长时间约 36h，YPD 中活化两次，最后转接至 15 % 固含量的小麦秸秆水解液中进行发酵。

2.3.2 小麦秸秆预处理

小麦秸秆预处理方法根据 Zhang^[104]，经过水洗的小麦秸秆与稀硫酸溶液以 2:1 固液比 (w/w) 混合完全，然后放置于 20 L 的预处理反应器中进行密封，50 rpm，搅拌 3 min，随后通入蒸汽，升高温度并将反应温度维持在 175 °C 左右，螺旋搅拌 50 rpm 维持 5 min，整个预处理过程没有废水的产生。

2.3.3 预处理小麦秸秆生物脱毒

预处理后的小麦秸秆利用本实验室筛选到的 *Amorphotheca resinae* ZN1 菌株脱毒，脱毒过程按照 Zhang 等人^[105]方法进行。用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节预处理后的小麦秸秆 pH 至 5.0 左右，将 *Amorphotheca resinae* ZN1 培养在 PDA 平板上直至整个平板长满孢子，随后将长满孢子的平板分成几份加入至装有预处理小麦秸秆物料的盒子中，室温静置培养 4-5 天后，作为脱毒种子。随后将预处理后的小麦秸秆放置于 15 L 生物反应器中，并按照 10% (w/w) 的质量比接入脱毒种子，温度为 28 °C，通气量在 0.8 vvm 条件下，脱毒时间约为 72 h。

2.3.4 水解液制备

发酵培养基为 15%固含量脱毒小麦秸秆水解液。小麦秸秆经过预处理，生物脱毒后，在带有螺旋搅拌桨的 5 L 生物反应器（保兴生物设备工程有限公司，上海）中进行糖化。具体操作为：将所需要的经过生物脱毒后的小麦物料与超纯水以 15 %固含量计算用量并称量后在灭菌锅中 115°C，灭菌 20min。随后将灭菌完成的小麦物料与超纯水加入至 5L 发酵罐中，待温度维持在 50 °C 时以 4 mg 纤维素酶蛋白/g DM (Dry Material, 干物料) 的用量添加纤维素酶。糖化过程中通过添加 NaOH 溶液使得 PH 维持在 5.0~5.5 之间，并在 50 °C，150 rpm，酶解约 48h，测定葡萄糖浓度约在 60 g/L 左右。糖化结束时，将糖化液释放至塑料盒子中；然后经过 10000 rpm、10 min 离心弃去麦秆残渣，得到上清水解液，随后 115 °C 灭菌 20 min，使用滤纸将灭菌后水解液中的固体残渣等物质过滤后，加入营养盐，其营养盐成分与添加量为：1.0 g/L KH_2PO_4 、1 g/L YE、0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 0.22 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ；从而得到可使用的 15%固含量的小麦秸秆水解液。最终所得的 15 %固含量小麦秸秆水解液葡萄糖含量约为 60g/L，木糖含量约为 15g/L。

2.3.5 纤维素酶胁迫下 *T. cutaneum* 酵母的适应性进化与超高速离心筛选

首先将 *T. cutaneum* ACCC 20271 从 -80°C 冰箱中取出并进行活化，随后以 10% 接种量，将经过活化后的 *T. cutaneum* 细胞转接至装有 50 mL 15%固含量小麦秸秆水解液三角瓶中，并加入纤维素酶。整个适应性进化与超高速离心筛选过程中，纤维素酶的添加量根据细胞生长，葡萄糖消耗量及油脂产量不断调节。发酵条件为 180 rpm，30 °C，培养 96 h。发酵结束后用移液器量取 20 mL 发酵液，并转移至已灭菌的 50 mL 离心管中进行离心，离心转速自 3000g（离心力）开始，每次转接后根据细胞生长情况逐渐提高离心转速，直至达到最高转速 40000g，离心的时间设置为 3min。达到最高转速 40000g 时，当发酵结束后，取等体积的发酵液与玉米油于灭菌后的 50 mL 离心管中，40000g 转速下离心 3min。取离心最上层菌体以 10% 接种量接入至新的发酵培养基中，按照此法进行 10 次筛选转接，得到油脂产量继续提高的菌株。随后不再利用玉米油进行离心筛选，发酵结束后取 20 mL 发酵液进行 40000g, 3min 离心，以筛选得到稳定高产油脂 *T. cutaneum* 菌株。

2.3.6 筛选菌株 *T. cutaneum* YY 52 高产油脂稳定性验证

为验证筛选菌株 *T. cutaneum* YY 52 是否具有遗传稳定性，能够稳定进行高产油脂

发酵, 对该菌株活化后, 在正常培养基中进行连续多次无任何筛选的转接, 测定其细胞干重及油脂产量, 直至达到相对稳定的状态, 并以原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 为对照。具体实验操作为: 筛选菌株 *T. cutaneum* YY 52 及原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行活化后, 分别以 10% 接种量接入至含有 50 mL 15% 固含量小麦秸秆水解液中进行摇瓶发酵, 发酵时间为 96h, 随后继续维持 10% 接种量, 转接至新鲜的小麦秸秆水解液中。按照此方法进行多次转接, 最终比较每次转接两种不同菌株的油脂含量, 验证 *T. cutaneum* YY 52 的油脂产量是否具有稳定性。

2.3.7 发酵后期细胞因细胞壁极薄而发生破裂的可行性探究

首先将 *T. cutaneum* ACCC 20271 在 YPD 培养基中进行活化, 然后采用 10% 接种量, 将菌液转接至装有 50 mL 15% 固含量小麦秸秆水解液的 500 mL 锥形瓶中, 并加入适宜剂量的纤维素酶, 纤维素酶的添加量根据细胞生长, 葡萄糖消耗量及油脂产量进行调节。放置在 180 rpm, 30 °C 摇床中, 培养发酵 96 h 后, 量取 20 mL 发酵液转入至完全灭菌的 50 mL 离心管进行离心, 离心转速自 3000g (离心力) 开始, 时间设置为 3 min 每次转接后根据细胞生长情况逐渐提高离心转速, 直至达到最高转速 40000g。当达到离心机最高转速 40000g 后, 细胞含油率在某种程度上有所提高, 此后每次转接均加入较高剂量的纤维素酶, 探究 *T. cutaneum* 对纤维素酶耐受力的同时, 继续利用超高速离心筛选, 在得到高油脂产量细胞的同时, 并且探究处于发酵后期的 *T. cutaneum* 酵母是否可因细胞十分薄而在纤维素酶的作用下发生细胞破裂。

2.3.8 葡萄糖含量测定

葡萄糖含量的变化是检测 *T. cutaneum* 酵母生长的重要指标之一, 因此发酵结束后需测定糖的消耗情况。该数据通过 SBA-90 生物传感分析仪进行定量分析。取 1 mL 发酵液于 EP 管中, 13000 rpm 离心 5 min, 取上清, 超纯水稀释 100 倍后经过 0.22 μm 滤膜过滤后进行测量。

2.3.9 菌体干重及油脂测定

取发酵结束的发酵液, 12000 rpm, 离心 5 min, 随后去上清液, 超纯水重悬菌体, 再次以 12000 rpm 离心 5 min 弃去上清液, 最后加入 5 mL 超纯水重悬菌体, 并将重悬后的菌液转移至到已测定重量的小平板中, 将小平板放置在 60 °C 烘箱中过夜烘干至恒重, 利用差重法得到 DCW (Dry Cell Weight, 干细胞质量)。

油脂测定: 向上述平板中加入 5 mL HCl (4 mol/L) 溶液, 室温静置 3h, 然后将浸泡后的菌体溶液转移至 50 mL 离心管中, 之后将离心管置于沸水浴中 15 min, 以完全裂解 *T. cutaneum* 酵母细胞壁, 再转移至冰上冷却 10 min。然后向离心管中加入 20 mL 氯仿甲醇(2:1, v/v) 溶液, 并用两层封口膜将离心封紧, 随后将离心管放置于 180 rpm, 30 °C 的摇床中萃取 1-2 h。萃取完成后将, 11000 rpm 条件下离心 5 min 使得油脂层和水相层分离, 用注射器将离心管下层含有油脂的氯仿层提取至已测定质量的旋蒸瓶中, 并置于旋转蒸发仪中蒸发直至去除氯仿, 温度设置为 80 °C, 然后将旋蒸瓶置于 60 °C 烘箱中烘干至恒重, 最后差重法得到 *T. cutaneum* 酵母的油脂浓度。细胞含油率是油脂浓度除以

细胞干重所得。

2.3.10 细胞形态观察

细胞形态观察分为筛选过程中不同转接次数细胞形态的观察和一个发酵周期中不同时期的细胞形态观察两种。

筛选过程中不同转接次数细胞形态观察方法为：在筛选过程中的 *T. cutaneum* 酵母发酵 96 h 后，即发酵结束后，取 10 μL 发酵液滴于载玻片，随后盖上盖玻片，放置于显微镜中观察，并对细胞形态发生变化的转接菌株进行拍照。

不同时期的细胞形态观察方法为：对待观察菌株进行种子培养后，以 10% 接种量将种子液转移至发酵培养基中，180 rpm, 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件培养 120 h。自 0 h 开始，每隔 24 h 进行取样，随后将样品置于显微镜中观察拍照。

2.3.11 细胞壁组分测定

T. cutaneum 酵母测定葡聚糖与甘露聚糖含量的方法为：首先对待测菌株进行种子培养。并按照 10% 接种量把种子液转移至合成培养基中，180 rpm, 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件培养 24 h，随后将发酵液取出，以 12000 rpm 离心 5 min 后，弃上清，然后添加超纯水重悬洗涤细胞，12000 rpm 离心 5 min 后弃上清回收菌体。将回收的菌体放置在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜预冻。之后将装有预冻后菌体的离心管拿出，去掉离心管盖子，并将棉花塞于离心管口，之后将离心管放置于冷冻干燥机中，48 h 后取出备用，用分析天平准确称取 100 mg 菌体于具塞管中，随后添加 1 mL 4% H_2SO_4 溶液进行酸解，随后把具塞试管放入 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅水浴 1 h，期间每 2 min 用玻璃棒搅拌菌体。水浴完成后，向具塞试管中加入 28 mL 超纯水，上下颠倒混匀溶液之后将具塞试管放置于高压灭菌锅中 121 $^{\circ}\text{C}$ 酸解 1 h。酸解完成后，将具塞试管静置至温度冷却为室温，随后加入 CaCO_3 直至没有气泡产生以中和上清液，13000 rpm 离心 5 min，吸取上层清液并经过 0.22 μm 滤膜过滤后利用 HPLC 测定溶液中葡萄糖、甘露糖的含量，换算得到细胞壁中葡聚糖、甘露聚糖的含量，换算系数为 0.9^[106]。

2.4 结果与讨论

2.4.1 纤维素酶胁迫下 *T. cutaneum* 酵母的适应性进化与超高速离心筛选

在纤维素酶胁迫下，*T. cutaneum* ACCC 20271 经过长时间的适应性进化与超高速离心筛选后，随着转速的提升，细胞干重及油脂产量呈现出明显的上升趋势，最终筛选得到能够高产油脂的菌株。整个适应性进化与筛选过程分为四个阶段。根据葡萄糖消耗量，细胞生长及油脂积累的变化改变各阶段中纤维素酶的添加量及离心条件，如图 2.1 所示。

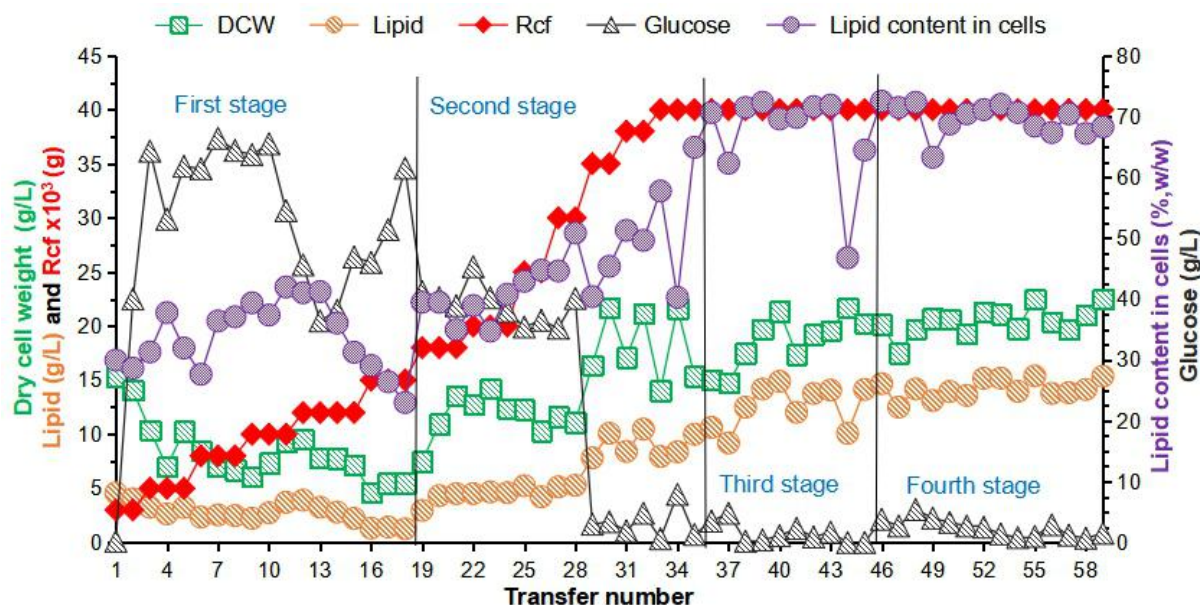


图 2.1 葡萄糖消耗、细胞干重、油脂浓度及细胞含油率变化情况

Fig.2.1 The change of glucose consumption, DCW, lipid and content

发酵条件：15%固含量脱毒小麦秸秆水解液，30℃，180 rpm，接种量 10%，培养时间 96 h，初始葡萄糖浓度：60 g/L。图中 Glucose 表示发酵结束后葡萄糖残余量。

