

学校代码：10251

学 号：Y30180979

华东理工大学

硕士学位论文

论文题目： 高盐胁迫下皮状丝孢酵母的

微生物油脂发酵研究

学科专业： 生物化工

研究方向： 生物炼制

论文作者： 孙鲁欢

指导教师： 张建 副教授

定稿日期： 2021 年 04 月 30 日

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

硕士学位论文

高盐胁迫下皮状丝孢酵母的

微生物油脂发酵研究

孙鲁欢

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

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2021.04.30 论文答辩日期: _____

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 姓名、职称

评阅人: 姓名、职称

姓名、职称

学位论文使用授权声明

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权华东理工大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。保密论文在解密后遵守此规定。

论文涉密情况：

不保密

保密，保密期（___年___月___日至___年___月___日）

学位论文作者签名：

指导老师签名：

日期： 年 月 日

日期： 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

高盐胁迫下皮状丝孢酵母的微生物油脂发酵研究

摘要

微生物油脂是替代动植物油生产航空燃料和生物柴油的最佳原料。微生物油脂发酵需要消耗大量的淡水，增加用水负担以及后续的废水处理压力，是影响其工业应用潜力的主要障碍之一。利用海水和工业废水等高盐水进行微生物油脂发酵是降低淡水消耗的重要选择。利用高盐水进行微生物油脂发酵，需要油脂微生物具备高盐耐受性和降解有毒物质的能力。前期研究发现皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 是良好的油脂生产菌株，具有较强的环境适应性和有毒物质降解能力。本文对皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* 在海水和工业含盐废水中的微生物油脂发酵进行了实验研究。

本文第一部分研究了皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* 的耐盐性及其在不同海水盐度下的微生物油脂发酵。首先，探究了 *T. cutaneum* ACCC20271 的耐盐性，发现其在长期适应性进化后耐受高达 13% 的氯化钠，具备在高盐渗透压胁迫下生长的潜能。其次，考察了几种典型盐度对 *T. cutaneum* ACCC20271 油脂生产能力的影响，包括纺织和电渗析废水盐度 (1.0%)，主要海域海水盐度 (3.5%)，热带沙漠气候区海水和石化废水盐度 (4.4%)，制革和制药废水盐度 (6.0%)。结果表明，典型海水盐度 (3.5%) 对微生物油脂积累无负面影响，而更高的盐度则会抑制油脂积累。最后，考察了高产油脂菌株 *T. cutaneum* MP11 在高盐水中的油脂生产能力，发现典型盐度 (3.5%) 促进了 *T. cutaneum* MP11 的油脂积累，其油脂产量 (31.7 g/L) 比淡水条件下 (23.3 g/L) 高出约 36%。结果表明，高盐水可有效替代淡水进行微生物油脂发酵生产。此外，本文观察到一个重要的现象，即 *T. cutaneum* MP11 在高盐条件下发酵液可自动分层，油脂酵母细胞在发酵液的上层聚集，对油脂回收具有重要意义。

本文第二部分研究了皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* 在高盐工业废水中的微生物油脂生产能力。工业废水中含有芳香族化合物、抗生素等污染物。苯酚是各类工业废水中普遍存在的有机污染物之一。本文发现 *T. cutaneum* MP11 在典型盐度下可以耐受 1,000 mg/L 苯酚。因此，在含 1,000 mg/L 苯酚的高盐水体系下进行微生物油脂发酵。结果表明，*T. cutaneum* MP11 的油脂产量与未添加苯酚的淡水发酵结果接近 (23.6 g/L vs 23.3 g/L)，而且降解了 80% 以上的苯酚。最后，尝试在四环素和榨菜废水中进行油脂发酵，结果发现，四环素对 *T. cutaneum* 的油脂生产无负面影响，在不添加任何营养物质的榨菜废水中也存在一定的油脂积累，具有一定的废水处理潜力。

关键词：皮状丝孢酵母；微生物油脂；耐盐性；高盐水；苯酚降解

Study on Microbial Lipid Fermentation of *Trichosporon cutaneum* under High Saline Stress

Abstract

Microbial lipid is the best alternative of animal and vegetable lipid feedstock for the production of aviation fuel and biodiesel. Microbial lipid fermentation requires a large amount of fresh water, resulting in the heavy burdens of fresh water usage and subsequent wastewater treatment pressure, which is one of the main obstacles affecting its industrial application potential. Utilization of high saline seawater or industrial wastewater for microbial lipid fermentation is an important alternative to reduce the freshwater consumption. Saline tolerance and toxin biodegradability of microorganism is required to use high saline water for microbial lipid fermentation. Previous studies found that *Trichosporon cutaneum* is a robust oleaginous yeast strain with strong environmental adaptability and degradation ability of toxic substance. In this thesis, the oleaginous yeast *T. cutaneum* was used for the experimental study on microbial lipid fermentation under seawater and saline wastewater.

Microbial lipid fermentation in different seawater salinities and saline tolerance of *T. cutaneum* was studied at the first part of this thesis. Firstly, saline tolerance of *T. cutaneum* ACCC20271 was investigated. It was found that it can tolerate up to 130 g/L of NaCl after a long-term adaptive evolution and has the potential to grow in high saline osmotic pressure. Secondly, *T. cutaneum* was cultured in several typical salinities to investigate the capacity of lipid production, including the salinity of textile and electro dialysis wastewater (1.0%), major marine seawater salinity (3.5%), the salinity of seawater in tropical desert climate and petrochemical wastewater (4.4%) and the salinity of tanneries and pharmaceutical wastewater (6.0%). The results showed that the typical salinity (3.5%) had no negative effect on microbial lipid accumulation, while higher salinities inhibited lipid accumulation. Finally, *T. cutaneum* MP11 was used to research the capacity of microbial lipid production in high saline conditions. It was found that the typical salinity (3.5%) promoted the microbial lipid accumulation of *T. cutaneum* MP11, and its lipid production (31.7 g/L) was about 36% higher than that of fresh water (23.3 g/L). The results show that high saline water has the potential to replace fresh water for microbial lipid fermentation. In addition, an important phenomenon was observed that *T. cutaneum* MP11 can be spontaneously stratified in the fermentation broth under high saline conditions, and the oleaginous yeast cells gathered on the upper layer of the fermentation broth, which is of great significance for lipid recovery.

In the second part of this thesis, microbial lipid production of *T. cutaneum* MP11 was

investigated under industrial wastewater with high saline. Industrial wastewater contains aromatic compounds, antibiotics and other pollutants. Phenol is one of the commonly existing organic pollutants in various industrial wastewater. *T. cutaneum* MP11 was to be tolerant to 1,000 mg/L of phenol at the typical salinity. Therefore, microbial lipid fermentation was carried out in high saline water with 1,000 mg/L of phenol. The results indicate that lipid production of *T. cutaneum* MP11 in this conditions was close to that of the fresh water without phenol (23.6 g/L vs 23.3 g/L), and more than 80% of phenol was degraded. Finally, microbial lipid fermentation was carried out in tetracycline and pickled wastewater. The results show that tetracycline had no negative effect on the lipid production of *T. cutaneum*, and there was a certain amount of lipid accumulation in pickled wastewater without adding any nutrients. This results indicate that *T. cutaneum* MP11 has a potential for wastewater treatment.

Keywords: *Trichosporon cutaneum*; microbial lipid; saline tolerance; saline water; phenol degradation

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 生物柴油概述	1
1.2 微生物油脂生产	1
1.2.1 产油微生物	1
1.2.2 微生物油脂的合成路径	3
1.2.3 提高微生物油脂生产的策略	4
1.2.4 廉价碳源生产微生物油脂	6
1.3 高盐水在微生物油脂发酵中的应用	7
1.3.1 高盐水的来源和特点	7
1.3.2 利用海水生产微生物油脂	8
1.3.3 利用工业含盐废水生产微生物油脂	9
1.4 微生物的耐盐性及苯酚降解	9
1.4.1 微生物的耐盐性	9
1.4.2 微生物的苯酚降解	10
1.5 本论文的立题依据与研究内容	12
第 2 章 皮状丝孢酵母在不同盐度的海水体系下的油脂发酵	13
2.1 引言	13
2.2 材料与方法	13
2.2.1 菌种与培养基	13
2.2.2 海水与试剂	14
2.2.3 <i>T. cutaneum</i> 的种子培养和适应性进化	14
2.2.4 微生物油脂发酵	14
2.2.5 细胞内的钠离子分析	14
2.2.6 细胞形态观察	15
2.2.7 阳离子浓度及盐度测定	15
2.2.8 葡萄糖、细胞生长的测定	15
2.2.9 细胞干重与油脂提取	15
2.3 结果和讨论	15
2.3.1 <i>T. cutaneum</i> 的耐盐性探究	15
2.3.2 <i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 在不同盐度的海水体系下的油脂发酵	17

2.3.3 皮状丝孢酵母在高盐条件下的适应性进化.....	19
2.3.4 <i>T. cutaneum</i> MP11 在不同盐度的海水体系下的油脂发酵.....	21
2.3.5 <i>T. cutaneum</i> MP11 在不同盐度下的发酵现象.....	24
2.4 本章小结.....	25
第 3 章 皮状丝孢酵母在含盐废水中的油脂发酵.....	27
3.1 引言.....	27
3.2 实验材料与方法.....	27
3.2.1 菌种与培养基.....	27
3.2.2 水样与试剂.....	28
3.2.3 种子培养.....	28
3.2.4 微生物油脂发酵.....	28
3.2.5 葡萄糖、细胞生长的测定.....	28
3.2.6 微生物油脂提取.....	28
3.2.7 高效液相色谱 (HPLC) 分析.....	28
3.3 结果和讨论.....	28
3.3.1 皮状丝孢酵母的苯酚耐受性.....	28
3.3.2 皮状丝孢酵母在含酚高盐水中的油脂发酵.....	30
3.3.3 皮状丝孢酵母在其他含盐废水中的油脂发酵.....	33
3.4 本章小结.....	34
第 4 章 结论与展望.....	36
4.1 结论.....	36
4.2 展望.....	37
参考文献.....	39
学术成果.....	51
致谢.....	52

第 1 章 绪论

1.1 生物柴油概述

生物柴油一般是由可再生原料甘油三酯 (TAG) 和醇类通过酯交换反应得到的长链脂肪酸烷基酯。它作为一种无硫、无毒、可降解的环境友好型替代能源受到全球范围内的广泛关注^[1]。第一代生物柴油主要由食用植物油生产, 然而这些植物油都需要足够的能源和面积来生产足够的油料作物, 这无疑将加剧全球粮食短缺, 并不可避免地损害未来的粮食供应。随着淡水资源、耕地面积等问题日益严重, 这些作物作为生物柴油的原料来源变得不可持续。微生物生长速度快, 周期短, 不受环境影响, 易于大规模培养, 并且产生脂肪酸的主要成分与植物油的成分相似, 可作为生物柴油的原料。微生物油脂代替其他食用油用于生物柴油的生产已引起越来越多的关注^[2]。尽管生物柴油的商业化可以带来有利的影响, 但由于化石燃料价格较低, 生物柴油成本高, 限制其大规模的工业生产。经济效益低是阻碍其规模化发展的主要因素^[3]。

生物柴油的成本大部分源自于原料成本^[4]。利用丰富且低廉的资源来培养微生物是降低原料成本的一种选择。有很多研究报道以有机废物, 农业废弃物, 发酵副产品为原料进行微生物油脂生产。粗甘油来源广泛, 价格低廉, 可作为碳源, 许多研究已报道其用来培养产油微生物^[5,6]。木质纤维素资源丰富, 可再生且含有大量可发酵糖, 许多研究人员致力于该生物质的转化以合成附加值较高的产品^[7,8]。

利用微生物油脂生产生物燃料, 其发酵过程需要大量的淡水资源^[9], 每立方生物燃料需要 1.9~5.9 m³ 水资源^[10], 而全球淡水资源匮乏。海水是廉价、丰富和可持续的资源, 在大多数情况下, 它们还含有微生物生长所必需的无机营养素。工业含盐废水也具有高盐度的特点, 另外, 还含有有机物以及其他的污染物。这些水资源的使用可以减少淡水消耗, 降低生产成本, 进而使微生物油脂作为生物柴油的原料在经济上可行。因此, 利用海水或含盐废水培育微生物为生物柴油提供原料不失为一种好的解决方案。目前研究者已利用淀粉废水、马铃薯废水、橄榄油制造废水、味精废水^[11]以及城市废水等进行微生物油脂生产^[12]。

1.2 微生物油脂生产

1.2.1 产油微生物

产油微生物通常以包涵体的形式积累高于细胞干重 20% 的油脂, 主要包括微藻、真菌 (霉菌、酵母菌) 和细菌。其中细菌产生脂类的能力较低, 并且它们大多数只能合成特定的脂类和多不饱和脂肪酸。微藻和真菌被认为是主要的油脂生产者, 它们产生的单细胞油脂主要由富含不同类型脂肪酸的三酰甘油 (TAGs) 组成, 如棕榈酸 (16:0)、棕

桐油酸 (C16:1)、硬脂酸 (C18:0)、油酸 (C18:1) 和亚油酸 (C18:2)。

细菌可以积累脂质如聚 3-羟基丁酸和各种其他的聚羟基烷酸 (PHAs), 但是这些并不适用于生物柴油生产。只有少数细菌可以积累甘油三酯 (TAG), 主要为放线菌属^[13], 如红球菌 (*Rhodococcus*)、分枝杆菌 (*Mycobacterium*)、诺卡氏菌 (*Nocardia*)^[14]。结核分枝杆菌是最早观察到具有高油脂积累的原核生物, 含油率为细胞干重的 26-28% (w/w)^[15]。混浊红球菌 (*Rhodococcus opacus*) 可以积累大量的油脂, 是一种很有前途的微生物油脂生产的细胞工厂^[16, 17]。*R. opacus* 可以将纸浆和造纸工业排放的氧预处理的硫酸盐木质素转化为微生物油脂^[18]。在大多数细菌中, 如果培养基中限制氮源, 通常会刺激 TAG 和其他中性脂质的积累。除此之外, 可以通过遗传操作手段来提高产油细菌的油脂产量, 也可在非原生产油细菌中构建产油途径。例如, Xu 等人通过非产油的大肠杆菌中引入 TAG 生物合成途径将其产生的脂肪酸以 TAG 的形式储存^[19]。除了大肠杆菌外, Plassmeie 等人首次证明了谷氨酸棒状杆菌可以通过代谢工程生产 TAGs 成为油脂生产者^[20]。虽然细菌生长快, 但与其他种类的产油微生物相比, 细菌的油脂生产量较低。

常见的产油微藻包括小球藻 (*Chlorella zofingiensis*)、原小球藻 (*Chlorella protothecoids*) 和裂殖藻 (*Schizochytrium limacinum*)。微藻的含油量通常为细胞干重的 20% - 50%, 甚至某些种类, 如 *Botryococcus braunii* 的含油率能够达到 75%^[21]。原小球藻通常被认为是替代食用油生产生物柴油的理想原料的生产菌, 因为它们生长速度快, 并且在限制氮源的条件可以积累 50% 以上的油脂含量。在大部分情况下, 微藻可以利用可再生的碳源 (CO₂) 和能源 (阳光) 进行自养。据报道, 一些藻类菌株也可以同时在自养和异养条件下生长, 即限制光照和利用有机碳源^[22]。光养微藻的油脂积累量通常低于异养微藻^[23], 因此其异养生长已被用来高效生产油脂^[24]。微藻的油脂产量高于最具商业价值的植物、油棕。此外, 微藻可以在海水或含盐废水中生长, 并能够将废水中的有机物转化为生物质和高价值的细胞成分, 如油脂、蛋白质、色素等。微藻的油脂产量严重依赖于其种类, 各种理化性质如光、二氧化碳、温度、盐度, 培养基成分等。Monika 等^[25]研究了小球藻的重要生长参数如 pH、光色、光强、光周期和盐等对其生长力的影响。他们发现在培养基中添加盐并选择最佳的条件后该藻类可获得较高的含油率。微藻的生物量少, 油脂产量普遍较低, 一般不适用于微生物油脂的大量生产。

许多霉菌在特定的培养条件下都能合成油脂, 如 *Cunninghamella*^[26]、*Mortierella isabellina*^[27]、*Mucor*^[28]、*Aspergillus terreus*^[29] 和 *Mortierella alpine*^[30]。其中深黄被孢霉 *M. isabellina* 具有非常强的油脂积累能力, 含油率为细胞干重的 72%^[2]。产油真菌 *Mucor circinelloides* 首次被用于商业化来生产微生物油脂^[31]。*M. circinelloides* 是一种很好的霉菌分枝杆菌模型, 因为它的全基因组序列已被解析并且存在成熟、有效的转化程序, 基因操作手段相对容易。Aki Tsunehiro 筛选到的丝状真菌 *Mortierella alliacea* YN-15 能够产生大量花生四烯酸, 主要以甘油三酯形式存在。该菌株在 50 L 生物反应器中培养, 细

胞干重达到 46.1 g/L, 总油脂累积量为 19.5 g/L^[32]。

产油酵母的油脂组成中 C16~C18 脂肪酸的比例最大, 其在合成生物柴油方面具有明显优势。在目前已知的 1600 种酵母中约有 70 种是产油酵母, 它们可以产生超过其细胞干重 20% 的油脂^[33]。这些酵母平均积累的油脂含量约为细胞干重的 40%^[34], 根据营养限制条件油脂酵母的含油率可达到 70%^[35]。油脂酵母因具有优异的油脂生产和利用各种有机底物的能力, 而成为生产油脂、脂肪酸及其衍生物的最佳选择。解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 具有良好的遗传特性、先进的系统和合成生物学工具可用于基因修饰, 它是迄今为止研究最广泛的产油酵母^[36,37]。最近, 有研究者通过重组技术构建的油脂酵母 *Y. lipolytica* 菌株被证实能够产生高达细胞干重 90% 的油脂, 油脂浓度可达到理论值的 85%, 产率约为 1 g/L/h^[38]。Chen 等人^[39]发现相较于粘红酵母、圆红冬孢酵母、斯达氏油脂酵母, 皮状丝孢酵母对木质纤维素体系耐受性最好, 能够降解木质纤维素来源的多种抑制物。Wang 等人^[40]首次将酚醛作为皮状丝孢酵母生产微生物油脂的唯一碳源, 发现 4-羟基苯甲醛可以作为油脂积累的底物, 而香兰素和丁香醛只能转化为毒性较小的酚醇和酸。皮状丝孢酵母在玉米芯残渣水解物中最佳碳氮比为 49.3, 通过增加纤维素酶用量来提高糖浓度, 最终油脂产量达到 12.3 g/L^[8]。

1.2.2 微生物油脂的合成路径

油脂酵母的微生物油脂合成路径已经研究的非常透彻, 现在以斯达氏油脂酵母 (*Lipomyces starkeyi*) 为例来阐述微生物油脂的合成途径。

微生物油脂主要成分为 TAG, 其合成有两个重要的途径: 乙酰辅酶 A 合成途径和从甘油-3-磷酸到 TAGs 的 Kennedy 途径 (图 1.1)。首先, 葡萄糖通过糖酵解途径转化为丙酮酸, 该过程是在细胞质中进行的, 随后被运输到线粒体中在丙酮酸脱氢酶复合物的催化下生成乙酰辅酶 A。氮源的消耗增加了腺苷单磷酸脱氢酶 (AMPD) 的活性, 从而大幅度降解 AMP 致使细胞内 AMP 水平降低, 从而为细胞提供氮^[41]。这种低浓度的 AMP 抑制了异柠檬酸脱氢酶 (Idh) 的活性, 导致 TCA 周期的下调和线粒体内柠檬酸的大量累积^[42]。而积累的柠檬酸则由苹果酸/柠檬酸转运酶系统输送到细胞质中。随后, 胞质中的 ATP-柠檬酸裂解酶 (Acl1, Acl2) 将其转化为草酰乙酸和乙酰辅酶 A。柠檬酸裂解酶是一种胞质酶, 在产油酵母中共享, 而在非产油酵母中不存在该酶^[43]。细胞质中的乙酰辅酶 A 被乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acc1) 转化为丙二酰辅酶 A。然后, 脂肪酸合成酶 (Fas1, Fas2) 复合物利用乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 分子来延长碳链生成脂酰辅酶 A。NADPH 形式的还原能力是脂酰辅酶 A 合成的先决条件^[44], 产生 NADPH 的辅助手段是必要的。最后, 合成的碳链长为 C16 和 C18 的脂酰辅酶 A 被转移到内质网, 并通过 Kennedy 通路生成油脂。

三个完整的脂酰辅酶 A 分子通过 Kennedy 通路依次与一个甘油-3-磷酸分子结合从而生成 TAGs, 详细的过程如下。首先, 甘油-3-磷酸通过酰基化反应转化为溶血磷脂酸。

其次，溶血磷脂酸酰基转移酶（Slc1）和溶血磷脂酰乙醇胺（Ale1）的酰基转移酶催化溶血磷脂酸在第二个碳上发生乙酰化反应而生成磷脂酸。然后，磷脂酸被去磷酸化形成二酰基甘油（DAG），催化该反应的酶是磷脂酸磷酸酶。最后，二酰基甘油酰基转移酶（Dga1, Dga2）将酰基基团从酰基辅酶 A 转移到 DAG 的第三个碳上，形成 TAGs^[45]。

