

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

硕士学位论文

皮状丝孢酵母利用木质纤维素与
无机氮生产单细胞蛋白与油脂

任大宇

指导教师姓名:

鲍杰 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: 2023年5月29日 论文答辩日期: 2023年6月2日

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:

华东理工大学研究生学位论文提交要求

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

研究生学位论文全文电子版由档案馆按_____①_____（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

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

学位论文作者签名：任大宇

2023年5月10日

指导教师签名：鲍立

2023年5月10日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作者声明

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

论文作者签名：任大宇

2023年5月10日

皮状丝孢酵母利用木质纤维素与无机氮生产单细胞蛋白与油脂

摘要

单细胞蛋白 (Single cell protein, SCP) 是指从微藻、细菌和真菌等微生物获取的蛋白质, 是动植物来源蛋白质的可持续替代品。微生物油脂是指由产油微生物在一定条件下合成并储存在细胞内的甘油三酯。因为良好的糖代谢和胞内产物积累能力, 产油酵母成为联产单细胞蛋白和微生物油脂的优选细胞工厂。以廉价的木质纤维素生物质和无机氮化合物为底物生产单细胞蛋白与油脂, 可有效降低生产成本。皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum* MP11) 是超离心力胁迫适应性进化得到的高产突变产油酵母。该菌株能够快速、彻底地利用木质纤维素来源的己糖和戊糖, 其巨大的细胞体积为胞内蛋白和油脂的积累提供更大的空间。因此, 该菌株具备高产单细胞蛋白与微生物油脂的巨大潜力。本论文对 *T. cutaneum* MP11 利用小麦秸秆碳源和无机氮化合物氮源联合生产单细胞蛋白与油脂的过程进行了探究。

本论文第一部分对 *T. cutaneum* MP11 利用木质纤维素与无机氮化合物生产单细胞蛋白与油脂的可行性进行探究。*T. cutaneum* MP11 产单细胞蛋白的最佳条件研究表明, 硫酸铵是皮状丝孢酵母生产单细胞蛋白的最适氮源, 最适碳氮比为 9.4, 最适 pH 为 5.0。在上述培养条件下, *T. cutaneum* MP11 以 30% (w/w) 固含量小麦秸秆为底物发酵 48 h 可生产 24.4 g/L 单细胞蛋白和 11.8 g/L 油脂。研究还表明, 将硫酸铵、尿素和玉米浆作为复合氮源, *T. cutaneum* MP11 的单细胞蛋白和油脂产量分别提高至 26.9 g/L 和 12.5 g/L。研究还发现, *T. cutaneum* MP11 以木质纤维素作为碳源时的糖代谢、菌株生长、单细胞蛋白和油脂积累均高于合成培养基。基因转录研究也进一步证明, 氨基酸合成、糖代谢、油脂合成等代谢路径的基因在 *T. cutaneum* MP11 发酵小麦秸秆水解液的过程期间较合成培养基显著上调表达。

本论文第二部分尝试将含高氮的发酵废水用于生物炼制的糖化阶段并生产单细胞蛋白与油脂。研究发现, 发酵废水残留硫酸铵约 7.6 g/L。单细胞蛋白与油脂发酵生产前, 通过补充硫酸铵使发酵废水的碳氮比达 9.4。经过 5 次废水循环, 单细胞蛋白产量稳定在 18.5-20.2 g/L, 平均氮元素转化率高达 72.0%, 油脂产量稳定约为 13.1-17.0 g/L。研究结果表明, 废水循环过程中金属离子未大量积累, 但酚醛抑制物含量持续增加。通过对循环发酵策略的整体生物炼制流程进行物料衡算发现, 每 100 kg 干重小麦秸秆可得到 8.6 kg 单细胞蛋白与 6.6 kg 油脂, 每次循环可避免 177.0 kg 高氮发酵废水产生并节约 1.3 kg 硫酸铵。由此可见, 将发酵废水直接循环用于预处理小麦秸秆的糖化过程具有较强的环保与经济效益。本研究还发现, *T. cutaneum* MP11 以工业高氮废水

生产单细胞蛋白和油脂的生产指标接近新鲜水。

为了提高单细胞蛋白积累能力，通过细胞密度差异的离心筛选手段，本论文第三部分在高氨氮条件下对 *T. cutaneum* MP11 进行适应性进化。经离心筛选后，*T. cutaneum* MP11 高油脂含量成熟细胞因密度较低而悬浮于上层，高蛋白含量细胞则沉积于离心管底部。通过连续筛选转接蛋白含量较高的“重”细胞，经过 50 代的适应性进化，本研究获得较初代菌株单细胞蛋白含量提升 2.4 倍的进化菌株。

综上所述，本论文提出了一种利用废弃农业生物质与无机氮氮化合物生产单细胞蛋白与油脂的整合加工策略，以循环发酵的方式限制含氨氮废水的排放，实现了含氨氮废水的高价值转化。本论文为工业化单细胞蛋白和油脂生产提供高氨氮废水适应性酵母菌株，同时也为工业废水科学和高值化利用提供过程依据。

关键词：皮状丝孢酵母；木质纤维素；单细胞蛋白；微生物油脂；高氨氮废水

***Trichosporon Cutaneum* Produces Single Cell Protein and Lipid Using Lignocellulose and Inorganic Ammonia Nitrogen**

Abstract

As a sustainable alternative to animal and plant origin protein, single cell protein (SCP) is a protein obtained from microorganisms such as algae, bacteria and fungi. Microbial lipids were triglyceride (TGA) produced by oleaginous microorganisms under certain conditions and stored in the cells. Due to its efficient sugar metabolism and intracellular product accumulation capacity, oleaginous yeast has become the preferred cell factory for co-production of single cell protein and lipid. Using lignocellulose biomass and inorganic nitrogen as the substrates for the production of single cell protein and lipid can efficiently reduce the costs. *Trichosporon cutaneum* MP11, a mutant oleaginous yeast of high yield, is evolved from ultra-centrifugation force stress adaptation. It's large cell volume can provide more space for the accumulation of intracellular protein and lipid. *T. cutaneum* MP11 can quickly and thoroughly utilize lignocellulose-derived hexose and pentose, with great potential for the production of single cell protein and microbial lipids. In this thesis, *T. cutaneum* MP11 was used as the fermentation strain to explore the potential of wheat straw carbon and inorganic ammonia nitrogen to produce single cell protein and lipid.

The first part of this thesis explored the feasibility of *T. cutaneum* MP11 using lignocellulose and inorganic ammonia nitrogen to produce single cell protein and lipid. It further tested the optimal conditions for the production of single cell protein by *T. cutaneum* MP11 including the optimal nitrogen source ammonium sulfate, the optimal carbon-nitrogen ratio of 9.4 and the optimal pH of 5.0. Under the above culture conditions, *T. cutaneum* MP11 produced 24.4 g/L single cell protein and 11.8 g/L lipid for 48 h using 30% (w/w) solid wheat straw as substrate to. Ammonium sulfate, urea, and corn syrup were used as complex nitrogen sources to increase single cell protein and lipid production to 26.9 g/L and 12.5 g/L. Finally, in the wheat straw hydrolysate and synthetic medium, it compared the differences of *T. cutaneum* MP11 production of single cell protein and lipid. It was found that the lignocellulose system was more conducive to sugar metabolism, strain growth, single cell protein and lipid accumulation of *T. cutaneum* MP11. Transcriptional analysis showed that the transcription level of the key genes in the amino acid synthesis, sugar metabolism and lipid synthesis of *T. cutaneum* MP11 in the wheat straw hydrolysate was significantly upregulated, and thus suggesting that it was conducive to the synthesis of single cell protein and lipid.

The second part of this thesis attempted to produce single cell protein and lipid using high

ammonia nitrogen wastewater in the saccharification stage of biorefinery. Firstly, it tried to recycle fermentation wastewater directly for the mashing of pretreated wheat straw. It showed that fermentation wastewater containing about 7.6 g/L ammonium sulfate could be used to produce single cell protein and lipid when carbon-nitrogen ratio of 9.4 by supplementing ammonium sulfate. After five rounds of wastewater cycles, it achieved 18.5-20.2 g/L of the single cell protein productivity, 72% of the average nitrogen conversion rate and 13.1-17.0 g/L of the lipid production. It showed no significant accumulation of metal ions during the wastewater cycles, but it found a continuous increase of phenolic inhibitors. It achieved 8.6 kg single cell protein and 6.6 kg lipid from 100 kg dry weight wheat straw by cyclic fermentation after a detailed mass balance. Meanwhile, it can avoid the production of 177.0 kg high ammonia nitrogen and save 1.3 kg ammonium sulfate for every cycle of fermentation wastewater, and thus indicating the operation was an excellent environmental and economic efficiency. With the great adaptability for *T. cutaneum* MP11 and its production indicators close to the fresh water, industrial high ammonia nitrogen wastewater was used to produce single cell protein and lipid.

The third part of this thesis aimed to improve the accumulation capacity of single cell protein for *T. cutaneum* MP11 by centrifugal screening for adaptive evolution under the condition of high ammonia nitrogen. Based on differences of cell density, the adaptive evolution assays were carried out by centrifugal screening. After centrifugal screening, the mature cells of high lipid content were suspended in the upper layer of the liquid due to lower density, while these of high protein content were precipitated at the bottom of the centrifuge tube. By continuously screening and transferring the “heavier” cells with higher protein content, compared to the initial strain, it acquired an evolved strain with a 2.4-fold increase for protein content after 50 generations of adaptive evolution. .

In summary, this thesis proposed an integrated processing strategy for the production of single cell protein and lipid by utilizing waste agricultural biomass and inorganic ammonia nitrogen compounds. It was a green and economical high-value conversion to restrict the discharge of ammonia and nitrogen-containing wastewater by circular fermentation. This thesis would provide a strong basis for the industrial production of single cell protein and lipid.

Keywords: *Trichosporon cutaneum*; lignocellulose; single cell protein; microbial lipid; high ammonia nitrogen wastewater

目录

第 1 章 文献综述	1
1.1 前言	1
1.2 生产单细胞蛋白的碳源	1
1.2.1 农业废弃物	2
1.2.2 石油炼制废料、工业废料	3
1.3 生产单细胞蛋白的氮源	4
1.3.1 有机氮源与无机氮源	4
1.3.2 含氮废水	4
1.4 产单细胞蛋白的微生物及生产工艺	5
1.4.1 藻类生产单细胞蛋白	5
1.4.2 细菌生产单细胞蛋白	5
1.4.3 真菌生产单细胞蛋白	6
1.4.4 生产工艺及产品处理	6
1.5 微生物油脂	8
1.5.1 产油酵母油脂成分	8
1.5.2 木质纤维素生产微生物油脂	8
1.6 木质纤维素与生物炼制	9
1.6.1 预处理	10
1.6.2 脱毒、水解	11
1.6.3 发酵阶段	11
1.7 本文立题依据及主要研究内容	12
第 2 章 皮状丝孢酵母联合生产单细胞蛋白与油脂的可行性探究	14
2.1 引言	14
2.2 材料与方法	15
2.2.1 酶和试剂	15
2.2.2 菌种及其培养	15
2.2.3 小麦秸秆预处理、糖化与生物脱毒及水解液的制备	16
2.2.4 同步糖化共发酵生产单细胞蛋白与油脂	17
2.2.5 菌体生长、细胞形态和细胞干重评价	17
2.2.6 单细胞蛋白产量与含量的测定及计算	17

2.2.7 油脂含量与产量的测定	18
2.2.8 RNA 提取和 RT-qPCR 实验	19
2.2.9 HPLC 分析	23
2.3 结果与讨论	23
2.3.1 不同菌株产单细胞蛋白的性能差异	23
2.3.2 不同氮源种类对 <i>T. cutaneum</i> MP11 产单细胞蛋白的影响	27
2.3.3 <i>T. cutaneum</i> MP11 产单细胞蛋白与油脂的最适碳氮比及最适 pH	30
2.3.4 复合氮源对 <i>T. cutaneum</i> MP11 生产单细胞蛋白的影响	34
2.3.5 <i>T. cutaneum</i> MP11 在合成培养基和麦秆水解液产单细胞蛋白能力的比较	36
2.3.6 <i>T. cutaneum</i> MP11 在麦秆水解液中的转录水平变化	39
2.4 本章小结	42
第 3 章 木质纤维素体系下循环利用氨氮废液联产单细胞蛋白与油脂	44
3.1 引言	44
3.2 材料和方法	45
3.2.1 菌种及其培养	45
3.2.2 高氨氮废水	45
3.2.3 发酵上清液的循环利用	45
3.2.4 元素浓度、总酚浓度和铵根离子浓度测定	45
3.2.5 氨基酸和核酸含量测定方法	45
3.3 结果与讨论	46
3.3.1 最小化含氨氮废水排放策略	46
3.3.2 产品评价	50
3.3.3 生物炼制流程的整体物料衡算	53
3.3.4 利用高氨氮废水同步糖化共发酵产单细胞蛋白与油脂	57
3.4 本章小结	58
第 4 章 适应性进化提高皮状丝孢酵母的单细胞蛋白含量	60
4.1 引言	60
4.2 材料与方法	60
4.2.1 菌株与培养基	60
4.2.2 细胞干重与蛋白含量的测定	60
4.2.3 菌体生长和细胞形态观察	60
4.2.4 适应性进化提高 <i>T. cutaneum</i> MP11 蛋白含量	60
4.3 结果与讨论	61

4.3.1 适应性进化筛选方法的探究.....	61
4.3.2 离心筛选提高 <i>T. cutaneum</i> MP11 蛋白含量的适应性进化.....	63
4.4 本章小结.....	64
第五章 结论与展望.....	65
5.1 结论和创新点.....	65
5.2 展望.....	66
参考文献.....	67
致谢.....	76
学术成果.....	77

第1章 文献综述

1.1 前言

在过去的几十年，世界人口的快速增长导致能源供应不足，特别是在贫困的第三世界国家这种现象尤为明显^[1]。这些国家无法负担起以动物蛋白为基础的食品生产系统，甚至难以建立成熟的植物蛋白生产体系来养活不断增长的人口。由于微生物的生长效率较高，微生物蛋白质来源可以弥补第三世界饮食中的蛋白质不足^[2]。单细胞蛋白（Single cell protein, SCP）是从培养的微生物中获取的蛋白质，又被称为生物蛋白或微生物蛋白。这些单细胞蛋白可用作人类和动物饮食中蛋白质的补充剂或配料^[3]。单细胞蛋白具有生产时间短、富含某些必需氨基酸、有较高的营养价值、可由相对廉价的培养液和废料生产等多种优势^[1, 4]。单细胞蛋白不需要占用大面积的土地资源或大量水资源来生产^[5]，可以作为植物蛋白来源的替代品。同时单细胞蛋白的产量也不受季节和气候变化的影响，可以全年正常生产。此外，它们不会像植物蛋白来源那样向环境排放大量温室气体^[6]。

废物管理的基本原则之一是利用不同的可生物降解废料生产营养无害的产品。以往主要是以填埋和焚烧等方式处理废物，但这些方法不仅不能很好地再利用废物，而且造成了环境污染。目前随着生物技术的发展，通过微生物利用废料为开发高质量产品提供了选择，如单细胞油^[7]、单细胞蛋白、化学品及酶等产品。单细胞蛋白是从废物中获得的高质量产品之一^[8]。这不仅是环境友好型生产方式，也是合理的商业模式^[9]。

单细胞蛋白作为可再生食用蛋白能够满足人类在日常饮食中的蛋白质需求，并且，经过一定处理的单细胞蛋白还可以作为生物薄膜使用^[10]。人们大多利用微生物（细菌、酵母、真菌、藻类）来生产可供人和动物食用的蛋白质^[11]。以发酵法生产单细胞蛋白的生产成本相对比较低廉，且可生产出安全、健康的附加值食品^[12]。此外，大量工业农业生产所伴随的废水废料排放除了会造成环境污染，还会造成大量的生物污染。然而，利用这些废料生产单细胞蛋白能从根本上解决这些问题。

1.2 生产单细胞蛋白的碳源

生产单细胞蛋白的碳源底物极为广泛，农业废弃物、工业产品及副产品、城市生活垃圾及甲烷沼气^[13]等废料经过预处理后能为微生物生长提供碳源。这些原料来源广泛且成本低廉，为规模化生产单细胞蛋白提供了许多底物来源^[3]。一般来说，选择用于单细胞蛋白实际生产的最适废物的关键考虑因素包括：废物用于发酵之前的预处理成本、废物的运输成本、废物的本地可用性、发酵后获得的微生物生物量中的单细胞蛋白浓度、单细胞蛋白加工处理成本。

1.2.1 农业废弃物

参考 Finco 等人^[14]描述的生产单细胞油的农业废物分类, 生产单细胞蛋白的底物可以分为: 富含单糖和双糖的来源、富含淀粉的来源、富含结构多糖的来源、富含蛋白质或脂质的来源。

富含单糖和双糖的农业废料来源, 如糖蜜、乳制品(富含乳糖)和水果加工废料可以直接用来培养微生物, 最终获得较高产量的单细胞蛋白。这种废物仅需要较少的预处理后便可用于培养微生物, 显著降低单细胞蛋白生产成本。Yadav 等人^[15]以乳清废液为底物混合培养克鲁维氏酵母和假丝酵母, 最终生物量的生产效率为 0.17 g/L/h, 发酵 24 h 废液 COD 去除率最高为 80.2%。Gao 等人^[16]以大豆糖蜜为碳源培养热带假丝酵母生产单细胞蛋白, 在 10 L 发酵罐中发酵后最大细胞干重和总蛋白量分别达到 10.8 和 6.1 g/L。Hashem 等人^[17]利用两株酵母菌株在变质枣果汁中生产单细胞蛋白, 在 7 L 发酵罐中最高产量为 48.9 g/L。

富含淀粉的废物, 如谷物和块茎残渣占农业废物的很大一部分比例。富含淀粉的废料在用于培养微生物之前需要水解成单糖, 因此可以将能够水解淀粉的微生物与产单细胞蛋白的微生物混合培养以减少生产成本。Liu^[18]等人先利用黑曲霉降解马铃薯残渣中的纤维素, 然后利用地衣芽孢杆菌生产单细胞蛋白质。该过程不仅可以解决部分污染问题, 还可以解决动物饲料中蛋白质短缺问题。

目前, 不同来源的木质纤维素废弃物的组分差异较大。这些农业废弃物的纤维素含量和半纤维素含量的差异都会影响到后续单细胞蛋白的生产^[19]。通常, 木质纤维素来源于木材(硬木和软木)、草叶、制浆造纸废料、甘蔗渣、麦草、麦麸和米糠。近几年已经开展了许多关于利用纤维素和半纤维素废料生产单细胞蛋白的研究^[20]。大多情况下, 这些原料在使用前都需经过物理、化学和酶法水解, 这些预处理能将农业废物中纤维素和半纤维素分解为单糖, 以用于单细胞蛋白生产^[21]。微生物利用各种形式的纤维素、半纤维素生产单细胞蛋白的产物浓度取决于所使用的底物类型以及培养基成分^[22]。表 1.1 罗列了一些利用农业废弃物生产单细胞蛋白的相关研究。

每种农业废弃物作为生产单细胞蛋白的基质都有其自身的优势与劣势。富含单糖和双糖的废弃物需要的预处理最少, 相对于其它类型的废物具有明显的技术和经济优势。富含结构多糖的农业废弃物需要先使用高效且经济的预处理工艺进行水解后才能用于单细胞蛋白的生产, 相比富含单糖双糖的底物可以获得更高的单细胞蛋白产量。单细胞蛋白的实际生产中, 以农业废弃物为底物不仅可以降低主要的生产成本, 还能减少农业废弃物产生的环境污染问题。虽然利用各种农业废弃物生产单细胞蛋白有许多优点, 但它也可能导致杀虫剂和重金属等有毒物质的积累。因此, 单细胞蛋白产品饲料对动物健康和饲料效率的影响有待研究^[23]。

表 1.1 利用农业废弃物生产单细胞蛋白的相关文献

Table 1.1 Literatures on the production of single cell proteins from agricultural wastes

Feedstock	Strains	Results	Fermentation method	References
Cassava starch	<i>Schwanniomyces castelli</i> B5285	SCP yield 7.4 g /100g	Liquid fermentation	[24]
Sugar cane bagasse	<i>Candida tropicalis</i> IZ 1824	SCP yield 0.31 g/g	Liquid fermentation	[25]
Broken rice (rice tips)	<i>Aspergillus terreus</i>	SCP yield 0.344 g/g	Liquid fermentation	[26]
Soy bean hull	<i>Bacillus subtilis</i>	Protein content 12.3%	Solid-state fermentation	[27]
Corn cob	<i>Cladosporium Cladosporioides</i>	Protein content 13.64%	Solid-state fermentation	[28]
Corn cobs	<i>Aspergillus niger</i> AS-101	Protein content 30.4%	Liquid batch fermentation	[29]
Wheat bran	<i>Candida utilis</i>	Protein content 41.02%	Solid-state fermentation	[30]

1.2.2 石油炼制废料、工业废料

在上世纪 60 年代开始,已经有厂家利用石油、天然气生产单细胞蛋白饲料。石油炼制厂产生的碳氢化合物可以代替碳水化合物作为碳源,并且利用石油生产中产生的石油残渣也可以减少石油炼制造成的环境污染问题。微生物可以利用燃料油和其它正烷烃等石油蒸馏的蒸馏产物或残留物生产单细胞蛋白,法国公司 Technip 建立了热带假丝酵母利用 C₁₂-C₁₅ 正烷烃生产单细胞蛋白的方法^[31],最高产率可以达到 4.0 g/L/h。Ghosh 等人^[32]研究发现十六烷烃可以作为单曲杆菌 *Arthrobacter simplex* 发酵生产单细胞蛋白的碳源,最终产品细胞干重为 3.1 g/L。

石油炼制产生的副产品之一,短链碳化合物^[33](甲烷^[34]、乙酸、甲酸和甘油^[35])可以用作产单细胞蛋白的碳源。另外还有甲醇、正己烷、正庚烷、正庚醇、壬醇、癸醇、丙酸、辛酸和癸酸等化合物也可用于生产单细胞蛋白^[32]。

工业废料是指在金属加工、化学溶剂合成、造纸、染料制作等过程中产生的工业废弃残留物。只有可生物降解的工业废料才能用于微生物发酵,聚合物是应用最广泛的工业废料。聚合物所包含的结构多糖和其它复杂化合物需要经过彻底的预处理后,微生物才能利用这些聚合物发酵生产单细胞蛋白。作为底物生产单细胞蛋白的聚合物主要包括废纸^[36]、亚硫酸盐废液^[37]、木质素残渣^[38]以及乳胶废水^[39]等。Sharma^[40]等人在亚硫酸盐制浆法获得的云山木水解液和海藻水解液组成的培养基上,培养产朊假丝酵母生产单细胞蛋白,在 27 L 发酵罐中进行发酵得到最高产量为 20 g/L。鲑鱼饲养试验的结果表明,该产品可以替代部分鱼饲料,且不会对鲑鱼生长产生有害影响。

1.3 生产单细胞蛋白的氮源

氮元素是微生物最重要的元素之一，也是单细胞蛋白的重要组成元素。因此，不同氮源对微生物生产单细胞蛋白具有重要影响。生产单细胞蛋白的氮源主要包括有机氮源和无机氮源。有机氮源包括较昂贵的蛋白胨、酵母提取物以及较廉价的玉米浆、棉籽蛋白等，无机氮源包括硫酸铵、氯化铵等铵态氮以及硝酸盐、亚硝酸盐等硝态氮。不同种类的氮源会直接影响单细胞蛋白的产量。

1.3.1 有机氮源与无机氮源

酵母提取物、蛋白胨等有机氮源不仅蛋白含量较高，还含有对细胞生长有促进作用的氨基酸和生长因子。微生物可以直接利用有机氮源包含的氨基酸或其它有机物生产单细胞蛋白。

Ouedraogo 等人^[41]研究表明，产朊假丝酵母以蛋白胨为氮源时，添加 0.75 g/L 蛋白胨可以获得最高生物量 3.25 g/L，以酵母提取物作为氮源时，酵母提取物浓度的增加导致生物量先增加后减小，添加 0.5% 酵母提取物能使酵母生物量达到最大值 4.56 g/L。Nigam^[42]用多种有机氮源（玉米浆、酵母提取物、豆粕和蛋白胨）和无机氮源（硫酸铵、氯化铵和尿素）培养产朊酵母菌，结果表明使用玉米浆作为氮源时，单细胞蛋白产量最高。然而玉米浆的产品质量受到生产季节、生产工艺、运输储存等多因素的影响。玉米浆质量较大的波动会对微生物的生长有较为明显的影响，因此在实际应用中受到限制。Taran 等人^[43]的研究表明，嗜盐菌利用酵母提取物和蛋白胨等有机氮源时，单细胞蛋白产量较低，添加过量的有机氮源对单细胞蛋白的积累有不利影响。

无机氮源成分比较稳定且价格低廉，硝酸盐中的硝酸根需要被菌体产生的脲酶转化为铵根态才能被菌体吸收利用。铵盐中的铵根离子可以被菌体直接吸收利用，因此铵盐常作为一种迅速利用的氮源使用。

有研究将不同种类氮源（玉米浆、尿素、硝酸铵、硫酸铵）加入食品废物培养基，利用酿酒酵母生产单细胞蛋白。结果表明，添加玉米浆获得的单细胞蛋白产量最低，添加硫酸铵获得的单细胞蛋白产量最高^[44]。Akintomide 等人^[45]发现，黑曲霉和酿酒酵母以白薯皮为底物在添加硫酸铵时的粗蛋白含量分别为 16.78% 和 21.30%，在添加硝酸钾时的粗蛋白含量分别为 13.92% 和 18.00%。

1.3.2 含氮废水

微生物生长所需要的氮源不仅局限于常规的有机和无机氮源。含氮量较高的废水也可作为单细胞蛋白生产的氮源，菌体能够吸收利用废水中的氨氮并转化为单细胞蛋白^[46]。乳清是指奶酪生产过程中产生的副产品，富含乳清蛋白等有机氮源。Ashok 等人^[47]将不同乳清液体作为枯草芽孢杆菌生产单细胞蛋白的底物，最终单细胞蛋白产量最高可达 0.32 mg/mL。沼液废水中含有丰富的无机氨氮，Zhang 等人^[48]以高氨氮的沼液作为菌体生长的氮源。碳氮比为 6 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为 2000 mg/L 的条件下，

Nectaromyces rattus 在候选菌株中生物量达到最高值 12.6 g/L, 蛋白含量为 35.9%。Dou 等人^[49]利用两株氢氧化细菌 *Paracoccus denitrificans* Y5 和 *P. versutus* D6 在高氨氮废水中生产单细胞蛋白, 最终两株菌株的蛋白含量分别为 67.34%和 73.73%。

不同的菌株在利用不同的氮源和碳源的情况下, 生产单细胞蛋白的最适碳氮比有着较大差异。Ahmed^[50]等人以玉米秸秆水解液为培养基, 培养产朊假丝酵母生产单细胞蛋白, 当碳氮比为 30 时, 单细胞蛋白产量最高。另外有研究^[51]评估了利用废水在不同碳氮比条件下, *Trichoderma harzianum* 生产单细胞蛋白的产量变化, 发现当废水碳氮比为 20 时单细胞蛋白的产量最高。

1.4 产单细胞蛋白的微生物及生产工艺

1.4.1 藻类生产单细胞蛋白

通常, 生产用于人类或动物食用微藻的蛋白质含量很高, 约为 60-70%。部分藻类还能生产脂肪(例如 ω -3 脂肪酸和类胡萝卜素)、各类维生素、矿物盐和叶绿素^[52], 并且它们的核酸含量相对较低, 约为 3-8%^[53]。

目前微藻主要以补充剂的形式使用, 有片剂、胶囊或液体形式, 除此以外也越来越多地作为配料用于食品加工, 如意大利面、烘焙食品和零食等食品^[52]。藻类一般通过光合作用吸收二氧化碳来生产单细胞蛋白, 也有部分微藻通过传统发酵法生产单细胞蛋白。藻类在露天池塘生产单细胞蛋白会受到污染(包括生物污染和影响最终产品质量的矿物污染)和天气变化的影响^[54]。室内光生物反应器也能保证新鲜藻类的供应, 藻类生产的脂肪酸和类胡萝卜素可用于水产养殖, 藻类含有的蛋白质也能满足动物的营养需求^[55]。

1.4.2 细菌生产单细胞蛋白

细菌的单细胞蛋白以干重计算含有 50-80%的蛋白含量, 必需氨基酸的含量与世界粮农组织的标准相当或更高。细菌生产的单细胞蛋白蛋氨酸含量高达 3.0%, 高于藻类或真菌单细胞蛋白的一般含量^[56]。Overland^[57]等人在利用甲烷生长的细菌中也观察到类似的氨基酸组成, 从氨基酸组成、消化率、动物健康等方面来看, 天然气发酵产生的单细胞蛋白是一种很有前途的蛋白质来源。与真菌相比, 细菌单细胞蛋白含有很高的核酸含量(8-12%), 因此在用作食品/饲料之前需要对细菌单细胞蛋白进行加工处理^[58]。除了含有蛋白质和核酸, 部分细菌单细胞蛋白还会生产一些脂质和维生素。

在各种废物基质或废水处理的过程中能利用细菌的降解作用生产单细胞蛋白。Kornochalert^[39]等人利用橡胶厂废水生产单细胞蛋白, 该研究证明紫色非硫细菌可以将废水中的化学需氧量、悬浮固体和总硫化物降低到符合泰国灌溉用水准则的水平, 并且产生的生物量适合用做单细胞蛋白。Wongputtisin^[59]等人证明用枯草芽孢杆菌发酵大豆壳可以提高其作为单胃动物饲料的营养价值。Acosta^[13]等人将农业废弃物产生的沼

气用电化学法处理，利用甲烷氧化细菌从甲烷、氢气的混合物中生产单细胞蛋白。Khoshnevisan^[60]等人以厌氧消化和单细胞蛋白生产结合的方式，利用甲烷氧化菌代谢城市生活垃圾产生的甲烷及沼气，单细胞蛋白的得率最高可达 0.76 g CDW/g CH₄。

1.4.3 真菌生产单细胞蛋白

用于生产单细胞蛋白的真菌通常含有 30-50%的蛋白质，其氨基酸组成比世界粮农组织标准更好，苏氨酸和赖氨酸含量通常较高，尽管蛋氨酸含量相对较低，但仍符合世卫组织的最低标准^[61]。除蛋白质外，从真菌中提取的单细胞蛋白还能提供 B 族维生素（硫胺素、核黄素、生物素、烟酸、泛酸、吡哆醇、胆碱、叶酸和对氨基苯甲酸）。此外，真菌的细胞壁含有丰富的葡聚糖，能为动物饮食提供纤维。真菌具有中等的核酸含量（7-10%），但该含量对于人类食用的蛋白质标准来说相对较高，需要进一步的处理来减少核酸含量^[56]。

芬兰开发了一种称为“Pekilo”的工艺，用造纸厂亚硫酸盐废水生产单细胞蛋白用作动物饲料^[62]。Pratima^[63]等人将纸浆厂的预水解液用作宛氏拟青霉 *Paecilomyces varioti* 生产单细胞蛋白的底物，获得干细胞重量 25 g/L，最终底物利用率为 95%，预处理水解液的生化需氧量（Biochemical Oxygen Demand, BOD）降低了 70%。菲利普斯石油公司已进行单细胞蛋白工业规模生产，通过发酵系统提高传质效率，最终可以产生 130 g/L 的生物量，酵母生产效率超过 10 g/L/h^[64]。有相关研究混合发酵生产单细胞蛋白，Manilal 等人^[65]利用淀粉加工废水混合发酵产朊假丝酵母和扣囊拟内孢霉，最终获得的产物蛋白浓度达到 22% (w/w)，发酵结束后废水中 90%以上的化学需氧量（Chemical Oxygen Demand, COD）和 BOD 被菌体消耗。

各种真菌种类的单细胞蛋白的研究和开发正在进行中，同时也伴随着新产品或新工艺的产生。例如，Zhao^[66]等人利用溶脂亚罗菌生产高价值抗菌肽和单细胞蛋白，该菌体蛋白质含量很高，而单细胞蛋白则是生产过程中的副产物之一。Aggelopoulos^[67]等人以食品工业废弃物为底物，用马氏链霉菌固态发酵生产富含蛋白质的饲料和脂肪和芳香化合物 ϵ -蒎烯等产物，每吨底物可以生产 4 kg 附加产品。

1.4.4 生产工艺及产品处理

根据单细胞蛋白发酵时底物的可溶性与否，可以将生产单细胞蛋白的工艺分为：固态发酵、半固态发酵和液态发酵。

固态发酵是一种重要的生物转化技术，可以将天然原料转化为种类繁多的生化产品。这一过程是在不补水或补充少量水分的情况下，通过微生物利用固体底物来进行生长，通常情况下需要对固体培养基进行搅拌。由于固态发酵的生产率高、不需要严格的无菌操作且培养基成本低、下游加工简单、几乎无污染排放等优点，非常适合应用于单细胞蛋白的生产。由于有些真菌更适合在比较干燥的底物生长，将固态发酵用于真菌产单细胞蛋白有较大潜力。农业废弃物是以纤维素为主要成分的原料，是一种

常见的固态发酵培养基。Yunus^[30]等人对产孢假丝酵母和少孢根霉进行麦麸农渣的固态发酵生产单细胞蛋白，以 10% (v/w) 的接种量，粗蛋白得率在发酵 48 h 高达 41.02%，而未发酵麦麸的粗蛋白率仅为 4.21%。

半固态发酵是固态发酵的一种形式，这种发酵工艺适当提高培养基中液体的比例来保证微生物对营养物质的吸收效率^[68]。含水量的控制对半固态发酵至关重要，过高的含水量会填充基质空隙从而限制气态传质，但较低的含水量也会限制微生物的生长。除含水量外，温度、pH、基质类型及粒径等因素都会对半固态发酵产生重要的影响^[69]。