图 2.1 结果表明，在整个适应化与筛选过程中，随着筛选的进行，细胞生长、葡萄糖消耗、油脂浓度及细胞含油率均呈现出一种整体上升的趋势。

第一阶段，每次转接均向发酵培养基（15%小麦秸秆水解液）中加入 4%纤维素酶（纤维素酶按培养基体积比添加），发酵结束后取 20 mL 发酵液离心 2min 将最上层细胞以 10%接种量接入至新的培养基中。离心转速自 3000g 开始，每转接 3 次后转速增加 2000g，该阶段离心转速升高至 15000g。此阶段初步尝试对 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行纤维素酶胁迫及离心筛选。该阶段是 *T. cutaneum* ACCC 20271 适应小麦秸秆水解液的过程，纤维素酶的胁迫压力过高，细胞干重自 14.1 g/L 降低至 5.5 g/L，葡萄糖消耗量较低甚至无消耗，细胞干重及油脂浓度均处于较低的水平，细胞含油率无明显变化。

第二阶段，为提高细胞的生物量，降低纤维素酶的胁迫，减少纤维素酶用量为每隔一次转接向发酵培养基中添加 4%纤维素酶，离心条件与第一阶段相同。离心转速自 18000g 开始，根据细胞生长与油脂积累变化，每转接 2~3 次后转速增加 2000~5000g，该阶段离心转速提高至 40000g。该阶段 *T. cutaneum* 已良好适应水解液的生长环境，纤维素酶的胁迫降低，随着离心转速的不断提高，第二阶段细胞生长优于第一阶段，葡萄糖消耗量也在此阶段发生了明显变化。糖耗逐渐增加，至第 29 次转接，离心转速达到 35000g 时，葡萄糖消耗量明显升高，发酵结束后仅有 3g/L 的葡萄糖剩余；油脂浓度及细胞含油率与糖的消耗量一致同时处于上升趋势，油脂浓度从开始的 2.64 g/L 提高至 10.47 g/L，细胞含油率自 29%提高至 65%。

第三阶段，此时已达到离心机最高转速 40000g，漂浮在发酵液上层的轻细胞不断增

多,为进一步筛选得到油脂含量更高,密度更小的轻细胞,利用了一种密度更小的介质玉米油进行离心筛选。当发酵结束后取等体积的发酵液与玉米油于离心管中,离心后将最上层细胞以 10%接种量接入至新的水解液中,转速维持在 40000g。纤维素酶添加量减少至每隔一次只添加 1%纤维素酶,该过程前几次转接时细胞生物量呈上升趋势,葡萄糖基本耗完,而在后面的转接中由于玉米油的影响,油脂产量有所波动,细胞含油率增加至 71%且含油率相对稳定,油脂浓度上升至 14.1 g/L。

第四阶段,在第三阶段利用玉米油进行离心筛选,虽然油脂含量明显升高,但玉米油有可能进入细胞内及发酵液中残存留的玉米油都将对细胞生物量及油脂含量的测定结果造成误差,同时,玉米油加入后 *T. cutaneum* 酵母染菌率提高,不利于筛选得到能够稳定高产油脂的菌株。因此在第四阶段不再利用玉米油进行筛选,同时小麦秸秆水解液中不再加入纤维素酶,发酵结束后只取发酵液进行离心,取最上层细胞以 10%接种量接入至新的培养基中。该阶段细胞生长、葡萄糖消耗、油脂浓度及细胞含油率都趋于稳定,筛选得到的菌株其油脂浓度可达到 15.2 g/L,含油率可达 72%,对最终筛选得到的高产油脂菌株命名为 *T. cutaneum* YY 52。

2.4.2 适应性进化与超高速离心筛选过程中不同转接次数的细胞形态观察

纤维素酶的存在能明显改变 *T. cutaneum* 酵母的细胞形态,随着转接的进行,细胞形态同样发生着变化,体积变大的细胞逐渐增多,如图 2.2 所示。

第一阶段,观察发现 *T. cutaneum* ACCC 20271 呈现为正常的圆形酵母形态,体积较小且细胞形态稳定。随着适应性进化及离心筛选的进行,体积增大的长梭形细胞不断增多,但细胞内油脂小体的数量相对较少,整个细胞呈现出一种“大而空”的状态

第二阶段,随着适应性进化及离心筛选的进行,体积增大的长梭形细胞不断增多,自第二十九次转接开始,葡萄糖消耗骤然增加,此时胞内油脂小体也明显增多,油脂小体基本充满了整个细胞。

第三阶段,利用轻介质玉米油离心筛选后,观察发现细胞内基本没有单个独立油脂小体的存在,整个细胞被连成一片的油脂所填满,推测原因可能是玉米油进入细胞,与细胞内的油脂小体相融合致使整个细胞内的油脂连成一片,另一可能原因是该阶段的细胞经过长时间纤维素酶的胁迫作用,细胞的细胞壁已经比较薄,当盖上盖玻片后对细胞造成挤压导致细胞破裂致使油脂连成一片。

第四阶段,为筛选的最后阶段,细胞形态为中间加宽的梭状或较大的圆形酵母形态,每次转接发酵结束后的细胞形态基本一致,细胞内充满了油脂小体。

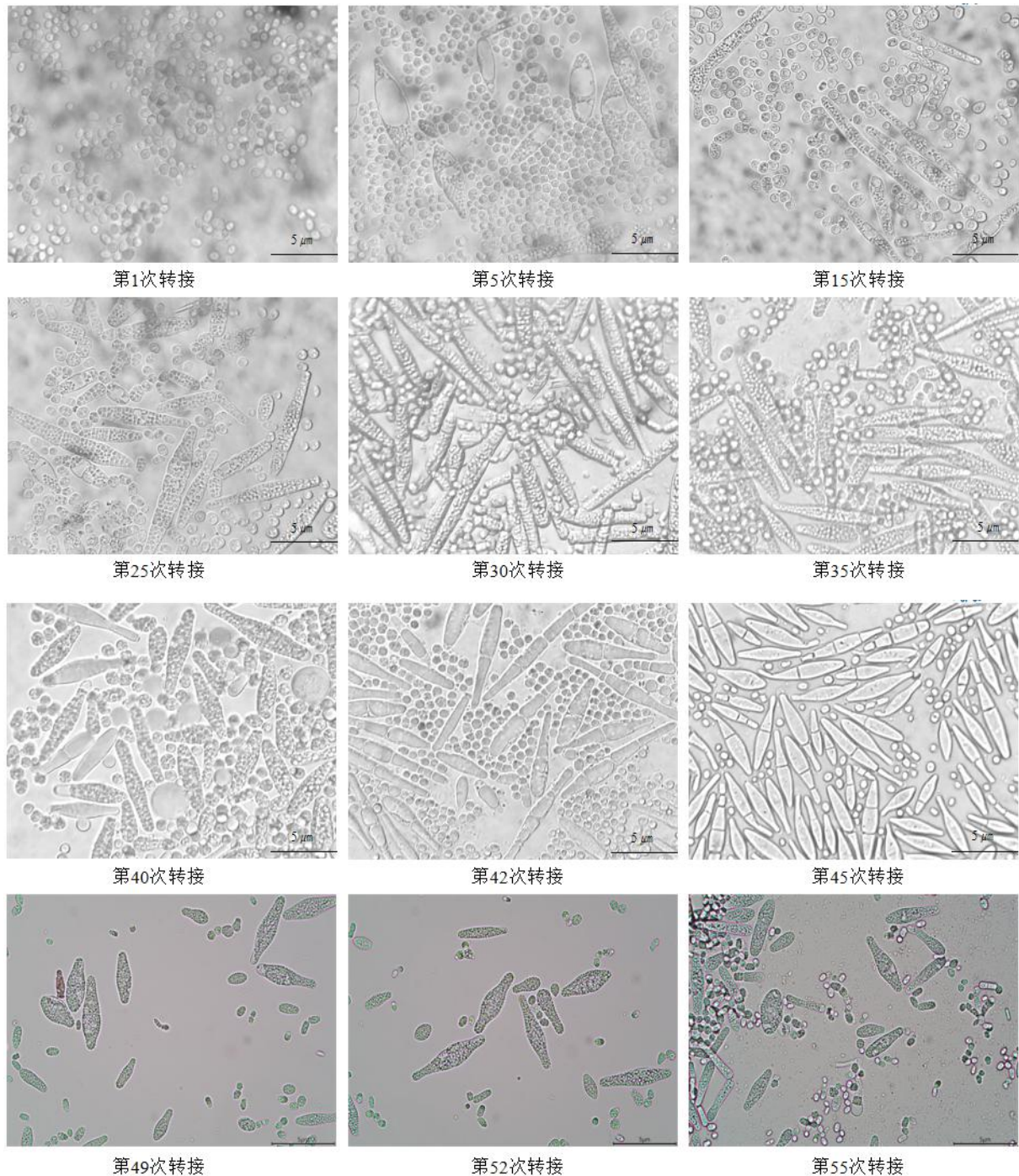


图 2.2 *T. cutaneum* YY 52 筛选过程中不同转接次数细胞形态变化

Fig.2.2 *T. cutaneum* YY 52 cell morphology changes at different transfer time during screening

前 45 次转接使用麦克奥迪 DM-BA300-A 显微镜观察，华为 nova 手机拍照；46 次开始使用 Olympus BX53 及成像系统观察拍照。

2.4.3 *T. cutaneum* YY 52 高产油脂稳定性验证

为验证筛选得到的菌株 *T. cutaneum* YY 52 是否具有遗传稳定性，本实验对 *T. cutaneum* YY 52 活化后，在 15% 固含量小麦秸秆水解液中连续转接 6 次，此时各发酵指标相对稳定，并与出发菌株相比较，其发酵结果如图 2.3 所示。*T. cutaneum* YY 52 在前两次转接时由于细胞活力较弱，因此该过程主要为细胞适应环境与生长的阶段，油脂浓

度及含油率相对较低，自第三次转接开始，细胞产油性能已经恢复，油脂产量增加，且经过四次转接油脂浓度及含油率均处于一个相对稳定的状态，说明 *T. cutaneum* YY 52 的高产油脂发酵性能具有稳定性。筛选菌株 *T. cutaneum* YY 52 与原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 对比，在 15% 小麦秸秆水解液中生长情况基本无明显差别（图 2.3 (a)），但发酵结束后油脂浓度及细胞含油率明显高于 *T. cutaneum* ACCC 20271（图 2.3 (b) (c)）。*T. cutaneum* ACCC 20271 油脂浓度约为 4 g/L，含油率约为 30%。而 *T. cutaneum* YY 52 油脂浓度约为 11 g/L，含油率约为 70%。

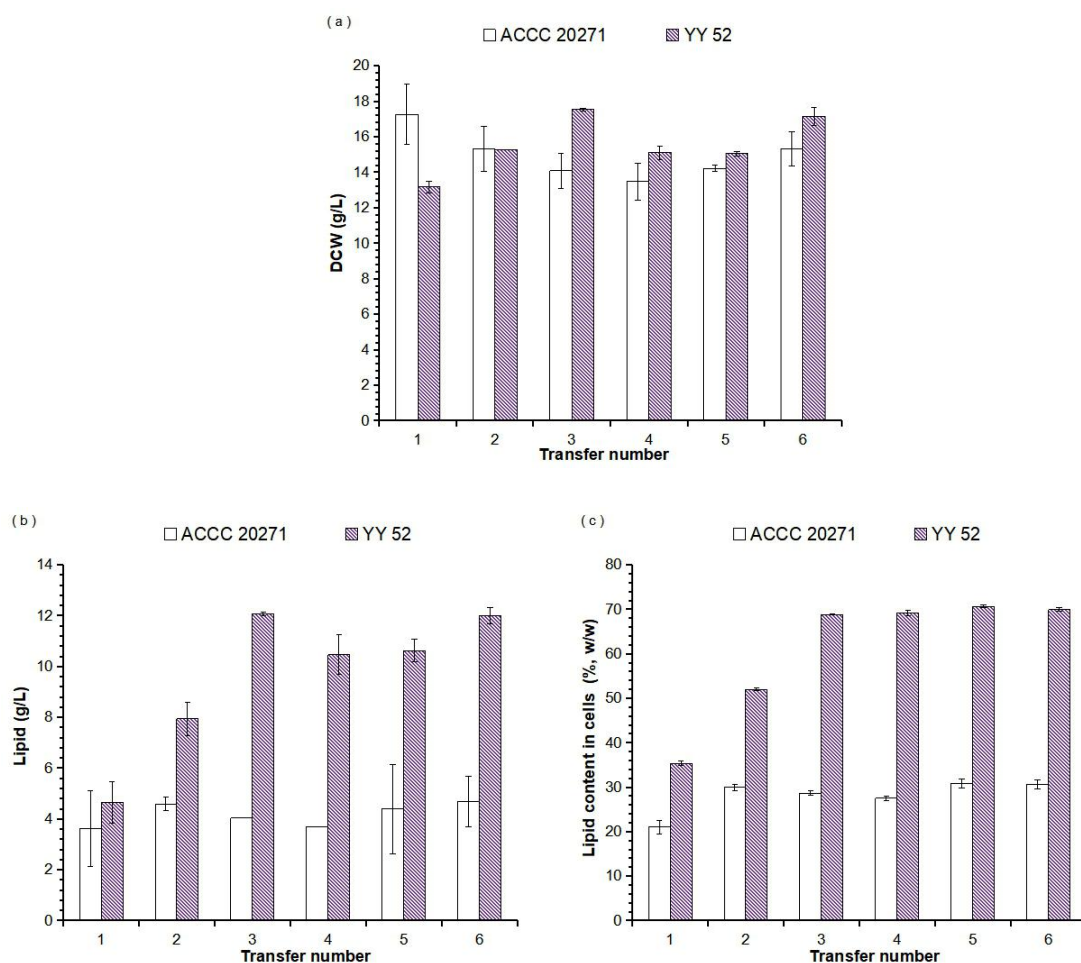


图 2.3 *T. cutaneum* YY 52 稳定高产油脂发酵验证

Fig. 2.3 The stable lipid fermentation of *T. cutaneum* YY 52

(a)细胞干重；(b)油脂浓度；(c)细胞含油率

发酵条件：15%固含量脱毒小麦秸秆水解液，30℃，180 rpm，接种量 10%，培养时间 96 h

2.4.4 不同时期 *T. cutaneum* YY 52 与 *T. cutaneum* ACCC 20271 细胞形态对比

通过观察发现筛选菌株 *T. cutaneum* YY 52 与出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 细胞形态存在明显差异，本实验主要探究并对比两种菌株在发酵过程中不同时期的细胞形态变化，如图 2.4 所示。两种菌株在不同时期的细胞形态存在明显差异。*T. cutaneum* YY 52 在 0 h 时，细胞呈菌丝态，同时存在十分膨大的球形态，培养至 24 h 时，菌丝长度、膨大现象均减小，48 h 时，细胞呈圆形或梭形酵母态，72 h 后多为变大的梭形态，形态