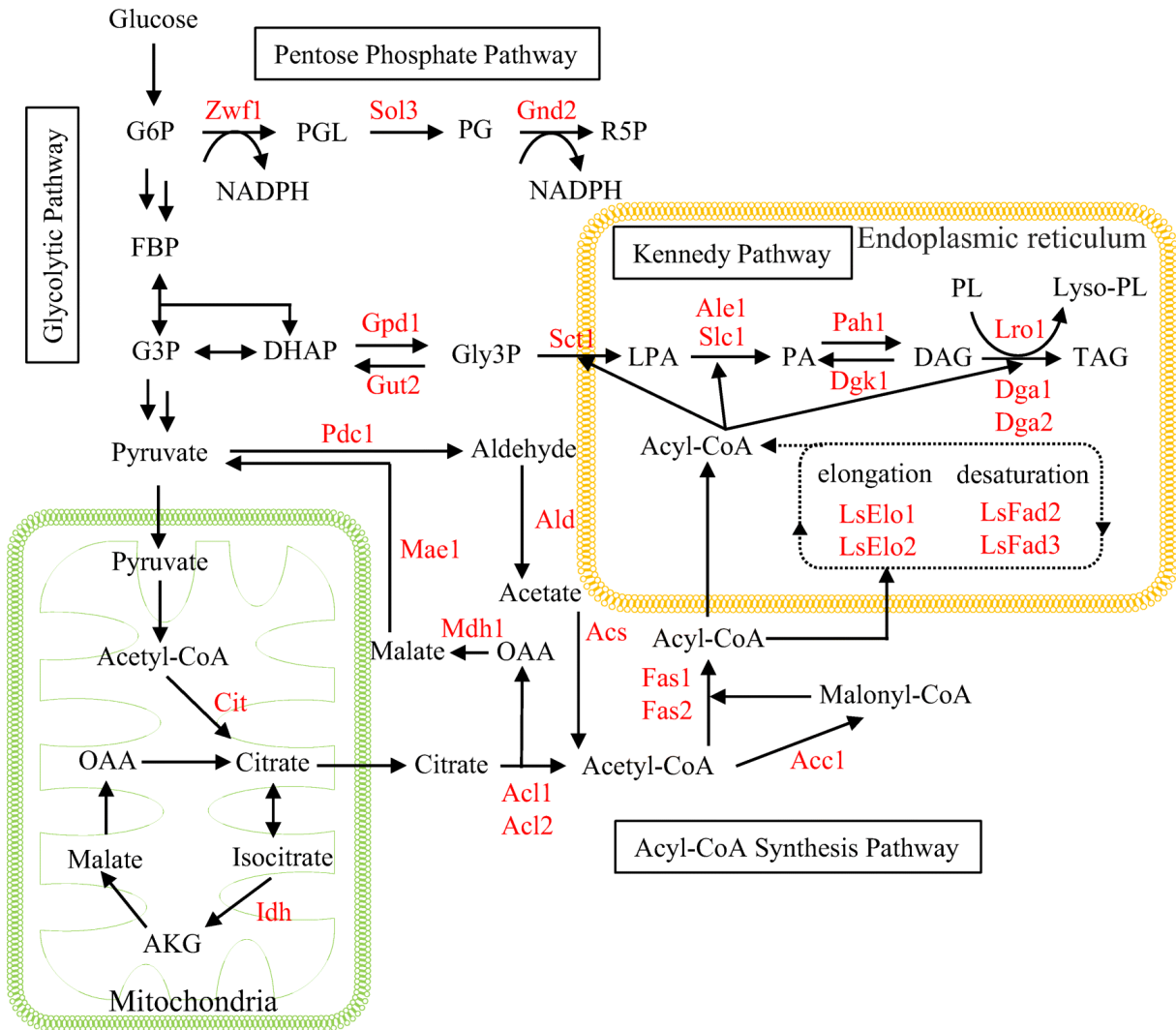


图 1.1 斯达氏油脂酵母中脂质合成的示意图^[46]

Fig. 1.1 Schematic diagram of lipogenesis in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*^[46]

图中重点为斯达氏油脂酵母中脂酰辅酶 A 和甘油三酯（TAG）这两种重要前体的合成示意图。图中主要的缩写如下：G6P，葡萄糖-6-磷酸；FBP，果糖 1, 6 二磷酸。G3P，甘油醛-3-磷酸；DHAP，磷酸二羟丙酮；Gly3P，三磷酸甘油。LPA，溶血磷脂酸；PA，磷脂酸；DAG，二酰基甘油；TAG，甘油三酯。

1.2.3 提高微生物油脂生产的策略

产油微生物油脂积累的程度取决于遗传因素和生长条件。分离、鉴定和选择高生长

率、生产率的产油微生物菌株是生物燃料实现工业化生产的关键步骤。目前主要通过人为干预的方式来提高菌株的油脂产量。增加微生物油脂产量的主要策略：调节微生物的培养条件（如培养基组成、碳源、C/N、pH、接种量、发酵方式），代谢工程改造，适应性进化以及针对特定特征的筛选方法。

油脂在微生物细胞中的积累量高度依赖于培养条件。不同产油微生物在最佳油脂生产方面有各自的特点，因此可以改变合成不同脂肪酸组成的培养条件，以满足不同的工业需要。产油微生物的油脂积累主要发生在除了碳源之外其他营养物质存在限制的培养基中，在此条件下，其可将过量的碳源转化为 TAG 储存在细胞内。研究发现，限制氮、磷、硫、铁或锌的供应会有利于产油微生物的油脂积累^[47,48]。氮的限制是大多数产油微生物在油脂积累方面的最有效条件，可使细胞具有最高的底物转化率和油脂含量^[49]。因此，氮限制条件被广泛用于诱导油脂的生成，选择适当的碳氮比是最大限度地提高微生物油脂生成的关键。许多产油微生物已被报道碳氮比对其油脂合成具有明显的影响，如被孢霉菌(*Mortierella*)、耶氏酵母(*Yarrowia*)、红酵母(*Rhodotorula*)和念珠菌(*Candida*)等^[50,51]。除了碳氮比外，还有许多其他的营养和环境因素影响微生物细胞的生长和油脂生产，包括碳源、氮源和其他必需的大量和微量营养素、温度、pH 和溶解氧等。Somashekar 等^[52]研究了毛霉菌油脂积累的培养基组成，发现不同碳源的培养导致不同的油脂产量，而乳糖不利于毛霉菌的生长和油脂生产。Angerbauer^[53]等研究了在限氮培养基中不同 pH 对 *L. starkeyi* 油脂产量的影响，其最高油脂产量（56% 细胞干重，7.5 g/L）在 pH 5.0 的条件下获得，而最高生物量（15.1 g/L）在 pH 6.5 条件下获得。

代谢工程是一种有效提高微生物油脂含量的策略。通过优化营养和环境因素来改善油脂产量的方法存在一些局限性，不能有效提高油脂产量。因此，目前的研究越来越多地指向基因修饰以增强产油微生物的油脂合成。在这方面已经开展了大量的研究，基因组数据和遗传工具的发展为代谢工程改造以提高胞内油脂产量提供了可能。最常研究的模式菌株为解脂耶氏酵母和卷枝毛霉。随着遗传手段和基因组大数据的提供，许多其他产油微生物也已被用于代谢途径工程的研究^[54-56]。代谢工程改造提高产油微生物积累油脂的能力主要方法为生物合成途径的调节和前体（如乙酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 和甘油-3-磷酸、NADPH 和 ATP）的供应。调控方法可分为五种：（1）脂肪酸合成路径中酶的表达；（2）TAG 生物合成途径中酶的表达；（3）调控相关 TAG 生物合成旁路；（4）阻断竞争路径；（5）多基因转基因方法^[57]。Lazar 等^[58]将 *POX1-6*、*TGL4* 的缺失与 *GDPI*、*DGA2* 的过表达相结合，得到的菌株 JMY3501 的脂肪酸降解减少，胞内甘油-3-磷酸的浓度增加，从而促进了 TAG 的积累。Blazek 等人^[59]利用组合策略协同调节解脂耶氏酵母中涉及脂质降解和生物合成的多个关键基因，包括 *PEX10*、*MFE1*、*AMPD*、*ACL1*、*ACL2*、*MAE*、*DGA1* 和 *DGA2*，产生了 57 种不同的基因型。其中最有效的修饰是 *PEX10* 和 *MFE1* 的双缺失和 *DGA1* 的过表达，优化生物反应器的发酵条件后，最终的改造菌株

的含油率将近 90%，在每升培养液中可产生 25 克油脂，是出发菌株的 60 倍左右。

提高油脂产量的代谢工程改造往往导致生物量的减少，因此损害了微生物的整体生产力^[60]。进化代谢工程可以在这两个相互竞争的因素之间提供一个平衡^[61]。适应性进化策略和进化代谢工程方法已经在工业上得到了广泛的应用，如乳酸、L-鸟氨酸和异丁醇等分子的生产^[62-64]，补充了传统的基因工程方法的不足^[65,66]。限制这类技术适用性的主要挑战之一是找到适当的选择压力，以促进油脂细胞的理想表型生长。一种用于获得高产含油量的适应性进化方法依赖于细胞密度随细胞内油脂含量增加而降低这一事实，该方法被应用于解脂耶氏酵母菌株中^[67]。Liu 等人^[67]在发酵结束后发现发酵液沉淀一段时间后部分细胞能够悬浮在上层，并且与下层细胞相比，这些细胞的油脂含量较高，因此作者以产油较高的工程菌株为研究对象，通过不断迭代筛选上层细胞，来富集高产油菌株。在另外一项研究中，Daskalaki 等^[68]采用适应性进化策略，通过交替改变培养基组分和持续筛选高油脂含量细胞来改善油脂生成，经过 77 代培养后菌株油脂含量达到 44%，比原始菌株高出 30%。本实验室也是基于油脂含量高而密度低这一原理，以 *T. cutaneum* ACCC20271 为出发菌株，通过超高速离心的筛选方法获得了一株突变菌株 *T. cutaneum* MP11。该菌株能够同步利用麦秆来源的葡萄糖、木糖、葡聚糖等，获得的油脂产量高达 34.4 g/L，是原始菌株 *T. cutaneum* ACCC20271 的 5.7 倍^[69]。

1.2.4 廉价碳源生产微生物油脂

由于成本高，经济效益低，目前微生物油脂的商业化仍未实现。降低生产成本的主要挑战之一在于寻找适合微生物油脂发酵的低成本底物。有机废物通常含有有机微粒，可作为微生物油脂发酵的廉价基质。利用廉价有机物作为碳源可以显著推进微生物油脂的产业化进程^[15]。

细菌能在短时间内产生较高的细胞密度，对多环芳烃、酚类、木质素等有毒或复杂化合物具有耐受能力。其中，红球菌 (*Rhodococcus* sp.) 是研究最多的细菌。*Rhodococcus* sp. 具有将木质素化合物转化为油脂的潜力。Wells 以有机溶剂预处理火松木 (loblolly pine) 得到的含有糖 (葡萄糖、甘露糖和木糖) 和芳香烃的木质纤维素废水为底物，培养红球菌，48 h 后产油率达到细胞干重的 26.88%^[17]。而在限制氮条件下，细菌 *Rhodococcus* sp. YHY01 在含食物垃圾来源的挥发性脂肪酸为碳源的培养基中脂肪酸的积累量达到 69% (w/w)^[70]。

产油酵母具有显著的转化各种有机底物和在短时间内稳定生产油脂的能力。木质纤维素生物质已被评价为产油酵母的油脂发酵原料。Probst 和 Vadlani^[71]以含有可发酵糖 (葡萄糖、木糖和阿拉伯糖) 的麦麸为原料，经过水热和稀酸预处理后，*L. starkeyi* 的油脂含量达到 37.3%。糖蜜是糖精炼过程的副产品，含糖量较高，是一种很好的产油酵母的培养原料，Taskin 等^[72]在非无菌条件下利用 20% 糖蜜培养粘红酵母，油脂浓度与含油率分别为 10.5 g/L 和 64.8%。粗甘油主要由甘油、甲醇和盐组成，是生物柴油生产过程

中产生的副产物,使用粗甘油作为油脂发酵的底物将提供可观的经济和环境效益。因此,粗甘油作为碳源用于产油酵母生产油脂是近年来比较热门的方向^[73, 74]。

1.3 高盐水在微生物油脂发酵中的应用

1.3.1 高盐水的来源和特点

海水是全球最为丰富的资源,地球上 97%的水是海水,仅有 3%是淡水^[75]。世界各大洋海水的平均盐度约为 3.5%,热带沙漠气候区的海水盐度更高,如红海的盐度在 4%以上。因为海水的高盐度而不能用作人类活动和农业灌溉。它是一种可再生的水源,在世界上许多国家都可以轻易获得。因此,利用海水制备发酵培养基可能成为一种有吸引力的生物产品生产方法^[76]。此外,海水中含有多种矿物质,可以避免添加目前商业发酵培养基所需的必需营养素^[77]。在发酵过程中使用海水有可能通过减少淡水的摄入来提高整个过程的经济性^[76, 78]。

含盐废水中的盐度通常由溶解的无机化合物所致,典型代表为 NaCl、Na₂SO₄、MgSO₄、KNO₃ 和 NaHCO₃。工业废水是其主要来源,其盐度范围非常广(0.2% - 15%)^[79]。其中,腌菜行业中的最大盐度可达到 15%^[80]。海水养殖废水的盐度一般在 3.0 - 3.5% (与海水相似),但它含有更多污染物,例如碳、氮、磷等。其他的工业含盐废水来源包括制药^[81]、制革厂^[82]、纺织厂^[83, 84]、石油^[85]、石化等行业,盐度更多集中在 3.0% - 3.5%, 3.5%是一个最为典型的盐度,详细的盐度见图 1.2。一般这些行业的废水除了高盐度之外,还存在大量难降解的污染物,特别是芳香族化合物、重金属等。关于制革废水,已发现其存在多种污染物,如有机化合物、悬浮固体(SS)、总溶解固体(TDS)、NH₄⁺-N 和有机氮^[86]。纺织工业废水包括强色度、SS、氯化物、重金属、硫酸盐、硫化物等无机污染物。苯酚作为一种典型的有机污染物,经常存在于这些含盐工业废水中,形成富含苯酚和盐的含酚废水^[87]。例如,石油炼制、煤炭加工和树脂生产的废水中含有高浓度的苯酚(~10,000 mg/L)^[88]。苯酚一直被认为是有害的有机污染物之一,含苯酚的高盐废水对土壤、地下水、生物甚至生态系统造成相应的不良影响^[89]。另外,制药废水中还含有抗生素,尽管它是微量的,但其积累可能产生细菌菌群中的抗生素耐药性基因。由废水中的污染物导致的全球性环境问题已引起人们的关注。

这些行业的含盐废水处理越来越重要,已经开发出越来越多的废水处理技术,包括生物法、物理化学法及其它综合技术。这类废水具有高盐度、难降解有机物的特点,生物法处理比较困难,因此一般采用物理化学方法进行处理。在除盐方面,反渗透的使用特别有效。但是废水中大量的有机物和悬浮固体减少了膜的使用寿命和效率,在进行物理化学处理之前,一般需要去除固体颗粒或悬浮物。虽然物理和化学处理工艺已成功应用,但存在化学消耗大、操作困难、能耗高、产生化学残留物造成二次污染等缺点。生物降解法是去除高盐废水中有机物的有效方式^[90]。尽管高盐水平会抑制生物处理,但使

用能够承受高盐度并能降解废水中所含污染物的微生物去处理这类废水是可行的。

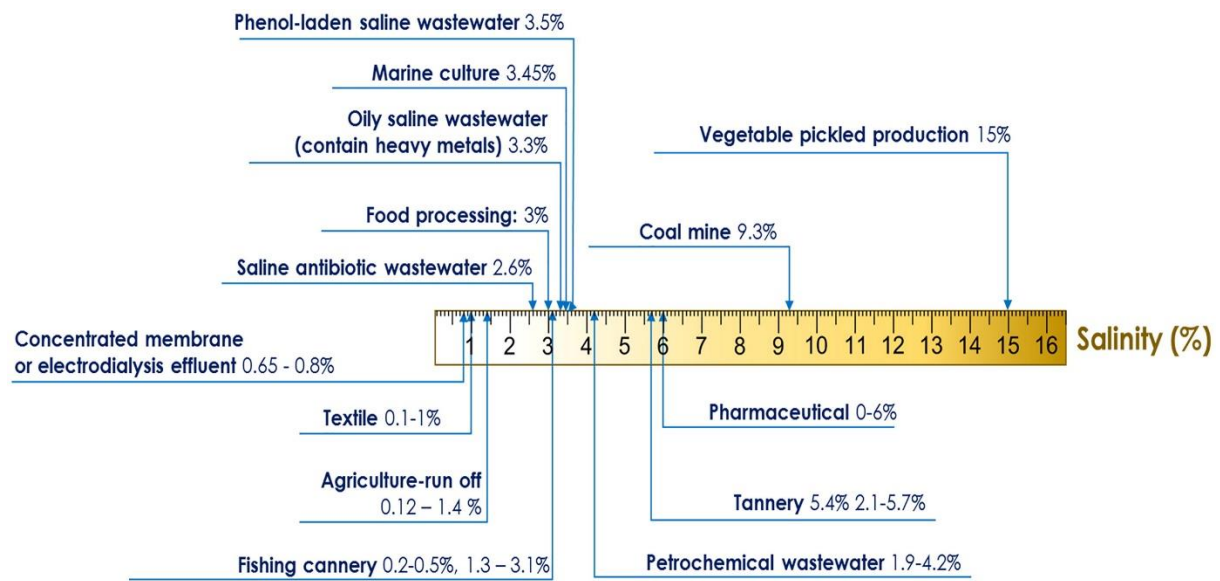


图 1.2 含盐废水的来源及相应的盐度^[79]

Fig. 1.2 Sources of saline wastewater and corresponding salinities^[79]

1.3.2 利用海水生产微生物油脂

在生产生物燃料方面，海水是一种很有潜力的淡水替代资源。迄今为止，利用海水替代淡水进行微生物油脂发酵依然是一个研究较少的领域。因为利用海水进行微生物产品的生产，耐盐性是一个前提条件，大部分工业化微生物的耐盐性并不强。Zaky AS 等^[91]研究了海洋酵母 *Saccharomyces cerevisiae* AZ65 对海水的高盐度耐受能力。与工业酵母 *S.cerevisiae* NCYC2592 相比，*S.cerevisiae* AZ65 在 10.5% (w/v) 盐度和 200 g/L 葡萄糖的条件下生长较好，并且获得的乙醇浓度达到 113.52 g/L，产率为 4.15 g/L/h。利用海水进行微生物油脂生产的报道更多集中在微藻中，因为它能够在一定范围的盐度下生长。Sabeela Beevi U 等^[92]在含 50%天然海水的培养基中，对淡水微藻 *Chlorococcum* 的生长和脂肪产量进行了评估，发现藻类细胞对海水的适应能力很强，在异养培养条件下，藻类细胞的油脂积累达到其细胞干重的 38%，生物量和油脂积累明显高于淡水。目前，也有研究者报道酵母在海水中的油脂发酵。Dobrowolski A 等^[93]用 3.5%盐度的模拟海水基质来培养解脂耶氏酵母，结果表明它能够在海水基质中产生与淡水中类似的脂肪酸产量。在另一项研究中，Yen HW^[9]在 5 L 气升式生物反应器中，以海水代替纯水直接培养油脂酵母 *Rhodotorula mucilaginosa*，其生物量为 17.2 g/L，略低于淡水的 18.1 g/L。结果表明，与纯水批次相比，使用海水批次的油脂含量较高，为 65±5%。利用海水代替淡水进行微生物油脂发酵是非常有潜力。但海水使用的前提条件是微生物需要具备高盐耐受能力。

1.3.3 利用工业含盐废水生产微生物油脂

在工业含盐废水中培养微藻已进行了大量研究。微藻可以通过生物化学特性、生物质产量、色素形成和去除污染物效率的变化来适应含盐废水^[94]。微藻作为废水处理的菌株展示出众多优点，因为它们能够为生物燃料生产提供油脂，以及收获的生物质可用于沼气和肥料等具有很高的经济价值^[95]。与筛选适应高盐废水的微生物菌株相比，利用海洋微藻在含盐废水中进行油脂生产具有更强的可操作性和经济性。海洋微藻通常能有效去除废水中的氮、磷，并有能力避免细菌、病毒、浮游动物等生物污染物的污染^[96]。Shen 等利用海洋微藻 *Chlorella vulgaris* 成功地处理了含盐废水，油脂含量提高了 40%，最大油脂产量为 54.0 mg/L/d^[96]。与其他环境因素类似，盐度也影响微藻的油脂积累，它对中性脂质的合成有促进作用，特别是三酰基甘油酯，其具有抵御不利环境条件的能力^[97]。一些研究表明，盐胁迫可以提高藻类的油脂生产^[98]。盐度从 0.75% 增加到 6%，多饱和脂肪酸浓度先增加但随后又降低^[99]。一般来说，小球藻和绿藻对不同类型的废水具有更强的抵抗能力。这些研究结果表明微藻在盐废水条件下用于生物燃料和色素生产的适用性和可行性。

