

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

工程硕士学位论文

皮状丝孢酵母的酚醛耐受性及
纤维素油脂发酵研究

张翼

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院

乔庆安 高级工程师 吉林燃料乙醇有限责任公司

申请学位级别: 硕士 工程领域: 生物工程

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:

评 阅 人:

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。所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：

年 月 日

皮状丝孢酵母的酚醛耐受性及纤维素油脂发酵研究

摘要

预处理是破坏木质纤维素的致密结构进而促进后续酶解的关键步骤。预处理过程中产生的抑制物导致微生物难以在木质纤维素体系中生存，因此通过脱毒处理去除抑制物是进行高效油脂发酵的前提。生物脱毒是一种极具优势的脱毒方式，它能够在有效保留可发酵单糖的前提下，选择性地去除弱有机酸和呋喃醛类抑制物；然而生物脱毒法去除酚醛抑制物的效率较低。以往的研究结果表明，即使通过生物脱毒法对原料进行了深度解毒，大部分油脂酵母仍然不能在木质纤维素原料中存活。

本文首先探究了各类油脂酵母在经过生物脱毒的木质纤维素原料中生长和代谢状况；我们猜测残留的酚醛抑制物可能导致了其细胞生长和代谢不良的现象，并对此猜测进行了验证。在仅含酚醛抑制物的合成培养基和麦秆水解液中，圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*)，粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)，解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 几乎不能生长，两株皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum* ACCC 20271, *Trichosporon cutaneum* MP11) 的细胞生长和油脂积累也受到明显影响，表明酚醛类抑制物的存在是导致油脂酵母在木质纤维素体系中生长和代谢不良的主要原因。其次探究了上述 5 株酵母对三种典型酚醛抑制物的转化能力，皮状丝孢酵母可以将 4-羟基苯甲醛 (HBA)、香草醛或丁香醛完全转化为它们的醇、酸衍生物，然后进一步降解酸；其它三株酵母仅能将少量的酚醛转化为它们的醇、酸衍生物，不能进一步降解酸。最后以小麦秸秆为原料在高固含量下进行了同步糖化与共发酵，结果表明皮状丝孢酵母在实际体系中的油脂发酵可以获得良好的油脂产量 (40.87 ± 1.85 g/L)。上述结果为皮状丝孢酵母在纤维素油脂生产上的应用提供了重要的理论依据。

此外，本文还探究了皮状丝孢酵母对木质纤维素主要抑制物乙酸和乙酰丙酸的利用情况。以乙酸和乙酰丙酸为碳源进行分批补料发酵，皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 能利用乙酸和乙酰丙酸进行生长和油脂积累，为木质纤维素来源的非常规碳源的利用提供了依据。

关键词：木质纤维素；皮状丝孢酵母；酚醛类抑制物；有机酸类抑制物；微生物油脂；

Study on the tolerance of *Trichosporon cutaneum* to phenolic compounds and its microbial lipid production from lignocellulosic feedstock

Abstract

Pretreatment is the key step to destroy the dense structure of lignocellulose and promote the subsequent enzymatic hydrolysis. However, microorganisms are generally hard to survive in lignocellulose system due to the presence of inhibitors generated from the lignocellulose pretreatment, so the detoxification step is always followed to remove the inhibitors. Biodetoxification have great advantages on the removal of inhibitors, which can selectively remove weak organic acids and furan aldehydes inhibitors without causing the loss of fermentable sugars; however, biodetoxification has a low efficiency in removing phenolic inhibitors. Previous results show that many oleaginous yeasts are difficult to survive in lignocellulosic feedstock, even the raw materials have been deeply detoxified by biodetoxification.

This study firstly investigated the cell growth and metabolism of various oleaginous yeasts in pretreated and biodetoxified lignocellulosic feedstock; phenolic aldehydes inhibitors were suspected to result in poor cell growth and metabolism of oleaginous yeasts. While cultured in synthetic medium containing only phenolic aldehydes inhibitors and wheat straw hydrolysate, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Yarrowia lipolytica* are generally hard to survive; the cell growth and lipid accumulation of *T. cutaneum* ACCC 20271, *T. cutaneum* MP11 were also significantly affected. The speculation of phenolic aldehydes inhibition on oleaginous yeasts was confirmed. Secondly, the bioconversion of phenolic inhibitors by the above 5 strains of yeast was investigated. *T. cutaneum* ACCC 20271 and *T. cutaneum* MP11 almost completely converted 4-hydroxybenzaldehyde (HBA), vanillin or syringaldehyde into their alcohols and acids form, then alcohol or acid are also effectively degraded; on the other hand, the other three yeasts can only convert a small amount of 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin or syringaldehyde into alcohol and acid derivatives, and the acid can't be further degraded. Finally, simultaneous saccharification and lipid co-fermentation was carried out using wheat straw under high solid content, *T. cutaneum* showed satisfactory lipid accumulation in the actual system (40.87 ± 1.85 g/L). These results provide an important theoretical basis for the application of *T. cutaneum* to the lipid production from lignocellulose.

In addition, the utilization of acetic acid and levulinic acid by *T. cutaneum*, which were main weak organic acids inhibitors from lignocellulose, was also investigated. By using acetic

acid and levulinic acid as carbon sources for fed-batch fermentation, *T. cutaneum* MP11 can use acetic acid and levulinic acid for cell growth and lipid accumulation. This study provides a theoretical support for the utilization of unconventional carbon sources from lignocellulose.

Key words: lignocellulose; *T. cutaneum*; phenolic inhibitors; organic acid inhibitors; microbial lipid;

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 生物燃料概述.....	1
1.3 微生物油脂.....	2
1.3.1 产油微生物.....	3
1.3.2 脂肪酸和 TAG 的合成途径.....	6
1.4 微生物油脂生产原料.....	7
1.5 木质纤维素生物炼制微生物油脂.....	8
1.5.1 木质纤维素结构.....	8
1.5.2 木质纤维素预处理及抑制物的形成.....	9
1.5.3 微生物脱毒.....	11
1.5.4 酚醛化合物的抑制作用.....	11
1.5.5 酚醛抑制物的微生物代谢途径.....	12
1.6 有机酸转化.....	13
1.7 本课题的研究内容与意义.....	13
第 2 章 皮状丝孢酵母的酚醛耐受性研究及纤维素油脂生产.....	15
2.1 引言.....	15
2.2 实验材料.....	15
2.2.1 木质纤维素原料.....	15
2.2.2 实验菌株和培养基.....	15
2.2.3 干式稀酸预处理麦秆和生物脱毒.....	16
2.2.4 15%固含量的麦秆水解液制备.....	16
2.3 实验方法.....	17
2.3.1 种子培养.....	17
2.3.2 油脂发酵.....	17
2.3.3 细胞生长测定.....	18
2.3.4 油脂提取.....	18
2.3.5 总酚浓度测定.....	18
2.3.6 高效液相色谱分析.....	18
2.4 结果与讨论.....	19

2.4.1 酚醛抑制物对油脂酵母生长的影响	19
2.4.2 酚醛对油脂酵母生长的影响	21
2.4.3 油脂酵母转化酚醛抑制物	22
2.4.4 皮状丝孢酵母代谢酚醛路径的推测	25
2.4.5 酚醛抑制物对皮状丝孢酵母油脂发酵的影响	28
2.4.6 同步糖化共发酵评价皮状丝孢酵母在实际体系中的发酵性能	29
2.5 小结	30
第 3 章 皮状丝孢酵母利用木质纤维素来源的有机酸生产微生物油脂 ...	32
3.1 引言	32
3.2 实验材料	32
3.3 实验方法	33
3.3.1 种子培养	33
3.3.2 <i>T. cutaneum</i> MP11 降解乙酸、乙酰丙酸	33
3.3.3 微生物油脂发酵	33
3.3.4 细胞生长测定和油脂提取	33
3.3.5 HPLC 检测	33
3.4 结果与讨论	33
3.4.1 <i>T. cutaneum</i> MP11 代谢乙酸、乙酰丙酸	33
3.4.2 验证 <i>T. cutaneum</i> MP11 以乙酸、乙酰丙酸为碳源生产微生物油脂。	35
3.5 小结	37
第 4 章 结论与展望	38
4.1 结论	38
4.2 展望	39
参考文献:	40
硕士期间研究成果	51
致谢	52

第 1 章 文献综述

1.1 前言

目前,化石燃料占世界主要能源消费的 80%,其中仅运输部门就消耗了 58%。化石燃料的不断消耗致使温室效应日益增强,引起了气温上升,冰川融化等环境问题,仅在美国,2018 年就排放了 67 亿吨温室气体,为了应对大气中温室气体积累造成的急剧的气候恶化,必须减少对化石能源的依赖并积极推进绿色能源建设^[1]。另外,不断增长的能源需求导致原油价格上涨,原油价格的波动将直接影响到全球经济活动,根据 2019 年国际能源署(IEA)的调查数据,2015 至 2018 年美国原油价格上涨约 800 亿美元。在目前的情况下,由于常规能源的供应有限、不可再生化石燃料的迅速耗竭和世界范围内日益增长的能源需求,人们已经认识到日渐枯竭的化石资源不足以支撑未来社会的稳定发展。

在当今时代,创造保守、高效和对生态有益的可再生能源燃料是全球的主要需求^[2]。新能源的使用有利于缓解社会的能源需求,降低化石燃料的消耗速度,减少温室气体的排放,可作为整个能源供应系统的重要补充。但是这些新能源的应用仍存在着许多局限性,比如提供的能源有限、需要较多的设备和场地、难以为大型的机械提供能量。这激发了全世界对可持续的、以生物质为基础的液体燃料的开发和利用的兴趣。生物柴油是一种燃烧性能与化石燃料相近的绿色能源,其点火性能优于化石能源、燃烧充分、具有优良的环保特性。生物燃料之所以重要,是因为它们具备取代石油燃料的潜力,在为大型机械供能时有着显著的优势。越来越多的国家发现生物燃料是减少对化石燃料依赖、降低温室气体排放、达到碳中和的运输方式和实现农村发展目标的关键,生物燃料逐渐成为国际上公认的一种具有替代化石能源潜力的可再生资源并成功吸引了许多发达国家的关注。

1.2 生物燃料概述

生物燃料被认为是最具前景的新型绿色能源,生物燃料的规范化使用可以缓解能源压力,也是环保治理和生态保护的重要措施。生物燃料安全可靠,能够极大程度地避免储藏和运输过程中的各种隐患,适应性好,无需对现有的各种动力设备进行较大的改造并且可以由现有的汽油设施供应^[3, 4]。生物航空燃料的开发和利用是近年来一个相对较新的研究方向,它的使用有助于稳定航空燃料的价格,减少 CO₂ 和颗粒物的排放,但是生物航空燃料相关技术的发展仍处于初步阶段。生物柴油是近年来研究最深入的一种生物燃料,与传统的燃料相比,生物柴油低害环保(低碳、低硫、不含芳香烃),具备更好的燃烧性能和更高的能量密度,提供更高的润滑度以降低机械之间的损耗,可被微生物

降解，能够与化石燃料混合使用^[5,6]，并且生物柴油可以运用于各种大型机械设备，这是新能源电池目前不具备的优势。我国的生物柴油产业发展较早，但是发展速度远低于预期，近年来，国家不断出台新的政策来扶持生物柴油产业，2021年发布的十四五规划已经将促进低碳经济，发展新能源作为未来社会的工作重心之一，这意味着我国的生物柴油行业即将迎来发展的黄金时期。虽然生物柴油的产业化进程得到了越来越多的关注，但是要达到完全可替代化石燃料的目标仍要攻克许多技术难题。

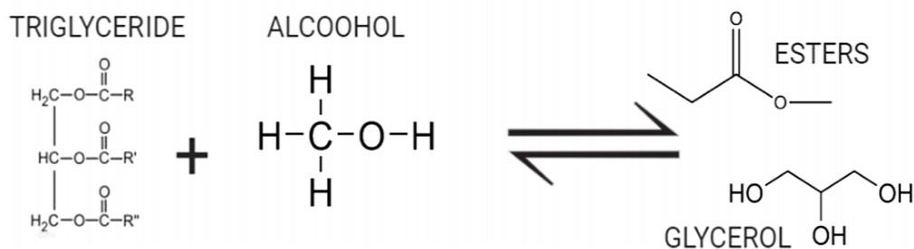


图 1.1 生物柴油合成的酯交换反应^[7]

Fig. 1.1. Transesterification for the synthesis of biodiesel^[7]

生物柴油可以通过生物油脂与低烷基醇的酯交换或脂肪酸的酯化合成，如酯交换反应将三酰甘油(或二酰甘油、单酰甘油)的甘油基团替换为短链一元醇^[8]。目前，生物柴油行业面临的巨大挑战是其工业化生产完全不具备经济上的可行性，这主要是因为生产所需的原料成本太高，而化石燃料的成本很低^[9]。生物柴油生产技术发展至今，生产原料主要来源于植物油脂^[10]，据统计，生物柴油生产所需的植物油成本已占到全部生产成本的 70 – 85 %^[11]。除此之外，许多产油作物与粮食作物存在土地竞争关系，并且产油作物的油脂收获周期长，单位面积的产量低。这些因素的综合影响促使人们更加迫切地开发另外一种优质的生物质原料代替动植物油脂进行生物柴油的生产^[12]。近年来，来源于产油微生物中的油脂引起了世界各国研究人员的关注。

1.3 微生物油脂

微生物油脂是一种由产油微生物在某些限制条件下在胞内有效合成并积累的可以充当生物柴油生产原料的脂质，它在微生物中发挥着重要的生理功能，其中最主要的功能是为细胞储存能量。微生物油脂在细胞内通常由组成细胞结构的体质脂以及存贮于细胞质中的脂质体组成，三酯甘油 (TAG) 是含量最丰富的脂质成分，约占总脂质含量的 95% 以上，其他脂质还包括甘油二酯、磷脂、糖脂、甾醇等^[13]。大部分微生物的脂肪酸成分相似，游离的脂肪酸和组成 TAG 的脂肪酸大多属于油酸、亚油酸和硬脂酸等 C16 和 C18 系脂肪酸，其组成类似于产油作物中的油脂。近年来，能够生产和储存油脂的微生物系统引起了许多科研人员的研究兴趣^[14]。与植物油脂相比，微生物油脂在生产方式上存在一些固有的优势，产油微生物可以在不适合农业的土地上全年生产，微生物培养

所需的土地面积远小于动植物生长所需的土地面积,这意味着微生物油脂与食品原料在生产上不存在任何的竞争关系。并且微生物的培养周期短,油脂产量不受天气和季节等因素的影响,微生物油脂的生产率和单位面积的产量要远高于动植物油脂,更容易上下游加工,容易通过分子改造得到特定产品^[15,16]。据统计,每年微生物油脂的产量高达每公顷植物油产量的数百倍(以升计)^[17]。过去十几年间,由于技术不够成熟,工业化生产微生物油脂的技术目标难以实现,但随着相关研究的不断深入,许多与微生物油脂相关的研究成果竞相发表,微生物油脂的生产技术正在不断取得新的进展。

1.3.1 产油微生物

产油微生物是天然的能够积累油脂的细胞工厂,目前对产油微生物的普遍定义是积累的胞内油脂能够超过自身细胞干重 20% (w/w) 的微生物^[18]。产油微生物在自然界中的分布十分广泛,目前在细菌属、酵母属、霉菌属和藻类属中都发现了此类微生物^[7],它们能够合成从短烃链(C6)到长烃链(C36)的绝大多数脂肪酸^[18]。微生物的培养条件易于调控,可以通过添加不同的营养物质或其他限制因素促使细胞积累不同成分和含量的脂肪酸,也可以根据需要进行选择特定的产油微生物生产具有特殊功能的脂质。

(1) 藻类

微藻 (Microalgal) 是一种结构简单的可以在胞内积累油脂的光合微生物,微藻的种类繁多,大量不同种类的微藻有着广泛的应用潜力^[19]。微藻最明显的特征是在有水的情况下从大气中捕获太阳能和二氧化碳,用于生物质能的生产 and 脂类的有机化合物的积累^[20]。微藻的生长依赖光合作用,每公斤的微藻可以固定约 1.83 公斤的二氧化碳,从而有助于减少 CO₂ 的排放,使整个生产过程实现碳中和^[21]。从实用的角度来看,微藻容易栽培,仅需要阳光、与土地作物相比更少的水和必要的营养物质,微藻具有很高的生长密度和生产率,每隔几天就能完成一个完整的生长周期^[22-26]。大多数情况下微藻的油脂含量在 1~70% 之间变化,但在特定条件下其油脂含量可以达到干重的 90%。微藻中脂肪酸的主链通常有 12-22 个碳原子,不同微藻中的脂肪酸含量和成分存在显著差异^[19, 25, 27, 28]。但利用微藻进行生物柴油的规模化生产面临着许多挑战^[22, 29, 30],其中一个主要阻碍是生长受光照的限制。与传统农业农场相比,微藻养殖设施的成本较高,需要相当密集的护理,并且藻类的收获成本较高。近年来许多研究都报道过利用微藻生产单细胞油脂,并尝试通过改进生产方式来提高生产力和降低生产成本,但事实上,微藻的油脂提取非常困难,并且其油脂产量和生产速率都远低于油脂酵母,根据一些报道过的文献中的数据,微藻的油脂产量最高仅能达到克级^[31-33],因此微藻的实际应用价值相对降低。如果能够获得一些高产量的微藻,采用先进的生产和收获方法,并采用创新的干燥和油脂提取工艺,那么它将真正成为化石燃料的有效补充。

(2) 细菌

三酰甘油 (TAG) 在真核生物如酵母、真菌、植物和动物中广泛存在,而在细菌中

却鲜有报道,大多数能够积累贮藏脂质的细菌会产生特殊的脂质,如聚羟基丁酸酯(PHB)或其他聚羟基脂肪酸酯(PHA),TAG并不认为是细菌中常见的贮藏化合物^[34]。然而,许多研究发现TAG普遍存在于放线菌类细菌中,如分支杆菌(*Mycobacterium*)、链霉菌(*Streptomyces*)、红球菌(*Rhodococcus*)和诺卡菌(*Nocardia*)等^[34]。红球菌是目前所报道的最多的产油细菌,有报道称,在过量碳源存在的条件下,*R. opacus*可以积累高达干细胞重量76%的脂质^[35, 36]。Hye MK等^[37]对*R. opacus* PD630进行基因工程改造,改造后的工程菌株生产了50.2 g/L的脂肪酸、21.3 g/L的脂肪酸乙酯,脂肪酸产率达到了理论得率的90%。也有研究尝试对大肠杆菌进行定向改造,使其生产了占菌体干重26%的脂肪酸^[38]。细菌具有潜在的作为脂质来源的应用前景,然而实际上能够作为产油微生物的细菌种类很少,细菌通常积累聚羟基烷酸作为能源贮藏化合物,大多数细菌的油脂生产能力极低,即使某些细菌如*R. opacus*表现出极高的油脂积累能力,但是生产的成本高昂。到目前为止,大部分研究都致力于利用细菌产生某些特殊的脂类物质,而非生物柴油的生产,酵母和真菌仍是生物柴油原料生产的唯一首选。

(3) 丝状真菌(霉菌)

目前所报道的产油霉菌大部分属于毛霉菌门和子囊菌门,如聚多曲霉菌(*Aspergillus sydowii*)、米曲菌(*Aspergillus oryzae*)、疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)、镰刀霉菌(*Fusarium equiseti*)、葡酒色伞枝霉(*Umbelopsis vinacea*)等。霉菌的胞内油脂中富含多种具有医学和饮食价值的饱和脂肪酸(PUFAs),如 γ -亚麻酸、二- γ -亚麻酸、花生四烯酸和二十二碳六烯酸等^[39]。美国和日本最先使用毛霉菌生产亚麻酸,SAKURADANI等^[40]筛选出一株能够生产花生四烯酸和二十碳五烯酸的丝状真菌:高山被孢霉(*Mortierella alpina*) 1S-4,并且高山被孢霉已经被应用于二十碳三烯酸和二- γ -亚麻酸的工业化生产。曲霉(*Aspergillus*)属的几种霉菌,如黑曲霉和米曲霉也被证明能够积累达生物量12-25%的脂肪^[41],Andre等^[42]在甘油培养基上培养了两株黑曲霉,最终脂质积累高达干重的40%。霉菌油脂中含有较高比例的不饱和脂肪酸,尤其是油酸,与食用油、花生油和棕榈油相似^[43]。作为一种真核微生物,霉菌在油脂生产上的应用有着独特的优势,如卷枝毛霉可以将木质纤维素原料分解为可发酵糖,并产生微生物油脂,而不需要在发酵前对原料进行过多的处理^[44];真菌与潮湿基质的紧密结合使它们能够利用基质的结合水^[45],其生长不受游离水缺乏的限制,因此在发酵过程中废水产量低,并且能最大限度地降低了细菌污染的风险^[46]。但是霉菌在生长过程中产生的菌丝会限制氧气的扩散和热量传递,这直接影响了霉菌的进一步生长^[47];真菌的固态发酵工艺实施起来十分困难;霉菌的生产力要显著低于油脂酵母。上述因素都限制了霉菌在微生物油脂生产中的应用。