基本稳定；48 h 后胞内油脂小体数量变多且不断增加。而 *T. cutaneum* ACCC 20271 没有发生形态改变，整个发酵中均为小圆形的酵母态。对于细胞形态出现改变的原因，推测是因为经纤维素酶的胁迫及离心筛选后细胞壁合成与分解的相关基因发生差异表达，导致细胞壁刚性减弱，结构相对疏松，细胞形态具有多样化^[90]。关于 *T. cutaneum* YY 52 细胞形态在 YPD 中呈现极长菌丝态的分子调控机制目前尚不清楚。

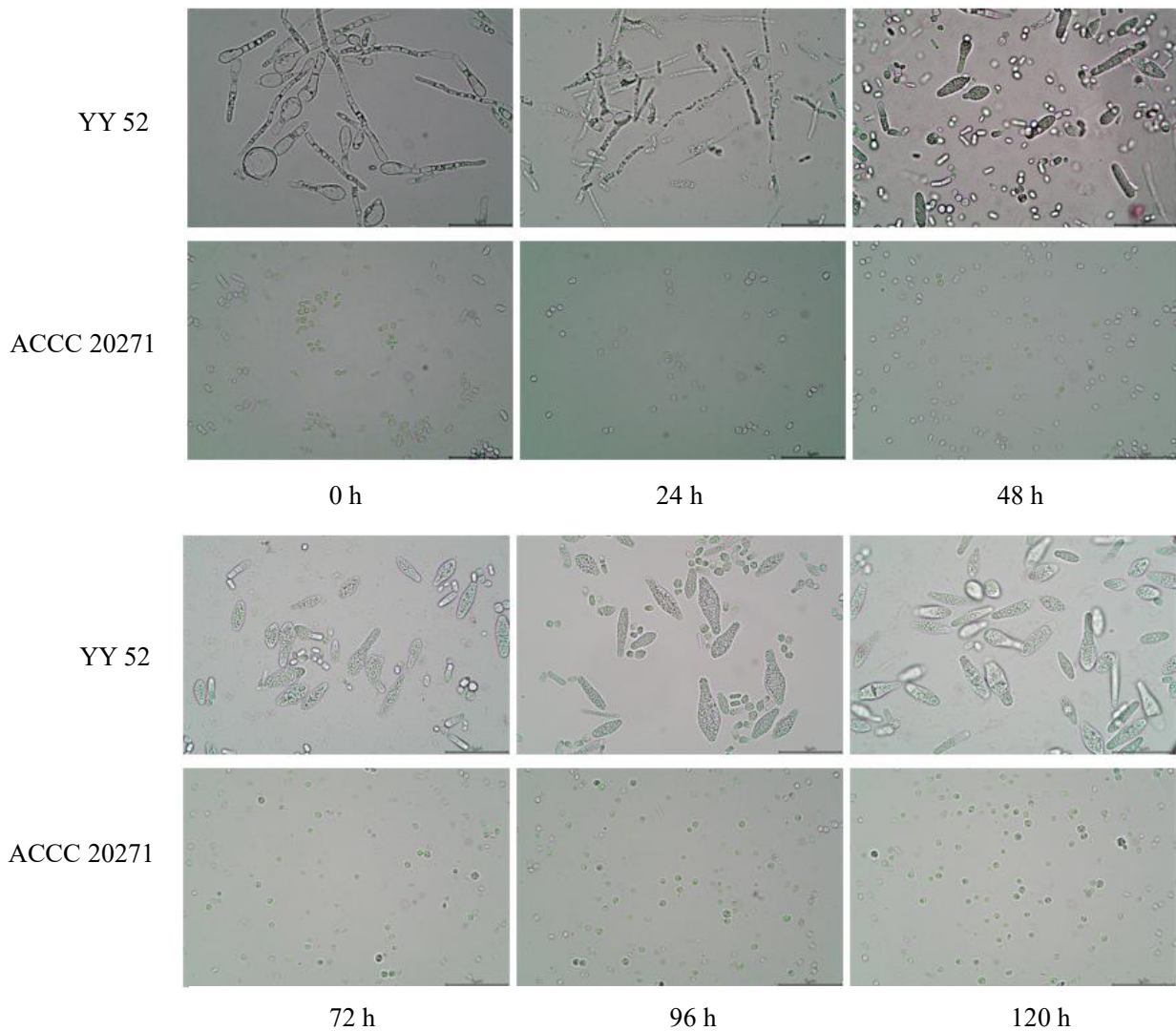


图 2.4 不同时期 *T. cutaneum* YY 52 与 *T. cutaneum* ACCC 20271 细胞形态对比

Fig. 2.4 Cell morphology comparison between *T. cutaneum* YY 52 and *T. cutaneum* ACCC 20271

发酵培养基：15 %固含量小麦秸秆水解液，30 °C，180 rpm，接种量 10 %，培养时间 120 h。0 h 细胞形态指在 YPD 中活化 24 h 后接入水解液时的形态。Olympus BX 53 及成像系统拍摄照片

2.4.5 细胞壁组分测定

酵母的细胞壁是保护细胞免受外界伤害的直接屏障，在维持细胞形态与信息传递方面起具有重要功能^[95]。为进一步的分析细胞形态变化的原因，本实验对 *T. cutaneum* YY 52 与 *T. cutaneum* ACCC 20271 细胞壁中的两种主要多糖含量进行了测定，结果如图 2.5 所示。

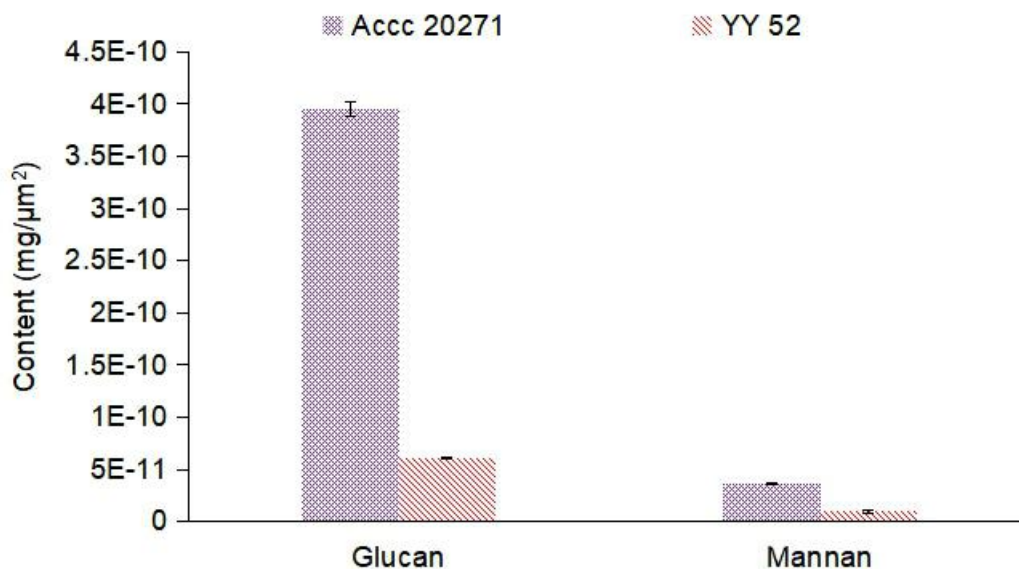


图 2.5 *T. cutaneum* YY 52 及 *T. cutaneum* ACCC 20271 细胞壁组分

Fig. 2.5 Cell wall composition *T. cutaneum* YY 52 and *T. cutaneum* ACCC 20271

酵母细胞壁主要由外层甘露聚糖、中间层为蛋白质，内层葡聚糖组成。两种多聚糖含量较为准确的表示方法为：将整个细胞看似为一个球体，从而计算出球体的体积及单位表面积，最终利用质量与细胞单位表面积的比值表示细胞壁中葡聚糖，甘露聚糖的含量。图 2.5 结果表明：筛选菌株 *T. cutaneum* YY 52 细胞壁中葡聚糖及甘露聚糖含量均明显低于原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271，说明细胞壁的生物合成与出发菌株相比确实发生了改变，细胞壁中多糖含量减少可降低细胞壁厚度，细胞壁刚性随之减弱，形态更易发生改变。

2.4.6 发酵后期细胞因细胞壁极薄而发生破裂的可行性探究

菌株 *T. cutaneum* YY 52 的获得表明纤维素酶确实能够部分酶解细胞壁，使之厚度降低。然后，本文继续探究了 *T. cutaneum* 酵母是否能够在高产油脂的同时，在持续较高剂量的纤维素酶作用下使得发酵后期的细胞因细胞壁极薄而发生破裂，从而节省后续提取油脂的时间及成本。为验证该猜想，对 *T. cutaneum* 酵母进行了一个新的筛选方向，筛选过程如图 2.6 所示。整个筛选过程为四个阶段：第一，二阶段与 *T. cutaneum* YY 52 筛选过程的前两个阶段一致。第三阶段，每次转接添加 4% 纤维素酶，并利用发酵液离心筛选。第四阶段，根据细胞生长及产油情况调整纤维素酶剂量，发酵液离心筛选。

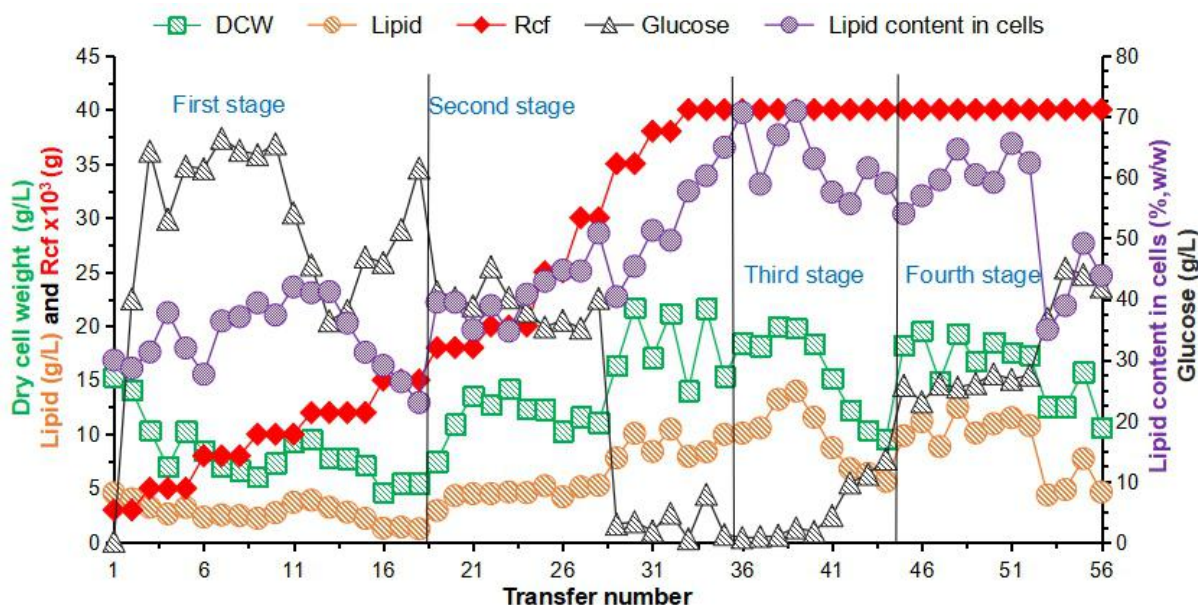


图 2.6 超高速离心筛选发酵后期自裂解的高产油脂细胞

Fig. 2.6 Screening of self-lysing cells in late fermentation

(a) 葡萄糖消耗变化曲线； (b) 细胞干重及油脂浓度变化曲线； (c) 细胞含油率变化曲线

发酵条件：15%脱毒小麦秸秆水解液，30℃，180 rpm，接种量 10%，培养时间 96 h。

该筛选过程同样分为四个阶段：第一，二阶段与 *T. cutaneum* YY 52 筛选过程的前两个阶段一致。在第三，第四阶段，每次转接均向培养基中添加纤维素酶，最开始几次转接细胞生长及油脂含量呈上升趋势，说明具有较高油脂产量的 *T. cutaneum* 酵母在一段时间内能够一直耐受纤维素酶的胁迫并保持不被裂解，但随着筛选的继续进行，细胞生长及油脂含量明显下降。主要原因是在纤维素酶持续存在时，对酵母细胞壁的裂解强度增加，细胞难以正常生长，甚至死亡。或促使 *T. cutaneum* 细胞做出相应的生物合成反应，首先维持正常生长，细胞变小，细胞壁厚度增加，以降低纤维素酶对细胞产生的压力，同时导致细胞分裂速度减慢，细胞内的代谢下降，导致细胞生物量及油脂的产量均降低。