酵母、细菌以及真菌利用工业含盐废水进行油脂发酵的研究较少。微生物往往受到工业含盐废水中芳烃、脂肪烃和氯化烃等难降解物的抑制，导致其在这类废水生长较差。此外，高盐度（大于 1%）可致使细胞破裂或降低细胞代谢，这是由于高盐度引起细胞内外的渗透压差异，使细胞内的水向外流动导致细胞中水的损失，从而影响微生物活性或造成细胞脱水^[100]。为了克服这些障碍，耐盐菌的筛选是有必要的，在以前的研究中提出了以纯培养的方式分离和富集耐盐细菌。Jiang 等^[101]从制药厂中获得一株嗜盐并能降解苯酚的真菌，经鉴定为念珠菌属。该菌株可以利用苯酚作为唯一的碳源，在其含量低于 1,200 mg/L 的培养基中都能够较好地生长；72 h 内可以降解约 800 mg/L 的苯酚，更高的浓度对其则有抑制作用。Huang LH 等人^[102]发现 *Lipomyces starkeyi* HL 在不添加任何额外营养的高盐度鱼粉废水中能够生长，并且在初始 pH 4.0、葡萄糖添加量为 20 g/L 的条件下，*L. starkeyi* HL 的生物量和油脂产量分别为 17 g/L、2.7 g/L。目前，大部分菌株一般用在废水的生物处理中，很少涉及微生物产品的生产。

1.4 微生物的耐盐性及苯酚降解

1.4.1 微生物的耐盐性

高盐水替代淡水进行微生物油脂发酵是以微生物具有高盐耐受性为前提的。一定的盐离子浓度对细胞来说是必需的，但当细胞外的盐离子浓度发生巨大变化时，微生物会通过多种调节机制来维持细胞内各离子的平衡，从而保护细胞免受高盐的迫害。

真核微生物已经发现了许多质膜转运系统，以维持其适当的盐离子水平，特别是消除任何过剩的有毒 Na^+ 。 Na^+ 可以通过 Na^+/H^+ 逆向转运系统从细胞中挤出； K^+ 在膜内负

电位的驱动下, 通过 K^+ 通道进入细胞, 但也存在活跃的、依赖 ATP 的 K^+ 转运系统^[103]。Yenush L 提到在暴露于高浓度钠离子的情况下, 酵母细胞会有不同程度的生理反应, 并且根据盐胁迫的程度和持续时间而有所不同^[104]。高浓度的钠离子对细胞具有双重毒性: 离子胁迫和高渗透胁迫。造成离子毒性的一个因素是钠在某些酶的活性部位取代钾或在某些情况下取代镁的能力。为了避免钠离子毒性, 酵母细胞积极维持高钾/钠比值^[104]。在盐胁迫反应中, 钠离子外排, 限制钠离子进入和液泡隔离是维持高钾/钠比值的关键过程。

高盐浓度会使细胞产生高渗透休克, 对这类应激反应的一个重要组成部分是代谢调节, 主要通过生产和积累兼容的溶质(甘油、氨基酸、糖、多元醇等)来维持水分平衡^[105]。在盐胁迫下, 酵母细胞也会短暂地阻滞细胞周期进程, 减少转录和翻译, 可能是为了提供适应的时间, 而 Hog1 直接参与了此过程^[106, 107]。盐胁迫反应的一个重要调节机制涉及到基因表达谱的重塑。一些研究已经展示出细胞对高钠浓度的转录调控反应, 涉及细胞内 400 和 250 个基因分别上调和下调^[108, 109]。藻类在耐盐性研究中具有重要意义, 因为它们本身就可以生活在含有一定盐度的自然环境中。盐胁迫条件可能有利于微藻的脂质积累。Zhang 等^[110]研究表明, 盐胁迫促进了碳的再分配和淀粉向油脂的转化, 即使淀粉产量低的淡水微藻也表现出盐度诱导下的碳流转换。在油脂酵母中也出现了类似的现象, Tchakouteu 等人^[111]发现圆红冬孢酵母在 NaCl 浓度为 4.0% (w/v)条件下的油脂含量有所增加。

1.4.2 微生物的苯酚降解

由于苯酚的芳香结构, 它可以抵抗自然的生物降解, 具有较强的稳定性。尽管如此, 自然界中还是存在一些微生物可以在较高浓度的苯酚条件下生长, 并将其作为碳源和能源^[112]。早在 1908 年, 研究人员就证明了微生物具有降解酚类物质的能力。苯酚的生物降解是利用微生物存在的酶通过苯环裂解来完成的^[113]。不同种类的微生物(细菌、微藻和真菌)都可以不同程度地降解苯酚。虽然一些藻类对酚类化合物的急性毒性耐受能力较低, 但蓝藻和微藻都能转化酚类化合物^[114]。恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)因去除效率高, 一直被广泛用于苯酚的生物降解^[115]。真菌在芳香化合物的循环中扮演重要的角色, 多项研究表明, 不同的真菌都具有酚类物质的降解能力。它们能够通过酶的机制消耗多种碳源, 从而为苯酚等芳香衍生物的代谢提供了可能^[116]。皮状丝孢酵母、热带念珠菌和红酵母是一些常见的真菌, 能够利用苯酚作为其唯一的碳源和能源。此外, 青霉菌属、曲霉菌属等霉菌也具有分解芳香族化合物的能力。

苯酚的生物降解可分为厌氧和好氧途径。与厌氧工艺相比, 好氧菌对苯酚的生物降解因其去除效率高、成本低而受到人们的关注。在高盐条件下, 苯酚降解的大多数研究也都使用好氧菌。在好氧条件下, 嗜盐菌表现出与非嗜盐菌在非盐环境中类似的苯酚降解途径(图 1.3)。苯酚或其他芳香族化合物的生物降解是否成功受到三个重要步骤的影

响：芳香环的触发，环的裂解，裂解后的产物分解为 TCA 循环中的中间体。苯酚代谢的一个典型途径是通过苯酚羟化酶使环羟基化，形成儿茶酚（1,2-二羟基苯）。苯酚羟化酶是必不可少的，它是该代谢途径中的第一种酶。随后，邻苯二酚通过两种不同方向的芳环裂解而被氧化。一种是间裂解，由邻苯二酚 2,3-双加氧酶（C23O）进行催化依次生成 2-羟粘康酸半醛和 4-烯酸；另一种是邻苯二酚 1,2-双加氧酶（C12O）催化生成粘康酸和粘康内酯的邻位裂解^[117]。最终这些裂解产物会进入 TCA 循环。嗜盐单胞菌（*Halomonas campisalis*）是通过邻位裂解降解苯酚^[118]。短梗霉属、红酵母属和毛孢子菌属在含酚细胞的游离细胞提取物中发现了 C12O 和苯酚羟化酶的活性。这最好地表明了它们是通过邻位裂解氧化邻苯二酚^[119, 120]。Khleifat^[121]报道大多数细菌是通过间位途径降解邻苯二酚。

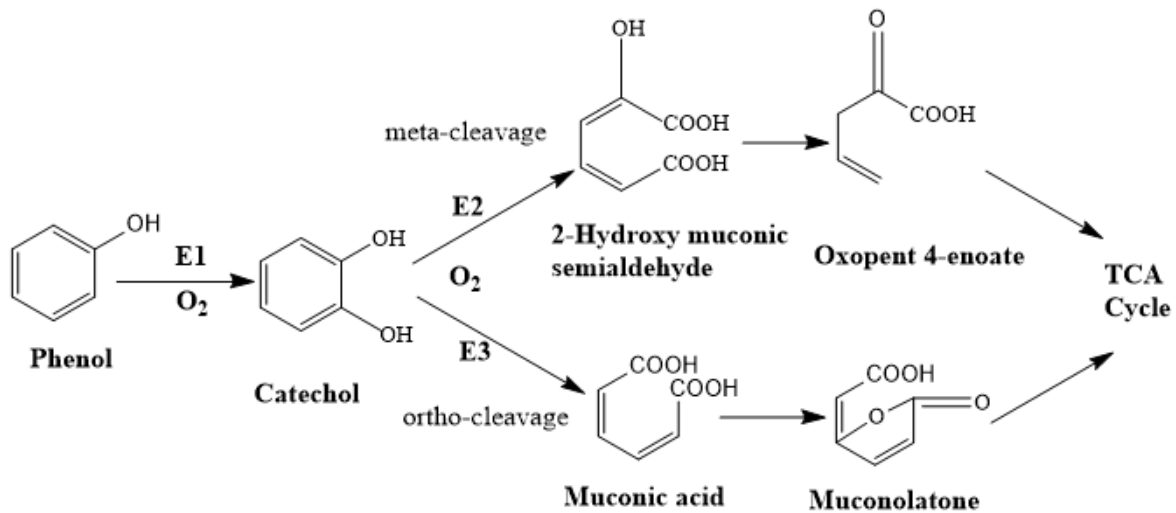


图 1.3 好氧条件下的苯酚降解途径^[122]

(E1: 苯酚羟化酶; E2: 儿茶酚 2,3 双加氧酶; E3; 儿茶酚 1,2 双加氧酶)

Fig. 1.3 Pathways of phenol degradation under aerobic conditions^[122]

(E1: Phenol hydroxylase; E2: Catechol 2, 3 dioxygenase; E3: Catechol 1, 2 dioxygenase)

苯酚的去除效率受浓度、温度、pH 值、盐度、外加碳氮源等因素的影响，从而导致整体降解效率的变化。温度是影响降解速率的重要因素，它与底物的生物利用度和溶解度以及微生物降解的性质、程度和代谢速率有关。pH 值的变化会影响微生物的生长及其酶活性，对大多数苯酚降解菌株来说，中性 pH 值（6.0-8.0）是适宜的^[123]。添加适量的营养物质，如葡萄糖、淀粉、蛋白胨、酵母或尿素，可能会影响生物降解。细菌优先利用容易降解的碳和氮源，这加快了生长和繁殖的速度，从而增加了底物的降解速度。Chandrasekaran 等^[124]研究发现，在盐浓度为 12% 时，酵母提取物的添加显著促进了苯酚降解，尿素（氮源）的添加减少了苯酚生物降解的滞后时间，但添加的营养物质并不总

是促进降解。一项研究表明,葡萄糖的存在阻碍了苯酚的去除率,大概是因为细胞比较倾向于碳水化合物而削弱了苯酚的利用^[125]。

1.5 本论文的立题依据与研究内容

微生物油脂可作为航空燃料和生物柴油的生产原料。相较于动植物油,微生物油脂的生产受到较少的限制(天气、季节等),生长较快。此外,微生物的遗传操作工具与其他培养方式已逐渐成熟,利用微生物进行油脂生产是目前关注的热点。与微藻、细菌及霉菌相比,产油酵母因其油脂含量高,可利用各种底物,已成为生产微生物油脂的主要细胞工厂。然而,微生物油脂发酵过程需要大量的淡水输入,产生大量的废水,导致淡水使用负担加重,成本增加。随着人们对水资源短缺问题的日益关注,淡水的消耗可能成为微生物油脂生产规模化的潜在障碍。使用海水或含盐废水是减少淡水输入、缓解废水处理压力、降低微生物油脂生产成本的一个有力措施。

海水或含盐废水可替代淡水进行微生物油脂发酵的前提是需要微生物具有耐盐性以及耐废水中的有机污染物的降解能力或毒性耐受力。皮状丝孢酵母作为油脂酵母,具有较强的环境适应性,在木质纤维素体系下适应良好。其可以降解木质纤维素来源的抑制物如丁香醛、4-羟基苯甲醛等。本实验室以 *Trichosporon cutaneum* ACCC20271 为出发菌株通过超离心筛选与长期的适应性进化获得了高产油脂菌株 *T. cutaneum* MP11。因此,本研究以 *T. cutaneum* 为研究对象在高盐胁迫下进行油脂发酵。首先, *T. cutaneum* 是否可以耐受高盐环境以及耐受浓度的高低并不清楚;其次,高产油脂的 *T. cutaneum* 菌株是否在高盐条件下也能获得高油脂产量;最后, *T. cutaneum* MP11 在高盐环境下是否能够降解苯酚并产生油脂。这些问题是在海水或工业含盐废水中进行油脂发酵时需要解决的。本论文针对以上问题开展实验,其主要研究内容如下。

(1) 利用高盐水进行油脂发酵,需要了解油脂酵母的耐盐性能。本文首先进行了皮状丝孢酵母的盐耐受性实验,探究其最高能够耐受的盐浓度。其次,将 *T. cutaneum* 培养在不同盐度的海水体系中以探究不同盐胁迫强度对细胞生长、形态以及油脂产量的影响。

(2) 苯酚是工业废水中典型的有机污染物,存在于大部分的含盐废水中,形成含酚高盐废水,其对微生物细胞生长具有抑制作用。不同微生物能够耐受的苯酚浓度不同,本研究对高产油脂酵母 *T. cutaneum* MP11 在高盐条件下进行了苯酚耐受性的探究。然后选择合适的苯酚浓度在高盐胁迫下进行油脂发酵,观察其油脂生产和苯酚降解能力。最后,本研究尝试在四环素含盐水与榨菜废水中进行油脂发酵,以期拓展油脂酵母菌株 *T. cutaneum* 在含盐废水中的应用范围。

第 2 章 皮状丝孢酵母在不同盐度的海水体系下的油脂发酵

2.1 引言

海水资源丰富，容易获得，另外它还含有多种矿物质，可以减少添加发酵培养基所需的必需营养素。迄今为止，并没有有效利用海水进行生物产品制造。在微生物油脂发酵过程中使用海水有可能提高整个过程的经济性，缓解用水压力以应对淡水匮乏的危机。海水的盐度通常在 3.5% 左右，其含有各类盐离子，主要成分为氯化钠，它的高盐度对微生物的生长有抑制作用，会造成细胞的质壁分离，影响胞内各种酶的活性。因此，海水替代淡水进行微生物油脂生产的前提条件是微生物必须具有高耐盐性。

皮状丝孢酵母具有广泛的底物谱，可以利用各种有机碳源进行微生物油脂生产，对环境的适应性强。由于它的遗传操作工具的建立一直是难点，目前并没有实现其遗传操作系统的构建，油脂含量也很难提高。本实验室根据高产油脂细胞密度低的原理，以 *T. cutaneum* ACCC20271 为出发菌株，利用超离心筛选和长期的适应性进化获得了高油脂含量的菌株 *T. cutaneum* MP11。该菌株筛选的成功说明超离心筛选方法对高油脂含量菌株是有效果的。可以尝试通过该方法提高皮状丝孢酵母在高盐条件下的油脂产量与耐盐性能。

本节研究了 *T. cutaneum* 的高盐耐受性及其在不同海水盐度下的油脂生产能力。首先进行了皮状丝孢酵母的盐耐受性实验，探究其最高能够耐受的盐浓度。其次，将原始菌株 *T. cutaneum* ACCC20271 在含有 4.0% NaCl 的培养基中进行适应性进化和超离心筛选以期获得具有高耐盐性、高产油脂菌株。最后，在不同盐度的海水体系中探究盐胁迫强度对细胞生长、细胞形态以及油脂产量的影响。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌种与培养基

Trichosporon cutaneum ACCC 20271 是从中国农业微生物菌种保藏管理中心 (ACCC, <http://www.accc.org.cn>) 获得。*T. cutaneum* MP11 由本实验室的卢敏萍同学在限制氮源条件下通过超离心筛选获得，保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC, <http://www.cgmcc.net>)，注册号为 20481。本实验所用的培养基如下。

- (1) YPD 培养基：10 g/L 酵母提取物，20 g/L 葡萄糖，20 g/L 蛋白胨。
- (2) YPD 平板：10 g/L 酵母提取物，20 g/L 葡萄糖，20 g/L 蛋白胨，20 g/L 琼脂
- (3) 合成培养基：60 g/L 葡萄糖，1.0 g/L 磷酸二氢钾，0.5 g/L 酵母提取物，0.5 g/L 七水硫酸镁，0.22 g/L 硫酸铵。
- (4) 上罐发酵培养基：150 g/L 葡萄糖，2.0 g/L 磷酸二氢钾，1.0 g/L 酵母提取物，

1.0 g/L 七水硫酸镁, 0.44 g/L 硫酸铵。

2.2.2 海水与试剂

本实验所用的海水取自位于上海奉贤海滩附近的东海区域 (30.819°N, 121.528°E)。海水盐度为 0.98%，所含的主要阳离子及其浓度为 3.2 g/L Na⁺、0.43 g/L Mg²⁺、0.17 g/L Ca²⁺、0.11 g/L K⁺。通过在所取的海水样品中添加氯化钠，将其盐度调整到 1.0%、3.5%、4.4%和 6.0%。

蛋白胨和酵母提取物均购买自 OXIOD 公司。葡萄糖标准溶液（用于生化分析仪标定）购买自山东省科学院。本章节所用到的其他所有分析级化学品均购买自上海泰坦科技有限公司。

2.2.3 *T. cutaneum* 的种子培养和适应性进化

T. cutaneum 的种子培养：用接种环蘸取冻存管中的菌液，然后在 YPD 平板上进行划线，随后将其在 30 °C 下培养 36 h；挑取单菌落，将其转移到含有 20 mL YPD 培养液的 100 mL 摇瓶中培养 24 h（此为第一次活化）。然后以 1% 的接种量再转移到新鲜的含有 YPD 的培养基中培养 16-20 h 即得种子液（此为第二次活化）。

T. cutaneum ACCC 20271 的适应性进化：*T. cutaneum* ACCC 20271 作为出发菌株，在限制氮源的含有 4.0% NaCl 的培养基中进行长期的适应性进化。种子经过活化之后，取 5 mL 菌液转入新鲜的添加 40 g/L 氯化钠的合成培养基中，在转速为 180 rpm，30 °C 的条件下培养 5 d。随后取发酵液 25 mL 于 50 mL 离心管中，离心 3 min（其中离心力不断增加，从 2,000 g 到 42,000 g）。取 5 mL 最上层菌液转入下一个含有新鲜培养基的摇瓶中继续培养，此为 1 次转接。重复上述的步骤，此过程除了离心力不断增加，其他条件保持不变。每次发酵结束后取一定的菌液测量油脂含量与细胞生长量，另外每隔 2-3 转接次数观察细胞形态。上述过程全部在无菌条件下进行操作。

2.2.4 微生物油脂发酵

T. cutaneum 的摇瓶探究实验在 500 mL 锥形瓶中进行。活化后的种子液转移至含有 50 mL 的合成培养基中，接种量为 10% (v/v)，在温度为 30 °C，转速为 180 rpm 条件下培养 5 d。

T. cutaneum 的微生物油脂发酵实验在 3 L 的生物反应器（上海保兴生物设备工程有限公司）中进行。上罐发酵的工作体积为 800 mL，10% (v/v) 的接种量。在温度为 30 °C，转速为 450 rpm，通气量为 1 vvm 的条件下发酵 120 h。发酵过程中 pH 值维持在 5.0（通过 5 M NaOH 和 4 M HCl 溶液调节）。

2.2.5 细胞内的钠离子分析

测定胞内的钠离子参照 Gao 等人^[126]的方法。首先通过离心收集不同氯化钠浓度下的细胞，用氯化镁溶液洗涤细胞以除去细胞周围的盐离子及杂质，然后再离心。将离心后的细胞在 65 °C 下烘干至恒定重量，测定其干重。然后再加入 1 M 的盐酸溶液进行细

胞破碎，离心除去细胞碎片及其他内容物，将得到的溶液稀释至一定倍数即得到钠离子待测溶液。

2.2.6 细胞形态观察

将发酵结束后的培养液稀释至合适的倍数，用光学显微镜（BX53, OLYMPUS, 东京都, 日本）观察其细胞形态，放大倍数为 100 倍。

2.2.7 阳离子浓度及盐度测定

采用等离子体发射光谱^[127]（725 ICP-OES, 安捷伦, 美国）测定海水中的阳离子浓度。将所取的海水样品用快速滤纸过滤掉固体杂质，然后通过马弗炉进行盐度的测定。

2.2.8 葡萄糖、细胞生长的测定

葡萄糖测定使用生物传感器分析仪 SBA-40D（山东省科学院生物研究所, 济南, 中国）。用紫外可见分光光度计（BIOMATE 3S, Thermo, Waltham, MA, USA）在 600 nm 处检测细胞生长。

2.2.9 细胞干重与油脂提取

利用差重法测量细胞干重，具体步骤为发酵液离心收集细胞后经过两次水洗过程去除杂质，将其转移到已知重量的玻璃平皿中，烘干后称其重量减去玻璃平皿重量即得细胞干重。微生物的油脂提取采用的是甲醇-氯仿法^[128]，详细的操作步骤如下。向烘干后的细胞中加入 4 M 盐酸维持 2-3 h，之后在沸水中煮沸 10 分钟，这个过程主要目的是使细胞破裂。然后加入甲醇和氯仿溶液（1:2, v/v），在 30 °C，180 rpm 下萃取 1 小时。随后通过离心可得到含油脂的氯仿相（在下层），将氯仿相转移到已知重量的旋蒸瓶中，最后在 80 °C 下真空蒸发得到油脂。将其烘干后通过差重法即可得出油脂产量。

2.3 结果和讨论

2.3.1 *T. cutaneum* 的耐盐性探究

本部分尝试通过海水来替代淡水进行油脂发酵。海水的主要成分为氯化钠，它对细胞的毒性较大，但不同微生物对氯化钠的耐受程度不同。因此，本研究通过在合成培养基中额外添加氯化钠来考察 *T. cutaneum* 的耐盐性能。将 *T. cutaneum* ACCC 20271 长期培养在不断提高 NaCl 浓度的合成培养基中，同时通过细胞形态进一步确认其耐受的最高盐浓度。