(4) 油脂酵母

酵母菌是目前最具有应用前景的微生物油脂生产菌株,也是研究最广泛最深入的微

生物油脂生产模式菌株。在生产单细胞油脂方面, 油脂酵母因其生长速度快、产脂量高, 比细菌、霉菌和微藻更具优势^[48]。与产油藻类相比, 酵母的生长不受可见光的限制, 生长密度更大, 单细胞的生产力和可获得的生物量更高, 较薄的细胞壁更易于油脂提取。与细菌相比, 酵母不含内毒素, 而内毒素在细菌物种中很常见^[49]; 当过量碳源存在时, 细菌将碳源代谢为多羟基烷酸酯形式的多糖和脂肪酸^[34], 而酵母以三酰基甘油(TAG)形式积累过量的糖原或脂质^[49]。

目前, 已有几十种已知酵母被发现能够积累超过其干重 25 %的脂质^[50], 常见的油脂酵母包括解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)、圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*)等^[51, 52]。油脂酵母可在过量碳源存在的条件下在胞内积累大量的脂质体, 据报道, 多种酵母都能积累超过自身干重 60 %以上的油脂^[50, 53, 54]。酵母能够广泛利用碳源, 采用低成本的碳源和简单的培养方法可以获得高产的油脂产量。近年来, 有关油脂酵母生长底物的研究不断取得新的进展, 除了葡萄糖、木糖等常规的可发酵糖外, 油脂酵母还可以利用甘油、挥发性脂肪酸、芳香族化合物、几丁质等非常规碳源作为油脂发酵的底物^[55-58]。Liang 等^[55]以粗甘油为底物培养弯曲隐球酵母, 最终获得了 32.9 g/L 的生物量和 17.1 g/L 的油脂。Pierre 等^[59]研究了解脂耶氏酵母将挥发性脂肪酸转化为微生物油脂的过程, 以乙酸为碳源时, 微生物油脂的产量和最终得率都明显高于葡萄糖。油脂酵母对培养方式和营养物质的要求不高, 对环境的适应性强, 因此各种含有挥发性有机酸的工业废水和其它来源的有机废水都可以充当油脂酵母的发酵底物, 同时降低了微生物油脂生产成本和有机废水的处理成本^[56, 60, 61]。除了能够广泛利用碳源, 还可以通过培养基中存在的脂肪酸替代甘油三酯中的脂肪酸来改变油脂酵母的脂质组成^[62], 并且某些油脂酵母如解脂耶氏酵母能够利用已有的脂质重新生产具有更高商业价值的脂质。油脂酵母自身能够高效的积累油脂, 通过发酵条件的优化以及发酵策略的调整可以进一步提高油脂酵母积累微生物油脂的能力^[54, 63, 64], 除此之外, 通过分子生物学操作对油脂酵母的油脂合成路径进行改造可以进一步提高油脂酵母的油脂积累能力, 也可以构建出适应复杂发酵条件的油脂酵母^[65-68]。虽然利用油脂酵母生产微生物油脂有着其它产油微生物难以比拟的巨大优势, 但是也存在着许多与其它产油微生物相似的技术难题, 微生物油脂是胞内产物, 需要通过菌体收集、细胞破碎和萃取等一系列步骤才能完成油脂提取, 优化提取工艺有助于规模化生产微生物油脂。

油脂酵母含有各种类型的脂质, 主要包括三酰甘油、二酰甘油、单酰甘油和脂肪酸, 其中高达 80-90%的中性脂质是由三酰甘油组成的。油脂酵母最常见的脂肪酸是 C18:1(油酸), C16:0(棕榈酸)和 C18:0(硬脂酸), 这些也是用于生产生物柴油的植物油中的主要成分^[69]。酵母细胞内 TAG 的脂肪酸组成是可变的, 取决于油脂酵母的种类、生长期、环境条件以及底物和培养基成分。

1.3.2 脂肪酸和 TAG 的合成途径

在细菌和真菌的脂肪酸合成途径中发挥功能的酶蛋白结构以及酶促反应的发生位点存在差异，但是脂肪酸合成反应相似。油脂酵母是最主要的产油微生物，其脂肪酸和 TAG 的合成路径最具代表性。目前普遍认为氮源的缺乏是促进油脂酵母积累大量油脂最主要的因素^[70,71]，此外硫酸盐、磷酸盐或镁的缺乏也会促使酵母进入油脂积累阶段。当培养基中的氮源耗尽时，单磷酸腺苷（AMP）被激活的腺苷单磷酸脱氨酶转化为肌苷-5-单磷酸和氨，单磷酸腺苷脱氨酶普遍存在于油脂酵母中，在非油脂酵母中不存在这种绝对依赖^[72]。AMP 浓度降低将导致异柠檬酸脱氢酶失活，三羧酸（TCA）循环受阻，线粒体中积累的柠檬酸被转运至细胞质中重新裂解为草酰乙酸和乙酰辅酶 A，这种转运机制是油脂酵母的典型特征。细胞质中的乙酰辅酶 A 作为脂肪酸合成的单体进入脂肪酸合成途径，每分子的乙酰辅酶 A 会使脂肪酸链延长 2 个碳原子，直至产生硬脂酸(C18:0)。硬脂酸是脂肪酸合成路径中能合成的最高分子量的脂肪酸，但是硬脂酸可以被转运至内质网或者线粒体的膜上，在延长酶的作用下继续延长。游离的脂肪酸与糖酵解中的中间代谢产物 3-磷酸甘油经过若干步反应生成三酰甘油^[73]。脂肪酸和三酰甘油的合成路径详见图 1.2。

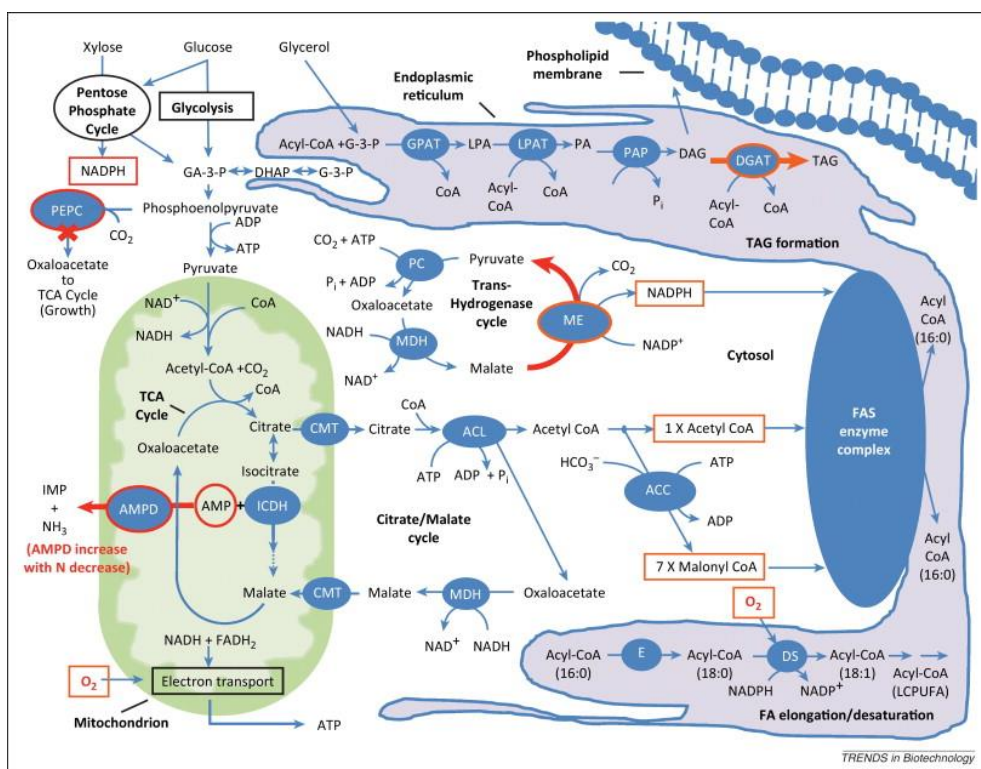


图 1.2 油脂酵母中脂肪酸和 TAG 的代谢途径^[74]

Fig. 1.2 The fatty acid and TAG metabolism in oleaginous yeasts^[74]

1.4 微生物油脂生产原料

在微生物油脂的生产过程中，发酵原料的成本约占据了总成本的 40 - 80%，这已经成为了制约微生物油脂规模化生产的主要因素^[75, 76]。最初，可食用性的农作物被认为是最优良的微生物油脂生产原料，如玉米、高粱、木薯、菊芋等粮食作物和非粮食作物。这些农作物的产量丰富、分布广泛，并且它们的结构简单，富含淀粉、果聚糖等多聚糖，只需要通过简单的处理和后续的酶解便可以得到大量的可供油脂酵母生长和积累油脂的可发酵糖。但是由于与粮食供应存在竞争关系，以及高昂的生产和收获成本，使用可食用性农作物生产微生物油脂并不是一种理想的生产方式^[77]。考虑到微生物油脂工业化生产在经济上的可行性和持续性，木质纤维素生物质是代替粮食作物和非粮食作物作为微生物油脂生产原料的一个理想选择^[78]。木质纤维素生物质是一种廉价的可再生原料，其储量丰富、来源广泛，含有高比例的可发酵糖，如小麦秸秆、玉米秸秆等农业废弃物，玉米胚芽等经济作物残渣和木屑等林业废弃物，它们都能够充当微生物油脂的生产原料，近年来，从微型和大型藻类中获取木质纤维素生物质也引起了关注^[79]。木质纤维素的产量庞大，完全可以满足目前能源生产的需求，但是它们其中的极大部分并没有得到妥善处理，反而造成了严重的环境污染和资源浪费，探索非食用木质纤维素生物质作为油脂酵母原料的想法可以大大降低原料成本，使微生物油脂的规模化生产具备商业可行性。除木质纤维素生物质外，富含碳水化合物的工业废水、粗甘油等也可以成为微生物油脂生产原料的重要补充^[80]。近年来，许多研究已经证实了油脂酵母以工业废水为底物进行油脂生产的可行性，通过培养油脂酵母来降低工业废水中的有机物含量已经成为废水处理的研究热点。

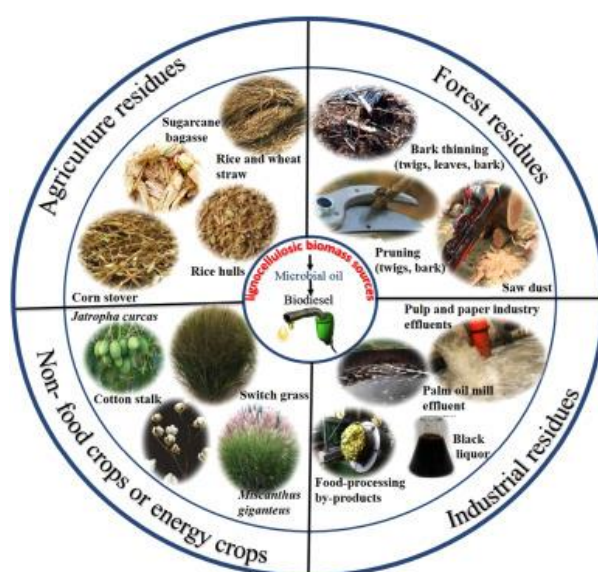


图 1.3 不同类型的木质纤维素生物质^[49]

Fig. 1.3 Different types of lignocellulosic biomass^[49]

1.5 木质纤维素生物炼制微生物油脂

木质纤维素生物质，作为单细胞油脂生产最有效、可再生的资源，近年来一直是许多研究人员关注的焦点，利用油脂酵母将木质纤维素原料转化为微生物油脂是微生物油脂生产最理想的生产方式。木质纤维素含有大量的可发酵糖，主要包括葡萄糖、木糖等，其转化为油脂的生物炼制途径主要包括生物质预处理、酶解预处理生物质生成单糖和微生物发酵产脂。然而，由于其结构和大分子组成，它难以被微生物利用，需要特殊的化学、物理或生物预处理^[76,81]。利用预处理破坏木质纤维素生物质的致密结构，从而促进随后的酶解以便获得可发酵的糖，酶解产生的可发酵糖能够被各种微生物发酵成各种化学品，包括乙醇、丁醇、异丁醇、有机酸、单细胞油脂等^[82-85]。Gao 等^[84]以玉米芯为原料进行油脂发酵，最终产量达 12.3 g/L，Dai 等^[86]以玉米秸秆为原料进行油脂发酵，最终产量达 12.5 g/L，Ayadi 等^[87]以麦麸为原料进行油脂发酵，最终产量达 11 g/L。Li 等^[88]以稻秆为原料进行油脂发酵，最终得到了 13.8 g/L 的微生物油脂。目前，在实验室规模或工业规模上，许多研究已经成功地实现了木质纤维素生物转化生产乙醇和丁醇。然而，将这些木质纤维素生物质转化为生物柴油的技术还没有从实验室规模发展到中试规模。

1.5.1 木质纤维素结构

木质纤维素为植物应对生物和非生物胁迫提供了机械支持和耐受性，它主要由三种高分子聚合物组成，即纤维素、半纤维素和木质素，这三种聚合物相互关联，其含量因植物种类而异^[89]。纤维素是一种两亲性的线性均聚物，主要由葡聚糖链组成，其结构分为晶体(有组织的)结构和非晶态结构。半纤维素是由主链和侧链形成的无定形支链杂多糖，由不同的聚合物组成，如葡聚糖、木聚糖等。半纤维素的分子量低于纤维素，其主链和侧链的长度较短，因此半纤维素比纤维素更容易降解，半纤维素连接木质素和纤维素纤维，使整个纤维素-半纤维素-木质素网络更具刚性，但是这种顽固的结构阻碍了酶水解的进行。木质素是一种非晶态异型聚合物，由三种不同的苯丙烷单元组成，它们通过不同的键连接在一起^[90]。木质素的溶解性极低，不具有光活性，所以木质素的降解非常困难。目前大量的研究都集中于纤维素和半纤维素的生物转化，关于微生物利用木质素的研究较少，这是因为木质素不含微生物生长代谢所需要的可发酵糖，在木质纤维素生物炼制微生物油脂的过程中属于不可利用的部分。但是木质素仍然是一种潜在的可用于生物炼制的原料，近年来，许多研究都尝试将木质素的降解产物转化为微生物油脂。Hu 等^[91]以 4-羟基苯甲酸为生长基质，利用 *T. cutaneum* ACCC 20271 生产了 0.85 g/L 的微生物油脂。Kosa 等^[92]以香草醛和 4-羟基苯甲醛（HBA）为生长基质评价了 *R. opacus* DSM 1069 和 PD630 的脂质积累能力，它们能够积累接近干重 20% 的脂质。

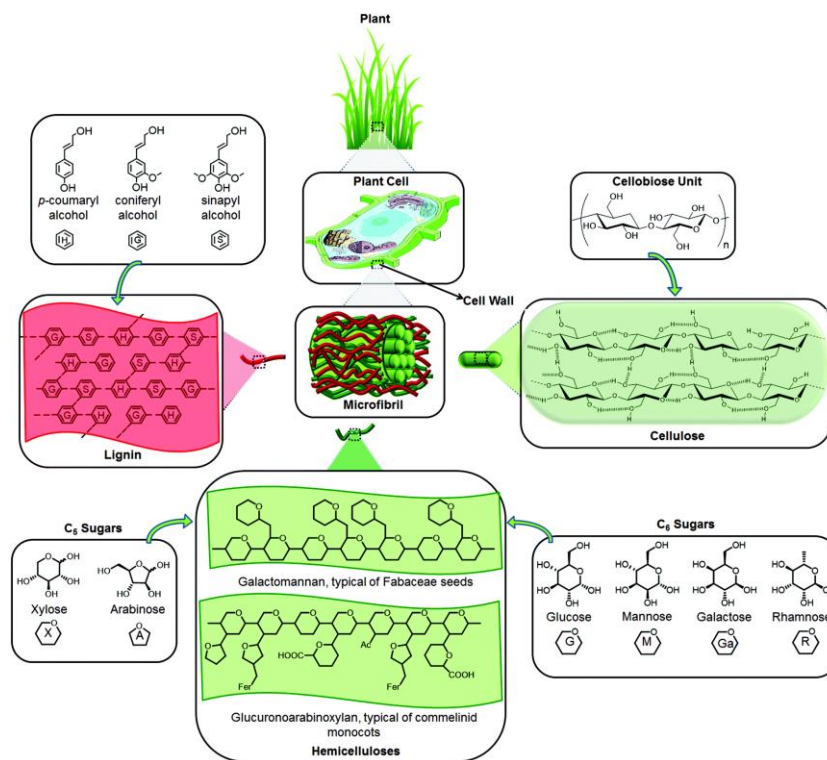


图 1.4 木质纤维素结构示意图^[80]

Fig. 1.4 Diagram of lignocellulose structure^[80]

1.5.2 木质纤维素预处理及抑制物的形成

预处理是木质纤维素生物质生物炼制过程中的起始步骤^[93-97]。预处理可以破坏植物细胞壁中纤维素-半纤维素-木质素之间的紧密相互联系，消除天然木质纤维素生物质难以降解的物理和化学障碍^[98]，只有当这种顽固结构被破坏后，纤维素酶或者半纤维素酶才能作用于纤维素和半纤维素，从而释放出可以用于油脂酵母生长和油脂积累的可发酵糖^[81,99]。目前，已经有多种方法被应用于木质纤维素预处理，如机械处理、酸处理、和氧化处理等，这些预处理方法都有自身的优势和不足，其中酸处理对木质纤维素结构的破坏最为高效和彻底，并且可以被应用于多种来源的木质纤维素的预处理。本实验室开发了一种干式稀酸预处理技术^[100]，预处理时只需要少量的水与物料混合，预处理后物料的固含量高，整个过程中无废水产生，不需要经过特殊处理便可在酶解后得到高浓度的可发酵糖，在保留了常规酸处理优点的同时还弥补了常规酸处理的不足。

在预处理过程中，强烈的预处理条件不仅会释放可发酵糖并且会产生许多有害的小分子化合物^[101,102]。这些化合物的存在能够抑制纤维素酶的酶解活性，更严重的是抑制了在木质纤维素体系中发酵菌株的生长代谢和产物合成。这些抑制物可分为三类：呋喃醛类；弱酸类；酚类化合物，预处理方式以及生物质来源影响上述化合物在木质纤维素水解物中的形成和浓度^[103]。糠醛和 5-羟甲基糠醛（HMF）是抑制发酵菌株活性的两种主要的呋喃醛类抑制物，主要由己糖和戊糖脱水形成^[104]。糠醛和 HMF 可以抑制细胞比

生长速率,影响细胞质中许多酶的活性,并且这两种化合物在预处理过程中产生的含量相对较高,溶解性强,因此是生物炼制过程中抑制菌株生长和产物合成的主要化合物。而酚类化合物来自于木质素的降解,当木质素降解为单体化合物时,主要降解产物包括对羟基苯甲醛、香兰素、丁香醛,这三种化合物分别代表对羟基苯基(H)、愈创木酚基(G)和紫丁香基(S)的降解,是最具代表性的酚醛类化合物^[91]。酚类化合物和其他芳香族化合物会抑制微生物的生长和产物的积累,它们的抑制机理并不固定,与特定的官能团有关^[105]。酚醛类抑制物会破坏细胞膜上蛋白质与脂质的比例,影响细胞膜的功能,并且会引起DNA突变以及抑制RNA的翻译。由于酚醛的溶解性较差,酚醛抑制物在预处理后的木质纤维素水解液中的含量相对较低,大部分酚醛抑制物都存在于固相中。但是酚醛对微生物的毒性高于其它两类抑制物,因此也是阻碍生物炼制过程的主要抑制物。弱酸类抑制物主要包括甲酸、乙酸、乙酰丙酸等小分子有机酸,其中乙酸是乙酰基水解的结果^[98],而甲酸和乙酰丙酸产生于呋喃类抑制物^[76]。有机酸类化合物的抑制作用主要是由于弱酸在细胞内的质子化改变了细胞质的pH,pH的改变会影响胞内酶的活性,这可能导致细胞死亡。呋喃醛类、酚醛类和有机酸类抑制物对细胞的抑制机理和抑制效果存在差异,但是当三类抑制物同时存在时会产生协同作用,对细胞的抑制效果远高于单一抑制物^[102]。

