

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 硕士学位论文

圆红冬孢酵母利用粗甘油产微生物油脂的研究

王新茹

指导教师姓名:

鲍杰 教授

张斌 特聘副研究员

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物与医药

论文定稿日期: 2025.06.05 论文答辩日期: 2025.06.05

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

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_____ (选择以下一项)方式,转交或不转交图书馆,并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

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

学位论文作者签名:

年 月 日

指导教师签名:

年 月 日

国家技术转移中心负责人签名:

(公章)

年 月 日

作 者 声 明

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

论文作者签名：

年 月 日

圆红冬孢酵母利用粗甘油产微生物油脂的研究

摘要

微生物油脂 (microbial lipids) 通常是由产油微生物利用底物合成并存储在细胞内部的甘油三酯。油脂原料通过酯交换反应转化为生物柴油, 同时产生粗甘油作为副产物, 每有 10 吨生物柴油生成就会产生 1 吨粗甘油。粗甘油中含有多种杂质, 如少量甲醇、肥皂、甘油三酯、脂肪酸和无机盐等。多种杂质会导致粗甘油再精炼难度大、经济效益低, 而且难以被绿色无公害化处理。利用产油微生物将粗甘油重整成油脂原料并用于生物柴油的生产是处理粗甘油的佳方式之一。圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*) 能够利用多种碳源生产微生物油脂, 其不仅能利用粗甘油中的甘油和脂肪酸甲酯, 而且对粗甘油中的多种杂质有较好耐受性, 可以作为直接利用粗甘油产微生物油脂的细胞工厂。本论文首先对圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 积累油脂的能力进行提高。采用实验室已经建立的超离心力胁迫适应性进化方法, 有效提高了圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 利用葡萄糖积累油脂的能力。进一步将上述方法扩展并用于提高圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 利用粗甘油发酵积累油脂的能力, 并对最终获得的进化菌株进行细胞表征并进行发酵验证。

本论文第一部分在葡萄糖为碳源条件下, 对圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 进行了超离心力适应性进化改造, 用于提高圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 的油脂含量。本实验室前期研究所建立的超离心力适应性进化方法, 可基于细胞密度差异快速筛选并富集油脂含量高的突变细胞。对圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 开展的超离心力适应性进化, 共进行了 36 次转接(216 天), 离心力逐次提升至 53,000 g (离心机最高转速)。菌株的油脂含量从 47% 提升至 80%。进化菌株较原始菌株细胞体积增大, 细胞增殖速度变慢, 细胞壁所含葡聚糖、甘露聚糖和几丁质含量均降低, 乙酰辅酶 A 和 NADPH 的含量增加。转录组学分析表明, 进化菌株糖代谢和脂肪酸代谢相关的部分基因相比原始菌株显著上调, 这有利于油脂的大量积累。

本论文第二部分在粗甘油为碳源条件下, 对圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 进行了超离心力适应性进化改造, 用于提高菌株利用粗甘油积累微生物油脂的能力。超离心力适应性进化共进行了 33 次传代 (共 200 天), 离心力逐次提升至 53,000 g。将最终分离获得的圆红冬孢酵母进化菌株命名为 *R. toruloides* XR20。以粗甘油为原料进行发酵, 与原始菌株相比, 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 的油脂含量为 63.6%, 提高近 2 倍; 摇瓶发酵中油脂产量从 4.5 g/L 至 19.8 g/L, 提高了 3.4 倍。圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20

体积较原始菌株增大约 3.6 倍，细胞壁所含葡聚糖、甘露聚糖和几丁质含量均降低，胞内 NADPH 和乙酰辅酶 A 的含量均增加。糖代谢和脂肪酸合成相关的许多基因的转录水平上升，乙酰辅酶 A 及 NADPH 合成相关基因在 *R. toruloides* XR20 利用粗甘油产油途径中显著提升。对菌株 *R. toruloides* XR20 产油脂的粗甘油培养基进行单因素优化（摇瓶发酵），菌株在 C/N 为 100、初始粗甘油浓度为 95 g/L（含有甘油约 80 g/L）、有机氮与无机氮比例（玉米浆干粉/硫酸铵）为 0.25、 KH_2PO_4 浓度为 2.0 g/L 时能够更利于该菌株油脂的生产。在 3 L 发酵罐的分批发酵中，圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 可生产 24.5 g/L 油脂，较原始菌株提升 40.8%；在分批补料发酵中，圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 消耗粗甘油 234.0 g/L，产出 42.56 g/L 油脂，油脂含量为 74.9%，油脂得率为 0.182 g/g，油脂产率为 0.161 g/L/h。

综上所述，本文通过超离心力适应性进化提升圆红冬孢酵母利用粗甘油产微生物油脂的能力，进化菌株的油脂含量和产量显著提高。通过优化发酵条件和发酵方式，进一步提升了菌株的油脂产量。本文所获得的利用粗甘油产微生物油脂的菌株，能够将生物柴油副产物通过微生物发酵的方式重整为油脂原料用于生物柴油生产，有助于生物柴油产业的可持续发展。

关键词：圆红冬孢酵母；超离心力适应性进化；微生物油脂；粗甘油

Production of Microbial Lipids by *Rhodospiridium toruloides* Utilizing Crude Glycerol

Abstract

Microbial lipids are typically triglycerides synthesized by oleaginous microorganisms using various substrates and stored intracellularly. Lipid feedstocks are converted into biodiesel through transesterification reactions, with crude glycerol generated as a byproduct at a ratio of approximately 1 ton of crude glycerol for every 10 tons of biodiesel produced. Crude glycerol contains a variety of impurities, such as small amounts of methanol, soap, triglycerides, fatty acids, and inorganic salts. These impurities make the re-refining of crude glycerol challenging, resulting in low economic value and difficulties in environmentally friendly processing. Utilizing microorganisms to convert crude glycerol into lipid feedstocks for biodiesel production is one of the most effective approaches for managing crude glycerol. *Rhodospiridium toruloides* is capable of producing microbial lipids from multiple carbon sources. This study initially focused on enhancing the lipid accumulation capacity of *Rhodospiridium toruloides* CGMCC 2.1389. Employing the established ultracentrifugation-based adaptive laboratory evolution (UC-ALE) method under hyperosmotic stress, the lipid accumulation capability of *R. toruloides* CGMCC 2.1389 utilizing glucose was significantly enhanced. This UC-ALE strategy was further extended to enhance lipid biosynthesis during fermentation using crude glycerol as the carbon source. The evolved strains obtained through this approach were subjected to comprehensive cellular characterization and fermentation validation to evaluate their phenotypic and metabolic performance.

In the first part of this study, ultracentrifugation-adaptive evolution was performed on *R. toruloides* CGMCC 2.1389 using glucose as the carbon source to enhance its lipid accumulation capacity. *R. toruloides* CGMCC 2.1389 was subjected to UC-ALE under glucose conditions through 36 passages (216 days) with incremental centrifugal forces up to 53,000 $\times g$. The evolved strain achieved 80% lipid content, representing a substantial improvement over the original strain (47%). Phenotypic analysis revealed enlarged cell morphology, reduced cell wall components (glucan, mannan, and chitin), and elevated intracellular acetyl-CoA and NADPH levels. Transcriptomic profiling demonstrated significant upregulation of genes associated with carbohydrate metabolism and lipid biosynthesis pathways.

Building on the success of the first part, the second part of this research focused on implementing ultracentrifugation-adaptive evolution strategies on the same strain under crude glycerol conditions, aiming to improve its ability to utilize this low-cost substrate for microbial lipid production. *R. toruloides* CGMCC 2.1389 was subjected to UC-ALE under crude glycerol

through 33 passages (200 days) with incremental centrifugal forces up to 53,000 $\times g$. The evolved strain *R. toruloides* XR20 exhibited 63.6% lipid content (2-fold increase) and produced 19.8 g/L lipids in shake-flask fermentation, 3.4 times higher than the parental strain. Enhanced metabolic performance was attributed to increased NADPH and acetyl-CoA availability, as well as upregulated genes involved in glycerol assimilation and lipogenesis. Medium optimization identified optimal conditions as C/N ratio 100, 95 g/L crude glycerol (80 g/L pure glycerol), organic/inorganic nitrogen (corn syrup dry powder/(NH₄)₂SO₄) ratio 0.25, and 2.0 g/L KH₂PO₄. Scale-up in 3 L bioreactors resulted in 24.5 g/L lipid production (40.8% increase) in batch fermentation and 42.56 g/L in fed-batch mode, with 74.9% lipid content and a yield of 0.182 g/g.

In summary, this study enhances the ability of *Rhodospiridium toruloides* to produce microbial lipids from crude glycerol through UC-ALE, with significant increases in lipid content and yield of the evolved strains. By optimizing fermentation conditions and strategies, further improvements in lipid yield were realized. The obtained strains capable of producing microbial lipids from crude glycerol can convert biodiesel byproducts into lipid feedstocks for biodiesel production through microbial fermentation, contributing to the sustainable development of the biodiesel industry.

Keywords: *Rhodospiridium toruloides*; Ultracentrifugation-Adaptive Laboratory Evolution; Microbial Lipids; Crude Glycerol

目录

第 1 章 文献综述	1
1.1 前言	1
1.2 粗甘油在微生物油脂生产中的应用	1
1.2.1 粗甘油的来源与特性	1
1.2.2 粗甘油的利用情况	2
1.2.3 利用粗甘油产微生物油脂的相关研究	3
1.3 圆红冬孢酵母的研究进展	5
1.3.1 油脂合成机制	5
1.3.2 油脂合成的影响因素	5
1.3.3 油脂产量与品质	6
1.3.4 油脂产量提升的策略	6
1.3.5 圆红冬孢酵母的特性及其在粗甘油产油脂生产中的优势	8
1.4 超离心力适应性进化提升产油酵母的油脂含量	8
1.4.1 超离心力进化的原理	8
1.4.2 超离心力适应性进化的应用案例	9
1.5 本文立题依据及主要研究内容	9
第 2 章 验证圆红冬孢酵母通过超离心力适应性进化下使油脂含量提升	11
2.1 引言	11
2.2 材料与方法	11
2.2.1 菌株和培养基	11
2.2.2 细胞形态观察	12
2.2.3 菌体生长、菌液糖浓度、油脂含量和产量测定	12
2.2.4 细胞壁组分检测	13
2.2.5 细胞世代检测和细胞体积、表面积计算	13
2.2.6 胞内乙酰辅酶 A 及 NADPH 含量检测	14
2.2.7 细胞转录组测序	14
2.3 结果与讨论	15
2.3.1 超离心力适应性进化获得的圆红冬孢酵母突变菌株及性状稳定性鉴定	15
2.3.2 圆红冬孢酵母细胞形态的相关分析	17

2.3.3 圆红冬孢酵母的细胞表征.....	18
2.3.4 圆红冬孢酵母胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量分析.....	19
2.3.5 圆红冬孢酵母转录情况分析.....	20
2.4 本章小结.....	22
第 3 章 圆红冬孢酵母利用粗甘油生产微生物油脂.....	23
3.1 引言.....	23
3.2 材料与方法.....	23
3.2.1 粗甘油来源和成分.....	23
3.2.2 菌种及培养基.....	23
3.2.3 细胞表征相关实验.....	24
3.2.4 细胞产油相关参数计算.....	24
3.2.5 RT-qPCR.....	25
3.2.6 分批发酵和补料分批发酵.....	25
3.3 结果与讨论.....	25
3.3.1 圆红冬孢酵母利用粗甘油产油脂的可行性.....	25
3.3.2 超离心力适应性进化提升圆红冬孢酵母利用粗甘油产油脂的能力.....	27
3.3.3 超离心力适应性进化获得突变圆红冬孢酵母 <i>R. toruloides</i> XR20 的细胞表征.....	28
3.3.4 圆红冬孢酵母 <i>R. toruloides</i> XR20 生长和产油代谢相关基因转录水平分析.....	30
3.3.5 圆红冬孢酵母 <i>R. toruloides</i> XR20 摇瓶发酵优化发酵条件.....	32
3.3.6 分批发酵评价圆红冬孢酵母 <i>R. toruloides</i> XR20 产油脂能力.....	35
3.3.7 分批补料发酵提升圆红冬孢酵母 <i>R. toruloides</i> XR20 油脂产量.....	37
3.4 本章小结.....	38
第 4 章 结论与展望.....	40
4.1 结论及创新点.....	40
4.2 展望.....	41
参考文献.....	42
致谢.....	50
学术成果.....	51
附录 I.....	52

第1章 文献综述

1.1 前言

近年来,随着科技的不断进步,能源的需求和利用量持续攀升。目前广泛使用的仍然是生产技术成熟且成本较低的化石燃料^[1]。然而,化石燃料燃烧时会释放大量温室气体和有害气体^[2,3],对环境危害极大^[4],亟待寻找其他可再生的清洁能源替代化石燃料^[5,6]。

目前,常见的清洁能源包括太阳能、风能、水能、地热能等^[7],但都存在早期设备搭建造价高、易受气候影响等问题。生物质能作为一种可再生的清洁能源,能很好地缓解化石能源不足、环境污染大等问题^[8,9],近些年被大力研究和应用。生物柴油是最有希望代替化石燃料的能源^[10],其燃烧时释放的温室气体和有毒气体较少^[11],与传统燃料的兼容性较好,是代替化石燃料的理想可再生能源^[12]。

生物柴油的主要生产路线是以油脂原料进行酯交换。粗甘油是生物柴油生产过程中的副产品^[13],粗甘油因其粘度过高,杂质种类较多,再精炼难度大,故寻找其他的处理或利用方式尤为重要。直接提纯粗甘油对工艺流程和效率要求较高^[14],且通常成本难以降低;相比之下,将粗甘油直接转化为其他高附加值产物则有较好的应用前景。微生物能利用多种底物,对生长环境的要求较低,若利用微生物直接处理利用粗甘油,解决工业排放问题的同时,还可以利用微生物产出其他产物,有利于实现资源的再利用。产油酵母能以粗甘油中甘油为碳源,生产出微生物油脂并再度用于生产生物柴油的过程早有研究^[15,16]。在相关研究中存在粗甘油利用率低和油脂产量较低的缺点,所以寻找简单高效方法提升其利用粗甘油生产微生物油脂的效率是非常有必要的。

1.2 粗甘油在微生物油脂生产中的应用

1.2.1 粗甘油的来源与特性

生物柴油无毒且可以生物降解,与传统柴油有良好的兼容性,是代替化石燃料的理想可再生清洁燃料^[17]。生物柴油生产及产生副产物粗甘油的流程如图 1.1 所示^[18,19],生物柴油的主要制备流程包括原料的预处理、酯交换反应、分离及精制等步骤。生产原料通常为植物油脂、动物脂肪或废弃油脂(如地沟油)^[20],需先进行过滤、脱水等预处理得到纯油脂,再经过酯交换反应,将油脂与甲醇在催化剂(通常是 NaOH)作用下进行反应,得到生物柴油和副产物粗甘油^[21],将粗甘油分离后,洗涤精制生物柴油就可得到成品生物柴油^[22]。生物柴油的生产中会产生大量副产物粗甘油,每生成十吨生物柴油就会产生一吨粗甘油^[23]。粗甘油中含有多种杂质,直接排放会对环境造成很大污染,还会造成极大的资源浪费。因

此，将粗甘油再生产成其他高附加值产物十分有必要。

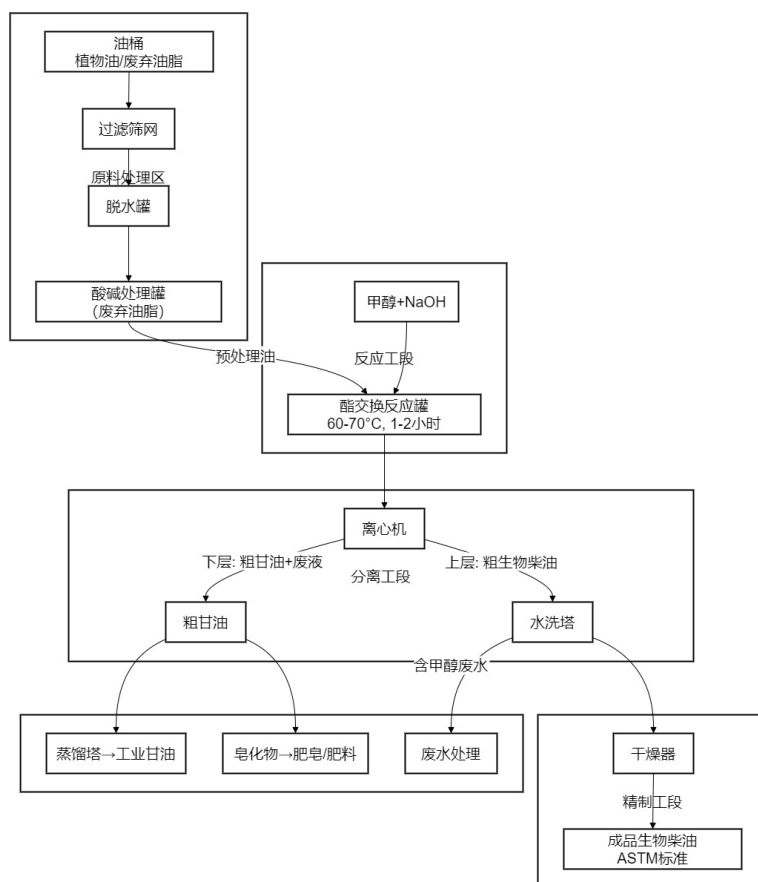


图 1.1 生物柴油的制备过程^[18, 19]