液态发酵是微生物在以液体培养基为底物进行发酵生产代谢产物，利用液态发酵生产单细胞蛋白较以上两种发酵形式周期更短，实际应用前景更好。用于液态发酵的容器一般都装有通气管道、搅拌装置、温度调节装置和 pH 计，能保持菌体生长的最适参数。真菌发酵只需 5 d 左右就能积累大量菌体量，而固体培养基则需要 30-60 d。Bertasini^[70]等人研究了利用蔗糖浓度约 40 g/L 的制糖废水和富含氮、磷等营养元素的农业沼液为培养基，培养酿酒酵母生产单细胞蛋白。该研究结果表明，好氧条件下对酿酒酵母的生长有利，在不同稀释率下进行连续发酵实验，当稀释率为 0.50 d⁻¹，水力停留时间为 2 d，生物量产量为 0.25 g/L/d，蛋白含量为 28%。该研究中产生的单细胞蛋白包含的氨基酸浓度与水产养殖饲料的典型氨基酸浓度相似或更高，表明酿酒酵母生产的单细胞蛋白可用作鱼类饲料的组成部分。

根据发酵基质材料和预期的应用目标（饲料或食品），在获得最终单细胞蛋白产品之前需要各种加工步骤。部分单细胞蛋白可以被直接用作动物饲料，而有的单细胞蛋白需要打破细胞壁才能使动物更容易获得蛋白质。例如 Quorn™ 是一种可在不降解细胞壁情况下直接食用的单细胞蛋白，真菌细胞壁中的甲壳素和葡聚糖可以提供纤维^[71]。从微藻中提取的单细胞蛋白不需要破壁，因其细胞不含细胞壁，使其更容易消化。

破坏细胞壁的方法有多种，包括机械力(粉碎、粉碎、研磨和超声波)、水解酶(内源或外源)、洗涤剂化学破坏或这些方法的组合^[53]，但是这些处理可能会影响单细胞蛋白中蛋白质和其它成分的质量和数量。

藻类的核酸含量通常较低，然而生长迅速的细菌和真菌核酸含量较高。RNA 含量和降解速率受生长条件、生长速率和碳氮比的影响。高含量的核酸浓度对人体有害，单细胞蛋白中的 RNA 会被降解为嘌呤，嘌呤会导致人体内尿酸沉积，这可能导致痛风和肾结石^[72]。高核酸含量的单细胞蛋白用作动物饲料如果不经核酸的去除步骤，建议仅用于喂养寿命较短的动物^[58]。

目前已经开发出各种降低单细胞蛋白中 RNA 含量的方法。核糖核酸酶在热处理后可用于降解 RNA^[73]。核糖核酸酶也可以添加到生产工艺中用作固定化酶^[74]。除此之外，单细胞蛋白产品中的核酸成分还可以用碱水解法和化学萃取法等方法去除^[75]。

1.5 微生物油脂

生物柴油可以用于大多数柴油发电机，因其有环保性、可生物降解和可再生等优点日益引起人们的重视。然而，生物柴油目前主要由植物油、动物脂肪和回收的烹饪油脂或油的酯交换反应生产。由于生产成本较高，尤其是原料成本占比高，种植产油作物所需的土地面积大等原因，使得生物柴油的生产水平较低^[76]。利用产油微生物生产油脂是解决生物柴油生产难题的重要方案。与植物油或动物油脂相比，微生物油脂有较稳定的脂肪酸构成、生产周期较短、不依赖地理气候条件、占地面积小和生产成本低等诸多优点^[77]。

1.5.1 产油酵母油脂成分

产油微生物在特定生长条件下可以在胞内积累细胞干重 20-70%的油脂，包括真菌、酵母、藻类和细菌等。产油酵母是最为常见的细胞工厂，能够积累大量油脂的异养微生物。与真菌、微藻、细菌相比，产油酵母的生长速度更快，在大型发酵罐中利用各种廉价底物发酵产油脂的能力更强，使其成为生物炼制工艺产微生物油脂的最佳选择之一^[78]。最常见的高油脂含量的产油酵母包括红酵母属、根霉属、耶氏酵母属、丝孢酵母属、假丝酵母属和隐球酵母属。

产油酵母积累的油脂一般是单酰甘油、二酰甘油、三酰甘油形式的脂质。油脂成分中脂肪酸含量较高的包括棕榈酸 C_{16:0}、棕榈油酸 C_{16:1}、硬脂酸 C_{18:0}、油酸 C_{18:1} 和亚油酸 C_{18:2}，而肉豆蔻酸 C_{14:0} 和亚麻酸 C_{18:3} 的含量较低。在产油酵母合成油脂的过程中，由 I 型脂肪酸合成酶催化乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 转化为 16 个 (C_{16:0}) 或 18 个 (C_{18:0}) 碳原子的饱和酰基链^[79]，这些酰基链被去饱和酶修饰以形成不饱和 C16 和 C18 脂肪酸，不同菌种和不同培养基的各脂肪酸成分占比不同。

Awad 等^[80]人发现 *C. oleaginosa* 产生的脂肪酸与碳源相关联，以甘露糖、麦芽糖、乳糖和葡萄糖为碳源生产获得的脂肪酸组成大致相同。使用阿拉伯糖作为碳源时，C_{18:0} 和 C_{18:1} 降低，C_{18:2} 比例增加。此外，该研究发现以铵盐为氮源时饱和脂肪酸含量增加，这为特定油脂化学品或食品应用生成定制的脂肪酸谱提供了新的途径。其它研究表明，微生物油脂的脂肪酸组分还和温度、pH 和氧气浓度有关^[81]。

1.5.2 木质纤维素生产微生物油脂

产油酵母能从多种低成本原料（如农业废料、工业废料等）生产微生物油脂^[82]。小麦秸秆、玉米秸秆和甘蔗等木质纤维素材料经过各种预处理步骤制作成水解液，这些水解液包括多种戊糖和己糖，能够作为基质供产油酵母生产微生物油脂^[83]。产油酵母利用己糖从头合成油脂，先将己糖转化为丙酮酸后进一步用于脂质的合成，利用戊糖时一般通过磷酸解酮酶途径进行同化然后再进行油脂合成（图 1.1）。

木质纤维素生物质可以作为微生物油脂生产的重要基质，但产油酵母对木质纤维素预处理产生的各种抑制物的耐受性是大规模生产微生物油脂的主要瓶颈之一^[84]。

Sitepu 等人^[85]测试了 45 种产油酵母在木质纤维素水解液中的生长情况，发现这些酵母都可以在含有 0.5 g/L-5-HMF 的水解液中正常生长，但是当 5-HMF 浓度提升至 1 g/L 以上时，菌体生长受到了明显的抑制作用。Yu 等人^[86]测试了预处理产生的不同抑制物单独对产油酵母的影响，发现糠醛对产油酵母的油脂合成抑制效果最强。产油酵母 *T. cutaneum* ACCC 20271 可以将甲酸和乙酸作为碳源，并且可以将 5-HMF 转化为醇，因此适合应用在木质纤维素体系下生产油脂^[87]。

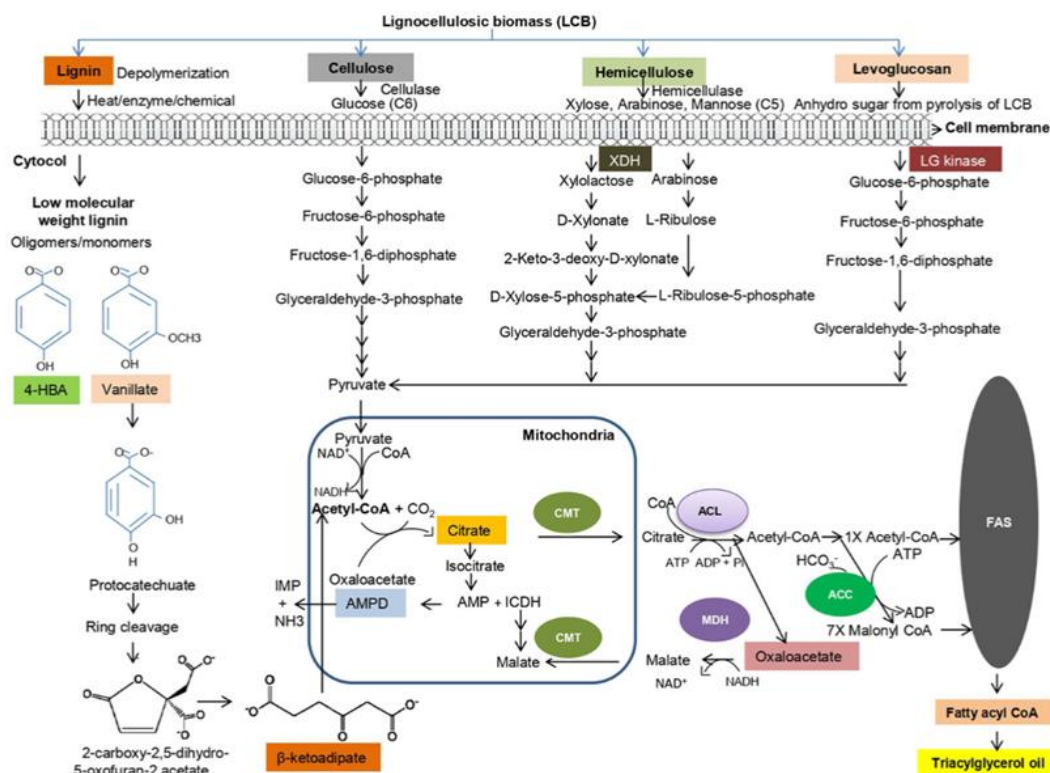


图 1.1 木质纤维素生物质到微生物油脂的主要转化途径^[88]

Fig. 1.1 Main conversion pathways from lignocellulosic biomass to microbial lipids

Slininger 等人^[89]评估了多种产油酵母在木质纤维素水解液的产油脂性能，粘红酵母、圆红冬孢酵母菌、科罗拉多赛托氏菌、斯达氏油脂酵母和解脂耶氏酵母四种菌株在玉米秸秆、柳枝稷水解液中的产油性能最佳。产油酵母利用木质纤维素生产微生物油脂大致分为 3 种方式：（1）分步进行糖化和油脂生产；（2）糖化和油脂生产同时进行，该方法较第一种方式可以降低高葡萄糖浓度对纤维素酶的抑制作用；（3）糖化和油脂生产在同一个反应器进行，该方法可以有效提高油脂生产效率，降低生产成本。

1.6 木质纤维素与生物炼制

木质纤维素生物质主要由纤维素、半纤维素和木质素组成，其中纤维素占比约为 30%至 50%，半纤维素占比约为 20%至 40%，木质素占比约为 20%（图 1.2）。木质纤维素的生物炼制主要有预处理、脱毒、水解、发酵和后续的分离纯化步骤。生物炼制

流程可以将价格低廉且可再生的木质纤维素转化成高附加值产品^[90]。

1.6.1 预处理

木质纤维素中的结构较为复杂，因含有木质素所以有较强的生物顽抗性，这对木质纤维素中的纤维素和半纤维素起到保护作用，较温和的处理方法无法释放出纤维素和半纤维素^[91]。木质纤维素生物质的预处理是将复杂的木质纤维素分解为纤维素、半纤维素和木质素等简单成分。预处理过程可以破坏一些木质素结构，水解部分半纤维素结构，降低纤维素结晶度，增加材料的孔隙率。将切碎的木质纤维素原料在高温条件下，暴露于酸性或碱性环境中，使半纤维素部分水解为单糖和低聚糖，并且有利于后续水解纤维素与半纤维素。

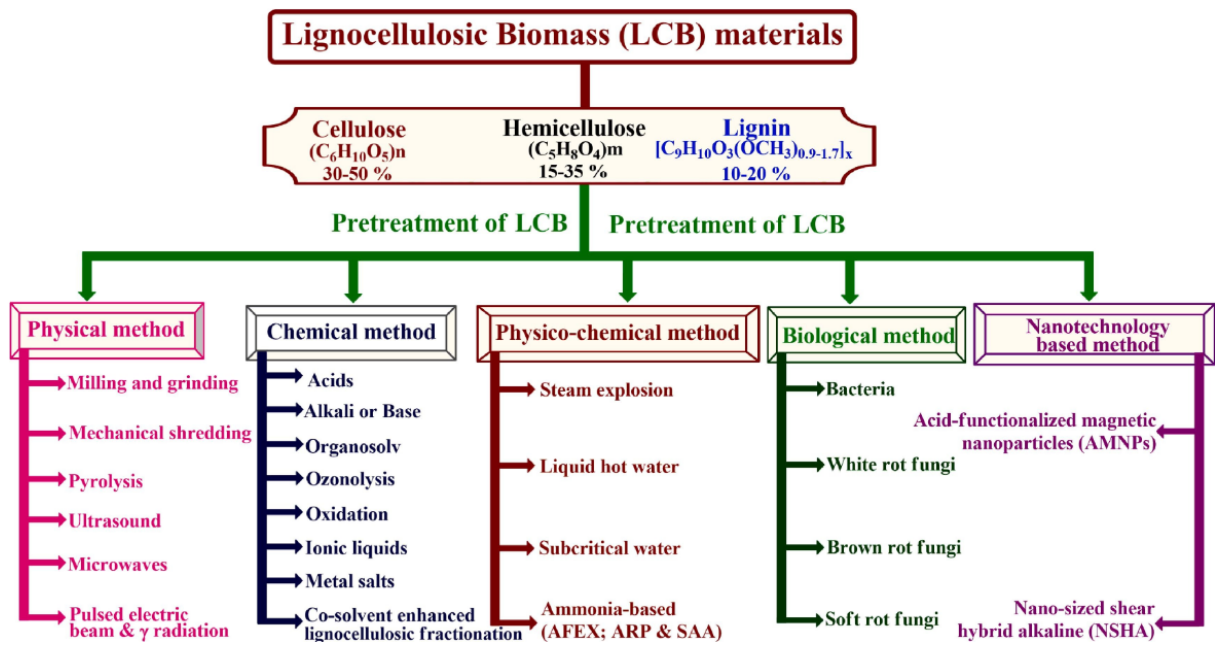


图 1.2 木质纤维素生物质的预处理方法

Fig. 1.2 Pretreatment methods of lignocellulosic biomass

预处理主要包括以下几种方法^[92]：

(1) 物理法预处理，主要包括研磨、削片和微波等方法。研磨或粉碎类型的物理法能够有效减小木质纤维材料的粒径从而增加其比表面积。这些物理法预处理大多对木质纤维素的结构破坏效果有限，因此常和其它预处理方法混合使用。

(2) 生物法预处理，包括直接使用酶或利用可以产生木质素分解酶的真菌进行预处理。生物法预处理较其它方法条件更温和且能耗更低，然而由于受到培养温度、通气量、pH 等因素的影响，预处理效率较低^[93]。

(3) 化学法预处理，包括酸法预处理、碱法预处理、离子液体预处理、有机试剂预处理和氧化预处理。后面三种方法的预处理成本较高或者在预处理结束后容易造成污染，因此不常被使用。

(4) 物理化学法预处理：包括氨纤维膨爆、热水处理、蒸汽膨爆预处理和湿式氧

化(WO)等方法。这些物理化学方法伴随着巨大的能源消耗,同时也会产生大量抑制物,因此不适用于实际生产中。

最常见的预处理是酸法预处理和碱法预处理^[94],其中酸法预处理木质纤维素可以得到较高浓度的单糖。Zhang^[95]等人研发的干式稀酸预处理可以处理较多种类的木质纤维素原料,该方法有着能耗低、无废水排放等优点。但是干式稀酸法预处理后也会生成由纤维素和半纤维素过度降解而来的多种抑制物。

1.6.2 脱毒、水解

木质纤维素的预处理过程会产生多种呋喃类、酚醛类抑制物,这些化合物都对微生物有毒害作用。例如在酸法预处理过程中,少量纤维素降解形成的己糖脱水后会形成5-羟甲基糠醛,另外还会有少量甲酸生成。过度降解部分半纤维素会生成糠醛、乙酸等抑制物。木质纤维素组分含量第三的木质素在预处理过程中会生成4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛等酚醛类抑制物,这些酚类抑制物的毒性可能比呋喃类抑制物更强^[96]。预处理过程中产生的抑制物严重抑制后续发酵过程中微生物的生长。去除上述抑制物的阶段称为脱毒,脱毒方法主要有物理法、化学法和生物法。最常见的物理法包括:膜过滤、离子交换树脂、吸附^[97]。化学法主要有萃取、盐析提取、中和或离子交换法^[98]。生物法主要是利用微生物对抑制物的降解作用去除抑制物^[99]。用物理法或化学法脱毒的要求比较严苛且成本较高。生物法脱毒较物理法和化学法有绿色环保的优势,因此被广泛应用。

由聚糖构成的纤维素和半纤维素需要被进一步水解处理,水解步骤将聚糖分解为各种单糖。在后续的发酵阶段,微生物可以直接利用这些单糖转化为高附加值产品。最常见的水解方法是酸水解和酶水解,其中酶水解(糖化)的效率更高,可以得到浓度更高的可发酵糖,因此被广泛使用^[100]。酶水解一般指纤维素酶和半纤维素酶将纤维素和半纤维素分解为葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等单糖。半纤维素酶有和纤维素酶类似的构成,这两种酶的协同作用会促进木质纤维素分解为单糖的速率^[101]。

1.6.3 发酵阶段

经过生物炼制过程中的预处理、脱毒和糖化阶段,木质纤维素中的多聚糖被降解成可被微生物直接利用的单糖。利用木质纤维素耐受菌株将获得的可发酵糖转化为高附加值产品是生物炼制的最终目的^[102]。有相关文献列举了目前生物炼制最具产业化前景的产品^[103],包括生物碳氢化合物、有机酸、呋喃类化合物、甘油和糖醇类产品等。

生物炼制过程中发酵阶段紧接水解阶段进行,方式主要包括三种分步水解和发酵、同步糖化共发酵、整合生物加工过程。分步水解和糖化是将水解和发酵分两步进行,该方法可以获得高浓度的发酵单糖供微生物进行生物转化。然而在水解阶段获得的高浓度单糖会抑制纤维素酶酶活从而使最终获得的可用单糖浓度降低。

同步糖化共发酵是将糖化和发酵在同一反应器进行,微生物及时消耗糖化产生的

单糖，降低了单糖对纤维素酶的底物抑制作用。利用高固含量的秸秆同步糖化共发酵可以得到较高的产品得率，但可能会阻碍传质^[104]。由于纤维素酶的最适温度（50℃左右）与微生物最适发酵温度差异较大。在实际生产中常常需要进行预糖化步骤保证糖化效率，然后再降温至发酵温度进行生物转化过程^[105]。

整合生物加工过程是将纤维素酶生产、酶水解和发酵过程置于同一个反应器中进行。生物炼制整体成本中购买商业纤维素酶的成本占比很大，整合生物加工过程可以大大降低木质纤维素生物炼制过程的生产成本^[106]。

1.7 本文立题依据及主要研究内容

利用廉价的底物生产单细胞蛋白饲料发展畜牧业，除可以节约资源和减低成本外，还能减少环境污染，实现食品生产的良性循环^[107]。生产单细胞蛋白的碳源极为广泛，最常见的葡萄糖、蔗糖、玉米、淀粉、糖蜜等可直接作为底物来源，但是原料成本较高且不符合循环经济的要求^[108]。廉价的农业废弃秸秆等木质纤维素生物质被广泛应用于单细胞蛋白的生产中。生产单细胞蛋白的氮源主要分为无机氮源和有机氮源，微生物以无机氮化合物作为氮源，能够高效且低廉地实现无机氮到单细胞蛋白的转变。

酵母生产单细胞蛋白能够使用多种底物原料，相比其它种类的单细胞蛋白富含维生素和微量营养元素。酿酒酵母、热带假丝等已经成功地进行商业化生产单细胞蛋白^[70]。但是目前生产单细胞蛋白的各类酵母依旧存在蛋白含量较低、菌体浓度较低、难以适应木质纤维素复杂体系等问题。皮状丝孢酵母是一种产油酵母，该酵母具备生长迅速和高细胞浓度等优点。并且对木质纤维素体系下的抑制物有很强的耐受性，因此具有生产单细胞蛋白的巨大潜力。*T. cutaneum* MP11 细胞体积巨大，可以为胞内单细胞蛋白与油脂的积累提供更大空间^[109]。

利用产油酵母 *T. cutaneum* MP11 生产单细胞蛋白与微生物油脂依旧存在一些困难和问题。这些问题主要包括：（1）产油酵母具有较高的油脂含量，*T. cutaneum* MP11 在木质纤维素水解液中的油脂含量最高可达 70.3%。尤其在氮限制条件下，诱导了油脂合成的分子机制，不利于单细胞蛋白的积累。（2）使用不同种类氮源会导致单细胞蛋白产量的差异，确定最适氮源后，需要进一步确定生产单细胞蛋白与油脂的最佳碳氮比、最佳 pH 值等条件。（3）生产单细胞蛋白的发酵前期加入过量的无机氮源可以抑制油脂的生成，使更多的碳前体进入氨基酸合成代谢从而促进胞内蛋白的积累。但是发酵结束后，直接排放残留有无机氮的发酵液会造成环境污染，需要用一种经济且环保的方式解决氨氮废水的排放问题。（4）增加微生物蛋白含量是提高菌株单细胞蛋白生产潜力的另一关键因素。为了提高微生物蛋白含量，人们尝试了各种常规突变、代谢工程改造的方法，但这些常规手段很难整体提升微生物的单细胞蛋白合成能力。

针对上述在单细胞蛋白与油脂生产过程中出现的问题，本论文探究了皮状丝孢酵

母以木质纤维素生物质为碳源和无机氮化合物为氮源生产单细胞蛋白与油脂的可行性。提出一种利用农业生物质与无机氮化合物生产单细胞蛋白与油脂的整合加工策略，并以循环发酵的策略限制含氮废水的排放。最后通过离心筛选适应性进化的手段提高 *T. cutaneum* MP11 的蛋白含量。本论文的主要研究计划主要包括：

(1) 分析皮状丝孢酵母利用木质纤维素与无机氮化合物生产单细胞蛋白与油脂的可行性。探究以木质纤维素为碳源与无机氮化合物为氮源，皮状丝孢酵母生产单细胞蛋白的最适氮源种类、最适碳氮比与最适 pH。

(2) 探究皮状丝孢酵母在木质纤维素水解液中蛋白含量明显上调的原因。以在合成培养基中发酵的 *T. cutaneum* MP11 为对照，分析小麦秸秆水解液中 *T. cutaneum* MP11 的氮同化、氨基酸合成、糖代谢、油脂合成等路径关键基因的转录水平变化情况。

(3) 通过循环发酵的策略限制含氮发酵废水的排放，重复利用发酵上清液中的残余氮进行循环发酵，监测每次循环过程中的金属离子、酚醛抑制物积累情况，测定每次循环发酵结束后的单细胞蛋白与油脂的产量。

(4) 对整体生物炼制流程进行物料衡算，分析用新鲜水发酵和用含氮发酵废水循环发酵的单细胞蛋白与油脂产量、废水排放量、营养盐添加量等生产指标的差异。

(5) 确定基于细胞密度差异的离心筛选作为适应性进化筛选手段的有效性，离心筛选适应性进化提高 *T. cutaneum* MP11 生产单细胞蛋白的能力。

第2章 皮状丝孢酵母联合生产单细胞蛋白与油脂的可行性探究

2.1 引言

单细胞蛋白产品包括游离氨基酸、维生素等多种营养成分，在解决蛋白质短缺方面具有巨大潜力，已被广泛用于动植物来源蛋白的替代品。通常，单细胞蛋白来源于微藻、真菌、酵母和细菌。酵母因为生长快速、底物选择广泛、核酸含量低等优点，被广泛用于单细胞蛋白的实际生产。

如农业废弃物等废料和廉价原料被认为是发酵生产单细胞蛋白的潜在原材料，木质纤维素生物质是已被用作生产单细胞蛋白的优势基质。在单细胞蛋白的生产过程中，利用木质纤维素作为底物不仅能减少环境污染，也有效降低了单细胞蛋白生产成本。木质纤维素作为底物之前需要经过物理或化学法预处理和糖化步骤，为了使菌株正常生长，需要去除预处理产生的抑制物，并且需要选择适应木质纤维素体系的菌株发酵生产单细胞蛋白。

氮元素是生物体的基本元素，也是组成氨基酸、蛋白质的重要组成元素，氮源种类及用量对单细胞蛋白的生产有重要影响。较为常见的有机氮源包括蛋白胨、酵母提取物、玉米浆和棉籽蛋白等，常见无机氮源包括硫酸铵、氯化铵等铵态氮以及硝酸盐、亚硝酸盐等硝态氮。虽然蛋白胨、酵母提取物等有机氮源营养丰富，用作氮源时可能会获得较高单细胞蛋白产量，但因其价格昂贵，在单细胞蛋白的实际生产中一般选用价格更为低廉的铵盐作为合成单细胞蛋白的氮源。

碳氮比对菌体合成单细胞蛋白存在直接影响，因为碳氮比的变化通过影响细胞代谢通路的流量分配而影响蛋白质的合成。碳氮比较低时，细胞的蛋白质合成会增加而碳水化合物的合成会减少。有研究者发现，单细胞蛋白生产的最佳碳氮比为 6-10，因为较高的碳氮比会导致细胞内脂质或碳水化合物的积累，进而影响单细胞蛋白的积累^[110]。碳氮比较高时，细胞中碳源利用的酶等蛋白表达增加。碳氮比较低时，细胞谷氨酸合成酶等氮代谢相关的蛋白质的表达会增加，更有利于将无机氮氮转化为单细胞蛋白。

本章节首先测试了耐受木质纤维素体系的三株菌株生产单细胞蛋白的性能差异，选定皮状丝孢酵母作为后续研究的菌株。在木质纤维素体系下确定了同步糖化共发酵生产单细胞蛋白与油脂的最适碳氮比和最适 pH 值。其次探究了复合氮源对 *T. cutaneum* MP11 生产单细胞蛋白与油脂的影响，确定了最适复合氮源配比。比较了木质纤维素水解液与合成培养基培养 *T. cutaneum* MP11 生产单细胞蛋白与油脂的差异。测定了相较于合成培养基利用木质纤维素水解液培养皮状丝孢酵母的转录水平变化，分析了单细胞蛋白含量及产量提高的原因。

2.2 材料与方法

2.2.1 酶和试剂

纤维素酶 Cellic Ctec 2.0 由北京诺维信生产，根据 Brandford 方法测得酶蛋白含量为 81.5 mg/mL，根据 NREL 方案测得滤纸酶活为 256.0 FPU/mL，根据 Ghose 方法测得纤维二糖酶活为 4653.3 CBU/mL。

2.2.2 菌种及其培养

谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* S9114-ppAB 是一株经基因工程改造的含木糖代谢途径的通常公认安全 (Generally recognized as safe, GRAS) 的菌株。该菌株产 SCP 的培养基含 100 g/L 葡萄糖、2.5 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 磷酸氢二钾、0.25 g/L 硫酸镁、0.01 g/L 氯化钙、0.01 g/L 七水硫酸亚铁、0.01 g/L 硫酸锰、0.001 g/L 硫酸锌、0.0002 g/L 硫酸铜、0.0002 g/L 生物素和 0.0005 g/L VB₁，硫酸铵浓度按对应碳氮比计算。

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 是一株能够木糖代的菌株，其产 SCP 的培养基含 100 g/L 葡萄糖、1 g/L 磷酸氢二钾、0.5 g/L 氯化钠和 0.01 g/L 硫酸亚铁，硫酸铵浓度按对应碳氮比添加。

单细胞蛋白与油脂的发酵菌株皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 (CGMCC 20481) 在限制氮源条件下通过超离心力适应性进化筛选获得。该菌株所用的培养基如下：

- (1) YPD 平板：10 g/L 酵母提取物、20 g/L 葡萄糖、20 g/L 蛋白胨和 20 g/L 琼脂。
- (2) YPD 培养基：10 g/L 酵母提取物、20 g/L 葡萄糖和 20 g/L 蛋白胨。
- (3) SCP 发酵培养基：60.0 g/L 葡萄糖、1.0 g/L 磷酸二氢钾、0.5 g/L 酵母提取物和 1.0 g/L 七水硫酸镁，按对应碳氮比添加氮源。
- (4) 复合氮源 SCP 发酵培养基：20 g/L 硫酸铵、20 g/L 尿素、10 g/L 玉米浆、1 g/L 磷酸二氢钾和 1 g/L 七水硫酸镁。
- (5) 产 SCP 合成培养基 (3 L 生物反应器)：100 g/L 葡萄糖、30 g/L 木糖、1 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 七水硫酸镁和 26 g/L 硫酸铵。

培养方法：首先需要对 *T. cutaneum* MP11 进行种子活化。取出在 -80 °C 保存的冻存管，用经酒精灯外焰灼烧 30 s 后的接种环蘸取菌液，然后用平板划线法将菌液接种到 YPD 平板上进行初次活化，在 30 °C 恒温培养箱培养 48 h。初次活化后用灭菌枪头挑取单菌落转移至 20% 装液量装有 YPD 培养基的 100 mL 摇瓶中进行二次活化，培养条件为：温度 30 °C，转速 180 rpm，培养时间 20 - 24 h。最后将二次活化菌液吸取 5 mL 接种至装液量为 10% (v/v) 的 500 mL 锥形瓶于 30 °C 和 180 rpm 振荡培养 72 h。

生物脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN89 是在干式稀酸预处理后的含多种抑制物的玉米秸秆物料上筛选得到的真菌。该脱毒菌株优先以抑制物糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸为碳源^[11]，发酵液的 pH 值随着抑制物的消耗而持续上升 (此时消耗的抑制物为酸性物质)。消耗完抑制物后，*P. variotii* FN89 会代谢木糖产生酸性代谢物，此时发酵液

的 pH 值会下降。脱毒过程中发酵液 pH 达到最高点开始下降时，测定糠醛、5-羟甲基糠醛浓度为零，乙酸浓度降至 0.2 g/L 以下，表明脱毒结束。*P. variotii* FN89 在 PDA 固体培养基上保存，用于生物脱毒步骤的合成培养基为 SM 培养基，培养时间为 24 h。

(1) PDA 培养基：200 g/L 马铃薯提取液（马铃薯小块加水煮沸 20 min 后，过滤获取滤液）、20 g/L 葡萄糖和 25 g/L 琼脂。

(2) SM 培养基：20 g/L 葡萄糖、2 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 七水硫酸镁、1 g/L 硫酸铵、1 g/L 酵母提取物和 0.5 g/L 氯化钙。

2.2.3 小麦秸秆预处理、糖化与生物脱毒及水解液的制备

小麦秸秆收获于 2021 年，产自河南南阳。根据 NREL 组分测定方法，测得小麦秸秆纤维素含量为 31.24%，半纤维素含量为 24.31%，木质素含量为 19.41%，灰分含量为 9.61%，其中各组分均按照干重计算。

根据本实验室的干式稀酸法对小麦秸秆进行预处理：首先用粉碎机将小麦秸秆粉碎至直径为 10 ± 2 mm，然后进行干酸法预处理。小麦秸秆（干重）和的稀硫酸溶液按照固液比 2:1 (w/w) 同时加入到 20 L 的预处理反应釜中。最终的硫酸添加量为每 100 kg 小麦秸秆（干基）添加 3.8 kg 浓硫酸。在反应釜中转速 50 rpm 搅拌 1 min 将小麦秸秆与稀硫酸混合均匀后，通入蒸汽在 175 ± 2 °C，50 rpm 的条件下反应 5 min。将麦秆处理成固体颗粒后用碳酸钙调节 pH 至 5.5，接着用盘式粉碎机处理物料以出去物料中的长纤维。

将灭菌的预处理物料按 30% (w/w) 固含量转入 5 L 生物反应器，于 200 rpm 和 50 °C 进行糖化。纤维素酶用量为 4 mg 纤维素酶蛋白每克麦秆干物质。糖化 12 h 后，将水解液转入 3 L 生物反应器，以 10% 接种量加入 *P. variotii* FN89 菌液进行生物脱毒，37 °C，750 rpm 脱毒 11 - 14 h。脱毒结束后，立即停止通气并将生物反应器温度升温至 50 °C，保持 12 h 即可灭活发酵液中的 *P. variotii* FN89。向生物反应器中加入营养盐后接入 *T. cutaneum* MP11 种子液，进行同步糖化共发酵生产单细胞蛋白与油脂。

将预处理后的小麦秸秆用碳酸钙粉末调节 pH 至 5.0 - 5.5，然后按照实验室之前的固态脱毒法，用脱毒菌株 *P. variotii* FN89 去除预处理过程中产生的各种抑制物。具体过程如下：将生长在 PDA 培养基上的 *P. variotii* FN89 种子接种到预处理后的物料中，将种子和物料在箱中充分混合后放入 37 °C 恒温培养箱中保持 48 h，每隔 12 h 喷洒一次去离子水，使物料保持湿润状态。实时测定物料中的抑制物浓度变化情况。脱毒完成的物料再用磨浆机移除较长的纤维组分。将脱毒并磨浆后的麦秆物料按 30% (w/w) 固含量投入 5 L 生物反应器中进行糖化，添加 4 mg protein/g dry material 的纤维素酶，糖化条件为 50 °C，200 rpm。糖化 48 h 后得到糖化液，将糖化液分装后用离心机固液分离，离心参数为：10000 rpm，10 min。离心结束后收集上层糖化液体，再经过灭菌和滤纸过滤就可以得到 30% (w/w) 固含量的小麦秸秆水解液。小麦秸秆水解液含 115.5 g/L 葡

葡萄糖、27.3 g/L 木糖和 0.6 g/L 乙酸，用于发酵时需添加 1 g/L 磷酸二氢钾和 1 g/L 七水硫酸镁。

2.2.4 同步糖化共发酵生产单细胞蛋白与油脂

首次活化是从 YPD 固体平板挑取 *T. cutaneum* MP11 单菌落至装有 20 mL YPD 培养基的 100 mL 锥形瓶，第二次活化是取 5 mL 菌液至装有 50 mL YPD 培养基的 500 mL 锥形瓶中，两次活化均在 30 °C、180 rpm 摇床培养 24 h。将菌液以接种量为 10% (v/v) 接入 3 L 生物反应器中进行发酵，发酵体系 1 L，温度 30 °C、转速 600 rpm、通气量 1 vvm，培养 72 h。添加营养盐条件为 1 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 七水硫酸镁和 24 g/L 硫酸铵。用 2M H₂SO₄ 和 5M NaOH 将 pH 调节至 5.0。