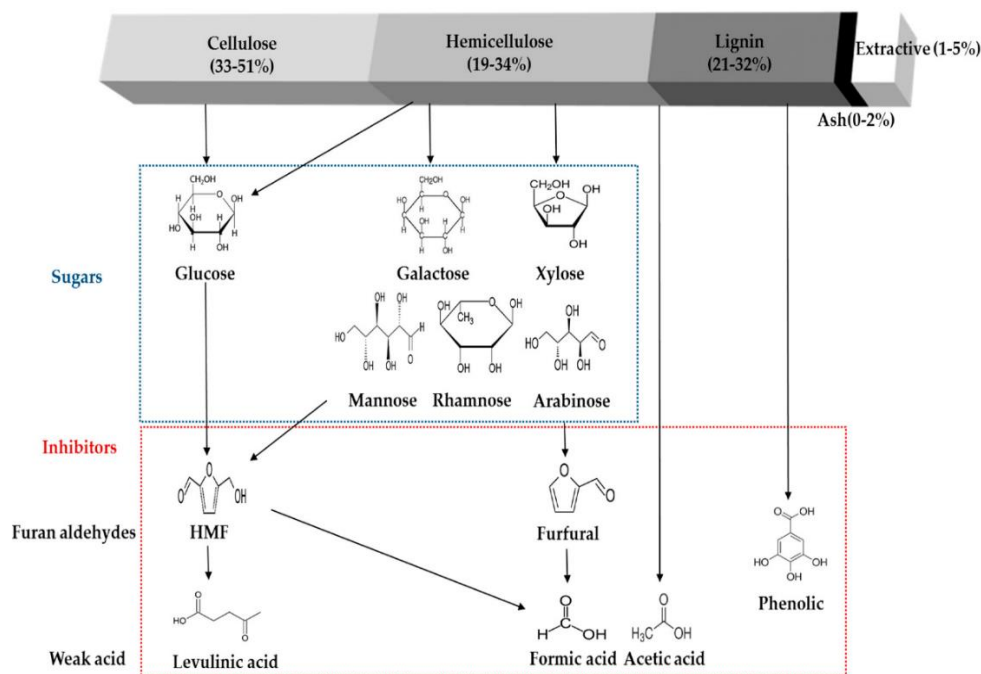


图 1.5 主要的抑制物及其来源^[106]

Fig. 1.5 The main inhibitors and their sources^[106]

1.5.3 微生物脱毒

许多研究表明,大部分油脂酵母难以在木质纤维素水解产物中存活^[84, 107-109],这给木质纤维素生物质转化为微生物油脂的生物炼制过程造成了极大的阻碍。在预处理过程中,抑制物的形成是难以避免的,因此如何降低抑制物对生物转化的影响是必须应对的难题。过去有研究曾经尝试在不经过脱毒的麦秆水解液中培养弯曲隐球酵母,但是仅能生产极少量的微生物油脂^[110]。近年来也有许多研究尝试通过对解脂耶氏酵母进行分子改造使其能够在未经过脱毒的木质纤维素水解物中进行微生物油脂的生产,但是最终得到的油脂产量与理想产量之间仍具备极大的差距。这些研究都证明了脱毒(即在发酵前特定去除抑制剂)仍是以木质纤维素为原料进行微生物油脂发酵的整个过程中不可或缺步骤。目前,多种生物、物理和化学脱毒方法已被广泛用于水解物中抑制物的去除。物理法和化学法虽然也能够去除抑制物,但是其使用成本和后续处理偏高,并且抑制物的去除不够彻底(尤其是酚醛类抑制物),因此通常需要结合几种方法才能完全去除抑制物。而生物脱毒所需的条件温和、对环境影响较小,并且对抑制物的去除更为彻底,更为重要的是生物降解法能有效去除酚类抑制物。有报道称里氏木霉(*Trichoderma reesei*)可以去除水解液中的乙酸、糠醛;也有研究表明一些来源于木质素降解菌中的漆酶可选择性地、几乎完全地去除酚类抑制物。这些研究都说明了微生物在去除抑制物的过程中具有极大的应用潜力。

本实验室筛选出了两株能用于脱毒处理的菌株树脂枝孢霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 和拟青霉菌 *Paecilomyces variotii* FN89。这两株脱毒菌株对木质纤维素来源的抑制物(呋喃醛、有机酸、酚醛)都具有良好的降解效果,能优先利用呋喃醛、有机酸类抑制物。

1.5.4 酚醛化合物的抑制作用

酚类化合物通常分为醛类、酚酮类、酚酸类和酚醇类,木质纤维素体系中常见的酚醛化合物有 13 种,其种类远多于呋喃类和有机酸类化合物^[111]。并且区别于普遍认知的呋喃类化合物作为抑制物时的效价顺序(醛通常被认为是抑制性最强的,而酸和醇通常被认为是毒性最小的),酚类的抑制效价并不完全与该种化合物的种类相关,因为酚醛抑制物的抑制作用是由功能侧基(如甲氧基和羟基)以及在化合物的结构中出现不饱和键的结合产生的,这说明酚醛抑制物有着比其他抑制物更复杂的抑制机理。除毒性机理复杂外,酚醛抑制物还具有水溶性差,疏水性强等特点^[112]。因此,传统的物理或者化学方法难以完全去除酚醛类抑制物,如水洗、过灰、离子交换法只能去除存在液相中的酚醛抑制物,而固相中的抑制物难以去除。许多研究结果都表明在脱毒过程中呋喃类和有机酸类抑制物是可以被充分去除的,但是酚醛类抑制物难以实现完全去除^[112]。一般来说,在考虑抑制现象时,酚类化合物并不是最优先考虑的,因为在相对较低的浓度下,每个单一酚类化合物的抑制作用都不太明显^[113]。此外,许多研究中微生物油脂的发酵基质是

以液体形式存在的木质纤维素水解液，酚醛浓度并不高，并且这部分酚醛抑制物可以通过离子交换等方法被去除，因此关于抑制物的相关研究多数与呋喃醛和有机酸相关。然而在以木质纤维素为原料生产油脂的同步糖化共发酵过程中，酚醛抑制物的积累可能会对油脂酵母产生强烈的胁迫，因此油脂酵母需要具备良好的酚醛耐受性。Chen 等^[107]研究了 7 种典型的抑制物对 6 株油脂酵母的抑制作用，结果表明低浓度的酚醛抑制物也会对油脂酵母产生了强烈的抑制。Gao 等^[84]在主要含有酚醛抑制物的玉米芯水解液中培养 5 株油脂酵母，只有 *T. cutaneum* ACCC 20271 出现了明显的生长和油脂积累，而其它酵母几乎不能生长。这些研究都表明在实际的木质纤维素体系中进行微生物油脂发酵时，获取具有良好酚醛耐受性的油脂酵母具有重要意义。

适用性进化和分子改造是实验室常用的提高酵母对酚醛抑制物耐受性的方式。适应性进化的适用性较广，而分子改造仅适用于分子操作手段较成熟的油脂酵母，如解脂耶氏酵母。Gu^[113]等通过在逐渐增加浓度的玉米穗水解物中培养培养酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 菌株，利用改良的 *S. cerevisiae* DQ1 在后续同步糖化发酵中获得了较高的乙醇浓度(62.68 g/L)和产率(55.7%)。Shen 等^[114]通过甲基磺酸乙酯诱变和适应性进化，获得了一株对香草醛表现出特异性耐受的菌株 *S. cerevisiae* EMV-8。Yoneda 等^[115]以苯酚为唯一碳源对红球菌 *R. opacus* PD630 进行了 40 代的适应性进化，适应性菌株的苯酚消耗率和产脂量均比原始菌株高 2 倍。

1.5.5 酚醛抑制物的微生物代谢途径

微生物对酚醛的生物降解是一个复杂的过程，许多微生物仅能将酚醛转化为毒性稍弱的醇或者酸，只有极少数微生物能够彻底将酚醛转化为中心碳代谢中的产物。酚醛的转化途径属于微生物转化芳香族化合物的“漏斗途径”，包括上层途径和下层途径。在上层途径中，酚醛会被转化为保守的中间体，如邻苯二酚(CA)和原儿茶酸(PCA)^[116]。在下层途径中，这些保守中间体的芳香环被双加氧酶裂解，产生开环化合物，开环方式通常取决于中间体的种类，但同一种中间体也可能存在多种开环方式，如原儿茶酸可以被三种双加氧酶裂解，每种双加氧酶在苯环上的作用位点不同。芳香环裂解产生的开环化合物经过多个酶促反应后最终进入三羧酸循环^[117, 118]。一般情况下，微生物按照上述方式将酚醛转化为 TCA 循环的中间产物，但是某些真菌可以通过一种特殊的解毒机制将酚类化合物聚合成一种不确定的可溶性黑色素，称为异种黑色素^[119]，多酚氧化酶可能在该机制中发挥了重要作用。HBA、香草醛、丁香醛是三种典型的酚醛抑制物，也是与酚醛代谢相关的研究中的主要研究对象。Eiji 等^[120]报道了香草醛、丁香醛在少动鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 中的代谢路径，香草醛首先被转化为香草酸，香草酸被逐步转化为 2-吡喃酮-4,6-二羧酸(2-pyrone-4,6-dicarboxylate)，然后被水解酶裂解，最终转化为丙酮酸和草酰乙酸；丁香醛首先被转化为丁香酸，丁香酸被脱甲基酶转化为没食子酸甲酯，没食子酸甲酯最终被转化为丙酮酸和草酰乙酸；Shen 等^[121]对谷氨酸棒

状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 的酚醛代谢路径进行了总结, HBA 和香草醛经开环反应后被转化为乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A。有关酚醛代谢路径的报道大多与细菌有关, 而很少有相关研究报道过油脂酵母转化酚醛的生理机制, 但是近年来, 许多研究都发现油脂酵母也具有能彻底降解酚醛抑制物的代谢路径。Wang 等^[122]根据全基因组信息和实验结果构建了皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* ACCC 20271 代谢糠醛、HMF、HBA、香草醛和丁香醛的路径。Hu 等^[91]发现皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* ACCC 20271 能将 HBA 为转化为乙酰辅酶 A。

1.6 有机酸转化

乙酸和乙酰丙酸是木质纤维素预处理过程中产生的有机酸类抑制物的主要成分, 通常在发酵前被去除, 并且乙酸还是工业污水和城市固废厌氧消化混合物中挥发性脂肪酸的主要成分, 因此乙酸和乙酰丙酸可以成为微生物油脂生产的廉价碳源。许多研究证明油脂酵母可以将乙酸直接转化为乙酰辅酶 A, 乙酰辅酶 A 可以被直接用于脂肪酸的合成。Bettencourt 等^[56]以 15 g/L 的乙酸为碳源培养了四株酵母, 结果表明这四株酵母都能够消耗乙酸并积累油脂。Fontanille 等^[59]利用解脂耶氏酵母 *Y. lipolytica* MUCL 28849 生产微生物油脂, 最初以葡萄糖或甘油为碳源, 然后在葡萄糖或甘油消耗完后, 在限氮条件下依次添加乙酸, 最终获得了 12.4 g/L 的油脂, 脂质含量接近 40 %。Huang 等^[123]利用隐球酵母 *C. curvatus* MUCL 29819 以不同浓度的乙酸为碳源生产微生物油脂, 当添加 40 g/L 的乙酸时, *C. curvatus* MUCL 29819 可产生 5.01 g/L 的油脂, 该研究还发现当乙酸浓度超过 20 g/L 时, 胞内脂质开始向胞外溢出。许多研究都证明了乙酸可作为油脂酵母积累油脂的底物, 但是很少有研究将乙酰丙酸用于微生物油脂发酵。乙酸在乙酰辅酶 A 合成酶的催化下直接被转化为乙酰辅酶 A, 而乙酰丙酸则需要经过多个酶促反应才能被转化为丙酮酸和乙酰辅酶 A, 虽然乙酰丙酸的生物转化过程比乙酸的更复杂, 但乙酰丙酸也具有成为微生物油脂生产原料的潜力。值得注意的是, 高浓度的乙酸和乙酰丙酸会对油脂酵母产生强烈的抑制作用, 因此它们目前并不能取代葡萄糖等常规碳源, 但是在纤维素油脂的生产过程中, 它们可作为有效的补充碳源。皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 是本实验室筛选到的一株油脂酵母, 能够以木质纤维素为原料进行高效的油脂发酵, 探究该菌株是否能以乙酸和乙酰丙酸为底物生产微生物油脂对其在纤维素油脂生产中的应用有重要的指导意义。

1.7 本课题的研究内容与意义

生物柴油是一种绿色环保的可再生燃料, 它的开发和利用有助于降低对化石燃料的依赖性、实现碳中和的发展目标, 但是高昂的原料成本阻碍了生物柴油的工业化进程, 因此寻找一种价格低廉的原料对于生物柴油的产业化具有重大意义。微生物油脂的组成类似于植物油脂, 其生产周期短、生产所需的土地面积小、产量不受自然环境影响, 可

替代植物油脂成为生物柴油生产的主要原料。木质纤维素是一种分布广泛、储量丰富的可再生生物质，通过油脂酵母将预处理后的木质纤维素生物质转化为微生物油脂是生物柴油原料生产的一种理想方式。

预处理后的木质纤维素原料中含有大量的酚醛类抑制物，传统的脱毒方法难以完全去除酚醛，以往酚醛抑制物并不被认为是油脂发酵过程中的主要的抑制物，但是在同步糖化同发酵微生物油脂的实际生产过程中，酚醛的积累可能会对发酵菌株产生强烈的抑制。本实验室采取的生物脱毒法能选择性地去除呋喃醛类、有机酸类抑制物，但是对酚醛抑制物的去除效率较低，并且通过生物脱毒完全去除酚醛会导致木糖的损失，因此脱毒过程并不会完全去除酚醛。以往的研究结果表明，大部分的油脂酵母难以在经过脱毒的木质纤维素原料中存活，即使原料中的呋喃醛和有机酸类抑制物已经被完全去除。本研究猜测残留的酚醛抑制了油脂酵母的生长，探究这部分酚醛对油脂酵母的抑制作用对木质纤维素转化为微生物油脂的实际过程有重要的指导意义。本研究首先在经过脱毒完全去除呋喃醛和有机酸类抑制物的小麦秸秆水解液和含酚醛的合成培养基中培养了5株常见的油脂酵母，证明了残留的酚醛是导致油脂酵母在脱毒处理后的木质纤维素原料中生长和代谢不良的主要原因。皮状丝孢酵母被证明是实验菌株中最耐受酚醛的油脂酵母，并且研究发现两株皮状丝孢酵母存在三种典型的酚醛 HBA、香草醛、丁香醛的代谢途径，并基于此实验结果，本论文推测了皮状丝孢酵母降解这三种酚醛抑制物的代谢途径。此外，本研究还验证了酚醛抑制物对皮状丝孢酵母油脂积累能力的影响，并在实际的木质纤维素体系中评估了皮状丝孢酵母的油脂发酵性能。

乙酸、乙酰丙酸是木质纤维素来源的有机酸抑制物中的主要组成部分，并且乙酸和乙酰丙酸都可以被微生物转化为脂质合成的前体乙酰辅酶 A。皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 是本实验室筛选的一株优良的油脂酵母。本研究探究了该菌株转化乙酸和乙酰丙酸的能力，并通过分批补料发酵证明了该菌株利用乙酸和乙酰丙酸生产微生物油脂的可行性。该研究扩充了皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 的底物广谱性，对该菌株应用于木质纤维素生物炼制过程中的实用性和灵活性有重要的指导意义。

第2章 皮状丝孢酵母的酚醛耐受性研究及纤维素油脂生产

2.1 引言

通过油脂酵母将木质纤维素转化为微生物油脂是可持续生产生物柴油最有前景的技术之一。预处理是破坏木质纤维素结构进而促进后续酶解的关键步骤，然而在预处理过程中产生的多种抑制物阻碍了油脂酵母菌株的生长和微生物油脂的积累。以往的研究表明，油脂酵母难以在木质纤维素水解物中生存，这严重的阻碍了微生物油脂发酵技术的发展。目前，多种脱毒方法已被应用于有效去除弱有机酸类(乙酸、乙酰丙酸、甲酸)和呋喃醛类抑制物(糠醛和 HMF)。酚醛抑制物的化学性质和物理性质与呋喃醛和有机酸存在显著差异，其成分复杂、疏水性强、生物可降解性差。传统的物理化学方法难以完全去除木质纤维素原料中的酚醛抑制物，生物脱毒法虽然可以完全去除酚醛化合物，但是去除效率低且耗费大量时间，并且酚醛抑制物的完全去除会导致木质纤维素原料中木糖的大量损失。为了最大限度地保留木糖，生物脱毒过程通常以有机酸、呋喃醛类抑制物的完全去除为终点，这就导致部分酚醛抑制物仍然残留在木质纤维素原料中。目前许多关于抑制物对油脂酵母影响的研究并不涉及酚醛抑制物，但是在实际的木质纤维素炼制微生物油脂的生产过程中，酚醛积累可能会产生比呋喃和有机酸更强烈的胁迫。

皮状丝孢酵母、解脂耶氏酵母、圆红冬孢酵母、粘红酵母作为常见的油脂酵母已经被广泛研究，在本研究中，选取了以上 5 株酵母（包括两株皮状丝孢酵母）作为研究对象。主要内容如下：（1）首先在生物脱毒处理后的麦秆水解液中培养了 5 株油脂酵母，并在添加了三种代表性酚醛抑制物的合成培养基中培养以上酵母，探究酚醛抑制物是否是生物脱毒处理的木质纤维素原料中抑制油脂酵母的主要因素；（2）探究 5 株油脂酵母转化酚醛的能力，并对皮状丝孢酵母的酚醛代谢路径进行了推测；（3）以皮状丝孢酵母为发酵菌株，在含有酚醛的合成培养基中进行油脂发酵，探究酚醛抑制物对皮状丝孢酵母油脂发酵性能的影响。（4）以小麦秸秆为原料在高固含量下进行了同步糖化与共发酵，评价在实际的木质纤维素体系中皮状丝孢酵母的油脂发酵性能。

2.2 实验材料

2.2.1 木质纤维素原料

实验所用小麦秸秆于 2020 年秋季于河南南阳收获，购买的小麦秸秆在进行水洗、晾干和粉碎后于密封袋中储藏。通过两步酸解法测定小麦秸秆原料的纤维素、半纤维素含量分别为 35.2%，22.4%，其余组分为木质素与灰分^[122]。

2.2.2 实验菌株和培养基

油脂酵母：解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* DSM 3286 来自德国微生物保藏中心

(DSMZ); 粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* CGMCC 2.703、圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides*, CGMCC 2.1609 来自中国普通微生物菌种保藏管理中心; 皮状丝孢酵母 *Trichosporon. cutaneum* ACCC 20271 来自中国农业微生物菌株保藏管理中心; 皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* MP11 (菌种保藏号为 CGMCC 20481) 是本实验室以皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* ACCC 20271 为原始菌株通过超离心筛选得到的一株高产的油脂酵母, 目前保存在中国普通微生物菌种保藏管理中心。

脱毒菌株: 拟青霉菌 *Paecilomyces variotii* FN89 (CGMCC 17665) 是本实验经过筛选分离出的一株适用于脱毒处理的优良菌株, 目前保存在中国普通微生物菌种保藏管理中心。

脱毒菌株种子培养基: 20 g/L glucose, 2 g/L KH_2PO_4 , 1.0 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L Yeast Extract, 2 % Agar。

YPD 培养基: 20 g/L Glucose, 20 g/L Tryptone, 10 g/L Yeast Extract; 其固体培养基添加 2 % Agar。

合成培养基: 1.0 g/L Yeast Extract, 1.0 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.22 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Glucose (20 g/L 或 60 g/L), 以及额外添加的酚醛。

2.2.3 干式稀酸预处理麦秆和生物脱毒

干式稀酸预处理麦秆的详细过程参照 Zhang 等^[100]报道的方法, 预处理过程中所使用的稀硫酸浓度为 3.3 % (w/w, 基于物料干重)。总重 1800 g 的麦秆和稀硫酸在预处理反应器中充分混和, 然后通高温蒸汽使反应温度至 175 °C, 充分反应 5 min 后得到预处理后的麦秆。