Fig. 1.1 Preparation process of biodiesel

1.2.2 粗甘油的利用情况

粗甘油中甘油含量约占 80%，故粗甘油具有粘度高、流动性差等特点，难以通过管道进行运输和排放。粗甘油中还含有甲醇、肥皂、甘油三酯、脂肪酸和无机盐等杂质，使其纯化困难^[24]。但是将粗甘油直接废弃会造成资源浪费和环境污染，所以如何对其再度利用成为十分重要的问题。已有报道提出多个对粗甘油的处理方案，如可以直接用活性炭吸附粗甘油中的杂质^[25]，或化学纯化^[13, 26]获得纯度较高的纯甘油，还可以利用热化学转化法将粗甘油转化为固、液、气体燃料等^[27]。但是，现有的多种粗甘油处理方法，例如化学处理、热处理、膜技术、离子交换色谱和吸附等，都存在成本较高或效率较低的问题^[28]。上述问题可以通过利用更高效的催化剂来降本增效，但技术开发成本通常过高，相比之下，直接利用粗甘油并生产其他高附加值产物更有工业价值^[29]。

环境微生物环境适应能力强，能耐受生长环境中多种抑制物并可以进行大规模高密度

培养^[30]，所以用微生物处理粗甘油是合适的方法。目前，自然界中多种微生物都能利用粗甘油生长并生产代谢产物，现有相关研究中，柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)^[31]及克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)^[32]利用粗甘油可生产 1,3 丙二醇 (1,3-PDO)；巴氏梭菌 (*Clostridium pasteurianum*) 可生产丁醇和 1,3-PDO^[33]；米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 可生产 L-乳酸^[34]；毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 可生产 α -淀粉酶^[35]；解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 可生产柠檬酸和油脂^[36,37]；以及圆红冬孢酵母 (*Rhodotorula toruloides*) 可生产微生物油脂^[38]等。

在粗甘油的多个利用方案中，由于粗甘油中存在大量无法利用的杂质，利用菌株生产胞外产物会造成下游分离提取的负担。而利用产油微生物生产胞内油脂，有利于产品的分离和加工。由粗甘油转化的微生物油脂再度用于生产生物柴油，可以实现生物柴油生产过程中低排放，进而提高能量利用率，故利用产油微生物生产微生物油脂是粗甘油的最佳利用方式之一。

1.2.3 利用粗甘油产微生物油脂的相关研究

产油微生物通常被定义为胞内油脂含量超过 20%的微生物，包括微藻^[39]、霉菌^[40]及酵母^[41]等。产油微藻是一种能进行光合作用的自养丝状或单细胞的藻类^[42]，通常能积累占自身干重 20%-40%的油脂^[43,44]，主要生产包括二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)在内的多不饱和脂肪酸^[45,46]，其产物有较高的利用价值^[47]。常见的产油微藻包括蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 和莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 等，虽然培养藻类需要的营养物质较少，但是难以进行高密度培养，还容易因为环境影响导致生长较差，较难工业应用。

产油霉菌是一种可利用多种碳源和氮源的丝状真菌，培养时不易染菌，可天然合成包括 EPA、 γ -亚麻酸 (GLA)、花生四烯酸 (ARA) 在内的多不饱和脂肪酸^[48]。常见的产油霉菌包括高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)^[49]、长被孢霉 (*Mortierella elongata*)、卷枝毛霉 (*Mucor circinelloides*)^[50]和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)^[51]等，但是霉菌的细胞形态较多，不同营养环境可能会导致霉菌处于不同的细胞形态，而且每个形态的产油能力不同，难以精准进行控制故导致产量不稳定。

产油酵母是一种能利用包括葡萄糖、甘油和木糖等多种底物^[52]，油脂产量高^[53]，生长周期较短的真菌，能适应多种复杂环境。常见的产油酵母包括皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、圆红冬孢酵母 (*Rhodotorula toruloides*) 和黏红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 等。限制产油酵母的营养条件 (磷、氮或硫元素) 可以提升其油脂含量及产量^[54,55]，使油脂含量最高能占到细胞干重的 80%左右^[56]。另外，产油酵

母发酵技术成熟，能在工业发酵设备中高密度培养^[57]，有利于工业生产多种产物。多种产油酵母都有合适的基因操作系统^[58]，可以通过代谢工程改造提升产油酵母的产油性能，所以目前研究中对产油酵母利用粗甘油产微生物油脂的报道较多。

粗甘油中含有的大量甘油可以作为产油酵母的碳源，但粗甘油中还含有甲醇、肥皂、脂肪酸甲酯和无机盐等杂质，可能会通过干扰细胞膜的合成、影响细胞的代谢途径或者是影响细胞对氧的传递效率等多种方式对菌株的生长和代谢进行抑制^[59]。所以，用天然就能耐受粗甘油中杂质的产油酵母进行微生物油脂生产十分重要^[60]，再通过对菌株培养条件的适当调整，提升其油脂产量，就能绿色可持续性地消耗粗甘油并获得微生物油脂。

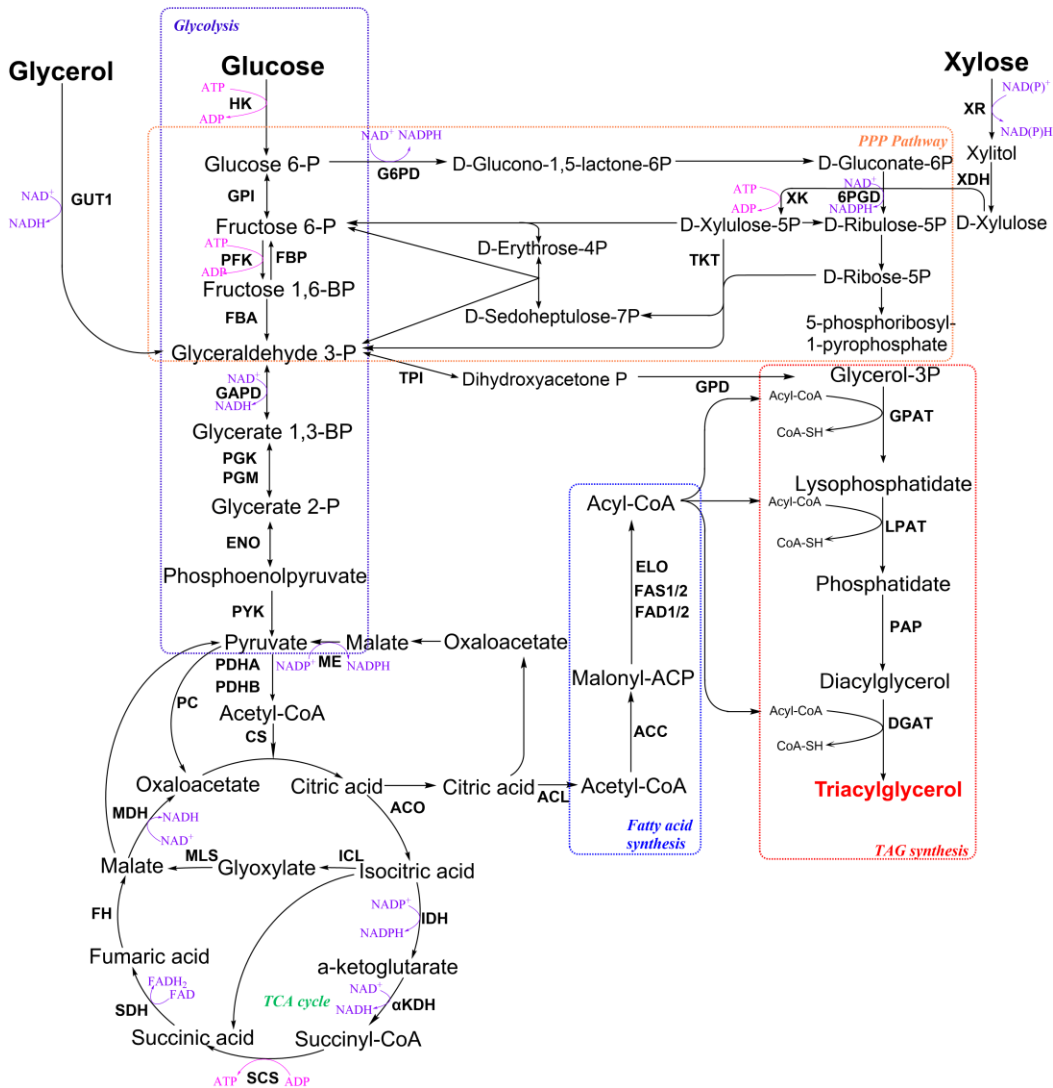


图 1.2 圆红冬孢酵母利用不同碳源产油脂的代谢路径^[64-66]

Fig. 1.2 Metabolic pathways of *Rhodotorula toruloides* utilizing different carbon sources for lipid production.

1.3 圆红冬孢酵母的研究进展

圆红冬孢酵母 (*Rhodotorula toruloides*) 是一种油脂积累能力非常强的产油酵母, 其油脂含量通常可达到 70%以上。该酵母可以利用包括粗甘油、木质纤维素、糖蜜等多种底物及廉价氮源, 还能在低 pH 条件下生长, 有较好的环境适应能力。圆红冬孢酵母生产的微生物油脂多不饱和脂肪酸含量较高, 有良好的类胡萝卜素生产能力, 还有可供操作的基因操作系统^[61], 故该菌株常用于生产多种高附加值产品。另外, 圆红冬孢酵母已测得全基因组序列, 已有合适的基因编辑的系统, 可以通过代谢工程改造进行油脂生产性能的优化^[62]。

1.3.1 油脂合成机制

圆红冬孢酵母利用多种底物生产微生物油脂时, 底物在胞内代谢为乙酰辅酶 A, 作为细胞能量供应和代谢产物的关键中间体。乙酰辅酶 A 是微生物油脂的前体^[63], 通过脂肪酸合酶 (FAS) 将乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 合成脂肪酸, 再通过甘油三酯合成途径 (TAG) 生成甘油三酯, 即为微生物油脂的主要组成部分。圆红冬孢酵母利用甘油、葡萄糖和木糖的相关代谢路径如图 1.2 所示^[64-66]。

1.3.2 油脂合成的影响因素

不同碳源对圆红冬孢酵母的生长和产油具有不同的影响。以葡萄糖为碳源时, 葡萄糖可以被圆红冬孢酵母快速吸收利用, 对菌株生长繁殖有较好的促进作用。但是葡萄糖代谢产生的 NADH 无法直接转化为 NADPH 进入脂质代谢, 所以对脂质代谢有一定的抑制作用。当圆红冬孢酵母以甘油为碳源时, 菌株进行甘油代谢产生的乙酰辅酶 A 能被直接用于脂肪酸合成并提高油脂生产效率。

圆红冬孢酵母与其他产油酵母一样, 当培养基中碳源充足而其他营养元素耗尽 (如氮元素) 时, 细胞的生长繁殖受到影响, 合成蛋白和核酸的能力下降。同时, 因为氮源缺少, 激活氮供应机制, 促进细胞将 AMP 转化成 IMP 和氨, 导致 AMP 含量减少, 使得需要 AMP 才能发挥作用的异柠檬酸脱氢酶 (ICDH) 受到抑制, 无法将异柠檬酸转化为 α -酮戊二酸, 从而使 TCA 循环受阻, 积累大量的柠檬酸和异柠檬酸^[67]。过量的柠檬酸经柠檬酸转运系统, 裂解为乙酰辅酶 A 和草酰乙酸进入细胞质, 同时提供还原力 (NADPH) ^[68]。乙酰辅酶 A 和 NADPH 为脂质合成的前体和还原力, 最终使得甘油三酯合成增多, 表现为油脂含量增多^[69]。据报道, 磷和硫元素的不足对圆红冬孢酵母产油脂也有促进作用^[70]。

粗甘油中的不同杂质对圆红冬孢酵母的影响不同, 甲醇对菌株的生长和产油有抑制作用, 肥皂、灰分、脂肪酸甲酯和无机盐等杂质对菌株生长均有益。综合来说, 粗甘油整体对菌株的促进作用强于抑制作用^[71]。除了上述粗甘油中杂质对圆红冬孢酵母产油有影响,

改变发酵条件（如 pH、温度、通气量等）对菌株合成油脂也有促进作用。

1.3.3 油脂产量与品质

在利用粗甘油生产微生物油脂的过程中，因为菌株能够耐受的粗甘油浓度是有限的，故产油酵母的油脂产量能够反映菌株对粗甘油的利用情况。目前有很多能够利用粗甘油产微生物油脂的红酵母属菌株，如表 1.1 所示，其中，胶红酵母（*Rhodotorula mucilaginosa*）、圆红酵母（*Rhodotorula toruloides*）、粘红酵母（*Rhodotorula glutinis*）等红酵母均有较好的产油性能，上述菌株利用粗甘油生产微生物油脂的油脂含量最高可达到 80%左右^[72]，生物量也可以最高达到 40 g/L^[70]以上，是目前以粗甘油为底物生产微生物油脂的优良生产菌株。但是，即使是同一种菌株，不同培养条件下其生长情况和油脂产量也有差别，说明菌株利用粗甘油的产油脂的潜能可能未被完全开发，在提升能量利用和生产效率上，还有很大空间。

圆红冬孢酵母与其他红酵母属的产油酵母一样，生产的微生物油脂脂肪酸组成多为 C₁₄-C₁₈ 的多饱和或不饱和脂肪酸，以油酸和亚油酸为主^[73]。提升高不饱和脂肪酸的含量能有效提高后续生产出的生物柴油的燃烧热值，使其更接近石油柴油，还能在常温下保持较好的流动性，从而更易于储存和运输。

1.3.4 油脂产量提升的策略

为将产油酵母利用粗甘油产微生物油脂的技术投入工业生产，提升产油酵母的油脂产量是至关重要的，这能有效降低生产成本并提高底物利用率。针对圆红冬孢酵母（*Rhodospiridium toruloides*）产油脂性能的强化，目前主要采用优化发酵条件（如碳源类型、溶氧水平及 pH 调控）、代谢工程靶向改造脂质合成关键基因以及适应性实验室进化等策略。

发酵工艺优化是工业上降本增效的常用方法，能提升多种微生物的生产性能。常见的发酵条件优化是对发酵的相关参数进行调整，不断优化多个发酵参数，将条件叠加最终获得更高的产量。发酵方式的常规方式是分批发酵和分批补料发酵，分批发酵可以将物料和菌株一次性加入发酵罐，这种发酵方式更不容易染菌，能获得稳定的产量；分批补料发酵可以往体系中源源不断加入新鲜培养基，始终维持合适的底物浓度，能获得更高密度的培养菌株，还能减少清洗发酵罐次数，获得更多的产物。此外，还可以通过两阶段发酵提升微生物油脂产量，该方法在培养前期保证菌株大量生长，后期调整培养条件使得菌株所处环境有利于生产代谢产物，是促进产物产生的有效方式^[25, 87, 88]。