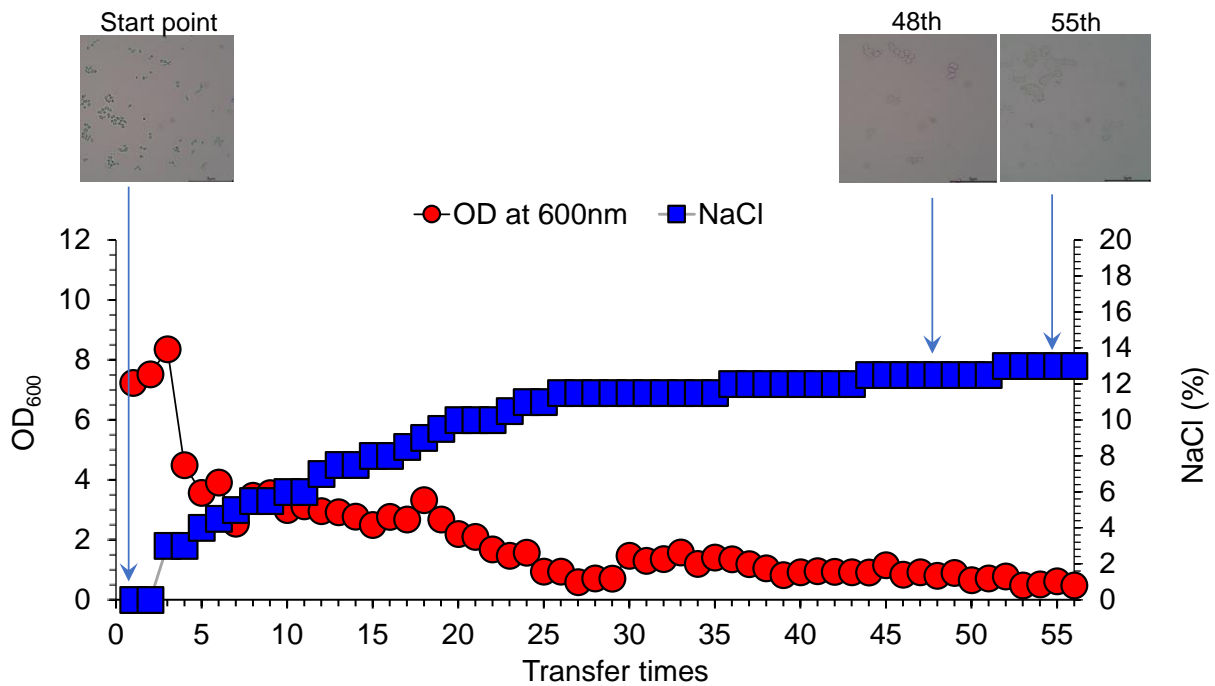


图 2.1 *T. cutaneum* ACCC 20271 在盐条件下的细胞生长情况和细胞形态变化

Fig. 2.1 Cell growth and cell morphological of *T. cutaneum* ACCC 20271 under saline conditions

T. cutaneum 的盐耐受性实验在 500 mL 的摇瓶中进行。*T. cutaneum* ACCC 20271 经过 YPD 培养基活化后，转移到未添加氯化钠的合成培养基中，3 d 后转移到新鲜的含有氯化钠的合成培养基中。培养 3 d 后再转移新鲜的含有氯化钠的培养基中。一直重复该过程，直到细胞不再生长，所用培养基为合成培养基，氯化钠浓度从 0% 增加至 13.0%。培养条件：30 °C，180 rpm，3 d，接种量为 10% (v/v)。摇瓶发酵结束后，细胞形态用光学显微镜观察，倍数为 100 x。

T. cutaneum ACCC 20271 在长期的高盐胁迫下的细胞生长情况如图 2.1 所示。*T. cutaneum* ACCC 20271 在高盐胁迫下经过 56 次的转接培养，能够耐受高达 13.0% NaCl，具有较高的盐耐受能力。*T. cutaneum* ACCC 20271 从淡水培养基中转到含有 30 g/L 氯化钠的培养基中，OD 值迅速降低（由 7.5 降到 3.9），说明该盐浓度对细胞有一定的负面影响。氯化钠浓度在 3.0% 至 9.0% 范围内，细胞的生长量没有明显降低，说明在该范围内提高氯化钠浓度对细胞生长影响不大。当氯化钠浓度从 9.0% 逐步增加时，细胞的生长量也随之减少。当氯化钠浓度增至 13.0%，细胞几乎不再生长。相应转接次数的细胞形态也展示在图 2.1 中，*T. cutaneum* ACCC 20271 在淡水（Start point）中培养的细胞多数呈圆形，NaCl 浓度在 12.5%（48th）下培养的细胞形态有稍微变大的趋势，基本能维持正常的形态。在含有 13.0% NaCl 的培养基中多次培养，细胞均不能维持正常的形态，边缘甚至发生破裂（图中展示的是第 55 次转接的细胞形态）。因此，通过细胞的生长状况与细胞形态可以看出 *T. cutaneum* 能够耐受 13.0% NaCl 的高盐浓度。

T. cutaneum 能够耐受高浓度的氯化钠，其细胞内存在耐盐机制来抵御高渗透压胁迫。在高浓度的氯化钠存在下，细胞内的耐盐机制可能遭到严重破坏。 Na^+/H^+ 逆向转运系统在抵御高盐胁迫中有着重要作用。通过测定细胞内外的钠离子浓度来初步探究在不同盐度下对离子转运的影响，结果如图 2.2 所示。与淡水 (0.63 mol/L) 相比，当培养基中添加的氯化钠浓度为 4.0% 时，胞内的钠离子浓度 (0.58 mmol/L) 在误差范围内可认为无变化。当培养基中的氯化钠浓度为 12.5% 时，胞内的钠离子浓度 (2.63 mmol/L) 明显增加，是对照组的 2.6 倍。本研究并没有测定在 13.0% 氯化钠条件下的胞内钠离子浓度，因其大部分细胞破裂，并不能准确表明其浓度。从该结果可知，在一定盐度下细胞内的钠离子浓度能够维持在正常水平，即细胞能够正常生长。当盐度较高时，细胞内的耐盐机制遭到破坏，不能将胞内的钠离子水平维持在正常范围内，从而影响细胞的生长，甚至导致细胞死亡。

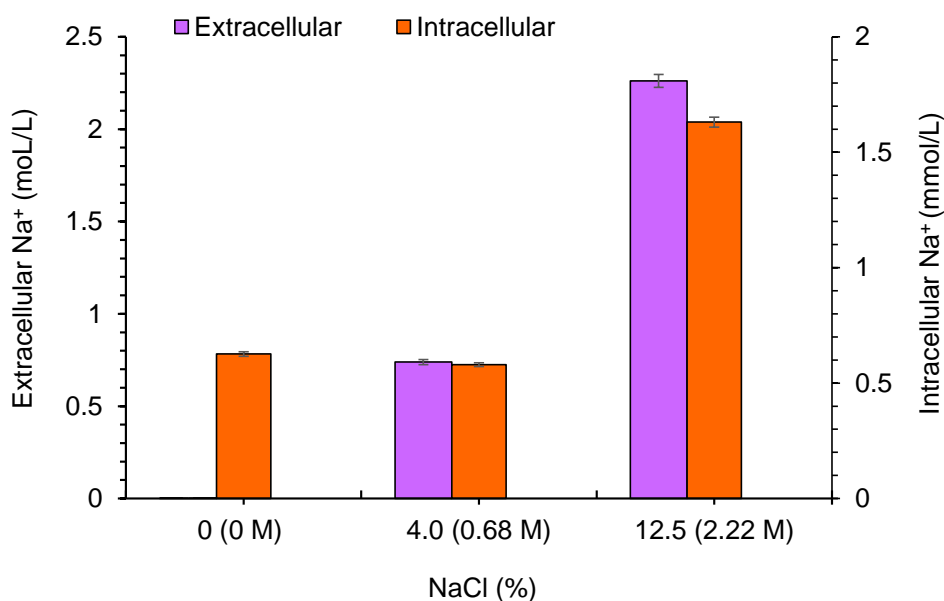


图 2.2 细胞内外的钠离子浓度

Fig. 2.2 Sodium concentration of intracellular and extracellular

2.3.2 *T. cutaneum* ACCC 20271 在不同盐度的海水体系下的油脂发酵

上述探究实验发现，*T. cutaneum* ACCC 20271 能够耐受高盐条件，具有在海水培养基中生产油脂的潜力。接下来将 *T. cutaneum* ACCC 20271 在 3 L 生物反应器进行油脂发酵，研究几种常见盐度对该酵母细胞油脂产量的影响。其中，纺织、电渗析废液的盐度在 1.0% 左右^[79]，含酚类废水、海水养殖废水等盐度约为 3.0-3.5%^[129-131]，世界范围内海水的平均盐度在 3.5%，热带沙漠气候区的海水、石化废水的盐度高达 4.4% 左右，制革厂、药厂的废水盐度能达到 6.0% 左右^[132]。本研究选择上述 1.0%、3.5%、4.4%、6.0% 这几种有代表

性的盐度进行实验，淡水基质作为对照组，考察 *T. cutaneum* 在不同盐度下的油脂生产能力。

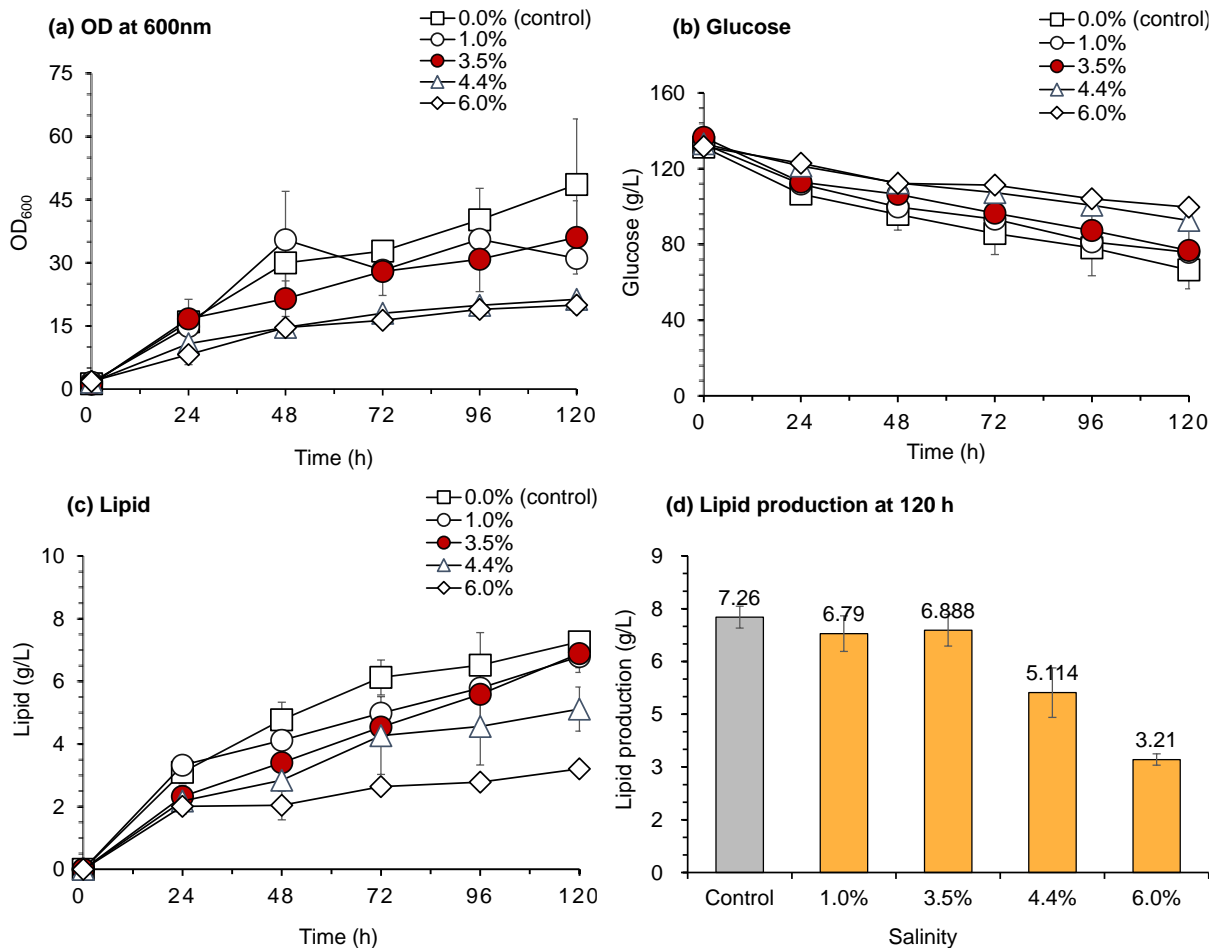


图 2.3 *T. cutaneum* ACCC 20271 在不同盐度下的的油脂发酵

Fig. 2.3 Lipid fermentation of *T. cutaneum* ACCC 20271 at different salinity

(a) 细胞生物量；(b) 糖消耗情况；(c) 油脂产量；(d) 不同盐度下发酵 120 h 后的油脂产量。油脂发酵 *T. cutaneum* ACCC 20271 在 3 L 生物反应器中进行，发酵条件：30 °C，450 rpm，5 d，pH 控制在 5.0，通气量 1 vvm，接种量 10%，发酵体系 800 mL。每个盐度下均进行一次重复发酵，以上数值为两次发酵结果的平均值。

因海水资源丰富，含有额外的矿物质可作为营养素，所以该部分实验以实际海水为高盐水介质来进行油脂发酵。所取海水样品的盐度约为1.0%，远低于海水的平均盐度（3.5%）。因此本研究使用淡水、海水样品来制备0%、1.0%盐度的水，通过在海水中额外补加氯化钠来制备3.5%、4.4%、6.0%盐度的水。

由图2.3的发酵结果可以看出，盐度对 *T. cutaneum* ACCC 20271 的细胞生长和油脂生产有一定影响。1.0%、3.5%盐度下的细胞生长量、糖消耗情况和油脂生产量与淡水中的发酵结果类似，在这两个盐度下油脂积累的速率较慢，但发酵过程中一直在积累，而在

淡水中油脂在72 h后几乎无积累，说明盐度减缓了油脂的积累。盐度在4.4%和6.0%下，细胞生长量明显低于淡水，油脂产量也较低。*T. cutaneum* ACCC 20271的最高油脂产量均在120 h获得，因此，图2.3(d)展示了其在不同盐度条件下发酵120 h得到的油脂产量。对照组的最高油脂产量为7.2 g/L，1.0%和3.5%盐度下的油脂产量分别为6.8、6.9 g/L，与对照组相似。而4.4%、6.0%盐度的油脂产量分别为5.1 g/L、3.2 g/L，与对照相比油脂产量分别降低了29.1%和55.5%。该结果表明在盐度为4.4%、6.0%的条件下，细胞生长量与油脂产量均受到明显抑制，在3.5%及以下盐度其油脂生产性能和生长量并没有受到较大的影响。另外，3.5%的盐度是一个非常典型的盐度，各类工业废水大部分处于该盐度下，也恰好是海水的平均盐度，因此*T. cutaneum*具备利用海水生产油脂的潜能。但是，从图2.3(b)中可以得知，*T. cutaneum* ACCC 20271在发酵120 h后并没有将葡萄糖完全消耗完，在淡水发酵中还有约70 g/L残糖。与其他油脂酵母相比，*T. cutaneum* ACCC 20271的油脂产量并没有优势。

2.3.3 皮状丝孢酵母在高盐条件下的适应性进化

从前面图2.1的实验结果可知*T. cutaneum*具有高耐盐性。图2.3展示的结果中表明，与淡水条件相比，*T. cutaneum* ACCC 20271在3.5%氯化钠浓度下存在细胞生长量低的问题。另外一个是与其他产油微生物相比，*T. cutaneum* ACCC 20271的油脂生产能力低。利用海水代替淡水获得高微生物油脂产量需要解决*T. cutaneum* ACCC 20271菌株生物量低和油脂产量低的问题。

该油脂酵母的遗传操作系统并没有建立起来，本实验室的赵瞭同学曾尝试在该细胞中进行基因改造，但最终因为同源重组效率低等问题而不能获得有效的重组菌株^[133]，在此基础上，我们也做过提高粗甘油利用的相关分子改造，但均未成功。此外，考虑到高盐胁迫并不是单个基因起作用，而是细胞内一系列的相关基因上调或下调来应对高盐胁迫。某个耐盐基因的导入或过表达并不一定有明显的效果。因此，本研究尝试通过适应性进化来提高油脂酵母*T. cutaneum* ACCC 20271的耐盐性。将其在4.0%氯化钠浓度下进行适应性进化，采用4.0%氯化钠浓度而不是一个典型的海水盐度（3.5%），是期望能快速提高其耐盐性。提高细胞内的油脂含量可采用超离心筛选方法，因积累高油脂含量的细胞一般比较大，而且其密度较轻，与油脂含量低的细胞相比，其在培养液中受到的摩擦力和浮力大，可以尝试通过高速离心的方式筛选培养液上层的细胞以富集含油率较高的细胞。本实验室已通过该方法获得了*T. cutaneum* MS28和*T. cutaneum* WL97^[134]，表明了该方法的可行性。

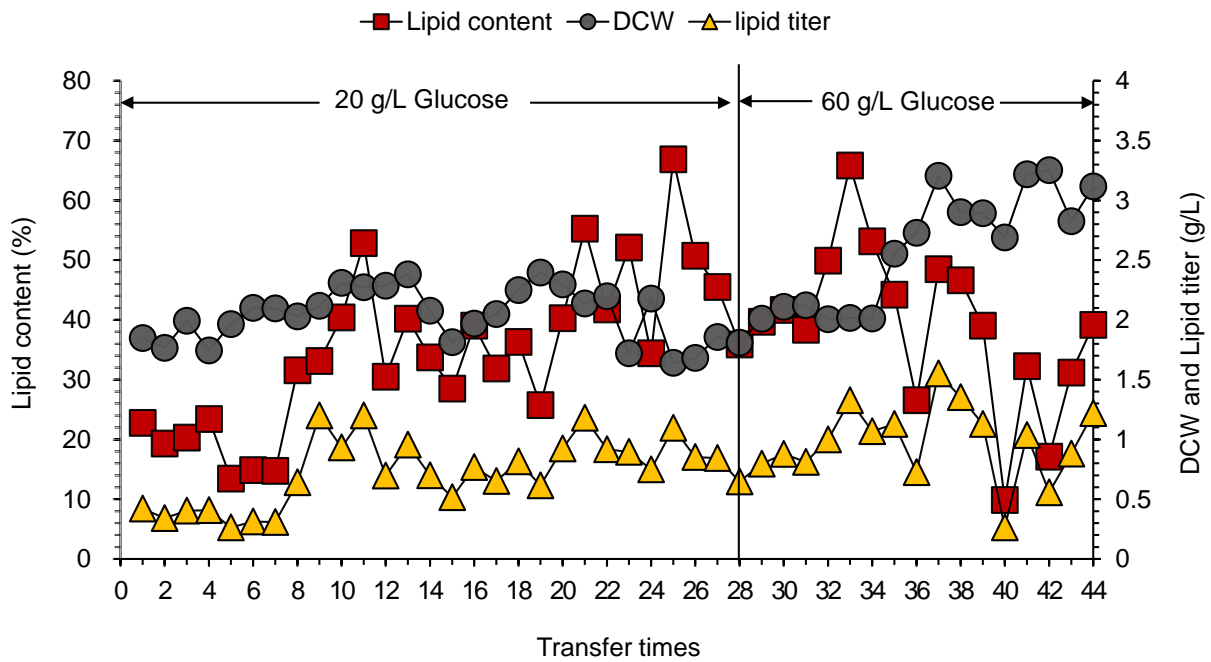


图 2.4 *T. cutaneum* ACCC 20271 在 4.0% NaCl 下的长期适应性进化

Fig. 2.4 Long-term adaptive evolution of *T. cutaneum* ACCC 20271 in medium containing 4.0% NaCl
T. cutaneum ACCC 20271 培养在合成培养基中，培养条件：30 °C，180 rpm，5 d。培养基开始添加葡萄糖为 20 g/L，为了保持高的碳氮比以利于油脂积累，后期调整为 60 g/L。培养基中保持 40 g/L 氯化钠浓度不变，离心筛选过程逐渐提高离心力大小（从 2,000 g 到 42,000 g）

本研究通过把适应性进化与高速离心方法相结合来筛选高耐盐性、高油脂含量的酵母菌株。首先将 *T. cutaneum* ACCC 20271 培养在含有 4.0% NaCl 的培养基中，培养 5 d 取 5 mL 菌液离心后取上清转移到新鲜的同样含有 4.0% NaCl 的摇瓶中进行培养。一直重复该过程，不断提高离心力，期间观察细胞形态变化并测定油脂含量。结果如图 2.5 所示，经过 44 次不断转接与离心（离心力从 2,000 g 逐步提高至 42,000 g），细胞生长并没有明显改善，但油脂含量总体是有一定的提高。油脂含量总是在上下波动，一部分原因可能是由于盐条件下菌体量少，油脂测量并不准确。另外，考虑到碳氮比较低，可能不利于油脂的积累，后期增加葡萄糖浓度至 60 g/L。在其浓度提高之后细胞干重有所增加，但细胞含油率并没有明显提高。

皮状丝孢酵母在经过 44 次转接之后细胞形态并没有一个明显的变化（如图 2.5）。后续尝试通过加入纤维素酶以期减少细胞壁厚度来提高细胞内的油脂含量，但仍然没有变化。可能离心筛选的方法在高盐条件下并不适用，因高的渗透压可能迫使细胞变小，大部分细胞都是同样大小，通过离心的方式并不能有效筛选出高油脂含量的细胞。