预处理麦秆的生物脱毒的详细过程参照 Zhang 等^[124]报道的方法。预处理后的麦秆首先用质量比为 20 % 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液调节 pH 至 4.8, 然后将 *Paecilomyces variotii* FN89 的孢子转移至 300 g 预处理后的麦秆中, 37 °C 下培养 2 天后与 3000 g 的预处理后的未脱毒麦秆混合, 混合后装入 15 L 的脱毒反应器中, 在曝气率为 0.8 vvm、37 °C 的条件下进行生物解毒, 曝气有助于抑制物的去除和脱毒菌株的生长。糠醛、HMF、乙酸全部去除后脱毒结束, 脱毒后的物料- 4 °C 保存。通过液相色谱监测物料中的抑制物浓度, 具体方法如下: 取样前开启搅拌, 于 50 rpm 下混合 1 min, 然后用 45 mL 去离子水充分溶解 5 g 物料, 取上清液检测抑制物 (主要检测糠醛、HMF、乙酸) 浓度。

2.2.4 15 % 固含量的麦秆水解液制备

实验所用纤维素酶 Cellic CTec 2.0 购自诺维信, 滤纸活性、纤维二糖酶活性和蛋白浓度分别为 203.2 FPU/mL、4900 CBU/mL 和 87.3 mg/mL, 具体测定方法参考已发表的文章^[86]。

小麦秸秆水解液的制备步骤参照本实验室先前的报道^[122, 125]。所使用麦秆的固含量为 15%, 纤维素酶用量为 5.5 mg 蛋白/g 纤维素, 反应条件为 50 °C, 150 rpm。酶解后的

醪液于 12000 rpm 下离心取上清，灭菌后的上清液经滤纸过滤去残渣，过滤后的水解液加入 1.0 g/L KH_2PO_4 、1.0 g/L Yeast Extract、0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 0.22 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

2.3 实验方法

2.3.1 种子培养

取适量冻存管中的菌体（冻存管-80 °C 保存）涂布在 YPD 平板上，30 °C 下培养 36 h，挑取单菌落接种于 20 mL YPD 液体培养基中，30 °C、180 rpm 下培养 20 h，然后按照 10%接种量转入含 50 mL YPD 液体培养基中，于 30 °C、180 rpm 下培养 16 h。

2.3.2 油脂发酵

麦秆水解液发酵：接种量为 10% (v/v)，将活化后的酵母种子液转入含有 50 mL 固含量为 15% 的脱毒麦秆水解液的 500 mL 摇瓶中，发酵在 30 °C、180 rpm/min 下持续 120 h，用 5 mol/L NaOH 溶液将初始 pH 调节为 5.0。

酚醛存在时 5 株油脂酵母的生长能力评价：发酵在含有 1 L 合成培养基的 3 L 发酵罐中进行，合成培养基包含 20 g/L 葡萄糖以及 0.8 g/L 4-羟基苯甲醛 (HBA)、0.8 g/L 香草醛和 0.6 g/L 丁香醛，酚醛抑制物不能经过高温灭菌，应直接在无菌条件下加入粉末状的酚醛，然后超声溶解，发酵菌株为 5 株油脂酵母，接种量为 10%。发酵在 30 °C、450 rpm/min 下持续 72 h，发酵过程中用 5 mol/L NaOH 和 4 mol/L HCl 溶液将 pH 值维持在 5.0。每隔 12 h 取样检测发酵液中的葡萄糖、抑制物的浓度和油脂酵母的 CFU。

酚醛胁迫下皮状丝孢酵母的油脂发酵评价：油脂发酵在含有 50 mL 合成培养基的 500 mL 摇瓶中进行，合成培养基含 60 g/L 葡萄糖和 0.8 g/L HBA、0.8 g/L 香草醛和 0.6 g/L 丁香醛，发酵菌株为 *T. cutaneum* ACCC20271 和 *T. cutaneum* MP11，接种量为 10%。用 5 mol/L NaOH 溶液将初始 pH 调节为 5.0，在 30 °C、180 rpm/min 下发酵 120 h。

同步糖化共发酵：具体方法参照本实验室已发表的论文^[126, 127]，所使用的小麦秸秆固体含量为 30% (w/w)，纤维素酶的添加量为 5 mg 蛋白/g 纤维素。在 50 °C、150 rpm 下预糖化 12 h 后，控温至 30 °C，以 10% (v/v) 接种量加入 *T. cutaneum* MP11 种子液，并添加 1.0 g/L KH_2PO_4 、0.5 g/L Yeast Extract、0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 0.44 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。发酵温度为 30 °C、搅拌转速为 450 rpm/min，通气量设置为 1 vvm，pH 维持在 5.0。

分批补料发酵：发酵在含有 1 L 合成培养基的 3 L 发酵罐中进行，初始葡萄糖浓度设为 5 g/L，发酵菌株为 *T. cutaneum* ACCC20271。对照组发酵 12 h 后进行补料，然后每隔 3 h 进行补料，5 次补料后将补料间隔调整为 2.5 h，共进行补料 8 次，总共添加了 45 g/L 葡萄糖。实验组发酵 12 h 后添加 1 g 香草醛，20 h 后添加 10 mL 500 g/L 葡萄糖，4 h 后添加 1 g 香草醛，重复上述添加葡萄糖和香草醛的过程，间隔时间不变，重复该过程 9 次，共添加 45 g/L 葡萄糖和 9 g/L 香草醛。

2.3.3 细胞生长测定

细胞干重 (dry cell weight): 量取 25 mL 菌液至 50 mL 离心管, 于 12000 rpm 下离心 3 min, 去上清, 洗涤湿菌体后用适量超纯水将菌体转移至玻璃皿(重量已知), 在 60 °C 烘箱中干燥 12 h, 称重后计算细胞干重。

CFU (colony forming unit): 取发酵过程中的菌液, 用无菌水稀释至适当浓度, 取 100 μ L 稀释后的菌液涂布在 YPD 平板上, 涂布后的平板置于 30 °C 的温箱中孵育 36 h 后计算单菌落个数即得取样时的 CFU, CFU 增长倍数定义为每次取样时得到的 CFU 与 0 h 的 CFU 的比值。

2.3.4 油脂提取

油脂提取采用甲醇-氯仿法^[91]。细胞干重测量完成后, 在该玻璃皿中加入适量浓度为 4 mol/L 的 HCl 溶液, 充分浸泡干菌体并轻微摇晃, 4 h 后用刮勺将菌体转入 50 mL 离心管中(用适量 HCl 溶液冲洗玻璃皿上的残余菌体, 重复 2~3 次), 将离心管置于通风橱中沸水浴 10 min 后、迅速转移至冰水中冷却, 使细胞完全破碎。然后加入适量配置好的氯仿/甲醇 (2:1, v/v) 溶液, 常温下充分萃取 1 h, 低温下离心使溶液分层, 将下层氯仿相转移至 50 mL 旋蒸瓶中(旋蒸瓶质量已知), 然后于 80 °C 下挥发氯仿, 直至氯仿挥发完全, 最后将旋蒸瓶放至 65 °C 烘箱中去除水分, 称重后计算油脂重量。

2.3.5 总酚浓度测定

总酚含量的测定方法为改良的 Folin-Ciocalteu 法^[112, 128]。200 mg (干重) 样品室温下用 20 mL 甲醇溶液 (95%, v/v) 萃取 48 h, 萃取液于 12000 g 离心 5 min 取上清, 取 500 μ L 上清液至 10 mL 玻璃试管后加入 1 mL 福林酚试剂 (15%, v/v), 混匀后加入 4 mL 0.7 mol/L Na_2CO_3 , 避光条件下反应 2 h, 765 nm 测定吸光值。配制 100 μ g/mL 没食子酸溶液, 取 0 μ L、100 μ L、200 μ L、400 μ L、600 μ L、800 μ L 的没食子酸溶液作为样品绘制标准曲线。

2.3.6 高效液相色谱分析

呋喃醛 (糠醛、HMF)、乙酸、乙酰丙酸、葡萄糖和木糖的含量通过 HPLC 定量分析。色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H, 检测器为岛津 RID-10A 示差检测器。方法如下: 色谱柱的工作温度设置为 65 °C, 以 5 mM 硫酸为流动相冲洗色谱柱, 流速逐渐升至 0.6 mL/min, 待视差检测器的基线稳定后开始测样, 进样量为 20 μ L。

HBA、香草醛、丁香醛及其醇、酸的含量通过 HPLC 定量分析, 具体方法参照以前的报道^[91]。色谱柱为 YMC-Pack ODS-A(150 mm \times 4.6 mm), 检测器为 SPD-20A 型 UV/Vis 紫外检测器, 检测器波长为 270 nm, 色谱柱的工作温度设置为 35 °C, 进样量为 20 μ L。

2.4 结果与讨论

2.4.1 油脂酵母利用木质纤维素水解液发酵生产微生物油脂

利用木质纤维素原料生产微生物油脂的一个重要前提是发酵菌株能够适应木质纤维素体系，以往的研究表明，大部分的油脂酵母都难以在木质纤维素水解液中生长，即使已经对所使用的经过预处理的木质纤维素原料进行了深度的生物脱毒处理。本研究认为酚醛抑制物的存在可能是导致该现象发生的原因，并对该猜测进行了验证。

为了评价油脂酵母在生物脱毒后的木质纤维素水解液中的细胞生长和油脂积累能力，我们选取了5株常见的油脂酵母：*T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MP11、*Y. lipolytica* DSM 3286、*R. glutinis* CGMCC 2.703、*R. toruloides* CGMCC 2.1609，在15%脱毒后麦秆水解液进行油脂发酵。对该麦秆水解液进行检测，糠醛、5-羟甲基糠醛(HMF)、乙酸、乙酰丙酸已经被完全去除(HPLC未检测出四种物质)，但是酚醛抑制物的含量仍然较高。HBA、香草醛、丁香醛是代表性的三种酚醛抑制物，也是与酚醛抑制物相关的研究中最主要的考察对象，其它酚醛抑制物的性质都分别与这三种酚醛抑制物类似。此外，预处理过程中产生的酚醛抑制物的成分十分复杂，许多组分的浓度很低，即使通过质谱等分析手段也难以检测出所有的酚醛抑制物。因此本研究只对所使用的麦秆水解液中的总酚和HBA、香草醛、丁香醛进行了定量分析，其它酚类化合物在此不进行探究。经过检测，总酚浓度为690.00 mg/L，三种典型的酚醛抑制物HBA、香草醛、丁香醛的浓度分别为60.21 mg/L、79.62 mg/L、30.34 mg/L（图2.1）。实际上，在预处理后的木质纤维素原料中，大部分的酚醛抑制物以固相形式存在，因此传统的物理、化学脱毒难以完全去除酚醛，生物脱毒法虽然可以完全去除酚醛，但是需要花费更高的时间成本，并且脱毒菌株会消耗麦秆原料中的木糖。因此，即使经过生物脱毒，仍有大量酚醛残留在麦秆原料中，在酶解过程中，固相中的酚醛会释放至液相中。

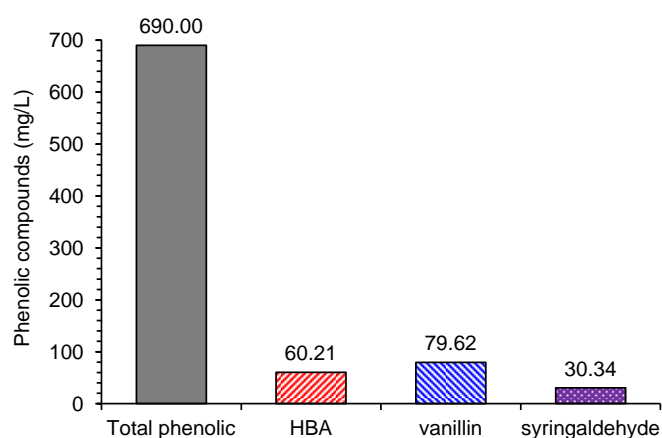


图 2.1 15%麦秆水解液中总酚、HBA、香草醛和丁香醛的浓度

Fig. 2.1 Contents of the total phenolics and the representative phenolics (HBA, vanillin and syringaldehyde) in the biotreated wheat straw hydrolysate

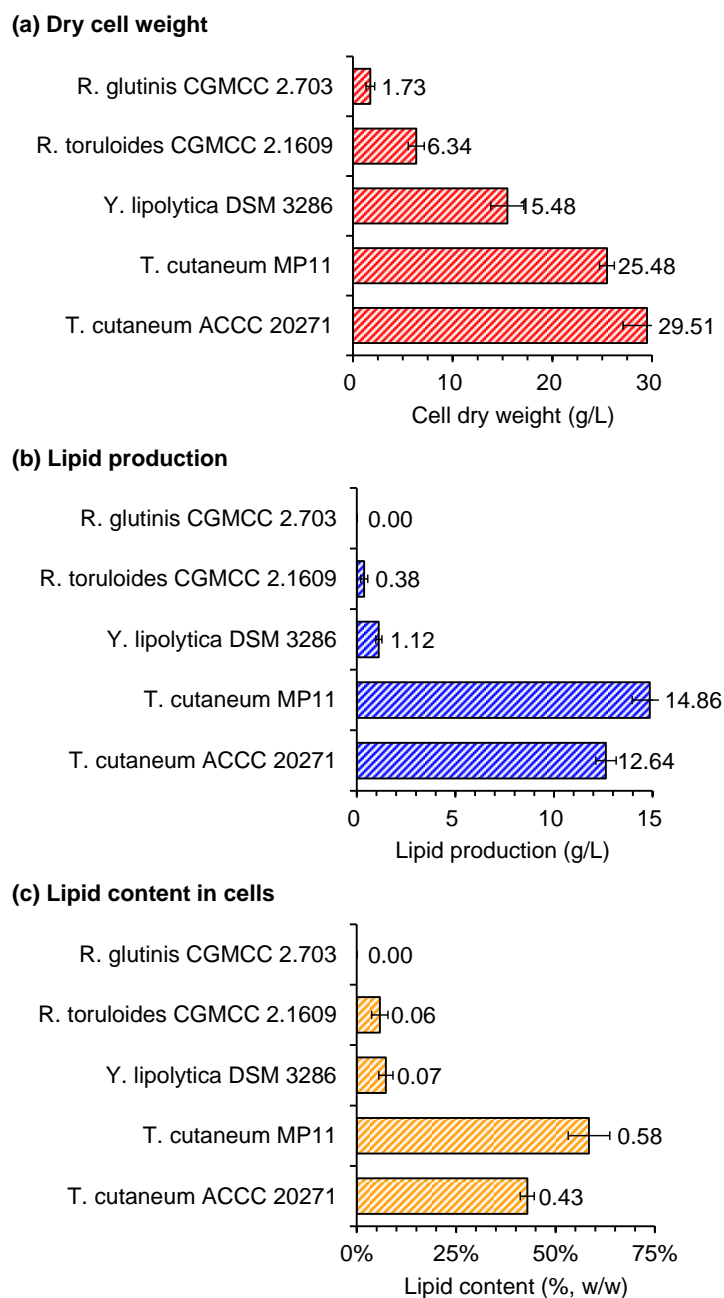


图 2.2 5 株油脂酵母在 15% 麦秆水解液中进行油脂发酵

Fig. 2.2 Lipid production by five oleaginous yeast in wheat straw hydrolysate at 15% (w/w) solids loading

(a): 细胞干重; (b): 油脂产量; (c): 含油率

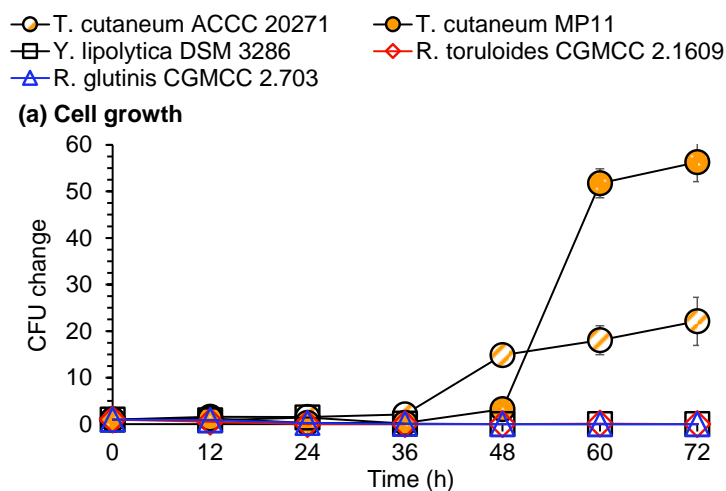
发酵条件: 温度为 30 °C, 初始 pH 调节为 5.0, 转速为 450 rpm/min, 通气量为 1 vvm

如图 2.2 所示, 5 株油脂酵母在麦秆水解液中的生长状况以及油脂产量存在明显差异。发酵 120 h 后, *T. cutaneum* ACCC 20271 的细胞干重、油脂产量分别达到 29.51 g/L、12.64 g/L; *T. cutaneum* MP11 的细胞干重、油脂产量为 25.48 g/L、14.86 g/L。而在相同的培养条件下, *Y. lipolytica* DSM 3286、*R. toruloides* CGMCC 2.1609、*R. glutinis* CGMCC 2.703 分别仅能得到 15.48 g/L、6.34 g/L 和 1.73 g/L 的细胞干重, 并且没有检测到明显的

油脂积累。实验结果表明 *Y.lipolytica* DSM 3286、*R.toruloides* CGMCC 2.1609、*R.glutinis* CGMCC 2.703 在麦秆水解液中的生长和油脂生产受到了明显抑制,而 *T.cutaneum* ACCC 20271 与 *T.cutaneum* MP11 在麦秆水解液中仍具有较高的生长和油脂积累能力。

2.4.2 酚醛抑制物对油脂酵母生长的影响

在以往的研究中,酚醛并不被认为是油脂发酵过程中的一种主要的抑制物,但是 2.4.1 的实验结果表明,在经过生物脱毒处理后仅含酚醛抑制物的麦秆水解液中,油脂酵母的生长受到了明显的抑制。为了进一步探究酚醛类抑制物对于油脂酵母生长的影响,我们选取了三种典型的酚醛:HBA、香草醛和丁香醛来代表木质纤维素来源的所有酚醛抑制物^[91,92],在含有上述三种酚醛抑制物的合成培养基中培养 5 株油脂酵母,设置三种酚醛抑制物的添加量分别设置为 0.8 g/L、0.8 g/L、0.6 g/L。酚醛抑制物对油脂酵母生长的影响如图 2.3 所示,在酚醛抑制物存在的情况下,5 株油脂酵母中只有 *T.cutaneum* ACCC 20271、*T.cutaneum* MP11 出现了明显的细胞生长。CFU 变化曲线显示了当酚醛抑制物存在时酵母细胞的生长过程(图 2.3 a)。*T.cutaneum* ACCC 20271、*T.cutaneum* MP11 在发酵开始 36 h 内 CFU 没有出现明显变化,此时酵母细胞处于生长延滞期,延滞期结束后 CFU 快速增长,并快速达到生长稳定期。而 *Y.lipolytica* DSM 3286、*R.glutinis* CGMCC 2.703、*R.toruloides* CGMCC 2.1609 三株油脂酵母在发酵 24 h 后 CFU 开始减少,72 h 后无 CFU 形成(稀释后涂板,无菌落生长)。5 株酵母的葡萄糖消耗曲线显示,*T.cutaneum* ACCC 20271、*T.cutaneum* MP11 在发酵 36 h 内仅消耗了少量的葡萄糖,36 h 后,糖耗速度显著提高,并快速消耗完 20 g/L 的葡萄糖;而 *Y.lipolytica* DSM 3286、*R.glutinis* CGMCC 2.703、*R.toruloides* CGMCC 2.1609 在发酵过程中几乎没有消耗葡萄糖(图 2.3 b),葡萄糖消耗与酵母细胞生长的情况类似。发酵结果显示酚醛对 5 种油脂酵母的细胞活力都存在明显的抑制,但 *T.cutaneum* ACCC 20271、*T.cutaneum* MP11 显示出了优于其它三株酵母的酚醛耐受性,结合 2.4.1 的实验结果可以得出酚醛抑制物是导致油脂酵母在木质纤维素体系中生长和代谢不良的主要原因。