2.2.5 菌体生长、细胞形态和细胞干重评价

菌体生长测定：12000 rpm 离心发酵菌液，弃上清，用 1 mL 超纯水稀释菌体至 40 倍（使 OD₆₀₀ 值在 0.3-1.0 范围内），以 1 mL 超纯水作空白对照。用 Thermo BIOMATE 3S 紫外可见分光光度计（Waltham, MA, USA）检测菌体在 OD₆₀₀ 的光密度值。

细胞形态观察：OLYMPUS BX53 光学显微镜（日本东京），将菌液（可适当稀释）吸取至载玻片中央，盖玻片压实至没有气泡，置于 40 倍显微镜下找到合适观测位置，然后再调至 100 倍观测细胞形态。

细胞干重测定：用差重法测定菌体干重，具体测定流程如下。首先将发酵结束的菌液摇匀后吸取 25 mL - 30 mL 至已灭菌烘干称重的 50 mL 离心管中。在转速为 10000 - 12000 rpm，离心 3 min 后，倒去上清液，用大约 25 mL 去离子水洗涤菌体。重复离心弃去上清液后再次洗涤菌体，去除菌体表面杂质以及无机氨氮，防止菌体表面的无机氮源和营养盐影响后续蛋白含量或油脂含量的测定。将装有菌体的 50 mL 离心管置于 65 °C 烘箱中烘干至恒重，称量其总重量，减去空离心管重量即可求得细胞干重。

2.2.6 单细胞蛋白产量与含量的测定及计算

用凯氏定氮法测定蛋白含量。将烘干至恒重的菌体加入消化管，估算其氮含量为 10 mgN-30 mgN（所加固体不超过 1 g）。另外，需加入 1:9 的硫酸铜与硫酸钾共 5 g 作为催化剂，再加入 10 mL 浓硫酸。之后于沛欧红外石英消化炉加热消化，蛋白质中的铵根在强热、硫酸铜催化和浓硫酸作用下硝化生成无机态的硫酸铵。待消化管内的液体颜色为澄清透明的绿色时，继续消化 30 min 以上。待消化管冷却至室温后，用凯氏定氮仪测量菌体蛋白含量。

凯氏定氮时，消化管中的铵根离子与强碱氢氧化钠在通有蒸汽的条件下反应。同时，通过蒸馏释放出氨气经管路收集于硼酸溶液。氨气与硼酸反应生成偏硼酸铵，上述两个反应式分别为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2 \text{NaOH} = 2\text{NH}_3 \uparrow + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{SO}_4$ 和 $2 \text{NH}_3 + 4 \text{H}_3\text{BO}_3 = (\text{NH}_4)_2\text{B}_4\text{O}_7 + 5 \text{H}_2\text{O}$ 。其中，氮含量、蛋白含量和蛋白产量的计算方法见公式 2-1、2-2、2-3。凯氏定氮时，盐酸滴定反应式为 $(\text{NH}_4)_2\text{B}_4\text{O}_7 + 2 \text{HCl} + 5 \text{H}_2\text{O} = 2 \text{NH}_4\text{Cl} + 4 \text{H}$

3BO_3 。在测量合成培养基或水解液培养的菌体蛋白含量时，直接经消化后凯氏定氮即可测得。

用木质纤维素进行 *T. cutaneum* MP11 的同步糖化共发酵后，离心获得的木质纤维素残渣内部及其表面会残留发酵液。因为发酵液残留的硫酸铵难以去除，所以凯氏定氮法测蛋白含量会偏高。因此，在计算最终蛋白含量时需要减去这部分无机氮。除此以外，还要减去木质纤维素自身含有的蛋白及糖化时加入的纤维素酶的蛋白含量。*T. cutaneum* MP11 在木质纤维素体系下进行同步糖化共发酵的蛋白含量计算公式如下：

$$\text{Nitrogen content (\%)}: w_1 = \frac{[c] \times ([V_i] - [V_0]) \times M}{m_1} \times 100\% \quad (2-1)$$

$$\text{Produced SCP content (\%)}: w = F \times (w_1 - w_2 - w_3) \quad (2-2)$$

$$\text{SCP titer (g/L)}: C = \frac{w \times m_1}{V} \quad (2-3)$$

公式 (2-1) 中， c (mol/L): 滴定所用盐酸的浓度； V_i (mL): 样品滴定标准酸消耗量； V_0 (mL): 空白样滴定标准酸消耗量； M (g/mol): 氮元素摩尔质量 14； m_1 (g) 是指样品烘干至恒重的质量。公式 (2-2) 中， w_1 : 样品消化后测定含氮量； w_2 : 不消化样品，研磨至粉末状测定氮含量，即发酵液中残留的硫酸铵氮含量； w_3 : 糖化结束后的样品经消化后测定含氮量； F 为氮含量换算为蛋白质含量的系数 6.25。公式 (2-3) 中 V (ml) 是指发酵液样品的体积， w 指产物 SCP 含量。

SCP 总糖得率，氮元素转化率的计算公式如下：

$$\text{Yield (g/g)} = \frac{V_{\text{total}} \times C}{DM \times X_1 \times f + C_{\text{xylose}}} \quad (2-4)$$

$$\text{Nitrogen conversion (\%)} = \frac{\text{SCP-N}}{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-N} + \text{YE-N} + \text{Peptone-N}} \times 100\% \quad (2-5)$$

公式 (2-4) 中 V_{total} (mL) 是发酵结束时发酵液总体积； C (g/L) 是 SCP 产量； DM (g/L) 为糖化初始阶段麦秆干重浓度，30% (w/w) 固含量下 $DM=300$ g/L， X_1 (%) 是纤维素含量， f 为聚糖转化为单糖的系数 1.11； C_{xylose} (g/L) 为发酵初始阶段木糖浓度。公式 (2-5) 中 SCP-N (g) 是指产物单细胞蛋白含有的氮元素质量； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-N}$ (g) 是指加入硫酸铵含有的氮元素质量；YE-N 和 Peptone-N (g) 是指种子液中酵母提取物和蛋白胨含有的氮元素质量。

2.2.7 油脂含量与产量的测定

首先按照 2.2.6 所示，测定细胞干重。然后向装有已烘干菌体的玻璃平皿中加入 5 mL 为 5 mol/L 的盐酸溶液，用枪头混匀菌体和盐酸，确保菌体完全被盐酸浸泡。4 h 后将盐酸和菌体全部吸取到 50 mL 离心管中，把离心管固定放置于沸水中蒸煮 10 min 以上。蒸煮结束后立即将离心管冰浴冷却 10 min。加入 6.7 mL 氯仿、13.3 mL 甲醇后盖紧管盖，在转速为 200 rpm 的摇床中萃取油脂 60 min 以上。萃取结束后 12000 rpm 离心 3

min, 用针筒吸取离心管最下层的氯仿相 (含油脂)。将吸取的氯仿相置于旋转蒸发瓶中, 80 °C水浴旋转蒸发去除氯仿后, 将蒸发瓶放入 65 °C烘箱过夜烘干去除蒸发瓶中残留的水分, 减去旋转蒸发瓶重量即为油脂重量。油脂含量等于油脂重量除以菌体干重。

木质纤维素体系油脂产量的测定与计算: 由于进行同步糖化共发酵时含有纤维素等固体, 无法测定发酵液中菌体干重。直接将已知体积的发酵液过夜烘干后, 用上述方法测定样品油脂重量, 发酵液油脂产量公式:

$$\text{Lipid titer (g/L)} = \frac{m_{\text{Sample Lipid}}}{V_{\text{Sample}}} \quad (2-6)$$

2.2.8 RNA 提取和 RT-qPCR 实验

菌体的收集: 皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 的活化过程见 2.2.1, 取 5 mL 活化菌液分别加入装有 50 mL SCP 合成培养基 (对照组) 与装有 50 mL 15% (w/w) 固含量麦秆水解液 (实验组) 的 500 mL 三角瓶中。30 °C, 180 rpm 培养 24 h 或 48 h, 将菌液转移至 50 mL 离心管后, 用温度设置为 4 °C 的离心机 12000 rpm 离心 3 min 弃去上清液后, 收集全部菌体。RT-qPCR 实验的对照组所用的合成培养基成分 60 g/L 葡萄糖、15 g/L 木糖、1 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 七水硫酸镁、15 g/L 硫酸铵。实验组所用培养基为 15% 麦秆水解液添加 1 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 七水硫酸镁和 15 g/L 硫酸铵。

RNA 提取: 提前将研钵和研磨棒用锡纸包裹, 放置于 200 °C 烘箱 5 h 去除 RNA 酶。将收集菌体的离心管浸泡至液氮中冻干菌体, 研钵中加入少量液氮进行冷却后, 将冻干菌体放入研钵中, 用研磨棒将冻干态菌体研磨成粉末状。在 2 mL RNase-free 离心管中加入 1.5 mL 细胞裂解液 RZ, 将磨成粉末状的菌体倒入离心管中, 将菌体与裂解液混匀成匀浆状后放置 5 min。用 TIANGEN DP419 总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。最后用 ReverTra Ace qPCR-RT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 实验。该研究所用的引物如表 2.1-2.3 所示。

表 2.1 氨基酸合成、氨同化和铵转运相关基因 RT-qPCR 实验引物

Table 2.1 The nucleotide primers involving with amino acid synthesis, ammonia assimilation and ammonium transport for RT-qPCR assays

Enzyme	Gene code	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Glutamate dehydrogenase	<i>Trcu_02909</i>	CCAAGCATGACCCTGAGAA	GCCGAAGAGTGGATGAAGAC
Glutamate dehydrogenase	<i>Trcu_04903</i>	CTCCGTCTCCACCCCACT	CACCCTTACCACCACCCAT
Glutamine synthetase-glutamate synthase	<i>Trcu_01838</i>	CGTCCTTTGCGAGTGCTA	CCTGCTCAAGACCGAACC
Glutamine synthetase	<i>Trcu_03031</i>	TCTGCGGCGTCGTGTATG	GGGATGCGGCGGTAAGTC
Glutamate synthase (NADPH/NADH)	<i>Trcu_00619</i>	GAGGGTTACTACGCTGTCCG	AATGGAGTTGTCGGTGGG
Ammonium transportase	<i>Trcu_02054</i>	TCTTTCTTCCAGGGGATGTT	GCAGTAGACAATGGTGAGCC
Ammonium transportase	<i>Trcu_02091</i>	ACGGAACTCAGCGGAATG	GACGGGACGGTTGAGGAC
Alanine transaminase	<i>Trcu_02828</i>	TGCCAACATTGGAAACCC	CAACGAGCGAGATGACCTG
Aspartate aminotransferase	<i>Trcu_00399</i>	ATGCTTACCACCTTCTCCCG	CCTTGAAGTTCTCAGTGATGCC
Glutamate decarboxylase	<i>Trcu_02358</i>	CATCAGCCGCGACAACC	TCCCCTGCCCTTTATTTGT
Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	<i>Trcu_04737</i>	ATGCCGCAGTCACCAAGT	CGAGACCCGAGAAGACGA
Threonine synthase	<i>Trcu_04818</i>	CGCCAACAAGGGCAAGG	TGGAGCGGAGGCCGTAGA
Tryptophan synthase	<i>Trcu_03047</i>	GGCGTTTCGTCACCTTTCCT	CCAAGCTCGATAATGTCCG
Threonine dehydratase	<i>Trcu_02837</i>	GAAGCGACTCGGATGTGAC	CCTTCTTCTTCTCCTCCTCTGTC
Glutaminase	<i>Trcu_02665</i>	CGATACTACAATCCCCTCA	GCGAATCCGTTCAAACCT
Saccharopine dehydrogenase	<i>Trcu_03633</i>	CCGTGTCGCTGCCTTTG	ACCCTTGCCGCCATCCT
S-adenosylmethionine synthetase	<i>Trcu_02371</i>	GTCAACTGCCTCGTGGATG	CGCACCTGGTAGTCGTCC
Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	<i>Trcu_00045</i>	GGTCGTGATGGACTGGATG	AAGCCGAGTTGCCGATG
Aromatic amino acid aminotransferase I	<i>Trcu_04981</i>	ACCTGCGGCACCACCT	ACGGGAACAGGGACGG
Branched-chain amino acid aminotransferase	<i>Trcu_00161</i>	CCCCAAGGAGAAGGGATAC	GCGATGACGAACAGCAGA
Lysyl-trna synthetase, class II	<i>Trcu_02979</i>	GCGAGGAGGAGATGGACG	GGTAGGGGTCGGGGTTCT
Arginyl-trna synthetase	<i>Trcu_05280</i>	TATGCCCTCCCCACCCT	CGACACCGGCGACAATC
Tryptophanyl-trna synthetase	<i>Trcu_05015</i>	CCGACGAGTGGGAGAAGG	GGGCAGGAGTCAGTAATTGTG

表 2.2 油脂合成相关基因 RT-qPCR 实验引物

Table 2.2 The nucleotide primers involving with lipid synthesis for RT-qPCR assays

Enzyme	Gene code	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
ATP citrate (pro-S)-lyase	<i>Trcu_05047</i>	GGTCTTGCTTCGGGCTAC	ACAAGGACGACACGGAGG
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	<i>Trcu_00818</i>	CCCTCCTCGTCGAGTTTG	GCAATAGGGTCGTGGGTC
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	<i>Trcu_03773</i>	GGATCGGAGATCATTGCC	AATGAGAGCAGTGTCGGG
Pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase)	<i>Trcu_02935</i>	GCTCCCGAAGACCCTAAG	AGCATGAAGGTAAGGGGG
Dihydrolipoamide dehydrogenase	<i>Trcu_02957</i>	CCAACCAGGACACTGACG	CCGAAGTTCACGACGATG
Acetyl-coa synthetase	<i>Trcu_03003</i>	TCTTCATCATCGCCGACC	GACGACGTCAATGCGCTC
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	<i>Trcu_05648</i>	ACAAGCTTCCCGGTCTTG	TCACGAACGAAGTGCGAG
6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Trcu_02851</i>	CACCATCCAACCCTTTCC	CAAATCCCCCAAGCAAGT
Malate dehydrogenase (oxaloacetate- decarboxylating) (NADP+)	<i>Trcu_00011</i>	CCACCACACACATTTCCG	ATAGCCATGTGGGTTCCG
Acetyl-coa carboxylase / biotin carboxylase	<i>Trcu_04595</i>	AAGCTCAACTCGATGGGC	CGTAAGCACGCGAAGTCT
Fatty acid synthase complex protein subunit beta, fungi type	<i>Trcu_00520</i>	TTCATCGAGGTTGGTCCC	CTTGTGGTTCTTGGCGTG
Fatty acid synthase complex protein subunit alpha, fungi type	<i>Trcu_00529</i>	TTACCTCGTTCGGTTTCG	GCACGACGCTTGATCTTG
Diacylglycerol O-acyltransferase 1	<i>Trcu_03536</i>	TTGGCACCTTTTCGCTC	TGGTGATCATTGGGATGG
Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase / dihydroxyacetone phosphate acyltransferase	<i>Trcu_04305</i>	AAGGCAAAGGAGGCTCTC	TAGCGGTAGGCGACAATG
Lysophosphatidate acyltransferase	<i>Trcu_03414</i>	CGCTTCAACCTCAACTACTATGT	AATGTGCTCTTCGCCCTC
Phosphatidate phosphatase	<i>Trcu_01186</i>	CCGAGGAATGGCTCAAGC	CCTTCATCCTGCAGCGAGT

表 2.3 糖代谢相关基因 RT-qPCR 实验引物

Table 2.3 The nucleotide primers involving with glucose metabolism for RT-qPCR assays

Enzyme	Gene code	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Hexokinase	<i>Trcu_02268</i>	CACATTGTCGCCACCG	AGGATCTTGAGTGCCTCGTGT
Hexokinase	<i>Trcu_03222</i>	GTATCGCCGCCATTGTCT	GTGCGTCGTAATCTTCTTGC
Glucose-6-phosphate isomerase	<i>Trcu_04167</i>	AAGACTGAGGAGCAGGTTGT	CATGATCGAGTTGGTGGG
Fructose-1,6-bisphosphatase I	<i>Trcu_01724</i>	GCGGCATCTTCGGCTAC	GTGGATCGAGGTGGGGAC
6-phosphofructokinase 1	<i>Trcu_00360</i>	CAACGCTCAAGCCTACCA	TGCTCCACCAGACATTCG
Triosephosphate isomerase	<i>Trcu_00578</i>	CCACCATTGAGGAGAAGGACTG	GTTGACCGAGCCGCCGTA
Fructose-bisphosphate aldolase, class II	<i>Trcu_04860</i>	CGACACTCAGTTCGCCTACC	TGGTCTTCTCACCTCACG
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Trcu_01126</i>	CCACCAAGCCCTTCAACA	GACGACTGGGACGAAGTGAG
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Trcu_01680</i>	GACGGCCCTTCGCACAA	GGACACGGAACGCCATAC
Phosphoglycerate kinase	<i>Trcu_05335</i>	TCCACATTGAGGAGGAGGGC	GTCGCCGAGCGAAGTAAGC
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	<i>Trcu_02862</i>	CCCCGTTCCCTTCATTATCTC	ACTTGCCGGTCATCTCCTCA
Probable phosphoglycerate mutase	<i>Trcu_00681</i>	GGTGCGGCTTCCCTATCCA	GGGCTCCTTGAGCGTGTGTG
Probable phosphoglycerate mutase	<i>Trcu_03622</i>	ACCCGCATATCCGAGTGGC	GCCGTCTTGAGGCTGTAGGG
Probable phosphoglycerate mutase	<i>Trcu_03969</i>	GGCGAGACGCTCACCGAGTT	GGAGGGCATTGCCAACACAGC
Enolase	<i>Trcu_05201</i>	TTCATTGCCGACCTTGCC	CGGTGGTGCCCTTGAGGA
Pyruvate kinase	<i>Trcu_00983</i>	GGCTCGCCTCATCTCCAA	ACGGGATAGACACCACGC
D-xylose reductase	<i>Trcu_01943</i>	AGACACTCCCGTCGCTCCTCA	TGTTGATAAGGGCGTTGTCTG
Xylitol dehydrogenase	<i>Trcu_00347</i>	CGCACCGGGATCAAAGGT	GTGTTGCAGTAGCGGAAGACG
Xylulokinase	<i>Trcu_05012</i>	GGCCAAGAACCCACGAT	TTGTACGCCACGCCGACC
Transketolase	<i>Trcu_00933</i>	CTCCGCTCCAAGGGTCTCAA	AGGCAGGGATACCGATGTGC

2.2.9 HPLC 分析

通过用配置有 RID-10A 型示差折光检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 和 HPX-87H 型色谱柱 (Bio-rad, USA) 的 Shimadzu LC-20AD 高效液相色谱 (Kyoto, Japan) 检测葡萄糖、木糖、乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛 (HMF)。

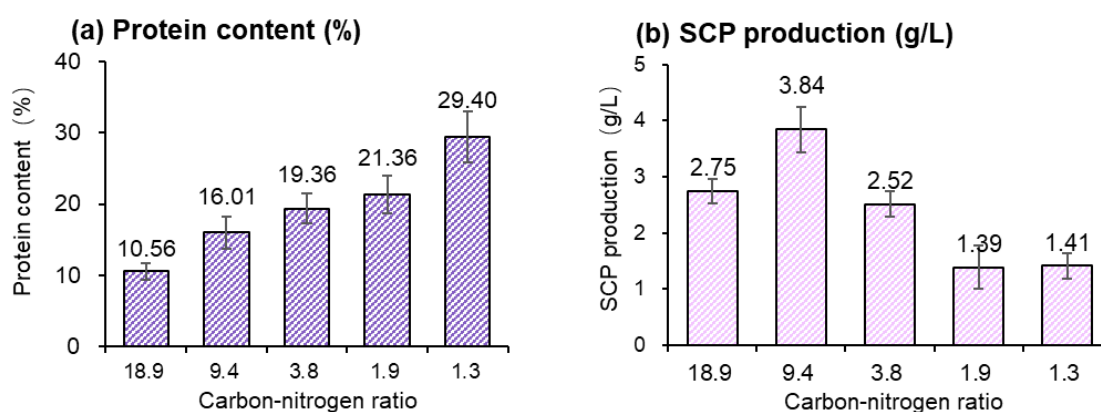
2.3 结果与讨论

2.3.1 不同菌株产单细胞蛋白的性能差异

皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11、谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* S9114-ppAB 和酿酒酵母 *S. cerevisiae* XH7 是三株耐受木质纤维素体系的菌株。这三株菌株可以正常代谢木质纤维素来源的单糖。在以硫酸铵为唯一氮源的合成培养基, 本小节比较研究以上三种菌株的单细胞蛋白发酵能力。初始葡萄糖浓度 100 g/L, 硫酸铵浓度设置为 10、20、50、100 和 150 g/L, 对应碳氮比为 18.9、9.4、3.8、1.9 和 1.3。

图 2.1 是 *T. cutaneum* MP11 在不同的碳氮比条件下产单细胞蛋白与微生物油脂的结果。随着碳氮比的降低 (硫酸铵浓度的增加), 皮状丝孢酵母的蛋白含量逐渐增加 (图 2.1a), 碳氮比为 1.3 时蛋白含量最高为 29.4%。细胞干重随着氮源浓度的增加而下降, 这可能是因为高浓度硫酸铵造成的较大渗透压不利于单细胞蛋白的积累。单细胞蛋白的产量随着氮源浓度的增加先上升后下降 (图 2.1b), 在碳氮比为 9.4 时, 单细胞蛋白的产量最高为 3.84 g/L, 此时油脂产量为 13.2 g/L (图 2.1f)。油脂含量及油脂产量都随着碳氮比的下降而下降, 产油酵母需要在限氮条件下才能维持高油脂含量 (图 2.1e)。

由于 *T. cutaneum* MP11 是一种产油酵母, 需要较高浓度的硫酸铵抑制其产油特性, 使其更偏向于积累蛋白。因此, 培养 *T. cutaneum* MP11 获得较高的单细胞蛋白产量需要一个较低的碳氮比条件 (较高的硫酸铵浓度)。在该碳氮比条件下, 必须在能够维持菌体正常生长的前提下, 皮状丝孢酵母吸收的碳源大多数流入蛋白质合成的相关代谢通路, 利用少部分碳源进行油脂的合成。在细胞干重一定的情况下, 菌体保持较高的蛋白含量可以获得更高的单细胞蛋白产量。



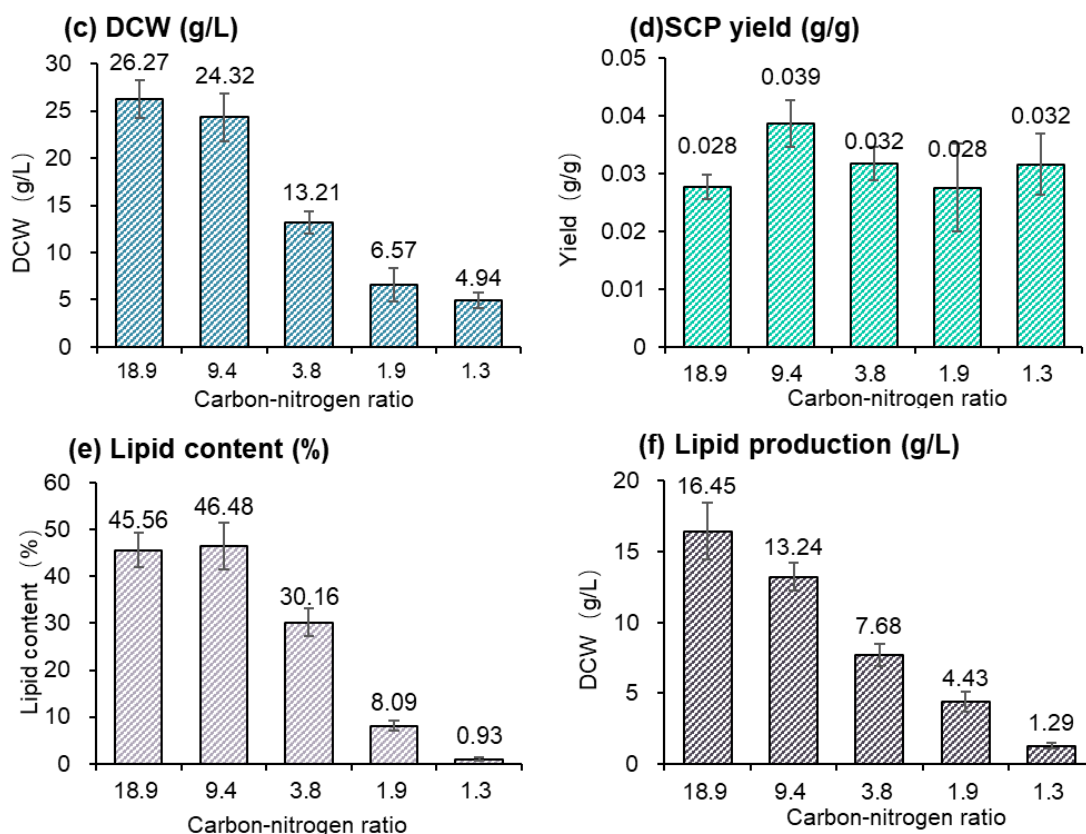


图 2.1 *T. cutaneum* MP11 在不同碳氮比条件下生产单细胞蛋白与油脂

Fig. 2.1 SCP and lipid production under different carbon-nitrogen ratios for *T. cutaneum* MP11

(a) Protein content; (b) SCP production; (c) DCW; (d) SCP yield; (e) Lipid content; (f) Lipid production

注：发酵在 500 mL 三角瓶中进行，培养基为酵母产 SCP 发酵培养基，具体成分如材料与amp;方法 2.2.1 所示，发酵温度为 30 °C，转速为 180 rpm，培养 96 h，SCP 得率计算时间为 96 h

图 2.2 是 *C. glutamicum* S9114-ppAB 在不同碳氮比条件下生产单细胞蛋白的情况。*C. glutamicum* S9114-ppAB 的蛋白含量随着硫酸铵浓度的增加而增加，在碳氮比 1.3 时细菌菌体蛋白含量最高，最高为 76.4%（图 2.2a）。*C. glutamicum* S9114-ppAB 在不同碳氮比条件下的细胞干重差别较小，在碳氮比为 3.8 时，细胞干重和单细胞蛋白产量达到最大值，分别是 4.8 g/L 和 3.45 g/L（图 2.2b,c）。根据实验结果可以看出，不同碳氮比条件下菌体的细胞干重都在 4.5 g/L 上下波动，谷氨酸棒状杆菌对高浓度的硫酸铵耐受性较强，在较高浓度的硫酸铵条件下菌体也能保持正常生长。在不同碳氮比条件下，*C. glutamicum* S9114-ppAB 的细胞干重值均较小，这可能是由于该菌株积累蛋白质的能力较弱，大部分碳源都用来合成其他可溶性副产物或维持自身生长。

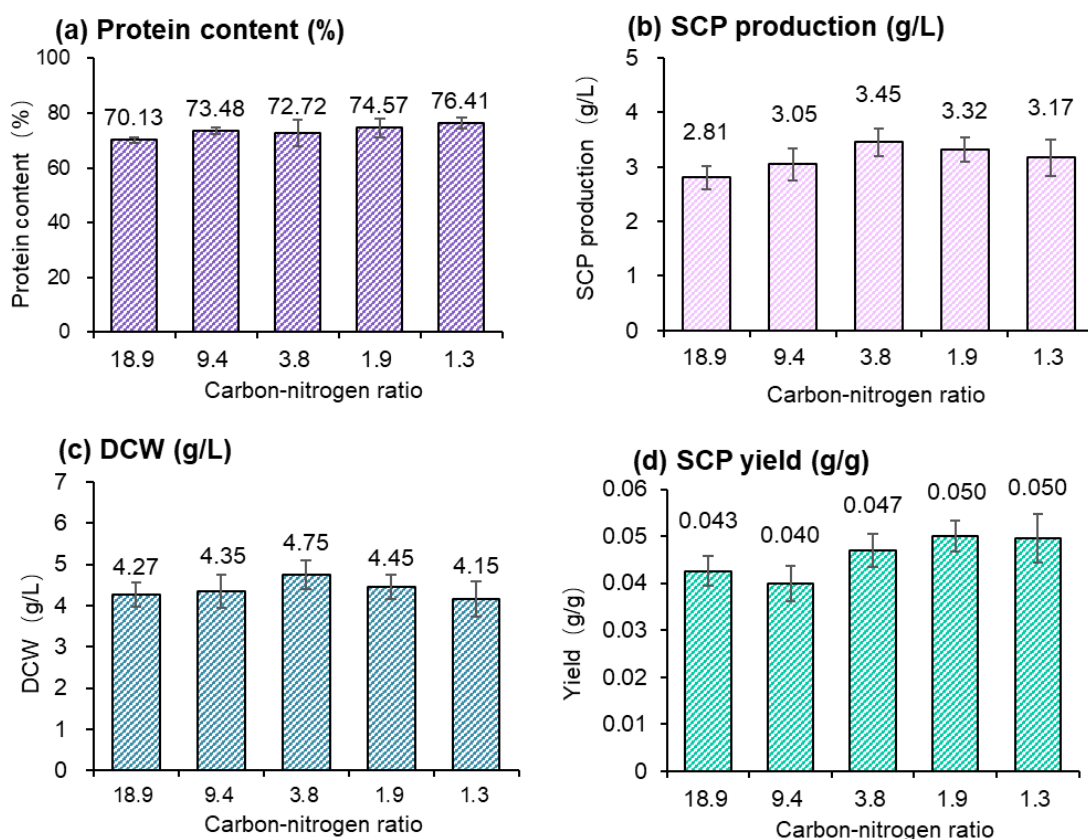


图 2.2 *C. glutamicum* S9114-ppAB 在不同碳氮比条件下生产单细胞蛋白

Fig. 2.2 SCP production under different carbon-nitrogen ratios for *C. glutamicum* S9114-ppAB

(a) Protein content; (b) SCP production; (c) DCW; (d) SCP yield

注：发酵在 250 mL 三角瓶中进行，培养基为细菌产 SCP 发酵培养基，具体成分如材料与amp;方法 2.2.1 所示，发酵温度为 30 °C，转速为 200 rpm，培养 96 h，SCP 得率计算时间为 96 h

S. cerevisiae XH7 在不同碳氮比条件下生产单细胞蛋白的结果如图 2.3 所示。酿酒酵母的蛋白含量随硫酸铵浓度的增加而上升，但是细胞干重和单细胞蛋白产量都随碳氮比的下降而下降。在碳氮比为 18.9 时，酿酒酵母的细胞干重和单细胞蛋白产量达到最大值，分别为 3.28 g/L 和 1.77 g/L。酿酒酵母对高浓度的硫酸铵耐受性较差，提高硫酸铵浓度明显减缓了酿酒酵母的生长情况。根据实验结果可以看出，酿酒酵母的细胞干重水平一直较低，可能菌体利用多数碳源来生成乙醇，该菌株的蛋白积累能力较弱，因此不适合作为单细胞蛋白的生产菌株。

C. glutamicum S9114-ppAB 的蛋白含量最高（70%以上），但是其单细胞蛋白产量略低于 *T. cutaneum* MP11。接着，本研究用 15% 小麦秸秆水解液在 3 L 生物反应器培养谷氨酸棒状杆菌，旨在观察该菌株在木质纤维素体系下生产单细胞蛋白的能力。

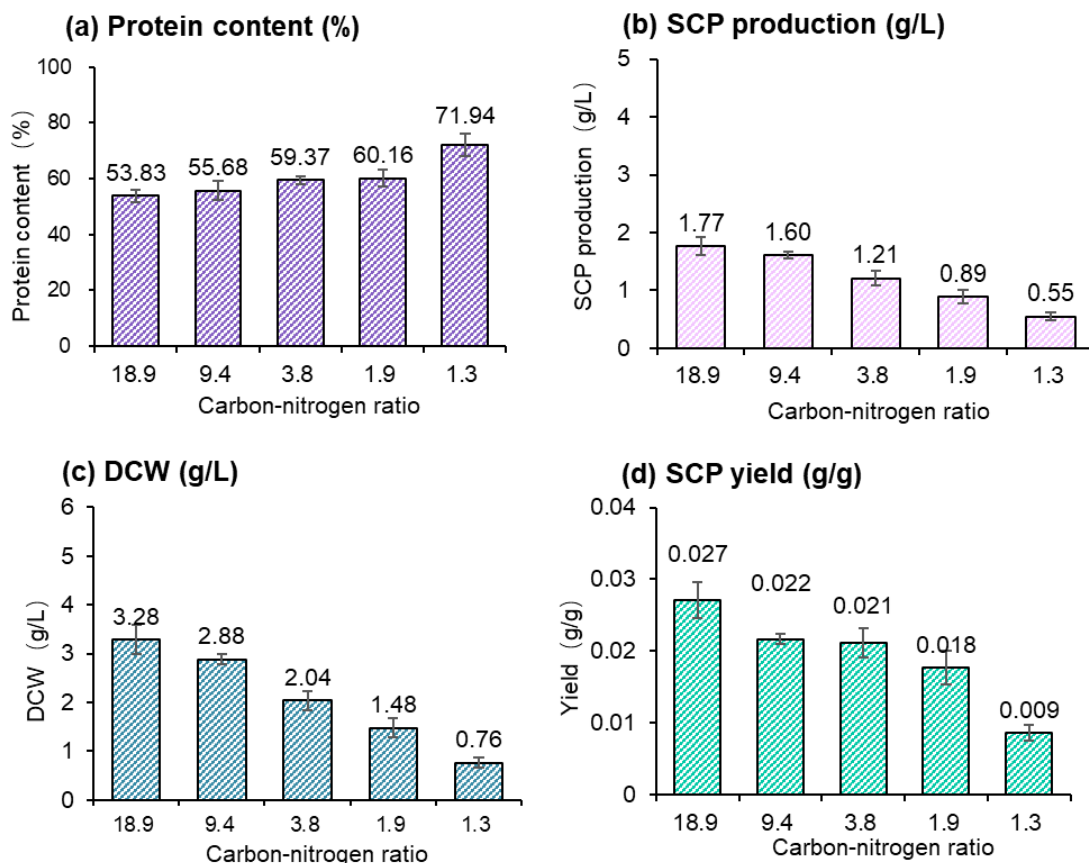


图 2.3 *S. cerevisiae* XH7 在不同碳氮比条件下生产单细胞蛋白

Fig. 2.3 SCP production under different carbon-nitrogen ratios for *S. cerevisiae* XH7