2.4.7 发酵后期细胞因细胞壁极薄而发生破裂的可行性探究中细胞形态变化

对该筛选过程细胞形态的变化情况同样进行了观察，其细胞形态变化如图 2.7 所示。

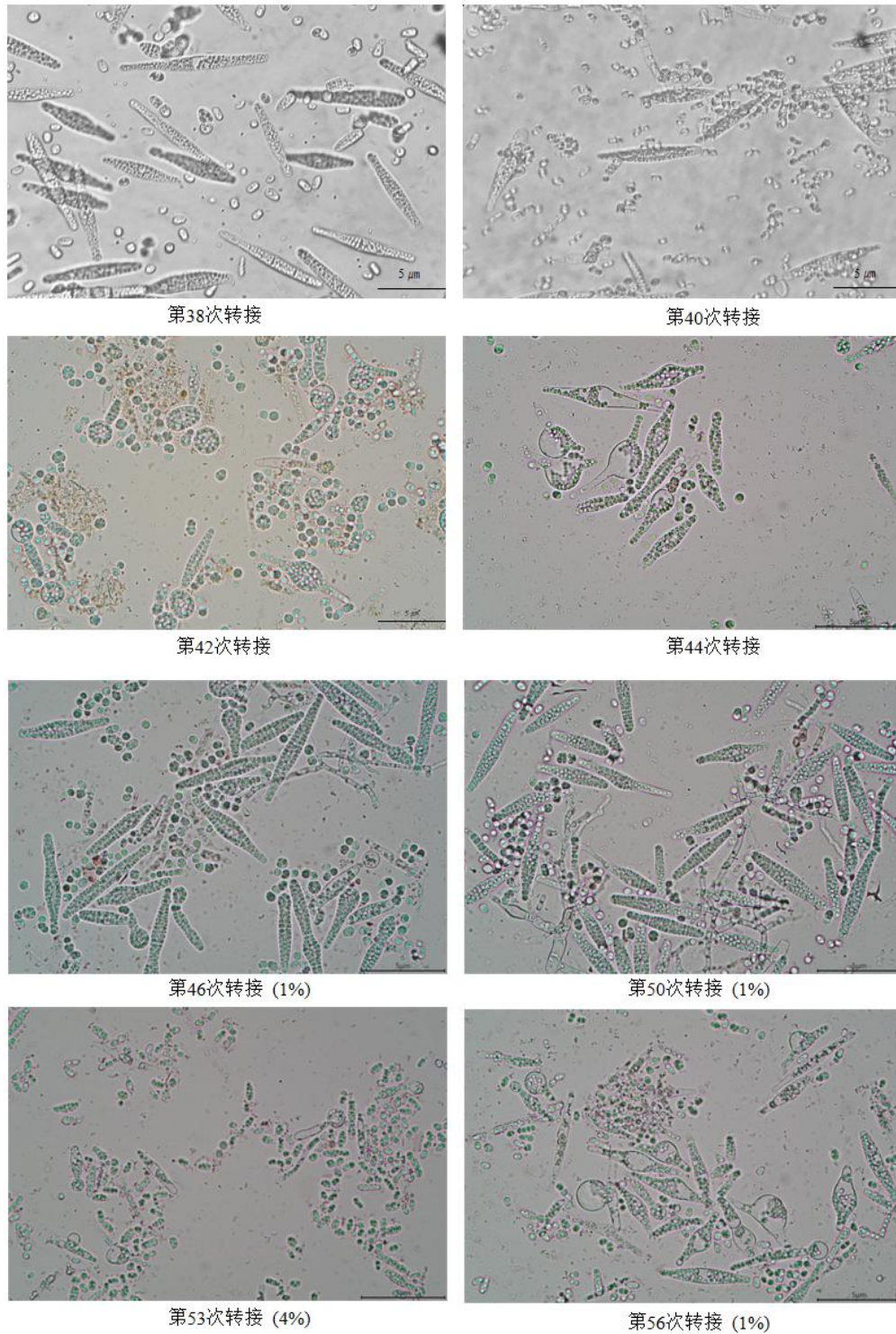


图 2.7 不同转接次数细胞形态变化

Fig. 2.7 Cell morphology changes at different transfer time

前 42 次转接使用麦克奥迪 DM-BA300-A 显微镜观察，华为 nova 手机拍照；48 次开始使用 Olympus BX53 及成像系统观察拍照。

图 2.7 表明：在第三十六次转接之后，因纤维素酶的持续存在，细胞形态逐渐趋于不规则状态，与椭圆状、圆状的细胞都不相同，存在哑铃状或一边膨大的气球状等极不规则形状。推测原因是纤维素酶的持续存在导致细胞壁的正常生物合成失调，因而无法

控制细胞形态，致使细胞形态具有多样性及不规则性。当减少纤维素酶的含量时，细胞形态逐渐恢复正常，增加纤维素酶用量时细胞变小，说明纤维素酶对细胞形态的改变具有很大的影响。细胞形态及细胞内油脂小体的改变与细胞生长、油脂含量变化趋势相一致，细胞内油脂小体减少，细胞变“空”，持续高剂量的添加纤维素酶对细胞的生长及油脂的积累产生副作用，出现细胞退化现象。

2.5 本章小结

在纤维素酶的胁迫下对 *T. cutaneum* 酵母进行一个长期的适应性进化并通过超高速离心筛选的方法，最终得到了一株油脂产量显著增加的突变菌株 *T. cutaneum* YY 52，其在油脂积累及葡萄糖消耗等方面都明显优于原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271。在持续纤维素酶的作用下，希望筛选出高产油脂菌株的同时，发酵后期的细胞在纤维素酶的作用下发生细胞破裂的研究中没有得到较为理想的结果。通过本研究上述实验主要得到以下结论：

纤维素酶能够水解部分 *T. cutaneum* 酵母细胞壁，当在 *T. cutaneum* 酵母发酵培养基中加入适宜剂量的纤维素酶后能使细胞形态快速发生改变，具体表现为细胞尺寸明显变大，当细胞变大后，更有利于营养物质的传递及生物合成，与正常的圆形态细胞相比可以积累更多油脂，经过离心后更易被筛选出来，最终得到了能够稳定遗传的高产油脂菌株 *T. cutaneum* YY 52。

超高速离心筛选方法是通过不同细胞中油脂含量不同，存在密度差异，低油脂量的重细胞在离心过程中很快沉入底部，而密度更小的高含油轻量细胞则漂浮在液体上表面。离心转速越高，越多细胞沉入底部，上层的漂浮细胞含油量越高，通过不断的提高离心转速能够筛选得到高产油脂的菌株。在离心发酵液中加入密度更低的物质玉米油作为一种离心的介质，使密度更低的细胞漂浮在玉米油上层，从而筛选出油脂产量进一步提高的细胞。但玉米油可能进入细胞导致细胞内油脂短时间内迅速增加，对于油脂及细胞生物量的测定造成一定误差，另一方面，能够漂浮在玉米油上层的细胞较少，最终细胞生物量有所降低，随着离心转接过程导致接种量过少，在发酵过程中增加了染菌的概率，因此可以选择在一段时间内利用玉米油作为离心介质筛选更高油脂产量的菌株。

在持续纤维素酶的作用下筛选发酵后期因细胞壁极薄而发生破裂的探究结果表明，当纤维素酶的剂量较高且一直存在时，纤维素酶对细胞壁中葡聚糖的持续降解作用，使细胞壁正常合成受到严重影响。细胞形态变得极不规则，细胞生长受到影响，随着筛选的进行，细胞生物量不断降低，油脂产量下降，细胞内仅存在少量的油脂小体。为降低提取油脂破壁过程所带来的时间及能源损耗，仍需进一步的研究。

第 3 章 *T. cutaneum* YY 52 木质纤维素原料同步糖化共发酵生产油脂

3.1 引言

以木质纤维素为原料生产微生物油脂有分步糖化发酵 (SHF) 及同步糖化发酵 (SSF) 两种方式^[80]。分步糖化与发酵即糖化过程与发酵过程分开进行, 首先在最适条件下将木质纤维素原料水解为微生物可利用的单糖并将固液分离, 得到含糖水解液, 随后发酵菌株再以水解液为生长培养基进行油脂发酵。该方法不仅操作复杂, 增加生产成本, 且高浓度糖一定程度上抑制了纤维素酶活性及发酵菌株生长, 降低了发酵性能。同步糖化与发酵 (SSF) 即糖化、发酵同时进行, 将脱毒后的原料, 纤维素酶, 发酵菌株及所需的灭菌水加入至同一生物反应器中, 使得糖化、微生物的生长与油脂发酵同时进行。此方法的主要问题为糖化与发酵的条件不一致, 一般以发酵条件设置温度, PH 等参数, 因而导致糖化效率低。本研究采用同步糖化与油脂共发酵 (SSCF) 的方法: 首先将木质纤维素原料在生物反应器中酶水解 12 h, 之后再接入菌株进行油脂发酵, 该方法有效的提高了糖化效率, 解除了高糖浓度对菌体生长的抑制作用, 同时节约了固液分离的成本。

目前, 利用木质纤维素生产微生物油脂存在的主要问题之一是发酵指标过低, 因而导致纤维素油脂工业化应用具有很大难度。影响发酵的原因主要有以下几点: (1) 抑制物的存在, 预处理后木质纤维素中的抑制物能够影响菌株的正常生长, 进而影响油脂的积累情况。(2) 木糖的低效利用, 木质纤维素糖化后可产生大量的木糖, 在小麦秸秆, 玉米秸秆中木糖量可占总糖量的 30%, 是仅低于葡萄糖的糖分, 但大多数油脂微生物不存在木糖代谢路径, 导致木糖不能利用而造成浪费; 少部分能利用木糖的油脂微生物, 因存在葡萄糖效应致使木糖仅能在葡萄糖耗完后再利用, 延长了发酵所需的时间。

(3) 高固含量发酵难于实现, 该问题主要在于高固含量的木质纤维素搅拌较为困难, 导致反应器内温度控制效果差, 纤维素酶与物料不能混合均匀, 影响糖化效果和发酵指标^[109]。此外, 高固含量下抑制物的含量也会随之增加, 则对发酵菌株的生长及纤维素酶的活力抑制效果增强^[108]。虽然有报道称高固含量的搅拌困难问题可通过分批补料或提高纤维素酶用量两种方式缓解^[109], 但分批补料不仅耗时长, 且操作复杂; 而增加纤维素酶用量则会提高成本。在本实验室前期的研究工作中, 开发了一种具有新型螺带搅拌桨的生物反应器, 其能在 30% (w/w) 固含量的玉米秸秆中通过同步糖化发酵生产乙醇。利用该反应器已成功实现 30% (w/w) 高固含量的纤维素油脂发酵, 并通过半连续发酵模式生产了 46.7 g/L 的油脂^[110]。该生物反应器为本研究获得的高纤维素油脂浓度奠定了基础。综上所述, 筛选出一株能够易于培养、多底物利用、高速率及高固含量发酵、高油脂产量的优良菌株对于促进纤维素油脂发展具有重要意义。

本章内容主要是通过 SSCF 方式, 对筛选菌株 *T. cutaneum* ACCC YY 52 的发酵性能进行探究, 并与原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行比较。主要研究内容为: 静态脱

毒及快速脱毒两种不同脱毒方式对发酵性能的影响；小麦秸秆，玉米秸秆不同原料下油脂产量的探究。同时对本论文中得到的油脂产量与目前文献报道的纤维素油脂产量进行了比较。

3.2 实验材料

3.2.1 原料

小麦秸秆购买于河南南阳自 2019 年春季收获，玉米秸秆购买于河南南阳自 2019 年秋季收获。

3.2.2 菌株及培养基

发酵菌株：*Trichosporon cutaneum* ACCC 20271；*Trichosporon cutaneum* YY 52，由本研究筛选得到的一株高产油脂菌株

小麦及玉米秸秆使用的生物脱毒菌株：由本实验室筛选得到的一株高效生物脱毒菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 进行脱毒，宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 在合成培养基平板中 37 °C 培养。

YPD 培养基：葡萄糖 20 g/L，酵母提取物（Yeast Extracts）10 g/L，蛋白胨 20 g/L，（YPD 平板另加琼脂 20 g/L），115 °C 灭菌 20 min。

合成培养基：葡萄糖 60 g/L、YE 1 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L、(NH₄)₂SO₄ 0.22 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L。

3.3 实验方法

3.3.1 种子培养

Trichosporon cutaneum ACCC 20271 种子培养：参考 2.2.1 种子培养

Trichosporon cutaneum YY 52 种子培养：*Trichosporon cutaneum* YY 52 在 15 % 脱毒小麦秸秆水解液中培养 96 h 后 40000g 离心 4 min，按照 10% 的接种量，将离心后的上层菌体接入 YPD 中培养 18-20 h 做为种子液。

Paecilomyces variotii FN89 种子培养：取保存于 -80 °C 冰箱的冻存管，室温静置至融化，吸取 100 μL 种子液于合成培养基中并涂布均匀，37 °C 培养 48h~72 h。

3.3.2 小麦秸秆及玉米秸秆预处理

详见 2.3.2

3.3.3 预处理小麦秸秆与玉米秸秆生物脱毒

脱毒种子培养：首先根据预处理时所用的酸量，将秸秆原料利用 CaCO₃ 固体中和 pH 至 5.0 左右，将长满宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN891 孢子的平板加入到装有 100g 预处理后秸秆物料的小收纳盒中，每隔 12 h 向收纳盒中喷一次水，并观察生长情况，37 °C 培养箱中培养 3-4 天至 100 g 物料中全部长满孢子，此物料作为一级脱毒种子，随后再按照 10% 接种量将一级脱毒种子加入 500g 预处理后的物料中，以相同的操作方法，放置于 37 °C 培养箱培养 2-3 天后作为二级脱毒种子。