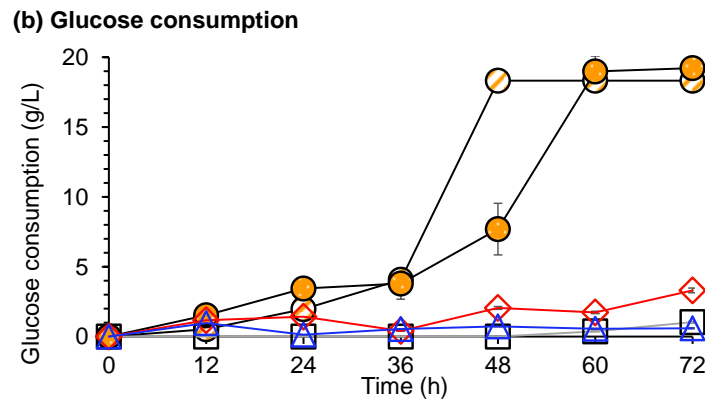


图 2.3 酚醛抑制物存在时油脂酵母的生长以及葡萄糖消耗

Fig. 2.3 CFU changes and glucose consumption of oleaginous yeast under the stress of phenolic aldehyde

(a): CFU changes: 菌株生长过程中 CFU 变化倍数 (取样时的 CFU 与 0 h CFU 的比值); (b): 发酵过程中的葡萄糖消耗 (初始葡萄糖浓度与取样时葡萄糖浓度的差值)

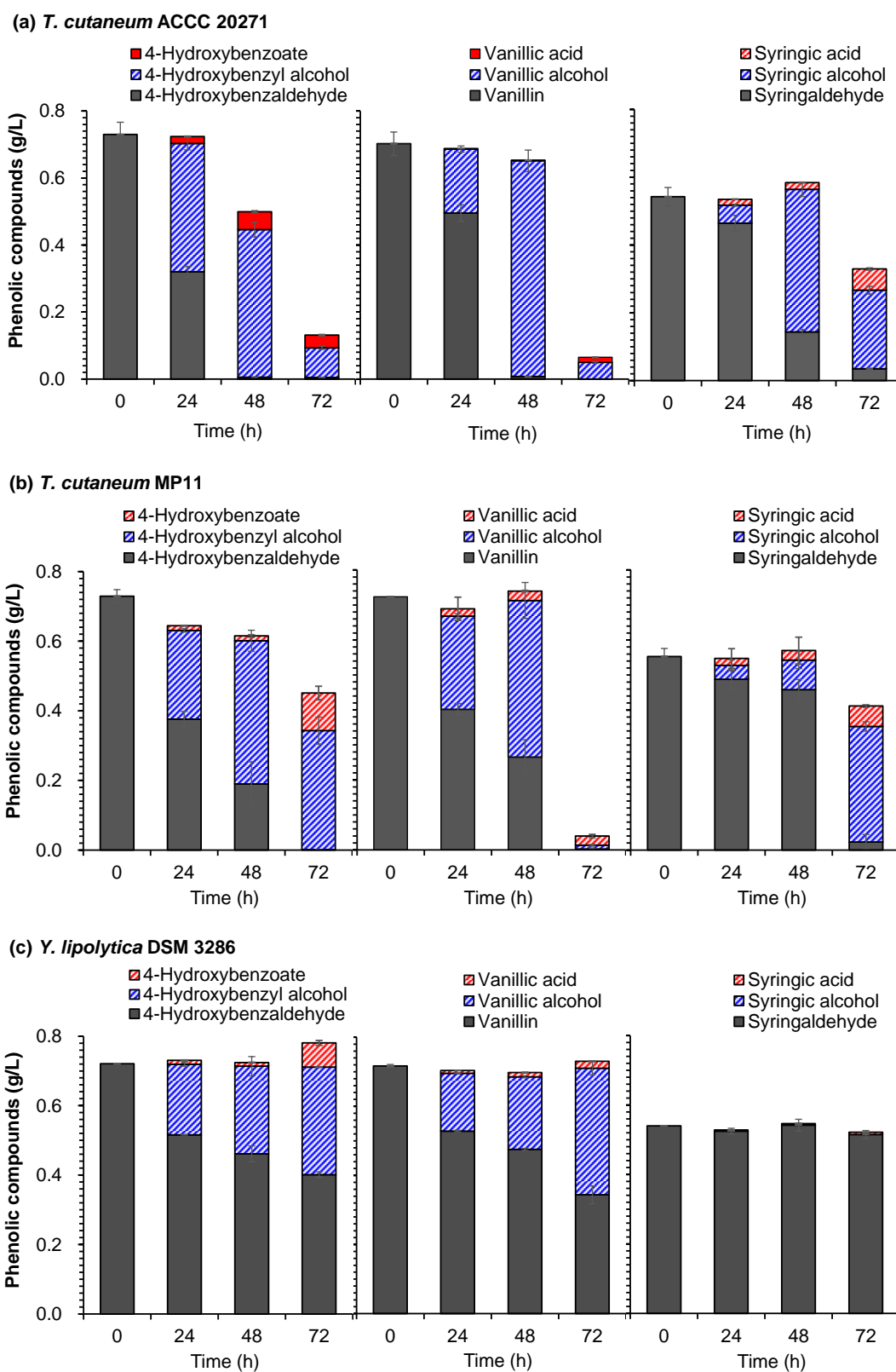
发酵条件: 发酵在含有 800 mL 合成培养基的 3 L 发酵罐中进行, 发酵温度为 30 °C, pH 控制在 5.0, 转速为 450 rpm/min, 通气量为 1 vvm

2.4.3 油脂酵母转化酚醛抑制物

微生物对抑制物的耐受性主要取决于其将毒性较强的抑制物转化为毒性较低的代谢物的能力^[91, 129], 并且微生物降解酚醛时遵循以下规则: 首先将酚醛转化为毒性较低的酚醇, 然后少量的酚醇重新转化为酚醛, 而酚醛则被快速地转化为酚酸; 某些微生物能够将酚酸进一步转化。前面的实验结果表明, 在酚醛抑制物存在时, 5 株油脂酵母的生长能力表现出了显著差异, 两株皮状丝孢酵母显示出优于其他三株酵母的生长能力, 这意味着它们的酚醛代谢能力存在差异。因此, 我们进一步探究了 5 株酵母转化三种典型酚醛抑制物的具体情况。

5 株油脂酵母对三种酚醛抑制物的转化情况如图 2.4 所示。发酵 24 h 时, *T. cutaneum* ACCC 20271 已经将部分的酚醛转化为其对应的醇、酸。发酵 48 h 时, *T. cutaneum* ACCC 20271 将 0.8 g/L 香草醛、0.8 g/L HBA 完全转化, 并且在后续过程中将醇、酸进一步降解, 发酵结束时, HBA 及其醇、酸的总含量约为 0.13 g/L, 香草醛及其醇、酸的总含量约为 0.06 g/L, 都远低于酚醛的初始浓度。*T. cutaneum* ACCC 20271 对丁香醛的转化与对香草醛和 HBA 的转化类似, 发酵 72 h 时, 丁香醛的浓度下降至 0.05 g/L 左右, 酚类物质的总含量从 0.56 g/L 降低至 0.33 g/L, 这说明 *T. cutaneum* ACCC 20271 对丁香醛的转化速率要明显低于 HBA 和香草醛, 这可能是由于丁香醛的芳香环上含有更多的甲氧基。*T. cutaneum* MP11 也表现出与 *T. cutaneum* ACCC 20271 相似的酚醛转化特性。发酵 72 h 时, 三种酚醛抑制物及其醇、酸的总含量都明显降低, 但是发酵液中残存的抑制物浓度更高, 这可能是由于 *T. cutaneum* MP11 的细胞膜较薄以及生长延滞期更长。该实验

结果说明 *T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MP11 能够将 HBA、香草醛和丁香醛转化为醇、酸的形式，然后进一步降解三种酚醛转化形成的酚酸。



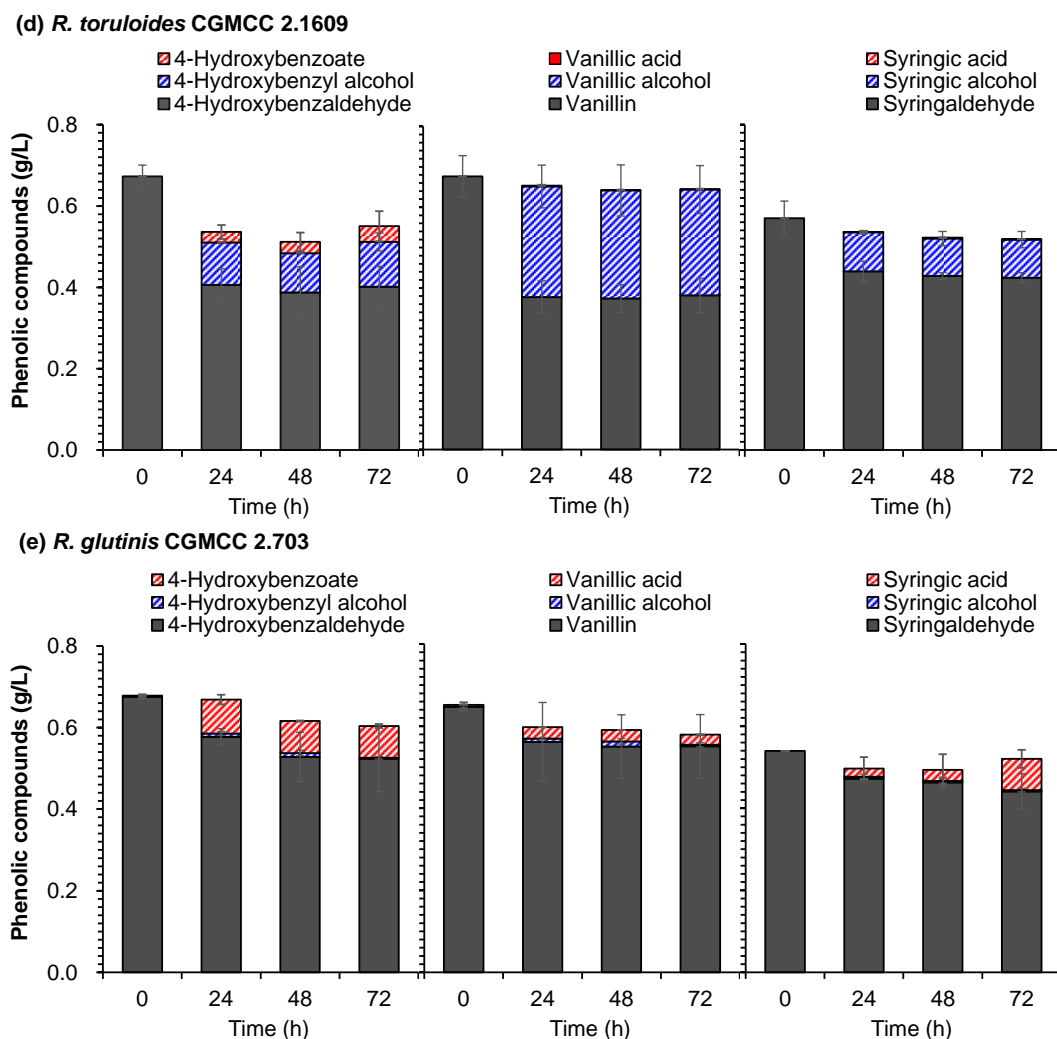


图 2.4 油脂酵母转化酚醛抑制物

Fig. 2.4 Bioconversion of phenolic aldehyde by oleaginous yeast

(a): *T. cutaneum* ACCC 20271; (b): *T. cutaneum* MP11; (c): *Y. lipolytica* DSM 3286; (d): *R. toruloides* CGMCC 2.1609; (e): *R. glutinis* CGMCC 2.703

发酵条件：发酵在含有 800mL 合成培养基的 3L 生物反应器中进行，发酵温度为 30 °C，pH 控制在 5.0，转速为 450 rpm/min，通气量为 1 vvm

Y. lipolytica DSM 3286、*R. toruloides* CGMCC 2.1609、*R. glutinis* CGMCC 2.703 的酚醛转化情况各不相同(图 2.4 c 至图 2.4 e)。发酵过程中，*Y. lipolytica* DSM 3286 能够将部分 HBA、香草醛转化为对应醇、酸，但是几乎未对丁香醛进行转化；*R. toruloides* CGMCC 2.1609 能将部分 HBA 转化为对应的醇、酸，但只能将香草醛、丁香醛转化为醇的形式；*R. glutinis* CGMCC 2.703 能将少量的 HBA、香草醛转化为其醇、酸的形式，但是仅能将少量的丁香醛转化为其酸的形式。虽然这三株酵母转化酚醛抑制物的能力存在差异，但是发酵结束时都存在大量的酚醛未被转化，并且三种化合物的总量没有减少，这意味着它们不能像 *T. cutaneum* (ACCC 20271 和 MP11) 那样进一步转化 4-羟基苯甲

酸、香草酸和丁香酸。实验结果说明这三株油脂酵母都具有一定的将醛转化为醇、或者酸的能力，但是转化效率较低，并且不能将酚酸进一步转化，因此不能消除酚醛抑制物对细胞的毒性，残存的抑制物抑制了菌株的生长。

2.4.4 皮状丝孢酵母代谢酚醛路径的推测

大多数微生物耐受酚醛类抑制物的生理机制主要是在醇脱氢酶等功能酶介导的氧化还原反应下将毒性较强的醛还原成为毒性较低的醇，同时将醛氧化为毒性较低的酸，以此来降低醛类化合物对自身的影响。但是某些微生物能够将进一步代谢酚酸，最终生成 TCA 循环中的某种化合物或者其他的无毒性代谢物。Hu 等^[91]对 *T. cutaneum* ACCC 20271 转化 HBA、香草醛、丁香醛的具体情况进行了探究。当 *T. cutaneum* ACCC 20271 分别以 HBA、香草醛、丁香醛为唯一碳源时，HBA 首先被转化为其对应的醇或酸，然后 4-羟基苯甲酸被进一步转化，香草醛和丁香醛的转化与 HBA 类似，但是香草酸和丁香酸并未被进一步转化，而是在发酵液中积累。在后续的实验中，以 HBA 为唯一碳源进行了为期 20 天的分批补料发酵，*T. cutaneum* ACCC 20271 积累了 0.85 g/L 的油脂，这证明了 *T. cutaneum* ACCC 20271 具有一条能够将 4-羟基苯甲醛转化为乙酰辅酶 A 的代谢通路。由于缺乏 *T. cutaneum* 的基因敲除工具，只能结合现有的文献报道、*T. cutaneum* ACCC 20271 的基因组信息以及实验结果推测酚醛可能存在的代谢路径。

T. cutaneum ACCC 20271 能以 HBA 为唯一碳源进行生长和油脂积累。但是作为培养基中添加的唯一碳源时，香草醛或丁香醛最终都只能被 *T. cutaneum* ACCC 20271 转化为香草酸和丁香酸，并不能充当生长代谢可利用的碳源。在本研究中，我们发现在葡萄糖存在的条件下 *T. cutaneum* 不仅能够将香草醛、丁香醛转化为香草酸、丁香酸，而且能将香草酸、丁香酸进一步降解。于是接下来的研究主要是为了探究 *T. cutaneum* ACCC 20271 能否将香草醛和丁香醛转化为微生物油脂。之前在 2.4.3 中，转化酚醛的实验结果表明皮状丝孢酵母转化香草醛的速率明显高于丁香醛，因此选取香草醛进行了分批补料发酵。补料策略在 2.3.2 进行了详细描述，经过 224 h 的分批补料后，实验组共添加了 45 g/L 葡萄糖和 9 g/L 的香草醛，对照组共添加了 45 g/L 葡萄糖。发酵结果显示，*T. cutaneum* ACCC 20271 能够在 20 h 内将每次添加的香草醛降解，并且每次补料前几乎没有香草醛及其醇、酸的积累。通过与没有添加抑制物的对照组对比，额外添加香草醛的实验组的细胞干重、油脂产量和含油率都远低于对照组，这说明香草醛不能被 *T. cutaneum* ACCC 20271 转化为生长和油脂积累所用的碳源。在发酵结束后，可以观察到发酵液的颜色由淡黄色变成黑色（降解丁香醛时存在类似的发酵现象），这与 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行正常油脂发酵的现象不同。结合分批补料发酵结果和上述实验现象，推测香草醛、丁香醛并没有被 *T. cutaneum* ACCC 20271 进一步转化为乙酰辅酶 A，而有可能被转化为某种黑色素或者黑色素前体，我们尝试通过有机溶剂萃取和盐酸洗涤等方法提取该种色素，获得了一种暗红色的固体，该固体易溶于乙醇、丙酮和碱性液体，微溶于氯仿，但

是最终仍没有鉴定出该固体的组成。基于已知报道中对酚醛代谢路径的研究^[91, 122]、*T. cutaneum* ACCC 20271 的基因组信息以及以上实验结果和现象，对皮状丝孢酵母转化 HBA、香草醛、丁香醛的代谢路径进行了合理地推测（图 2.6）。皮状丝孢酵母首先通过酶催化的可逆反应将 HBA、香草醛和丁香醛还原为醇的形式，使醛类的浓度处于较低水平，然后通过不可逆反应进一步将醛氧化为酸的形式。接下来，4-羟基苯甲酸通过原儿茶酸开环途径打开苯环，然后经过 β -酮己二酸路径转化为脂肪酸合成的前体乙酰辅酶 A。与 4-羟基苯甲酸不同，香草酸和丁香酸可能被转化为邻苯二酚，然后邻苯二酚被进一步转化为某种黑色素前体。由于皮状丝孢酵母的基因敲除工具仍未成功构建，目前仍不能通过分子生物学手段对该路径进行验证。

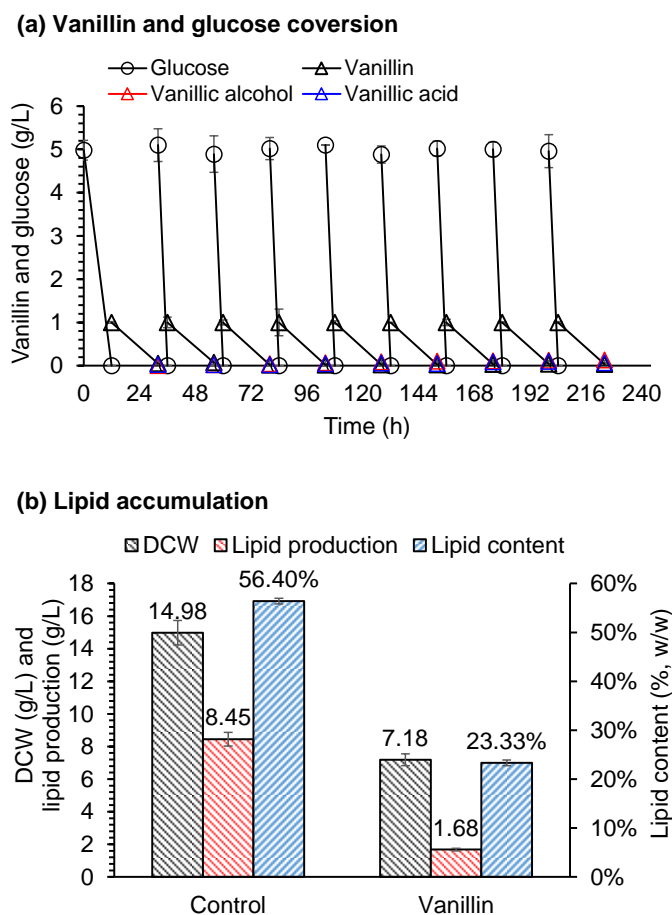


图 2.5 *T. cutaneum* ACCC 20271 以香草醛、葡萄糖为碳源进行分批补料发酵

Fig. 2.5 Lipid production of *T. cutaneum* ACCC 20271 by feed batch while vanillin and glucose was used for carbon source

(a): 香草醛转化以及葡萄糖消耗; (b): 实验组和对照组的细胞干重、油脂产量和含油率
 发酵条件: 温度为 30 °C, pH 控制在 5.0, 转速为 450 rpm/min, 通气量为 1 vvm