表 1.1 相关红酵母利用粗甘油产油脂情况

Table 1.1 Lipid production by *Rhodotorula* species using crude glycerol

Strain	Culture mode	Biomass	Lipid content (%)	Lipid titer (g/L)	References
<i>R. toruloides</i> 32489	Batch (flasks)	49.52	21.32	10.56	[70]
<i>R. toruloides</i> CBS 14	Batch (flasks)	19.1	46.125	8.81	[74]
<i>R. glutinis</i> NRRL YB252	Batch (flasks)	9.8	40.85	4.0	[75]
<i>R. babjevae</i> 05775	Batch (flasks)	14.1	50.3	7.1	[76]
<i>R. toruloides</i> AS 2.1389	Batch	26.7	70	18.5	[77]
<i>R. mucilagenosa</i> IIP32	Batch	20	28	5.6	[78]
<i>R. graminis</i> DBVPG 4620	Batch	16.25	53	8.61	[79]
<i>R. glutinis</i> BCRC 22360	Batch	14.8	36.5	5.4	[80]
<i>R. mucilagenosa</i> CCT 7688	Fed-batch (flasks)	21	51	10.72	[81]
<i>R. glutinis</i> CICC 31596	Fed-batch two-stage	30.63	53.15	16.28	[82]
<i>R. fluvialis</i> DMKURK253	Fed-batch two-stage	39.14	79.42	27.81	[72]
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	Fed-batch	37.4	51.3	19.2	[83]
<i>R. toruloides</i> Y4	Fed-batch	31.1	41.7	13	[84]
<i>R. paludigena</i> CM33	Fed-batch	46.32	37.65	17.439	[85]
<i>R. glutinis</i> BCRC 21418	Fed-batch	46.4	62.2	28.86	[86]

代谢工程改造菌株是将目标产物相关酶的基因过表达或是抑制副产物相关基因的表达,使得碳通量更多地流向产物产生的方向,并获得更多的产物。已知报道中,圆红冬孢酵母的全基因组已测序完成^[89],也有可供分子操作的基因操作系统^[62],能够进行相关的基因改造^[90]。为使圆红冬孢酵母油脂产量提升,可通过代谢工程改造提高菌株的糖代谢或是产油相关途径的基因表达来提升菌株的产油能力,如可以过表达 $\Delta 12$ -脂肪酸去饱和酶,用于提高油脂中亚麻酸的含量^[73],;也可以过表达 *VHb* 基因,增强细胞内氧气的利用效率,从而促进细胞生长和所需代谢物的产生,从而促进油脂生产^[91]。这些研究表明,通过代谢工程手段,可以有效提高圆红冬孢酵母的油脂产量和品质。

适应性进化(Adaptive Laboratory Evolution, ALE)是一种在特定环境压力下连续培养菌株,使菌株完成自然进化并富集目标突变,从而实现微生物性状改变的过程^[92, 93]。通过适应性进化刺激菌株突变并筛选目标性状,再利用多组学技术联合分析基因和转录水平,就

可以了解目标性状相关的突变位点的情况，该方法通常用于提升微生物的底物利用率，某种杂质的耐受性，或是提升某种产物的产率等^[94]。如在粗甘油上进行了 520 代的解脂耶氏酵母适应性进化，与亲本菌株相比较，进化菌株的脂质含量增加约了 1.1 至 1.6 倍^[95]，皮状丝孢酵母经过超离心力适应性进化使细胞体积增大并大幅提升其油脂积累能力^[96]；枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* J46 在含半乳糖的培养基中连续适应性进化 5000 代提升其利用半乳糖的能力^[97]。

上述提升菌株产油性能的方法中，优化发酵方式对菌株产量的提升有限，代谢工程改造菌株会耗费很多时间和材料，而适应性进化的方法通常简单高效，只需选择合适的刺激和筛选方法就能更方便地获得有利突变的细胞，是提升菌株产量更有益方法。

1.3.5 圆红冬孢酵母的特性及其在粗甘油产油脂生产中的优势

圆红冬孢酵母是一种只有酵母形态的菌株，与解脂耶氏酵母和皮状丝孢酵母等同时存在酵母态和菌丝态的产油酵母相比，其在不同生长环境下的稳定性更强，且不容易因细胞形态的差异而导致产量不稳定^[38]。此外，圆红冬孢酵母的野生菌株的油脂含量就能达到 70% 以上。圆红冬孢酵母生长时不会产生酸性副产物，培养过程中 pH 几乎不会变化，还能在一定程度上耐受酸性环境，能利用发酵设备进行高密度培养，而且已有研究证明该菌株对粗甘油中多种杂质的耐受性良好，还能很好地利用粗甘油中甘油，对粗甘油中的少量脂肪酸甲酯也能被作为碳源吸收代谢并进一步提升油脂产量^[98]，是非常理想的利用粗甘油产微生物油脂的菌株。目前关于圆红冬孢酵母利用粗甘油产油脂的研究里，用于提升菌株产油能力的方法大多提升程度有限，无法高效提升油脂产量，所以如果能通过合适有效的方法快速提升菌株的生长和产油能力，将大大降低粗甘油产微生物油脂的成本，从而更有可能将该技术投入工业生产，保护环境的同时还加快了能量循环速度。

1.4 超离心力适应性进化提升产油酵母的油脂含量

1.4.1 超离心力进化的原理

离心力作为一种机械应力，可诱导酵母细胞通过信号转导机制将离心力刺激转化为胞内生化信号，进而触发生理生化响应（如调控细胞周期进程及重塑细胞壁结构等）^[99]。基于此特性，超离心力适应性进化技术通过施加高强度离心力实现双重作用：一方面，高机械力环境驱动细胞发生适应性突变以应对外界压力^[100,101]；另一方面，基于细胞密度差异的离心沉降特性，低密度、高油脂含量的细胞因浮力优势优先富集于上清相，而高密度细胞则沉降于管底，从而实现目标表型的高效分选。其核心筛选原理在于，细胞内累积的脂质

因密度显著低于水相介质，故油脂含量与细胞密度呈负相关性^[96]。在离心过程中，低密度细胞向离心管顶端迁移并形成可见聚集层，通过梯度取样即可定向获取高脂菌群。通过多轮离心-培养迭代循环，可显著提升菌群整体脂质积累能力。

1.4.2 超离心力适应性进化的应用案例

为验证该技术的工业适用性，本课题组以产油酵母模式菌株皮状丝孢酵母（*Trichosporon cutaneum* ACCC 20271）为研究对象，采用超离心力适应性进化策略成功获得突变株 *T. cutaneum* MP11^[96]。该菌株细胞体积较野生型增大两个数量级（约 100 倍），胞内油脂含量提升 5 倍，展现出显著强化的脂质合成代谢通量。进一步地，通过耦合纤维素酶解体系与超离心力联合进化筛选，获得强化菌株 *T. cutaneum* YY52^[102]，其不仅维持细胞体积的巨幅增长，还能够在木质纤维素底物中实现高效油脂合成（产量高达 58.4 ± 0.1 g/L），证实该技术对复杂发酵体系的兼容性。

上述研究表明，超离心力适应性进化技术可通过物理筛选与基因适应性进化的协同作用，突破传统代谢工程改造的局限性，为产油微生物的定向驯化提供高效、低成本的普适性策略。

尽管目前超离心力适应性进化技术在产油酵母中的应用研究多局限于皮状丝孢酵母，但基于该技术的内在普适性机制——即通过机械应力诱导基因组适应性突变与密度梯度物理筛选的协同作用——其核心条件（如脂质密度差异驱动的细胞分选、机械力响应信号通路等）^[103, 104]在圆红冬孢酵母中同样存在。因此，本研究推断，通过优化离心力参数（如转速、作用时间）并构建迭代筛选体系，超离心力适应性进化技术可有效定向提升圆红冬孢酵母的脂质合成能力。

1.5 本文立题依据及主要研究内容

生物柴油具有温室气体排放少，污染小，原料丰富，可再生而且燃烧性能与化石燃料接近等优点，被大力研究和应用^[10]。生物柴油生产时产生的副产物粗甘油，其产量大且含有多种杂质，进行精致处理的成本高且工艺复杂。用能够耐受粗甘油中杂质并利用其中甘油为底物的微生物处理粗甘油，能将粗甘油直接转化为其他有利用价值的产物。该方法能有效处理粗甘油，还能产生附加价值，有利于废物再利用和环境保护。

用产油酵母将粗甘油转化成微生物油脂，再将此油脂用于生产生物柴油，处理掉大量粗甘油的同时，还可以实现能源的再利用，使生物柴油生产体系中的能量不断回流，减少资源的浪费和废弃物排放，是处理粗甘油的最好方法之一。目前，已有研究报道使用圆红冬孢酵母利用粗甘油培养并生产微生物油脂，但是仍存在一些难点未能处理，主要问题有：

(1) 代谢工程改造可以有效提升菌株的产油能力，但是构建菌株较为复杂成本也比较高，其生产指标仍然相对较低；(2) 已知研究中，用于提升圆红冬孢酵母以粗甘油为底物产微生物油脂的适应性进化所需的时间较长且油脂产量提升幅度不大，而且缺少合适的筛选手段，故难以有效富集有利突变的细胞。针对上述圆红冬孢酵母利用粗甘油生产微生物油脂中出现的问题，本论文的主要研究计划如下：

(1) 验证圆红冬孢酵母在以葡萄糖为碳源的合成培养基中能利用超离心力适应性进化提升菌株的油脂含量，对进化得到的突变菌株进行细胞表征，观察检测其细胞形态及生长产油脂情况，再结合转录组分析菌株的生长、产油脂以及其他相关基因的表达情况进行分析，说明超离心力适应性进化对菌株的影响和产生影响的原因。

(2) 对能够高效产微生物油脂的圆红冬孢酵母、解脂耶氏酵母和皮状丝孢酵母利用粗甘油的生长和产油情况进行评价，选择更能利用粗甘油产微生物油脂的菌株进行后续的进化和发酵来提升产油能力。

(3) 将超离心力适应性进化的方法用于圆红冬孢酵母在粗甘油体系中产微生物油脂的研究，不断提升该酵母在粗甘油中的油脂产量，并将进化菌株做相关的细胞表征，从细胞表型和基因转录水平上对进化菌株产生的突变进行分析。

(4) 将在粗甘油体系进化得到的突变圆红冬孢酵母菌株进行单因素摇瓶发酵，探究该菌株在发酵培养过程中，C/N、初始粗甘油浓度、有机氮/无机氮以及磷元素浓度等能提升油脂产量的关键发酵条件对菌株生产油脂的有利影响，并将最终得到较合适的发酵条件用于生物反应器发酵。

(5) 分批发酵衡量圆红冬孢酵母原始菌株和进化后菌株利用粗甘油产油脂的情况，说明上述进化和发酵条件提升菌株产微生物油脂的幅度，再通过分批补料发酵，进一步提升菌株的油脂产量。

第2章 验证圆红冬孢酵母通过超离心力适应性进化下使油脂含量提升

2.1 引言

超离心力适应性进化的方法建立于本实验室皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* MP11^[96]的获得过程,进化得到的 *T. cutaneum* MP11 相比较原始菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271, 出现细胞体积增大,胞内脂滴数量增多,细胞壁变薄等变化。此方法的原理是利用超离心力刺激细胞发生突变,再基于细胞密度不同筛选获得聚集在菌液上层的高油脂含量细胞。通过该方法可以富集油脂含量高的突变细胞,从而高效便捷地获得油脂含量高的细胞。

圆红冬孢酵母是一种常见的高产油脂的酵母,在高速离心力下更易被聚集在菌液上方(油脂含量较高导致密度低),从而更被筛选。本章选择圆红冬孢酵母作为进化实验对象,主要有以下优势:(1)作为非二态性真菌,其生长表型高度稳定,可避免因形态转换(如酵母态-菌丝态转变)引起的代谢变化;(2)对复杂培养条件(如温度波动、营养限制)具有强鲁棒性,能够耐受长期离心力筛选压力;(3)代谢副产物(如有机酸)分泌量较低,且生长过程中发酵液 pH 值维持近中性,易于培养。上述特性使其成为适配超离心力适应性进化技术的实验菌株。

故本实验主要对圆红冬孢酵母进行超离心力适应性进化,验证该方法能够有效提升圆红冬孢酵母的产油能力,并对进化得到菌株进行油脂含量提升程度的评估,对菌株形态、细胞壁及胞内关键代谢物含量等相关指标进行测定,以及对因进化导致的转录水平上的差异进行分析和讨论。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌株和培养基

圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* CGMCC 2.1389 由大连理工大学赵宗保教授课题组惠赠。

YPD 培养基: Glucose 20.0 g/L, Peptone 20.0 g/L, Yeast Extracts 10.0 g/L (固体培养基另外加 20.0 g/L Agar);

超离心力进化合成培养基: Glucose 60.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.44 g/L, Yeast Extracts 1.0 g/L^[96]。

菌株活化培养: 对菌株 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 进行活化。取出在-80 °C保存的菌株并室温解冻,在超净台中用接种环蘸取菌液于 YPD 固体培养基上划线,培养 48 h 后,挑取单菌落于 20 mL YPD 液体培养基中培养 24 h,即活化完成,后续可按照 10% (v/v)

接种量接种于其他培养基。其中，圆红冬孢酵母在合成培养基的培养时间为 144 h，菌株液体培养的摇床条件为 200 rpm、30 °C，固体培养的培养箱温度为 30 °C。

超离心力适应性进化实验方法：将活化后圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 接种至超离心力进化合成培养基中（500 mL 锥形瓶装液量 50 mL），培养 144 h 后进行取菌液进行超离心力刺激。将培养后菌液分离到两个 50 mL 的离心管中（20 mL 用于离心筛选、20 mL 用于检测参数），将其中一个离心管在不同的离心力下进行超速离心分级。离心后，吸取菌液上层含有较轻细胞的 5 mL 菌液，作为下一轮适应性进化培养的种子，接种量为 10% (v/v) [96]。

2.2.2 细胞形态观察

光学显微镜制片观察：取菌液 10 μ L 于载玻片上，用盖玻片压实至无气泡，将柏木油滴到盖玻片上，置于光学显微镜 OLYMPUS BX53（日本东京）的载物台上，用 100 倍物镜调清晰视野后，在目镜中观察细胞形态并保存照片。

扫描电镜制样观察：将菌液离心收集菌体，PBS 清洗 2 次，用 2.5% (v/v) 戊二醛溶液固定细胞 3 d，再用超纯水清洗细胞后，乙醇梯度脱水（30%-100%），将菌体冷冻干燥过夜后，喷金并用场发射透射电子显微镜 JEM-F200（日本电子株式会社）拍摄照片。

切片电镜制样观察：将菌液离心并收集菌体，PBS 清洗 2 次，用 2.5% (v/v) 戊二醛溶液固定细胞过夜，于中科 e 测公司送样拍摄切片电镜照片。

2.2.3 菌体生长、菌液糖浓度、油脂含量和产量测定

菌体生长情况测定：将 1 mL 菌液用超纯水稀释 40 倍后，用 Thermo BIOMATE 3S 紫外可见光分光光度计（Waltham, MA, USA）测定菌液的 OD₆₀₀。

菌液糖浓度测定：将 1 mL 菌液 12,000 rpm 离心 1 min，取上清稀释 40 倍后，用 HPLC（LC-20D, Shimazu, Kyoto, Japan）检测，所用检测器和色谱柱为：RID-10A 示差折光检测器（Shimazu, Kyoto, Japan）和 HPX-87H 色谱柱（Bio-rad, USA），流动相为 5 mM 硫酸溶液（流速 0.6 mL/min）。

细胞干重测定：用差重法来测定干重。将菌液摇匀后取 20 mL 于 50 mL 离心管中 12,000rpm 离心 3 min，弃上清，用超纯水清洗 1 次后，用 5 mL 超纯水重悬菌体，倒入称重过的玻璃培养皿中，65 °C 烘干过夜，放凉后称培养皿+菌体重量并记录，减去培养皿原本重量即为细胞重量。细胞干重（DCW, g/L）为细胞重量除测定细胞干重时所用菌液的体积。

油脂含量及产量测定：测定细胞干重后，向已装有烘干菌体的玻璃平板中加入 5 mL 4M

HCl, 将菌体与盐酸混合均匀, 室温放置酸解 4 h 以上。将混合溶液收集到 50 mL 离心管中, 不盖盖子隔水煮沸 10 min, 使盐酸与菌液共沸裂解。细胞壁, 后将离心管放置于冰上冷却 10 min, 加入 20 mL 氯仿和甲醇 (2:1, v/v), 密封置于 200 rpm, 30 °C 摇床萃取 1.5 h。将离心管从摇床中取出, 12,000 rpm 离心 3 min, 用玻璃针筒抽取下层氯仿相, 置于称过重的 50 mL 圆底旋转蒸发瓶中, 80 °C 水浴旋转蒸发去除氯仿, 将旋蒸瓶置于 65 °C 烘箱中过夜。放凉旋蒸瓶后称重, 该重量减去瓶子原有重量即为油脂重量。油脂含量 (Lipid content, %) 为油脂重量除菌体干重。油脂产量 (Lipid titer, g/L) 为油脂重量除测定时所用菌液体积。