(a) Protein content; (b) SCP production; (c) DCW; (d) SCP yield

注：发酵在 500 mL 三角瓶中进行，培养基为酵母产 SCP 发酵培养基，具体培养基配方如材料与方
法 2.2.1 所示，发酵温度为 30 °C，转速为 180 rpm，培养 96 h，SCP 得率计算时间为 96 h

以硫酸铵为唯一氮源时，*C. glutamicum* S9114-ppAB 产单细胞蛋白的最适碳氮比约为 3.8，15%小麦秸秆水解液的总糖和硫酸铵浓度分别为 100 g/L 和 50 g/L（图 2.2）。发酵 48 h 时单细胞蛋白产量达到最高值 8.44 g/L，此时蛋白含量也达到最高值 77.16%（图 2.4）。发酵 48 h，单细胞蛋白得率和生产效率分别约为 0.10 g/g 和 0.18 g/L/h。由实验结果可以看出，*C. glutamicum* S9114-ppAB 在小麦秸秆水解液生产单细胞蛋白的产量较低，菌体本身积累细胞干重的能力较弱。从木糖消耗结果图可以看出，该菌株的木糖代谢速率较差，72 h 只消耗了 12.81 g/L 的木糖，未将水解液中的木糖全部消耗。木质纤维素体系中木糖占总糖含量的 20%以上，无法完全消耗木糖会造成原料的浪费，因此谷氨酸棒状杆菌 S9114-ppAB 不适合在木质纤维素体系生产单细胞蛋白。

可见，细胞干重积累量较低的 *S. cerevisiae* XH7 生产单细胞蛋白的能力最弱，尽管其菌体蛋白含量较高（55%）。木糖代谢能力较差 *C. glutamicum* S9114-ppAB 的菌体蛋白含量最高（75%左右），但是其在 15%小麦秸秆水解液单细胞蛋白的产量最高为 8.44

g/L。 *C. glutamicum* S9114-ppAB 的生长最适 pH 值为 7，其只能在水解液中生长，但通过同步糖化共发酵不能生产单细胞蛋白。水解液制备过程复杂，糖化过程的高浓度葡萄糖抑制纤维素酶酶活导致总糖浓度较低。然而，*T. cutaneum* MP11 可以在木质纤维素体系进行同步糖化共发酵，而且具有良好的全糖代谢能力。与 *S. cerevisiae* XH7 和 *C. glutamicum* S9114-ppAB 相比较，*T. cutaneum* MP11 的菌体干重和单细胞蛋白产量最高，并且该菌株是产油酵母，产生的微生物油脂可以作为附加产物。因此，本研究选择 *T. cutaneum* MP11 作为生产单细胞蛋白的目标菌株。

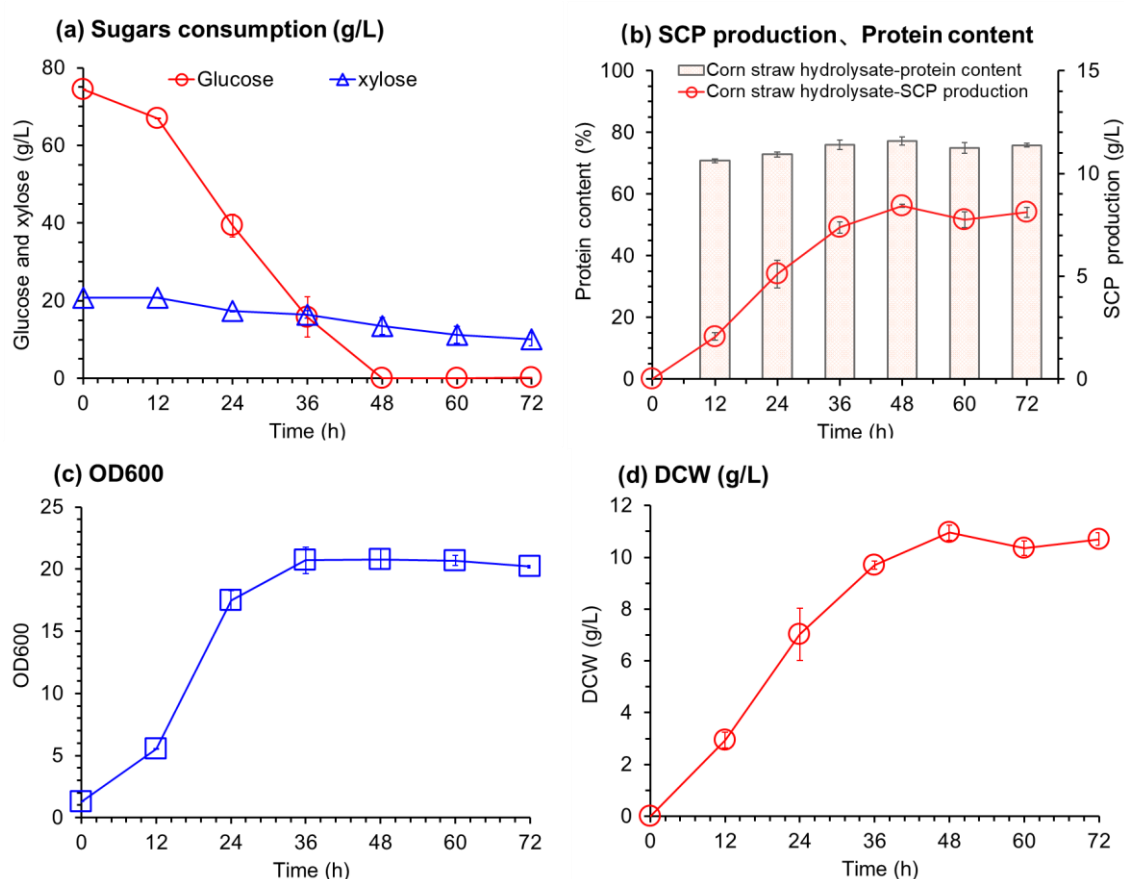


图 2.4 *C. glutamicum* S9114-ppAB 利用 15%小麦秸秆水解液生产单细胞蛋白

Fig. 2.4 SCP production for *C. glutamicum* S9114-ppAB using 15% wheat straw hydrolysate

(a) Sugars consumption; (b) SCP content and production; (c) OD₆₀₀; (d) DCW

注：发酵在 3 L 生物反应器中进行，培养基：15%小麦秸秆水解液，50 g/L (NH₄)₂SO₄、1 g/L KH₂PO₄、1 g/L K₂HPO₄ 和 0.6 g/L MgSO₄；发酵条件：温度为 30 °C；转速为 600 rpm；通气量为 1.4 vvm；pH7.0，用 2 M H₂SO₄ 和 25%氨水调节 pH7.0。

2.3.2 不同氮源种类对 *T. cutaneum* MP11 产单细胞蛋白的影响

为了确定最佳氮源，本节探究了常见无机氮源和有机氮源对 *T. cutaneum* MP11 蛋白产量和蛋白含量的影响。表 2.4 是 5 种常见的无机氮源和 2 种常见的有机氮源包括硝酸钾、草酸铵、硫酸铵、氯化铵、磷酸氢二铵、尿素和酵母提取物。而这些氮源由于本

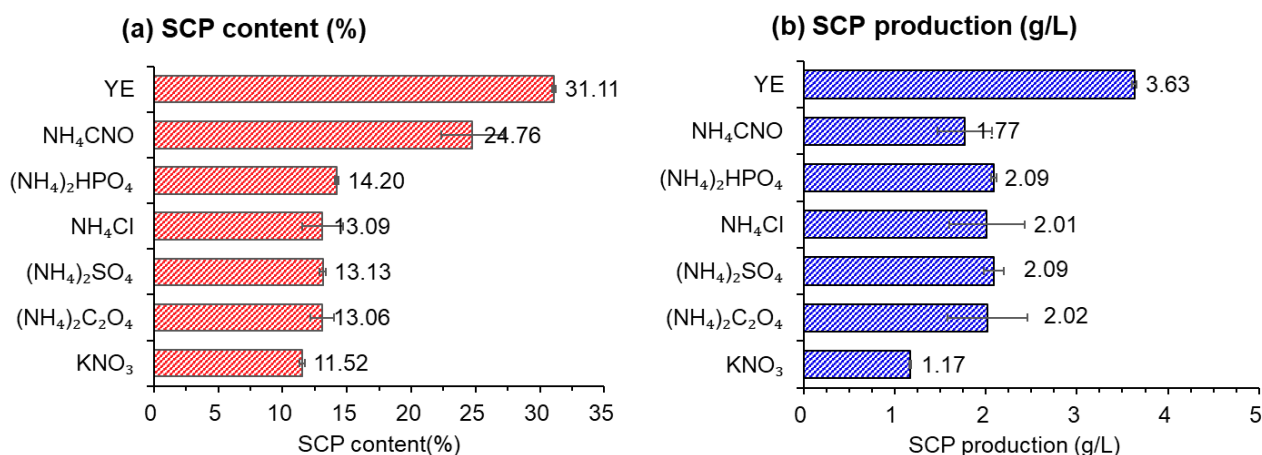
身含氮量相差较大, 所以实验对不同氮源采取统一的总氮量 5 g/L, 以保证 *T. cutaneum* MP11 生长的合成培养基中初始总氮量大致相同, 不同氮源对应的浓度如下表所示。

表 2.4 不同氮源对应浓度

Table 2.4 Types and concentrations of different nitrogen sources

Nitrogen source	Nitrogen content (%)	Concentration (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	21.2	23.58
NH ₄ Cl	31.8	15.72
(NH ₄) ₂ HPO ₄	21.2	23.58
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	22.6	22.12
KNO ₃	13.9	35.97
NH ₄ CNO	46.7	10.71
Yeast extract	65.8	7.6

如图 2.5 所示, 使用不同的无机氮源, 硝酸钾作为氮源的实验组蛋白产量和蛋白含量均为最低, 分别为 1.17 g/L 和 11.5%。原因是 *T. cutaneum* MP11 不能直接利用硝基态的氮, 需要经过多步转化反应将硝态氮转化为铵态氮后, *T. cutaneum* MP11 才能利用铵态氮生产单细胞蛋白。草酸铵、硫酸铵、氯化铵、磷酸氢二铵作为氮源时, *T. cutaneum* MP11 的蛋白含量分别为 13.06%、13.13%、13.09%和 14.2%, 蛋白产量也比较接近, 分别为 2.02 g/L、2.09 g/L、2.01 g/L 和 2.09 g/L。从使用不同种类的铵盐作为氮源的实验结果来看, 在氮元素质量相同的情况下, 使用草酸铵、硫酸铵、氯化铵、磷酸氢二铵作为氮源对 *T. cutaneum* MP11 的蛋白含量、单细胞蛋白产量和生长情况 (OD₆₀₀ 值) 影响不大, 蛋白含量约为 13%, 单细胞蛋白产量约为 2.05 g/L (OD₆₀₀ 约为 20)。



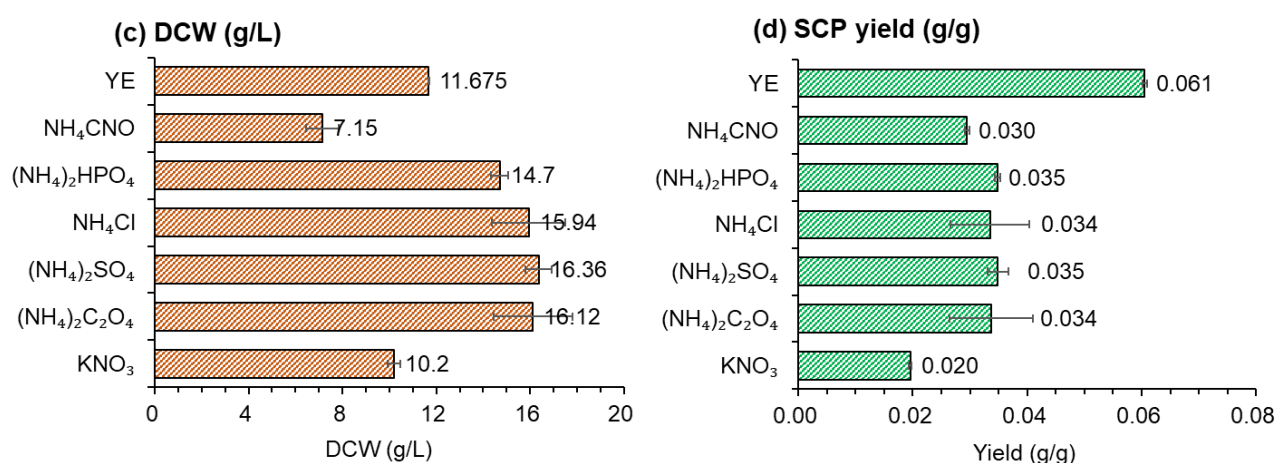


图 2.5 不同氮源对 *T. cutaneum* MP11 产单细胞蛋白的影响

Fig. 2.5 Effect of different nitrogen source on SCP production for *T. cutaneum* MP11

(a) SCP content; (b) SCP production; (c) DCW; (d) SCP yield

注：发酵在 500 mL 三角瓶中进行，SCP 发酵培养基见 2.2.1，培养条件：30 °C，180 rpm，培养 72 h，SCP 得率计算时间为 72 h

使用有机氮源尿素、酵母提取物使 *T. cutaneum* MP11 的蛋白含量明显提高，最高达到 31.11%。使用尿素作为氮源时，蛋白含量为 24.8%，与使用无机氮源的实验组相比蛋白含量有较大的提升，使用尿素作为氮源可能利于 *T. cutaneum* MP11 积累更多的蛋白。但是以尿素为氮源的实验组蛋白产量只有 1.77 g/L，蛋白产量相较于使用无机氮源的实验组明显降低。其原因是 *T. cutaneum* MP11 的生长状况较差，使用无机铵态氮源的实验组在发酵结束后均无葡萄糖残留，而以尿素为氮源的实验组在发酵结束时仍含有 47 g/L 的葡萄糖。以尿素为氮源的实验组糖耗速率明显下降，只消耗了约 20% 的葡萄糖，菌体代谢尿素需要产生脲酶将尿素转化为铵态氮，而 *T. cutaneum* MP11 在氮源全部为尿素的培养条件下代谢的脲酶可能不足。酵母提取物作为氮源时，菌体的单细胞蛋白含量、单细胞蛋白产量、单细胞蛋白得率均为最高值，分别是 31.11%、3.63 g/L 和 0.061 g/g，但是只消耗了 75.83% 的葡萄糖，耗糖速率低于以铵盐为氮源的实验组。另外由于酵母提取物价格比较昂贵，故不以酵母提取物作为后续 *T. cutaneum* MP11 生产单细胞蛋白的最优氮源。

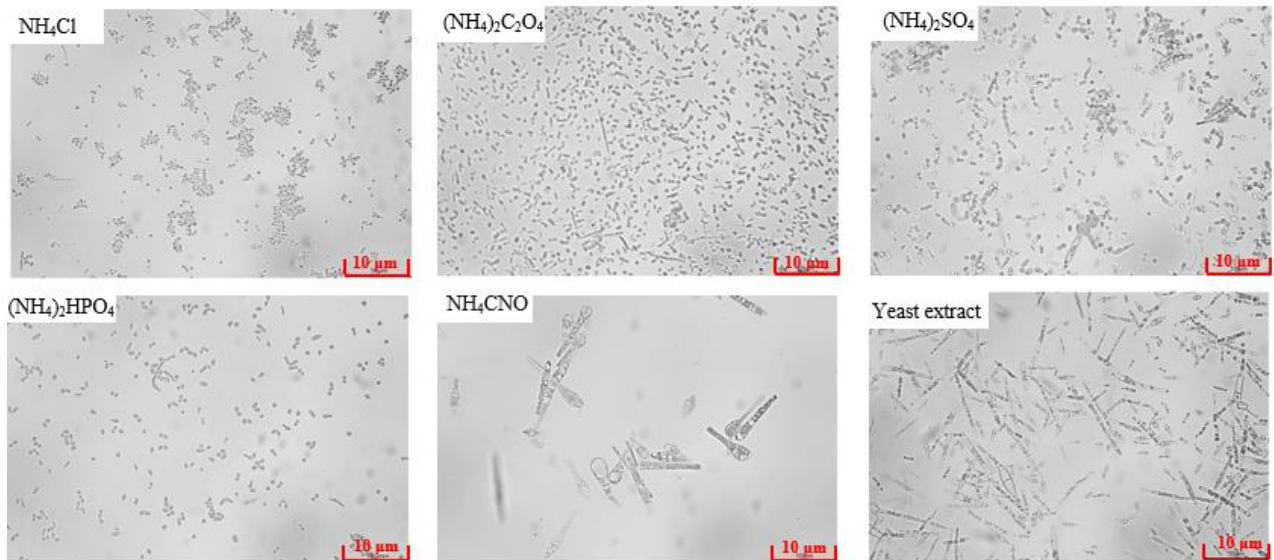


图 2.6 *T. cutaneum* MP11 在不同氮源下的细胞形态

Fig. 2.6 Cell morphology of *T. cutaneum* MP11 using different nitrogen sources

图 2.6 表明, *T. cutaneum* MP11 在不同无机氮源条件下的菌体细胞形态类似, 细胞体积较小且均为球形或梭形。以硫酸铵为氮源的菌体, *T. cutaneum* MP11 形态较其它无机氮源条件下的细胞偏大, 以氯化铵为氮源的菌体出现“聚团现象”。在 5 g/L 为总氮量的条件下, 加入的无机氮源浓度较高, 抑制了 *T. cutaneum* MP11 细胞生长为较大的梭型, 对其油脂的积累也可能有一定的抑制作用。而利用有机氮源的菌体细胞形态明显更大, 呈梭形, 其中利用尿素作为氮源的细胞形态较为不同, 一端膨大呈球状、一端呈杆状, 使用尿素等有机氮源可能会对皮状丝孢酵母的形态有较大影响。从 *T. cutaneum* MP11 在不同氮源培养条件的细胞形态图来看, 利用无机氮源与有机氮源对细胞形态的影响较大。

2.3.3 *T. cutaneum* MP11 产单细胞蛋白与油脂的最适碳氮比及最适 pH

根据 2.3.2 的结果, 不同无机氮源对 *T. cutaneum* MP11 的粗蛋白产量和含量影响很小。硫酸铵是生产单细胞最常用的无机氮源, 由于其价格便宜、N 效价较高、转化率较高。因此, 本研究选择硫酸铵作为后续研究的无机氮源。

本研究计划在合成培养基中以硫酸铵为唯一氮源, 初步确定 *T. cutaneum* MP11 产单细胞蛋白的最适碳氮比。本研究的碳氮比是指碳原子与氮原子的质量比。初始葡萄糖浓度为 60 g/L, 设置了 6 个碳氮比实验组。硫酸铵浓度分别为 6 g/L、12 g/L、24 g/L、36 g/L、48 g/L 和 60 g/L, 对应的碳氮比分别为 18.9、9.4、4.7、3.1、2.4 和 1.9, 检测不同碳氮比对 *T. cutaneum* MP11 粗蛋白含量以及粗蛋白产量的影响 (图 2.7)。实验结果表明, *T. cutaneum* MP11 的蛋白含量随着碳氮比的减小而增大, 蛋白产量随着碳氮比的减小先增加后减小。即硫酸铵浓度越高, 蛋白含量越高, 蛋白产量呈现先增加后减小的趋势。在碳氮比为 1.9 时, 蛋白含量最高为 19.5%。在碳氮比为 9.4 时, 蛋白产量最高

为 2.5 g/L。OD₆₀₀ 的差异较小，原因可能是不同碳氮比下细胞形态大小有所差异，硫酸铵浓度越高，菌体形态较小，而 OD₆₀₀ 是测定细胞数目的多少，有的菌体生长状况较好但是细胞形态较大，OD₆₀₀ 值反而较低。

接下来探究了木质纤维素体系下生产单细胞蛋白的最佳硫酸铵浓度。在 30% 高固体含量下木质纤维素水解液的糖浓度为 120 g/L 左右，设置硫酸铵浓度梯度 12 g/L、24 g/L、36 g/L 和 48 g/L，相当于碳氮比 18.9、9.4、6.3 和 4.7（图 2-8）。在各类碳氮比下，皮状丝孢酵母均可以实现对葡萄糖和木糖的完全利用，木糖代谢略微滞后于葡萄糖的代谢。碳氮比为 9.4 和 6.3 时的糖代谢速率较快（图 2.8a；图 2.8b）。随着碳氮比的减少（硫酸铵浓度的增加），*T. cutaneum* MP11 的糖耗速率明显下降，其中以木糖的糖耗速率下降最为明显。当硫酸铵浓度低于 36 g/L 时，*T. cutaneum* MP11 在 48 h 内耗尽葡萄糖与木糖。

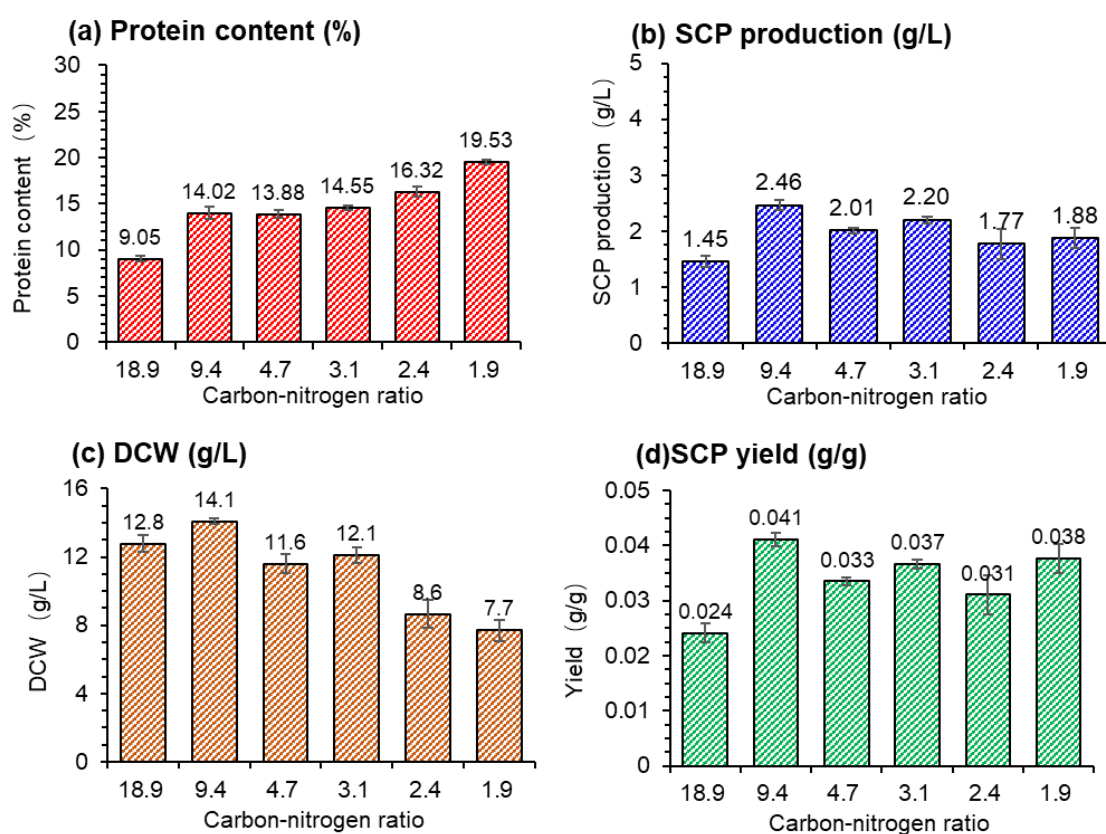


图 2.7 *T. cutaneum* MP11 以硫酸铵为氮源在不同碳氮比下生产 SCP

Fig. 2.7 The production of SCP using ammonium sulfate as a nitrogen source at different carbon-nitrogen ratios for *T. cutaneum* MP11. (a) SCP content; (b) SCP production; (c) DCW; (d) SCP yield

注：发酵在 500 mL 三角瓶中进行，SCP 发酵培养基成分见 2.2.1；按对应碳氮比添加硫酸铵，培养条件：30 °C，180 rpm，培养 72 h

从单细胞蛋白发酵结果图 2.7 来看，当碳氮比为 9.4 时，单细胞蛋白在 48 h 达到最高产量（24.4 g/L）。此时单细胞蛋白的产率和生产效率分别为 0.19 g/g 和 0.51 g/L/h，氮

元素转化率为 71.5%。单细胞蛋白产量基本在 48 h 达到最高点后，在 72 h 趋于稳定或略有下降，其原因可能是发酵后期没有可利用的单糖，菌体利用一小部分蛋白质维持正常的生长代谢导致单细胞蛋白的产量在发酵后期略有下降。从微生物油脂产量的发酵结果来看，油脂的产量随着碳氮的减小（硫酸铵浓度的增加）而减小，因为一般 *T. cutaneum* MP11 产油脂需要在限氮条件下进行，这与目前在严格限氮条件下生产微生物油脂的现象一致，高氮氮条件不利于油脂的生成。在 4 种不同碳氮比条件下，当碳氮比为 18.9 时微生物油脂的产量最高，最高产量为 18.4 g/L。油脂的产量随着发酵时间的增加而增加，由于本研究以单细胞蛋白为主要产物，微生物油脂为附加产物，所以发酵时间只维持至 72 h 保证获得最高产量的单细胞蛋白。

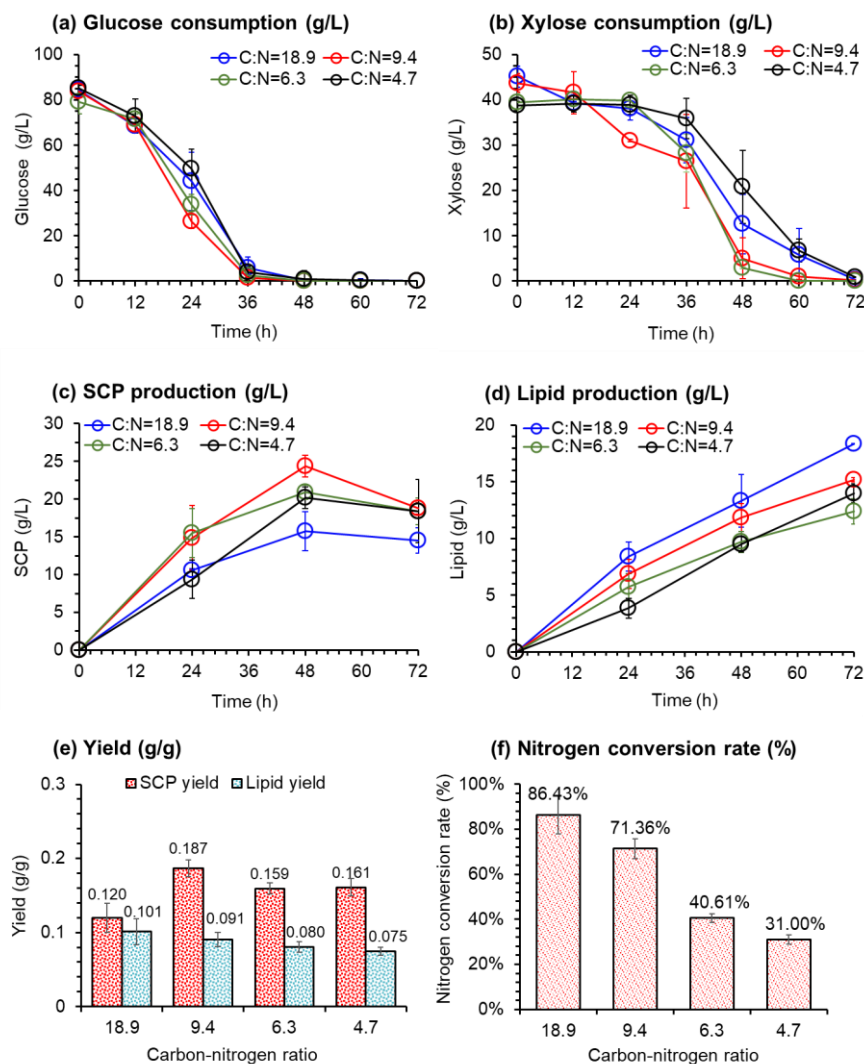


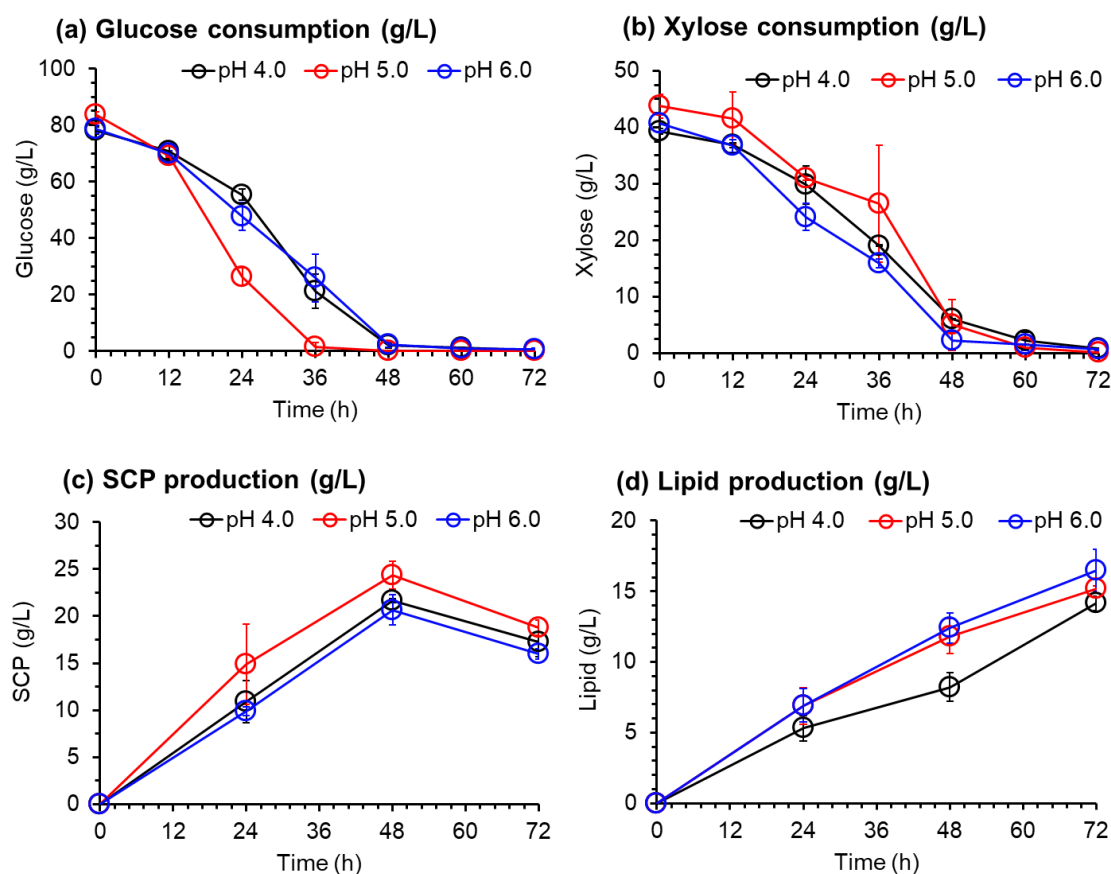
图 2.8 *T. cutaneum* MP11 不同碳氮比下同步糖化共发酵产单细胞蛋白与微生物油脂

Fig. 2.8 Single-cell proteins and microbial lipid from simultaneous saccharification and co-fermentation under different carbon-nitrogen ratios for *T. cutaneum* MP11. (a)Glucose consumption; (b) Xylose consumption; (c) SCP production; (d) Lipid production; (e) Yield; (f) Nitrogen conversion rate

注：预糖化前用碳酸钙将物料 pH 调节至 5.5，30% (w/w) 固含量小麦秸秆预糖化 12 h，在 3 L 生物反应器中进行同步糖化共发酵 (SSCF)，SSCF 条件：30 °C、600 rpm、通气量 1 vvm，用 2M H₂SO₄ 和 5M NaOH 调节 pH 保持 5.0。培养基成分见 2.2.4，硫酸铵浓度根据对应碳氮比添加。产物得率和氮元素转化率的计算时间为 48 h (SCP 产量最高时间点)

T. cutaneum MP11 利用木质纤维素体系产单细胞蛋白的最佳碳氮比是 9.4，该结论与在合成培养基以硫酸铵为唯一氮源生产单细胞蛋白的最佳碳氮比的结果一致。而在 3 L 发酵罐中的单细胞蛋白产量远高于摇瓶，原因可能是木质纤维素体系下 *T. cutaneum* MP11 的代谢水平有较大变化，菌体蛋白含量可能远高于在摇瓶合成培养基中得到的结果。

本研究进一步对发酵 pH 进行优化。由于采用的 SSCF 策略，为了最大程度保留商业纤维素酶的活性，本研究设定 pH4-6 (图 2.9)。通过对比 *T. cutaneum* MP11 在不同 pH 条件下的糖耗速率图可知，在发酵前 36 h，菌体在 pH4 或 pH6 条件下的糖耗速率略低于 pH5。初始 pH 为 5 时对葡萄糖的代谢有所促进，但对木糖的消耗没有显著影响。



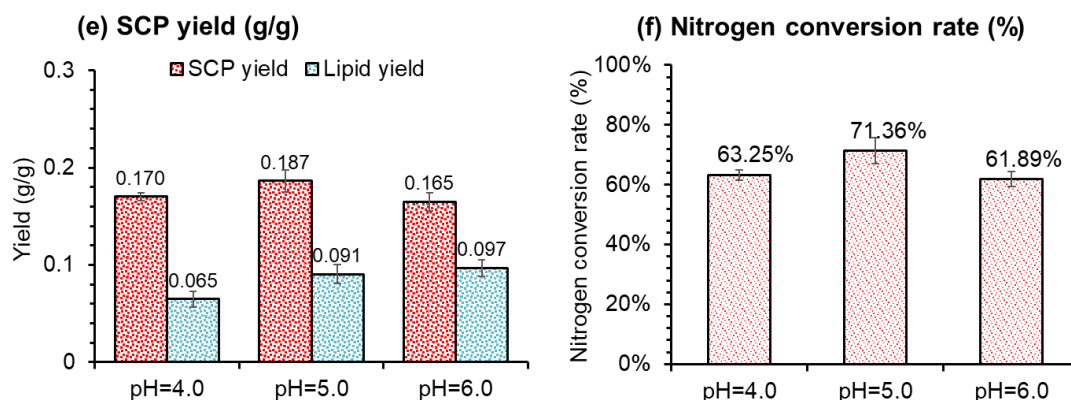


图 2.9 *T. cutaneum* MP11 不同 pH 下同步糖化共发酵产单细胞蛋白与油脂

Fig. 2.9 Single cell proteins and microbial lipid production under different pH to produce by simultaneous saccharification and co-fermentation for *T. cutaneum* MP11. (a) Glucose consumption; (b) Xylose consumption; (c) Protein production; (d) Lipid production; (e) Yield; (f) Nitrogen conversion rate.