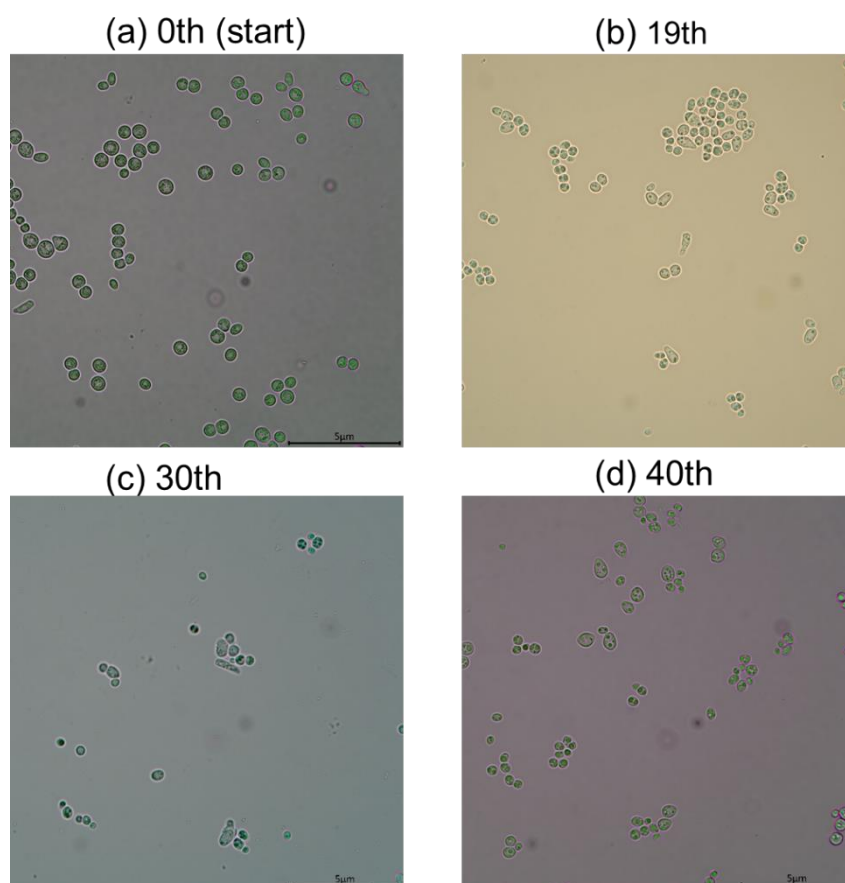


图 2.5 *T. cutaneum* ACCC 20271 在适应性进化过程中的细胞形态

Fig. 2.5 Cell morphology of *T. cutaneum* ACCC 20271 during adaptive evolution

T. cutaneum ACCC 20271 每 3 天转接一次，每次转接前观察细胞形态。图中分别为 *T. cutaneum* ACCC 20271 (a) 初始；(b) 第 19 次转接；(c) 第 30 次转接；(d) 第 40 次转接时的细胞形态。细胞形态在光学显微镜 100 倍下观察。

2.3.4 *T. cutaneum* MP11 在不同盐度的海水体系下的油脂发酵

原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 并没有较强的油脂生产能力，利用高盐水发酵生产油脂的应用价值不高。由 2.3.3 小节可知，*T. cutaneum* ACCC 20271 经过适应性进化其油脂产量并没有明显提高，细胞形态也没有按照预想发生变化。因此直接在高盐条件下进行适应性进化的方法不可行。本研究接下来尝试利用在淡水中通过离心筛选而使油脂产量提高的酵母菌株在高盐条件下进行油脂发酵。*T. cutaneum* MP11 是通过超高速离心筛选而来，油脂含量高达 70%，细胞也比原始菌株大几十倍。因此，接下来以 *T. cutaneum* MP11 为研究对象在不同盐度下进行油脂发酵。

T. cutaneum MP11 在不同盐浓度下的发酵结果如图 2.6 所示，油脂积累与细胞生长的趋势一致。*T. cutaneum* MP11 在 1.0% 盐度下的生长趋势、糖消耗与淡水培养中的情况基本一致，其油脂产量为 24.1 g/L，与淡水的 23.3 g/L 类似，说明此盐度对其油脂积累与细

胞生长均无负面影响。*T. cutaneum* MP11在3.5%盐度下细胞生长有一定的延迟，在前期生长较慢，24 h以后快速生长，到96 h达到最大值，此时油脂产量也达到了最高（31.7 g/L）。从图2.6(d)可以看出，该菌株在4.4%的盐度下，发酵120 h后还剩余约30 g/L葡萄糖未被消耗，细胞量与油脂积累量一直随着时间稳步增加，油脂最终产量达到20.3 g/L。在4.4%盐度的条件下继续延长发酵时间发现葡萄糖能够被不断消耗，油脂产量增加，说明此盐度使细胞生长与油脂积累变得缓慢，但延长发酵时间细胞还是能够继续生长与积累油脂。*T. cutaneum* MP11在6.0%盐度下，前24 h并未见生长，之后细胞量缓慢增加，120 h后还有80 g/L以上的葡萄糖未被消耗；在此盐度下，48 h之前几乎无油脂积累，发酵120 h仅有8.5 g/L油脂积累。综上所述，1.0%盐度下对细胞生长与油脂积累无影响，而3.5%、4.4%、6.0%盐度下对细胞生长都有一定的影响，使细胞延迟期增加，尤其在6.0%盐度下明显抑制细胞生长。油脂积累与细胞生长是一致的，细胞生长快，油脂积累快，细胞无生长，油脂也随之停止积累。当葡萄糖耗完后，油脂积累量降低，细胞通过降解油脂来维持细胞生长。

从图2.7中可以清晰地看出，随着盐度的增加，*T. cutaneum* MP11的油脂产量呈现出先增加后减少的趋势，在盐度为3.5%时，该油脂酵母细胞的油脂产量最高。具体来说，在盐度为1.0%时，油脂产量与淡水发酵的结果类似（24.2 g/L），并没有大的变化。当盐度为3.5%时，油脂产量最高（31.7 g/L），比淡水中的（23.3 g/L）提高了36%。盐度为4.4%时，油脂产量（20.3 g/L）开始下降，当盐度继续增加至6.0%时，油脂产量为8.7 g/L，与对照相比降低了64%。观察细胞形态发现，当盐度为3.5%及以下时，与淡水培养条件下的细胞形态相比并没有明显变化，细胞形态都呈现长而大的棒状。但盐度为4.4%和6.0%时细胞形态大部分趋于圆形，长梭状的细胞变少。出现此现象的原因可能是由于在更高的盐度下细胞外的渗透压较强，不利于细胞的伸长，小的细胞可能更利于抵御渗透压胁迫。从以上分析结果来看，在5个盐度梯度下，一个非常典型的盐度（3.5%）更有利于*T. cutaneum* MP11的油脂生产。从该部分油脂发酵的趋势来看，在盐胁迫下细胞的生长变得缓慢，油脂会不断积累，即油脂生产的时间变长。与淡水相比，一定的盐胁迫可诱导油脂积累。有一些研究报道也表明一定的盐胁迫强度有利于油脂的积累，但这些研究大多数集中在微藻中，油脂酵母中的报道很少。Ho等人^[135]发现，在盐胁迫下，三磷酸甘油、丙酮酸和乙酰辅酶A的含量高于淡水。造成这一现象的原因可能是盐胁迫改变了碳代谢流，使其更倾向于脂类合成途径。

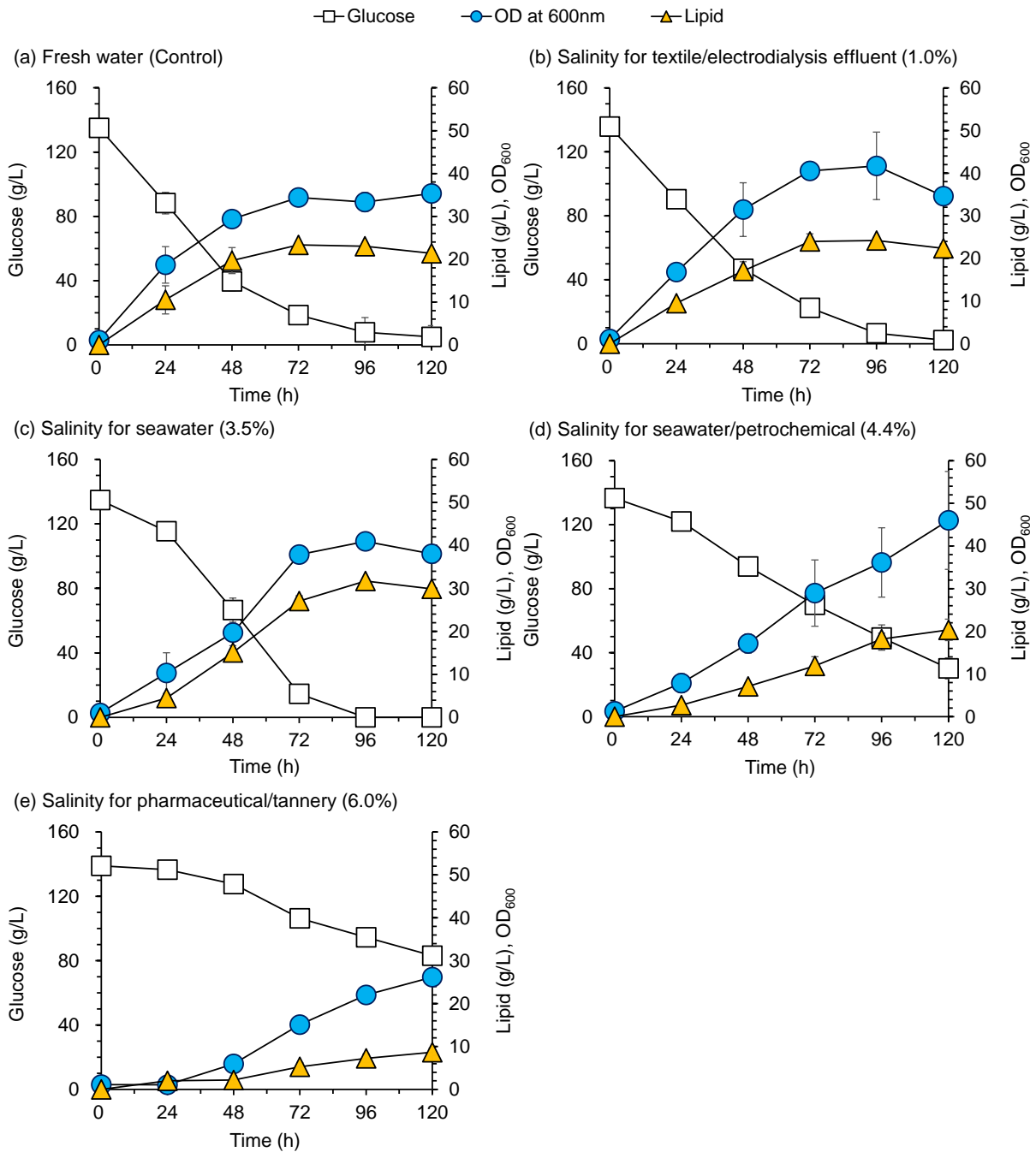


图2.6 *T. cutaneum* MP11在不同盐度下的细胞量、糖耗和油脂产量

Fig. 2.6 Cell growth, sugar consumption and lipid production of *T. cutaneum* MP11 at different salinity. *T. cutaneum* MP11 的油脂发酵在 3 L 生物反应器中进行，发酵条件：30 °C，450 rpm，5 d，pH 控制在 5.0，通气量 1 vvm，接种量 10%，发酵体系 800 mL。上罐发酵用的是海水体系，通过额外添加氯化钠配置成不同盐度，盐度分别为 (a) 淡水、(b) 1.0%盐度、(c) 3.5%盐度、(d) 4.4%盐度、(e) 6.0%盐度。每个盐度条件下均进行一次重复实验，以上数值为两次发酵结果的平均值。

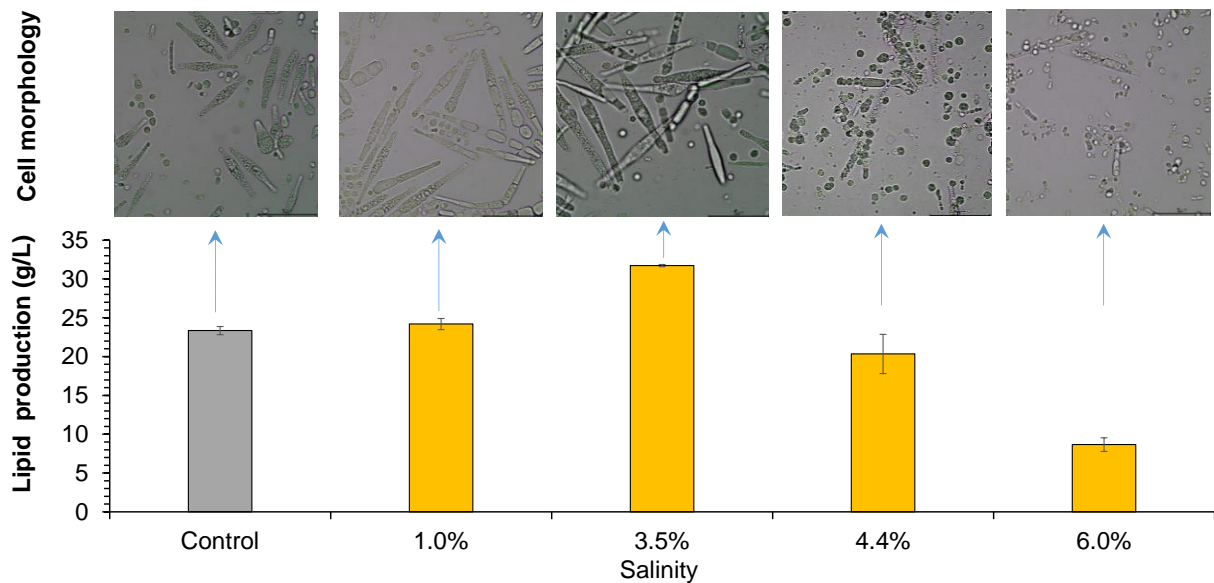


图 2.7 *T. cutaneum* MP11 在不同盐度下的油脂产量与其对应的细胞形态

Fig. 2.7 Lipid production and its corresponding cell morphology of *T. cutaneum* MP11 under different salinities.

图中所表示的油脂产量为发酵 120 h 后所获得的最大油脂产量。其中，盐浓度在 1.0%和 3.5%时，最大油脂产量在 96 h 获得；盐浓度为 4.4%和 6.0%时，在 120 h 获得；而对照组（淡水）则在 72 h 获得。5 张细胞形态图片分别对应下面五个盐度，细胞形态均在 100 倍镜下观察拍摄。

2.3.5 *T. cutaneum* MP11 在不同盐度下的发酵现象

T. cutaneum MP11 在发酵结束后一般取 25 mL 样品于离心管中进行油脂产量的测量。在样品放置过夜后发现一个在原始菌株 *T. cutaneum* ACCC20271 中并没有出现过的现象。如图 2.8 所示，*T. cutaneum* MP11 在高盐条件下不经过离心作用油脂细胞就能够自动实现与发酵培养液的分离。但在淡水培养基中培养时（图 2.8 (a)）并没有出现细胞漂浮在上层的现象。工程改造菌株解脂耶氏酵母中也发现细胞漂浮在发酵液上层的现象，该酵母细胞的培养介质是淡水^[136]，但作者只提到这一现象并没有过多的解释，可能是该改造菌株中含油率较高的原因。本实验在高盐条件下细胞的分层现象大致可能的原因如下：一方面，高盐水中培养会使细胞外环境具有高的渗透压，而高渗透压会使细胞失去水分，导致细胞内油脂含量会略微偏高；另一方面，高盐水的密度比淡水的密度大，油脂含量高的细胞更容易漂浮在发酵液上，这可能是主要的原因。这种现象的发现对于细胞收集是非常重要的，可以不经过离心步骤就可以收集到大部分细胞，对降低油脂提取成本具有重要作用。

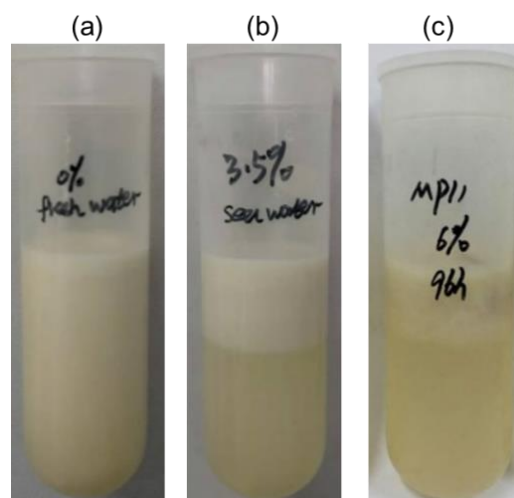


图 2.8 *T. cutaneum* MP11 在不同盐度条件下发酵结束后的样品

Fig. 2.8 Fermentation samples of *T. cutaneum* MP11 under different salinities.

分别取 *T. cutaneum* MP11 在 (a) 淡水对照 (0.0%)、(b) 3.5%盐度、(c) 6.0%盐度条件下发酵 96 h 的培养液 25 mL 于 50 mL 离心管中，放置过夜后进行观察。

2.4 本章小结

海水是丰富的水资源，目前并没有应用于大规模的生物制造。皮状丝孢酵母对环境的适应性强，能够在木质纤维素体系中生产油脂。本章节首先考察了皮状丝孢酵母的耐盐性能，在含有 4.0% NaCl 培养基中进行适应性进化以期提高油脂产能与耐盐能力。其次尝试将海水替代淡水进行 *T. cutaneum* 的油脂发酵。本章节得出的主要研究结果如下：

(1) 将皮状丝孢酵母培养在不断提高氯化钠浓度的培养基中，探究其耐盐能力，细胞形态与生长情况表明 *T. cutaneum* 能够耐受高达 13.0% NaCl，可见其具有高耐盐性能。

(2) 在海水中添加氯化钠制备不同盐度的水。将 *T. cutaneum* ACCC 20271 培养在不同盐度的海水体系中进行油脂发酵。结果发现，3.5%及以下盐度的细胞生长、油脂生产与在淡水中培养的产量相差不大，油脂产量在 6 - 7 g/L 左右；但在 4.4%和 6.0%盐度下，细胞生长与油脂积累受到抑制，尤其在 6.0%盐度下该酵母细胞的油脂产量下降了 55.5%。

(3) *T. cutaneum* ACCC 20271 菌株油脂产量不高，盐度或多或少会影响细胞的生长，因此在含有 4.0% NaCl 的培养基中进行适应性进化来提高油脂产量。该油脂酵母细胞经过 44 次超离心筛选，细胞形态并没有变化，油脂产量也没有一个提高，细胞生长有所增加。在高盐条件下进行适应性进化与离心筛选并不能得到高油脂产量的菌株，可能是因为高渗透压下细胞形态很难发生改变。

(4) 在高盐条件下超离心筛选高油脂含量的细胞行不通，那么尝试另一种途径。即

利用在不添加氯化钠的条件下通过超离心筛选得到的菌株 *T. cutaneum* MP11。将该菌株在不同盐度条件的水中进行油脂发酵，结果表明一个 3.5% 的盐度能够产生更高的油脂产量，是淡水发酵的 1.36 倍，该盐度是大部分的工业废水和海水的盐度，非常典型。在 1.0% 盐度的水中获得了与淡水中相似的油脂产量。盐度为 6.0% 时油脂产量为 8.7 g/L，比淡水中降低了 64.0%。在淡水、1.0%、3.5% 盐度下的细胞形态没有明显变化，在 4.4% 和 6.0% 盐度细胞形态更多趋向于圆形。一个典型的盐度更利于 *T. cutaneum* 生产油脂，但盐度超过某值后就会抑制细胞的生长与油脂积累。

(5) 在高盐条件下发现一个重要的现象，即 *T. cutaneum* MP11 的发酵后的样品经过夜放置后大部分细胞会漂浮在培养液上层。该现象在工业生产中是非常有利的，可以降低细胞分离成本，进而降低油脂生产的成本投入。

第 3 章 皮状丝孢酵母在含盐废水中的油脂发酵

3.1 引言

除了丰富的海水资源外，还有另外一部分工业废水也具有高盐度的特点。工业废水来源广泛，如制药、制革厂、纺织厂、石油、石化、海水养殖等行业产生的废水。另外，工业含盐废水含有许多污染物，特别是重金属、有机污染物等有害物质^[136-138]，必须经过处理才能进行排放。废水的排放标准不断增高，含盐废水处理显得越来越重要，到目前为止，已经开发出各种技术来处理高盐工业废水。生物、物理化学技术正逐步应用于工业含盐废水的处理。

其中苯酚是各种工业废水中最常见的有机污染物之一^[139]，具有相当的稳定性与难降解性^[140]。对苯酚的去除有吸附、氧化等有效的处理方法，然而，它们往往存在严重的缺点。这些技术大多不会降解苯酚，而是将其转移到另一阶段，从而导致有害副产品的形成，造成二次污染。生物降解是最具有成本效益和可持续性的处理方法。因此，苯酚的生物处理正逐渐成为污染控制中的重要过程。此外，与物理化学方法相比，生物降解法去除苯酚是普遍首选的方法，因为苯酚有可能被完全降解，使有毒化合物完全转化为无毒的代谢产物。