2.2.4 细胞壁组分检测

将圆红冬孢酵母在超离心力进化合成培养基中培养, 在 24 h 时取菌液 100 mL, 离心收集菌体, 用超纯水清洗细胞 1 次, 12,000 rpm 离心 3 min, 将菌体液氮冷冻后真空冷冻干燥过夜。

测定细胞壁单糖聚合物含量: 两步酸解法测定。取干菌体 100 mg 于玻璃试管中, 加入 1 mL 72% 硫酸溶液与之充分混合, 在 30 °C 水浴温度下用玻璃棒不停搅拌 (每 5 min 搅拌一次) 使菌体和高浓度硫酸低温反应 60 min, 从而有利于细胞壁的裂解。将所有液体转移至 100 mL 锥形瓶中, 加入 28 mL 去离子水将浓硫酸稀释为 4% 稀硫酸, 混匀后用塞子和封口膜塞紧瓶口防止水分蒸发, 置于 121 °C 的灭菌锅 60 min 进行第二步酸解。取出锥形瓶, 放凉后摇匀, 取出 5 mL 溶液, 加碳酸钙粉末进行酸碱中和, 12,000 rpm 离心 5 min, 取上清液过滤, 用 HPLC 测定溶液中的葡萄糖和甘露糖的浓度。单糖聚合物与单糖的换算系数为 0.9。

测定细胞壁中几丁质含量: 称取 50 mg 干菌体置于 50 mL 旋蒸瓶中, 添加 10 mL 6 M HCl 溶液, 用瓶塞和封口膜密封瓶口, 于 105 °C 烘箱下酸解 24 h。将酸解得到混合液体在 110 °C 油浴中蒸发其中水分和盐酸, 加入超纯水 5 mL 充分溶解剩余固体。取 0.5 mL 样品与 0.5 mL Solution A (1.5 M Na₂CO₃ 溶于 40 g/L 乙酰丙酮) 进行 1:1 混合均匀, 煮沸 20 min, 冷却后加入 0.5 mL Solution B (1.6 g 对二甲氨基苯甲醛溶于 30 mL 饱和盐酸及 30 mL 乙醇溶液) 和 3.5 mL 乙醇溶液充分混匀, 放置 60 min。利用分光光度计在 520 nm 下进行检测 (对照为用超纯水进行上述处理的样品)。以 N-乙酰葡萄糖胺标准曲线计算几丁质含量。

2.2.5 细胞世代检测和细胞体积、表面积计算

细胞世代测定: 计算细胞平均每分裂一次所需要的时间。首先需绘制圆红冬孢酵母在超离心力进化合成培养基中的生长曲线, 在对数生长期的至少选择 3 个时间点, 在每个时

间点取样，用血球计数板计算细胞个数，每个时间点需要至少取 20 个样本计数，并带入公式 (2-1)：

$$G=1/R=(t_2-t_1)/3.322(\lg x_2-\lg x_1) \quad (2-1)$$

其中， t_2 ：后一个时间点的培养时间； t_1 ：前一个时间点的培养时间； x_2 ：后一个时间点的细胞个数； x_1 ：前一个时间点细胞个数。

细胞表面积和体积计算：用光学显微镜拍摄菌株圆红冬孢酵母在光学显微镜下的照片，用 image j 计算细胞长宽，因为该菌株的形状与椭球类似，用公式 (2-2) 计算细胞体积 (V)，公式 (2-3) 计算细胞表面积 (S)：

$$V = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{A}{2}\right)^2 \frac{B}{2} \quad (2-2)$$

$$S = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{A^2}{4} + \frac{AB}{2}\right) \quad (2-3)$$

其中，A：细胞的短直径；B：细胞的长直径。细胞体积和表面积的测量时取 100 个以上细胞体积的平均值。计算细胞体积和表面积时只选择成熟细胞，不包括未成熟（小）细胞和分裂时的细胞，该实验在超离心力进化合成培养基中进行。

2.2.6 胞内乙酰辅酶 A 及 NADPH 含量检测

将圆红冬孢酵母接种到超离心力进化合成培养基中摇床培养，在第 24 h、48 h 和 72 h 时取样，超纯水洗涤并收集菌体，使用上海科艾博生物的细菌乙酰辅酶 A (A-CoA) ELISA 检测试剂盒测定胞内乙酰辅酶 A 的含量，使用碧云天(上海)生物科技有限公司的 NADPH Assay Kit 试剂盒测定胞内 NADPH 的含量。细胞数量由菌液稀释一定倍数后用血球计数板计算得到。

2.2.7 细胞转录组测序

将圆红冬孢酵母活化后接入 100 mL 超离心力进化合成培养基中，在菌株培养 24 h 时取样，12,000 rpm，4 °C 离心 3 min 收集菌体，用超纯水清洗 1 次后置于冰上备用每个样品三个平行。提前用锡纸包裹研钵、研磨棒和金属药勺，置于 200 °C 烘箱 4 h 以上，放凉后用液氮预冷。将菌体用液氮冷冻后，置于研钵中研磨成粉末状，装入提前加入 1 mL 细胞裂解液 RZ 的 1.5 mL RNase-free 离心管，菌体可分开加入三个离心管中，将菌体与裂解液混匀室温放置 5 min。用 TIANGEN DP419 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。由北京擎科(上海)生物科技公司进行转录组测序 (Illumina HiSeq 2000 系统)。

2.3 结果与讨论

2.3.1 超离心力适应性进化获得的圆红冬孢酵母突变菌株及性状稳定性鉴定

将活化后圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 接种至超离心力进化合成培养基中连续传代 36 代，离心时间为 0-15 min。当细胞油脂含量高到一定程度，少量细胞会积聚在离心管的上部，形成从上至下菌体-液体-菌体的分层。用枪头轻轻吹散离心管上部聚集的细胞团，吸取含有少量较轻细胞的上层菌液作为下一轮适应性进化培养的种子。为了不断提高油脂含量，在尽量保证出现上层细胞团的情况下，不断提高的传代菌液的离心力或延长离心时间。

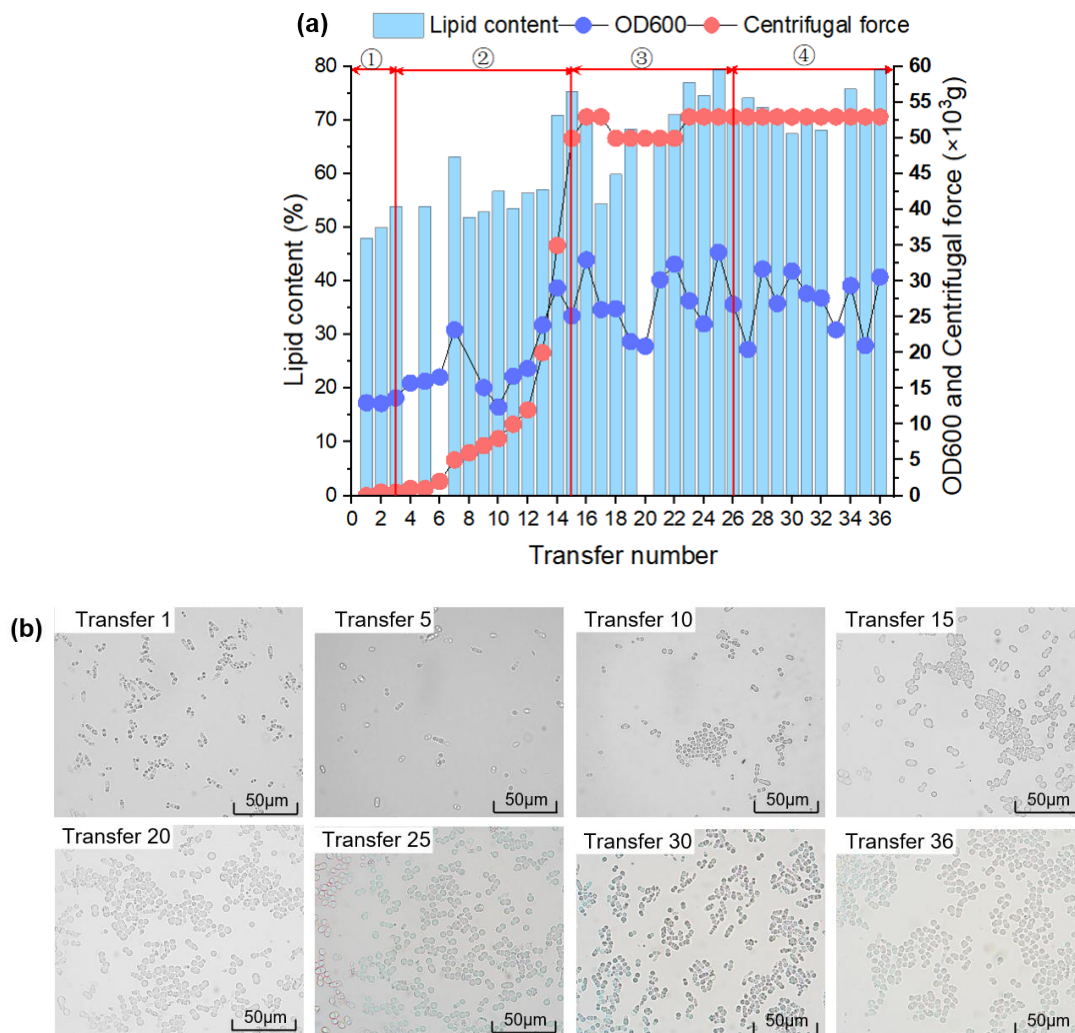


图 2.1 离心筛选提高 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 油脂含量的适应性进化

Fig. 2.1 Adaptive evolution of improving lipid content of *R. toruloides* CGMCC 2.1389 by centrifugal screening: (a) Strain evolution diagram (①Culture time is 72 h; ②/③/④Culture time is 144 h; ③Use corn oil); (b) Cell morphology

如图 2.1 (a) 所示, 将 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 连续传代到第 36 代。进化开始 1-2 代内, 菌株培养时间为 72 h, 发现胞内油脂分布较少, 油脂含量也较低, 仅有 50% 以下。从第 3 代到第 14 代, 延长培养时间至 144 h, 并连续提高离心力至 50,000g, 至此可以看到菌株的油酯含量不断提升至 70% 以上。传代到第 15-25 代时, 因离心力几乎达到离心机极限, 为进一步提升油脂含量, 在离心筛选时, 选择加入 10 mL 玉米油和 10 mL 菌液混合后离心, 玉米油密度低于菌液中液体, 故筛选离心后浮于玉米油上方的菌体更有利于筛选油脂含量更高的细胞。利用此筛选方式, 细胞的油脂含量有进一步提升, 在进化第 23-25 代, 油脂含量稳定于 75% 以上, 甚至达到 80%。在进化的第 26-36 代维持原有筛选方式, 进一步稳定细胞的油脂含量。连续十代的培养至第 36 代时, 油脂含量仍可以到达 75% 以上。超离心力适应性进化实验至此, 油脂含量提升 56% 以上, 结束圆红冬孢酵母的适应性进化。

从圆红冬孢酵母的光学显微镜图 (图 2.1 (b)) 也可以看出, 菌株传代至 15 代时的细胞大小与原始菌株相比已有明显的增大, 胞内的脂滴也几乎充满整个细胞, 说明在高速离心力的条件下, 细胞为了抵抗不利生长刺激, 细胞体积会发生变化, 再加上离心力对菌株有筛选作用, 会使得体积较大的油脂含量较多的细胞不断得到富集, 最终呈现出菌落整体的油脂含量提高, 体积增大的结果。随后续高速离心力的筛选, 菌株的大小虽未出现明显的持续增大, 但细胞内部的脂滴仍能够充满整个细胞。

为了确保该突变的稳定性, 将冻存过的圆红冬孢酵母原始和进化菌株重新活化, 接种到超离心力进化合成培养基中培养 144 h, 不进行离心和筛选, 连续传代 6 次, 测定菌株的 DCW、油脂含量和产量。

上述遗传性状的稳定性验证所使用的培养基是有利于产油脂的限氮环境, 有助于圆红冬孢酵母进化菌株恢复高产油脂效果的同时, 也会胁迫原始菌株, 使其产生更多油脂。随着在限氮环境中的连续传代, 菌株趋向于产油能力提升, 对应的生长就会变缓, 如图 2.2 (a) 所示, 随传代次数增加, DCW 缓慢下降, 而因为进化菌株更适应该生长环境, 故其 DCW 始终高于原始菌株; 如图 2.2 (b) 所示, 原始菌株和进化菌株的油脂含量会趋于稳定, 最终原始菌株的油脂含量稳定于 55% 左右, 进化菌株在非胁迫条件下传代 6 次后的油脂含量比非传代后菌株的油脂含量稍低, 最终稳定在 75% 左右, 油脂产量变化也与该结果相匹配。观察细胞的形态图 (图 2.2 (d)) 可看出, 随着连续传代, 进化菌株中的体积较大细胞数量减少, 但仍比原始菌株中数量多, 细胞内部的脂滴分布情况未有明显变化。可以看出, 该菌株的突变性状较稳定, 该进化菌株和原始菌株已有稳定的差异。

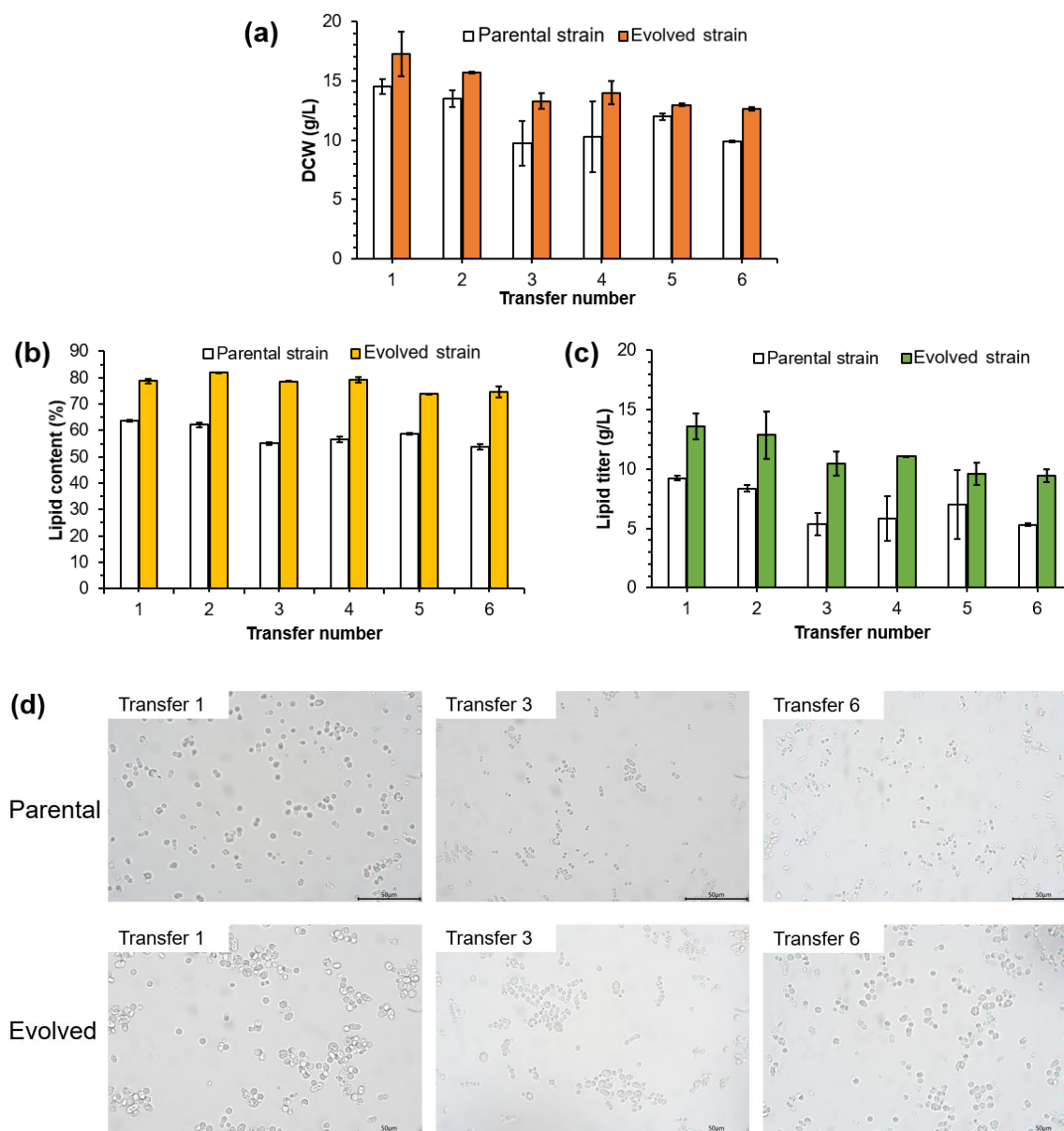


图 2.2 无胁迫压力下连续培养验证 *R. toruloides* 进化菌株的遗传稳定性

Fig. 2.2 Verification of genetic stability of *R. toruloides* evolutionary strain by continuous culture under stress-free pressure: (a)DCW; (b)Lipid content; (c)Lipid yield; (d)Cell morphology