注：预糖化前用碳酸钙将物料 pH 调节至 5.5，30% (w/w) 固含量小麦秸秆预糖化 12 h，在 3 L 生物反应器中进行同步糖化共发酵 (SSCF)，SSCF 条件：发酵温度 30 °C、转速 600 rpm、通气量 1 vvm，用 2M H₂SO₄ 和 5M NaOH 调节 pH，发酵培养基见 2.2.4。产物得率和氮元素转化率的计算时间为 48 h (SCP 产量最高时间点)。

不同 pH 条件下 *T. cutaneum* MP11 同步糖化共发酵单细胞蛋白最高产量的时间都是 48 h，pH4、5、6 对应最高产量分别为 21.6 g/L、24.4 g/L、21.1 g/L，此时微生物油脂产量分别为 8.2 g/L、11.8 g/L、12.4 g/L。pH5.0 是同步糖化共发酵生产单细胞蛋白与微生物油脂的最佳 pH。尽管有研究表明酿酒酵母 pH3.5-4.5 条件下更有利于单细胞蛋白的生产^[112]，但皮状丝孢酵母在 pH 5.0 时的单细胞蛋白产量最高，pH 值的变化几乎不影响油脂生产。因此，本研究选择在 pH5.0 开展皮状丝孢酵母的单细胞蛋白的发酵研究。

2.3.4 复合氮源对 *T. cutaneum* MP11 生产单细胞蛋白的影响

通过 2.3.2 的研究结果可以发现，与以无机氮源相比，*T. cutaneum* MP11 在以尿素或酵母提取物作为唯一氮源时，蛋白含量和细胞形态更大。有机氮源可能会使菌体更有利于积累蛋白质，*T. cutaneum* MP11 在以有机氮源为唯一氮源时，菌体蛋白产量较低的原因是菌体的糖耗速率较低，导致在培养 72 h 积累的菌体量低。本小节内容探究了以硫酸铵、尿素、玉米浆 (CSL) 作为复合氮源对 *T. cutaneum* MP11 生产单细胞蛋白的影响。

首先在通过摇瓶实验，探究了 *T. cutaneum* MP11 在木质纤维素体系下同步糖化共发酵产单细胞蛋白的最适复合氮源配比 (图 2.10)。结果表明，尿素、玉米浆和硫酸铵的任一种氮源浓度过高均不利于单细胞蛋白产量的提升。*T. cutaneum* MP11 同步糖化共发酵生产单细胞蛋白的最适氮源配比为 20 g/L 硫酸铵、20 g/L 尿素、10 g/L 玉米浆。

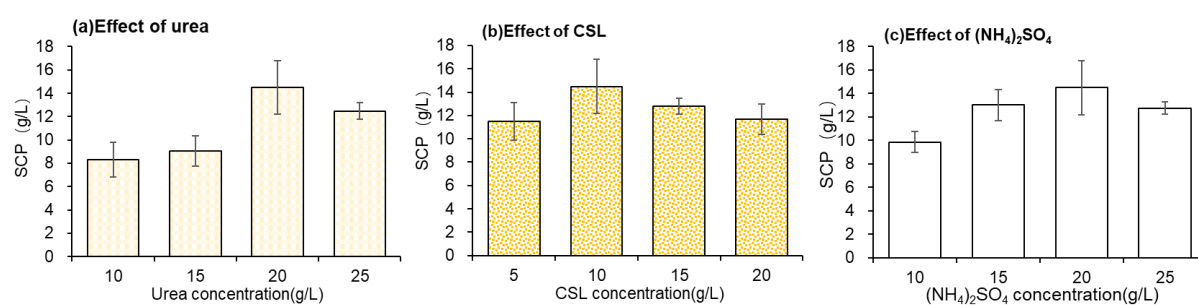


图 2.10 复合氮源对 *T. cutaneum* MP11 产单细胞蛋白的影响

Fig. 2.10 Effect of composite nitrogen source on SCP production by *T. cutaneum* MP11

(a) Effect of urea (b) Effect of CSL (c) Effect of (NH₄)₂SO₄

注：25% (w/w) 固含量小麦秸秆在 500 mL 三角瓶预糖化 12 h 后进行同步糖化共发酵，培养基成分见 2.2.1，培养条件：发酵温度 30 °C，转速 180 rpm，培养 72 h

在 3 L 生物反应器中用上述得到的最适复合氮源配比进行同步糖化共发酵，验证复合氮源对 *T. cutaneum* MP11 产单细胞蛋白的影响（图 2.11）。根据实验结果可以看出，以硫酸铵、尿素、玉米浆作为复合氮源生产单细胞蛋白与微生物油脂，发酵 48h 基本完全耗尽葡萄糖与木糖，糖耗速率与以硫酸铵为唯一氮源相比没有明显变化（图 2.11a），木糖消耗速率在前 36 h 略微上升，可能是因为加入玉米浆含有丰富的维生素和生长因子对菌体的生长有促进作用。添加尿素后并未对菌株的生长有明显的抑制作用，可能是在 3 L 生物反应器中的溶氧条件远高于摇瓶培养，菌株生长状况较佳。

在复合氮源条件下，单细胞蛋白的产量在 48 h 达到最高值 26.9 g/L（图 2.11b），此时单细胞蛋白的产率和生产效率分别为 0.21 g/g 和 0.56 g/L/h，氮元素转化率为 24.9%。与硫酸铵为相比，复合氮源使单细胞蛋白的产量和得率提高了 10.4% 左右（图 2.11c），但是氮元素的转化率下降幅度较大（从 71.5% 降至 24.9%）（图 2.11d），很明显大量氮源在发酵结束后残留在发酵液中。发酵 48 h 时，微生物油脂的产量为 12.5 g/L，与以硫酸铵为唯一氮源相比几乎没有差别。使用复合氮源极大的提高了单细胞蛋白的生产成本，但是对单细胞蛋白的产量提升幅度有限。考虑到经济效益和发酵废水的处理成本，后续研究仍以硫酸铵为唯一氮源生产单细胞蛋白。

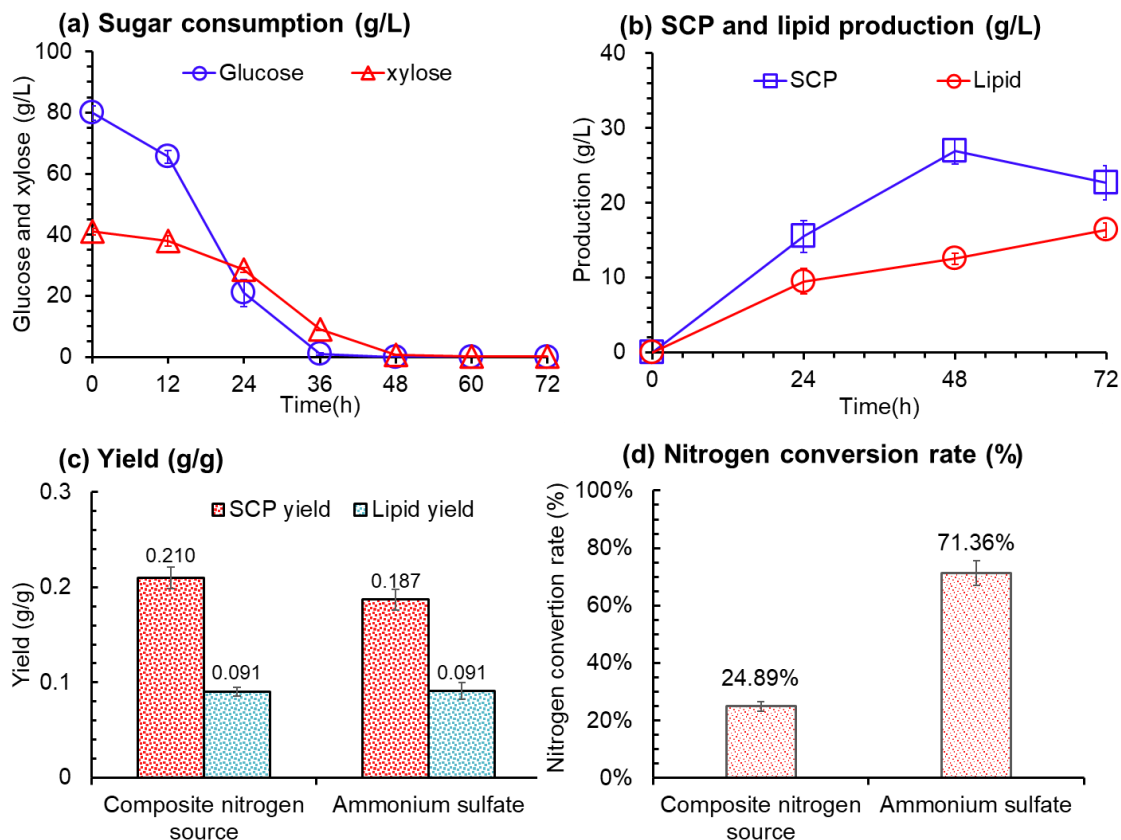


图 2.11 利用复合氮源同步糖化共发酵生产单细胞蛋白与油脂

Fig. 2.11 SCP and lipid production from simultaneous saccharification and co-fermentation using composite nitrogen source. (a) Sugar consumption; (b) SCP and lipid production; (c) Yield; (d) Nitrogen conversion rate.

注：30% (w/w) 固含量小麦秸秆预糖化 12 h，在 3 L 生物反应器中进行同步糖化共发酵 (SSCF)，复合氮源 SCP 发酵培养基成分见 2.2.1，SSCF 条件：30 °C、600 rpm、1 vvm，2 M H₂SO₄ 和 5M NaOH 调节 pH 保持 5.0。产物得率和氮元素转化率的计算时间为 48 h (SCP 产量最高点)。

2.3.5 *T. cutaneum* MP11 在合成培养基和麦秆水解液产单细胞蛋白能力的比较

上述研究中发现 *T. cutaneum* MP11 在木质纤维素体系下生产单细胞蛋白产量远远高于在合成培养基条件下的产量。在优化后的生产条件下比较了皮状丝孢酵母菌株在脱毒小麦秸秆水解液和合成培养基下的单细胞蛋白和油脂生产性能。为了更好地评价菌株的生长状况，本研究将酶水解后固液分离的上清作为碳源 (图 2.12)。

在不添加酵母提取物的情况下，经过 96 h 的发酵，水解液中的葡萄糖和木糖被全部利用，而在合成培养基中，仅利用了 66.1% 的葡萄糖 (剩余 33.2 g/L) (图 2.12a)。 *T. cutaneum* MP11 在合成培养基的生长后期 (72 h 至 96 h) 几乎不再耗葡萄糖，原因可能是生长后期培养基中缺乏微量营养元素，而在 30% 麦秆水解液中 72 h 基本可以耗尽葡萄糖，水解液中含有丰富的营养元素例如维生素等，可供菌体正常生长。高氨氮条件下，菌体在合成培养基中几乎没有代谢木糖。在 30% 麦秆水解液中 72 h 消耗完葡萄糖后才开始消耗木糖，可能在高氨氮条件下存在葡萄糖阻遏现象。

发酵前 48 h 在合成培养基中的菌体生长高于在水解液中，但随后远远滞后于在水解液中的菌株生长。前 24 h 在 30% 麦秆水解液中酚醛抑制物、高氨氮环境对菌体的生长抑制较明显，在 96 h 耗尽葡萄糖和木糖后，最终水解液中的 OD₆₀₀ 值达到了 76.7，是合成培养基中 OD₆₀₀ 值的 1.9 倍（图 2.12b）。

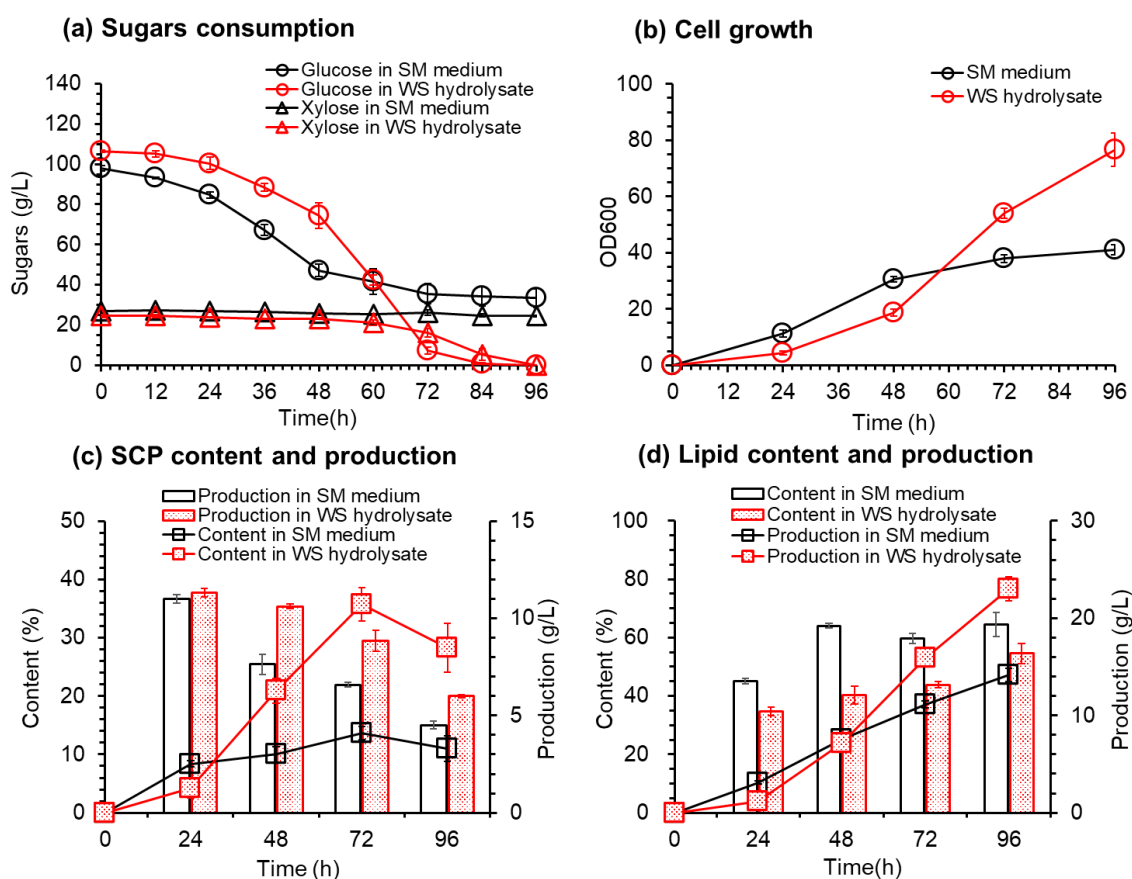


图 2.12 合成培养基和 30% (w/w) 固含量麦秆水解液发酵产单细胞蛋白与微生物油脂的比较

Fig. 2.12 Comparison of SCP and lipid production between in synthetic medium and in the 30% (w/w) solid loading wheat straw hydrolysate. (a) Sugars consumption; (b) Cell growth; (c) SCP production and content; (d) Lipid production and content.

注：水解液和合成培养基初始碳氮比为 9.4，培养基成分见 2.2.1. 发酵条件：发酵温度 30 °C、转速 500 rpm、通气量 1 vvm，用 2M H₂SO₄ 和 5M NaOH 调节 pH 保持 5.0

在发酵 24 h 时，初始的高氨氮条件对菌体的胁迫作用明显，*T. cutaneum* MP11 在合成培养基和 30% 麦秆水解液两种培养基的蛋白含量均在 35% 以上，在 48 h 至 96 h，*T. cutaneum* MP11 在水解液中的蛋白含量均明显高于合成培养基。发酵 72 h 时单细胞蛋白产量达到最高，水解液和合成培养基中分别为 10.7 g/L 和 4.1 g/L（图 2.12c）。72-96 h 蛋白产量出现下降，这与细胞中蛋白含量下降有关。值得注意的是，在发酵 24 h 时，合成培养基和水解液中菌株的单细胞蛋白含量基本一致（36.7% 和 37.7%）。但随后在合成培养基中单细胞蛋白的含量出现了显著下降，这导致了其单细胞蛋白产量明显低于水解液中单细胞蛋白的产量。发酵过程中油脂的产量始终呈上升的趋势，在发酵 48

h 后（发酵后期）大量合成。尽管水解液中细胞的油脂含量低于合成培养基，但水解液中油脂产量在 48 h 后高于合成培养基（图 2.12d）。这主要是由于 *T. cutaneum* MP11 在水解液积累的菌体量更大，而且 *T. cutaneum* MP11 在合成培养基和水解液中的油脂产量最高分别为 14.2 和 23.0 g/L。

因此，*T. cutaneum* MP11 在水解液较合成培养基更有利于积累单细胞蛋白。Yang 等人^[113]曾报道在相同葡萄糖浓度下，与含酵母提取物的合成培养基相比，稻草水解液可以提高干细胞重量 2.89 倍，从而大幅度提高单细胞蛋白的产量，这与本实验的现象一致。该研究进一步的实验表明水解液中的寡糖和其它生物活性物质能够维持酵母的细胞活性使细胞快速生长积累更多的单细胞蛋白。因此同步糖化过程中，由于纤维素酶的持续水解，会持续的释放葡寡糖来促进单细胞蛋白的合成。木质纤维素原料的同步糖化过程是合成单细胞蛋白的有效方法。

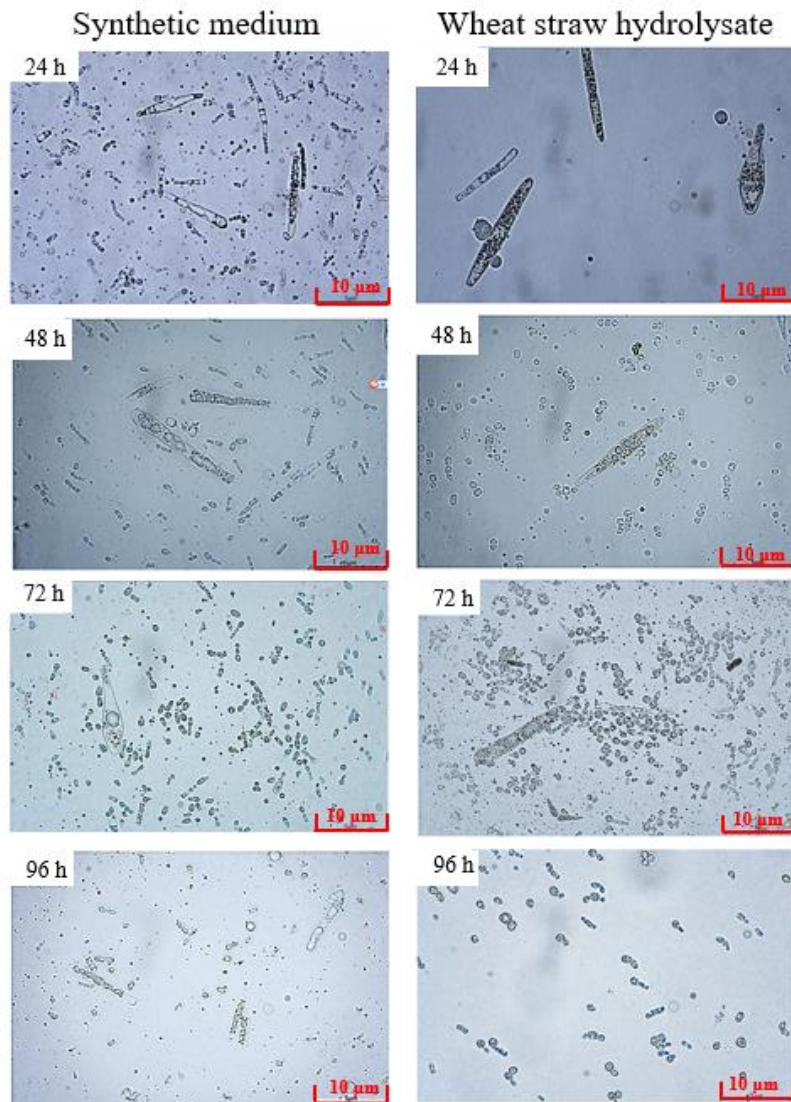


图 2.13 皮状丝孢酵母在合成培养基和 30% (w/w) 固含量小麦秸秆水解液的细胞形态

Fig. 2.13 Cell morphology in synthetic medium or 30% (w/w) solid loading wheat straw hydrolysate

T. cutaneum MP11 在两种培养基中的细胞形态图没有显著的差异，在水解液中细胞

比合成培养基中的细胞形态偏大，且水解液体系下细胞形态多为圆形，而合成培养基多为杆状。

2.3.6 *T. cutaneum* MP11 在麦秆水解液中的转录水平变化

根据上小节的研究结果，*T. cutaneum* MP11 在小麦秸秆水解液中蛋白含量以及单细胞蛋白产量都明显高于合成培养基。因此在初始碳氮比为 9.4 的条件下，以合成培养基为对照，对比了在麦秆水解液中 *T. cutaneum* MP11 转录水平的变化情况。由于 *T. cutaneum* MP11 前 24 h 在水解液中的生长比合成培养基更缓慢，因此提取 RNA 时分别收集生长 24 h 和 48 h 的菌体，测定两种培养基在 24 h 和 48 h 两个时间点的转录水平变化，实验以 β -actin 基因作为内参。

探究部分氨同化、铵转运、氨基酸代谢、氨基酰-tRNA 合成酶的转录水平表达差异（图 2.14），一般认为基因上调 2 倍以上则为显著上调。铵转运酶负责将铵根离子转运至菌体内部，氨同化途径谷氨酸脱氢酶（GDH）和谷氨酰胺合成酶（GS）将铵根离子转化为谷氨酸和谷氨酰胺供，GDH 和 GS 也是细胞内氮代谢最重要的两种酶。虽然铵转运的两种基因和多数氨同化的相关基因明显下调，其中有两个关键基因分别在 24 和 48 h 上调，24 h *Trcu_01838* 上调约 2 倍，48 h *Trcu_02909* 上调约 1.7 倍。由于 *T. cutaneum* MP11 是突变体，现有的基因测序结果不完整，可能还有其它氨同化、铵转运的基因有变化。氨基酸作为蛋白质的基本组成单元，菌体内氨基酸脱水缩合形成肽链后折叠形成具有一定空间结构的蛋白质，氨基酰-tRNA 合成酶是参与将氨基酸结合到 tRNA 上的过程的关键酶。相比于在合成培养基中，在小麦秸秆水解液中 *T. cutaneum* MP11 氨基酸代谢及氨基酰-tRNA 合成酶相关基因表达水平普遍上调，这有利于菌体在麦秆水解液中合成氨基酸及单细胞蛋白。

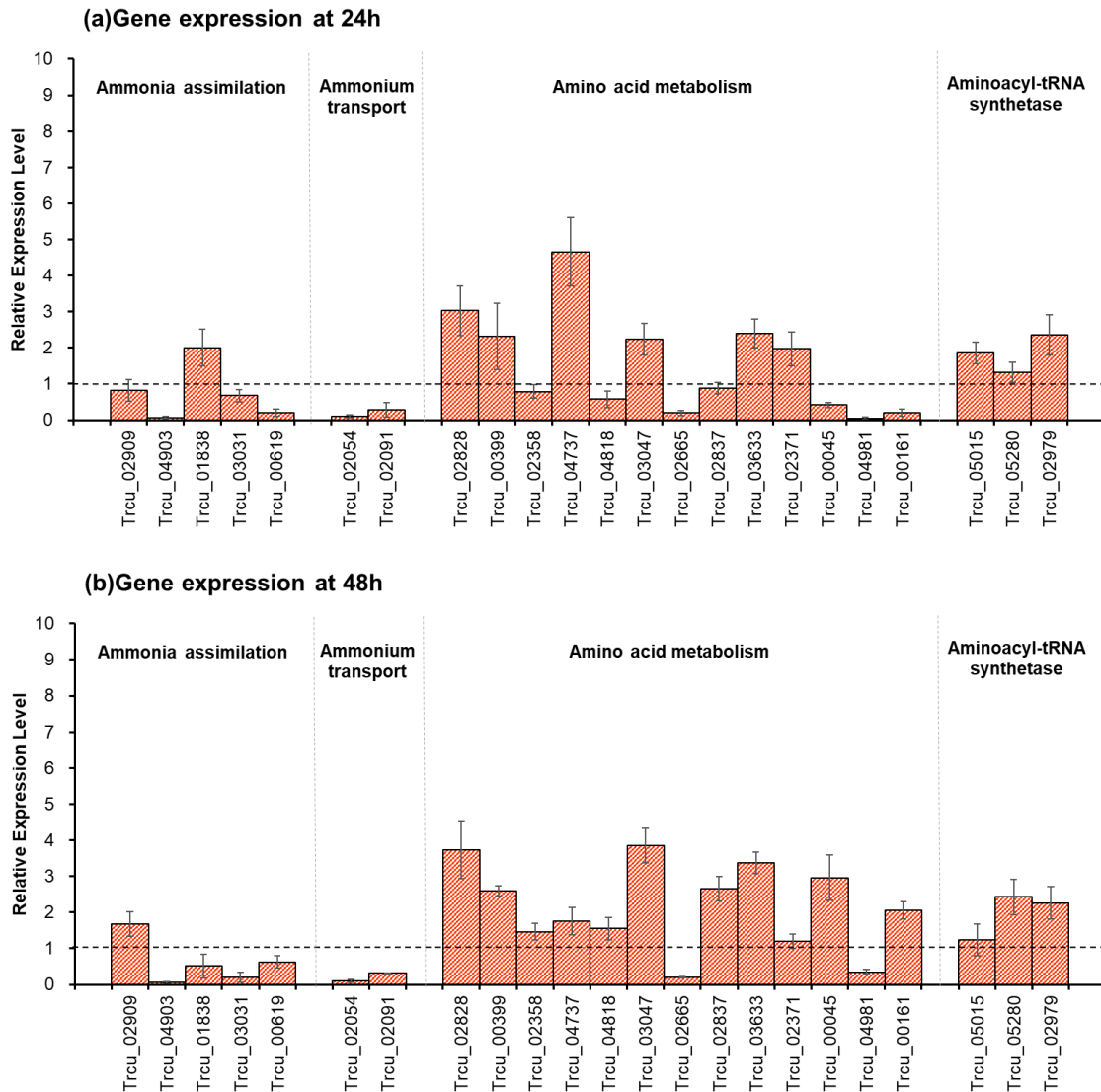


图 2.14 *T. cutaneum* MP11 在水解液中蛋白合成相关基因转录水平情况

Fig. 2.14 Transcriptional levels associated with protein synthesis in hydrolysate of *T. cutaneum* MP11.

(a) Gene expression at 24 h; (b) Gene expression at 48 h

由于单细胞蛋白的产量与菌体的生长情况密不可分，因此还对糖代谢相关基因的转录水平变化情况进行了测定（图 2.15）。葡萄糖和木糖代谢基因转录水平大部分略微下调，没有出现显著变化，其中己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸异构酶下调 5 倍以上。编码木糖还原酶的 *Trcu_01943* 的表达量均出现了显著上调，这也是木糖代谢重要限速酶之一，*T. cutaneum* MP11 在水解液中木糖代谢速率优于合成培养基可能与编码木糖还原酶基因的上调有关。

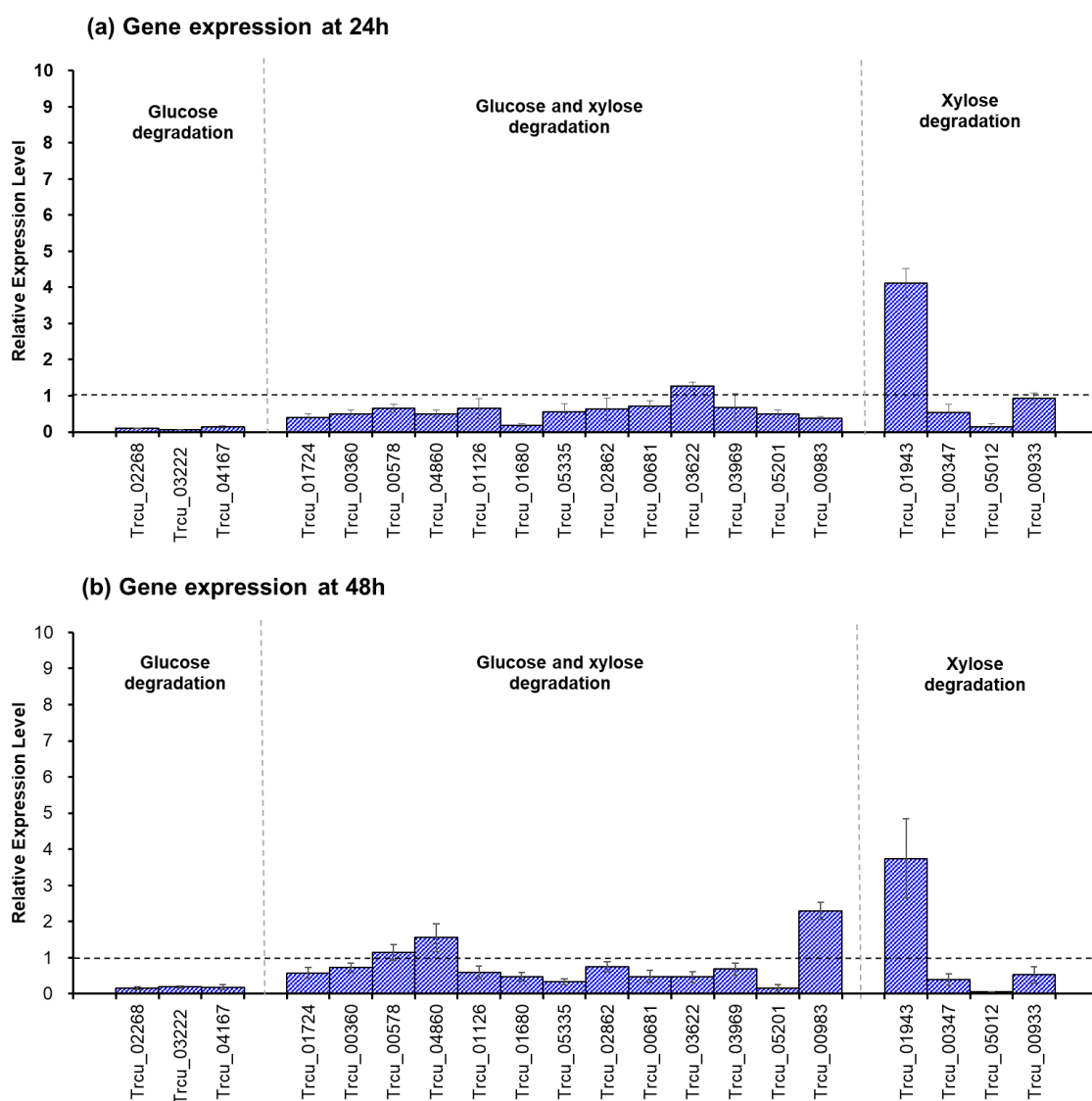


图 2.15 *T. cutaneum* MP11 在水解液中糖代谢相关基因转录水平情况

Fig. 2.15 Transcriptional levels associated with sugar metabolism in hydrolysate of *T. cutaneum* MP11.

(a) Gene expression at 24 h; (b) Gene expression at 48 h

另外对 *T. cutaneum* MP11 在水解液中油脂合成相关基因的转录水平变化情况进行了分析 (图 2.16)。根据 qPCR 实验结果可以看出, 在 24 h 时参与 NADPH 代谢途径的异柠檬酸脱氢酶 (IDH) *Trcu_00627* 表达量上调 2 倍, IDH 催化异柠檬酸转化为 α -酮戊二酸, 并且能将 NADP^+ 还原成 NADPH, 在能量代谢中起着非常重要的作用。在 48 h 时参与三酰甘油合成的二酰甘油-O-酰基转移酶 (DGAT) *Trcu_05356* 的表达量出现了上调, DGAT 是一种关键酶参与合成三酰甘油的最后一个步骤, 它将一个酰基从酰辅酶 A 转移到二酰甘油上, 形成三酰甘油。编码脂肪酸合成的 ω -6 脂肪酸去饱和酶 *Trcu_00716* 始终保持了较高的表达量 (在 24 h 和 48 h 的表达量分别上调 7.6 和 4.6 倍), 它催化将脂肪酸中的饱和键转化为不饱和键, 是合成 ω -6 脂肪酸 (特别是亚油酸) 的关键酶, ω -6 脂肪酸是重要的必需脂肪酸。

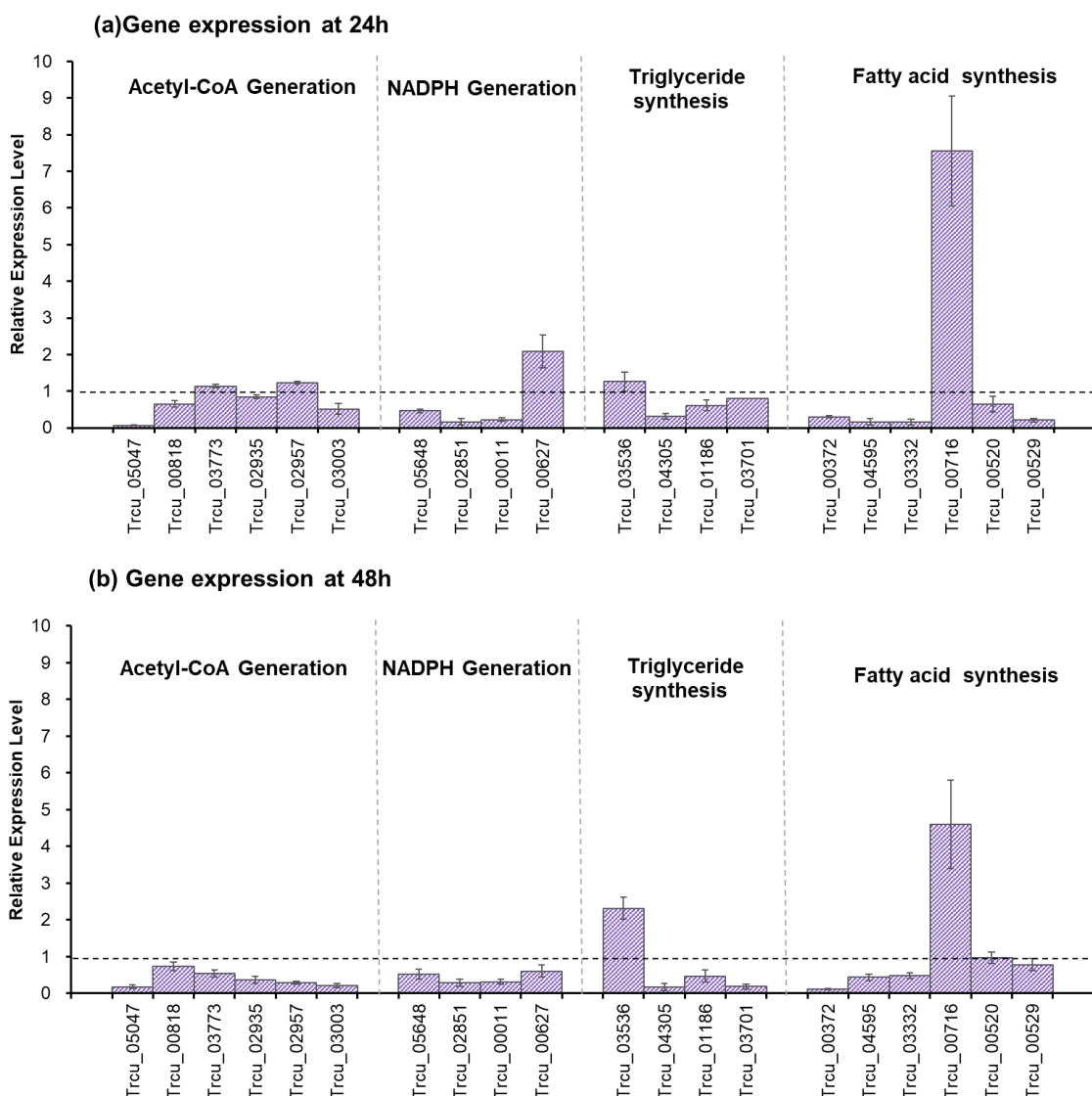


图 2.16 *T. cutaneum* MP11 在水解液中油脂合成相关基因的转录水平

Fig. 2.16 Transcriptional level of lipid synthesis-related genes in hydrolysate for *T. cutaneum* MP11.