小麦秸秆, 玉米秸秆的脱毒方法相同, 脱毒方式有静态脱毒和快速脱毒两类。静态脱毒即为将脱毒种子以 10%接种量加入至装有已知重量的预处理物料的收纳盒中, 并进行充分混匀, 每隔 12 h 向收纳盒中喷一次水, 以保证水分充足脱毒菌株快速生长, 随后室温放置下至抑制物完全脱除, 约 120 h。

快速脱毒是将物料置于 15 L 生物反应器中, 以 10% 接种量接入脱毒种子, 37 °C 培养至抑制物完全脱除, 脱毒时间约 72 h, 通气量设置为 0.8 vvm。

3.3.4 同步糖化与共发酵

T. cutaneum ACCC 20271 和筛选菌株 *T. cutaneum* YY 52 分别利用 30%固体含量的脱毒小麦秸秆及脱毒玉米秸秆进行 SSCF, 其操作步骤相同, 以小麦秸秆例具体实验方法为: 首先 30%固体含量的秸秆在具有螺旋式搅拌桨 5 L 发酵罐中以 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固, pH4.8, 50 °C, 180 rpm 的条件进行 12h 预糖化, 随后将糖化液转入到 3L 发酵罐中, 并加入营养盐及按照 10 % (v/v) 接种量将种子接入。营养盐添加量为 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。发酵的温度设置 30 °C, pH 用 4MHCL 控制在 5.0, 450 rpm, 1 vvm, 发酵时间为 120h。

3.3.5 高效液相色谱(HPLC)分析

SSCF 过程中葡萄糖, 木糖的消耗量使用 HPLC 进行测定。检测器为日本岛津公司 RID-10A 示差折光检测器, HPLC 色谱柱为 Bio-Rad HPX-87H (300 mm×7.8 mm)。以 5 mM H_2SO_4 作为流动相, 流速设置 0.6 mL/min, 柱温设置为 65 °C, 采用自动进样方式, 进样量为 20 μL 。每 12 h 取样一次测定葡萄糖, 木糖的消耗量, 13000 rpm, 5 min 离心样品之后, 将上清稀释 20 倍, 经过 0.22 μm 滤膜过滤, HPLC 进行定量分析。

3.3.6 油脂测定

每 24h 进行一次取样测定油脂浓度。取样时将样品放置在已知重量的 50 mL 离心管中, 进行称量后差重法计算出样品重量。随后 12000 rpm, 6 min 将样品进行离心, 离心后可以观察到分层现象, 上层为菌体, 下层为木质素残渣, 将上层菌体轻轻刮下并转移至平板中, 超纯水冲洗 2-3 次保证菌体被全部收集, 随后将平板放置在 60 °C 烘箱下过夜烘干, 然后向平板中加入 6 mL HCl (4 mol/L) 溶液用以浸泡菌体, 室温放置 4 h, 随后转移浸泡后的菌体至 50 mL 的离心管中, 将离心管放于沸水浴中煮沸 20 min, 煮沸结束后再将离心管放入冰中冷却 10 min, 之后量取 20 mL 氯仿甲醇 (2:1, v/v) 溶液转至离心管中用以萃取油脂, 用两层封口膜将离心管与盖子封紧, 随后置于在 30 °C, 180 rpm 的摇床中萃取 1-2 h。萃取完成后, 11000 rpm 条件下离心 5 min 使得油脂层和水相层分离, 用注射器将离心管下层含有油脂的氯仿层提取至已测定质量的旋蒸瓶中, 并置于旋转蒸发仪中蒸发直至去除氯仿, 温度设置为 80 °C, 然后将旋蒸瓶置于 60 °C 烘箱中烘干至恒重, 差重法得出油脂浓度。

3.4 结果与讨论

3.4.1 静态生物脱毒小麦秸秆的 SSCF 发酵性能

在第二章中主要进行了摇瓶发酵实验,为更好的验证 *T. cutaneum* YY 52 的发酵性能,本章在 3 L 的生物反应器中进行了放大实验。本节的发酵实验主要探究原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 和筛选菌株 *T. cutaneum* YY 52 利用静态生物脱毒小麦秸秆的发酵性能,发酵结果如图 3.1 所示:

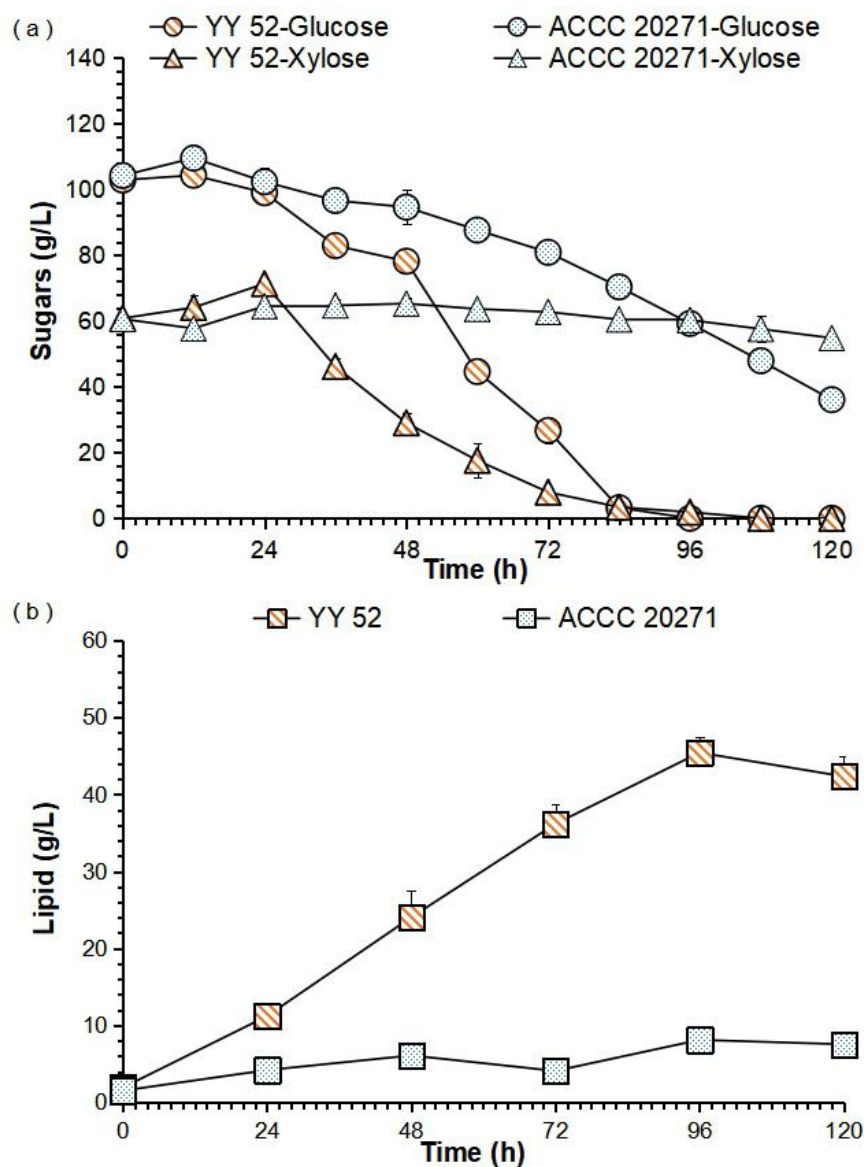


图 3.1 静态生物脱毒时 30% 固体含量小麦秸秆 SSCF

Fig. 3.1 30% Wheat straw SSCF with during static bioremediation

(a) 两种菌株的葡萄糖及木糖消耗变化曲线; (b) 两种菌株的油脂浓度变化曲线

发酵条件: 在 3 L 发酵罐中进行, 30 °C, 450 rpm, PH 控制在 5.0~5.5, 发酵时间为 120h

静态生物脱毒及 12 h 预糖化后, 30% 固含量的小麦秸秆初始葡萄糖浓度为 102 g/L, 木糖为 60 g/L。图 3.1 表明, 发酵前 24 h 同为 *T. cutaneum* YY 52 和 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长延滞期, 此过程糖耗较慢; 24 h 后 *T. cutaneum* YY 52 糖耗速率加快, 直至

96 h 时葡萄糖、木糖均已基本耗完，此过程中油脂积累不断增加。而 *T. cutaneum* ACCC 20271 主要用于细胞生长，产油脂较少，糖耗速度也比较慢，在发酵结束后仍剩余 36 g/L 的葡萄糖和 54 g/L 的木糖，仅有 6 g/L 的木糖被消耗。*T. cutaneum* YY 52 在 96 h 时，油脂产量最高达到 43.8 g/L，*T. cutaneum* ACCC 20271 油脂产量也在 96 h 最高为 8.1 g/L。

3.4.2 快速生物脱毒小麦秸秆的 SSCF 发酵性能

原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 和筛选菌株 *T. cutaneum* YY 52 在经过快速生物脱毒的小麦秸秆中进行油脂发酵，结果如图 3.2 所示：

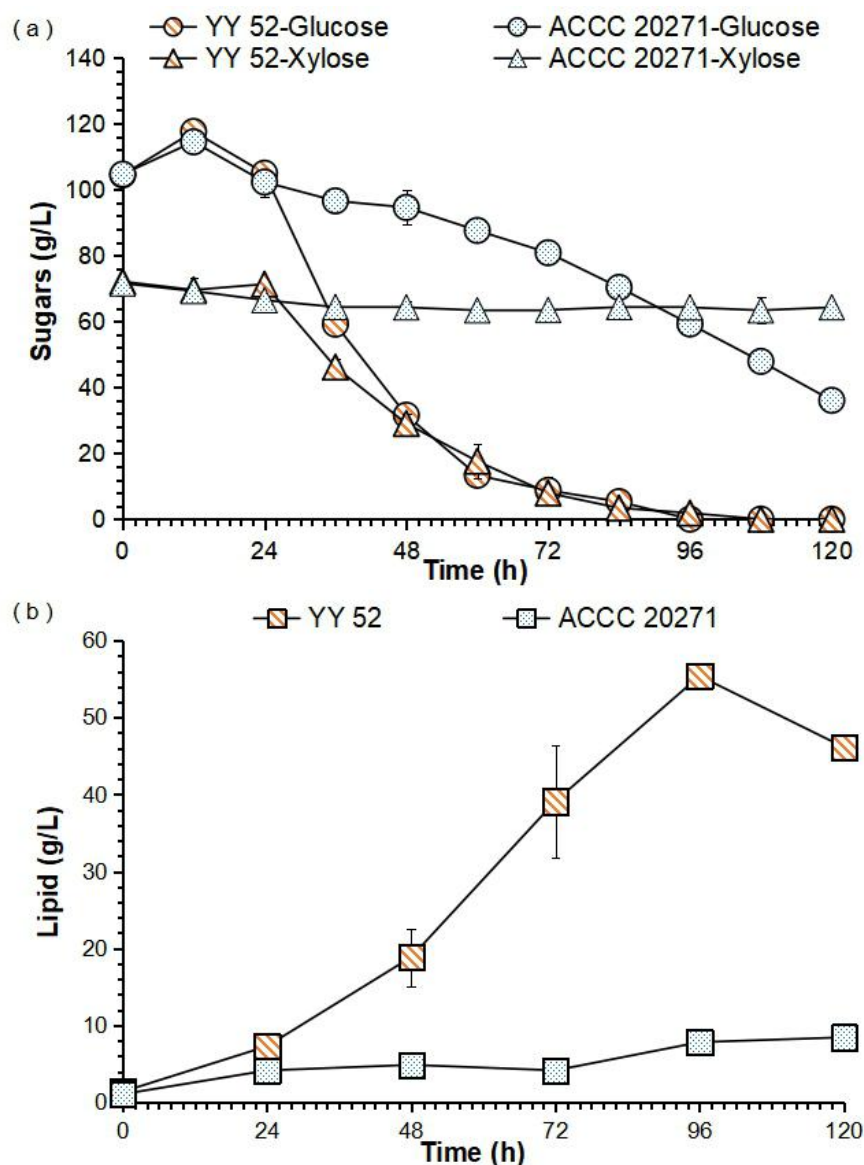


图 3.2 快速生物脱毒 30% 固体含量小麦秸秆 SSCF

Fig.3.2 30% Wheat straw SSCF with during s accelerated biotransformation

(a) 两种菌株的葡萄糖及木糖消耗变化曲线； (b) 两种菌株的油脂浓度变化曲线

发酵条件：在 3 L 发酵罐中进行，30 °C，450 rpm，PH 控制在 5.0~5.5，发酵时间为 120h

经快速生物脱毒及 12 h 的预糖化后，30% 固含量小麦秸秆初始葡萄糖浓度约为 104 g/L，木糖为 70 g/L。图 3.2 结果表明，*T. cutaneum* YY 52 在 12 h 后开始快速消耗葡萄糖，木糖的快速消耗在发酵 24 h 后，发酵进行至 96 h 时已完全消耗葡萄糖和木糖，*T.*

T. cutaneum ACCC 20271 在发酵结束后则剩余 38 g/L 的葡萄糖和 64 g/L 的木糖，同样仅利用了 6 g/L 的木糖。*T. cutaneum* YY 52 在糖完全被耗尽的 96 h 时，油脂产量最高达到 55.4 g/L，*T. cutaneum* ACCC 20271 最高油脂产量为 8.4 g/L。

3.4.3 静态生物脱毒玉米秸秆的 SSCF 发酵性能

在前面的内容中，主要以小麦秸秆为原料对筛选菌株和出发菌株进行发酵实验。在下面的实验中，主要探究 *T. cutaneum* YY 52, *T. cutaneum* ACCC 20271 以玉米秸秆为原料进行发酵时的油脂产量。本节主要探究玉米秸秆在经过静态生物脱毒后，*T. cutaneum* ACCC 20271 和 *T. cutaneum* YY 52 以其为原料时的发酵性能，结果如图 3.3 所示：