2.3.2 圆红冬孢酵母细胞形态的相关分析

圆红冬孢酵母经过上述的超离心力适应性进化, 提供限氮环境和超离心力刺激及筛选, 最终获得积累油脂能力更强的菌株。根据进化图和光学显微镜图(图 2.1 和图 2.2)可知, 细胞油脂含量提升和胞内脂滴分布情况密切相关, 同时细胞体积也呈现增大的变化, 故猜测, 圆红冬孢酵母细胞油脂含量的增多, 是因为细胞体积增大, 使细胞内有更多体积容纳

脂滴的同时，油脂合成增多，使脂滴在胞内分布增多的共同作用下的结果。

超离心力适应性进化使细胞体积增大必然与细胞的生长分裂密切相关，进而可能会引起细胞壁成分的改变，还可能会引起细胞周期的变化，具体的差异情况需进一步展开研究。因此，本研究将圆红冬孢酵母原始菌株和进化菌株接种至超离心力进化合成培养基进行培养，在培养 96 h 的稳定期取菌液，用扫描电镜(SEM)观察原始菌株和进化菌株细胞表面情况差异，以及收集培养 144 h 油脂生产后期的菌体，用切片电镜(TEM)观察细胞壁厚度和胞内油脂分布情况，具体情况如下：

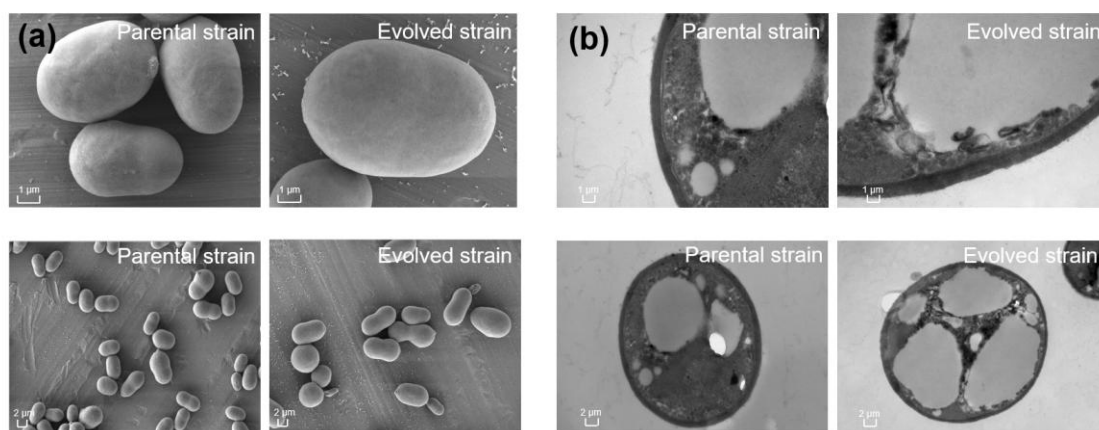


图 2.3 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* 原始菌株和进化菌株 SEM 和 TEM 图像比较图

Fig. 2.3 SEM and TEM observation of the parental strain and evolved strain of *R. toruloides*
(a) scanning electron microscope image; (b) ultrathin section electron microscope image

如图 2.3 (a) 所示，圆红冬孢酵母的细胞表面质地均匀、光滑无鞭毛，大多细胞的长末端会带有一个出芽生殖后的圆形印痕。原始菌株和进化菌株的扫描电镜图片看不出细胞表面的差别，但可以看出，同等培养时间下，相比较原始菌株的细胞两端膨大的花生状或是椭球状细胞，进化菌株则更接近于椭球型和球型，而且细胞体积也有明显增大。圆红冬孢酵母的切片电镜所示，进化菌株的细胞体积明显增大，胞内的脂滴更大而且油脂的空间占比更高。细胞壁结构及厚度与菌株培养时的营养情况和所处的生长阶段密切相关，但因为该菌株的切片电镜照片显示细胞壁薄且质地均一，无法看出细胞壁组分的差别，需进一步通过成分检测分析差别。

2.3.3 圆红冬孢酵母的细胞表征

为了进一步了解圆红冬孢酵母原始菌株和进化菌株的差异，对菌株的细胞壁成分、细胞世代和细胞体积进行测定并讨论差异产生可能的原因。

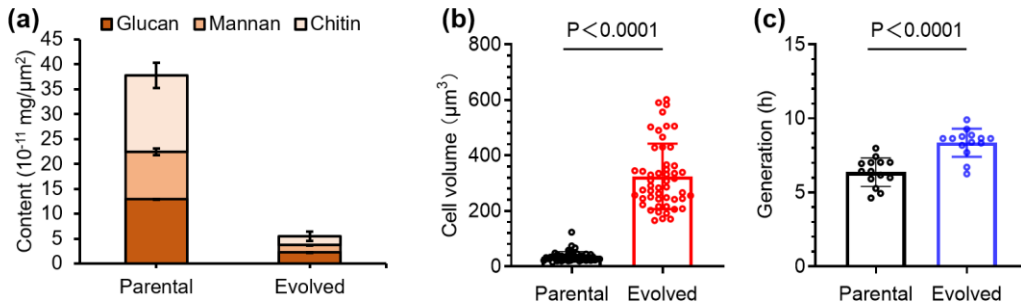


图 2.4 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* 超离心力适应性进化得到进化菌株的细胞表征

Fig. 2.4 Characterization of the evolved strains of *R. toruloides* obtained through centrifugal force adaptive evolution: (a) Cell wall composition; (b) Cell volume; (c) Cell generation

细胞壁的完整性对细胞的形态有很大影响，酵母细胞壁的主要由葡聚糖、甘露糖和几丁质构成。葡聚糖是细胞壁的重要组成部分，细胞壁的机械强度及稳定性主要靠其形成的多糖网络来维持，甘露糖能调节细胞通透性，几丁质可以抵御外界物理及化学损伤，三者协同作用，共同维持细胞的结构及功能。如图 2.4 (a) 所示，圆红冬孢酵母进化菌株单位表面积细胞壁的上述三种成分均有降低，可能是细胞壁在超离心力的刺激下变得结构更薄延展性更强，以抵抗超离心力对细胞的拉伸，从而使得细胞在增大的同时还能维持正常的生理功能。

圆红冬孢酵母进化前后细胞体积的变化如图 2.4 (b)，超离心力进化后细胞的体积平均增大 10 倍左右，可能与细胞壁变薄有密切关系，还为胞内脂滴的积累提供了更大的空间，更有利于菌株油脂生产。进化后细胞增大可能是由于细胞壁变薄，细胞壁延展性增强之外，还有可能是细胞周期发生改变，使得细胞繁殖速度变慢，有更多时间生长，故细胞体积增大。为了验证该猜想，对细胞世代进行测定，如图 2.4 (c) 所示，该细胞对数生长期时，细胞每繁殖一代所需的时间平均延长 1 h，该变化可以解释上述进化后细胞体积增大的现象。

超离心力适应性进化导致的细胞体积增大、细胞世代延长、细胞壁成分改变等变化，为细胞油脂含量的提升提供了更多先决条件，使细胞内可以容纳更多脂滴，但细胞油脂含量提升的具体原因还需进一步探讨。

2.3.4 圆红冬孢酵母胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量分析

乙酰辅酶 A 是脂肪酸合成的直接前体，乙酰辅酶 A 被催化生成丙二酰辅酶 A，后延长碳链形成脂肪酸，故乙酰辅酶 A 含量和油脂产量呈正比，有利于油脂积累。NADPH 是还原型辅酶，为脂肪酸合成过程提供还原力，用于将乙酰辅酶 A 还原成脂肪酸，故 NADPH

含量升高也有利于油脂的生产，在圆红冬孢酵母原始菌株和进化菌株的生长前期测定乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量，并探索超离心力进化对胞内物质的影响。

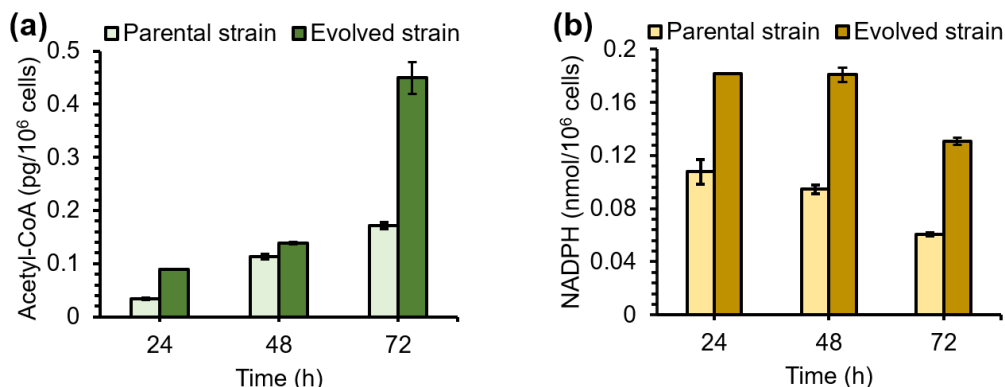


图 2.5 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* 不同时期胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量
Fig. 2.5 Content of acetyl-CoA and NADPH in different stages of *R. toruloides*
(a) the content of intracellular acetyl-CoA; (b) the content of intracellular NADPH

乙酰辅酶 A 是糖类、脂肪和蛋白质代谢的共同产物，是能量代谢的核心物质，还会参与合成脂肪酸、胆固醇等多种物质。如图 2.5 (a) 所示，圆红冬孢酵母胞内乙酰辅酶 A 含量随菌株培养时间的延长，含量越来越高，可能是由于越到生长后期，其胞内含量越多并用于后期产物的积累，故进化菌株的乙酰辅酶 A 含量多于原始菌株。如图 2.5 (b) 所示出现 NADPH 越来越少而且进化菌株含量更高的情况，可能是随菌株培养时间的延长，更多 NADPH 用于脂肪酸合成。另外，在上述限氮条件下，细胞可能优先将代谢通量引导至乙酰辅酶 A 的合成，从而减少了 NADPH 的生成，进化菌株 NADPH 含量更高也有利于油脂合成时更好利用还原力。

2.3.5 圆红冬孢酵母转录情况分析

经过超离心力适应性进化，圆红冬孢酵母细胞的形态和油脂含量都发生了很大的变化，为了进一步探索细胞在基因的表达方面产生的变化，对菌株进行转录组的检测和分析。以原始菌株为对照组，进行差异转录组学分析，用 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ ，显著性 $P \text{ value} < 0.05$ 为阈值，基于 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库进行 DEGs (差异转录基因) 的富集分析。

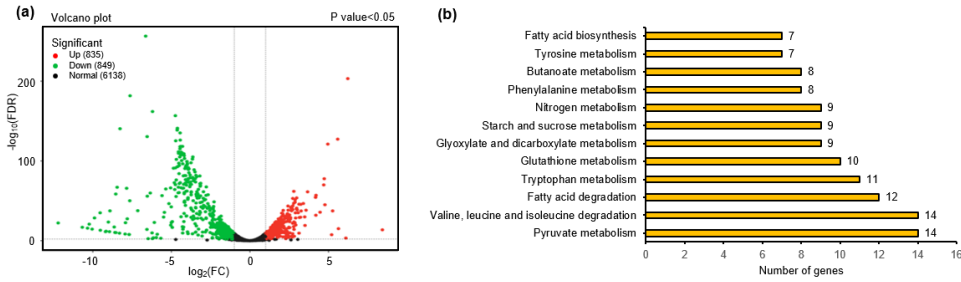


图 2.6 超离心力进化得到的圆红冬孢酵母进化菌株与原始菌株相比的差异表达基因的 KEGG 富集
 Fig. 2.6 KEGG enrichment of differentially expressed genes in *R. toruloides* evolved by ultracentrifugation force compared with the original strain (a) Volcano plot of differentially expressed genes (DEGs) of *R. toruloides* XR20. The data for all detected transcripts were plotted as log₂(Fold Change) versus the p-value; (b) KEGG annotation of proteins encoded by DEGs in *R. toruloides* XR20 compared with the parental

表 2.1 超离心力进化得到的圆红冬孢酵母糖代谢和油脂合成相关的差异转录基因

Table 2.1 Differential transcription genes related to sugar metabolism and lipid synthesis in *R. toruloides* evolved by ultracentrifugation force. DEGs that were upregulated in all three evolved strains were bolded and labeled in red

Gene ID	Log2 FC	P value	Gene ID	Log2 FC	P value
(a) Glycolysis			(b) TCA cycle		
ENO	-0.03	8.80E-01	SDH	-1.03	3.28E-09
FBA	0.89	1.99E-05	SCS- α	-0.05	8.32E-01
FBP	1.06	2.07E-06	SCS- β	-0.32	9.64E-02
GAPD	0.89	1.80E-05	(c) PPP pathway		
GPI	0.3	8.50E-02	6PGD	-2.6	1.67E-44
HK1	0.59	1.38E-04	G6PD	0.53	1.33E-03
HK2	0.97	6.99E-11	TKT	1.39	6.22E-01
PFK	-0.55	3.72E-04	TPI	0.13	0.47
PGK	-0.03	8.88E-01	(d) Fatty acid synthesis		
PGM	-0.55	1.20E-03	ACC	2.09	3.10E-25
PYK	-0.16	4.40E-01	ACL	1.74	1.04E-17
(b) TCA cycle			ELO	2.32	3.24E-26
α -KDH	1.08	5.92E-10	FAD1	-0.13	9.64E-01
ACO	-1.28	4.65E-11	FAD2	0.45	5.16E-02
CS	0.6	2.95E-04	FAS1	2.96	2.83E-22
FH	0.75	5.42E-04	FAS2	1.14	1.23E-24
IDH	0.21	4.55E-13	(e) TAG synthesis		
MDH	0.94	2.68E-05	DGAT	1.26	8.41E-10
ME	1.28	8.88E-06	GPAT	-0.32	7.13E-02
PC	0.4	8.32E-01	GPD	1.68	3.57E-18
PDHA	-0.03	9.64E-02	LPAT	0.76	1.04E-04
PDHB	0.85	8.88E-06	PAP	0.45	1.70E-02

如 KEGG 富集结果（图 2.6）所示，圆红冬孢酵母进化菌株发生显著变化的 DEGs 大多富集到了与代谢有关的通路上，其中糖代谢（Glycolysis/gluconeogenesis, Pyruvate metabolism, Starch and sucrose metabolism）和脂肪酸代谢（Fatty acid metabolism, Fatty acid biosynthesis, Glyoxylate and dicarboxylate metabolism）差异较大。将从糖酵解到形成甘油三酯的过程中的所有酶基因的表达水平进行整理（表 2.1），果糖-1,6-二磷酸酶（*FBP*）， α -酮戊二酸脱氢酶（ α -*KDH*），柠檬酸裂解酶基因（*ACL*），乙酰辅酶 A 羧化酶基因（*ACC*），脂肪酸和合成酶基因（*FASI/2*）等酶的基因有均出现上调，促进了菌株的 TCA 和磷酸戊糖途径，有利于菌株的糖代谢；脂肪酸合成途径基因上调更为明显，多个基因共同作用使进化菌株圆红冬孢酵母获得了菌株油脂含量上升的结果。

2.4 本章小结

本实验室曾用的超离心力适应性进化能够很好的提升产油酵母的油脂含量，但目前只在皮状丝孢酵母中有应用，为了后续的实验研究，验证该进化也能有效提高圆红冬孢酵母产油脂的能力。本章通过超离心力适应性进化提高圆红冬孢酵母的油脂含量，利用基因转录差异分析菌株突变的原因。探讨生长代谢方式和细胞壁组分变化与油脂酵母形态变化之间的联系，以及其对合成油脂过程的影响，总结得出以下结论：