(a) Gene expression at 24 h; (b) Gene expression at 48 h

2.4 本章小结

挖掘具有单细胞蛋白生产潜力的菌株是研究单细胞蛋白的第一步，确定生产单细胞蛋白的最佳氮源和其它重要培养条件是本研究的基础，本章节从这两方面出发。首先在三株候选菌株中找到最佳的单细胞蛋白生产菌株，其次利用 *T. cutaneum* MP11 菌株确定最适的培养氮源，在木质纤维素体系下确定单细胞蛋白与微生物油脂的最适碳氮比、最适 pH 值和最佳的复合氮源。比较了木质纤维素体系与合成培养基生产单细胞蛋白与油脂的差异，最后通过转录水平的变化情况分析了皮状丝孢酵母在水解液中蛋白含量更高的原因。本章节主要研究结论如下：

(1) *T. cutaneum* MP11 是三株候选菌株中生产单细胞蛋白性能最强的菌株，其细

胞干重积累量与单细胞蛋白产量均为候选菌株中的最高水平。其次，该菌株可以快速、彻底利用木质纤维素来源的己糖和戊糖，具有生产单细胞蛋白和微生物油脂的巨大潜力，选做后续的研究对象。

(2) 以不同无机氮源为唯一氮源时，*T. cutaneum* MP11 菌体的蛋白含量与产量无明显差异，氨氮作为微生物氮代谢的终极状态能够更高效地被转换为胞内蛋白，硫酸铵应用广泛且价格低廉，将其作为后续发酵生产单细胞蛋白与油脂的氮源。

(3) 将硫酸铵作为唯一氮源时，木质纤维素体系下 *T. cutaneum* MP11 生产单细胞蛋白的最佳碳氮比为 9.4 和最适 pH 值为 5。在最佳的碳氮比和 pH 条件下，单细胞蛋白与油脂的产量分别为 24.4 g/L 和 11.8 g/L。

(4) 以硫酸铵、尿素和玉米浆作为复合氮源时，*T. cutaneum* MP11 在木质纤维素体系生产单细胞蛋白的最适复合氮源的添加方案为 20 g/L 硫酸铵、20 g/L 尿素和 10 g/L 玉米浆。与以硫酸铵为唯一氮源相比，在 30% (w/w) 固含量小麦秸秆中利用复合氮源进行同步糖化共发酵生产单细胞蛋白的产量提升至 26.9 g/L，此时油脂产量为 12.5 g/L。

(5) 与在合成培养基中相比，*T. cutaneum* MP11 利用木质纤维素水解液可以获得更高的单细胞蛋白和油脂产量。可见，木质纤维素体系更有利于 *T. cutaneum* MP11 的菌体量和蛋白质含量的积累。

(6) *T. cutaneum* MP11 在水解液体系的氨基酸合成路径和氨基酰-tRNA 合成酶的大多数基因明显上调。而且，发酵 48 h，*Trcu_02828* (丙氨酸转氨酶) 和 *Trcu_00399* (天冬氨酸转氨酶) 等蛋白质合成关键基因在转录水平的表达提高，均有利于氨基酸和单细胞蛋白的合成。

第3章 木质纤维素体系下循环利用氨氮废液联产单细胞蛋白与油脂

3.1 引言

农业废弃物具有大量的木质纤维素生物质 (LCB)，废弃生物质被认为是能源生产的重要替代基质。农业、工业和食品制造业会伴随着大量各种木质纤维素废料以及废水生成。虽然木质纤维素生物质是一种廉价、分布广泛的可再生资源，但是在生产过程中产生的废料和废水需要有效的处理方式，否则就会造成极大的污染问题^[114]。生物炼制工厂使用木质纤维素生物质生产产品，最重要的就是减少废物排放以及尽可能多地实现木质纤维素和水资源的回收和循环利用。

工业生产会产生很多含有重金属离子和有毒阴离子的废水，这些废水排放前需经过处理以保证各种有毒离子浓度低于最低排放标准。木质纤维素生物质可以作为吸附剂从废水中吸附有毒无机污染物。因为其具有高浓度污染物的吸收能力以及价格低廉等优点，木质纤维素生物质吸附剂已被广泛用于从废水中吸附无机污染物^[115]。将高氨氮废水用于生物炼制过程可以减少淡水资源的使用，并且高氨氮废水中的氨氮可以被微生物吸收转化为单细胞蛋白。

生物炼制过程中，木质纤维素原料中的绝大多数纤维素和半纤维素被酶水解为己糖、戊糖，然后被微生物消耗并转化为单细胞蛋白、油脂或其他产品。木质素等残渣在发酵结束后经固液分离作为固态物质的形式残留。木质素可以作为锅炉焚烧物为生物炼制流程提供燃料^[116]。在生物炼制过程中，虽然使用干式稀酸预处理法极大地减少了预处理阶段废水的排放问题，但是在糖化和发酵结束后的固液分离则不可避免地产生大量发酵废水。而这些发酵废水的处理方法，将直接影响生物炼制流程对废物的处理成本。

根据上一章研究内容，在较低碳氮比条件发酵结束后，发酵液中仍残有部分硫酸铵。本章通过对发酵上清液的多次循环利用来降低生产成本与减少废水排放。经过 5 次循环发酵，氮元素转化率仍能保持 70%以上。对木质纤维素体系下生产单细胞蛋白的氨基酸含量和微生物油脂的脂肪酸含量进行测定，评价单细胞蛋白作为动物饲料添加剂以及微生物油脂作为生物柴油的潜力。通过对整体生物炼制流程进行物料衡算，*T. cutaneum* MP11 利用废弃农业生物质与无机氨氮生产微生物蛋白与油脂，实现了废弃生物质与廉价氮源的高价值转化，提出了一种高效利用生物质生产单细胞蛋白与微生物油脂的整体策略。因此，本研究最后尝试将工业高氨氮废水用于生物炼制流程生产单细胞蛋白与油脂。

3.2 材料和方法

3.2.1 菌种及其培养

皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 来源和种子培养基见 2.2.1。

3.2.2 高氨氮废水

高氨氮废水由中节能抚州环保能源有限公司提供，经垃圾渗滤液处理、升流式厌氧污泥床（UASB）出水获得的高氨氮废水，化学需氧量（COD）浓度约 6000-10000 mg/L，氨氮浓度约为 2000 mg/L。初始 pH 为 10-11，用 5M NaOH 调节 pH 至 6.0。

3.2.3 发酵上清液的循环利用

将同步糖化共发酵结束后得到的发酵液分装经 9000~12000rpm 离心 5~10 min 后取上清液。上清液分为含副产物微生物油脂油相和含发酵废水水相，收集发酵废水，加 NaOH 将其 pH 值调至 6.0。由于发酵废水中含有少量菌体和木质素残渣，将发酵废水进行灭菌处理后出现固体颗粒，离心收集上清液用于糖化阶段（作为下一次发酵时的部分氮源）。糖化结束后经生物脱毒步骤，加入营养盐以及补充硫酸铵（使初始碳氮比约为 9.4）进行同步糖化共发酵生产单细胞蛋白和油脂。

3.2.4 元素浓度、总酚浓度和铵根离子浓度测定

元素浓度测定方法：每次循环发酵结束后，用 Agilent725 ICP-OES 等离子体原子发射光谱测定稀释 100 倍的上清液。

总酚浓度测定方法：参照 Ainsworth 等人使用的 Folin-Ciocalteu 法^[117]，首先用没食子酸作为标准样品绘制标准曲线。经离心后取发酵上清液 0.5 mL 于避光试管中加入 1 mL 体积分数为 15% 的 Folin-Phenol 试剂，震荡摇匀后加入 4 mL 74.2 g/L 的碳酸钠溶液。继续摇匀后避光反应 3 h，再用分光光度计在 765 nm 测定反应液的吸光值。

铵根离子浓度测定：在发酵结束后离心取发酵上清液，凯氏定氮法测未消化上清液的消耗的标准 HCl 体积。上清液的铵根离子与 40% (w/w) NaOH 在通有蒸汽的条件下反应生成氨气，氨气与硼酸反应生成偏硼酸铵，反应式见 2.2.6。铵根离子浓度的计算公式为：

$$C_{NH_4^+} = \frac{M \times C_1 \times V_1}{2V_2} \quad (3-1)$$

C_1 ：标准 HCl 浓度，本论文所用浓度为 0.0501 mol/L， V_1 ：消耗标准盐酸的体积（mL）； V_2 ：凯氏定氮时添加上清液的体积（mL）； M ：铵根离子的质量分数（18 g/mol）； $C_{NH_4^+}$ ：铵根离子浓度（g/L）。

3.2.5 氨基酸和核酸含量测定方法

将 30 mL 发酵液装入 50 mL 离心管，12000 rpm 离心 5 min 收集菌体。弃上清，将菌体置于 -80 °C 超低温冰箱保存。隔夜将完全冷冻的菌体置于培养皿中，迅速转移至冻干机抽真空后冻干 8 h。将冻干后的菌体进行水解处理，详细步骤如下：取一定质量的

菌体于 20 mL 水解管中，加入 16 mL 6 mol/L HCl，真空脱气 30 min，冲入氮气后封管水解。菌体于 110 °C 水解 24 h 后析出氨基酸，待样品冷却至室温后，用超纯水将样品转移到 50 mL 容量瓶中定容。取 1 mL 水解液真空中脱酸抽干，加 1 mL 超纯水再次抽干，重复加水再抽干。加入 1 mL 0.02 mol/L HCl，水膜过滤后测定氨基酸含量。用装 2622#PH 离子交换色谱柱的日立 L-8900 Amino Acid Analyzer（日立 L-8900 高速氨基酸分析仪）分析氨基酸浓度。

根据 Liu 等人^[118]的方法提取菌体核酸后，用紫外吸收法测定核酸浓度，具体过程如下：离心发酵液收集菌体，将菌体置于 65 °C 烘箱中烘干至恒重，随后将菌体研磨至粉末状。取 0.1 g 菌体粉末，加入 25 mL 5% 三氯乙酸，80 °C 水浴提取 25 min，期间不断用玻璃棒搅拌。提取完成后冰浴冷却 5 min，离心取上清。以 5% 三氯乙酸为空白对照，NanoDrop ND-1000 分光光度计测定上清液在 260 nm 下的吸光值，以确定菌体中 RNA 的浓度。核酸含量计算公式为：

$$w = \frac{n \times V}{m} \times 100\% \quad (3-2)$$

n: 上清液中核酸浓度 (ng/μL); V: 上清液总体积 (25 mL); m 为菌体重量 (0.1 g)。

3.3 结果与讨论

3.3.1 最小化含氨氮废水排放策略

有相关研究称，皮状丝孢酵母对酚醛抑制物以及高渗环境有良好的耐受性^[119, 120]。利用皮状丝孢酵母在木质纤维素体系下生产单细胞蛋白与微生物油脂的最适碳氮比条件下，硫酸铵浓度的添加量为 24 g/L，这相比于利用皮状丝孢酵母进行油脂发酵时添加的硫酸铵浓度提高了近 50 倍。

对碳氮比为 9.4 时发酵结束的上清液中的氮含量进行测定，其浓度为 1.6 g/L（相当于 7.6 g/L 硫酸铵）。根据中华人民共和国污水排放标准（Integrated wastewater discharge standard, GB 8978-1996），最高氨氮浓度不得超过 50 mg/L。本研究尝试对发酵后上清的氨氮进行回收利用，以此减少高氨氮废水的产生。首次发酵时糖化步骤用去离子水，在发酵结束后将发酵液进行固液分离，取上清液用于下一次的糖化步骤用水和种子培养用水。对首次发酵以及五次循环发酵的上清液硫酸铵浓度进行了测定（表 3.1）。虽然在每次发酵结束后进行固液分离会损失部分水，但是预处理过程和脱毒过程中酸溶液和种子液有新鲜水输入，收集并处理得到的发酵上清液完全满足糖化阶段和发酵种子液用水需求。共进行了五次废水的循环利用，结果如图 3.2 所示。

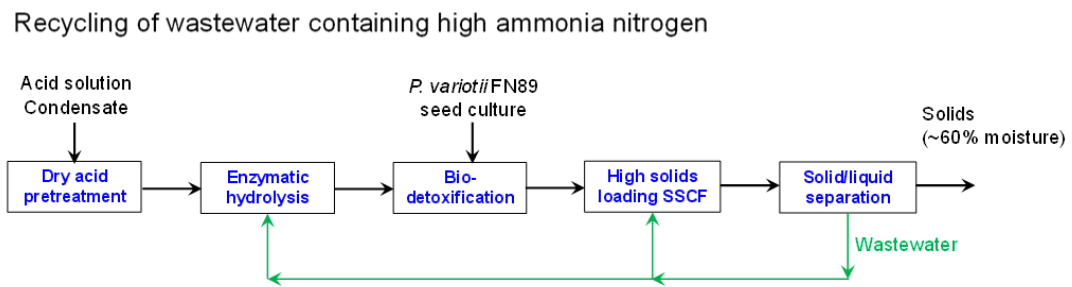


图 3.1 高氨氮废水的循环利用

Fig. 3.1 Recycling of wastewater containing high ammonia nitrogen

第一次循环发酵时耗尽葡萄糖与木糖的时间点分别为 60 h 和 72 h (图 3.2a,b)。首次使用去离子水发酵时耗尽葡萄糖和木糖的时间点分别为 36 h 和 60 h, 以此时间点计算糖耗速率, 第一次循环发酵葡萄糖和木糖的糖耗速率分别下降了 52.8%和 25.3%。显然循环发酵会导致皮状丝孢酵母的糖耗速率显著下降, 但是第一次循环发酵仍在 48 h 能够达到单细胞蛋白的最高产量 20.2 g/L。

废水的循环导致了单细胞蛋白生产的下降及滞后, 第一次使用循环废水的单细胞蛋白产量在 48 h 达到最高, 第二到第五次单细胞蛋白产量在 72 h 达到最高, 产量在 18.5-20.2 g/L 之间, 比对照组 (使用去离子水, 24.4 g/L) 降低了 17.2% - 24.2% (图 3.2c)。废水的循环对于菌株的油脂生产影响较小, 产量在 13.1 - 17.0 g/L 之间波动, 相比于使用去离子水的对照组 (15.2 g/L) 未显著下降 (图 3.2d)。随着循环发酵循环次数的增加, 葡萄糖和木糖的消耗速率缓慢下降, 但在 72 h 内基本都可以消耗完发酵液中的葡萄糖、木糖。造成单细胞蛋白产量下降、糖耗速率下降的原因可能是酚类物质、金属离子的积累对皮状丝孢酵母的生长有抑制作用, 所以对每次循环发酵结束后的上清液中金属离子浓度、总酚浓度进行了测定与分析。

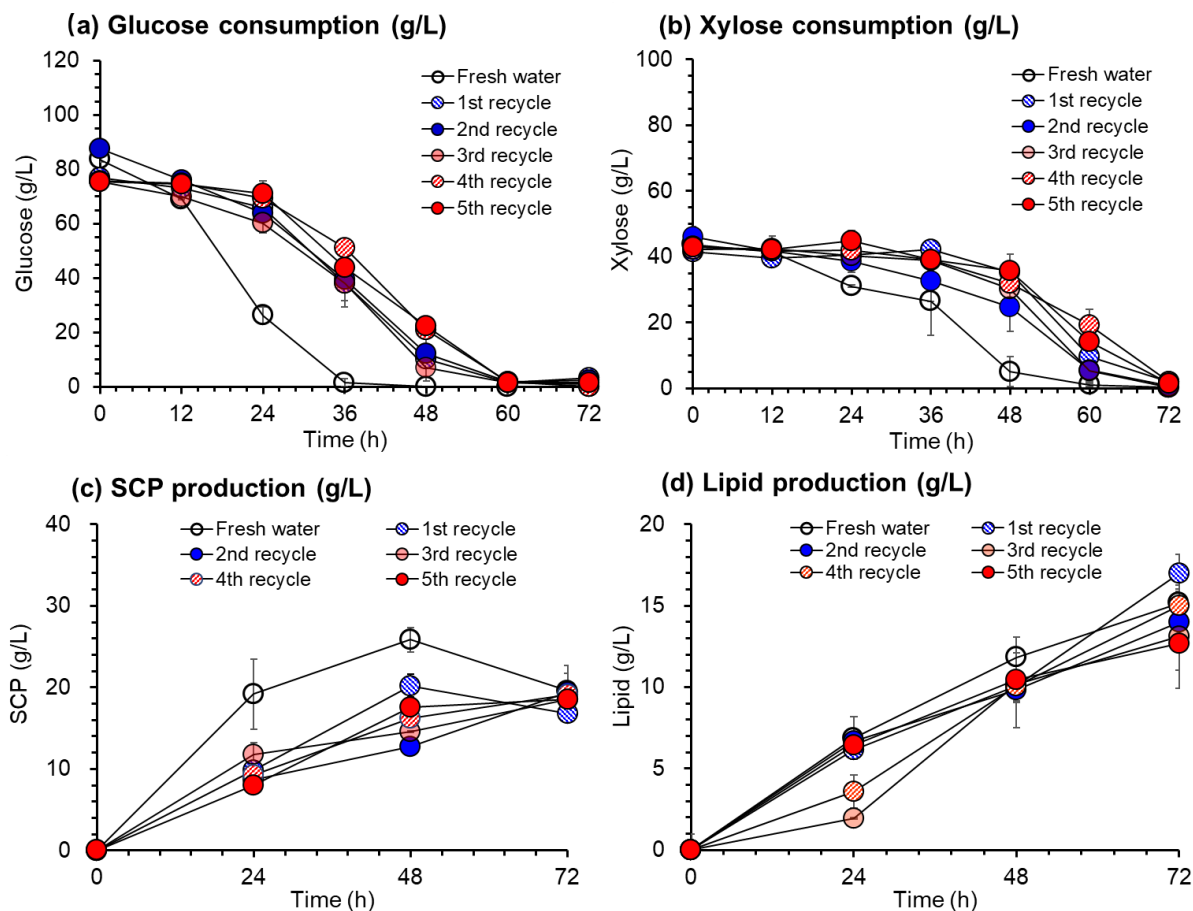


图 3.2 循环利用上清液剩余氨氮产单细胞蛋白与油脂

Fig. 3.2 Single cell protein and lipid production for *T. cutaneum* MP11 by recycling the residual ammonia nitrogen of the supernatant. (a) Glucose consumption; (b) Xylose consumption; (c) SCP production; (d)

Lipid production

注：30% (w/w) 固含量小麦秸秆 12 h 预糖化（纤维素酶用量：4 mg 纤维素酶蛋白/g 干物质）后，在 3 L 生物反应器进行同步糖化共发酵，发酵开始前补充硫酸铵使碳氮比为 9.4，SSCF 条件：30 °C，600 rpm，1.0 vvm，pH 5.0，2M H₂SO₄ 和 5M NaOH 调节 pH

对去离子水发酵、第 1-5 次循环发酵的上清液中 K、Ca、Na、Mg、P、S 六种元素的浓度进行了测定（图 3.3）。在经过循环发酵后 K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 浓度呈上升趋势并逐渐稳定，虽然循环发酵有富集金属离子浓度的趋向，但每次发酵过程中都会加入种子液、营养盐等对发酵液有稀释作用，K⁺、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 浓度先上升后保持稳定。在用去离子水发酵时 Na⁺ 浓度最高，第 3 次和第 5 次循环发酵的 Na⁺ 浓度最低，Na⁺ 绝大多数来源于调节 pH 时 NaOH 的添加量，可能与皮状丝孢酵母的生长代谢情况有关。菌体生长越旺盛，pH 波动越大，导致 NaOH 添加量越多。用去离子水发酵的单细胞蛋白产量最高，对应 Na⁺ 浓度最高，第 3 次和第 5 次循环发酵的单细胞蛋白产量最低，对应 Na⁺ 浓度最低。其它离子的浓度变化均不明显。

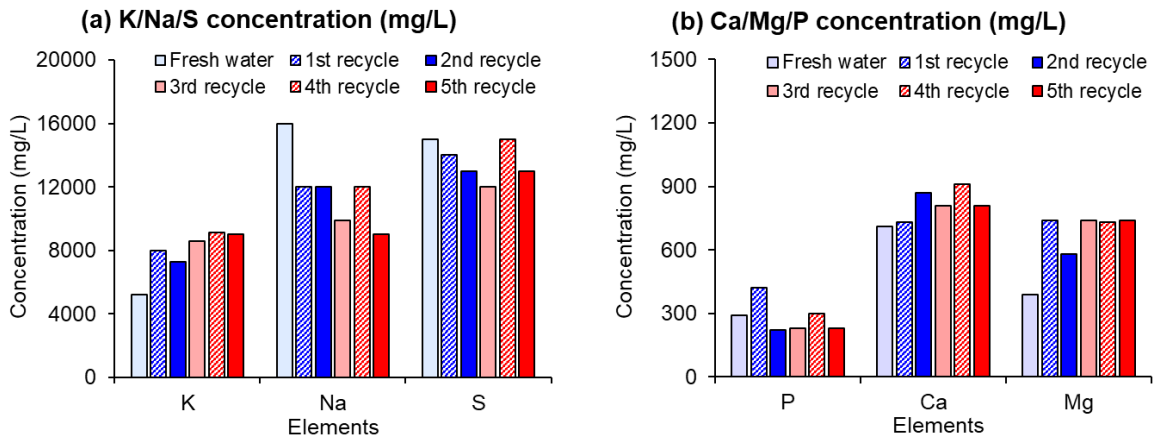


图 3.3 发酵上清液的主要元素浓度

Fig. 3.3 The concentration of the main elements in fermentation broth. (a) The concentration [potassium](#) (K), sodium (Na) and sulfur (S) (b) The concentration of calcium (Ca), magnesium (Mg) and phosphorus(P)

有研究表明木质纤维素生物质对一些金属离子和无机盐离子有一定的吸附作用^[114],也可能是灭菌时有较多固体颗粒(木质素残渣、蛋白质)吸附金属离子,导致其浓度波动较大。另外,有相关研究表明高浓度盐离子对酵母菌株生长有显著影响^[119]。由于该实验是在含有固体颗粒的小麦秸秆水解液进行同步糖化共发酵,因此无法直接测定菌体生长情况。但五次循环废水中 K、Na、Ca、Mg、S 和 P 浓度未发生显著变化,这表明废水的循环未造成明显的盐离子积累,不是对菌株生长抑制的主要原因。

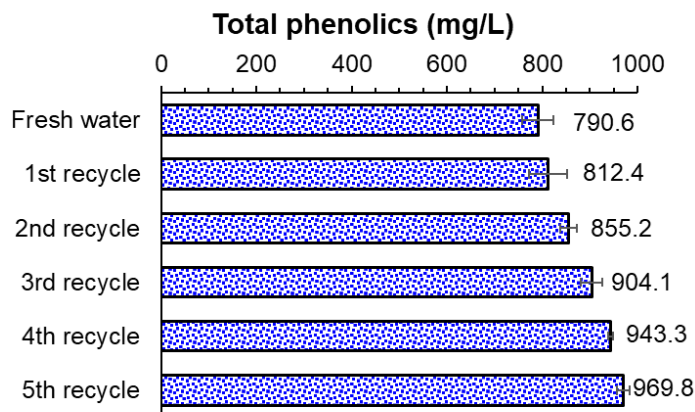


图 3.4 循环发酵上清液总酚浓度

Fig. 3.4 Total phenolic concentration of cyclic fermentation supernatant

由于脱毒菌株 *P. variotii* FN89 在脱毒过程中不能降解酚类抑制物,随着循环次数的增加,酚类抑制物可能逐渐升高。因此对去离子水发酵与五次循环发酵的上清液总酚浓度进行了测定(图 3.4)。每次循环都会使总酚浓度累积上升,由于每次循环发酵所加的脱毒菌株和发酵菌株种子液对体系中总酚浓度有稀释的作用,因此每次循环发酵液中的总酚浓度仅比上一次发酵上清液中高 21.9 - 48.9 mg/L。尽管皮状丝孢酵母相比于其他产

油酵母对木质纤维素来源酚醛抑制物有较好的耐受性^[118]，但经过 3 次循环后，发酵液中总酚浓度已经达到了 900 mg/L 以上，远高于先前实验条件（最高约 690 mg/L），可能会对菌株的生长造成严重抑制作用。

表 3.1 总结了使用不同循环次数废水中的残留氨氮浓度（换算成硫酸铵浓度）、生产 SCP 和油脂的氨氮转化率、发酵得率和产率。结果表明，不同循环中废水中残余的硫酸铵浓度在 6.7 - 7.6 g/L 之间。为保持发酵初始硫酸铵浓度为 24 g/L，在每次循环发酵前，只需补充 16.4 - 17.3 g/L 硫酸铵。与新鲜水发酵相比，第 1-5 次循环发酵的氮元素转化率分别提高 8.31%、提高 5.36%、减少 1.48%、减少 0.12%和减少 1.69%。前两次循环发酵的氮元素转化率较去离子水发酵上升，随循环次数的增加，氮元素转化率略微下降，在经过五次循环发酵后，氮元素转化率仍能够保持 70%以上。

首次用去离子水的常规发酵单细胞蛋白的产量、总糖得率、氮元素得率、生产效率均为最高值。随着上清液循环次数的增加，单细胞蛋白产量、单细胞蛋白总糖得率、单细胞蛋白氮元素得率、单细胞蛋白生产效率均呈缓慢下降的趋势。单细胞蛋白得率在 0.15 g/g 左右，废水循环对微生物油脂的得率和生产效率未有明显影响，分别在 0.12 g/g 和 0.2 g/L/h 左右。

由于随着循环次数的增加，发酵液不断积累某些物质（如酚类物质），这些物质对 *T. cutaneum* MP11 的生长有抑制作用，菌体需要消耗更多的能量来维持细胞的正常生长。上述情况导致单细胞蛋白的产量和得率呈下降趋势。发酵生产过程中不可避免的产生发酵废水，只需对发酵废水经过离心-调 pH-灭菌-离心取上清四步简单的处理，利用皮状丝孢酵母的耐受性可以多次循环利用含氨氮发酵废水进行生产微生物蛋白与油脂，从而减少了新鲜硫酸铵的添加量。随着发酵废水循环次数的增加，单细胞蛋白与油脂的得率几乎没有下降。整体上减少了发酵生产过程中新鲜水的使用量，减轻了发酵废水的排放量以及节省了硫酸铵的添加量，具有良好的环保效应和经济效应。

3.3.2 产品评价

用 30% (w/w) 固含量小麦秸秆水解液培养并收集菌体，经前处理后进行脂肪酸含量、氨基酸含量、核酸含量的测定。

本研究首先测定了皮状丝孢酵母和其他微生物的油脂组分（图 3.5）。通常，微生物油脂的生产在限氮的条件下进行。尽管本研究采用了较高的硫酸铵浓度，但 *T. cutaneum* MP11 以小麦秸秆为底物生产的油脂中脂肪酸的组成与目前报道的微生物生产的纤维素油脂组分基本相似，这表明本研究与单细胞蛋白共同生产的微生物油脂不仅可以作为植物油的替代品，也有作为生物柴油生产前体的潜力。同时，本研究中皮状丝孢酵母所生产的油脂中有利于生物柴油生产的油酸组分含量较高，达到了 61.5%。

表 3.1 多次循环利用发酵上清液的产物得率和生产效率

Table 3.1 Product yield and production efficiency of fermentation supernatant for multiple recycling

Group	Residual ammonium (g/L)	SCP			Lipid	
		Nitrogen Conversion rate	Productivity (g/L/h)	Yield (g/g Total sugars)	Yield (g/g Total sugars)	Productivity (g/L/h)
0	7.6	71.5% ± 7.3%	0.508 ± 0.019	0.188 ± 0.019	0.120 ± 0.007	0.217 ± 0.019
1	7.3	77.4% ± 3.1%	0.421 ± 0.023	0.157 ± 0.006	0.132 ± 0.008	0.236 ± 0.023
2	7.6	75.3% ± 17.1%	0.270 ± 0.021	0.146 ± 0.033	0.106 ± 0.011	0.194 ± 0.021
3	7.1	70.4% ± 4.8%	0.257 ± 0.017	0.143 ± 0.010	0.101 ± 0.025	0.182 ± 0.044
4	6.7	71.4% ± 9.7%	0.265 ± 0.036	0.147 ± 0.020	0.115 ± 0.015	0.208 ± 0.027
5	7.1	70.3% ± 1.5%	0.253 ± 0.005	0.138 ± 0.003	0.113 ± 0.003	0.204 ± 0.023

注：组别 0 为去离子水正常发酵；组别 1-5 为第 1-5 次循环发酵；组别 0 和组别 1 的产物得率和生产效率计算时间节点为 48 h，组别 2-5 的产物得率和生产效率计算时间节点为 72 h。

之前的 2.3.6 小节转录分析表明, *T. cutaneum* MP11 在水解液中, ω -6 脂肪酸去饱和酶 *Trcu-00716* 始终保持了较高的表达量 (图 2.16), 这可能导致了不饱和脂肪酸组分的增加。

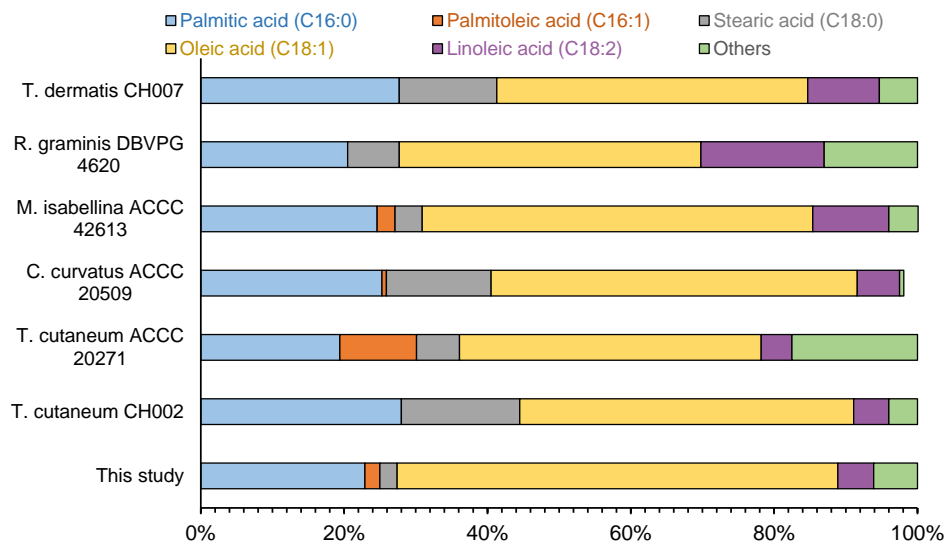


图 3.5 *T. cutaneum* MP11 和其它菌株之间的微生物油脂组成比较^[87,121-125]

Fig. 3.5 Comparison of fatty acid compositions from microbial lipids between *T. cutaneum* MP11 and other strains

表 3.2 为 *T. cutaneum* MP11 在 30% (w/w) 固含量小麦秸秆水解液中生产的单细胞蛋白的 18 种氨基酸含量成分。在麦秆水解液中培养得到的 *T. cutaneum* MP11 菌体检测到了全部的必需氨基酸, 与用做鱼类饲料和宠物饲料添加的蛋白质标准进行比较, 本研究生产的单细胞蛋白中尽管含有较多的精氨酸、亮氨酸、赖氨酸和缬氨酸, 但仅能满足宠物或人类蛋白质营养标准的 69.4% - 86.8% 或 42.1% - 84.8%。因此, 使用 *T. cutaneum* MP11 从小麦秸秆中所生产的单细胞蛋白与用于宠物食品或人类营养替代品的标准有所差距。研究结果表明, 本研究的单细胞蛋白产品基本满足作为鱼类饲料的要求, 因此其具有作为鱼类饲料的良好应用潜力^[70]。