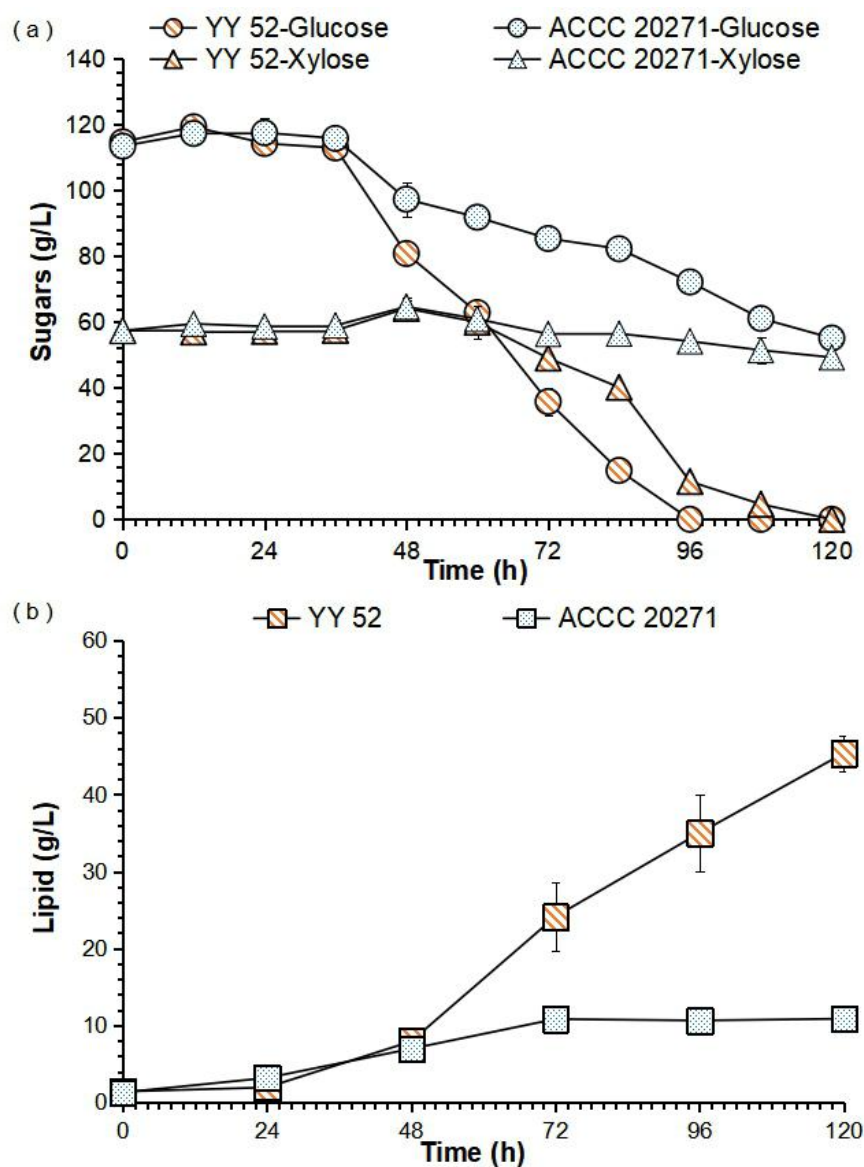


图 3.3 静态生物脱毒 30% 固体含量玉米秸秆 SSCF

Fig. 3.3 30% Corn stover SSCF with during static biodegradation

(a) 两种菌株的葡萄糖及木糖消耗变化曲线；(b) 两种菌株的油脂浓度变化曲线
 发酵条件：在 3 L 发酵罐中进行，30 °C，450 rpm, PH 控制在 5.0~5.5，发酵时间为 120h

在静态生物脱毒及 12 h 的预糖化后, 30% 固含量的玉米秸秆约含有 114 g/L 的葡萄糖, 57 g/L 的木糖。在发酵的前 36 h 两种菌株的生长均有一定延滞, 该时间内糖耗较慢, 36 h 后 *T. cutaneum* YY 52 葡萄糖消耗速率明显变快, 木糖也开始同步利用, 96 h 时葡萄糖完全耗尽, 120 h 时木糖被全部耗完。至发酵结束 *T. cutaneum* 202271 葡萄糖、木糖均有约 50 g/L 的残留, 利用了 64 g/L 的葡萄糖及 7 g/L 的木糖。整个发酵过程中, *T. cutaneum* YY 52 产油量不断升高, 油脂浓度在发酵结束 120 h 时最高达到 45.3 g/L, 而 *T. cutaneum* 202271 油脂产量在 96h 最高为 9.9 g/L。

3.4.4 快速生物脱毒玉米秸秆的 SSCF 发酵性能

本节主要对两种菌株在快速生物脱毒的玉米秸秆中进行发酵实验。如图 3.4 所示:

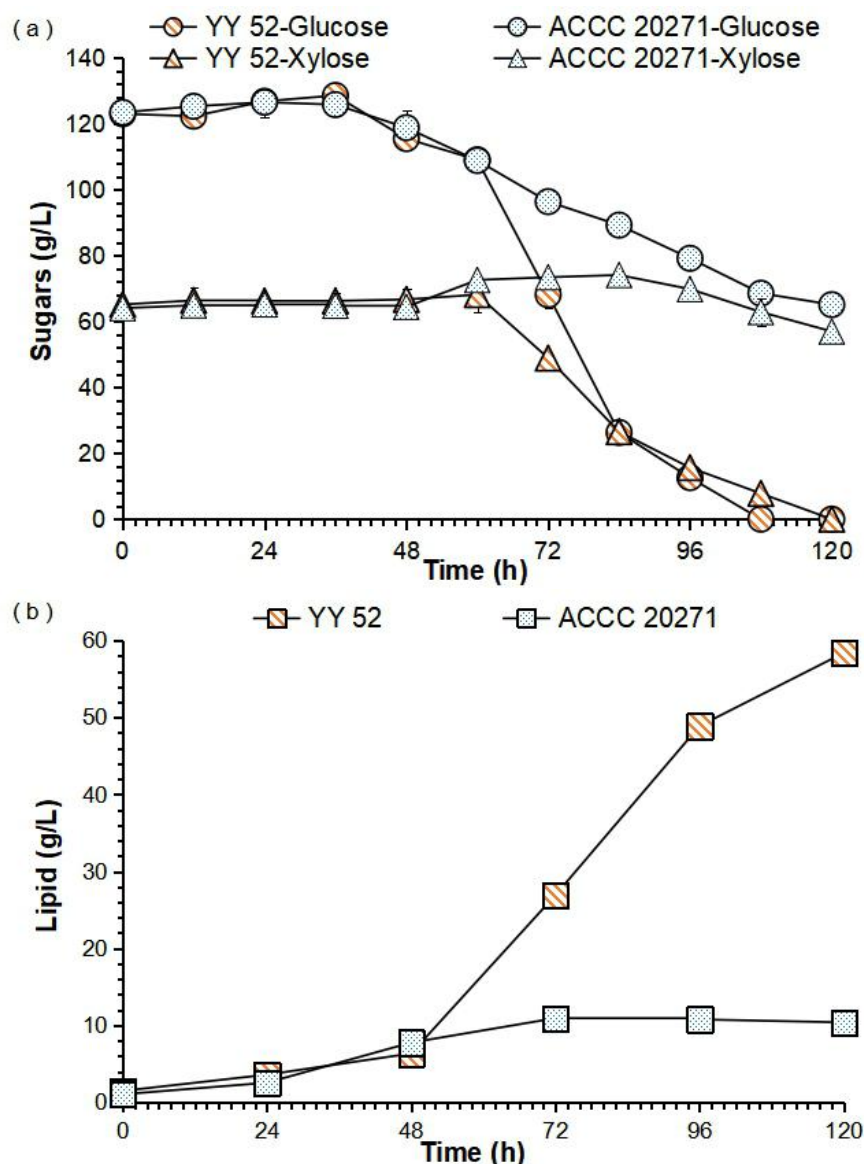


图 3.4 快速生物脱毒 30% 固体含量玉米秸秆 SSCF

Fig. 3.4 30% Corn stover SSCF with during accelerated biodegradation

(a) 两种菌株的葡萄糖及木糖消耗变化曲线; (b) 两种菌株的油脂浓度变化曲线
发酵条件: 在 3 L 发酵罐中进行, 30 °C, 450 rpm, PH 控制在 5.0~5.5, 发酵时间为 120h

与小麦秸秆相比,玉米秸秆中纤维素,半纤维素的含量更高,糖化后可利用单糖增加。相比于静态脱毒,快速生物脱毒时能够更好的控制脱毒菌株的生长环境,效果更好。因此,以快速生物脱毒的玉米秸秆为原料进行发酵时更能得到高油脂产量。

经快速生物脱毒,12 h 预糖化后,30%固含量的玉米秸秆葡萄糖浓度可达 120 g/L,木糖为 65 g/L。发酵过程中(图 3.4),*T. cutaneum* YY 52 表现出了一段较长时间的延滞期,前 60 h 葡萄糖缓慢被消耗,木糖未被利用,60 h 后葡萄糖、木糖的消耗速率同时增加,发酵至 120 h 时葡萄糖、木糖被全部耗尽。与之前的发酵结果相似,*T. cutaneum* ACCC 20271 在发酵结束时仍有大量葡萄糖,木糖残余,且极少量木糖被利用。*T. cutaneum* YY 52 在发酵结束时,油脂浓度最高达到了 58.4 g/L,而 *T. cutaneum* ACCC 20271 在 96h 达到最高浓度 10.3 g/L。

3.4.5 纤维素油脂产量对比

目前,以木质纤维素为原料生产微生物油脂已有一些报道,我们对上述研究得到的发酵结果与文献报道进行了对比(表 3.1)。因为木质纤维素中存在的一些成分十分复杂,利用比色法计算油脂产量误差较大,结果具有不精确性,因此我们只与重量法测定得到的油脂产量进行了对比,重量法测定油脂产量主要指通过有机溶剂萃取胞内油脂后,再经过旋蒸去除有机溶剂后计算得到的结果。*T. cutaneum* YY 52 在以快速脱毒的小麦秸秆为底物时,得到了 55.4 g/L 的油脂产量,油脂生产速率为 11.1 g/L/day,油脂产率为 0.32 g/g 总糖;*T. cutaneum* YY 52 在快速脱毒的玉米秸秆中发酵时,油脂产量达到了 58.4 g/L,油脂生产速率可达 11.7 g/L/day,油脂产率为 0.32 g/g 总糖;在两种秸秆中得到的发酵指标均为目前纤维素油脂发酵的最高水平。

表 3.1 不同微生物利用木质纤维素生物质为原料的发酵性能

Table 3.1 Lipid content of some oleaginous microbes

Feedstock	Biorefining method	Strains	Lipid content (%)	Lipid titer (g/L)	Lipid productivity (g/L/day)	Lipid yield (g/g total sugars)	Sources
Wheat straw	Dry acid pretreatment and Biodetoxification, SSCF	<i>T. cutaneum</i> YY 52	70	55.4	11.1	0.32	This study
Wheat straw	Dry acid pretreatment and Biodetoxification, SSCF	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271	30	8.1	1.6	0.05	This study
Corn stover	Dry acid pretreatment and Biodetoxification, SSCF	<i>T. cutaneum</i> YY 52	70	58.4	11.7	0.32	This study
Corn stover	Dry acid pretreatment and Biodetoxification, SSCF	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271	30	10.3	2	0.06	This study
Corn stover	Dry acid pretreatment and Biodetoxification, SSCF	<i>T. cutaneum</i> WL97	66.3	46.7	9.3	0.22	[110]
Corn stover	Dry acid pretreatment and Biodetoxification, SSCF	<i>T. cutaneum</i> MS28	61	34.4	8.6	0.21	[90]
Corn stover	AFEX pretreatment, SHF	<i>C. Humicola</i> UCDFST 10-1004	27	15.5	N/A	0.12	[111]
Corn stover	Dilute acid pretreatment, SHF	<i>R.graminis</i> DBVPG 4620	40	16.3	5.4	0.08	[112]
Corn stover	Dilute acid pretreatment, SHF	<i>M.isabeUma</i> ACCC 42613	34	4.8	1.2	0.15	[113]
Corn stover	Alkali pretreatment, water washing, SSF	<i>C. curvalus</i> ACCC 20509	34.5	15.1	4.7	0.18	[114]
Wheat straw	Dilute acid hydrolysate,	<i>M. Isabellina</i> NRRL 1757	N/A	4.4	0.7	0.07	[115]
Wheat straw	Dilute acid hydrolysate, overlming	<i>C. curvalus</i> ACCC 20509	36.3	5.8	0.8	0.07	[116]
Corn cob	Dilute acid hydrolysate, overlming	<i>T. cutaneum</i> CH002	33.5	10.4	2.1	0.2	[117]
Corn cob	SHF	<i>T. dermatis</i> CH007	36	9.8	1.4	0.16	[118]

3.5 本章小结

本章主要对高产油脂突变菌株 *T. cutaneum* YY 52 利用不同脱毒方式的小麦、玉米秸秆为底物时的发酵性能进行了探究，并与原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 的发酵性能进行比较，主要得到以下结论：

与快速生物脱毒相比，在两种原料的秸秆中经静态生物脱毒后得到的总糖量均有所下降，约降低了 10-15 g/L 的总糖含量；发酵结果同时表明，*T. cutaneum* YY 52 以静态生物脱毒的秸秆原料进行发酵时得到的最高油脂浓度均有下降。其主要原因为当脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN891 在收纳盒中静置进行脱毒时，不能保证氧气的通入，使 *P. variotii* FN891 长期处于无氧状态，对抑制物的代谢速度减慢，可能导致抑制物不能被完全脱除；同时增加了糖的消耗并产生乙醇，对 *T. cutaneum* YY 52 的发酵性能产生影响。快速生物脱毒法脱毒时间短，糖耗更少，油脂产量更高，因此更适合于研究需要。