真菌在芳香族化合物的降解中有着重要的作用，多项研究表明，不同的真菌都具有酚类物质降解的能力。它们能够通过酶的机制消耗多种碳源，从而为苯酚等芳香族衍生物的代谢提供了可能。废水中酚类物质的浓度最高可达 10,000 mg/L，而微生物耐受苯酚的能力因菌种而异。关于处理苯酚含盐废水的大部分研究都集中于生物降解^[120, 141]，也有一些研究报道过利用苯酚含盐废水作为培养介质进行油脂生产^[142, 143]，但在苯酚存在下油脂产量较低。皮状丝孢酵母是环境微生物，对恶劣条件的适应性强，能够耐受木质纤维素来源的酚醛抑制物，如丁香醛、4-羟基苯甲醛等。因此，本章节以 *T. cutaneum* MP11 为研究对象，研究其对苯酚的耐受性以及含酚高盐废水中的油脂生产能力。首先进行了皮状丝孢酵母的苯酚耐受性实验，探究其最高能够耐受的苯酚浓度。其次，将 *T. cutaneum* MP11 在含有初始浓度为 3.5% NaCl 和 1,000 mg/L 苯酚的培养基中进行油脂发酵，观察其细胞形态。最后，尝试在其他含盐工业废水中进行油脂发酵（自制四环素高盐水与工业榨菜废水），扩大 *T. cutaneum* MP11 在高盐水体体系下生产油脂的应用范围。

3.2 实验材料与方法

3.2.1 菌种与培养基

T. cutaneum MP11 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心（CGMCC，<http://www.cgmcc.net>），注册号为 20481。本实验所用的培养基如下。

(1) YPD 培养基: 10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 葡萄糖, 20 g/L 蛋白胨。

(2) YPD 平板: 10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 葡萄糖, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 琼脂

(3) 合成培养基: 60 g/L 葡萄糖, 2.0 g/L 磷酸二氢钾, 1.0 g/L 酵母提取物, 1.0 g/L 七水硫酸镁, 0.44 g/L 硫酸铵。

(4) 上罐发酵培养基: 150 g/L 葡萄糖, 2.0 g/L 磷酸二氢钾, 1.0 g/L 酵母提取物, 1.0 g/L 七水硫酸镁, 0.44 g/L 硫酸铵, 35 g/L 氯化钠。

3.2.2 水样与试剂

苯酚母液配制: 称取 2.5 g 的苯酚于容量瓶中用去离子水定容至 50 mL, 0.22 μm 的滤膜过滤除菌, 制作成 50 g/L 苯酚溶液备用。苯酚高盐废水由 35 g/L 氯化钠和过滤除菌后的苯酚配制而成。葡萄糖母液: 称取 85 g 葡萄糖配置成 100 mL。榨菜废水取自四川吉香居食品厂。配制 1 mg/mL 四环素母液, 过滤除菌后避光放置在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下。

蛋白胨、酵母提取物和葡萄糖标准溶液供应商详见 2.2.2。葡萄糖、苯酚和其他所有的分析级化学品购买自上海泰坦科技有限公司。

3.2.3 种子培养

方法详见 2.2.3。

3.2.4 微生物油脂发酵

苯酚耐受性探究与四环素油脂发酵实验均在摇瓶中进行。苯酚含盐废水与榨菜废水的微生物油脂发酵实验在 3 L 发酵罐中进行。苯酚含盐废水发酵: 在发酵开始前先向发酵罐中添加培养基, 然后按照所需浓度添加过滤除菌后的苯酚母液, 搅拌均匀后加入活化后的种子液 (10%, v/v)。具体发酵条件详见 2.2.4。

3.2.5 葡萄糖、细胞生长的测定

测定方法详见 2.2.8。

3.2.6 微生物油脂提取

微生物油脂提取的具体方法参见 2.2.9。

3.2.7 高效液相色谱 (HPLC) 分析

苯酚浓度使用 HPLC (岛津, 日本) 进行分析。检测器为 SPD-20A 型 UV/Vis 紫外检测器, C18 柱 (YMC-Pack ODS-A, 150 mm \times 4.6 mm) 为固定相, 以 70% 乙腈和 30% 超纯水为流动相, 流速为 1 mL/min。注射样品的体积为 20 μL , 柱温维持在 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 270 nm^[144]。样品经过 0.22 μm 的滤膜过滤然后稀释至合适的浓度。

3.3 结果和讨论

3.3.1 皮状丝孢酵母的苯酚耐受性

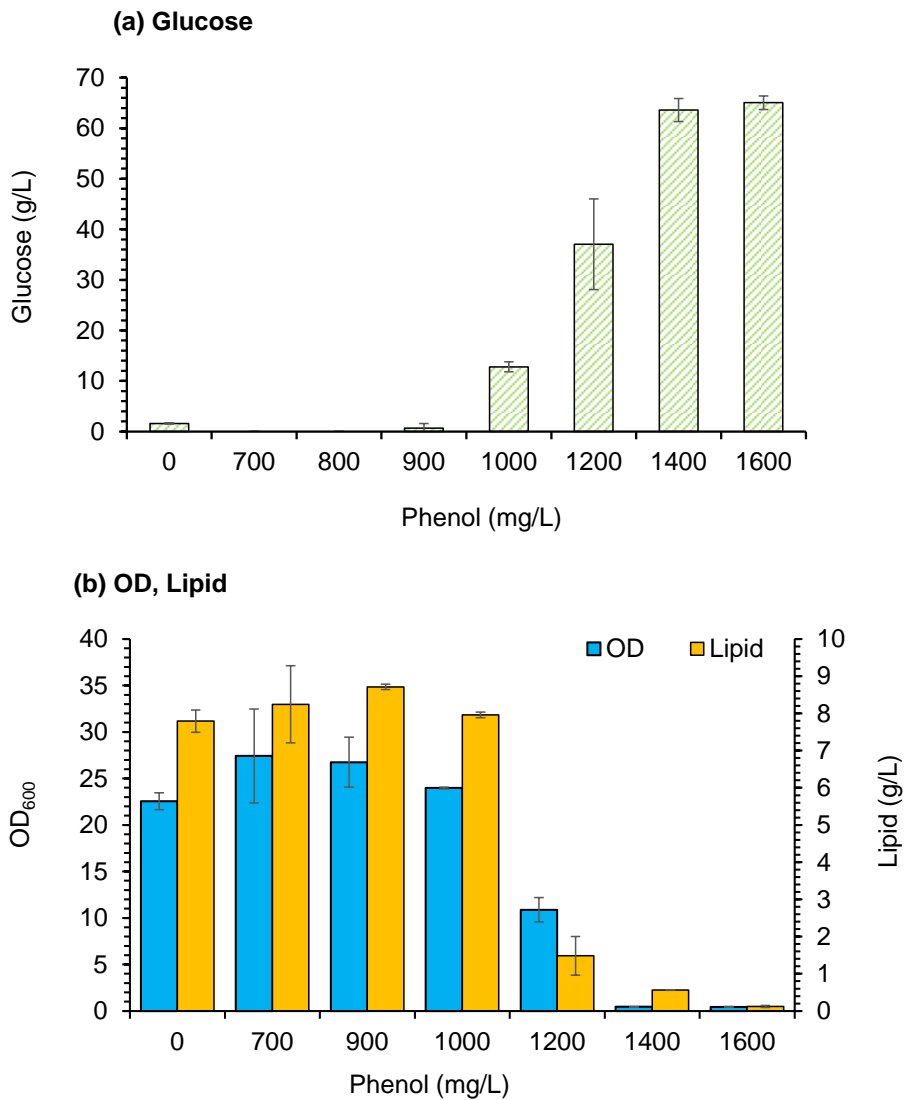


图 3.1 *T. cutaneum* MP11 在 3.5% 盐度条件下的苯酚耐受性研究

Fig. 3.1 Phenol tolerance of *T. cutaneum* MP11 at 3.5% salinity

T. cutaneum MP11 的苯酚耐受性实验在摇瓶中进行。培养条件：30 °C，182 rpm，5 d，接种量 10%。不加苯酚的 3.5% 盐度的培养基作为对照组。在摇瓶中分别加入苯酚母液 700 μL、800 μL、900 μL、1,000 μL、1,200 μL、1,400 μL 和 1,600 μL 来制备含有 700 mg/L、800 mg/L、900 mg/L、1,000 mg/L、1,200 mg/L、1,400 mg/L 和 1,600 mg/L 苯酚的培养基。

苯酚对细胞是有毒性的，会严重抑制其生长。不同微生物对苯酚的耐受性不同，据报道微生物能够耐受的最高苯酚浓度为 2,250 mg/L^[145]。通过 2.3.4 中的研究结果可知，与其他盐度相比，*T. cutaneum* MP11 在典型盐度 3.5% 下的油脂产量较高。因此，本研究探究 *T. cutaneum* MP11 在典型盐度胁迫下的苯酚耐受性。实验结果如图 3.1 所示，从结果中可以看出，1,000 mg/L 以下的苯酚浓度对细胞生长、油脂积累量几乎无负面作用，

但苯酚在 1,000 mg/L 时葡萄糖有少量剩余。初始苯酚浓度为 1,200 mg/L 时对细胞有显著影响，油脂产量显著降低。在 1,200 mg/L 的苯酚存在下，发现有一组平行试验在培养 120 h 后细胞生长状况差异明显，可能不同的接种量对该油脂酵母耐受苯酚的能力有影响。细胞在 1,400 mg/L 苯酚下无生长量，无油脂积累。从结果可知，*T. cutaneum* MP11 在典型盐度条件下能够耐受 1,000 mg/L 的苯酚浓度。

3.3.2 皮状丝孢酵母在含酚高盐水中的油脂发酵

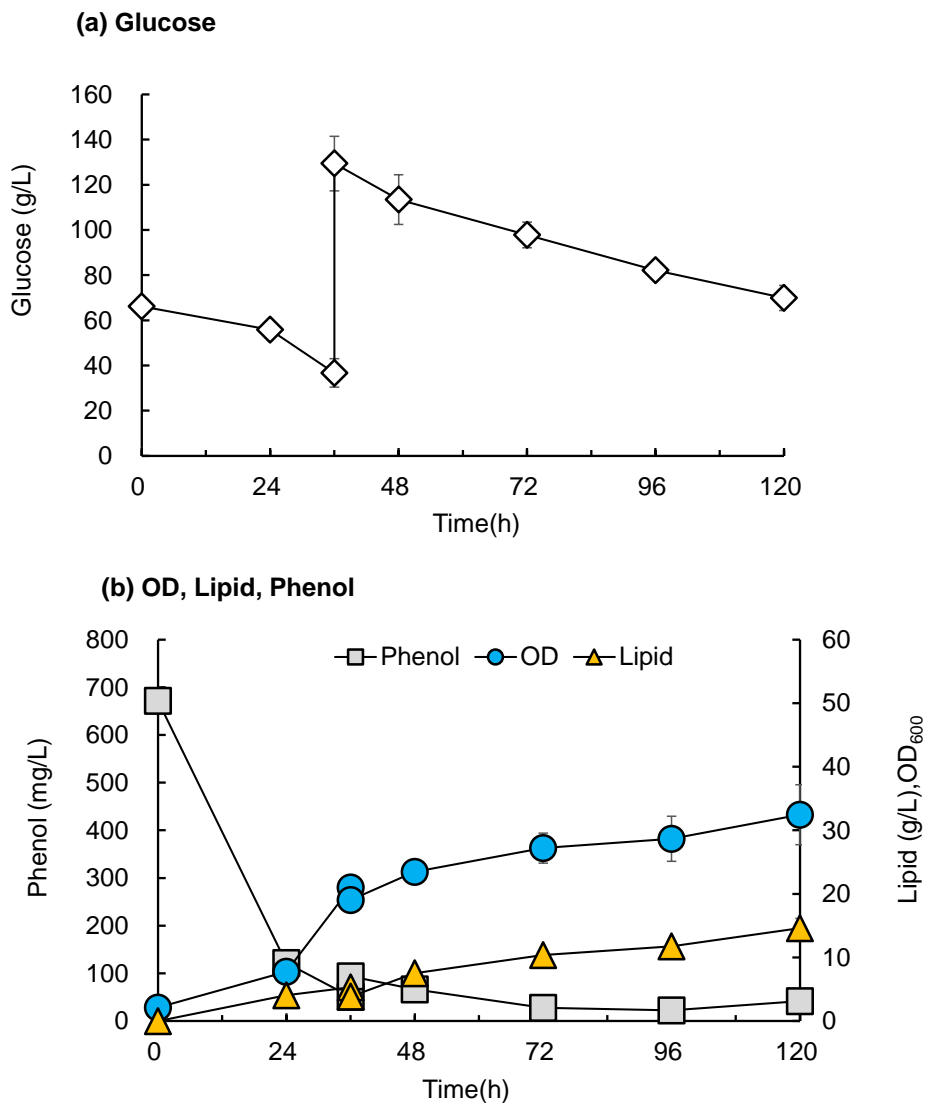


图 3.2 *T. cutaneum* MP11 在含酚高盐废水的油脂发酵

Fig. 3.2 Lipid fermentation of *T. cutaneum* MP11 under phenol containing salinr water

T. cutaneum MP11 的油脂发酵在 3 L 生物反应器中进行，发酵条件：30 °C，450 rpm，5 d，pH 控制在 5.0，通气量 1 vvm，接种量 10% (v/v)，发酵体系 800 mL。培养基成分：60 g/L 葡萄糖，35 g/L 氯化钠，1,000 mg/L 苯酚，其他成分与发酵培养基一样。发酵 36 h 补加葡萄糖母液。每个盐度条件下均进行一次重复实验，以上数值为两次发酵结果的平均值。

由以上结果可知, *T. cutaneum* MP11能够耐受1,000 mg/L的苯酚。因此, 将*T. cutaneum* MP11在1,000 mg/L的苯酚浓度和典型盐度下进行油脂发酵。本研究发现当葡萄糖的初始浓度为150 g/L, 发酵72 h后未见细胞生长。分析原因可能是培养基中渗透压过高, 加上苯酚和高盐的胁迫压力, 对细胞的毒害作用大。因此, 后续实验尝试降低初始葡萄糖的浓度, 在发酵过程中再补加葡萄糖, 考察*T. cutaneum* MP11在含酚高盐水中的油脂发酵能力。

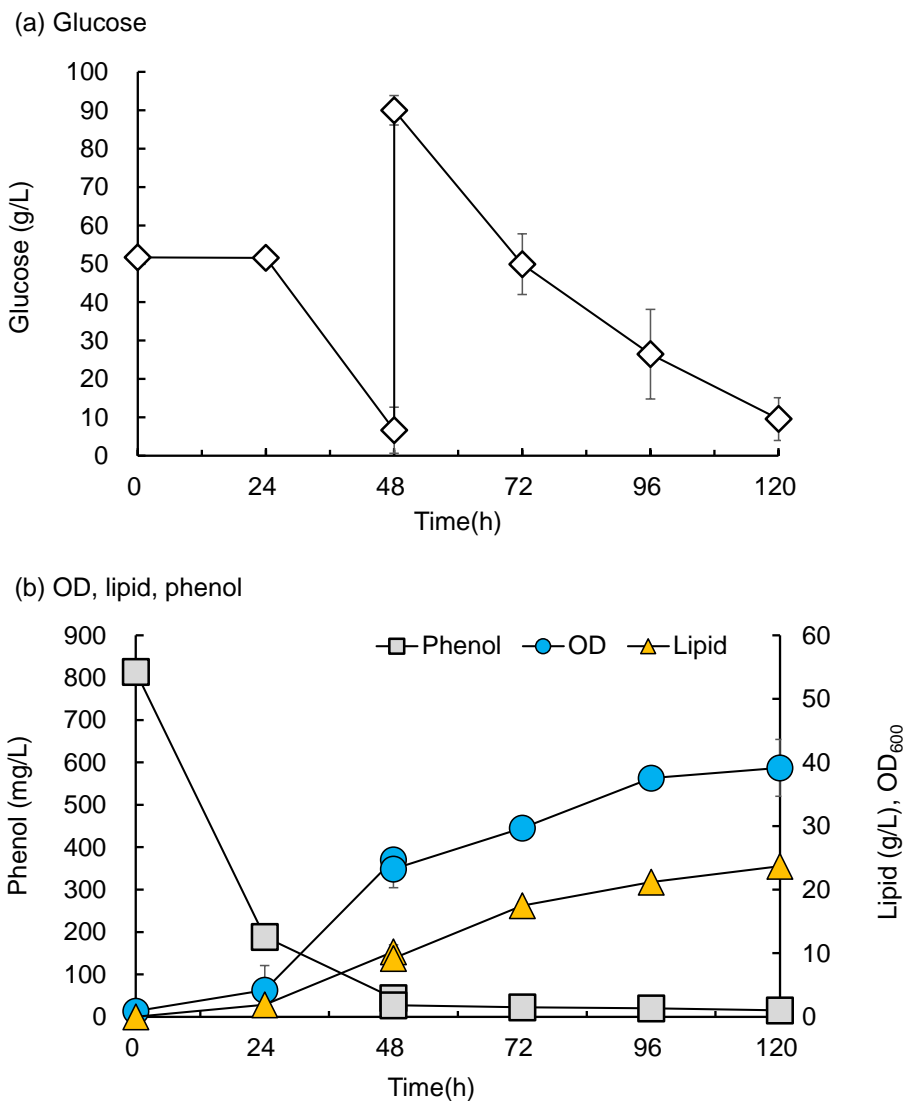


图 3.3 *T. cutaneum* MP11 在含酚高盐废水的油脂发酵

Fig. 3.3 Lipid fermentation of *T. cutaneum* MP11 under phenol containing salinr water

T. cutaneum MP11 在培养 48 h 后添加葡萄糖母液使总糖浓度达到 150 g/L, 按 1.0 g/L 补加酵母提取物。其它发酵条件和操作与图 3.2 中所描述的相同。每个盐度条件下均进行一次重复实验, 以上数值为两次发酵结果的平均值。

初始糖浓度与摇瓶发酵的糖浓度（60 g/L）保持一致，*T. cutaneum* MP11在培养24 h后细胞开始逐渐生长，因此在培养36 h时补加葡萄糖母液，使其达到150 g/L的葡萄糖水平。发酵结果如图3.2所示，*T. cutaneum* MP11在发酵的前24 h苯酚被快速降解，约82%的苯酚在该阶段被降解，之后降解缓慢，可能加入过多的葡萄糖抑制了苯酚的降解。发酵24 h之后细胞快速生长，到36 h时OD值达到了21.0。添加葡萄糖后，细胞并没有如24-36 h的快速生长趋势。油脂产量在36 h后一直在持续积累，但*T. cutaneum* MP11发酵5天后最终仅获得14.6 g/L的油脂产量。从图3.2中可以看出发酵结束后还有70 g/L的葡萄糖残留。与上一章节2.3.4中的淡水发酵结果（23.3 g/L）相比，油脂产量降低了37.3%，可能由于苯酚的存在抑制了细胞的油脂生产。

上述发酵结果并不理想，发酵结束后有大量残糖，细胞生长缓慢。根据发酵趋势图，考虑到可能的原因如下。发酵36 h时，培养基中还有将近一半的葡萄糖未被消耗，此时再添加葡萄糖对细胞的冲击力还是较大，外部环境的渗透压增加可能影响了细胞生长。第二个原因可能是前期绝大部分碳源用于细胞生长，造成氮源消耗殆尽，不能保持适宜的碳氮比不利于细胞生长与油脂积累。针对以上两个问题，采取以下策略，即在发酵48 h后再补加葡萄糖，在补加葡萄糖的同时补加氮源。发酵结果如图3.3所示，*T. cutaneum* MP11不仅实现了油脂积累而且降解了约800 mg/L的苯酚，其最终油脂产量达到23.6 g/L，与不添加苯酚的淡水发酵结果相似。

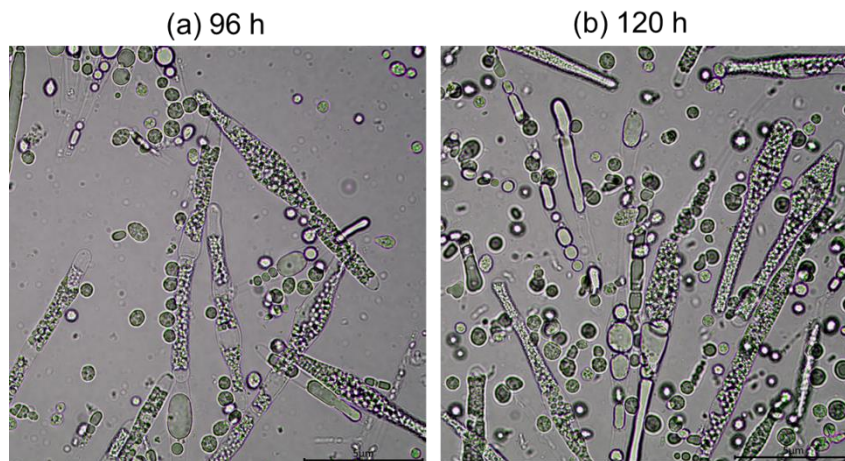


图3.4 *T. cutaneum* MP11在苯酚高盐水介质中的细胞形态

Fig. 3.4 Cell morphology of *T. cutaneum* MP11 under phenol containing saline medium