与此同时, 测定了 *T. cutaneum* MP11 以小麦秸秆为原料生产的单细胞蛋白中的核酸含量, 含量为 8.01% (w/w), 在真菌生产单细胞蛋白的正常范围内。但这对于人类摄入来说过高, 仅适用于寿命较短的动物的饲养^[3]。

表 3.2 *T. cutaneum* MP11 在麦秆水解液中产单细胞蛋白的氨基酸含量

Table 3.2 Amino acid content of SCP in wheat straw hydrolysate for *T. cutaneum* MP11

Amino acid (g/100g)	Single cell proteins from wheat straw	Pet food ^[70]	FAO standard	Aquaculture feed ^[126]
Essential amino acid				
Arginine	2.54	4.80	-	1.00
Histidine	0.98	1.40	-	-
Isoleucine	1.77	2.40	4.20	-
Leucine	3.33	4.50	4.20	-
Lysine	3.56	4.10	4.20	1.20
Methionine	0.57	1.40	2.20	0.60
Phenylalanine	1.68	2.50	-	-
Threonine	2.12	2.40	2.80	0.50
Valine	2.22	3.20	4.20	-
Tryptophan	0.58	0.50	1.40	0.10
Nonessential amino acid				
Alanine	2.95	-	-	-
Aspartic acid	3.84	-	-	-
Cystine	0.70	-	-	0.20
Glutamic acid	4.90	-	-	-
Glycine	2.03	-	-	-
Proline	1.94	-	-	-
Serine	2.03	-	-	-
Tyrosine	1.42	-	-	-

注: Food and Agriculture Organization of the United Nations

3.3.3 生物炼制流程的整体物料衡算

按照麦秆原料的组分测定结果,以 100 kg 干重的小麦秸秆为计算基础,100 kg 麦秆含有 31.24 kg 纤维素、24.31 kg 半纤维素、19.41 kg 木质素以及 9.61 kg 灰分。

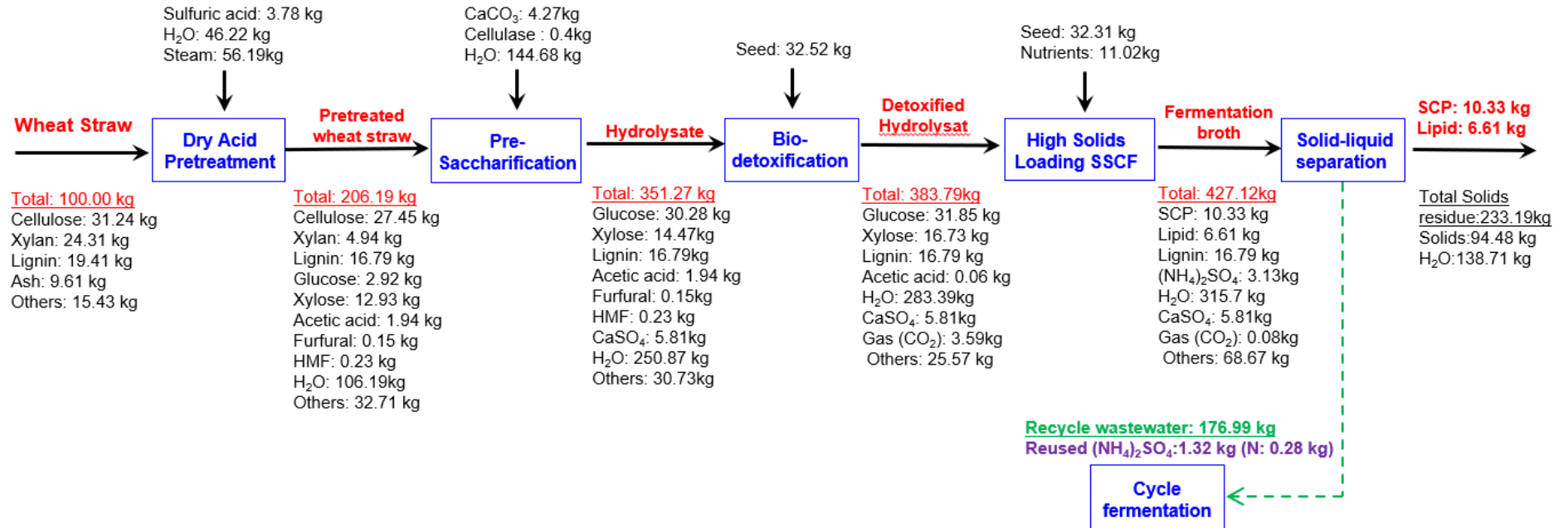
采用高固体含量(约 70% w/w)稀酸预处理技术进行预处理。将小麦秸秆物料与含有 3.7 kg 的浓硫酸的稀酸溶液先后投入预处理反应器中,预处理过程中向物料中混入 56.19 kg 的水蒸气,预处理后生成了 206.19 kg 的物料。预处理过程中将近 80% 的木聚糖被水解,大部分的纤维素组分被保留。预处理过程中高固体含量的小麦秸秆吸收了所有的酸溶液和冷凝蒸汽,因此无任何废水产生。同时由于过度降解所产生的 1.94 kg 乙酸、0.23 kg 五羟甲基糠醛(HMF)和 0.15 kg 糠醛抑制物全部积累于预处理物料中。

预处理结束后部分纤维素和半纤维素水解成 2.92 kg 葡萄糖和 12.93 kg 木糖。向预处理后的物料中投入 4.27 kg 碳酸钙调节物料 pH 至 5.5 左右,碳酸钙与稀硫酸发生反应生成 5.81 kg 硫酸钙,由于硫酸钙为固体,在后续的生物脱毒、发酵过程中不被降解。物料的 pH 值调至 5.5 左右后,经过磨浆处理进入糖化步骤。糖化阶段中需加入 0.4 kg 蛋白纤维素酶和 144.68 kg 的新鲜水(循环发酵中可用发酵废水替代新鲜水),使糖化体系固含量为 30% (w/w),预糖化过程共释放出 30.28 kg 葡萄糖。接下来添加 32.52 kg

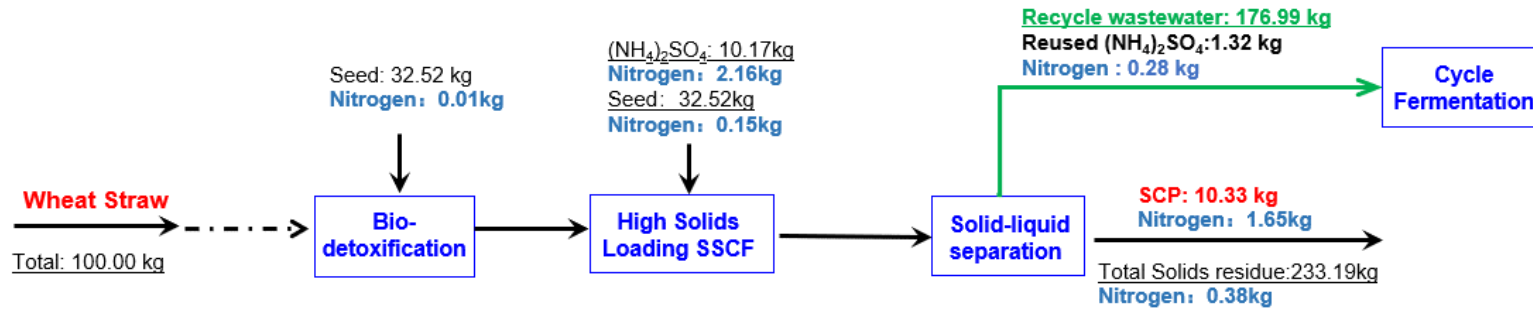
P. variotii FN89 种子液进行生物脱毒，去除体系中所有的糠醛、五羟甲基糠醛和绝大多数乙酸，脱除这些抑制物会有 3.59 kg 的二氧化碳气体放出。脱毒菌株的独特之处在于可在消耗可发酵糖之前降解抑制物，从而避免了糖损失。脱毒过程中由于持续的酶水解，以及升温灭活的过程可发酵糖浓度上升。添加 11.02 kg 的营养盐（硫酸铵、磷酸二氢钾、七水硫酸镁）后，添加 32.31 kg *T. cutaneum* MP11 种子液，同步糖化共发酵产单细胞蛋白与微生物油脂，两种产物的产量分别为 10.33 kg 和 6.61 kg，两种产物总得率是理论得率的 0.188 g/g 和 0.120 g/g。发酵液中残留有约 3.13 kg 硫酸铵、5.81 kg 硫酸钙和 315.7 kg 的发酵废水。经过固液分离后，所产生的固体木质素残渣可用做固体燃料焚烧供能。176.99 kg 发酵废水可用于下一阶段循环发酵的糖化步骤与种子培养，废水中的硫酸铵可以抵消部分所需添加的硫酸铵。

物料衡算（图 3.6b）展示了在首次生物炼制中使用新鲜水生产单细胞蛋白和油脂的氮元素衡算。在发酵前添加 10.17 kg 的硫酸铵（氮元素质量为 2.16 kg），*T. cutaneum* MP11 的种子液约含有 0.15 kg 的氮元素（酵母提取物和蛋白胨的氮元素）。生成的 10.33 kg 单细胞蛋白所含有的氮元素质量约为 1.65 kg，固液分离得到的废水中约含有 1.32 kg 的硫酸铵（氮元素质量为 0.28 kg），剩余的氮元素在固体残渣中。

a) Mass balance of wheat straw biorefining for SCP and Lipid production



b) Mass balance of Nitrogen in wheat straw biorefining



c) Mass balance of cycle fermentation in wheat straw biorefining

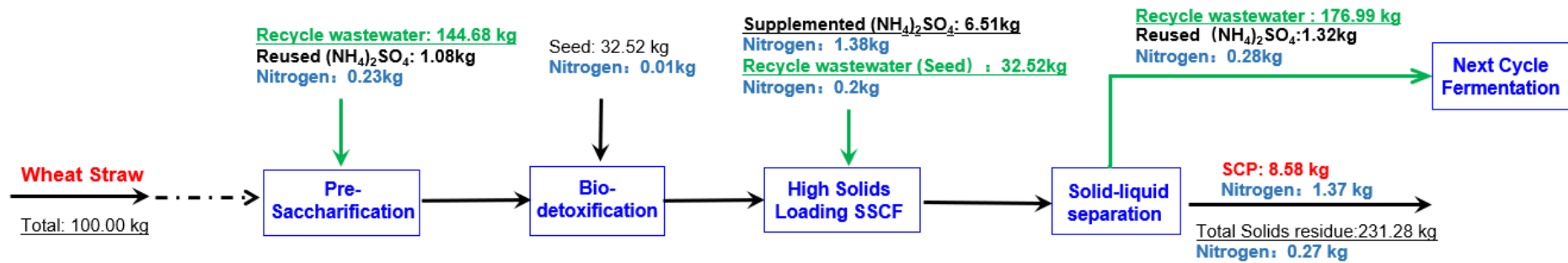


图 3.6 小麦秸秆生物炼制生产单细胞蛋白和油脂的物料衡算

Fig. 3.6 Mass balance of wheat straw biorefining for SCP and Lipid production. (a) Mass balance of wheat straw biorefining for SCP and Lipid production;

(b) Mass balance of Nitrogen in wheat straw biorefining; (c) Mass balance of cycle fermentation in wheat straw biorefining

物料衡算（图 3.6c）展示了发酵废水的循环过程。每次循环废水约为 177.00 kg，其中含 1.32 kg 硫酸铵，折合为 0.28 kg 氮元素。循环废水可用于糖化阶段以及皮状丝孢酵母的种子培养。发酵开始时需要额外补充 6.51 kg 硫酸铵，保证发酵时的初始碳氮比始终维持在 9.4。无机氮转化为单细胞蛋白的氮转化率为 72%。该策略在糖化和发酵过程中不需要补充新鲜水，至少可以循环五次。

3.3.4 利用高氨氮废水同步糖化共发酵产单细胞蛋白与油脂

上述研究结果表明，*T. cutaneum* MP11 对高氨氮发酵废液具有很强的耐受性。因此，本节尝试将工业高氨氮废水用于生物炼制流程生产单细胞蛋白与油脂。将工业高氨氮废水调节 pH 至 6.0 后不经灭菌（防止刺激性气体蒸出），直接代替去离子水用于生物炼制流程中的糖化步骤。在糖化过程中发现，用高氨氮废水代替去离子水的糖化效果较差，所以将糖化时间从 12 h 延长至 24 h。糖化效果差的原因可能是工业废水中含有害金属离子或其他离子，这些离子会与纤维素酶形成络合物导致纤维素酶酶活下降。

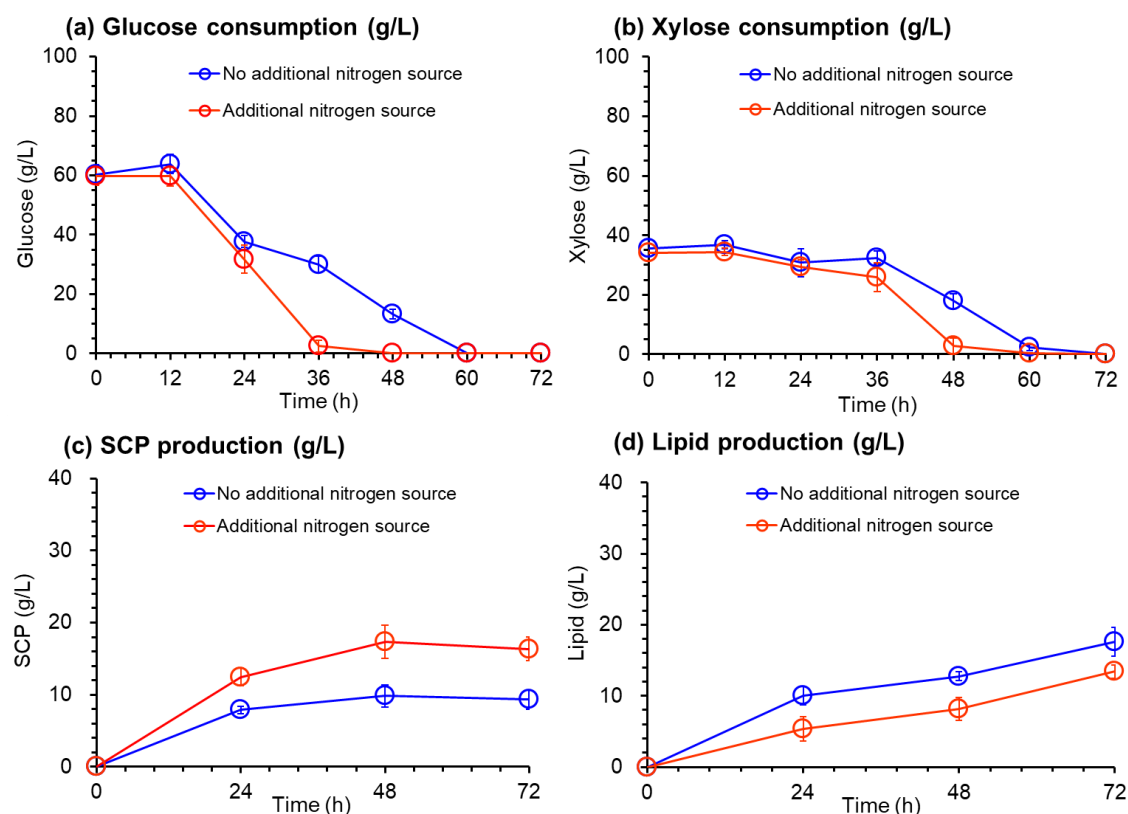


图 3.7 利用高氨氮废水同步糖化共发酵产单细胞蛋白与油脂

Fig. 3.7 SCP and lipid production from synchronous saccharification and co-fermentation using high ammonia nitrogen wastewater.

(a) Glucose consumption; (b) Xylose consumption; (c) SCP production; (d) Lipid production

注：30% (w/w) 固含量小麦秸秆预糖化 24 h，培养基：1 g/L KH_2PO_4 ；1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；对照组不添加额外的硫酸铵，实验组将 NH_4^+ 浓度补充至 4.24 g/L（相当于 20 g/L 硫酸铵的氨氮浓度，初始碳氮比为 9.4）。发酵条件：30 °C、600 rpm、1 vvm，用 2M H_2SO_4 和 5M NaOH 调节 pH 保持 5.0。

补充硫酸铵使发酵时葡萄糖和木糖的消耗速率明显变快（图 3.7a,b），补充硫酸铵使菌体在 36 h 基本耗尽葡萄糖，糖耗速率上升了 40%。原因可能是在新鲜充足的硫酸铵条件下更利于菌株在废水中生长代谢。根据实验结果可以看出，补充足量的硫酸铵能够获得更高的单细胞蛋白产量，在 48 h 达到单细胞蛋白的最高值 17.3 g/L，产量提高了 76.1%，此时单细胞蛋白得率为 0.14 g/g，氮元素转化率为 59.02%。相比使用去离子水发酵，使用工业高氨氮废水同步糖化共发酵的单细胞蛋白产量明显下降。补充硫酸铵的实验组比不补充硫酸铵的对照组油脂产量降低，在 48 h 时（单细胞蛋白最高产量时间点）油脂的产量分别是 8.1 g/L 和 12.8 g/L，得率分别是 0.07 g/g 和 0.10 g/g。

在不补充硫酸铵的条件下，*T. cutaneum* MP11 利用高氨氮废水进行同步糖化共发酵醪液不含残留氨氮。这表明，*T. cutaneum* MP11 经将废液中全部无机氨氮离子吸收并转化为单细胞蛋白或其它含氮物质。虽然高氨氮废水对皮状丝孢酵母的生长有一定的抑制作用，但菌体在 72 h 内能完全耗尽发酵液中的单糖。上述结果表明将该高氨氮工业废水用于生物炼制流程，不仅可以对高氨氮工业废水进行除氨氮处理，而且可以减少新鲜水的使用量，整体可以实现利用废弃生物质和高氨氮废水转化为单细胞蛋白与微生物油脂。

3.4 本章小结

木质纤维素生物质中缺少皮状丝孢酵母生产单细胞蛋白所需的氮源，需要人工补加较高浓度的氨氮，最终发酵所产生的高氨氮废水会造成极大的技术、经济负担，因此必须对大量高氨氮发酵废水进行循环利用。本章重点针对生产单细胞蛋白与油脂的发酵液剩余大量氨氮的问题，提出了循环发酵实现最小化含氨氮废水的排放策略，并对生物炼制流程进行了整体的物料衡算。接着尝试利用木质纤维素来源的单糖和工业高氨氮废水提供的氮源进行同步糖化共发酵生产单细胞蛋白与油脂。本章主要研究结果如下：

（1）将生产单细胞蛋白与油脂的发酵上清液用于循环发酵的部分氮源和糖化的全部用水。结果表明，废水的循环未出现金属离子大量积累的现象，但会出现酚醛抑制物含量的持续增高。5 次废水循环过程中的糖代谢、单细胞蛋白和油脂产量和得率都趋于稳定。单细胞蛋白产量稳定在 18.5-20.2 g/L 之间，无机氨氮转化为单细胞蛋白的氮元素转化率高达 72%，油脂产量稳定在 13.1-17.0 g/L 之间。由木质纤维素来源的可发酵糖转化为单细胞蛋白和油脂的得率始终保持在 0.15 g/g 和 0.11 g/g 左右。

（2）检测木质纤维素体系下皮状丝孢酵母生产单细胞蛋白的氨基酸成分，有充足的赖氨酸、亮氨酸等必需氨基酸，能够完全满足鱼类饲料的最低标准，具有作为鱼类饲料的良好应用潜力。检测皮状丝孢酵母所生产的油脂中的脂肪酸成分，油酸组分高达达到了 61.5%，有作为生物柴油生产前体的巨大潜力。

(3) 对整体生物炼制流程进行物料衡算, 以 100 kg 干重小麦秸秆为原料时, 仅需添加 10.1 kg 硫酸铵和 0.9 kg 磷酸二氢钾与七水硫酸镁, 最终可以获得 10.3 kg 单细胞蛋白与 6.6 kg 油脂。在循环发酵的生物炼制过程中, 每 100 kg 干重小麦秸秆可得到 8.6 kg 单细胞蛋白与 6.6 kg 油脂, 每次循环可以避免产生 177.0 kg 高氨氮发酵废水, 并节省 177.0 kg 新鲜水和 1.3 kg 硫酸铵。最小化排放含氨氮废水的循环发酵策略具有很强的环保和经济效益, 实际应用前景较好。

(4) 利用废弃农业生物质与高氨氮工业废水生产单细胞蛋白与油脂, 将高氨氮废水用于生物炼制的糖化阶段。不补充硫酸铵时, *T. cutaneum* MP11 发酵 48 h 能将废水中的全部氨氮转化为 8.1 g/L 单细胞蛋白, 此时油脂产量为 12.8 g/L。补充硫酸铵至碳氮比为 9.4, *T. cutaneum* MP11 发酵 48 h 可以获得 17.3 g/L 单细胞蛋白, 此时油脂产量为 8.1 g/L。

第4章 适应性进化提高皮状丝孢酵母的单细胞蛋白含量

4.1 引言

单细胞蛋白是由各种藻类、酵母、细菌和真菌产生的大量生物质，这些微生物可以用作动物饲料或营养添加剂。微生物油脂是产油微生物生产的脂质，被认为是作为可持续生物柴油和高营养价值饲料添加剂的较佳选择。

微生物生产单细胞蛋白的相关代谢路径十分复杂，包括氮同化途径、糖酵解途径、氨基酸合成和蛋白质合成等途径都与单细胞蛋白的生成有关。很少有研究通过代谢工程改造的方式来提高单细胞蛋白的产量，大多是通过培养基优化、发酵调控的手段提高产量。

适应性进化策略已经广泛的应用于提高菌株性能，填补了常规基因工程方法的不足。适应性进化的主要难点是确定合适的筛选压力来不断提高菌株的某种性能。油脂含量增加会造成菌体细胞密度下降，通过离心作用可以富集高油脂含量菌体^[127]。与之相反的是，产油酵母的蛋白含量增加会提高细胞密度，通过离心作用筛选下层细胞可以富集高蛋白含量菌体。

本章采用离心筛选适应性进化的方法提高皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 的蛋白含量，经过 50 次转接传代，获得了蛋白含量较出发菌株提升 2.4 倍的一株进化菌株。

4.2 材料与方法

4.2.1 菌株与培养基

皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 来源和种子培养基见 2.2.1。

适应性进化培养基为：60 g/L Glucose、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g/L Yeast extract 和 10 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度随着驯化代数增加。

4.2.2 细胞干重与蛋白含量的测定

菌体的测定方法见 2.2.5

4.2.3 菌体生长和细胞形态观察

OD_{600} 测定方法与观察细胞形态的方法见 2.2.5

4.2.4 适应性进化提高 *T. cutaneum* MP11 蛋白含量

依据 2.2.1 部分的菌体活化步骤对驯化初始菌株 *T. cutaneum* MP11 进行适应性进化。在 500 mL 三角瓶中，按照 10% (v/v) 接种量，将 *T. cutaneum* MP11 接种至含 10 g/L 硫酸铵的 50 mL 高氮培养基，并于 180 rpm 培养 72 h。吸取 15 mL 菌液于 50 mL 离心管，菌体经离心后收集到离心管底部。重悬去除上层菌体后取下层菌体传代培养，重复以上步骤进行适应性进化。

初始阶段将硫酸铵浓度设置为 10 g/L，将离心力设置为 4000 rpm 转接培养。由于本研究的最终目的是利用 *T. cutaneum* MP11 将廉价无机氮转化为单细胞蛋白，所以需要较高的硫酸铵浓度胁迫提高其利用无机氮转化为蛋白质的能力。测定适应性进化过程中的每代 OD₆₀₀、蛋白含量和菌体干重。转接至第 10 代发现蛋白含量明显上升，提高转速至 5000 rpm，使得蛋白含量较高的菌体聚集于离心管底层。当传代至第 20 代和 30 代时，分别增加硫酸铵浓度至 15 g/L 和 20 g/L，加大高氮环境对 *T. cutaneum* MP11 的胁迫作用。传代至 27 代时，将转速提高至 6000 rpm，由于过高的转速不利于将蛋白含量较高的菌体与蛋白含量较低的菌体区分开来（菌体聚成一团，难以吹悬去除上层菌体），后续一直保持 6000 rpm 的转速进行转接培养。

4.3 结果与讨论

4.3.1 适应性进化筛选方法的探究

根据 2.3.3 的研究结果，培养基碳氮比越低（硫酸铵浓度越高），*T. cutaneum* MP11 的蛋白含量越高。因此尝试用含有高浓度硫酸铵的合成培养基适应性进化 *T. cutaneum* MP11，目的是提高 *T. cutaneum* MP11 的产蛋白能力，以获得一株高蛋白含量的进化菌株。驯化过程中，每次转接时吸取 5 mL 作为下一代的种子液。

初始阶段的适应性进化培养基中，硫酸铵浓度设置为 50 g/L。第一阶段，蛋白含量由初代的 23.6% 提升至第 4 代的 35.8。但是从第 4 代到第 7 代菌体蛋白含量连续下降，*T. cutaneum* MP11 的产蛋白能力明显呈下降趋势（图 4.1）。分析原因可能是 *T. cutaneum* MP11 已经适应了 50 g/L 硫酸铵对细胞的胁迫作用，更趋向于在高氮条件下生产油脂。

适应性进化的第二阶段，第 8 代开始将培养基中的硫酸铵浓度提升至 75 g/L，更高浓度的硫酸铵对其产生更强的胁迫作用。提高硫酸铵浓度后，蛋白含量由第 7 代 22.1% 提升至第 8 代 34.9%，但是细胞的生长状态明显变差，OD₆₀₀ 由 17.4 降低至 10.6。转接至第 12 代时，*T. cutaneum* MP11 的蛋白含量又出现下降趋势，蛋白含量由第 12 代 33.1% 降低至第 15 代 22.3%。

适应性进化的第三阶段，第 16 代开始将硫酸铵浓度提升至 100 g/L，目的仍是以高浓度的硫酸铵抑制 *T. cutaneum* MP11 的产油脂性能，提高蛋白含量。虽然第 16 代的蛋白含量提升明显，但随着转接代数的增加，出现了同前两个适应性进化阶段相同的现象：蛋白含量逐渐趋于下降。驯化进入第三阶段，培养基的碳氮比已经低至 1.1，高浓度的硫酸铵导致培养基的渗透压过高，对 *T. cutaneum* MP11 的细胞形态影响较大。

观察适应性进化过程中的 *T. cutaneum* MP11 细胞形态（图 4.2），*T. cutaneum* MP11 在初代的细胞形态呈圆球状，随着提高适应性进化培养基的硫酸铵浓度至 75 g/L，细胞形态逐渐变成长棒状。当硫酸铵浓度提高至 100 g/L，细胞的形态变为更细的长棒状，这是由于高浓度硫酸铵造成的高渗透压环境挤压细胞生长，使细胞在合成培养基中的

形态变的更窄小。

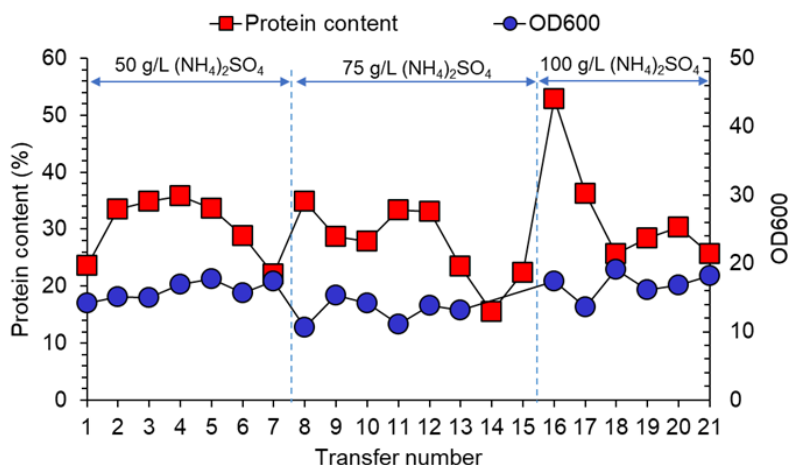


图 4.1 高氨氮合成培养基中适应性进化 *T. cutaneum* MP11

Fig. 4.1 Adaptive evolution of *T. cutaneum* MP11 in high ammonia nitrogen synthesis medium

适应性进化培养基: 60 g/L Glucose、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g/L Yeast extract、50~100 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 发酵条件: 30 °C, 180 rpm。传代时间: 1-7 代为 4 d, 8-21 代为 3 d (*T. cutaneum* MP11 在生长后期更趋向于积累油脂, 第 8 代开始培养时间缩短至 3 d)。

根据 Liu 等人的研究^[109], 油脂含量高的产油酵母在经过离心力作用后, 因其密度更小漂浮于上层。与之相反的, 产油酵母 *T. cutaneum* MP11 中蛋白含量高的细胞经离心后会位于下层。适应性进化至 20 代时, 离心收集菌体, 分别筛取上层菌体和下层菌体测定蛋白含量并观察细胞形态, 上下层菌体的蛋白含量分别为 29.7%和 36.7%。上层菌体的细胞形态为较细的棒状, 而下层菌体多为椭球状 (图 4.2), 这可能也与蛋白含量差异有关。因此后续一节采用基于密度差异的离心筛选适应性进化方法, 重新对 *T. cutaneum* MP11 进行适应性进化。

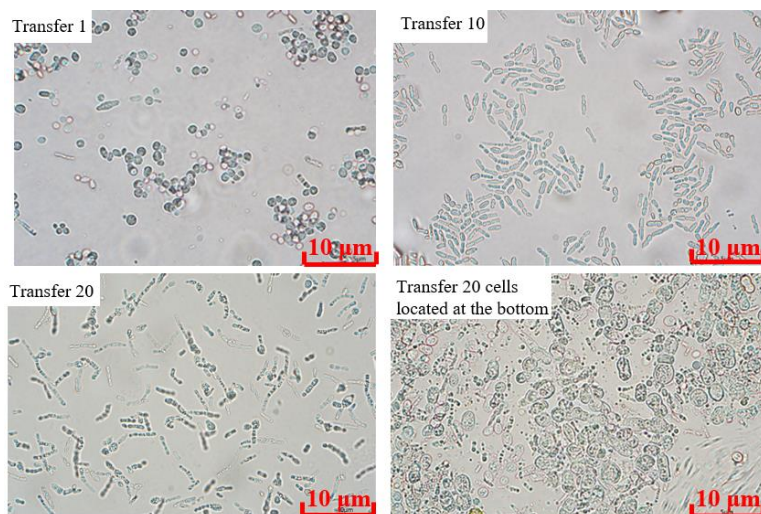


图 4.2 高氨氮驯化 *T. cutaneum* MP11 的细胞形态

Fig. 4.2 Cell morphology of high ammonia nitrogen domesticated for *T. cutaneum* MP11

4.3.2 离心筛选提高 *T. cutaneum* MP11 蛋白含量的适应性进化

在上一小节中, *T. cutaneum* MP11 经过 21 代高氨氮条件下的适应性进化, 蛋白含量不仅没有稳定提升, 而且蛋白含量有下降的趋势。仅以高浓度硫酸铵提供高氨氮胁迫的适应性进化无法获得蛋白含量稳定提升的进化菌株。因此需要对适应性进化的传代增加一个筛选的条件, 在转接时离心菌液, 筛选蛋白质含量高的下层菌体进行传代。

经过预实验发现过高转速收集到的菌体黏连成一块, 很难将较“轻”的上层菌体重悬舍弃, 前期转速设置为 4000 rpm。由 YPD 培养基活化转接入适应性进化培养基的第一代菌体蛋白含量仅为 13.4%, 转接 15 代后蛋白含量有明显的提高, 蛋白含量提高至 25.8%。适应性进化培养基的高氨氮条件对 *T. cutaneum* MP11 有一定的胁迫作用, 因此 OD₆₀₀ 由初代的 21.2 下降到了第 15 代的 10.7。由于转接时重悬舍弃大部分上层菌体, 每次接种的菌体量不能保持一致, 每代培养 72 h 后, OD₆₀₀ 有所波动。

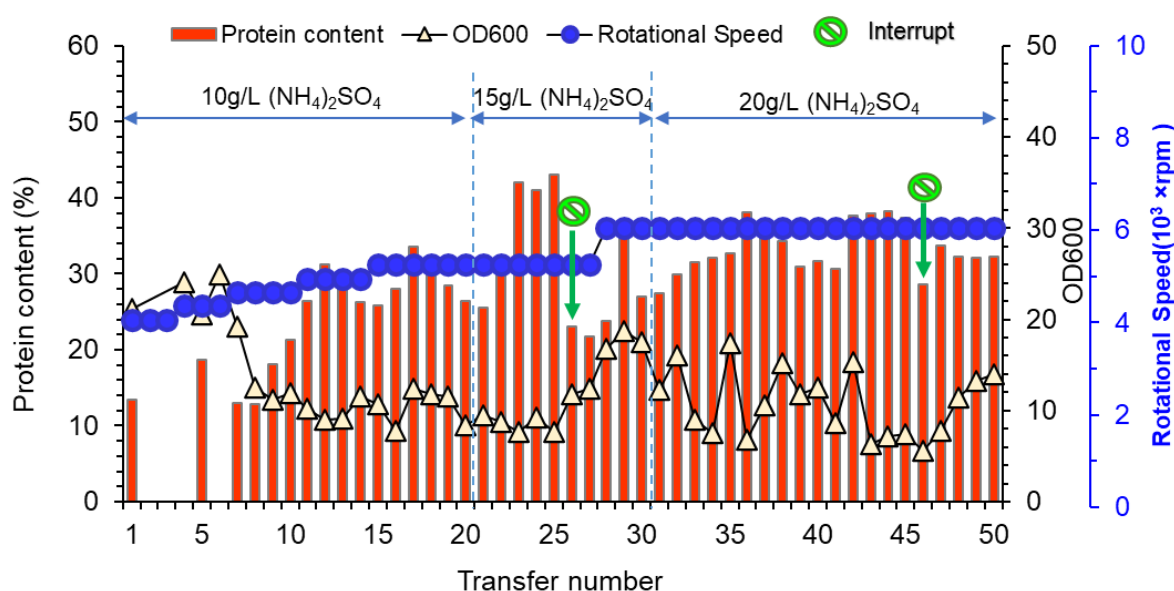


图 4.3 离心筛选提高 *T. cutaneum* MP11 蛋白含量的适应性进化

Fig. 4.3 Adaptive evolution of centrifugal screening to improve *T. cutaneum* MP11 protein content