（1）圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 以葡萄糖为碳源的限氮条件下，进行超离心力适应性进化共 36 代（共 216 天），并不断在传代时提高筛选的离心力，使菌株油脂含量不断提升。离心力逐次提升至最高 53,000g，使其油脂含量从 47% 升高至 75%，将原始和进化菌株在进化合成培养基中进行无胁迫的 6 代连续培养，原始菌株的油脂含量稳定在 55%，而进化菌株仍能稳定在 75% 左右，说明该进化引起的突变较为稳定。

（2）对圆红冬孢酵母每代菌株进行光学显微镜拍照，可以看到在细胞体积在逐渐增大，细胞内部的脂滴也在不断增大。切片电镜可看出进化细胞内部油脂含量明显多于原始细胞，且进化细胞体积明显大于原始细胞。与圆红冬孢酵母原始菌株相比，进化菌株单位表面积的葡聚糖、甘露聚糖和几丁质含量均下降，细胞体积增大 10 倍左右，细胞对数生长期繁殖一代所需时间延长 1 h。进化菌株胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量相比原始菌株更高

（3）对菌株进行转录组学分析，用 KEGG 富集差异基因，圆红冬孢酵母进化菌株糖代谢和脂肪酸代谢相关基因发生较多突变，有利于菌株的 TCA 和磷酸戊糖途径的进行，脂肪酸合成相关基因上调更为明显。

第3章 圆红冬孢酵母利用粗甘油生产微生物油脂

3.1 引言

随生物柴油产业的发展，粗甘油作为生物柴油的副产物，其的产量也不断增加。粗甘油中含有大量的杂质，导致粗甘油精制难度大且经济效益低，故粗甘油难以制备成纯甘油并被工业应用。粗甘油中含有的多种杂质，可以通过粗甘油预处理^[105]、优化培养基^[106]、调整发酵方式^[72, 107]或者添加添加剂^[108]等方法减轻对产油酵母生长代谢的抑制作用，从而提高产菌株的油脂产量。将粗甘油通过产油酵母发酵转化为微生物油脂，并进一步用于生物柴油生产的处理方法，不仅解决了粗甘油的利用问题，还实现了生物柴油生产过程中的低排放的目标，是处理粗甘油的最佳方法之一。

圆红冬孢酵母 (*Rhodotorula toruloides*) 作为一种常见的产油酵母，能够以粗甘油底物进行代谢，对粗甘油中包括甲醇在内的多种杂质有一定的耐受性，还能利用其中的脂肪酸甲酯^[98]，对各种发酵条件的适应性较强，可以通过调整多个发酵参数有效提升油脂产量，是利用粗甘油产微生物油脂的理想菌株。本文第2章说明本实验室前期建立的超离心力适应性进化的方法能够有效提升圆红冬孢酵母的产油能力，故本实验将利用超离心力适应性进化的方法，提升圆红冬孢酵母在粗甘油中耐受能力的同时，提升油脂产量。通过多种细胞表征解释说明超离心力适应性进化对以粗甘油为碳源的圆红冬孢酵母的影响，并进行发酵实验进一步提升圆红冬孢酵母利用粗甘油产微生物油脂的产量。

3.2 材料与方法

3.2.1 粗甘油来源和成分

粗甘油来源于中国福建龙岩市龙岩新能源有限公司，其中甘油含量为 853 g/L，不含有甲醇，将粗甘油稀释十倍后测定 pH 为 5.6，K、Ca、Na、Mg、P、S 离子浓度分别为 1.5、2.5、2.7、0.15、0.29、0.5 g/L。粗甘油中脂肪酸甲酯含量约为 10%，其中肉豆蔻酸甲酯(C14:0)，棕榈酸甲酯(C16:0)，棕榈油酸甲酯(C16:1)，硬脂酸甲酯(C18:0)，油酸甲酯(C18:1)，亚油酸甲酯(C18:2)比例为 2%、26%、3%、8%、39%、22%。

3.2.2 菌种及培养基

皮状丝孢酵母 *Trichosporium cutaneum* ACCC 20271 从中国农业微生物菌株保藏管理中心购买。

解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* DSM 3286 由华东理工大学花强教授课题组惠赠。

圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* CGMCC 2.1389 由大连理工大学赵宗保教授课题组惠赠。

纯甘油评价固体培养基: Glycerol 30.0 g/L, Peptone 10.0 g/L, Yeast Extracts 5.0 g/L。

粗甘油评价固体培养基: Glycerol 30.0 g/L, Peptone 10.0 g/L, Yeast Extracts 5.0 g/L。

粗甘油限氮培养基: Crude glycerol 95.0 g/L(含有约 80.0 g/L glycerol), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, 玉米浆(CSL) 0.415g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.25 g/L, KH_2PO_4 2.0g/L。

粗甘油进化培养基: Crude glycerol 118.0 g/L(含有约 100.0 g/L glycerol), 玉米浆(CSL) 1.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g/L。

YPD 培养基配方和培养条件详见 2.2.1。

本章节所有的液体培养的条件为 200 rpm, 30 °C, 固体平板培养条件为 30 °C。

3.2.3 细胞表征相关实验

细胞光学显微镜观察, 扫描电镜观察方法详见 2.2.2。

细胞壁组分测定方法详见 2.2.4。

细胞表面积和体积计算方法详见 2.2.5。

乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量测定方法详见 2.2.6。

本章细胞表征均在粗甘油限氮培养基中培养中进行。

3.2.4 细胞产油相关参数计算

糖浓度、细胞干重、油脂含量和产量测定详见 2.2.3。

细胞密度 (CFU) 测定方法: 将发酵后菌液稀释至 10^{-4} - 10^{-7} , 吸取 100 μL 稀释液用涂布棒均匀涂在 YPD 固体培养基上, 并放置培养箱培养 48 h 后数细胞并计算细胞密度。

油脂得率 (Lipid yield, g/g) 计算方法: 油脂产量除消耗的糖浓度。

油脂产率 (Lipid productivity, g/L/h) 计算方法: 油脂产量除发酵所用时间。

脂肪酸组分分析: 将 5 mL 三氟化硼和 30 mL 甲醇混合, 取 5 mL 混合试剂置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 500 μL 待测油脂, 将圆底烧瓶安装回流管并置于油浴锅内, 80 °C, 400 rpm 反应 40 min 后, 在烧瓶中加入 6 mL 超纯水和 4 mL 正己烷, 混合后萃取上层溶液, 用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 测定脂肪酸组分。

GC-MS 测定参数: 注射口温度为 280 °C, 进样量 1 μL , 用甲醇清洗进样针; 氦气作为载气, 流速为 1 mL/min; 色谱柱型号为 Agilent 19091J-433(30 m \times 250 μm \times 0.25 μm), 不分流进样; 火焰离子化检测器 (FID) 温度 120 °C; 升温程序: 80 °C 维持 3 min 后, 以 16 °C/min

的速率升温至 280 °C，维持温度 8 min。分析系统为 NITS MS Search 2.0。

3.2.5 RT-qPCR

将圆红冬孢酵母活化，在粗甘油限氮培养基中培养，以原始菌株为对照组，先按照 2.2.7 所示方法提取总 RNA。用东洋纺(上海)生物科技有限公司的 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix 进行 DNA 的去除和反转录反应。用同公司的 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒，利用 BioRad CFX 96 (美国伯乐) 系统进行 RT-qPCR (Real-Time Quantitative Reverse Tranion PCR) 实验。肌动蛋白 Actin 基因作为内参基因，用于 RNA 总量差异的归一化处理，转录水平使用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。RT-qPCR 所用引物见附录 I 中表 1。

3.2.6 分批发酵和补料分批发酵

种子培养方法：将圆红冬孢酵母菌液划线于 YPD 固体培养基，培养 48 h 后，取单菌落接种于 YPD 液体培养基，摇床培养 24 h 后按 10% (v/v) 接种量接种到粗甘油限氮培养基中培养 144 h，再按 10% (v/v) 接种量接种于发酵培养基。

分批发酵培养基/分批补料发酵培养基：Crude glycerol 95.0 g/L (含有约 80.0 g/L glycerol), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/L, 玉米浆(CSL) 0.415g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1.25 g/L, KH_2PO_4 2.0g/L (单因素优化实验的最佳培养条件)。

分批补料发酵补料母液：称取 47.0 g Crude glycerol (含有 glycerol 约 40.0 g), $(NH_4)_2SO_4$ 0.725 g, KH_2PO_4 1.0 g, 玉米浆(CSL) 0.208 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, 用超纯水定容到 80 mL 后灭菌备用。

3 L 发酵罐的实验条件：培养基装液量 1 L，接种量为 100 mL，发酵罐温度为 30 °C，通气量 1.0 vvm，转速 600 rpm，pH 为 5.6 (用 3M HCl 和 3M NaOH 自动调节)，发酵开始时加入 5 mL 消泡剂。发酵 0 h 时取样测定初始糖浓度，发酵开始后，每隔 24 h 取样，测定菌液 CFU、剩余糖浓度和油脂产量。

3.3 结果与讨论

3.3.1 圆红冬孢酵母利用粗甘油产油脂的可行性

将上述皮状丝孢酵母、解脂耶氏酵母和圆红冬孢酵母菌株经 YPD 培养基活化后分别涂布于纯甘油评价固体培养基和粗甘油评价固体培养基，如图 3.1 (A) 所示，三种菌株在粗甘油中生长状况优于纯甘油。再将活化后三种菌株接种于粗甘油限氮培养基培养 144 h，观察其生长和产油脂情况。

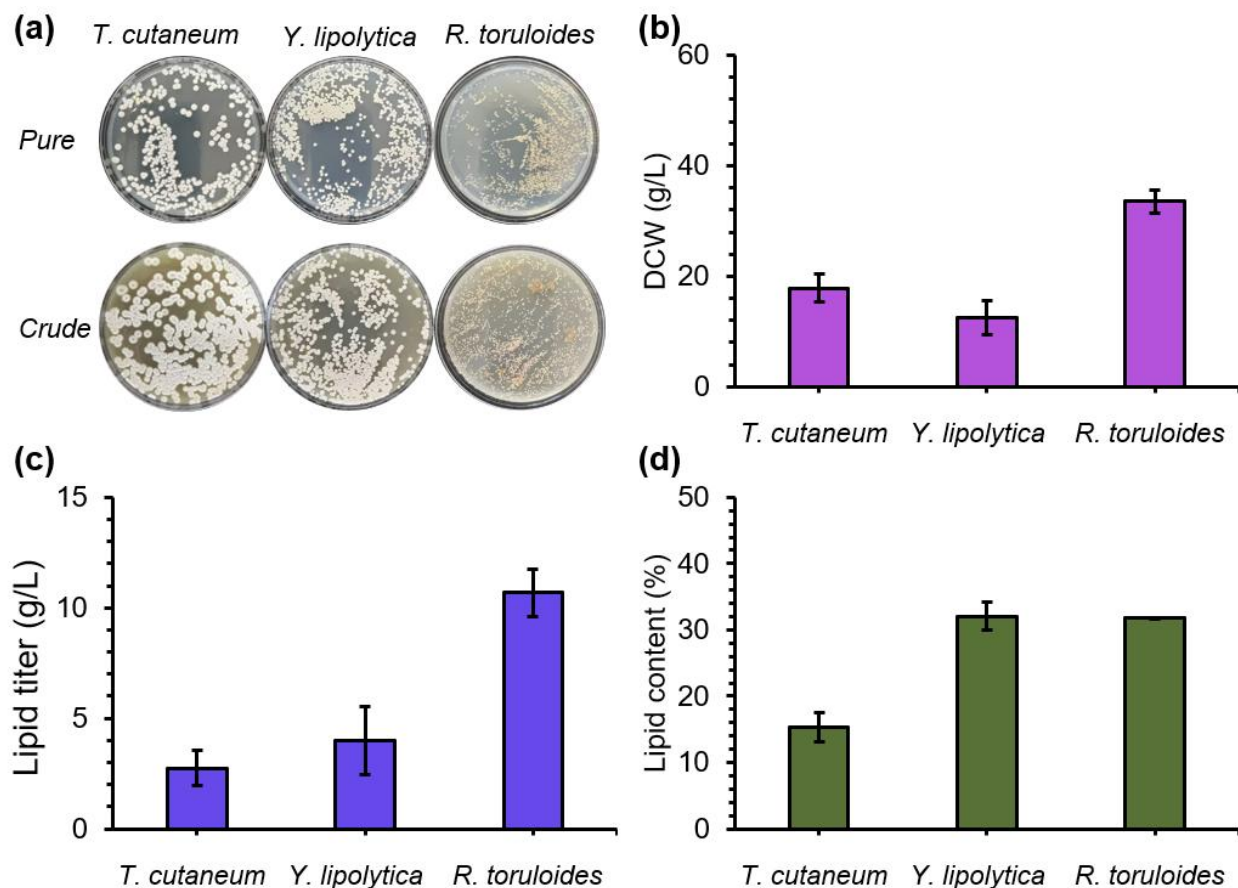


图 3.1 三种典型产油酵母利用粗甘油生产油脂的评价

Fig. 3.1 Evaluations of three typical oleaginous yeasts for lipid production using crude glycerol: (a) Cell growth on glycerol contained plates; (b) Dry cell weight (DCW); (c) Lipid titer; (d) Intracellular lipid content

图 3.1 结果表明，三株产油酵母均可以利用粗甘油，经过 144 h 的培养剩余甘油浓度分别为 60.25 g/L、56.90 g/L 和 22.75 g/L。圆红冬孢酵母较皮状丝孢酵母和解脂耶氏酵母展现出了更高的甘油消耗、细胞生长和油脂积累能力，其 DCW 和油脂产量分别可以达到 33.5 g/L 和 10.7 g/L。野生型圆红冬孢酵母利用粗甘油生产油脂的得率较低，仅为 0.19 g/g 甘油，仅相当于理论得率（0.3 g/g）的 57.6%。较低的胞内油脂含量（31.8%）是导致其得率较低的关键原因，因此需要通过有效的手段提高圆红冬孢酵母的胞内油脂积累能力。

3.3.2 超离心力适应性进化提升圆红冬孢酵母利用粗甘油产油脂的能力

超离心力分选适应性进化是基于突变细胞的密度差异，全通量筛选培养液中高油脂突变体的方法。从上述 2.4 结论可知，以葡萄糖为底物时，超离心力适应性进化的方法能使圆红冬孢酵母油脂含量提升，故将该方法用于本章提升圆红冬孢酵母利用粗甘油产微生物油脂的产量。

取圆红冬孢酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 在粗甘油进化培养基培养 144 h 后菌液，按 2.2.1 所示方法进行超离心筛选后，吸取上层轻细胞（油脂含量较高）进行转接培养，迭代进行，共传代 33 代（共 200 天）。离心力逐次提高至最大离心力 53,000 g，离心时间为 0-15 min，前 12 代培养时使用原定粗甘油进化培养基，可以看出随离心力的迅速增加，油脂产量也在迅速增加，但考虑到剩余甘油量始终过高，可能是甘油含量过高对其生产油脂不利，而且造成大量浪费，故在第 13 代开始，降低甘油和硫酸铵浓度，并维持最高离心力 15 min 继续进化。从第 21 代开始，油脂产量出现大幅提升，并在后续的进化中始终稳定到 19.0 g/L 左右，可能是细胞体积增大和油脂含量增多的共同作用。

如图 3.2 所示，超离心力适应性进化有效提高了圆红冬孢酵母利用粗甘油生产微生物油脂的能力，其油脂产量从初始的 4.5 g/L 提高至 19.8 g/L，提高了 3.4 倍。但是，随着离心转接的进行，菌株的 CFU 呈现出了下降的趋势，这可能是由于超离心力作为强大的机械力胁迫，对细胞的增殖造成了影响。另外，圆红冬孢酵母在该进化过程中的初始的油脂产量为 4.5 g/L，与前文 3.1 所示圆红冬孢酵母在粗甘油中的 10.7 g/L 的油脂产量差别较大，因为 3.1 所使用的培养基是后文 3.4 优化后的培养基，更有利于菌株产油脂，前文结果只是作为评价使用，与该进化结果不冲突。将最终获得的细胞涂布在 YPD 平板上，分离出单菌落，将其命名为 *R. toruloides* XR20。