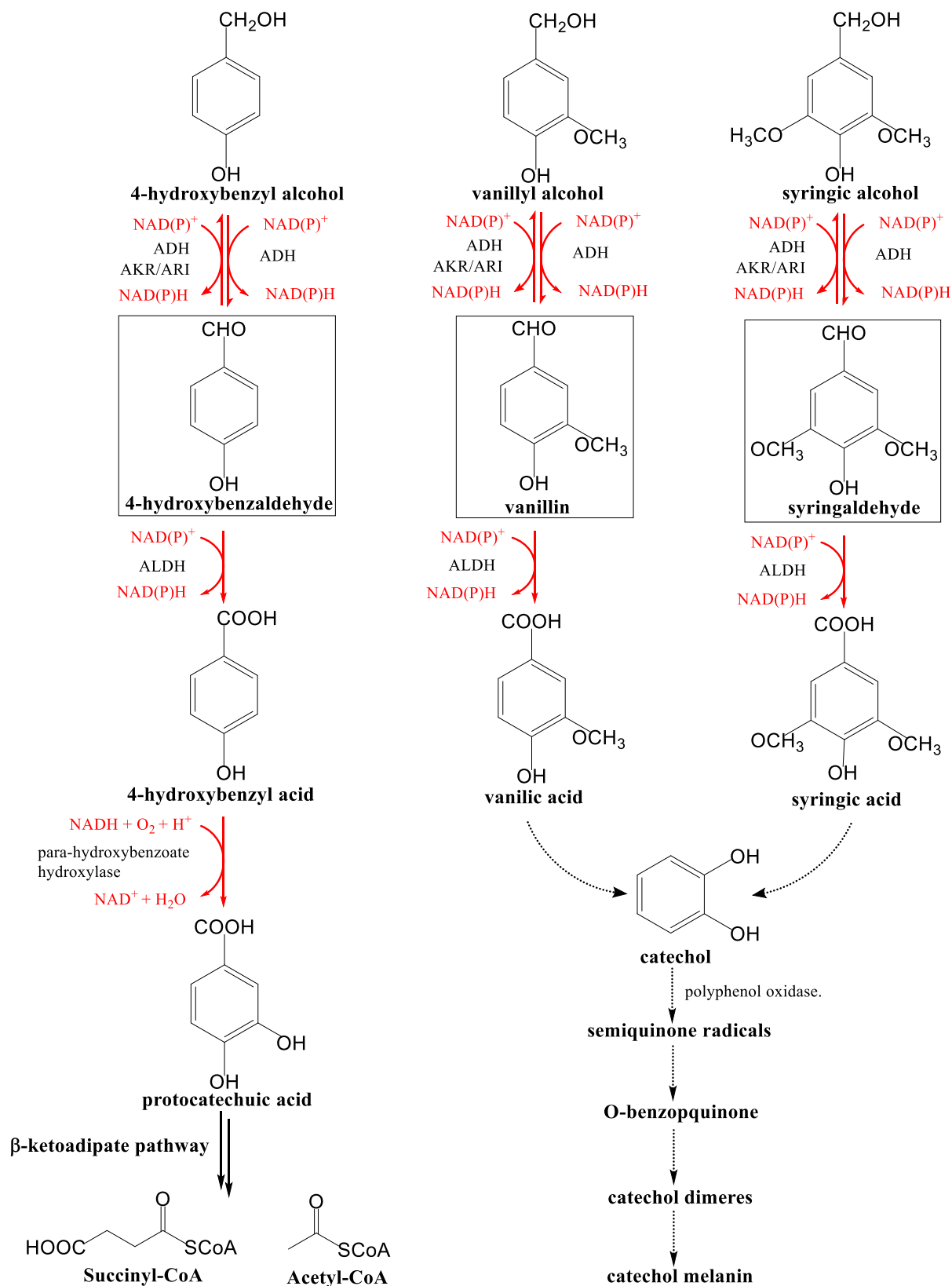


图 2.6 *T. cutaneum* ACCC 20271 降解 4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛的推测路径

Fig. 2.6 Putative degradation pathways of 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, and syringaldehyde by *T.*

cutaneum ACCC 20271

2.4.5 酚醛抑制物对皮状丝孢酵母油脂发酵的影响

前面的实验结果表明 *T. cutaneum* ACCC 20271 和 *T. cutaneum* MP11 都具有较强的酚醛抑制物耐受性，并且存在三种代表性酚醛抑制物的代谢途径。因此，进一步探究酚醛抑制物对 *T. cutaneum* ACCC 20271 和 *T. cutaneum* MP11 油脂积累能力的影响。在本阶段的实验中，合成培养基中葡萄糖的浓度设置为 60 g/L，对照组不添加任何抑制物，实验组分别添加 0.8 g/L HBA、0.8 g/L 香草醛和 0.6 g/L 丁香醛。

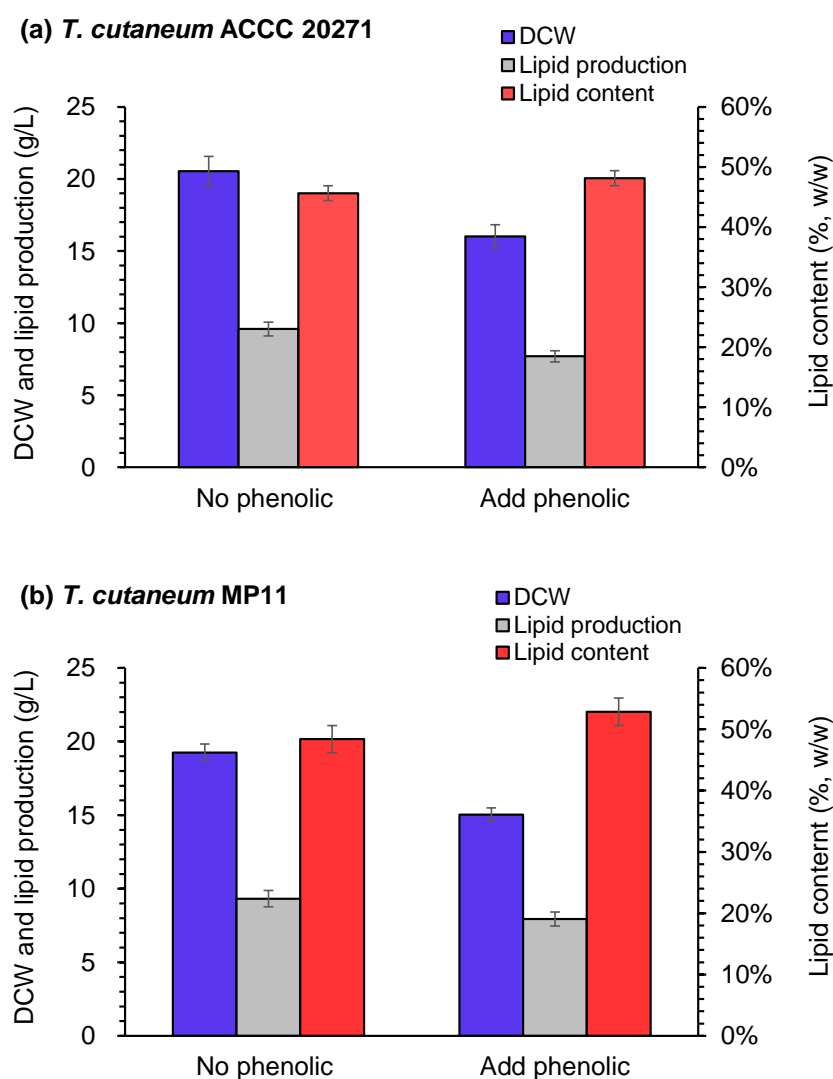


图 2.7 酚醛胁迫下 *T. cutaneum* 的油脂发酵评价

Fig. 2.7 Fermentation evaluation of *T. cutaneum* in the presence of phenolic aldehyde

(a): *T. cutaneum* ACCC 20271 的细胞干重、油脂产量和含油率；(b): *T. cutaneum* MP11 的细胞干重、油脂产量和含油率

发酵条件：30 °C，200 rpm，发酵 120 h，初始 pH 调节为 5.0

实验结果如图 2.7 所示, 发酵 120 h 后, *T. cutaneum* ACCC 20271 在无酚醛抑制物添加时所得到的细胞干重和油脂产量分别为 20.54 g/L、9.59 g/L, 添加酚醛抑制物后所得到的细胞干重和油脂含量分别为 16.02 g/L、7.70 g/L, 酚醛抑制物的存在使 *T. cutaneum* ACCC 20271 的细胞生长和油脂产量分别降低了 22.01%、19.71%; *T. cutaneum* MP11 在无酚醛抑制物添加时所得到的细胞干重和油脂产量分别为 19.26 g/L、9.32 g/L, 添加酚醛抑制物后所得到的细胞干重和油脂含量分别为 15.03 g/L、7.93 g/L, 酚醛抑制物的存在使 *T. cutaneum* MP11 的细胞生长和脂肪产量分别降低了 21.96%、14.91%。然而与添加了酚醛的对照组相比, 当酚醛存在时 *T. cutaneum* ACCC 20271 和 *T. cutaneum* MP11 的含油率并没有下降, 反而略微高于对照组。实验结果说明酚醛抑制物虽然对 *T. cutaneum* 的生长存在一定的抑制作用, 但是并没有对脂质代谢途径产生负面影响, 油脂产量的下降是由于细胞生物量的下降而非油脂积累能力的变化。发酵结束后, 在发酵液中并没有检测到酚醛抑制物和葡萄糖。在对照组和实验组中, 两株皮状丝孢酵母消耗量相同含量的葡萄糖, 但是细胞生物量和油脂产量都明显下降, 结合 2.4.4 的实验结果, 推测皮状丝孢酵母在代谢香草醛和 (或) 丁香醛的过程中需要消耗大量的 NADPH。

2.4.6 同步糖化共发酵评价皮状丝孢酵母在实际体系中的发酵性能

从上面的实验结果可以看出, 皮状丝孢酵母在酚醛抑制物存在时仍具有良好的油脂积累能力, 但是木质纤维素炼制微生物油脂的实际过程与在合成培养基中进行的油脂发酵存在较大的差距。在微生物油脂生产的实际过程中, 为了降低后续的分离合成的成本, 通常采用高固体含量的同步糖化共发酵来得到高浓度的油脂, 但高固体含量的木质纤维素生物质中含有更多的不溶性酚醛抑制物。在同步糖化共发酵过程中, 酚醛会不断地从固相溶解至液相中, 这意味着酚醛会对菌株产生持续的影响^[130], 因此同步糖化共发酵对菌株的耐受性有更高的要求。为了评价皮状丝孢酵母在实际体系中的发酵性能, 选取皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 为发酵菌株, 并以 30% 固含量的经过预处理和生物脱毒的麦秆为底物进行同步糖化共发酵生产油脂。

经过 12 h 的预糖化, 原料中以寡糖形式存在的木糖完全酶解成单体, 而纤维素中的葡萄糖被部分释放, 这避免了高浓度葡萄糖对菌株产生的抑制。实验结果如图 2.8 所示, 发酵前 24 h, *T. cutaneum* MP11 处于生长延滞期。发酵 24 h 后, *T. cutaneum* MP11 开始积累油脂, 此时葡萄糖含量开始下降 (可利用的纤维素全部被酶解成单糖)。发酵 48 h 后, *T. cutaneum* MP11 开始消耗木糖。发酵 120 h 后, 木糖和葡萄糖完全被耗尽, 此时 *T. cutaneum* MP11 积累了 40.87 g/L 的油脂。该实验结果表明, 在高固体含量的木质纤维素体系中, *T. cutaneum* MP11 仍具有较强的油脂合成能力, *T. cutaneum* MP11 是一株极有潜力的能够应用于木质纤维素油脂生产的油脂酵母。

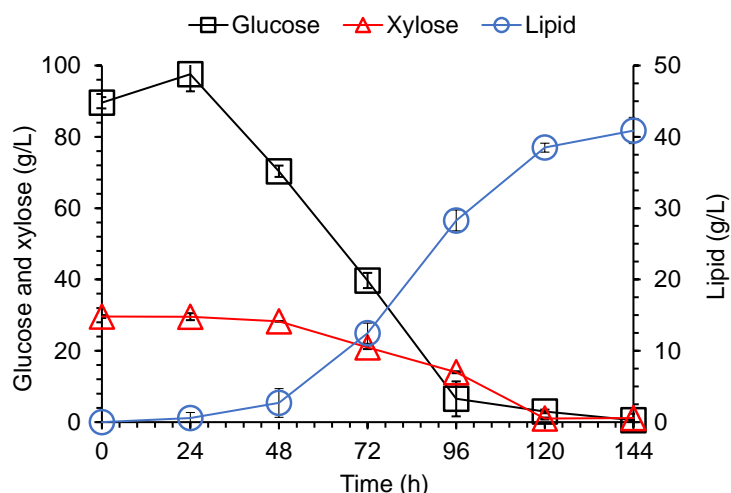


图 2.8 同步糖化共发酵评价 *T. cutaneum* MP11 的油脂发酵性能评价

Fig. 2.8 Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of *T. cutaneum* MP11 for lipid production

发酵条件: 30°C, 450 rpm/min, pH 控制在 5.0, 通气量为 1 vvm

2.5 小结

本章主要探究了酚醛抑制物对油脂酵母的生长和油脂积累的影响, 比较了 5 株油脂酵母转化酚醛抑制物的能力, 评价了皮状丝孢酵母在木质纤维素体系中的油脂积累能力。详细结论如下:

(1) 在经过生物脱毒去除呋喃醛和有机酸类抑制物后的麦秆水解液中进行油脂发酵时, *Y. lipolytica* DSM 3286、*R. glutinis* CGMCC 2.703、*R. toruloides* CGMCC 2.1609 几乎不能生长并且没有出现明显的油脂积累, 而 *T. cutaneum* ACCC 20271 和 *T. cutaneum* MP11 仍具备较高的生长和油脂积累能力。在含有三种典型的酚醛抑制物 (HBA、香草醛和丁香醛) 的合成培养基中培养油脂酵母时, *T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MP11 在经过 36 h 的延滞期后开始生长并快速到达生长稳定期, 而 *Y. lipolytica* DSM 3286、*R. glutinis* CGMCC 2.703、*R. toruloides* CGMCC 2.1609 几乎不能生长, 以上结果证实了酚醛抑制物是经过脱毒的麦秆水解液中影响油脂酵母生长的主要因素。并且在上述实验中, *T. cutaneum* ACCC 20271 和 *T. cutaneum* MP11 被证明具有良好的酚醛抑制物耐受性。

(2) 在含有三种典型的酚醛抑制物的合成培养基中培养油脂酵母, 并检测发酵过程中酚醛以及对应醇、酸的含量。*T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MP11 可以将全部的酚醛转化为其对应醇、酸, 然后将酚酸进一步转化, 而 *Y. lipolytica* DSM 3286、*R. glutinis* CGMCC 2.703、*R. toruloides* CGMCC 2.1609 仅能将少量酚醛转化为酚醇或酚酸。

(3) 分批补料发酵的结果显示皮状丝孢酵母不能将香草酸和丁香酸转化为微生物油脂。对皮状丝孢酵母的酚醛代谢路径进行了推测, HBA 可以被转化为乙酰辅酶 A, 而

香草醛和丁香醛可能被转化为某种黑色素前体。

(4) 酚醛抑制物虽然对皮状丝孢酵母的生长存在一定的抑制作用，但是对皮状丝孢酵母的油脂含量无负面影响。以小麦秸秆为原料在高固含量下进行了同步糖化与共发酵，*T. cutaneum* MP11 可以耐受酚醛的持续抑制，并积累了 40.85 g/L 的微生物油脂。

第3章 皮状丝孢酵母利用木质纤维素来源的有机酸生产微生物油脂

3.1 引言

乙酸、乙酰丙酸是来源于木质纤维素预处理过程中有机酸类抑制物的主要成分。它们在预处理后的木质纤维素原料中浓度较高、且易溶于水，因此乙酸、乙酰丙酸通常在脱毒过程中被去除。除此以外，乙酸还是工业废弃物和城市固废中挥发性有机酸的主要成分之一，这些短链有机酸的分离纯化十分困难，因此不具备任何的工业应用价值。因此，乙酸、乙酰丙酸可以作为微生物油脂生的廉价碳源，并且它们也是微生物脂质积累的优质碳源。乙酸在乙酰辅酶 A 合成酶的作用下直接被转化为乙酰辅酶 A，乙酰丙酸通过 5 步酶促反应可以被转化为乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A，它们被微生物转化为乙酰辅酶 A 的代谢路径较短，合成微生物油脂的效率要高于葡萄糖和木糖等常规碳源，可以作为微生物油脂生产的补充原料。

T. cutaneum MP11 是以 *T. cutaneum* ACCC 20271 为出发菌株通过超离心筛选得到的一株高产油脂酵母，可在高浓度的酚醛抑制物存在时进行油脂发酵，在木质纤维素体系中有较强的油脂积累能力，是一株极有应用前景的微生物油脂工业化生产的油脂酵母。先前的研究表明皮状丝孢酵母可以将酚醛抑制物中的 HBA 转化为微生物油脂。在本章中，我们探究了 *T. cutaneum* MP11 利用乙酸、乙酰丙酸进行微生物油脂生产的可行性，该研究扩大了 *T. cutaneum* MP11 的底物广谱性、为木质纤维素来源的非常规碳源的利用和后续的研究提供了理论依据。

本章主要实验内容如下：（1）分别探究了乙酸、乙酰丙酸对 *T. cutaneum* MP11 生长的影响和 *T. cutaneum* MP11 代谢乙酸、乙酰丙酸的能力；（2）以葡萄糖和乙酸或葡萄糖和乙酰丙酸为碳源进行分批补料发酵，探究了 *T. cutaneum* MP11 利用乙酸和乙酰丙酸合成微生物油脂的能力；（3）进行分批补料发酵，探究 *T. cutaneum* MP11 以乙酸或乙酰丙酸为唯一碳源进行油脂发酵的能力。

3.2 实验材料

发酵菌株：皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* MP11 (菌种保藏号为 CGMCC 20481)，目前保存在中国普通微生物菌种保藏管理中心。

YPD 培养基：20 g/L Glucose, 20 g/L Tryptone, 10 g/L Yeast Extract；其固体培养基添加 2 % Agar。

合成培养基：1.0 g/L Yeast Extract, 1.0 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.22 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Glucose (0 g/L 或 10 g/L)，以及乙酸或乙酰丙酸。

3.3 实验方法

3.3.1 种子培养

菌种在-80 °C 的超低温冰箱中保存，取适量冻存管中的菌液涂布在 YPD 平板上，30 °C 下培养 36 h，挑取单菌落接种于含 20 mL YPD 液体培养基中，30 °C、180 rpm 下培养 20 h，然后按照 10 %接种量转入含 50 mL YPD 液体培养基中，于 30 °C、180 rpm 下培养 20 h 培养 16 h。

3.3.2 *T. cutaneum* MP11 降解乙酸、乙酰丙酸

发酵在含有 50 mL 合成培养基的 500 mL 摇瓶中进行，合成培养基中加入不同浓度的乙酸、乙酰丙酸，浓度设置为 1.5 g/L 乙酸；3.0 g/L 乙酸；2 g/L 乙酰丙酸；4 g/L 乙酰丙酸；0.75 g/L 乙酸和 1 g/L 乙酰丙酸；1.5 g/L 乙酸和 2 g/L 乙酰丙酸。发酵在 30 °C、180 rpm/min 下进行，初始 pH 调节为 5.0，每隔 8 h 调节 pH。每隔 12 h 取样检测。

3.3.3 微生物油脂发酵

(1) 验证 *T. cutaneum* MP11 利用乙酸、乙酰丙酸积累微生物油脂

分批补料发酵在含有 1 L 合成培养基的 3 L 发酵罐中进行，实验分为 4 组，对照组无乙酸、乙酰丙酸添加，其余两组分别补料乙酸、乙酰丙酸。合成培养基中初始葡萄糖浓度为 10 g/L，后续不补加葡萄糖。根据溶氧水平决定补料的时间（溶氧上升并开始稳定时）。发酵在 30 °C、450 rpm/min、1 vvm 下进行，发酵过程中用 5 mol/L NaOH 和 4 mol/L HCl 溶液将 pH 值维持在 5.0。每次补料时取样检测乙酸或乙酰丙酸的浓度，发酵结束后测定油脂浓度。

(2) *T. cutaneum* MP11 以乙酸、乙酰丙酸为单一碳源生产微生物油脂

分批补料发酵在含有 1 L 合成培养基的 3 L 发酵中进行，实验分为 4 组，对照组无乙酸、乙酰丙酸添加，其余三组分别补料乙酸、乙酰丙酸、乙酸和乙酰丙酸。合成培养基中初始葡萄糖浓度为 0 g/L，后续不补加葡萄糖。根据溶氧水平决定补料的时间。发酵在 30 °C、450 rpm/min、1 vvm 下进行，pH 值维持在 5.0。发酵结束后测定油脂浓度。