T. cutaneum ACCC YY 52 能够同时利用木质纤维素中的葡萄糖和木糖，不存在葡萄糖效应，而 *T. cutaneum* ACCC 20271 几乎无木糖利用能力。*T. cutaneum* ACCC 20271 以小麦秸秆为原料时得到的油脂浓度约 8 g/L，*T. cutaneum* ACCC YY 52 利用静态脱毒的小麦秸秆时油脂浓度为 43.8 g/L，在快速脱毒的小麦秸秆中进行发酵时油脂浓度可达 55.4 g/L。当 *T. cutaneum* ACCC YY 52 利用小麦秸秆进行发酵时，葡萄糖，木糖在 96 h 的时候均被彻底利用，并达到最高油脂产量，随后油脂产量有所下降，说明当培养环境中缺乏可供 *T. cutaneum* ACCC YY 52 利用的碳源时，油脂作为一种细胞内碳源的储存形式将被消耗以供细胞生长。玉米秸秆的初糖浓度比小麦秸秆高，*T. cutaneum* ACCC YY 52 在玉米秸秆中的生长延滞期更长，糖耗速度略有降低，在 120 h 才能完全耗尽葡萄糖，木糖；利用静态脱毒的玉米秸秆油脂浓度最高可达 45.3 g/L，快速脱毒的小麦秸秆油脂浓度可达 58.4 g/L，*T. cutaneum* ACCC 20271 的油脂浓度约为 10 g/L。*T. cutaneum* YY 52 的发酵性能明显优于 *T. cutaneum* ACCC 20271，油脂积累能力有显著的提高。*T. cutaneum* ACCC YY 52 对秸秆原料中葡萄糖，木糖的高效利用使得油脂发酵指标大幅度提高。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论和创新点

缺乏优良的发酵菌株是生产纤维素油脂的一个主要问题。木质纤维素预处理后存在的抑制物,糖化后菌株对戊糖的低效利用,高固含量发酵困难等问题导致菌株发酵性能不强,最终油脂产量较低。因此,优良的发酵菌株应具有易于培养、多底物利用、高速率及高固含量发酵、高油脂产量的特点。传统的高产油脂菌株的筛选方法通常具有操作复杂,筛选效率低等问题。本研究考虑到油脂作为一种胞内产物,油脂的积累与细胞形态存在重要关联,因此在 *T. cutaneum* 酵母的发酵培养基中加入纤维素酶,通过酶解 *T. cutaneum* 酵母细胞壁中的多糖,改变其细胞形态。其次考虑到不同含油率的细胞之间存在密度差异,含油率越高的细胞越容易漂浮在发酵液的上表面,采用超高速离心筛选的方法对 *T. cutaneum* 酵母进行筛选。

限制纤维素油脂工业化发展的另一主要问题是提取油脂困难,成本较高。基于纤维素酶能使 *T. cutaneum* 酵母细胞壁厚度降低,我们考虑到如果 *T. cutaneum* 酵母发酵到油脂积累的后后期时在纤维素酶的作用下能够因细胞壁极薄而发生细胞破裂,那么油脂的提取将变得简单,在很大程度上节约了破碎细胞需要的时间与成本。因此本研究尝试在 *T. cutaneum* 酵母发酵的麦秆水解液中持续添加纤维素酶,再通过离心筛选的方式,对该猜想进行验证。本文的结论和创新点主要有以下几个方面:

(1) 在 *T. cutaneum* ACCC 20271 的发酵培养基中加入纤维素酶后,细胞形态能快速发生改变,细胞体积明显变大。表明通过酶解 *T. cutaneum* 酵母细胞壁组分的形式,可改变细胞壁的生物合成,使细胞尺寸变大,进而提高了细胞内的油脂积累,为筛选工作奠定了重要的基础。该方法为提高微生物油脂及微生物胞内产物提供了一个新的思路。

(2) 本研究采用超高速离心筛选的方法,在长期的转接过程中,自 3000g 开始不断提高离心转速,转速的提高会导致接种量减少,所以葡萄糖消耗,细胞生长,油脂含量略有波动,但整体呈上升趋势,转速提高至 30000g 时,葡萄糖消耗显著增加,细胞含油率也随之升高,说明较高转速下漂浮在上层的细胞油脂积累能力更强,导致糖耗速率加快;当离心转速继续提高至 40000g 时,已达到离心机的最高转速,此时在离心发酵液中加入一种更低密度的玉米油作为离心介质,进一步筛选出含油率更高的细胞,最终筛选得到一株油脂产量大幅度提高的突变菌株,命名为 *T. cutaneum* ACCC YY 52,在以 15% 固含量小麦秸秆水解液为底物时油脂浓度可达 15.18 g/L,含油率可达到 72%。

(3) 在 *T. cutaneum* 酵母发酵培养基中持续添加较高剂量的纤维素酶后,当高剂量的纤维素酶一直存在时,对于体积变大,油脂积累能力提高的细胞产生副作用,出现严重的衰退现象。这是因为细胞具有自我保护机制,当纤维素酶持续存在时,为防止细胞发生破裂,细胞将会变小且细胞壁厚度增加,以维持正常生长。

(4) 对 *T. cutaneum* YY 52 发酵性能进行测定,通过同步糖化与油脂共发酵的方式,

探究了不同原料，不同生物脱毒方式对发酵指标的影响。以静态脱毒的 30 %高固含量小麦秸秆发酵时，油脂浓度达到了 43.8 g/L；以快速脱毒的 30 %高固含量小麦秸秆发酵时，油脂浓度达到了 55.4 g/L。以静态脱毒的 30 %高固含量玉米秸秆发酵时，油脂浓度达到了 45.3 g/L；以快速脱毒的 30 %高固含量玉米秸秆发酵时，油脂浓度高达了 58.4 g/L。相比于原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271，*T. cutaneum* ACCC YY 52 对木质纤维素中葡萄糖，木糖的高效利用使得油脂发酵指标大幅度提高，油脂浓度是同等发酵条件下原始菌株的 6~7 倍。利用快速脱毒的小麦秸秆，玉米秸秆发酵获得的油脂浓度均是目前纤维素油脂产量的最高水平。

4.2 展望

本文围绕木质纤维素原料生产高浓度微生物油脂进行了一系列研究。通过在 *T. cutaneum* 酵母发酵培养基中加入纤维素酶，经过超高速离心筛选后获得了一株能进行高指标纤维素油脂发酵的菌株 *T. cutaneum* ACCC YY 52。本论文中仍存在一些问题需要更深入的研究：

(1) 在 *T. cutaneum* 酵母发酵培养基中加入纤维素酶后，细胞形态快速且明显的发生了改变，推测是纤维素酶部分降解了 *T. cutaneum* 酵母的细胞壁，导致细胞壁生物合成的改变，进而影响了细胞形态的变化，但具体的分子调控机制仍不清楚，后续可从分子代谢路径方面进行深入分析。

(2) *T. cutaneum* ACCC YY 52 在快速生物脱毒的小麦秸秆，玉米秸秆中采用同步糖化与共发酵的方式获得的油脂浓度均为目前纤维素油脂产量的最高水平，但后续的研究仍然可以对发酵条件如转速，发酵方式，营养盐添加量等方面进行优化，进一步提高油脂产量。

(3) 在筛选发酵后期细胞能够因细胞壁极薄而发生破裂的研究中，细胞发生破裂存在一定的困难，但仍可对纤维素酶用量进行探究，过高纤维素酶剂量对细胞生长及油脂积累存在抑制作用，因此可探究纤维素酶合适剂量，在不影响细胞正常生长发酵的情况下，使细胞壁达到最薄，从而减少细胞破壁耗费的时间与成本。

参考文献

- [1] Hoekman S K, Broch A, Robbins C, et al. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012, 16(1): 143-169.
- [2] Knothe G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*. 2005, 86(10): 1059-1070.
- [3] Demirbas A. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy*, 2007, 35(9):4661-4670.
- [4] Knauf M, Moniruzzaman M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. *International Sugar Journal*. 2004, 106(1263): 147-150.
- [5] Cherubini F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 2010, 51 (7): 1412-1421.
- [6] 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.
- [7] Demirbas A. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy*, 2007, 35(9):4661-4670.
- [8] Carraretto, C., Macor, A., Mirandola, Stoppato, Tonon, S. Biodiesel as alternative fuel: Experimental analysis and energetic evaluations. *Energy Oxford*, 2004.
- [9] Mofijur M, Masjuki HH, Kalam MA, Atabani AE, Mobarak HM. Comparative evaluation of performance and emission characteristics of Moringa oleifera and Palm oil based biodiesel in a diesel engine. *Industrial Crops & Products*, 2014, 53(53):78-84.
- [10] 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.
- [11] Milano J, Silitonga AS, Hassan MH, Shamsuddin AH, Wang C-T, Indra Mahlia TM, Siswantoro J, Kusumo F, Sutrisno J. Biodiesel production from Calophyllum inophyllum-Ceiba pentandra oil mixture: Optimization and characterization. *Journal of Cleaner Production*, 2019.
- [12] Husnawan M, Masjuki HH, Mahlia TMI. The interest of combining two additives with palm olein as selected lubricant components. *Industrial Lubrication & Tribology*, 2011, 63(3):203-209.
- [13] Mahdavi M, Abedini E, Darabi AH. Correction: Biodiesel synthesis from oleic acid by nano-catalyst (ZrO₂/Al₂O₃) under high voltage conditions. *Rsc Advances*, 2015, 5(72):55027-55032.
- [14] Shameer PM, Ramesh K. Green technology and performance consequences of an

- eco-friendly substance on a 4-stroke diesel engine at standard injection timing and compression ratio. *Journal of Mechanical Science & Technology*, 2017, 31(3):1497-1507.
- [15] Tariq M, Ali S, Khalid N. Activity of homogeneous and heterogeneous catalysts, spectroscopic and chromatographic characterization of biodiesel: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2012, 16(8):p.6303-6316.
- [16] Katrin O, Claudia G, Timo S, Lutz F, Christoph S. *Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils*. 2016.
- [17] Bet-Moushoul E, Farhadi K, Mansourpanah Y, Nikbakht AM, Molaei R, Forough M. Application of CaO-based/Au nanoparticles as heterogeneous nanocatalysts in biodiesel production. *Fuel*, 2016, 164(JAN.15):119-127.
- [18] Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. Biodiesel Production From Oleaginous Microorganisms. *Renewable Energy*, 2009, 34(1):p.1-5.
- [19] Karamerou EE, Webb C. Cultivation modes for microbial oil production using oleaginous yeasts – A review. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 151:107322.
- [20] Kanakdande AP, Khobragade CN. Exploration of *Staphylococcus nepalensis* (KY024500) Biosurfactant towards Microbial Enhanced Oil Recovery. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2020, 23(3).
- [21] Papadaki A, Cipolatti EP, Aguiéiras E, Pinto MCC, Koutinas AA. Development of Microbial Oil Wax-Based Oleogel with Potential Application in Food Formulations. *Food & Bioprocess Technology*, 2019, 12(6):899-909.
- [22] Chebbi H, Leiva-Candia D, Carmona-Cabello M, Jaouani A, Dorado MP. Biodiesel production from microbial oil provided by oleaginous yeasts from olive oil mill wastewater growing on industrial glycerol. *Industrial Crops and Products*, 2019, 139:111535.
- [23] Yang D, Xiong L, Wang B, et al. Preparation and characterization of epoxidized microbial oil(Article)[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2016(3): 964-971.
- [24] Alvarez H M K R S A. Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB40126[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, 54(2): 218-223.
- [25] Kalscheuer R, Stölting T, Steinbüchel A. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production[J]. *Microbiology (13500872)*. 2006, 152(9): 2529-2536.
- [26] Concas A, Steriti A, Pisu M, et al. Comprehensive modeling and investigation of the effect of iron on the growth rate and lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* cultured in batch photobioreactors[J]. *Bioresource Technology*. 2014, 153: 340-350.
- [27] Huang Gh C F W D. Biodiesel production by microalgal biotechnology[J]. *Applied*

- Energy. 2010, 1(87): 38-46.
- [28] Tibocha-Bonilla J D, Zuñiga C, Godoy-Silva R D, et al. Advances in metabolic modeling of oleaginous microalgae[J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, 11: 241.
- [29] Salbitani G, Barone C M A, Carfagna S. Effect of bicarbonate on growth of the oleaginous microalga *Botryococcus braunii*[J]. *International Journal of Plant Biology*. 2019(1): 10.
- [30] Zhang Y, Ji C, Zhou W, et al. Studies on the Attached Cultivation of Filamentous Oleaginous Microalga *Tribonema minus*[J]. *Journal of Ocean University of China*. 2020(3): 691-699.
- [31] Yen H, Hu I C, Chen C, et al. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products.[J]. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 166-174.
- [32] 薛照辉吴谋成. 微生物油脂进展[J]. *山西食品工业*. 2002, 02: 10-11.
- [33] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media[J]. *Bioresource Technology*. 2004, 95(3): 287-291.
- [34] Sitepu I R, Garay L A, Sestric R, et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production[J]. *Biotechnology Advances*. 2014, 32(7): 1336-1360.
- [35] Sreeharsha R V, Mohan S V. Obscure yet Promising Oleaginous Yeasts for Fuel and Chemical Production[J]. *Trends in Biotechnology*. 2020, 1896: 15.
- [36] M. S, A. Y, M. B. Oleaginous yeast for biofuel and oleochemical production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*. 2019: 73-81.
- [37] Kruger J S, Cleveland N S, Yeap R Y, et al. Recovery of Fuel-Precursor Lipids from Oleaginous Yeast[J]. *ACS SUSTAINABLE CHEMISTRY & ENGINEERING*. 2018(3): 2921-2931.
- [38] 马丽娟, 邢大辉, 王红蕾, 王晓俊, 薛冬桦. 培养条件对产油微生物生长的影响[J]. *生物工程学报*. 2009, 25(1): 55-59.
- [39] Rostron K A, Rolph C E, Lawrence C L. Nile red fluorescence screening facilitating neutral lipid phenotype determination in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, and the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015, 108(1): 97-106.
- [40] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence[J]. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, 56(3): 331.
- [41] Capus A, Monnerat M, Ribeiro L C, et al. Application of high-content image analysis for quantitatively estimating lipid accumulation in oleaginous yeasts with potential for use