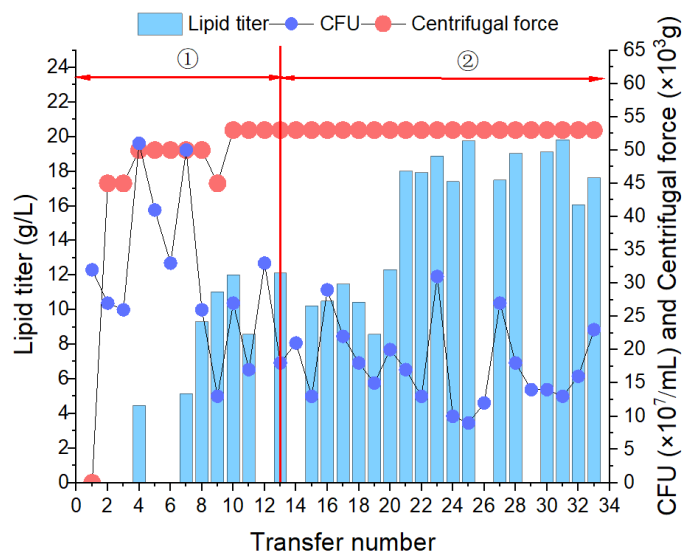


图 3.2 离心筛选提高圆红冬孢酵母在粗甘油体系中油脂产量的适应性进化

Fig. 3.2 Adaptive evolution of improving lipid titer of *R. toruloides* in crude glycerol system by centrifugal screening: ① Crude glycerol evolution medium; ② Low glycerol and $(NH_4)_2SO_4$ medium: Crude glycerol 95.0 g/L (80.0 g/L glycerol), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/L, CSL 1.0 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.475 g/L, KH_2PO_4 1.0g/L

3.3.3 超离心力适应性进化获得突变圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 的细胞表征

圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 经过超离心力适应性进化后其油脂产量有明显提升，为了对得到的 *R. toruloides* XR20 进行进一步了解，以原始菌株为对照，进行细胞表征实验。先对细胞的形态进行拍照分析，将原始菌株和 *R. toruloides* XR20 菌株培养 144 h 后用光学显微镜拍照，用于观察圆红冬孢酵母进化期间胞内油脂分布和细胞大小的变化情况。另外，将原始菌株 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 和进化菌株 *R. toruloides* XR20 培养 96 h 后用扫描电镜拍照并分析。

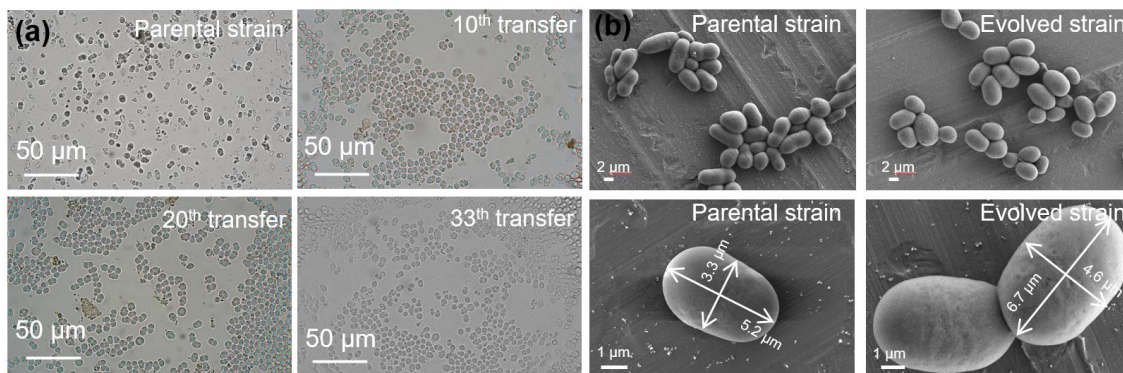


图 3.3 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 与原始菌株的光学显微镜和 SEM 图像比较图

Fig. 3.3 Microscope and SEM images of the evolved *R. toruloides* XR20 compare to the parental strain (a) optical microscope image; (b) scanning electron microscope image

如图 3.3 (a) 所示, 随着超离心力适应性进化的进行, 细胞的体积逐渐增大, 传代至第 10 代时, 细胞体积已有明显增大, 胞内脂滴占比不断增多, 与图 3.2 测得菌株油脂产量不断提升的趋势对应。后续适应性进化时, 因为菌株的离心力已达到最高的 53,000 g, 只能不断延长离心时间, 故细胞的体积和细胞内的脂滴占胞内体积的比重提升程度不高。观察原始菌株和进化菌株 *R. toruloides* XR20 的扫描电镜图 (图 3.3 (b)) 可知, 细胞表面光滑均匀, *R. toruloides* XR20 长和宽与原始菌株相比均有一定程度上的增加, 进化菌株的细胞普遍更圆更鼓, 内容物更多, 细胞体积有一定程度上增大。

观察菌株超离心力进化前后的形态图, 能看出细胞体积在超离心力的影响下增大, 对原始菌株和 *R. toruloides* XR20 进行细胞表征, 分析超离心力对菌株 *R. toruloides* XR20 细胞生长产油及相关基因表达的影响。

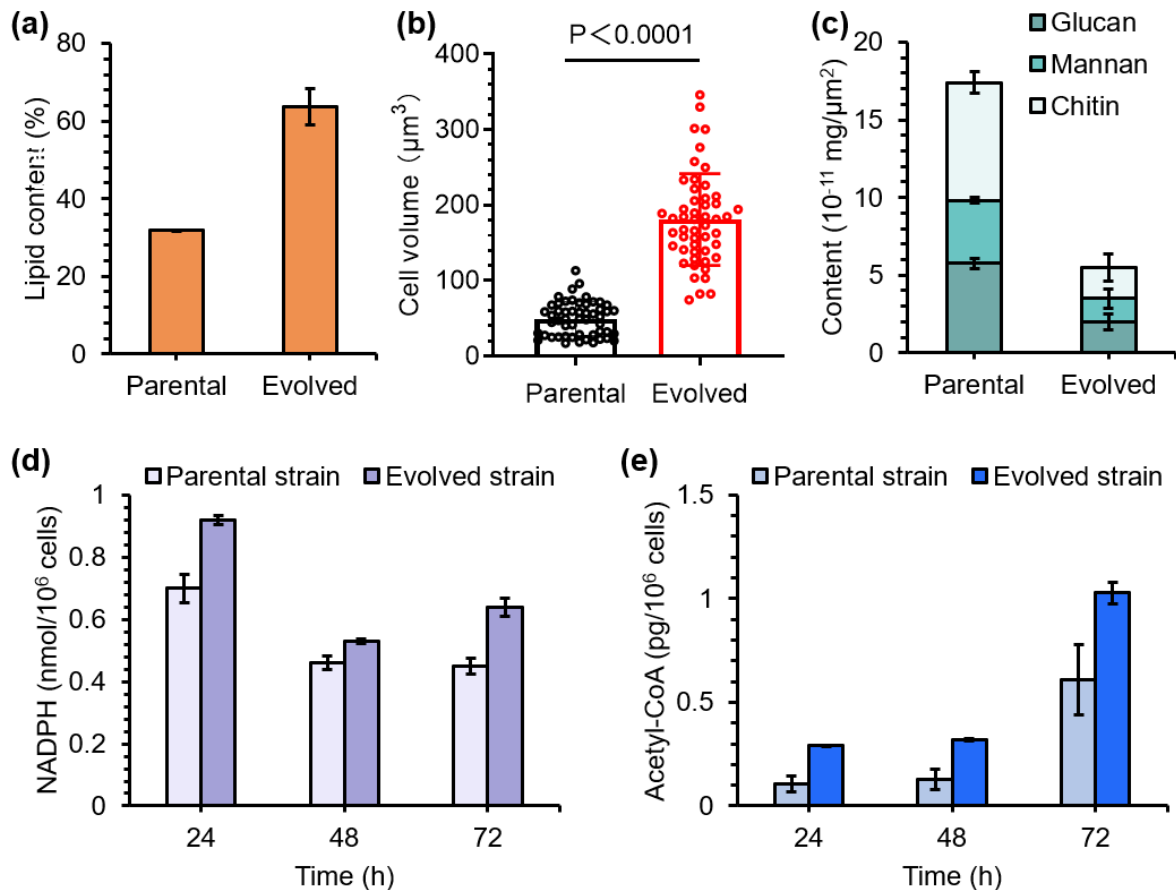


图 3.4 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 (对照为原始菌株) 的细胞表征

Fig. 3.4 Characterizations of the evolved *R. toruloides* XR20 compare to the parental strain: (a) Lipid content; (b) Cell volume calculated according to the light microscope diagram; (c) Content of major cell wall

components; (d) Intracellular NADPH content; (e) Intracellular acetyl-CoA content

如图 3.4 (a) 所示, 进化菌株 *R. toruloides* XR20 在粗甘油限氮培养基中培养 144 h 后, 其中油脂含量可达到 63.6% 左右, 是原始菌株的两倍, 细胞平均体积可以达到 $181.0 \mu\text{m}^3$, 是原始菌株的 3.6 倍。上述现象与光学显微镜观察到的, 随着超离心力进化的进行, 细胞体积和脂滴所占胞内体积均增多的现象相匹配, 并与上述圆红冬孢酵母以葡萄糖为碳源进行超离心力适应性进化的结果一致。

细胞体积增大势必会对细胞壁的组成有影响, 可能会对细胞壁强度进行削弱, 如图 3.4 (c) 所示, *R. toruloides* XR20 细胞壁中主要组分葡聚糖、甘露聚糖和几丁质的含量分别下降了 65.5%、62.8% 和 73.5%。这说明, *R. toruloides* XR20 相比较原始菌株有更薄的细胞壁, 更有利于后续油脂测定时的细胞破碎和细胞提取。

NADPH 和乙酰辅酶 A 是油脂合成的重要前体, 前体的充足供应有利于产物的积累。如图 3.4 (d 和 e), 与亲代菌株相比, 在培养的第 24 h、48 h 和 72 h 时, 进化的 *R. toruloides* XR20 中的 NADPH 和乙酰辅酶 A 的胞内含量分别提升 15.2%-42.2% 和 68.8%-168.8%, 可能是上述前体的增加, 使胞内油脂含量增加, 最终使得油脂产量增加。

3.3.4 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 生长和产油代谢相关基因转录水平分析

在典型的含油酵母中, NADPH 通过胞质溶胶中的苹果酸酶(ME)将苹果酸转化为丙酮酸^[109]。如图 3.5 所示, 进化的 *R. toruloides* XR20 中 ME 的转录水平上调 4.64 ± 0.27 , 依赖 NADP⁺ 的异柠檬酸脱氢酶(IDH)的上调(5.66 ± 0.22)也有助于 NADPH 的再生。依赖 ATP 的柠檬酸裂解酶 (ACL) 通常被认为通过催化柠檬酸转化为乙酰辅酶 A 的反应在脂质生物合成中发挥关键作用。然而, ACL 的表达水平(0.81 ± 0.19)在进化菌株 *R. toruloides* XR20 中显著下调。在 TCA 途径中, 琥珀酸脱氢酶(SDH)、延胡索酸水合酶(FH)和苹果酸脱氢酶(MDH)的上调促进了丙酮酸的产生, 丙酮酸通过丙酮酸脱氢酶(PDH)转化为乙酰辅酶 A。转录分析结果表明, 进化菌株 *R. toruloides* XR20 中乙酰辅酶 A 含量的增加是由于循环中一些基因的表达水平提高, 而不是 ACL 的高表达, 这与 *R. glutinis*^[110]中报道的研究相似。此外, 与合成三酰甘油直接相关的编码磷脂酸磷酸酶(PAP)和二酰甘油酰基转移酶(DGAT)的基因的表达水平显示出显著的上调, 这也促进了脂质积累。简而言之, 超速离心适应性进化改变了

acyltransferase; GPD, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; GPD1/GPD2, glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1/2; GUP, glycerol uptake protein; GUT1/GUT2, glycerol utilization protein 1/2; ICL, isocitrate lyase; IDH, NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase; LPAT, lysophosphatidic acid acyltransferase; MDH, malate dehydrogenase; ME, malic enzyme; MLS, malate synthase; PAP, phosphatidic acid phosphatase; PC, pyruvate carboxylase; PDHA/PDHB, pyruvate dehydrogenase E1 α/β subunit; PGK, phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglycerate mutase; PYK, pyruvate kinase; SCS, succinyl-CoA synthetase; SDH, succinate dehydrogenase; TPI, triose phosphate isomerase; α -KDH, α -ketoglutarate dehydrogenase.

3.3.5 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 摇瓶发酵优化发酵条件

在 3.3.2 中, 超离心力适应性进化有效提高了圆红冬孢酵母利用粗甘油生产微生物油脂的能力, 其油脂产量从初始的 4.5 g/L 提高至 19.8 g/L, 提高了 3.4 倍。上述进化所用的粗甘油进化培养基只是提供了较高的粗甘油浓度和碳氮比, 使其在限氮条件下能够生产油脂, 但并不是圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 产油脂的最佳条件。为了进一步提升 *R. toruloides* XR20 的油脂产量, 在摇瓶中进行油脂发酵条件的优化, 包括碳氮(C/N)比、初始粗甘油浓度、玉米浆与(NH₄)₂SO₄的比例以及初始 KH₂PO₄浓度(图 3.6)。实验进行时, 在 500 mL 摇瓶中装液量 50 mL, 将 *R. toruloides* XR20 种子活化并按 10% (v/v) 接种量接种至培养基中, 每个实验条件做两组平行, 摇床培养 144 h 后测定其生长耗糖和产油情况。

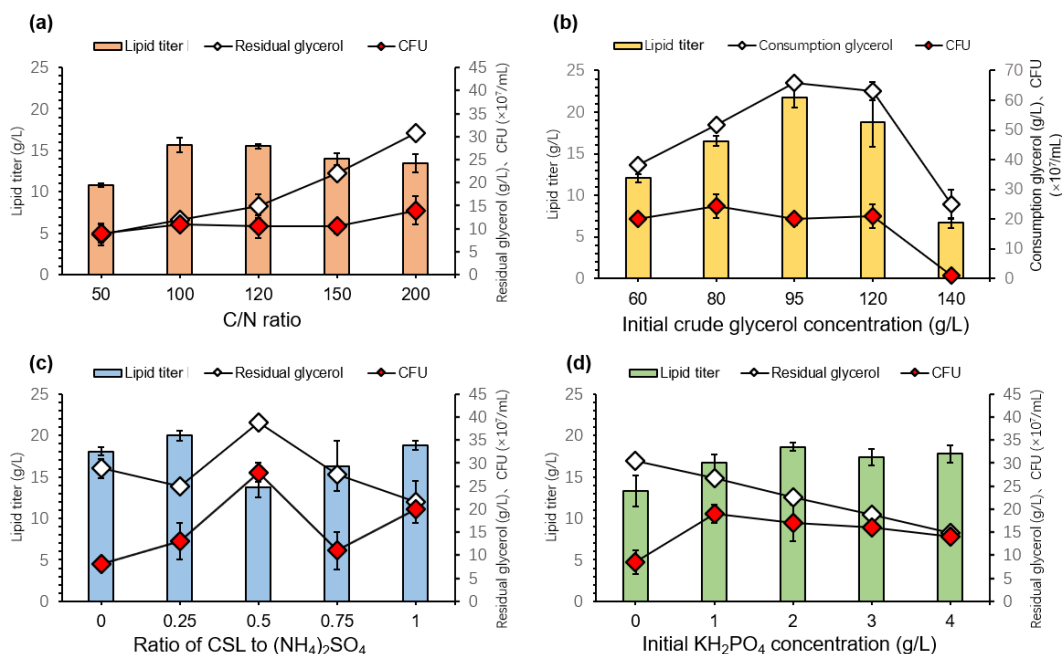


图 3.6 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 关键发酵条件的优化

Fig. 3.6 Optimizations of key fermentation conditions for *R. toruloides* XR20: (a) C/N ratio. (b) Initial glycerol concentration. The crude glycerol concentrations of 60, 80, 95, 120, 140 g/L are equivalent to the initial glycerol concentrations of 51.2, 68.2, 80.0, 102.4, 119.4 g/L. The nitrogen source included 1.0 g/L corn steep liquor and 1.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (c) Ratio of corn steep liquor (CSL) to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The concentrations of CSL and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ are 0, 0.42, 1.0, 1.9, 3.5 g/L and 1.4, 1.25, 1.0, 0.64, 0 g/L, respectively, at the ratio of 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1. The water content of CSL was 74.4% (w/w). (d) Initial KH_2PO_4 concentration.