3.3.4 细胞生长测定和油脂提取

OD₆₀₀: 取 1mL 菌液离心后去上清，用 1mL 超纯水重悬菌体，使用紫外分光光度计在 600 nm 处测量吸光度。

细胞干重和油脂提取的详细操作请参考 2.3.3、2.3.4。

3.3.5 HPLC 检测

乙酸、乙酰丙酸和葡萄糖的测定方法参照 2.3.6。

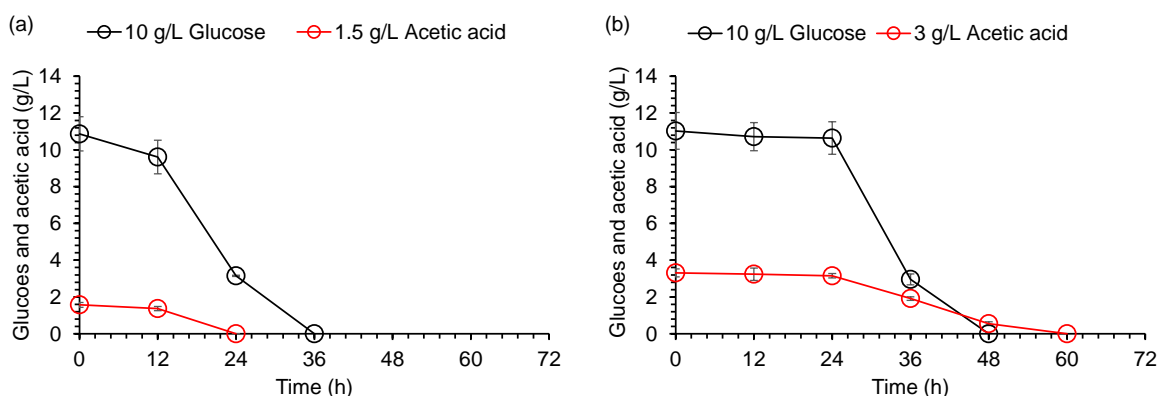
3.4 结果与讨论

3.4.1 *T. cutaneum* MP11 代谢乙酸、乙酰丙酸

在以前的研究中，并没有探究过 *T. cutaneum* MP11 代谢乙酸、乙酰丙酸的具体情况。

因此首先通过摇瓶实验验证 *T. cutaneum* MP11 代谢乙酸、乙酰丙酸的能力。乙酸、乙酰丙酸此类弱酸的细胞毒性与其质子化程度相关，乙酸的 pKa 值为 4.76，乙酰丙酸的 pKa 值为 4.65，而 *T. cutaneum* MP11 生长的最优 pH 为 5.0，因此在 *T. cutaneum* MP11 生长的液体环境中，高比例的未解离的乙酸和乙酰丙酸会对 *T. cutaneum* MP11 产生较强的抑制。

实验结果如图 3.1 所示，1.5 g/L 的乙酸没有对 *T. cutaneum* MP11 的葡萄糖消耗速率产生明显的抑制作用，并且此时 *T. cutaneum* MP11 的生长也没有受到明显的影响。当乙酸浓度从 1.5 g/L 增加到 3 g/L 时，*T. cutaneum* MP11 开始消耗葡萄糖的时刻后移，说明此时菌株的生长延滞期已经延长，但是延滞期结束后细胞开始快速消耗葡萄糖，并开始消耗乙酸，这说明 3 g/L 的乙酸已经对 *T. cutaneum* MP11 产生了明显的抑制，而 *T. cutaneum* MP11 可以通过消耗乙酸来降低其对菌株的影响。以上实验结果说明低浓度的乙酸并不会对 *T. cutaneum* MP11 产生明显的抑制作用，并且 *T. cutaneum* MP11 能够降解乙酸。乙酰丙酸的降解情况与乙酸略有不同，*T. cutaneum* MP1 降解乙酰丙酸的速率远低于乙酸。当乙酰丙酸浓度从 2 g/L 提高至 4 g/L 时，*T. cutaneum* MP1 的葡萄糖消耗速率并未发生明显变化，并且 2 g/L 的乙酰丙酸几乎没有影响菌株生长。与添加 3 g/L 乙酸时 *T. cutaneum* MP11 的生长状况相比，4 g/L 的乙酰丙酸对菌株生长的影响明显较低，这说明乙酰丙酸对 *T. cutaneum* MP11 的细胞毒性要低于乙酸。并且实验结果显示只有当葡萄糖浓度降低至一定浓度时（约 5 g/L），*T. cutaneum* MP11 才开始降解乙酰丙酸。



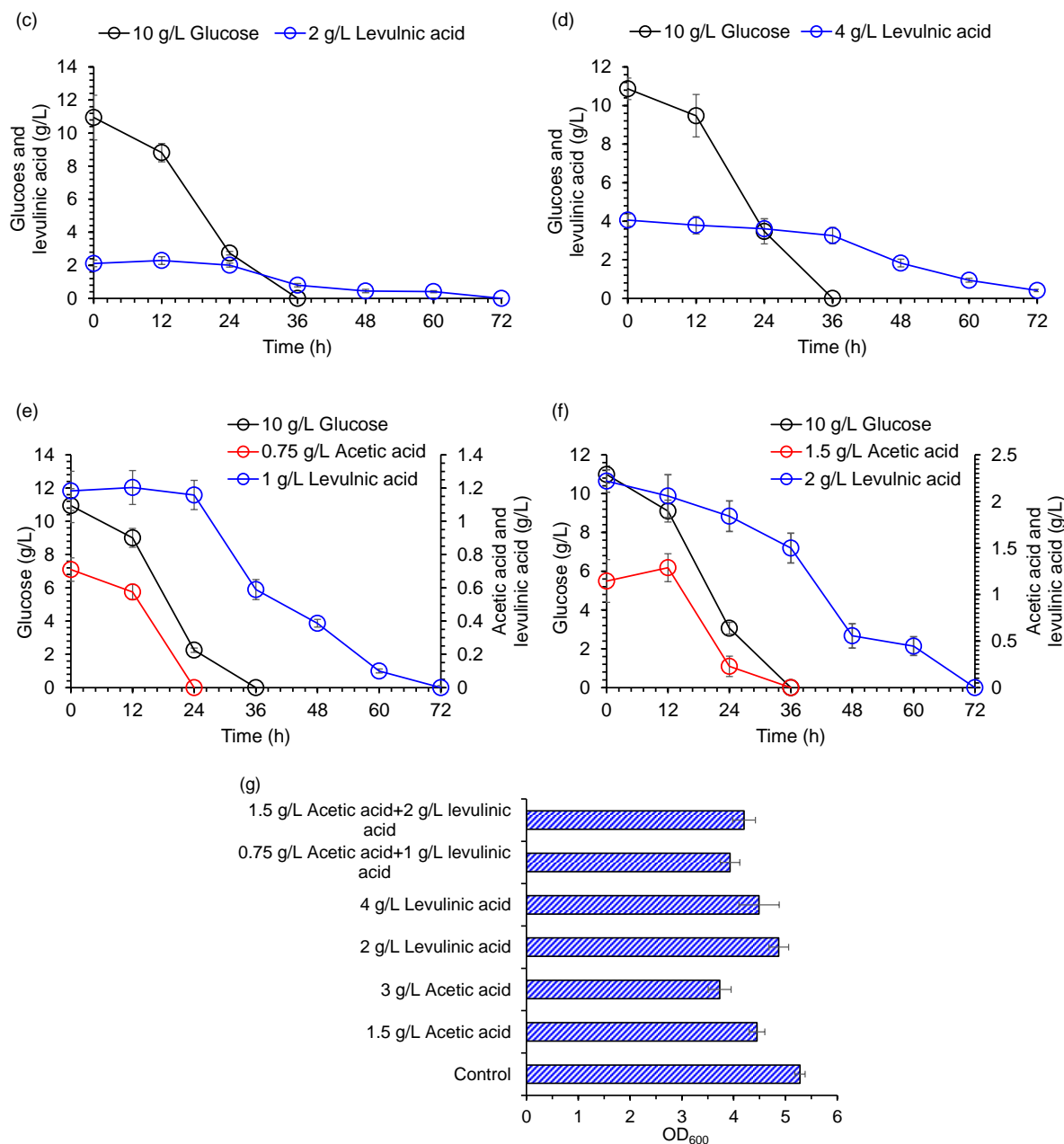


图 3.1 *T. cutaneum* MP11 代谢乙酸、乙酰丙酸能力的验证

Fig. 3.1 The bioconversion of acetic acid and levulinic acid by *T. cutaneum* MP11

- (a): 培养基中添加 1.5 g/L 乙酸; (b): 培养基中添加 3 g/L 乙酸; (c): 培养基中添加 2 g/L 乙酰丙酸;
 (d): 培养基中添加 4 g/L 乙酰丙酸; (e): 培养基中添加 0.75 g/L 乙酸和 1 g/L 乙酰丙酸;
 (f): 培养基中添加 1.5 g/L 乙酸和 2 g/L 乙酰丙酸; (g): 发酵结束时的菌体浓度

3.4.2 验证 *T. cutaneum* MP11 以乙酸、乙酰丙酸为碳源生产微生物油脂

3.4.1 的实验结果显示, *T. cutaneum* MP11 能够降解乙酸或者乙酰丙酸, 但是尚不清楚 *T. cutaneum* MP11 是否能够将乙酸或乙酰丙酸转化为胞内油脂。因此接下来的实验是为了验证 *T. cutaneum* MP11 是否能以乙酸或者乙酰丙酸为碳源积累油脂。之前对降解乙

酸的实验结果（图 3.1）表明，1.5 g/L 的乙酸不会对 *T. cutaneum* MP11 的生长产生明显的抑制作用，因此在接下来的补料过程中，每次添加的乙酸浓度约为 1.5 g/L，连续添加 5 次后乙酸的总量为 8.7 g/L。如图 3.2 所示，*T. cutaneum* MP11 能够将每次添加的乙酸完全消耗，分批补料发酵结束时得到的细胞干重、油脂产量和含油率分别为 8.36 g/L、3.15 g/L、37.67%，而对照组的细胞干重、油脂产量和含油率分别为 6.01 g/L、1.74 g/L、28.88%，分批补料发酵得到结果都要明显高于对照组。与以乙酸为底物进行分批补料发酵时的补料方式相同，每次补料时添加的乙酰丙酸浓度约为 3 g/L（该浓度下的乙酰丙酸不会对 *T. cutaneum* MP11 的生长产生明显抑制），连续添加 2 次后乙酰丙酸总量为 9.4 g/L。如图 3.2 所示，*T. cutaneum* MP11 能够将每次添加的乙酰丙酸完全消耗，分批补料发酵最终得到的细胞干重、油脂产量和含油率分别为 7.89 g/L、2.80 g/L、35.47%，都要明显高于对照组。以上结果说明 *T. cutaneum* MP11 能够将乙酸、乙酰丙酸转化为微生物油脂。

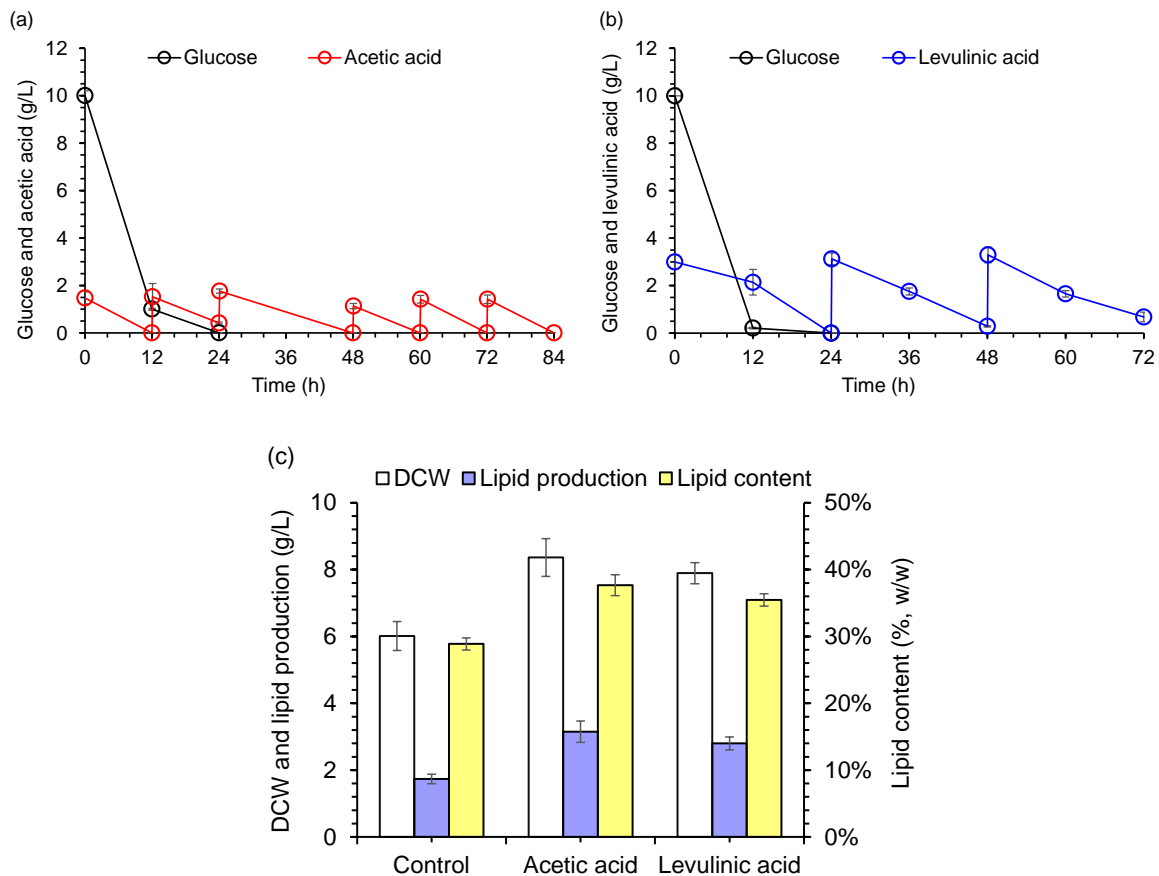


图 3.2 分批补料发酵验证 *T. cutaneum* MP11 利用乙酸、乙酰丙酸积累微生物油脂

Fig. 3.2 To verify the lipid production of *T. cutaneum* MP11 by feeding acetate or levulinate

(a): 以乙酸为碳源进行分批补料发酵；(b): 以乙酰丙酸为碳源进行分批补料发酵；(c): 三组发酵结束时得到的细胞干重、油脂产量和含油率

上述实验证明了 *T. cutaneum* MP11 可以将乙酸、乙酰丙酸转化为微生物油脂，于是在接下来的实验中，进一步探究了 *T. cutaneum* MP11 以乙酸、乙酰丙酸为唯一碳源时的发酵情况。每次补料时添加的乙酸的浓度约为 1.5 g/L、乙酰丙酸的浓度约为 2.5 g/L。实验结果如图 3.3 所示。以乙酸为唯一碳源时，连续补料 6 次，共添加了 10.1g/L 的乙酸，发酵结束时无乙酸残留，油脂产量为 1.21 g/L。以乙酰丙酸为唯一碳源时，连续补料 4 次，共添加了 11.9 g/L 的乙酰丙酸，发酵结束时无乙酰丙酸残留，油脂产量为 1.08 g/L。本节实验结果表明，当利用 *T. cutaneum* MP11 进行油脂发酵时，乙酸转化为油脂的转化率（0.12）要高于乙酰丙酸转化为油脂的转化率（0.09）。

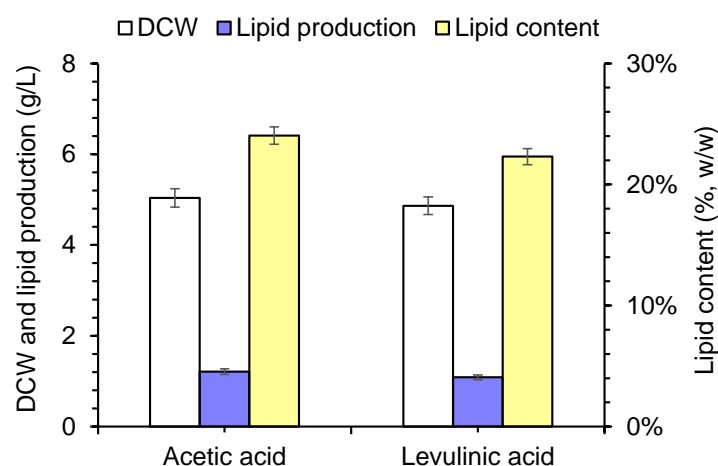


图 3.3 *T. cutaneum* MP11 以乙酸、乙酰丙酸为唯一碳源生产微生物油脂

Fig. 3.3 Fed-batch fermentation of *T. cutaneum* MP11 for lipid using only acetate or levulinate

3.5 小结

本章主要探究了 *T. cutaneum* MP11 对木质纤维素来源的两种有机酸抑制物乙酸和乙酰丙酸的利用情况，并验证了 *T. cutaneum* MP11 利用乙酸、乙酰丙酸进行微生物油脂积累的能力。实验结果如下：

(1) 比较 *T. cutaneum* MP11 在添加不同浓度的乙酸、乙酰丙酸时的葡萄糖消耗速率以及发酵结束时的菌体浓度，结果表明浓度低于 1.5 g/L 的乙酸或浓度低于 3 g/L 的乙酰丙酸不会对 *T. cutaneum* MP11 产生明显抑制。*T. cutaneum* MP11 能降解培养基中添加的乙酸和乙酰丙酸，但是对乙酰丙酸的转化速率要慢于乙酸。从 *T. cutaneum* MP11 降解乙酰丙酸的结果中可以看出，只有当葡萄糖浓度低于约 5 g/L 左右时，*T. cutaneum* MP11 才开始消耗乙酰丙酸。

(2) 分批补料结果显示，*T. cutaneum* MP11 能够以乙酸或乙酰丙酸为碳源进行生长，并将乙酸和乙酰丙酸转化为微生物油脂。

第4章 结论与展望

4.1 结论

生物脱毒可以选择性地去除预处理过程中产生的弱有机酸(乙酸、乙酰丙酸、甲酸)和呋喃抑制剂(糠醛和 HMF),但是由于酚醛抑制物的种类繁多、水溶性低、生物降解性差,生物脱毒对酚醛抑制物的去除效率较低。因此,即使经过生物脱毒处理,酚醛类抑制物仍存在于木质纤维素原料中。以前的研究表明,许多油脂酵母菌株即使在强烈解毒后也不能在木质纤维素水解物中生存。本研究验证了经过脱毒处理完全去除呋喃醛和有机酸类抑制物后的木质纤维素水解物中酚醛抑制物对油脂酵母活力和代谢的影响,证实了残留的酚醛是导致油脂酵母细胞活性下降的主要因素。研究发现皮状丝孢酵母(*T. cutaneum* ACCC 20271 和 *T. cutaneum* MP11)存在3种代表性酚醛(HBA、香草醛、丁香醛)的代谢路径,并进一步评估了 *T. cutaneum* MP11 在实际体系中进行纤维素油脂生产的能力。此外,本文首次探究了皮状丝孢酵母利用乙酸和乙酰丙酸进行油脂发酵的能力。

(1) 在脱毒后仅余酚醛抑制物的麦秆水解液中进行油脂发酵时,除皮状丝孢酵母外的三株油脂酵母几乎不能生长。在含有酚醛抑制物的合成培养基中培养油脂酵母时,两株皮状丝孢酵母在经过一段时间的延滞期后快速生长至稳定期,而另外三株油脂酵母逐渐失去活性。此结果证实了酚醛抑制物是抑制木质纤维素体系中油脂酵母生长的主要因素。

(2) 对所挑选油脂酵母转化酚醛抑制物的能力进行探究,皮状丝孢酵母可以将三种代表性酚醛转化为它们对应的酸、醇的形式,然后将酚酸进一步转化为油脂或者黑色素合成的前体,而其它三株油脂酵母仅能将酚醛转化为醇或酸。

(3) 在含 60 g/L 葡萄糖的合成培养基中进行油脂发酵,结果显示在高浓度的三种典型的酚醛抑制物存在时, *T. cutaneum* ACCC 20271 和 *T. cutaneum* MP11 的细胞生长量和油脂产量降低了约 20%,但是细胞中的油脂含量几乎没有被影响。以 30% 固含量的脱毒麦秆进行同步糖化共发酵对 *T. cutaneum* MP11 在实际体系中进行纤维素油脂生产的能力进行评估,发酵 144 h 后, *T. cutaneum* MP11 消耗完所有葡萄糖和木糖,并最终积累了 40.85 g/L 的微生物油脂。