适应性进化培养基: 60 g/L Glucose、1 g/L KH₂PO₄、1 g/L MgSO₄·7H₂O、10~20 g/L (NH₄)₂SO₄、0.5 g/L Yeast extract。培养条件: 30 °C、180 rpm、培养 72 h。第 26 代、46 代因新冠疫情中止传代, 用 YPD 培养基活化菌株后, 菌体蛋白含量降低。

第 20 代提高硫酸铵浓度至 15 g/L, 目的是保持充足且过量的无机氨氮对 *T. cutaneum* MP11 的胁迫作用。产油酵母合成油脂通常需要较高的碳氮比, 加入高浓度的硫酸铵使培养基有一个过低的碳氮比从而抑制皮状丝孢酵母合成油脂的性能, 促使代谢流偏向更有利于蛋白合成的通路。中途因新冠疫情中断传代, 第 26 代相比上一代蛋白含量明显下降, 原因可能是进化菌株高蛋白含量的性能不稳定, 经过长时间的冻存

后在 YPD 培养基活化，菌体在非高氨氮环境下又恢复到原先的代谢水平（偏向于油脂的积累）。在转接 4 代后开始恢复较高蛋白含量。转接至 44 代时，菌体的蛋白含量基本保持的 37% 左右。再次中断传代，活化后经过 6 代的适应性进化，蛋白含量能够稳定在 32% 左右。经过 50 代的适应性进化，获得了一株蛋白含量提升 2.4 倍的进化菌株。

观察适应性进化过程中细胞的形态变化（图 4.4），初代细胞保持 *T. cutaneum* MP11 原有的形态，在适应性进化的过程中细胞形态逐渐变小然后稳定保持椭球状至长棒状，细胞体积在硫酸铵的胁迫作用下明显缩小几倍，细胞体积变小也导致了油脂积累量下降。

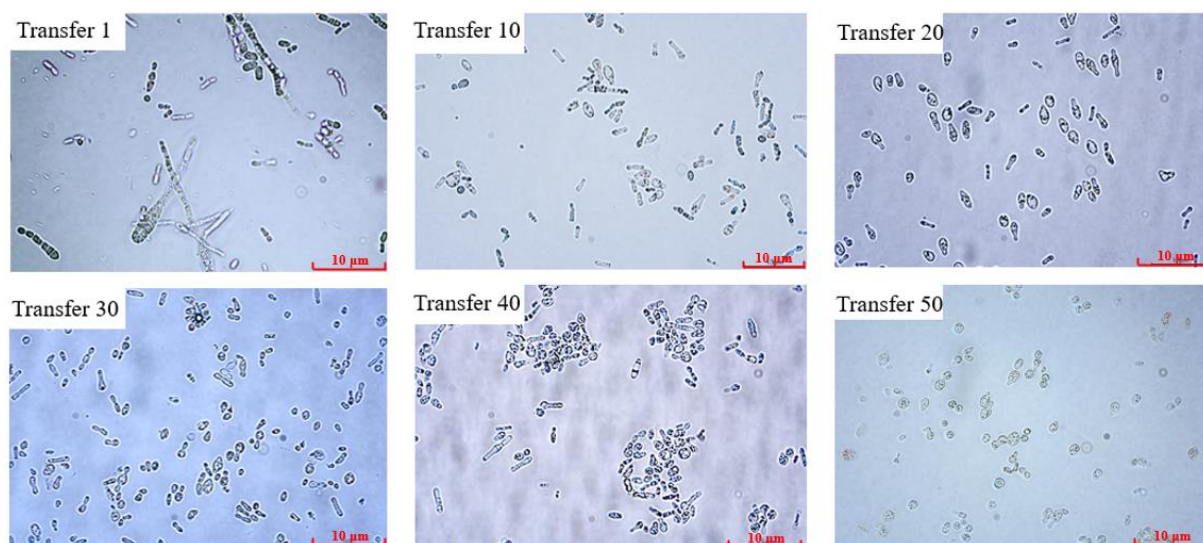


图 4.4 离心筛选适应性进化 *T. cutaneum* MP11 的细胞形态

Fig 4.4 Cell morphology of *T. cutaneum* MP11 in the centrifugal screening adaptive evolution

4.4 本章小结

单细胞蛋白是菌体积累的胞内蛋白的总和，因其代谢机制复杂，较难以单一的代谢工程改造的方法提高菌体生产单细胞蛋白的能力。适应性进化是获得目标性状的有效手段，本章用适应性进化的方法，在高氨氮条件下尝试在发酵结束后离心取下层蛋白含量较高的“重”细胞，重复转接培养提高皮状丝孢酵母的蛋白含量。本章的主要研究结论如下：

在高氨氮的合成培养基中，通过离心筛选适应性进化的手段提高皮状丝孢酵母的蛋白含量。每次发酵结束后离心取下层蛋白含量较高的“重”细胞作为种子接入下次的培养基中继续培养。在培养过程中逐渐提高氨氮的浓度，促进皮状丝孢酵母无机氮转化为蛋白的合成能力。经过 50 代的适应性进化，获得了蛋白含量稳定提高至 32% 以上的进化菌株，证明了该方法能够有效的获取蛋白含量更高的菌株。

第五章 结论与展望

5.1 结论和创新点

单细胞蛋白是解决当前蛋白质短缺问题的重要替代来源之一。单细胞蛋白大规模生产的主要瓶颈是降低原料成本，选择廉价碳源和氮源是生产面向实际应用的重要环节。廉价可再生的木质纤维素生物质可以作为原料大大降低成本，而合理的氮源应来自于无机氮化合物或高氨氮废水。本研究对皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 利用木质纤维素生物质与无机氮转化为单细胞蛋白与油脂的可行性进行了探究。此外，本研究还展示了 *T. cutaneum* MP11 利用废弃生物质与无机氮联合生产单细胞蛋白与油脂的潜力，提出一种高效利用木质纤维素生物质生产单细胞蛋白与油脂的整合加工策略。进一步通过循环发酵策略，循环利用发酵废水限制含氮废水的排放，实现了对废弃农业生物质原料与廉价无机氮源的高价值转化。本论文的主要研究结论如下：

(1) 首先确定了 *T. cutaneum* MP11 是最优潜力的单细胞蛋白生产菌株。木质纤维素体系下同步糖化共发酵联合生产单细胞蛋白与油脂的最适碳氮比为 9.4，最适 pH 为 5.0。利用 30% (w/w) 固含量小麦秸秆同步糖化共发酵，仅需添加 24 g/L 硫酸铵、1 g/L 磷酸二氢钾和 1 g/L 七水硫酸镁，在通气量为 1.0 vvm、pH 保持 5.0 的条件下发酵 48 h，单细胞蛋白与油脂产量分别达到了 24.4 g/L 和 11.8 g/L。其次，尝试利用 20 g/L 硫酸铵、20 g/L 尿素、10 g/L 玉米浆作为复合氮源，进一步提高单细胞蛋白和油脂的产量至 26.9 g/L 和 12.5 g/L。相比于在合成培养基中生长的 *T. cutaneum* MP11，在小麦秸秆水解液中生长的 *T. cutaneum* MP11 展现出更强的糖代谢、单细胞蛋白与油脂的合成能力。转录分析表明，在小麦秸秆水解液中 *T. cutaneum* MP11 氨基酸合成、糖代谢、油脂合成等路径关键基因的转录水平明显上调，这有利于单细胞蛋白与油脂的合成。

(2) 基于单细胞蛋白发酵剩余高氨氮的问题，重点探究了最小氨氮废水排放的策略，将残留有硫酸铵的发酵上清液中用于糖化、种子液培养阶段。经过 5 次循环发酵过程，单细胞蛋白产量稳定在 18.5-20.2 g/L 之间，无机氮转化为单细胞蛋白的氮元素转化率高达 72%，油脂产量稳定在 13.1-17.0 g/L 之间。废水的循环未出现金属离子大量积累的现象，但酚醛抑制物含量持续增高。对初次使用新鲜水的生物炼制流程进行物料衡算，以 100 kg 干重小麦秸秆为原料时，仅需添加 10.1 kg 硫酸铵和 0.9 kg 磷酸二氢钾与七水硫酸镁，最终可以获得 10.3 kg 单细胞蛋白与 6.6 kg 油脂。在循环发酵的生物炼制过程中，每 100 kg 干重小麦秸秆可得到 8.6 kg 单细胞蛋白与 6.6 kg 油脂，每次循环可以避免 177.0 kg 高氨氮发酵废水产生并节省 1.3 kg 硫酸铵的使用，具有较强的环保效益与经济效益。鉴于 *T. cutaneum* MP11 对高氨氮废水的耐受性，将高氨氮废水用于生物炼制流程的糖化阶段，利用工业高氨氮废水作为氮源在木质纤维素体系下联合生产单

细胞蛋白与油脂，最终生产指标与使用新鲜水接近。

(3) 在高氮氮的合成培养基中通过离心筛选适应性进化的手段提高皮状丝孢酵母的蛋白含量，在每次发酵结束后离心取下层高蛋白含量的“重”细胞进行迭代培养。经过 50 代的适应性进化，获得了蛋白含量稳定提高至 32% 以上的进化菌株，蛋白含量较出发菌株提升 2.4 倍，证明了该方法能够有效的获取蛋白含量更高的菌株。

5.2 展望

本研究在探讨皮状丝孢酵母发酵木质纤维素联产单细胞蛋白与微生物油脂的可行性过程中，建立了产物积累的最适碳氮比和最适 pH 值。本研究提出一种高效利用木质纤维素生物质生产单细胞蛋白与油脂的整合加工策略。进一步通过循环发酵策略，循环利用发酵废水限制含氮废水的排放，实现了废弃农业生物质原料与廉价无机氮源的高值化转化和利用。另一方面，通过适应性进化提高了皮状丝孢酵母的蛋白含量。但是本研究仍需要深入研究以下内容：

(1) 在木质纤维素体系，皮状丝孢酵母同步糖化共发酵获得的单细胞蛋白产量远远高于合成培养基。在此期间，皮状丝孢酵母的菌株代谢情况发生了明显变化。氨基酸合成的基因表达量上调只是给出了转录水平的分析，而整体代谢通路的变化情况未知。

(2) 皮状丝孢酵母的细胞形态与蛋白含量有待进一步探讨。

(3) 有待建立单细胞蛋白与油脂的整个生物炼制流程的计算模型，需要计算实际生产的原料成本、用电成本和废水处理成本等相关费用和碳排放。

(4) 需要继续探讨离心筛选的参数或条件，以获得遗传性状稳定的适应性进化菌株。

参考文献

- [1] Mehaboob, Ramesh AN, Patil C. Single cell protein: Management and utilization of agricultural and horticultural waste and production of supplemental protein. *International Journal of Botany Studies*, 2021, 6(1): 481-485.
- [2] Colgrave ML, Dominik S, Tobin AB, Stockmann R, Simon C, Howitt CA, Belobrajdic DP, Paull C, Vanhercke T. Perspectives on future protein production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(50): 15076-15083.
- [3] Ritala A, Hakkinen ST, Toivari M, Wiebe MG. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2009.
- [4] Spalvins K, Zihare L, Blumberga D. Single cell protein production from waste biomass: comparison of various industrial by-products. *Energy Procedia*, 2018, 147: 409-418.
- [5] Mekonnen MM, Hoekstra AY. Water footprint benchmarks for crop production: A first global assessment. *Ecological Indicators*, 2014, 46: 214-223.
- [6] Vermeulen SJ, Campbell BM, Ingram JSI. Climate change and food systems. *Annual Review of Environment and Resources*, 2012, 37(1): 195-222.
- [7] Finco AMD, Mamani LDG, Carvalho JC, Pereira GVD, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(5): 656-671.
- [8] El-Bakry M, Abraham J, Cerda A, Barrena R, Ponsa S, Gea T, Sanchez A. From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2015, 45(18): 1999-2042.
- [9] Browne J, Nizami AS, Thamsiriroj T, Murphy JD. Assessing the cost of biofuel production with increasing penetration of the transport fuel market: A case study of gaseous biomethane in Ireland. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011, 15(9): 4537-4547.
- [10] Singha S, Mahmutovic M, Zamalloa C, Stragier L, Verstraete W, Svagan AJ, Das O, Hedenqvist MS. Novel bioplastic from single cell protein as a potential packaging material. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, 9(18): 6337-6346.
- [11] Feng KX, Wang W, Rong JS, Liang JB, Mi JD, Wu YB, Wang Y. Construction of recombinant *Pichia pastoris* strains for ammonia reduction by the *gdhA* and *glnA* regulatory genes in laying hens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 234: 113376.
- [12] Vethathirri RS, Santillan E, Wuertz S. Microbial community-based protein production from wastewater for animal feed applications. *Bioresource technology*, 2021, 341: 125723.
- [13] Acosta N, Sakarika M, Kerckhof FM, Law CKY, Vrieze JD, Rabaey K. Microbial protein production from methane via electrochemical biogas upgrading. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 391: 123625.
- [14] Reihani SFS, Khosravi-Darani K. Influencing factors on single-cell protein production by

- submerged fermentation: a review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2019, 37: 34-40.
- [15] Yadav JSS, Bezawada J, Ajila CM, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY. Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresource Technology*, 2014, 164: 119-127.
- [16] Gao YR, Li DP, Liu Y. Production of single cell protein from soy molasses using *Candida tropicalis*. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(3): 1165-1172.
- [17] Hashem M, Hesham AEL, Alamri SA, Alrumman SA. Production of single-cell protein from wasted date fruits by *Hanseniaspora uvarum* KKUY-0084 and *Zygosaccharomyces rouxii* KKUY-0157. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(4): 1505-1511.
- [18] Liu BN, Li Y, Song JZ, Zhang LH, Dong JC, Yang Q. Production of single-cell protein with two-step fermentation for treatment of potato starch processing waste. *Cellulose*, 2014, 21(5): 3637-3645.
- [19] Tanaka M, Matsuno R. Conversion of lignocellulosic materials to single-cell protein (SCP): Recent developments and problems. *Enzyme and Microbial Technology*, 1985, 7(5): 197-206.
- [20] Suman G, Nupur M, Anuradha S, Pradeep B. Single cell protein production: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2015, 4(9): 251-262.
- [21] Adedayo M, Ajiboye E, Akintunde J, Odaibo A. Single cell proteins: as nutritional enhancer. *Advances in Applied Science Research*, 2011, 2(5): 396-409.
- [22] Dhanasekaran D, Lawanya S, Saha S, Thajuddin N, Panneerselvam A. Production of single cell protein from pineapple waste using yeast. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 2011, 8: 26-32.
- [23] Patsios SI, Dedousi A, Sossidou EN, Zdragas A. Sustainable animal feed protein through the cultivation of *Yarrowia Lipolytica* on agro-industrial wastes and by-products. *Sustainability*, 2020, 12(4): 1398.
- [24] Hongpattarakere T, H-Kittikun A. Optimization of single-cell-protein production from cassava starch using *Schwanniomyces castellii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1995, 11(6): 607- 609.
- [25] Pessoa A, Mancilha IM, Sato S. Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. *Journal of Biotechnology*, 1996, 51(1): 83-88.
- [26] Shahzad MA, Rajoka MI. Single cell protein production from *Aspergillus Terreus* and its evaluation in broiler chick. *International Journal of Bioscience Biochemistry and Bioinformatics*, 2011, 1(2): 137-141.
- [27] Wongputtisrisin P, Khanongnuch C, Kongbuntad W, Niamsup P, Lumyong S, Sarkar PK. Use of *Bacillus subtilis* isolates from Tua - nao towards nutritional improvement of soya bean hull for monogastric feed application. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 59(3): 328-333.
- [28] Paynor KA, David ES, Valentino MJG. Endophytic fungi associated with bamboo as possible sources of single cell protein using corn cob as a substrate. *Mycosphere*, 2016,

- 7(2): 139-147.
- [29] Singh A, Abidi AB, Agrawal AK, Darmwal NS. Single cell protein production by *Aspergillus niger* and its evaluation. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 1991, 146(3): 181-184.
- [30] Yunus FUN, Nadeem M, Rashid F. Single-cell protein production through microbial conversion of lignocellulosic residue (wheat bran) for animal feed. *Journal of the Institute of Brewing*, 2015, 121(4): 553-557.
- [31] 张柏青. 法国 Technip 公司单细胞蛋白研制情况. *微生物学通报*, 1979, 2: 47-48.
- [32] Ghosh BB, Banerjee AK. Production of single cell protein from hydrocarbons by *Arthrobacter simplex* 162. *Folia Microbiologica*, 1984, 29(3): 222-227.
- [33] Dürre P, Eikmanns BJ. C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 35: 63-72.
- [34] Yazdian F, Hajizadeh S, Shojaosadati SA, Khalilzadeh R, Jahanshahi M, Nosrati M. Production of single cell protein from natural gas: parameter optimization and RNA evaluation. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2005, 3(4): 235-242.
- [35] Papanikolaou S, Aggelis G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology*, 2002, 82(1): 43-49.
- [36] Ivarson KC, Morita H. Single-cell protein production by the acid-tolerant fungus *Scytalidium acidophilum* from acid hydrolysates of waste paper. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(3): 643-647.
- [37] Alriksson B, Hornberg A, Gudnason AE, Knobloch S, Arnason J, Johannsson R. Fish feed from wood. *Cellulose Chemistry and Technology*, 2014, 48: 9-10.
- [38] Rodríguez J, Ferraz A, Nogueira RFP, Ferrer I, Esposito E, Durán N. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1997, 62(2): 233.
- [39] Kornochalart N, Kantachote D, Chairapat S, Techkarnjanaruk S. Use of *Rhodopseudomonas palustris* P1 stimulated growth by fermented pineapple extract to treat latex rubber sheet wastewater to obtain single cell protein. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(3): 1021-1032.
- [40] Sharma S, Hansen LD, Hansen JO, Mydland LT, Horn SJ, Overland M, Eijsink VGH, Vuoristo KS. Microbial protein produced from brown seaweed and spruce wood as a feed ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(31): 8328-8335.
- [41] Somda M. Effect of mineral salts and nitrogen source on yeast (*Candida utilis* NOY1) biomass production using tubers wastes. *African Journal of Biotechnology*, 2017, 16: 359-365.
- [42] Nigam JN. Single cell protein from pineapple cannery effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998, 14(5): 693-696.
- [43] Taran M, Bakhtiyari S. Production of single cell protein by a halophilic microorganism using glucose as carbon source: optimization of process variables in extreme conditions by taguchi experimental design. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 2012,

- 1: 41-46.
- [44] Khan MKI, Asif M, Razzaq ZU, Nazir A, Maan AA. Sustainable food industrial waste management through single cell protein production and characterization of protein enriched bread. *Food Bioscience*, 2022, 46: 101406
- [45] Akintomide MJ, Antai S. Inorganic nitrogen supplementation and micro-fungal fermentation of white yam peels (flour) into single cell protein. *The Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, 2012, 2: 820-832.
- [46] 张乐, 崔金娜, 刘占英, 胡建华, 燕亚平, 朱明达. 单细胞蛋白生产技术及其应用研究进展. *饲料研究*, 2022, 45(18): 146-152.
- [47] Ashok G, Minakshi P, Pranita G. Liquid whey: a potential substrate for single cell protein production from *Bacillus subtilis* NCIM 2010. *International Journal of Life Sciences*, 2014, 2(2): 119-123
- [48] Zhang L, Zhou P, Chen YC, Cao Q, Liu XF, Li D. The production of single cell protein from biogas slurry with high ammonia-nitrogen content by screened *Nectaromyces rattus*. *Poultry Science*, 2021, 100(9): 101334.
- [49] Dou JW, Huang YM, Ren HW, Li ZZ, Cao Q, Liu XF, Li D. Autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic nitrogen assimilation for single-cell protein production by two hydrogen-oxidizing bacterial strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 187(1): 338-351.
- [50] Ahmed S, Ahmad F, Hashmi A. Production of microbial biomass protein by sequential culture fermentation of *Arachniotus sp.* and *Candida utilis*. *Pakistan Journal of Botany*, 2010, 42: 1225-1234.
- [51] Ahmed S, Mustafa G, Arshad M, Rajoka MI. Fungal biomass protein production from *Trichoderma harzianum* using rice polishing. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 623279.
- [52] Christaki E, Florou-Paneri P, Bonos E. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2011, 62(8): 794-799
- [53] Balagurunathan B, Ling H, Choi WJ, Chang MW. Potential use of microbial engineering in single-cell protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 76: 102740.
- [54] Harun R, Singh M, Forde GM, Danquah MK. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14(3): 1037-1047.
- [55] Wang B, Lan CQ, Horsman M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology advances*, 2012, 30(4): 904-912.
- [56] Anupama, Ravindra P. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*, 2000, 18(6): 459-479.
- [57] Øverland M, Tauson AH, Shearer K, Skrede A. Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals. *Archives of Animal Nutrition*, 2010, 64(3): 171-189.
- [58] Strong PJ, Xie S, Clarke WP. Methane as a resource: can the methanotrophs add value?

- Environmental Science & Technology, 2015, 49(7): 4001-4018.
- [59] Wongputtisai P, Khanongnuch C, Kongbuntad W, Niamsup P, Lumyong S, Sarkar PK. Use of *Bacillus subtilis* isolates from Tua - nao towards nutritional improvement of soya bean hull for monogastric feed application. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 59(3): 328-333.
- [60] Khoshnevisan B, Tsapekos P, Zhang Y, Valverde-Pérez B, Angelidaki I. Urban biowaste valorization by coupling anaerobic digestion and single cell protein production. *Bioresource Technology*, 2019, 290: 121743.
- [61] Nasser AT, Rasoul-Amini S, Morowvat MH, Ghasemi Y. Single cell protein: Production and Process. *American Journal of Food Technology*, 2011, 6(2): 103-116.
- [62] Ugalde U, Castrillo J. Single cell proteins from fungi and yeasts. *Applied Mycology and Biotechnology*, 2002, 2: 123-149.
- [63] Bajpai P, Bajpai PK. Single cell protein production from rayon pulp mill waste by *Paecilomyces variotii*. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65(3): 349-351.
- [64] Johnson EA. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(2): 503-517.
- [65] Manilal VB, Narayanan CS, Balagopalan C. Cassava starch effluent treatment with concomitant SCP production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1991, 7(2): 185-190.
- [66] Zhao MX, Chi Z, Chi ZM, Madzak C. The simultaneous production of single-cell protein and a recombinant antibacterial peptide by expression of an antibacterial peptide gene in *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 2013, 48(2): 212-217.
- [67] Aggelopoulos T, Katsieris K, Bekatorou A, Pandey A, Banat IM, Koutinas AA. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chemistry*, 2014, 145: 710-716.
- [68] Thiviya P, Gamage A, Kapilan R, Merah O, Madhujith T. Single cell protein production using different fruit waste: A Review. *Separations*, 2022, 9(7): 178
- [69] Oliveira SD, Padilha CED, Asevedo EA, Pimentel VC, Araújo FR, Macedo GR, Santos ES. Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2017, 6(1): 937-944.
- [70] Bertasini D, Binati RL, Bolzonella D, Battista F. Single cell proteins production from food processing effluents and digestate. *Chemosphere*, 2022, 296: 134076.
- [71] Wiebe MG. Quorn™ Myco-protein - Overview of a successful fungal product. *Mycologist*, 2004, 18(1): 17-20.
- [72] Sadler M. Myco-protein: a new food. *Nutrition & Food Science*, 1983, 83(6): 5-6.
- [73] Whittaker JA, Johnson RI, Finnigan TJA, Avery SV, Dyer PS. The biotechnology of quorn mycoprotein: past, present and future challenges. *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*, 2020: 59-79.
- [74] Hames EE, Demir T. Microbial ribonucleases (RNases) : production and application

- potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(12): 1853-1862.
- [75] Marson GV, Lacour S, Hubinger MD, Belleville MP. Serial fractionation of spent brewer's yeast protein hydrolysate by ultrafiltration: a peptide-rich product with low RNA content. *Journal of Food Engineering*, 2022, 312: 110737.
- [76] Arous F, Frikha F, Triantaphyllidou IE, Aggelis G, Nasri M, Mechichi T. Potential utilization of agro-industrial wastewaters for lipid production by the oleaginous yeast *Debaryomyces etchellsii*. *Journal of Cleaner Production*, 2016, 133: 899-909.
- [77] Liu ZJ, Feist AM, Dragone G, Mussatto SI. Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 249: 119308.
- [78] Caporusso A, Capece A, De Bari I. Oleaginous yeasts as cell factories for the sustainable production of microbial lipids by the valorization of agri-food wastes. *Fermentation*, 2021, 7(2): 50.
- [79] Qadeer S, Khalid A, Mahmood S, Anjum M, Ahmad Z. Utilizing oleaginous bacteria and fungi for cleaner energy production. *Journal of Cleaner Production*, 2017, 168: 917-928.
- [80] Awad D, Bohnen F, Mehlmer N, Brueck T. Multi-factorial-guided media optimization for enhanced biomass and lipid formation by the oleaginous yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosus*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 54.
- [81] Abeln F, Chuck CJ. The role of temperature, pH and nutrition in process development of the unique oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2020, 95(4): 1163-1172.
- [82] Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(4): 1219-1227.
- [83] Quarterman J, Slininger PJ, Kurtzman CP, Thompson SR, Dien BS. A survey of yeast from the *Yarrowia* clade for lipid production in dilute acid pretreated lignocellulosic biomass hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(8): 3319-3334.
- [84] Jin MJ, Slininger PJ, Dien BS, Waghmode S, Moser BR, Orjuela A, Sousa LC, Balan V. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(1): 43-54.
- [85] Sitepu I, Selby T, Lin T, Zhu S, Boundy-Mills K. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, 41(7): 1061-1070.
- [86] Yu XC, Zeng JJ, Zheng YB, Chen SL. Effect of lignocellulose degradation products on microbial biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Process Biochemistry*, 2014, 49(3): 457-465.
- [87] Wang J, Gao QQ, Zhang HZ, Bao J. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. *Bioresource Technology*, 2016, 218: 892-901.
- [88] Uthandi S, Kaliyaperumal A, Srinivasan N, Thangavelu K, Muniraj IK, Zhan X, Gathergood N, Gupta VK. Microbial biodiesel production from lignocellulosic biomass: New insights and future challenges. *Critical Reviews in Environmental Science and*

- Technology, 2021, 52(12): 2197-2225.
- [89] Slininger PJ, Dien BS, Kurtzman CP, Moser BR, Bakota EL, Thompson SR, O'Bryan PJ, Cotta MA, Balan V, Jin M, Sousa LdC, Dale BE. Comparative lipid production by oleaginous yeasts in hydrolyzates of lignocellulosic biomass and process strategy for high titers. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(8): 1676-1690.
- [90] Cherubini F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 2010, 51(7): 1412-1421.
- [91] Sheng YQ, Lam SS, Wu YJ, Ge SB, Wu JL, Cai LP, Huang ZH, Le QV, Sonne C, Xia CL. Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: a review on influence of structural changes of lignin. *Bioresource Technology*, 2021, 324: 124631.
- [92] Kumari D, Singh R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 90: 877-891.
- [93] Masran R, Zanirun Z, Bahrin EK, Ibrahim MF, Lai Yee P, Abd-Aziz S. Harnessing the potential of ligninolytic enzymes for lignocellulosic biomass pretreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(12): 5231-5246.
- [94] McIntosh S, Vancov T. Enhanced enzyme saccharification of sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology*, 2010, 101(17): 6718-6727.
- [95] Zhang J, Wang XS, Chu DQ, He YQ, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4480-4488.
- [96] Kumar V, Yadav SK, Kumar J, Ahluwalia V. A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment. *Bioresource Technology*, 2020, 299: 122633.
- [97] Onaran G, Gürel L, Argun H. Detoxification of waste hand paper towel hydrolysate by activated carbon adsorption. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2020, 17(2): 799-808.
- [98] Hatano K, Aoyagi N, Miyakawa T, Tanokura M, Kubota K. Evaluation of nonionic adsorbent resins for removal of inhibitory compounds from corncob hydrolysate for ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, 2013, 149: 541-545.
- [99] Torre M, Martín-Sampedro R, Fillat Ú, Eugenio ME, Blázquez A, Hernández M, Arias ME, Ibarra D. Comparison of the efficiency of bacterial and fungal laccases in delignification and detoxification of steam-pretreated lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(11): 1561-1573.
- [100] Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2007, 1(2): 119-134.
- [101] Lopes AM, Ferreira Filho EX, Moreira LRS. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(3): 632-645.
- [102] Wang CG, Zhang XH, Liu Q, Zhang Q, Chen LG, Ma LL. A review of conversion of lignocellulose biomass to liquid transport fuels by integrated refining strategies. *Fuel*

- Processing Technology, 2020, 208: 106485.
- [103] Bozell JJ, Petersen GR. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates - the US department of energy's "top 10" revisited. *Green Chemistry*, 2010, 12: 539-554.
- [104] Nogueira CS, Padilha CEA, Santos E. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of green coconut fiber under high concentrations of ethylene oxide-based polymers. *Renewable Energy*, 2021, 163: 1536-1547.
- [105] Chen HZ FX. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 57: 468-478.
- [106] Lynd LR, Zyl WHV, Mcbride JE, Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(5): 577-583.
- [107] Zhu W, He Q, Gao H, Nitayavardhana S, Khanal SK, Xie L. Bioconversion of yellow wine wastes into microbial protein via mixed yeast-fungus cultures. *Bioresource Technology*, 2020, 299: 122565.
- [108] Jiang GZ, Hill DJ, Kowalczyk M, Johnston B, Adamus G, Irorere V, Radecka I. Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 1157.
- [109] Liu Q, Lu MP, Jin C, Hou WL, Zhao L, Bao J. Ultra-centrifugation force in adaptive evolution changes the cell structure of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* into a favorable space for lipid accumulation. *Biotechnology & Bioengineering*, 2022, 119(6): 1509-1521.
- [110] Hu ZM, Que YM, Gao YX, Yin YW, Zhao YF. Using black liquor from the soda pulping process for protein production by *Candida utilis*. *Bioresources*, 2015, 10(3): 3908-3921.
- [111] Zerva A, Savvides AL, Katsifas EA, Karagouni AD, Hatzinikolaou DG. Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing. *Bioresource Technology*, 2014, 162: 294-299.
- [112] Tian YJ, Li JZ, Meng J, Li JL. High-yield production of single-cell protein from starch processing wastewater using co-cultivation of yeasts. *Bioresource Technology*, 2023, 370: 128527.
- [113] Yang F, Jin Z, Nawaz M, Xiao Y, Jiang YP, Hu J, Li JJ, Gao MT. Oligosaccharides in straw hydrolysate could improve the production of single-cell protein with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2022, 102(7): 2928-2936.
- [114] Sani A, Savla N, Pandit S, Singh Mathuriya AS, Gupta P, Khanna N, Babu PR, Kumar S. Recent advances in bioelectricity generation through the simultaneous valorization of lignocellulosic biomass and wastewater treatment in microbial fuel cell. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 2021, 48: 101572.
- [115] Guleria A, Kumari G, Lima EC, Ashish DK, Thakur V, Singh K. Removal of inorganic toxic contaminants from wastewater using sustainable biomass: A review. *Science of The Total Environment*, 2022, 823: 153689.
- [116] Liu G, Bao J. Evaluation of electricity generation from lignin residue and biogas in cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 1232-1236.

- [117] Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2007(2): 875-877.
- [118] Liu G, Xu ZN, Cen PL. Morphologically structured model for mycelial growth and secondary metabolite formation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2000, 8: 46-51.
- [119] Zhang Y, Bao J. Tolerance of *Trichosporon cutaneum* to lignin derived phenolic aldehydes facilitate the cell growth and cellulosic lipid accumulation. *Journal of Biotechnology*, 2022, 343: 32-37.
- [120] Sun LH, Shao S, Bao J. Microbial lipid fermentation of *Trichosporon cutaneum* in high saline water. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1): 71.
- [121] Huang C, Chen XF, Xiong L, Chen XD, Ma LL. Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 711-714.
- [122] Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, Franzosi G, Bianchi D, Compagno C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*, 2012, 111: 398-403.
- [123] Ruan ZH, Zanotti M, Wang XQ, Ducey C, Liu Y. Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 110: 198-205.
- [124] Gong ZW, Shen HW, Yang XB, Wang Q, Xie HB, Zhao ZK. Lipid production from corn stover by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 158.
- [125] Chen XF, Huang C, Yang XY, Xiong L, Chen XD, Ma LL. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 18-24.
- [126] Nunes AJP, Sá MVC, Browdy CL, Vazquez-Anon M. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. *Aquaculture*, 2014, 431: 20-27.
- [127] Daskalaki A, Perdikouli N, Aggeli D, Aggelis G. Laboratory evolution strategies for improving lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(20): 8585-8596.

致谢

光阴荏苒，日月如流，二十年学生生涯仅剩最后三十天。回看研究生三年，实验山重水复多，柳暗花明少，虽然只得到一堆“破烂”结果，但很庆幸最后能够按时毕业。读研期间，我取得的每一点儿进步都离不开师长们的帮助。

感谢鲍杰老师在学术道路上对我的指导与谆谆教诲，老师开阔的学术思维、严谨的科研态度和勤奋踏实的工作作风也是我终生学习的榜样。

感谢张斌老师对我实验方案的指导与论文及其它方面的帮助。

感谢刘祺师姐从研一开始就很有耐心的指导我修改 PPT、教我做实验。感谢张翼、徐迎迎、何妮玲、王雅、韩涛以及一些已毕业的师兄师姐们的帮助。感谢同届李治斌、郭晓梦、杨虎成的帮助。感谢张凌霄、刘娇、韩庆美、武师南、韩莹、陈峙苇以及研一的师弟师妹们的帮助。

感谢我的家人和女朋友一如既往地支持。感谢我远方朋友们的云陪伴。祝以上所有人幸福安康、万事胜意，前路漫漫，希望大家活得开心，过得愉快。

学术成果

Coproduction of single cell protein (SCP) and lipid from lignocellulose derived carbohydrates and inorganic ammonia salt with soluble ammonia recycling. **Bioresource Technology**.

(Under review)

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 柒拾柒 页

立卷人 _____

检查人 _____

立卷时间 _____