- in biodiesel production[J]. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 309-317.
- [42] Cao S, Zhou X, Jin W, et al. Improving of lipid productivity of the oleaginous microalgae *Chlorella pyrenoidosa* via atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. *Bioresource Technology*. 2017, 244: 1400-1406.
- [43] Chandra R, Das P, Vishal G, et al. Factors affecting the induction of UV protectant and lipid productivity in *Lyngbya* for sequential biorefinery product recovery[J]. *Bioresource Technology*. 2019, 278: 303-310.
- [44] Patel V K D M. Rapid budding EMS mutants of *Synechocystis* PCC 6803 producing carbohydrate or lipid enriched biomass[J]. *Algal Research*. 2016(16): 36-45.
- [45] Li S L, Lin Q, Li X R, et al. Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012: 627-634.
- [46] Tanimura A, Takashima M, Sugita T, et al. Lipid production through simultaneous utilization of glucose, xylose, and l-arabinose by *Pseudozyma hubeiensis*: a comparative screening study[J]. *AMB Express*. 2016, 6(1): 1-9.
- [47] 李仁民, 王菊芳, 马爽, 等. 利用脂肪酸合成酶抑制剂和磷酸香草醛反应筛选高产油脂酵母菌[J]. *微生物学通报*. 2008(4): 545-549.
- [48] Liu L P A S C. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*. 2015(29): 36-45.
- [49] Bikash Kumar N B K A. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept[J]. 2020, 106224(199).
- [50] Katzen R, Sawyer F G, Othmer D F. Extraction of Lignin from Hydrolyzed, Lignocellulose[J]. *Industrial & Engineering Chemistry*. 2002(12): 1218-1222.
- [51] Xu C, Zhang J, Zhang Y, et al. Long chain alcohol and succinic acid co-production process based on full utilization of lignocellulosic materials(Review)[J]. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2018: 1-9.
- [52] Hassan S S, Williams G A, Jaiswal A K. Lignocellulosic Biorefineries in Europe: Current State and Prospects[J]. *Trends in Biotechnology*. 2019(No.3): 231-234.
- [53] Huang K, Fasahati P, Maravelias C T. System-Level Analysis of Lignin Valorization in Lignocellulosic Biorefineries.[J]. *iScience*. 2019(No.1): 100751.
- [54] Kamm B, Kamm M. Principles of biorefineries.[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 2004, 64(2): 137-145.
- [55] Isikgor F, Becer R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers[J]. *Polym. Chem*. 2015, 6.
- [56] Jiong H, Xinhao Y, Y. H P Z. Quantitative Determination of Cellulose Accessibility to Cellulase Based on Adsorption of a Nonhydrolytic Fusion Protein Containing CBM and GFP with Its Applications.[J]. *Langmuir*. 2007, 23(25): 12535-12540.

- [57] Pan X, Xie D, Gilkes N, et al. Strategies to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Softwood with High Residual Lignin Content[J]. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2005, 121-124: 1069-1079.
- [58] Sawatdeenarunat C, Nam H, Adhikari S, et al. Decentralized biorefinery for lignocellulosic biomass: Integrating anaerobic digestion with thermochemical conversion.[J]. *Bioresource Technology*. 2018: 140-147.
- [59] Galbe M, Wallberg O. Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials[J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2019(No.1): 1-26.
- [60] Islam M K, Wang H, Rehman S, et al. Sustainability metrics of pretreatment processes in a waste derived lignocellulosic biomass biorefinery.[J]. *Bioresource technology*. 2019: 122558.
- [61] Capolupo L, Faraco V. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development[J]. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. 2016(No.22): 9451-9467.
- [62] Shinde S D, Meng X, Kumar R, et al. Recent advances in understanding the pseudo-lignin formation in a lignocellulosic biorefinery[J]. *Green chemistry*. 2018(No.10): 2192-2205.
- [63] Paone E, Tabanelli T, Mauriello F. The rise of lignin biorefinery[J]. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2020: 1-6.
- [64] Chundawat S, Beckham G T, Himmel M E, et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals[J]. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2010, 2: 1-25.
- [65] Jönsson L, Martín Medina C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects[J]. *Bioresource technology*. 2015, 199.
- [66] Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review[J]. *Energy Conversion & Management*. 2011, 52(2): 858-875.
- [67] An Y, Zong M, Wu H, et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass with renewable cholinium ionic liquids: Biomass fractionation, enzymatic digestion and ionic liquid reuse.[J]. *Bioresource Technology*. 2015, 192: 165-171.
- [68] Monlau, Florian; Barakat, Abdellatif; Trably, Eric; Dumas, Claire; Steyer, Jean-Philippe; Carré, Hlne. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment.[J]. *Critical Reviews in Environmental Science & Technology*. 2013, Vol.43(No.3): 260-322.
- [69] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review[J]. *Bioresource*

- Technology. 2010, 101(13): 4851-4861.
- [70] Kumari D, Singh R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review.[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2018, 90: 877-891.
- [71] Lynd L R, Allen S G, Antal J M J, et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol[J]. *Bioresource Technology*. 2002, 81(1): 33.
- [72] Zhao C, Shao Q, Chundawat S P S. Recent advances on ammonia-based pretreatments of lignocellulosic biomass.[J]. *Bioresource Technology*. 2020, 298.
- [73] Laureano-Pérez L, Teymouri F, Alizadeh H, et al. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass[M]. 2005: 124, 1081-1099.
- [74] Chien L, Saratale G D, Chang J S. Enzymatic Treatment of Lignocellulosic Wastes for Anaerobic Digestion and Bioenergy Production[J]. *Environmental Anaerobic Technology: Applications and New Developments*. 2010: 279-308.
- [75] Li P M, Lee C W, Lin J S. Using biological process to destroy lignocellulosic structure for energy conversion[J]. *MATERIALS FOR ENVIRONMENTAL PROTECTION AND ENERGY APPLICATION, PTS 1 AND 2*. 2012: 273-277.
- [76] Jönsson L J, Alriksson B, Nilvebrant N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification.[J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 1-10.
- [77] Ko J, Um Y, Park Y, et al. Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose.[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 2015, 99(10): 4201-4212.
- [78] Jian Z, Zhinan Z, Xiaofeng W, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation.[J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26-40.
- [79] Paulova L, Patakova P, Branska B, et al. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency.[J]. *Biotechnology Advances*. 2015, 33(6): 1091-1107.
- [80] Kawaguchi H, Hasunuma T, Ogino C, et al. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks.[J]. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, 42: 30-39.
- [81] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, et al. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw.[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2000, 25(4): 184.
- [82] Ruan Z, Zanotti M, Zhong Y, et al. Co-hydrolysis of lignocellulosic biomass for microbial lipid accumulation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110(4): 1039-1049.
- [83] Yu X, Zeng J, Zheng Y, et al. Effect of lignocellulose degradation products on microbial

- biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Process Biochemistry*. 2014, 49: 457-465.
- [84] Zhang G, French T, Hernandez R, et al. Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and Bioenergy*. 2011: 734-740.
- [85] Zhao X, Peng F, Du W, et al. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloide*s and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2012, 35: 993-1004.
- [86] Gao Q, Cui Z, Zhang J, et al. Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2014, 152: 552-556.
- [87] Chen X, Li Z, Zhang X, et al. Screening of Oleaginous Yeast Strains Tolerant to Lignocellulose Degradation Compounds. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2009, 159: 591-604.
- [88] Huang L, Zhang B, Gao B, et al. Application of fishmeal wastewater as a potential low-cost medium for lipid production by *Lipomyces starkeyi* HL. *Environmental technology*. 2011, 33: 1975-1981.
- [89] Liu W, Wang Y, Yu Z, et al. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource technology*. 2012, 118: 13-18.
- [90] 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. 华东理工大学. 2018.
- [91] Schmoller K M, Skotheim J M. The Biosynthetic Basis of Cell Size Control. *Trends in Cell Biology*. 2015, 25(12): 793-802.
- [92] Turner J J, Ewald J C, Skotheim J M. Cell Size Control in Yeast. *Current Biology*. 2012, 22(9): R350-R359.
- [93] Flick K, Chapman-Shimshoni D, Stuart D, et al. Regulation of cell size by glucose is exerted via repression of the CLN1 promoter. *Molecular and cellular biology*. 1998(5): 2492-2501.
- [94] Timoumi A, Guillouet S E, Molina-Jouve C, et al. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. 2018(9): 3831-3848.
- [95] Cabib E, Roh D H, Schmidt M, et al. The Yeast Cell Wall and Septum as Paradigms of Cell Growth and Morphogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2001, 276(23): 19679-19682.
- [96] Young S, Rai R, Nitin N. Bioaccessibility of curcumin encapsulated in yeast cells and

- yeast cell wall particles. *Food chemistry*. 2019: 125700.
- [97] Plaine A, Walker L, Da Costa G, et al. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: Roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genetics and Biology*. 2009, 45(10): 1404-1414.
- [98] Sosinska G J, de Koning L J, de Groot P W J. Mass spectrometry quantification of the adaptations in the wall proteome of *Candida albicans* in response to ambient pH. *Microbiology*. 2011, 157(1).
- [99] Ene I V, Walker L A, Schiavone M. Cell Wall Remodeling Enzymes Modulate Fungal Cell Wall Elasticity and Osmotic Stress Resistance. *mBio*. 2015, 6(4): 15.
- [100] Li J, Zhang M, Wan C, et al. Improved cellulase production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by disrupting the cell wall protein-encoding gene CWP2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2020, 129(2): 165-171.
- [101] Liu Y, Chen W, Xia Q, et al. Efficient Cleavage of Lignin–Carbohydrate Complexes and Ultrafast Extraction of Lignin Oligomers from Wood Biomass by Microwave-Assisted Treatment with Deep Eutectic Solvent. *ChemSusChem*. 2017, 10(8): 1692-1700.
- [102] T. K. Ghose. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59(2): 257-268.
- [103] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1979: 248-254.
- [104] 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(6): 4480-4488.
- [105] Jian Zhang, Zhinan Zhu, Xiaofeng Wang, Nan Wang, Wei Wang, Jie Bao. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3(1): 1-15.
- [106] 陈少峰, 望忠福. 高效液相色谱法测定酵母葡聚糖. *食品科技*. 2009, 34(7): 278-280.
- [107] Zhang J, Chu D, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010(4): 718-728.
- [108] Klinke H B, Thomsen A B, Ahring B K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005(1): 10-26.

- [109] Lu Y, Wang Y, Xu G, et al. Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass. *Applied Biochemistry & Biotechnology*. 2010(2): 360-369.
- [110] 侯伟亮. 生物燃料和化学品的好氧生物炼制研究. 华东理工大学. 2019.
- [111] Sitepu I R, Jin M, Fernandez J E. Identification of oleaginous yeast strains able to accumulate high intracellular lipids when cultivated in alkaline pretreated corn stover. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. 2014(17): 7645-7657.
- [112] Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, et al. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*. 2012: 398-403.
- [113] Ruan Z, Zanotti M, Wang X, et al. Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2012, 110: 198-205.
- [114] Gong Z, Shen H, Yang X. Lipid production from corn stover by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS*. 2014.
- [115] Zeng J, Zheng Y, Yu X, et al. Lignocellulosic biomass as a carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*. *Bioresource Technology*. 2013, 128: 385-391.
- [116] Yu X, Zheng Y, Dorgan K, et al. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource technology*. 2011, 102: 6134-6140.
- [117] Chen X, Huang C, Yang X. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. *BIORESOURCETECHNOLOGY*. 2013: 18-24.
- [118] Huang C, Chen X, Xiong L. Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs. *BIORESOURCETECHNOLOGY*. 2012: 711-714.

硕士期间研究成果

待发表论文

Yuanyuan Li, Jie Bao*. Adaptive evolution of *Trichosporon cutaneum* under cellulase stress and ultra-high speed centrifugation screening. *Biotechnology and Bioengineering*

致谢

时光如水，总是无言。反复提笔多次却不知道该怎么说起，只能默默感叹时间太快，总是令人猝不及防。眨眼之间硕士生活即将成为过去，仔细回想过去的三年，在感慨的同时，更多的是感恩。

首先感谢我的导师鲍杰教授，鲍老师是一个在科研工作中极其认真负责，但在生活中又是一个幽默可爱的人。鲍老师对科研的热爱和执著令我十分敬佩，也给我树立了良好的学习榜样。我的研究课题是在鲍老师的悉心指导下完成，从课题的选择到中间的实验过程以及论文的完成，鲍老师都给予了耐心的指导和不懈的鼓励，在此向鲍老师致以最诚挚的谢意。

真诚感谢实验室的师兄师姐师弟师妹给予的指导与帮助，感谢阚家伦师姐，侯伟亮师兄在我实验过程中的指引与帮助。感谢两个美丽善良的女生：方纯、卢敏萍，以及同届其他小伙伴：郑理想、黄振、韩涛，感谢你们对我论文写作和平时生活中的帮助，同时也让我的研究生生活变得丰富多彩。特别感谢王江师弟在实验操作中给予的帮助。感谢我亲爱的室友：畅畅，会会，叶华，让我三年的生活更加和谐温馨。感谢在远方的朋友们，即使不能经常见面，也可以给我带来开心与感动。

感谢曾经教育和帮助过我的所有老师。同时感谢为批阅本论文而付出宝贵时间和辛勤劳动的专家和教授们。

最后，感谢我的男朋友给我的关心，支持与包容，谢谢你的出现。感谢我的父母和家人这么多年对我无私的付出，你们给予我的支持与鼓励，让我始终对这个世界充满着期待与热爱。