(4) 对 *T. cutaneum* MP11 转化乙酸和乙酰丙酸的能力进行了探究,结果表明浓度低于 1.5 g/L 的乙酸或浓度低于 4 g/L 的乙酰丙酸不会对 *T. cutaneum* MP11 的生长产生明显抑制,并且 *T. cutaneum* MP11 可以同时转化乙酸和乙酰丙酸。但是只有当葡萄糖浓度低于 5 g/L 左右时,乙酰丙酸才会被消耗。

(5) 分批补料结果显示, *T. cutaneum* MP11 能以乙酸或乙酰丙酸为碳源进行生长,同时将乙酸或乙酰丙酸转化为微生物油脂。

4.2 展望

上述研究对油脂酵母运用于纤维素油脂的实际过程有一定的指导意义，但是仍有许多工作值得进一步探究。

(1) 可以进一步鉴定香草醛和丁香醛被皮状丝孢酵母代谢所形成的最终产物，评估该产物是否具有应用价值，并验证皮状丝孢酵母转化三种代表性酚醛抑制物的代谢路径。

(2) 通过生物脱毒去除抑制物的方式会增加纤维素油脂生产的时间成本，而皮状丝孢酵母已经被证明具备优良的酚醛耐受性。后续可以考虑通过提高皮状丝孢酵母的呋喃醛类和有机酸类抑制物的耐受能力来达到缩短脱毒时间的目的。

(3) 目前，HBA 已经被证明可以被皮状丝孢酵母转化为微生物油脂，后续可以通过代谢工程改造构建从香草醛和丁香醛分别到乙酰辅酶 A 的合成路径，进一步提高皮状丝孢酵母的酚醛转化能力，从而提高纤维素油脂的产量。

(4) 分析皮状丝孢酵母应对酚醛胁迫的相关基因元件，可以将关键基因转移至其它菌株中以提高其酚醛耐受性。

(5) 在木质纤维素的预处理过程中，为了减少抑制物的产生需要严格控制反应条件。可以通过代谢工程改造提高皮状丝孢酵母的乙酸和乙酰丙酸的耐受能力和转化能力，后续可以通过提高预处理条件加强对木质纤维素结构的破坏效果，这有助于后续的酶解和减少酶用量，并且皮状丝孢酵母可以将产生的乙酸和乙酰丙酸转化为微生物油脂。在具备前面的条件时，可以进一步探究不同浓度乙酸和乙酰丙酸对皮状丝孢酵母油脂发酵的影响。

参考文献:

- [1] Liu Y, Cruz-Morales P, Zargar A, et al. Biofuels for a sustainable future [J]. Cell, 2021, 184(6): 1636-1647.
- [2] Ravinder K , Pradeep K . Future microbial applications for bioenergy production: A Perspective. Frontiers in Microbiology, 2017, 8:450-455.
- [3] Chin HC, Choong WW, Wan Alwi S R, et al. Issues of social acceptance on biofuel development. Journal of Cleaner Production, 2014, 71: 30-39.
- [4] Hoed R . Sources of radical technological innovation: the emergence of fuel cell technology in the automotive industry. Journal of Cleaner Production, 2007, 15(11-12):1014-1021.
- [5] Atadashi IM , Aroua MK , Aziz A , et al. Production of biodiesel using high free fatty acid feedstocks. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2012, 16(5):3275-3285.
- [6] Balat M , Balat H . Progress in biodiesel processing. Applied Energy, 2010, 87(6):1815-1835.
- [7] Cavalcante FTT, Neto F S, Falca IRD, et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. Fuel, 2021, 288: 20.
- [8] Xu J, Du W, Zhao X, et al. Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2013, 7(1): 65-77.
- [9] Cao P, Dubé MA, Tremblay AY. High-purity fatty acid methyl ester production from canola, soybean, palm, and yellow grease lipids by means of a membrane reactor. Biomass and Bioenergy. 2008, 32(11): 1028-1036.
- [10] Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, et al. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. Bioresource Technology. 2012, 111: 398-403.
- [11] Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology. 2006, 97(6): 841-846.
- [12] Carriquiry MA, Du X, Timilsina GR. Second generation biofuels: economics and policies. Energy Policy. 2011, 39(7): 4222-4234.
- [13] Ma Yl. Microbial oils and its research advance. Sheng Wu Jia Gong Guo Cheng. 2006, 4(4): 7-11.

- [14] Lee RA, Lavoie JM. From first- to third-generation biofuels: challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*. 2013, 3(2): 6-11.
- [15] Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*. 2014, 32(7): 1336-1360.
- [16] Dourou M, Aggeli D, Papanikolaou S, et al. Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102(6): 2509-2523.
- [17] Bharathiraja B, Sridharan S, Sowmya V, et al. Microbial oil - a plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresource Technology*. 2017, 233: 423-432.
- [18] Patel A, Karageorgou D, Rova E, et al. An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. *Microorganisms*. 2020, 8(3). 1336-1360
- [19] Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010, 14(1): 217-232.
- [20] Zhu LD. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: an innovative framework. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2015, 41: 1376-1384.
- [21] Huang G, Chen F, Wei D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*. 2010, 87(1): 38-46.
- [22] Li Y. Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*. 2008, 24(4): 815-820.
- [23] Kim G, Mujtaba G, Lee K. Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis sp.* for lipid production. *Algae*. 2016, 31(3): 257-266.
- [24] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 2007, 25(3): 294-306.
- [25] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*. 2008, 54(4): 621-639.
- [26] Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*. 2008, 1(1): 20-43.
- [27] Yang Y, Du L, Hosokawa M, et al. Total lipids content, lipid class and fatty acid

- composition of ten species of microalgae. *Journal of Oleo Science*. 2020, 69(10): 1181-1189.
- [28] Gouveia L, Oliveira AC. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2009, 36(2): 269-274.
- [29] Alam F, Mobin S, Chowdhury H. Third generation biofuel from algae. *Procedia Engineering*. 2015, 105: 763-768.
- [30] Enamala MK, Enamala S, Chavali M, et al. Production of biofuels from microalgae - a review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2018, 94: 49-68.
- [31] Xia L, Ge HM, Zhou XP, et al. Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. *Bioresource Technology*. 2013, 144: 261-267.
- [32] He Q, Yang H, Xu L, et al. Sufficient utilization of natural fluctuating light intensity is an effective approach of promoting lipid productivity in oleaginous microalgal cultivation outdoors. *Bioresource Technology*. 2015, 180: 79-87.
- [33] Janssen JH, Driessen JLSP, Lamers PP, et al. Effect of initial biomass-specific photon supply rate on fatty acid accumulation in nitrogen depleted *Nannochloropsis gaditana* under simulated outdoor light conditions. *Algal Research*. 2018, 35: 595-601.
- [34] Alvarez HM, Steinbuchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 60(4): 367-376.
- [35] Kurosawa K, Boccazzi P, de Almeida NM, et al. High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production. *Journal of Biotechnology*. 2010, 147(3-4): 212-218.
- [36] Alvarez HM, Kalscheuer R, Steinbuchel A. Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB40126. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, 54: 218-223.
- [37] Kim HM, Chae TU, Choi SY, et al. Engineering of an oleaginous bacterium for the production of fatty acids and fuels. *Nature Chemical Biology*. 2019, 15(7): 721-729.
- [38] Kalscheuer R, Stolting T, Steinbuchel A. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology*. 2006, 152: 2529-2536.
- [39] Donot F, Fontana A, Baccou JC, et al. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: production and genetics. *Biomass and Bioenergy*. 2014, 68: 135-150.

- [40] Sakuradani E. Advances in the production of various polyunsaturated fatty acids through Oleaginous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2010, 74(5): 908-917.
- [41] Lin H, Cheng W, Ding HT, et al. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. 2010, 101(19): 7556-7562.
- [42] Andre A, Diamantopoulou P, Philippoussis A, et al. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*. 2010, 31(2): 407-416.
- [43] Azeem A, Neelagund YF, Rathod V. Biotechnological production of oil: fatty acid composition of microbial oil. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1999, 53: 381-386.
- [44] Qiao W, Tao J, Luo Y, et al. Microbial oil production from solid-state fermentation by a newly isolated oleaginous fungus, *Mucor circinelloides* Q531 from mulberry branches. *Royal Society Open Science*. 2018, 5(11): 180551.
- [45] Cheirsilp B, Kitcha S. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: fed-batch and repeated-batch fermentations. *Industrial Crops and Products*. 2015, 66: 73-80.
- [46] Certik M, Adamechova Z, Laoteng K. Microbial production of γ -linolenic acid: submerged versus solid-state fermentations. *Food Science and Biotechnology*. 2012, 21(4): 921-926.
- [47] Te Biesebeke R, Ruijter G, Rahardjo YSP, et al. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations progress report on a multi-disciplinary project. *Fems Yeast Research*. 2002, 2(2): 245-248.
- [48] Qin L, Liu L, Zeng AP, et al. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*. 2017, 245(Pt B): 1507-1519.
- [49] Patel A, Arora N, Sartaj K, et al. Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016, 62: 836-855.
- [50] Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*. 2009, 48(6): 375-387.
- [51] Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 90(4): 1219-1227.

- [52] Vasconcelos B, Teixeira JC, Dragone G, et al. Oleaginous yeasts for sustainable lipid production-from biodiesel to surf boards, a wide range of "green" applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103(9): 3651-3667.
- [53] Li Q, Du W, Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 80(5): 749-756.
- [54] Li Y, Zhao Z, Bai F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, 41(3): 312-317.
- [55] Liang Y, Cui Y, Trushenski J, et al. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresource Technology*. 2010, 101(19): 7581-7586.
- [56] Bettencourt S, Miranda C, Pozdniakova TA, et al. Single cell oil production by oleaginous yeasts grown in synthetic and waste-derived volatile fatty acids. *Microorganisms*. 2020, 8(11).
- [57] Yaguchi A, Robinson A, Mihealsick E, et al. Metabolism of aromatics by *Trichosporon oleaginosus* while remaining oleaginous. *Microb Cell Fact*. 2017, 16: 206.
- [58] Tang M, Wang Y, Zhou W, et al. Efficient conversion of chitin-derived carbon sources into microbial lipid by the oleaginous yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosum*. *Bioresource Technology*. 2020, 315: 123897.
- [59] Fontanille P, Kumar V, Christophe G, et al. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*. 2012, 114: 443-449.
- [60] Cheirsilp B, Louhasakul Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. *Bioresource Technology*. 2013, 142: 329-337.
- [61] Li Q, Kamal R, Wang Q, et al. Lipid production from amino acid wastes by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Energies*. 2020, 13(7).
- [62] Iassonova DR, Hammond EG, Beattie SE. Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerols encapsulated in oleaginous yeast. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2008, 85(8): 711-716.
- [63] Zhao X, Kong X, Hua Y, et al. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2008, 110(5): 405-412.

- [64] Gorte O, Kugel M, Ochsenreither K. Optimization of carbon source efficiency for lipid production with the oleaginous yeast *Saitozyma podzolica* DSM 27192 applying automated continuous feeding. *Biotechnology for Biofuels*. 2020, 13(1): 181.
- [65] Blazeck J, Hill A, Liu L, et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. *Nature Communications*. 2014, 5: 3131.
- [66] Wang J, Ledesma-Amaro R, Wei Y, et al. Metabolic engineering for increased lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* - A Review. *Bioresource Technology*. 2020, 313: 123707.
- [67] Park YK, Nicaud JM. Metabolic Engineering for unusual lipid production in *Yarrowia lipolytica*. *Microorganisms*. 2020, 8(12).
- [68] Tai M, Stephanopoulos G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*. 2013, 15: 1-9.
- [69] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*. 2004, 86(11): 807-815.
- [70] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. 2002: 1-51.
- [71] Evans CT, Ratledge C. A comparison of the oleaginous yeast, *candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids*. 1983, 18(9): 623-629.
- [72] Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. part I: biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2011, 113(8): 1031-1051.
- [73] Tkachenko AF, Tiginova OA, Shulga SM. Microbial lipids as a source of biofuel. *cytology and genetics*. 2013, 47(6): 343-348.
- [74] Jin M, Slininger PJ, Dien BS, et al. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in Biotechnology*. 2015, 33(1): 43-54.
- [75] Li X, Xu H, Wu Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, 98(4): 764-771.
- [76] Valdés G, Mendonça RT, Aggelis G. Lignocellulosic biomass as a substrate for oleaginous microorganisms: A Review. *Applied Sciences*. 2020, 10(21).
- [77] Sawangkeaw R, Ngamprasertsith S. A review of lipid-based biomasses as

- feedstocks for biofuels production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2013, 25: 97-108.
- [78] Huang C, Chen XF, Xiong L, et al. Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology Advances*. 2013, 31(2): 129-139.
- [79] Monlau F, Sambusiti C, Barakat A, et al. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 2014, 32(5): 934-951.
- [80] Isikgor FH , Becer CR . Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(25):4497-4559.
- [81] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005, 96(6): 673-686.
- [82] Luo H, Zheng P, Bilal M, et al. Efficient bio-butanol production from lignocellulosic waste by elucidating the mechanisms of *Clostridium acetobutylicum* response to phenolic inhibitors. *Science of the Total Environment*. 2020, 710: 136399.
- [83] 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. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020, 8(16): 6315-6322.
- [84] Gao QQ, Cui Z, Zhang J, et al. Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2014, 152: 552-556.
- [85] Kim S, Dale BE. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*. 2004, 26(4): 361-375.
- [86] Dai XZ, Shen H, Li Q, et al. Microbial lipid production from corn stover by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* using the preSSLP process. *Energies*. 2019, 12(6).
- [87] Ayadi I, Belghith H, Gargouri A, et al. Utilization of wheat bran acid hydrolysate by *Rhodotorula mucilaginosa* Y-MG1 for microbial lipid production as feedstock for biodiesel Synthesis. *Biomed Research International*. 2019, 2019: 11.
- [88] Li Y, Wu H, Huang C, et al. Using rice straw hydrolysate for microbial oil production by *Trichosporon fermentans* HWZ004. *Sheng wu gong cheng xue bao =*

- Chinese journal of biotechnology. 2011, 27(9): 1309-1316.
- [89] Zhao X, Zhang L, Liu D. Biomass recalcitrance. part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*. 2012, 6(4): 465-482.
- [90] Wang W, Zhang C, Sun X, et al. Efficient, environmentally-friendly and specific valorization of lignin: promising role of non-radical lignolytic enzymes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2017, 33(6): 125.
- [91] Hu M, Wang J, Gao Q, et al. Converting lignin derived phenolic aldehydes into microbial lipid by *Trichosporon cutaneum*. *Journal of Biotechnology*. 2018, 281: 81-86.
- [92] Kosa M, Ragauskas AJ. Bioconversion of lignin model compounds with oleaginous *Rhodococci*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 93(2): 891-900.
- [93] Qiu ZY, Fang C, Gao QQ, et al. A short-chain dehydrogenase plays a key role in cellulosic D-lactic acid fermentability of *Pediococcus acidilactici*. *Bioresource Technology*. 2020, 297: 122473.
- [94] Chandel AK, Garlapati VK, Singh AK, et al. The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*. 2018, 264: 370-381.
- [95] Galbe M, Zacchi G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*. 2012, 46: 70-78.
- [96] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96(18): 1959-1966.
- [97] Bhutto AW, Qureshi K, Harijan K, et al. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Energy*. 2017, 122: 724-745.
- [98] Jonsson LJ, Martin C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 103-112.
- [99] Van Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes--factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(6): 1458-1480.
- [100] Zhang J, Wang X, Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011,

- 102(6): 4480-4488.
- [101] Jing X, Zhang X, Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159(3): 696-707.
- [102] Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*. 2004, 93(1): 1-10.
- [103] Paes BG, Steindorff AS, Formighieri EF, et al. Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors. *AMB Express*. 2021, 11(1): 2.
- [104] Almeida JR, Bertilsson M, Gorwa-Grauslund MF, et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 82(4): 625-638.
- [105] Leif J Jönsson^{1*} BAaN-ON. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(16).
- [106] Kim D. Physico-Chemical conversion of lignocellulose: inhibitor effects and detoxification strategies: a Mini Review. *Molecules*. 2018, 23(2).
- [107] Chen X, Li ZH, Zhang XX, et al. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009, 159(3): 591-604.
- [108] Hu CM, Zhao X, Zhao J, et al. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*. 2009, 100(20): 4843-4847.
- [109] Huang C, Zong MH, Wu H, et al. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology*. 2009, 100(19): 4535-4538.
- [110] Yu X, Zheng Y, Dorgan KM, et al. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*. 2011, 102(10): 6134-6140.
- [111] Peter Temitope Adeboye MBaLO. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. *AMB Express*. 2014, 4(46).
- [112] Gu HQ, Zhang J, Bao J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation

- from industrial waste corncob residues. *Bioresource Technology*. 2014, 157: 6-13.
- [113] Gu HQ, Zhang J, Bao J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112(9): 1770-1782.
- [114] Shen Y, Li H, Wang X, et al. High vanillin tolerance of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain owing to its enhanced vanillin reduction and antioxidative capacity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2014, 41(11): 1637-1645.
- [115] Yoneda A, Henson WR, Goldner NK, et al. Comparative transcriptomics elucidates adaptive phenol tolerance and utilization in lipid-accumulating *Rhodococcus opacus* PD630. *Nucleic Acids Research*. 2016, 44(5): 2240-2254.
- [116] Fuchs G, Boll M, Heider J. Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*. 2011, 9(11): 803-816.
- [117] Caroline, S., Harwood, et al. The β -Ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology*. 1996, 50: 553-590.
- [118] Linger JG, Vardon DR, Guarnieri MT, et al. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014, 111(33): 12013-12018.
- [119] Toledo AV, Franco MEE, Yanil Lopez SM, et al. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2017, 99: 2-6.
- [120] Masai E, Katayama Y, Fukuda M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2007, 71(1): 1-15.
- [121] Shen XH, Zhou NY, Liu SJ. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 95(1): 77-89.
- [122] Wang J, Gao QQ, Zhang HZ, et al. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. *Bioresource Technology*. 2016, 218: 892-901.
- [123] Huang XF, Shen Y, Luo HJ, et al. Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid. *Bioresource Technology*. 2018, 247: 395-401.
- [124] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. 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: 26.
- [125] Wen JB, Bao J. Engineering *Corynebacterium glutamicum* triggers glutamic acid accumulation in biotin-rich corn stover hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12(86).
- [126] Liu W, Wang YM, Yu ZC, et al. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2012, 118: 13-18.
- [127] Zhang J, Chu DQ, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105(4): 718-728.
- [128] Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*. 2007, 2(4): 875-877.
- [129] Liu ZL, Ma M, Song MZ. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Mol Genet Genomics*. 2009, 282(3): 233-244.
- [130] Thomsen MH, Thygesen A, Thomsen AB. Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 83(3): 447-455.

硕士期间研究成果

待发表论文:

Yi zhang, Jie bao. High tolerance of *Trichosporon cutaneum* to lignin derived phenolic compounds facilitates the cell growth and cellulosic lipid accumulation. Journal of Biotechnology. (已投稿)

致谢

美好的时光总是飞快地流逝，我即将离开我所熟悉的所热爱的老师和同学，以及这个我获得成长的地方。在这里，我希望能以简单的语言表达我对老师和同学们最深切的感谢。

首先我要感谢鲍老师。在这三年的时光中，鲍老师始终关注着我的学习和研究，耐心地与我讨论我的研究计划，不厌其烦地纠正我的不当之处，仔仔细细地帮助我完成论文的撰写工作。如果没有鲍老师的指导和帮助，我不可能得到如此多的成长，也很难顺利地完成我的课题研究。

其次，我要感谢我的同门师兄张斌、金慈、颜钊和韩涛师兄以及刘祺师姐对我的帮助。感谢我的同级华珂君、孙鲁欢、何妮玲对我的支持，我们一起经历了完整的三年时光，一起来到实验室，一起学习，一起实习。也要感谢我的师弟师妹徐迎迎、李静、陈明星、李景、吴雷以及已经毕业的师兄师姐们给我带来的帮助。很高兴认识王雅师姐和一年级的师弟师妹们。希望在以后的工作生活中，你们能够顺顺利利。

最后我要感谢展宝睿、贾佳、钟驭涛、赵晨休和谢智勇。在这三年里，我的大部分时间都是和你们一起度过的，你们带来的欢乐和帮助难以忘怀。特别感恩我的家人和朋友们，在我的背后一直支持我，鼓励我，开导我，帮助我。