T. cutaneum MP11在3 L生物反应器中分别发酵 (a) 96 h 和 (b) 120 h 后观察细胞形态。

T. cutaneum MP11在苯酚高盐水中的细胞形态如图3.4所示。细胞形态存在球状和棒状两种状态。与2.3.4中的淡水或不同盐度的水中培养的细胞相比，在苯酚存在下，*T. cutaneum* MP11出现更多的球状。可见苯酚对细胞形态造成影响，使细胞变小，甚至高

浓度直接杀死细胞。这也是在苯酚含盐废水中的油脂产量低于相同盐度无苯酚添加条件下的原因。

3.3.3 皮状丝孢酵母在其他含盐废水中的油脂发酵

为了拓展 *T. cutaneum* 在其他含盐有机废水的应用范围, 本研究尝试在实际的工业榨菜废水和含有四环素的盐水中进行油脂发酵。

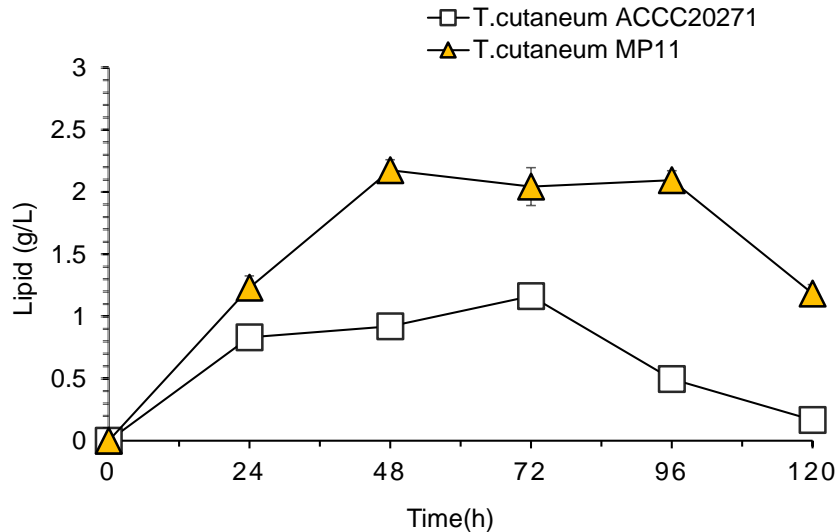


图 3.5 *T. cutaneum* 在榨菜废水中的油脂发酵

Fig. 3.5 Lipid fermentation of *T. cutaneum* in pickle waste water

T. cutaneum MP11 和 *T. cutaneum* ACCC20271 在榨菜废水中进行油脂发酵。发酵条件: 30 °C, 120 h, 450 rpm, 接种量 10%, 通气量 1vvm, pH 为 5.0。

本部分实验所用的榨菜废水盐度为 7.8%, 因盐度较高, 在发酵之前将榨菜废水稀释 2 倍。*T. cutaneum* MP11 在不额外添加糖和营养盐的榨菜废水中进行油脂发酵, 实验结果见图 3.5。*T. cutaneum* MP11 油脂产量在 48 h 达到最高, 为 2.2 g/L, 随后油脂积累量下降, 这可能因水中的可用碳源较少, 后续细胞开始消耗油脂。*T. cutaneum* ACCC20271 表现出了相同的趋势, 只是其油脂产量并没有 *T. cutaneum* MP11 高, 油脂积累量在 72 h 达到最高 (1.2 g/L)。在榨菜废水中的油脂发酵表明, 尽管 *T. cutaneum* 的油脂产量不高, 但其可以利用榨菜废水中的有机物进行生长。

制药废水中残留部分抗生素, 虽然浓度不高, 但经过长时间积累可能会出现抗生素的富集现象。另外, 抗生素可能使细菌产生耐药性, 对环境以及人类的健康造成威胁。本研究尝试用含有抗生素的高盐废水进行油脂发酵。该实验所用的抗生素为四环素, 是一类被广泛使用且用量比较大的抗生素。将 *T. cutaneum* MP11 在四环素废水(典型盐度)中进行油脂发酵, 结果如图 3.6 所示。与对照相比, 培养基中的四环素浓度在 50-250 mg/L 的范围内对 *T. cutaneum* MP11 的生长与油脂生产并没有产生影响。出现该现象的原因可

能是四环素对该油脂酵母并没有抑制作用，其主要抑制细菌的生长。另外废水中的抗生素浓度一般都达不到 200 mg/L，因此后续并没有选择某个抗生素浓度进行油脂上罐发酵。该结果也表明 *T. cutaneum* 适用于在四环素废水进行油脂发酵，也可拓展到其他对真菌没有影响的抗生素废水中。

综上所述，*T. cutaneum* MP11 具有在实际高盐有机废水中进行油脂生产以及某些有机污染物降解的潜能，可以减轻水处理成本，展示出了其利用含盐有机废水代替淡水进行微生物油脂的可能性。

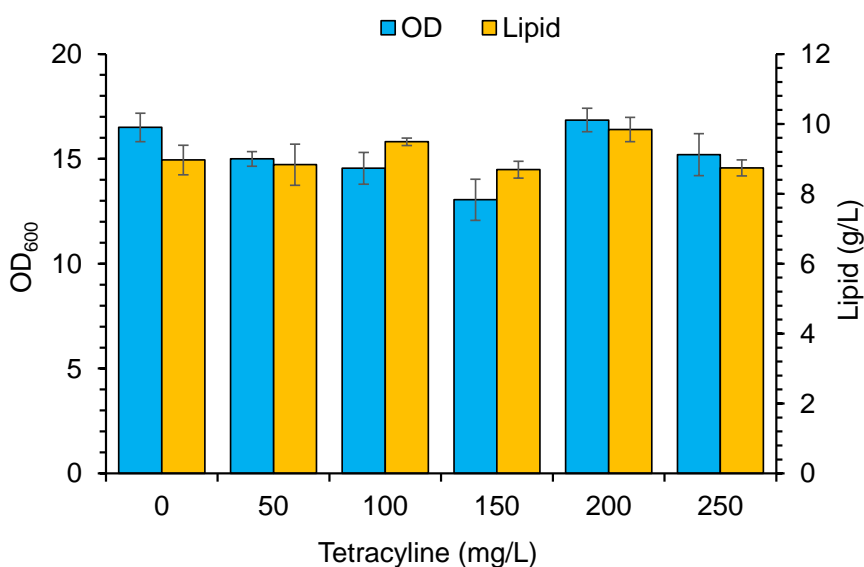


图 3.6 *T. cutaneum* MP11 在四环素含盐水中的油脂发酵

Fig. 3.6 Lipid fermentation of *T. cutaneum* MP11 under tetracycline containing saline water

3.4 本章小结

大部分工业废水具有高盐度的特点，如制药、制革、石油、石化厂。除了高盐度之外，也含有其他的有机污染物、重金属等。苯酚作为工业废水的主要有机污染物之一，对细胞具有严重的抑制作用。本章节主要研究含苯酚高盐废水对 *T. cutaneum* MP11 的油脂生产能力的影响。另外也考察了 *T. cutaneum* MP11 在其他含盐工业废水（自制四环素废水和工业榨菜废水）中的油脂生产能力。主要的研究结论如下。

(1) *T. cutaneum* MP11 能够在含有初始浓度为 1,000 mg/L 的苯酚和典型盐度的培养基中生长。苯酚浓度在 1,000 mg/L 以下时，*T. cutaneum* MP11 的生长与油脂产量并没有受到影响，与不添加苯酚的对照相似。

(2) *T. cutaneum* MP11 在 3 L 生物反应器中进行油脂发酵，考察其在初始浓度为 1,000 mg/L 的苯酚和典型盐度条件下的油脂生产能力。初始糖添加量为 150 g/L，发酵

72 h 还未见细胞生长, 考虑可能原因是细胞外渗透压高加上苯酚的抑制作用。随后调整初始糖添加量为 60 g/L, 在发酵 36 h 时再添加葡萄糖, 此时细胞已经开始生长。但是发酵结果仍然不理想, 前 48 h 细胞生长缓慢, 发酵 120 h 还有葡萄糖未被消耗。猜想可能是此时的渗透压还较高, 大部分氮源可能前期被消耗用于细胞生长。因此, 调整为发酵 48 h 后补加葡萄糖, 同时补加氮源。最终油脂产量达到 23.6 g/L, 与不添加苯酚的淡水下发酵结果相似。苯酚的添加的确影响了细胞的生长, 使其对发酵条件要求更高。

(3) 为了验证 *T. cutaneum* MP11 在其他的高盐工业废水中的广泛应用, 本研究尝试将其培养在工业榨菜废水中, 最后也尝试在含有四环素高盐水中发酵。*T. cutaneum* MP11 能够在不添加任何碳源、氮源和营养盐的榨菜废水生长, 并且能够积累 2.2 g/L 的油脂, 为榨菜废水的处理减轻了负担。*T. cutaneum* MP11 在四环素废水中进行摇瓶发酵, 发现四环素对其生长与油脂生产均无负面影响。以上结果表明 *T. cutaneum* MP11 具有在高盐废水中生产油脂的潜力。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

微生物油脂是生产航空燃料和生物柴油的最佳原料。微生物油脂的生产得到了广泛研究。产油酵母因为细胞生长快，油脂含量高，可利用各种发酵底物而成为油脂生产的主力。然而，微生物油脂发酵需要大量的淡水输入，增加用水负担以及后续的废水处理压力。丰富的海水资源与工业含盐废水尚未用于大规模的油脂生产。该高盐水资源的利用对微生物的要求高，首要条件就是需要其具有耐受高盐胁迫的能力。另外，工业废水含有有机污染物，重金属等有害物质，毒性大，这就要求微生物需要具有解毒机制或毒性耐受能力，如芳烃族降解能力，重金属的吸附作用等。*T. cutaneum* 可以降解木质纤维素来源的抑制物如丁香醛、4-羟基苯甲醛等。因此，本研究以 *T. cutaneum* ACCC20271 和高产油脂菌株 *T. cutaneum* MP11 为研究对象，研究它们在海水和工业含盐废水中的耐盐性能与油脂生产能力。本研究的主要内容与结论如下。

(1) 首先通过长期的适应性进化探究皮状丝孢酵母对氯化钠的耐受能力。通过细胞形态、生长状况与胞内钠离子浓度可知 *T. cutaneum* 能够耐受高达 13.0% NaCl，具有非常高的盐耐受能力。

(2) 在海水中添加氯化钠制备几种常见盐度（1.0%、3.5%、4.4%、6.0%）的水介质。将 *T. cutaneum* ACCC20271 在以上几种盐度下进行油脂发酵。结果表明 3.5% 及以下盐度的细胞生长、油脂生产与在淡水中培养的产量相差不大，油脂产量在 6-7 g/L 左右。但盐度在 4.4% 和 6.0% 下，细胞生长与油脂积累受到影响，尤其在 6.0% 盐度下该酵母细胞的油脂产量下降了 55.5%。考虑到原始菌株 *T. cutaneum* ACCC20271 产油性能不高，不利于工业化生产，因此尝试通过适应性进化与超离心筛选相结合的方法在 4.0% NaCl 条件下筛选优良的油脂生产菌株。该油脂酵母细胞经过 44 次超离心筛选，油脂产量并没有提高。可能由于存在高盐胁迫，此方法并不能有效地提高该油脂酵母的油脂产量。

(3) 在高盐条件下进行超离心筛选高油脂含量的细胞行不通，那么尝试另一种途径。即利用在淡水条件下已通过超离心筛选得到的菌株 *T. cutaneum* MP11 进行油脂发酵。*T. cutaneum* MP11 在不同盐度条件下的油脂发酵结果表明，在 1.0% 盐度的水中获得了与淡水中相似的油脂产量。3.5% 盐度能够产生更高的油脂产量，是淡水发酵的 1.36 倍。盐度为 4.4% 和 6.0% 时油脂产量显著降低。与淡水中的细胞相比，在 1.0%、3.5% 盐度下的细胞形态没有明显变化，4.4% 和 6.0% 盐度下细胞形态更多趋向于圆形。

(4) *T. cutaneum* 能够在初始浓度为 1,000 mg/L 的苯酚和 3.5% 盐度的培养基中生长。随后考察 *T. cutaneum* MP11 在含有苯酚和高盐的培养基中进行油脂生产能力。结果发现初始糖添加量为 150 g/L，发酵 72 h 还未见细胞生长。随后调整初始糖添加量为 60

g/L, 在培养 36 h 时再添加葡萄糖, 但是发酵结果不理想, 发酵 120 h 后还有葡萄糖未被消耗。调整葡萄糖的补加时间(发酵 48 h 时), 同时补加氮源。最终油脂产量达到 23.6 g/L, 与不添加苯酚的淡水介质中发酵结果相似。

(5) *T. cutaneum* 能够在不添加任何碳源、氮源和营养盐的榨菜废水生长, 并且可积累 1-2 g/L 的油脂。另外也考察了 *T. cutaneum* 在四环素废水的油脂生产, 发现四环素对其无影响。该结果表明 *T. cutaneum* 具有在高盐废水中生产油脂的潜力。

(6) 在高盐条件下发现一个重要的现象, 即 *T. cutaneum* MP11 的发酵后的样品经过过夜放置大部分细胞会漂浮在培养液上层。该现象在工业生产中是非常有利的, 可以降低细胞分离成本, 进而降低油脂生产的成本投入。

4.2 展望

目前的微生物油脂生产是在淡水中进行, 用水量大, 造成用水负担。为了能够减轻用水压力及水处理成本, 本论文主要研究了 *T. cutaneum* 在海水和工业含盐废水的油脂发酵。研究发现皮状丝孢酵母能够在实际海水体系中生产油脂, 盐度一定程度上促进了油脂生产。*T. cutaneum* 能够在含有苯酚的高盐水介质中生长, 也获得了不错的油脂生产量。另外, *T. cutaneum* 也能在榨菜废水和含有四环素废水中进行油脂生产。但研究中也出现一些未解决的问题, 需要对其进行进一步研究或改进。

(1) *T. cutaneum* 能够耐受 13.0% NaCl, 具有高盐耐受性。可进一步研究其耐盐机制, 通过分子手段将相关基因运用到其他微生物中, 增加其他微生物的盐耐受性。

(2) 本文发现 3.5% 盐度更有利于油脂的积累, 有研究者发现其他产油微生物是因为盐胁迫改变了碳代谢流, 使其更容易流向油脂生成的代谢途径。可通过转录组以及代谢组来进一步确认 *T. cutaneum* 在该盐度下的基因与代谢通路的变化。

(3) *T. cutaneum* 在高盐水中进行发酵, 但不可避免会产生高盐废水, 该高盐废水可能会加重水处理的负担。后续需要研究该过程产生的高盐废水是否能够回用至油脂发酵过程中以实现高盐水的循环利用。因其高盐度下 *T. cutaneum* 细胞能够漂浮在发酵液上面, 也可通过收集上层细胞, 向培养基中继续添加碳源、氮源实现在高盐条件下的连续发酵过程。

(4) 本文发现皮状丝孢酵母能够在含有苯酚的高盐水介质中实现良好的油脂生产。*T. cutaneum* 是否能够利用苯酚为碳源, 将其碳代谢流向油脂生成途径并不清楚。后续可通过检测苯酚代谢的中间产物来验证苯酚是通过间裂解还是邻位裂解来实现降解。因苯酚的降解对发酵条件有一定的要求, 可进行发酵的条件的优化以期获得更高的油脂产量。

(5) 本文只考察了 *T. cutaneum* 在榨菜废水中的油脂生产能力, 可知其能够利用该废水中的有机物进行油脂生产。可是, 并没有详细研究其对废水的生物处理能力, *T. cutaneum* 是否能够将该废水中的有机物, 氨氮化合物, 有色物质降解完全, 如果不能其

降解程度又如何。后续可测定该油脂酵母处理后的 BOD、COD 以及其他指标，考察其生物处理该废水的可行性。若可行，则可考虑连续发酵过程，截留细胞使处理后的废水排放出来，然后进入未处理的废水，该过程可以降低水处理成本并且生产一定的油脂。

参考文献

- [1] Li Q, Du W, Liu DH. Perspectives of microbial oils for biodiesel production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 80(5):749-756.
- [2] Meng X, Yang JM, Xu X, et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms[J]. *Renewable Energy*. 2009, 34(1):1-5.
- [3] Antolin G, Tinaut FV, Briceno Y, et al. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification[J]. *Bioresource Technology*. 2002, 83(2):111-114.
- [4] Marchetti JM. The effect of economic variables over a biodiesel production plant[J]. *Energy Conversion and Management*. 2011, 52(10):3227-3233.
- [5] Chen CY, Lee MH, Leong YK, et al. Biodiesel production from heterotrophic oleaginous microalga *Thraustochytrium* sp. BM2 with enhanced lipid accumulation using crude glycerol as alternative carbon source[J]. *Bioresource Technology*. 2020, 306:123113.
- [6] Chi ZY, Pyle D, Wen ZY, et al. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation[J]. *Process Biochemistry*. 2007, 42(11):1537-1545.
- [7] Jin C, Huang Z, Bao J. High-Titer glutamic acid production from lignocellulose using an engineered *Corynebacterium glutamicum* with simultaneous co-utilization of xylose and glucose[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020, 8(16):6315-6322.
- [8] Gao QQ, Cui ZY, Zhang J, et al. Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*[J]. *Bioresource Technology*. 2014, 152:552-556.
- [9] Yen HW, Liao YT, Liu YX. Cultivation of oleaginous *Rhodotorula mucilaginosa* in airlift bioreactor by using seawater[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 121(2):209-212.
- [10] Fang CJ, Thomsen MH, Brudecki GP, et al. Seawater as alternative to freshwater in pretreatment of date palm residues for bioethanol production in coastal and/or arid areas[J]. *Chemoschem*. 2015, 8(22):3823-3831.
- [11] Xue FY, Zhang X, Luo H, Tan TW. A new method for preparing raw material for biodiesel production[J]. *Process Biochemistry*. 2006, 41(7):1699-1702.
- [12] Cho HU, Park JM. Biodiesel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes[J]. *Bioresource Technology*. 2018, 256:502-508.
- [13] Alvarez HM, Steinbuchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 60(4):367-376.

- [14] Alvarez HM, Souto MF, Viale A, et al. Biosynthesis of fatty acids and triacylglycerols by 2,6,10,14-tetramethyl pentadecane-grown cells of *Nocardia globerula* 432[J]. FEMS Microbiology Letters. 2001, 200(2):195-200.
- [15] Tomas-Pejo E, Morales-Palomo S, Gonzalez-Fernandez C. Microbial lipids from organic wastes: outlook and challenges[J]. Bioresource Technology. 2021, 323:124612..
- [16] Alvarez HM, Herrero OM, Silva RA, et al. Insights into the metabolism of oleaginous *Rhodococcus* spp[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2019, 85(18):12.
- [17] Wells T, Wei Z, Ragauskas A. Bioconversion of lignocellulosic pretreatment effluent via oleaginous *Rhodococcus opacus* DSM 1069[J]. Biomass & Bioenergy. 2015, 72:200-205.
- [18] Wei Z, Zeng GM, Huang F, et al. Bioconversion of oxygen-pretreated Kraft lignin to microbial lipid with oleaginous *Rhodococcus opacus* DSM 1069[J]. Green Chemistry. 2015, 17(5):2784-2789.
- [19] Xu L, Wang L, Zhou XR, et al. Stepwise metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce triacylglycerol rich in medium-chain fatty acids[J]. Biotechnology for Biofuels. 2018, 11(1):177.
- [20] Plassmeier J, Li YY, Rueckert C, et al. Metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce triacylglycerols[J]. Metabolic Engineering. 2016, 33:86-97.
- [21] Rios LF, Klein BC, Luz LF, et al. Nitrogen Starvation for Lipid Accumulation in the Microalga Species *Desmodesmus* sp[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2015, 175(1):469-476.
- [22] Smetana S, Sandmann M, Rohn S, et al. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment[J]. Bioresource Technology. 2017, 245:162-170.
- [23] Miao XL, Wu QY. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil[J]. Bioresource Technology. 2006, 97(6):841-846.
- [24] Gao CF, Zhai Y, Ding Y, et al. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*[J]. Applied Energy. 2010, 87(3):756-761.
- [25] Prakash RM, Trishnamoni G, Nikunj S. Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application[J]. Online Journal of Biological Sciences. 2015, 15(4):260-267.
- [26] Fakas S, Papanikolaou S, Batsos A, et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*[J]. Biomass & Bioenergy. 2009, 33(4):573-580.

- [27] Gao DF, Zeng JJ, Zheng YB, et al. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*[J]. *Bioresource Technology*. 2013, 133:315-321.
- [28] Zhang Y, Song YD. Lipid accumulation by xylose metabolism engineered *Mucor circinelloides* strains on corn straw hydrolysate[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2021, 193(3):856-868.
- [29] Kumar AK, Vatsyayan P, Goswami P. Production of lipid and fatty acids during growth of *Aspergillus terreus* on hydrocarbon substrates[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 160(5):1293-1300.
- [30] Dedyukhina EG, Chistyakova TI, Mironov AA, et al. Arachidonic acid synthesis from biodiesel- derived waste by *Mortierella alpina*[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2014, 116(4):429-437.
- [31] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production[J]. *Biochimie*. 2004, 86(11):807-815.
- [32] Aki T, Nagahata Y, Ishihara K, et al. Production of arachidonic acid by filamentous fungus, *Mortierella alliacea* strain YN-15[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 2001, 78(6):599-604.
- [33] Garay LA, Sitepu IR, Cajka T, et al. Eighteen new oleaginous yeast species[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2016, 43(7):887-900.
- [34] Carsanba E, Papanikolaou S, Erten H. Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2018, 38(8):1230-1243.
- [35] Goncalves FAG, Colen G, Takahashi JA. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry[J]. *Scientific World Journal*. 2014:14.
- [36] Ledesma-Amaro R, Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids[J]. *Progress in Lipid Research*. 2016, 61:40-50.
- [37] Xu P, Qiao KJ, Ahn WS, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016, 113(39):10848-10853.
- [38] Ledesma-Amaro R, Nicaud JM. Metabolic engineering for expanding the substrate range of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Trends in Biotechnology*. 2016, 34(10):798-809.
- [39] Chen X, Li ZH, Zhang XX, et al. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159(3):591-604.
- [40] Hu MS, Wang J, Gao QQ, et al. Converting lignin derived phenolic aldehydes into

- microbial lipid by *Trichosporon cutaneum*[J]. *Journal of Biotechnology*. 2018, 281:81-86.
- [41] Evans CT, Ratledge C. Possible regulatory roles of ATP:citrate lyase, malic enzyme, and AMP deaminase in lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS14[J]. *Canadian Journal of Microbiology*. 1985, 31:845–850.
- [42] Tang W, Zhang SF, Wang Q, et al. The isocitrate dehydrogenase gene of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is linked to lipid accumulation[J]. *Canadian Journal of Microbiology*. 2009, 55(9):1062-1069.
- [43] Muniraj IK, Uthandi SK, Hu Z, et al. Microbial lipid production from renewable and waste materials for second-generation biodiesel feedstock[J]. *Environmental Technology Reviews*. 2015, 4(1):1-16.
- [44] Ratledge C. The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems[J]. *Biotechnology Letters*. 2014, 36(8):1557-1568.
- [45] Tkachenko AF, Tigunova OA, Shulga SM. Microbial lipids as a source of biofuel[J]. *Cytology and Genetics*. 2013, 47(6):343-348.
- [46] Takaku H, Matsuzawa T, Yaoi K, et al. Lipid metabolism of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, 104(14):6141-6148.
- [47] Wu SG, Hu CM, Jin GJ, et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Bioresource Technology*. 2010, 101(15):6124-6129.
- [48] Zhao XB, Peng F, Du W, et al. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid[J]. *Bioprocess & Biosystems Engineering*. 2012, 35(6):993-1004.
- [49] Wynn JP, Hamid AA, Li YH, et al. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*[J]. *Microbiology-SGM*. 2001, 147(10):2857.
- [50] Jang HD, Lin YY, Yang SS. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*[J]. *Bioresource Technology*. 2005, 96(15):1633-1644.
- [51] Granger LM, Perlot P, Goma G, et al. Kinetics of growth and fatty acid production of *Rhodotorula glutinis*[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 1992, 37(1):13-17.
- [52] Somashekar D, Venkateshwaran G, Sambaiah K, et al. Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi[J]. *Process Biochemistry*. 2003, 38(12):1719-1724.

- [53] Angerbauer C, Siebenhofer M, Mittelbach M, et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production[J]. Bioresource Technology. 2008, 99(8):3051-3056.
- [54] Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production[J]. Progress in Lipid Research. 2009, 48(6):375-387.
- [55] Gutierrez A, Lopez-Garcia S, Garre V. High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation[J]. Journal of Microbiological Methods. 2011, 84(3):442-446.
- [56] Bandhu S, Bansal N, Dasgupta D, et al. Overproduction of single cell oil from xylose rich sugarcane bagasse hydrolysate by an engineered oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* IIP132[J]. Fuel. 2019, 254:10.
- [57] Liang MH, Jiang JG. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology[J]. Progress in Lipid Research. 2013, 52(4):395-408.
- [58] Lazar Z, Dulermo T, Neuveglise C, et al. Hexokinase-A limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*[J]. Metabolic Engineering. 2014, 26:89-99.
- [59] Blazeck J, Hill A, Liu LQ, et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production[J]. Nature Communications. 2014, 5:1-10.
- [60] Trentacoste EM, Shrestha RP, Smith SR, et al. Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013, 110(49):19748-19753.
- [61] Abatemarco J, Hill A, Alper HS. Expanding the metabolic engineering toolbox with directed evolution[J]. Biotechnology Journal. 2013, 8(12):1397-1410.
- [62] Fong SS, Burgard AP, Herring CD, et al. In silico design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid[J]. Biotechnology and bioengineering. 2005, 91(5):643-648.
- [63] Jiang LY, Chen SG, Zhang YY, et al. Metabolic evolution of *Corynebacterium glutamicum* for increased production of L-ornithine[J]. BMC Biotechnology. 2013, 13.
- [64] Smith KM, Liao JC. An evolutionary strategy for isobutanol production strain development in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering. 2011, 13(6):674-681.
- [65] Zhou SH, Alper HS. Strategies for directed and adapted evolution as part of microbial strain engineering[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2019, 94(2):366-376.
- [66] Winkler JD, Kao KC. Recent advances in the evolutionary engineering of industrial

- biocatalysts[J]. *Genomics*. 2014, 104(6):406-411.
- [67] Liu L, Pan A, Spofford C, et al. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*. 2015, 29:36-45.
- [68] Daskalaki A, Perdikouli N, Aggeli D, et al. Laboratory evolution strategies for improving lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103(20):8585-8596.
- [69] 卢敏萍. 高产油脂皮状丝孢酵母菌株的超离心筛选及机制分析[D]. 华东理工大学, 2020.
- [70] Bhatia SK, Gurav R, Choi TR, et al. Effect of synthetic and food waste-derived volatile fatty acids on lipid accumulation in *Rhodococcus* sp. YHY01 and the properties of produced biodiesel[J]. *Energy Conversion and Management*. 2019, 192:385-395.
- [71] Probst KV, Vadlani PV. Production of single cell oil from *Lipomyces starkeyi* ATCC 56304 using biorefinery by-products[J]. *Bioresource Technology*. 2015, 198:268-275.
- [72] Taskin M, Ortucu S, Aydogan MN, et al. Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29[J]. *Renewable Energy*. 2016, 99:198-204.
- [73] Liu LP, Zong MH, Hu Y, et al. Efficient microbial oil production on crude glycerol by *Lipomyces starkeyi* AS 2.1560 and its kinetics[J]. *Process Biochemistry*. 2017, 58:230-238.
- [74] Gao Z, Ma YQ, Wang QH, et al. Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by *Rhodospiridium toruloides* yeast 32489[J]. *Bioresource Technology*. 2016, 218:373-379.
- [75] Kalogirou SA. Seawater desalination using renewable energy sources[J]. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2005, 31(3):242-281.
- [76] Zaky AS, Tucker GA, Daw ZY, et al. Marine yeast isolation and industrial application[J]. *Fems Yeast Research*. 2014, 14(6):813-825.
- [77] Lin CSK, Luque R, Clark JH, et al. A seawater-based biorefining strategy for fermentative production and chemical transformations of succinic acid[J]. *Energy & Environmental Science*. 2011, 4(4):1471-1479.
- [78] Serra I, Guidi B, Burgaud G, et al. Seawater-based biocatalytic strategy: stereoselective reductions of ketones with marine yeasts[J]. *ChemCatChem*. 2016, 8(20):3254-3260.
- [79] Vo HNP, Ngo HH, Guo WS, et al. Microalgae for saline wastewater treatment: a critical review[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2020, 50(12):1224-1265.

- [80] Kubo M, Hiroe J, Murakami M, et al. Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2001, 91(2):222-224.
- [81] Guo N, Wang YK, Tong TZ, et al. The fate of antibiotic resistance genes and their potential hosts during bio-electrochemical treatment of high-salinity pharmaceutical wastewater[J]. *Water Research*. 2018, 133(APR.15):79-86.
- [82] Maharaja P, Mahesh M, Chitra C, et al. Sequential oxic-anoxic bio reactor for the treatment of tannery saline wastewater using halophilic and filamentous bacteria[J]. *Journal of Water Process Engineering*. 2017, 18:47-57.
- [83] Bhatia D, Sharma NR, Singh J, et al. Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2017, 47(19):1836-1876.
- [84] Mirbolooki H, Amirnezhad R, Pendashteh AR. Treatment of high saline textile wastewater by activated sludge microorganisms[J]. *Journal of Applied Research and Technology*. 2017, 15(2):167-172.
- [85] Jorfi S, Pourfadakari S, Ahmadi M. Electrokinetic treatment of high saline petrochemical wastewater: Evaluation and scale-up[J]. *Journal of Environmental Management*. 2017, 204:221-229.
- [86] Sundarapandiyani S, Chandrasekar R, Ramanaiah B, et al. Electrochemical oxidation and reuse of tannery saline wastewater[J]. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, 180(1-3):197-203.
- [87] Moussavi G, Barikbin B, Mahmoudi M. The removal of high concentrations of phenol from saline wastewater using aerobic granular SBR[J]. *Chemical Engineering Journal*. 2010, 158(3):498-504.
- [88] Ren LF, Adeel M, Li J, et al. Phenol separation from phenol-laden saline wastewater by membrane aromatic recovery system-like membrane contactor using superhydrophobic/organophilic electrospun PDMS/PMMA membrane[J]. *Water Research*. 2018, 135:31-43.
- [89] Juang RS, Huang WC, Hsu YH. Treatment of phenol in synthetic saline wastewater by solvent extraction and two-phase membrane biodegradation[J]. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, 164(1):46-52.
- [90] Lu J, Yan X, Ma YF, et al. Impact of salinity on treatment of saline wastewater by sequencing batch biofilm reactor process[J]. *Journal of Central South University*. 2014, 21(5):1989-1994.
- [91] Zaky AS, French CE, Tucker GA, et al. Improving the productivity of bioethanol

- production using marine yeast and seawater-based media[J]. *Biomass & Bioenergy*. 2020, 139.
- [92] Sabeela Beevi U, Sukumaran RK. Cultivation of the fresh water microalga *Chlorococcum* sp. RAP13 in sea water for producing oil suitable for biodiesel[J]. *Journal of Applied Phycology*. 2015, 27(1):141-147.
- [93] Dobrowolski A, Drzymala K, Rzechonek DA, et al. Lipid production from waste materials in seawater-based medium by the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 10:9.
- [94] Cai T, Park SY, Li Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013, 19:360-369.
- [95] Church J, Hwang JH, Kim KT, et al. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production[J]. *Bioresource Technology*. 2017, 243:147-153.
- [96] Shen QH, Gong YP, Fang WZ, et al. Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency[J]. *Bioresource Technology*. 2015, 193:68-75.
- [97] Srivastava G, Nishchal, Goud VV. Salinity induced lipid production in microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR_047)[J]. *Bioresource Technology*. 2017, 242:244-252.
- [98] BenMoussa-Dahmen I, Chtourou H, Rezgui F, et al. Salinity stress increases lipid, secondary metabolites and enzyme activity in *Amphora subtropica* and *Dunaliella* sp for biodiesel production[J]. *Bioresource Technology*. 2016, 218:816-825.
- [99] Nedbalova L, Strizek A, Sigler K, et al. Effect of salinity on the fatty acid and triacylglycerol composition of five haptophyte algae from the genera *Coccolithophora*, *Isochrysis* and *Prymnesium* determined by LC-MS/APCI[J]. *Phytochemistry*. 2016, 130:64-76.
- [100] Abou-Elela SI, Kamel MM, Fawzy ME. Biological treatment of saline wastewater using a salt-tolerant microorganism[J]. *Desalination*. 2010, 250(1):1-5.
- [101] Jiang Y, Yang K, Wang HY, et al. Characteristics of phenol degradation in saline conditions of a halophilic strain JS3 isolated from industrial activated sludge[J]. *Marine Pollution Bulletin*. 2015, 99(1):230-234.
- [102] Huang LH, Zhang B, Gao BY, et al. Application of fishmeal wastewater as a potential low-cost medium for lipid production by *Lipomyces starkeyi* HL[J]. *Environmental Technology*. 2011, 32(16):1975-1981.
- [103] Gunde-Cimerman N, Plemenitas A, Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms

- of the three domains of life to high salt concentrations[J]. *Fems Microbiology Reviews*. 2018, 42(3):353-375.
- [104] Yenush L. Potassium and sodium transport in yeast[J]. *Yeast Membrane Transport*. 2016, 892:187-228.
- [105] Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002, 66(2):300-372.
- [106] Clotet J, Posas F. Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast[J]. *Methods in Enzymology*. 2007, 428:63-76..
- [107] Melamed D, Pnueli L, Arava Y. Yeast translational response to high salinity: global analysis reveals regulation at multiple levels[J]. *Rna*. 2008, 14(7):1337-1351.
- [108] Posas F, Chambers JR, Heyman JA, et al. The transcriptional response of yeast to saline stress[J]. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275(23):17249-17255.
- [109] Yale J, Bohnert HJ. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity[J]. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276(19):15996-16007.
- [110] Zhang LJ, Pei HY, Chen SQ, et al. Salinity-induced cellular cross-talk in carbon partitioning reveals starch-to-lipid biosynthesis switching in low-starch freshwater algae[J]. *Bioresource Technology*. 2018, 250:449-456.
- [111] Tchakouteu SS, Kopsahelis N, Chatzifragkou A, et al. *Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media: Adaptation dynamics and lipid production[J]. *Engineering in Life Sciences*. 2017, 17(3):237-248.
- [112] Kilic NK. Enhancement of phenol biodegradation by *Ochrobactrum* sp isolated from industrial wastewaters[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009, 63(6):778-781.
- [113] Kumar A, Kumar S, Kumar S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194[J]. *Biochemical Engineering Journal*. 2005, 22(2):151-159.
- [114] Lika K, Papadakis IA. Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae[J]. *Journal of Sea Research*. 2009, 62(2-3):135-146.
- [115] Hsieh FM, Huang C, Lin TF, et al. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation[J]. *Process Biochemistry*. 2008, 43(1):83-92.
- [116] Stoilova I, Krastanov A, Yanakieva I, et al. Biodegradation of mixed phenolic compounds by *Aspergillus awamori* NRRL 3112[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2007, 60(4):342-346.

- [117] Mohd A. Presence of phenol in wastewater effluent and its removal: an overview[J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2020,1-23.
- [118] Alva VA, Peyton BM. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: Influence of pH and salinity[J]. Environmental Science & Technology. 2003, 37(19):4397-4402.
- [119] Zhou JY, Yu XJ, Ding C, et al. Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology[J]. Journal of Environmental Sciences. 2011, 23(1):22-30.
- [120] Liu H, Yu QJ, Wang GX, et al. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel yeast *Trichosporon montevidense* PHE1[J]. Process Biochemistry. 2011, 46(8):1678-1681.
- [121] Khleifat KA. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions[J]. Process Biochemistry. 2006, 41(9):2010-2016.
- [122] Li H, Meng FP, Duan WY, et al. Biodegradation of phenol in saline or hypersaline environments by bacteria: A review[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2019, 184:109658.
- [123] Kuang Y, Zhou Y, Chen ZL, et al. Impact of Fe and Ni/Fe nanoparticles on biodegradation of phenol by the strain *Bacillus fusiformis* (BFN) at various pH values[J]. Bioresource Technology. 2013, 136:588-594.
- [124] Chandrasekaran S, Pugazhendi A, Banu RJ, et al. Biodegradation of phenol by a moderately halophilic bacterial consortium[J]. Environmental Progress & Sustainable Energy. 2018, 37(5):1587-1593.
- [125] Rozich AF, Colvin RJ. Effects of glucose on phenol biodegradation by heterogeneous populations[J]. Biotechnology and bioengineering. 1986, 28(7):965-971.
- [126] Gao XC, Gao QQ, Bao J. Improving cellulosic ethanol fermentability of *Zymomonas mobilis* by overexpression of sodium ion tolerance gene ZMO0119[J]. Journal of Biotechnology. 2018, 282:32-37.
- [127] Fingerova H, Koplík R. Study of minerals and trace element species in soybean flour[J]. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry. 1999, 363(5-6):545-549.
- [128] Folch JM, Lee SSG, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. Journal of Biological Chemistry. 1957, 226(226):497-509.
- [129] Ren LF, Chen R, Zhang XF, et al. Phenol biodegradation and microbial community dynamics in extractive membrane bioreactor (EMBR) for phenol-laden saline

- wastewater[J]. *Bioresource Technology*. 2017, 244:1121-1128.
- [130] Song WL, Li ZP, Ding Y, et al. Performance of a novel hybrid membrane bioreactor for treating saline wastewater from mariculture: Assessment of pollutants removal and membrane filtration performance[J]. *Chemical Engineering Journal*. 2018, 331:695-703.
- [131] Jin YC, Fu JL, Chen RY, et al. Ammonium and phosphorus recovery and electricity generation from mariculture wastewater by the seawater battery[J]. *Energy Conversion and Management*. 2018, 160:396-402.
- [132] Lefebvre O, Vasudevan N, Torrijos M, et al. Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reactor[J]. *Water Research*. 2005, 39(8):1471-1480.
- [133] 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.
- [134] 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.
- [135] Ho SH, Nakanishi A, Kato Y, et al. Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp JSC4[J]. *Scientific Reports*. 2017, 7:1-11.
- [136] Yurtsever A, Calimlioglu B, Gorur M, et al. Effect of NaCl concentration on the performance of sequential anaerobic and aerobic membrane bioreactors treating textile wastewater[J]. *Chemical Engineering Journal*. 2016, 287:456-465.
- [137] Ng KK, Shi XQ, Ng HY. Evaluation of system performance and microbial communities of a bioaugmented anaerobic membrane bioreactor treating pharmaceutical wastewater[J]. *Water Research*. 2015, 81:311-324.
- [138] Lefebvre O, Moletta R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review[J]. *Water Research*. 2006, 40(20):3671-3682.
- [139] Jiang Y, Shang Y, Yang K, et al. Phenol degradation by halophilic fungal isolate JS4 and evaluation of its tolerance of heavy metals[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(4):1883-1890.
- [140] Tomei MC, Annesini MC, Daugulis AJ. 2,4-Dichlorophenol removal in a solid-liquid two phase partitioning bioreactor (TPPB): kinetics of absorption, desorption and biodegradation[J]. *New Biotechnology*. 2012, 30(1):44-50.
- [141] Jiang Y, Wen JP, Li HM, et al. The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*[J]. *Biochemical Engineering Journal*. 2005, 24(3):243-247.
- [142] Deeba F, Pruthi V, Negi YS. Aromatic hydrocarbon biodegradation activates neutral lipid biosynthesis in oleaginous yeast[J]. *Bioresource Technology*. 2018, 255:273-280.
- [143] Patel A, Sartaj K, Arora N, et al. Biodegradation of phenol via meta cleavage pathway

-
- triggers de novo TAG biosynthesis pathway in oleaginous yeast[J]. *Journal of Hazardous Materials*. 2017, 340:47-56.
- [144] Santos GOS, Doria AR, Vasconcelos VM, et al. Enhancement of wastewater treatment using novel laser-made Ti/SnO₂-Sb anodes with improved electrocatalytic properties[J]. *Chemosphere*. 2020, 259.
- [145] Tsai SC, Tsai LD, Li YK. An isolated *Candida albicans* TL3 capable of degrading phenol at large concentration[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2005,69(12):2358-2367.

学术成果

待发表论文:

Luhuan Sun, Shuai Shao, Jie Bao. Microbial lipid fermentation of *Trichosporon cutaneum* in high saline water. *Bioresources and Bioprocessing*. (已投稿)

致谢

三年的科研生活即将画上句号。因为疫情在家半年，研究计划被打乱，所幸磕磕绊绊地完成实验。感谢在这期间老师、课题组同学、朋友以及家人的帮助和支持。

感谢鲍杰老师的悉心指导。每周的课题讨论，鲍老师总会耐心指导，指出问题所在，提供新的思路。在我实验没有任何进展时，鲍老师并没有任何批评，反而给予鼓励，使情绪低落的我又满血复活。鲍老师严谨的科研态度以及对科研的热情一直是我敬佩的地方。特别是在撰写与修改小论文时的一丝不苟，让我学到要注重细节，要有认真、严谨的态度。鲍老师也一直注重培养我们的科研精神，让我们树立一个正确的科研态度。很幸运能够遇到鲍老师这样的学术研究者。

感谢张建老师在研究生课程学习与科研上对我的帮助。感谢赵瞭、卢敏萍、李园园和刘祺师姐们在课题研究方案与实验操作中的指导。感谢韩涛、郑理想和黄振师兄们在培训实验中的指导。感谢金慈师兄不厌其烦地在实验方案、PPT 制作、数据分析方面提供的建议与指导。感谢邵帅和韩昀身两位师兄提供的材料支持。感谢同级何妮玲、华珂君、展宝睿、张翼和贾佳在各方面对我的帮助。感谢张斌师兄、颜钊师兄、陈明星、李景、李静、徐迎迎、吴雷以及课题组其他师弟师妹们对我的支持与帮助。感谢遇见你们这帮有趣的科研人。

感谢舍友刘涵、李薄薄的陪伴与关心。感谢李妮博士对科研进展的关注以及生活上的帮助。感谢好友李丽、岳蒙、千雯一直以来对我的关心和鼓励。

最后感谢我的家人们一直以来对我的支持与厚爱，虽然有时不理解，但也会尊重我的选择。靠谱老爸，损友老妈，互怼老弟，你们一直都是温暖的存在。

孙鲁欢

2021 年 4 月 18 日