(1) 氮元素限制条件的优化

氮元素缺少的培养环境能促进产油酵母碳通量流向油脂合成方向,使得油脂产量提升,故氮元素限制(更高的碳氮比)是产油酵母油脂积累关键因素。本实验在粗甘油进化培养基的基础上对 *R. toruloides* XR20 进行氮限制的探索,因为 *R. toruloides* XR20 在初始粗甘油浓度为 95-118 g/L 时,培养 144 h 时后甘油剩余量过多(约为 20-40 g/L 左右),故选择初始粗甘油浓度为 70.0 g/L(含有约 60.0 g/L 甘油)进行本实验, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 KH_2PO_4 浓度均为 1.0 g/L,同时调节 CSL 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量并使二者比例为 1:1,使其 C/N 为 50、100、120、150、200。

如图 3.6 (a) 所示, *R. toruloides* XR20 在不同 C/N 比下的油脂产量均不同,结合耗甘油量和 CFU 进行分析,可以看出较低 C/N 比会导致氮限制不足,使得菌株生长较旺盛、甘油消耗较快但油脂产量较低,而随着 C/N 比的增大,菌株的油脂含量升高,但会对生长有一定抑制作用,故会出现甘油消耗变慢,油脂产量降低。综合来看,该菌株在 C/N 比为 100 时,油脂产量较高,约为 15.3 g/L,此时的氮元素限制对该菌株来说可以得到较高的油脂产量。另外,由于初始粗甘油浓度较超离心进化时的培养基比较低,故油脂产量低于进化得到的最高产量,说明本实验用的初始甘油浓度并不是最合适的,于是进行下一种发酵条件的优化。

(2) 初始粗甘油浓度的优化

培养基中高浓度的粗甘油会导致培养基的渗透压增加,不利于菌株吸收甘油和生长,还会引入大量的杂质^[111],可能会导致菌株生长代谢和油脂生产受影响,故对培养基的初始粗甘油浓度的探索十分重要。沿用上述实验的所用的培养基,初始粗甘油浓度选择为: 60, 80, 95, 120, 140 g/L,相当于甘油浓度为 51.2, 68.2, 80.0, 102.4, 119.4 g/L,固定 CSL 和

(NH₄)₂SO₄ 的比例为 1:1, MgSO₄·7H₂O 和 KH₂PO₄ 含量均为 1.0 g/L, 以 C/N 为 100 同步调节 CSL 和(NH₄)₂SO₄ 含量。

如图 3.6 (b) 所示, 随初始粗甘油浓度升高, *R. toruloides* XR20 的油脂产量、消耗甘油的量和 CFU 均呈现出先上升后下降, 较低甘油浓度对菌株的代谢有影响, 较高浓度又会抑制菌株生长, 所以在初始粗甘油浓度为 95.0 g/L (甘油浓度为 80.0 g/L) 时, *R. toruloides* XR20 消耗最多的甘油, 生长也最旺盛, 同时油脂产量最高, 约为 21.8 g/L。以初始粗甘油浓度 95.0 g/L, C/N 比为 100 的条件为基础, 进行后续的发醇条件优化实验。

(3) 有机氮与无机氮比例的优化

目前, 大多数研究使用昂贵的酵母提取物作为从粗甘油生产脂质的复合氮源, 以获得较高细胞密度^[72], 本实验为降低成本, 本实验使用玉米浆 (CSL) 代替酵母膏作为复合氮源。CSL 作为一种廉价有机氮源, 价格较低廉, 还含有大量的氨基酸、维生素、矿物质和生长因子, 能促进菌株生长代谢。有机氮和无机氮的比例可能会影响菌株的代谢途径, 不同的氮源会激活或抑制不同的代谢途径, 从而影响代谢产物的合成, 故本实验主要利用 CSL 和(NH₄)₂SO₄ 探究何种比例更有利于 *R. toruloides* XR20 生产油脂。该实验的培养条件如下: 初始粗甘油浓度 95.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 和 KH₂PO₄ 含量均为 1.0 g/L, C/N 比维持 100 的情况下, 调节 CSL 与(NH₄)₂SO₄ 比例为 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1。

有机氮含量过高会使得 *R. toruloides* XR20 生长更旺盛, 而无机氮比例过高会降低菌株生长优势, 使其生产更多的产物, 二者共同作用下, 结果如图 3.6 (c) 所示, 不同的有机氮/无机氮对生长和产油有很大的影响, 比例为 1:1 时, 菌株的油脂产量最低, CFU 最高, 可能此条件下更有利于 *R. toruloides* XR20 的生长, 而有机氮/无机氮为 0.25 时, 最高油脂产量达到最高, 为 20.0 g/L。可以看到该条件对菌株 *R. toruloides* XR20 生长和产油影响较大, 但最合适条件的产量仍不及上述实验 (2), 可能是每次种子的细胞状态不是完全一样, 导致菌株的产量不能随着不断的条件优化上升, 而同一组实验中的种子是完全一样的, 所以该结果仍具有可信性。

(4) 磷元素限制条件的优化

磷元素限制条件下, 产油酵母的代谢途径会发生显著变化, 可能会抑制细胞的核糖体合成和三羧酸循环, 同时激活磷代谢、核糖核酸降解和脂肪酸合成途径。虽然磷限制可以

显著提升 *R. toruloides* XR20 的油脂含量，但过低的磷浓度可能会对细胞的生长产生不利效果，导致生物量较低，从而影响总油脂产量，故合适的磷元素含量对油脂的生产是非常重要的^[112, 113]。本实验的培养条件如下：初始粗甘油浓度为 95.0 g/L，MgSO₄·7H₂O 含量为 1.0 g/L，CSL 含量为 0.415 g/L，(NH₄)₂SO₄ 含量为 1.25 g/L，C/N 为 100，KH₂PO₄ 含量设定为 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 g/L。

如图 3.6 (d) 所示，因为粗甘油本身含有少量的磷元素，所以完全不添加 KH₂PO₄ 油脂生产也没受到较大影响，仍有 13.3 g/L，而在另外添加 2.0 g/L KH₂PO₄ 时，*R. toruloides* XR20 油脂产量达到最高值 18.6 g/L。

经过本节的发酵条件单因素优化，在碳氮比(C/N)、初始粗甘油浓度、CSL 与(NH₄)₂SO₄ 的比例以及初始 KH₂PO₄ 含量等方面进行优化，最终得到 *R. toruloides* XR20 最合适的产油发酵条件：粗甘油 95.0 g/L（含有约 80.0 g/L 甘油），MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L，CSL 0.415g/L，(NH₄)₂SO₄ 1.25 g/L，KH₂PO₄ 2.0 g/L（即为上述粗甘油限氮培养基）。在本节摇瓶发酵实验中，*R. toruloides* XR20 最高油脂产量为 21.8 g/L，与菌株在进化时的最高产量（19.8 g/L）相比提升幅度不大，考虑到可能是摇瓶发酵存在 pH 控制不方便，通气量不高，水分蒸发过快等局限性，造成每组的实验具有一定的误差。为了进一步提升菌株 *R. toruloides* XR20 产油脂的能力以及评估其相比较原始菌株的产油量的提升情况，对菌株 *R. toruloides* XR20 进行生物反应器的发酵实验。

3.3.6 分批发酵评价圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 产油脂能力

生物反应器培养菌株有参数控制精准、溶氧效率高、生长环境更稳定等优势，能为菌株的生长代谢和产物生产提供更好的环境，在工业上得到大规模应用。本实验为了评价进化菌株 *R. toruloides* XR20 相比较原始菌株 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 在发酵罐中的产油脂能力的提升情况，将原始菌株和进化菌株活化后，作为种子分别接种到完全相同的 3 L 发酵罐中进行分批发酵，用 3.3.5 优化的得到的粗甘油限氮培养基为分批发酵培养基，共培养 144 h，取样测定菌株生长和产油脂情况。

如图 3.7 (a-c) 所示，培养前 48 h 时，进化菌株和原始菌株的产油情况无明显差别，48 h 后，*R. toruloides* XR20 油脂产量明显高于原始菌株，培养 144 h 后，原始菌株油脂产量为 17.4 g/L，进化菌株油脂产量为 24.5 g/L，比原始菌株提升 40.8%左右。进化菌株的耗糖能力与原始菌株无明显差别，均能够在培养期间消耗掉所有甘油。原始菌株展现更高的

细胞生长能力，CFU在48小时内增加，从48小时到144小时急剧下降，表明大量细胞的自溶发生在发酵的后期。进化菌株 *R. toruloides* XR20 的CFU值持续增加，并在产油后期超过亲本菌株，表明进化菌株可能具有更长的细胞周期和耐受粗甘油的能力。据报道，圆红冬孢酵母具有利用广泛底物的能力^[114]。如图3.7(d)所示，发酵144小时后，在发酵液中几乎没有检测到脂肪酸甲酯，说明该菌株能够很好的利用粗甘油中的脂肪酸甲酯。

如图3.7(e)所示，对 *R. toruloides* XR20 从粗甘油中产生的脂质进行脂肪酸组成测定。结果表明，脂质主要由C16至C18脂肪酸组成，不饱和脂肪酸包括油酸(C18:1)和亚油酸(C18:2)的含量大于57%，高不饱和脂肪酸有利于提升生物柴油的燃烧性能，能够降低污染物的排放量，使生物柴油有更好的流动性，有利于保存和使用^[115]。

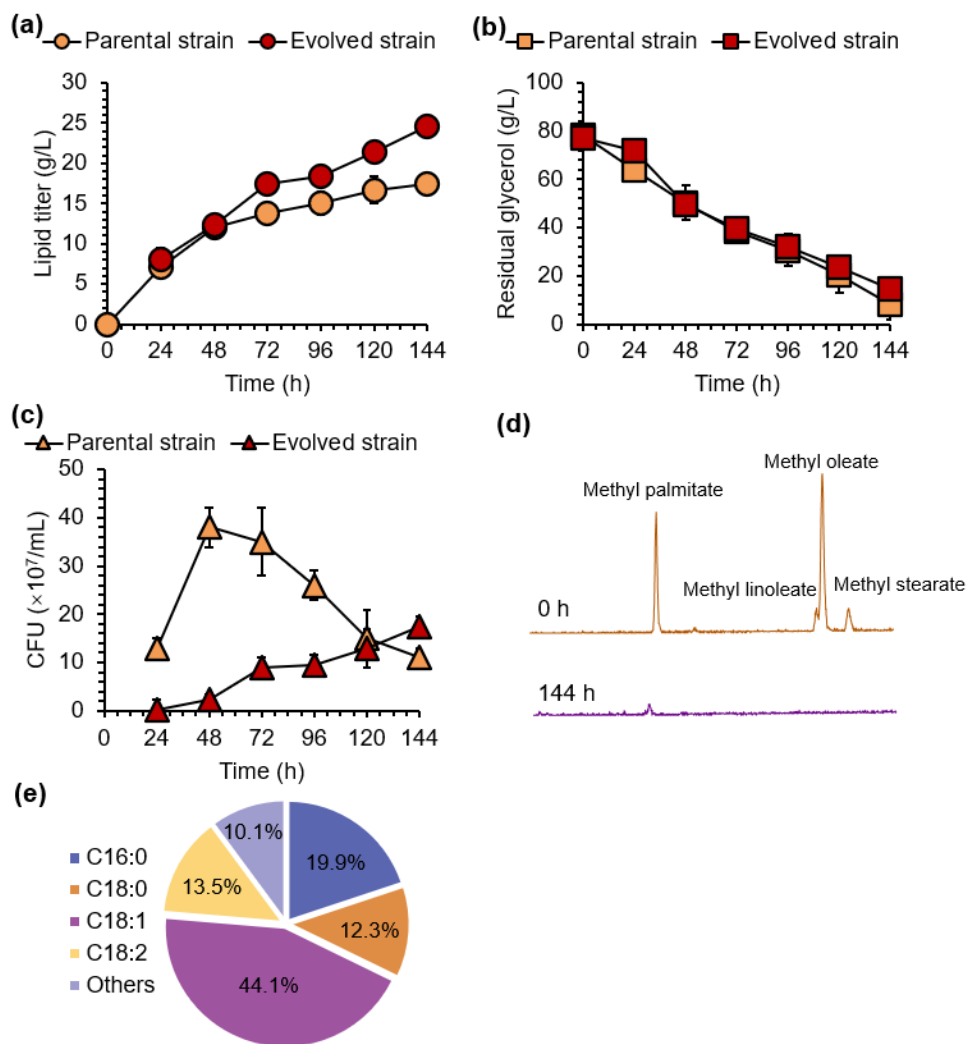


图 3.7 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* 利用粗甘油的分批发酵

Fig. 3.7 Batch fermentation using crude glycerol by *R. toruloides*: (a) Lipid titer; (b) Residual glycerol; (c) Colony-forming unit (CFU); (d) GC-MS analysis of fermentation broth at 0 h and 144 h; (e) Fatty acids composition of the lipid

本实验所用的 *R. toruloides* XR20 使用粗甘油分批发酵产微生物油脂的产量为 24.5 g/L, 油脂含量为 65.3%, 油脂得率为 0.32 g/g, 油脂产率为 0.17 g/L/h。查阅过往相关报道可知, *R. toruloides* AS 2.1389 油脂产量为 18.5 g/L, 油脂含量为 70%, 油脂得率为 0.175 g/g, 油脂产率为 0.093 g/L/h^[77], 以及 *Y. lipolytica* SKY7 油脂产量为 15.16 g/L, 油脂含量为 51.4%, 油脂得率为 0.175 g/g, 油脂产率为 0.2 g/L/h^[116], *R. toruloides* XR20 利用粗甘油通过分批发酵生产微生物油脂的各项指标均处于较为领先的位置。另外, 本实验的油脂得率明显过高, 可能是因为该培养基中含有粗甘油原料中自带的脂肪酸甲酯, 而菌株 *R. toruloides* XR20 可以使用脂肪酸甲酯生长和产油, 所以仅通过甘油浓度来计算油脂的得率是偏高的, 另外粗甘油中其它的杂质也有可能被菌株利用并转化为油脂, 所以导致了油脂得率偏高的结果。本实验所用发酵培养基较为廉价, 产油能力较高, 具有大规模生产的应用潜力。

3.3.7 分批补料发酵提升圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 油脂产量

为了能够进一步提升 *R. toruloides* XR20 利用粗甘油产微生物油脂的能力, 将菌株在 3 L 发酵罐中进行分批补料发酵。分批补料发酵相比摇瓶发酵和分批发酵, 能够持续补充营养物质, 打破原有菌株生长的规律, 支持菌体高密度生长并生产代谢产物, 是提高产物产量的有效方式。通过分批补料发酵, 只需不断补充新鲜培养基并延长生长时间, 就能够积累大量菌体和代谢产物, 节省时间和成本, 染菌风险低, 适用于工厂大规模生产。

本实验所用 *R. toruloides* XR20 的分批补料发酵实验操作方法如下: 将菌株 *R. toruloides* XR20 活化后, 培养种子后接种至分批补料发酵培养基中, 开始发酵。本实验室所用的发酵罐无法自动补料, 故预计在 95 g/L 粗甘油消耗一半时手动补入分批补料发酵补料母液, 使培养基中的糖浓度恢复至原始分批发酵培养基的含量, 共补三次物料, 最后一次补料后, 在甘油消耗完毕后停止发酵。因手动补料无法准确捕捉到预计补料点, 故在培养的第 3, 6, 8 d 进行补料, 补料前后取样测定培养基中糖浓度。在分批补料发酵期间, 培养体系中共加入 234.0 g/L 粗甘油 (约 200.0 g/L 甘油)。

如图 3.8 (a-b) 所示, *R. toruloides* XR20 的分批补料发酵期间, 甘油消耗速度差别不大, 均能够在 3d 左右消耗 40 g/L 左右甘油, 经过三次补料, 最终于培养 11 d 后消耗掉所有甘油。发酵期间, *R. toruloides* XR20 油脂产量不断增多, 最终达到 42.56 g/L。CFU 在发酵第 5 d 下降, 可能是此时甘油含量较低, 而且培养时间较长, 菌体不再大量复制, 进入产物积累期, 碳流量更多转向产物生长, 而培养第 7 d 后 CFU 继续上升, 可能是因为补料使得甘油量增多, 刺激部分菌株进入增殖期, 使得 CFU 提高, 后续培养时间中, CFU 增长量始终不多, 直至发酵结束, 最终 CFU 约为 5×10^8 个/mL。

本实验进行的 *R. toruloides* XR20 的分批补料发酵, 油脂产量为 42.56 g/L, 油脂含量为

74.9%，油脂得率为 0.182 g/g，油脂产率为 0.161 g/L/h。 *R. toruloides* XR20 与已报道的粗甘油分批补料发酵产油的情况对比如图 3.8 (c) 所示，油脂产量高于目前所有报道，但因为发酵时间过长，所以油脂得率也低于分批发酵，油脂产率略低，但仍高于大部分研究。

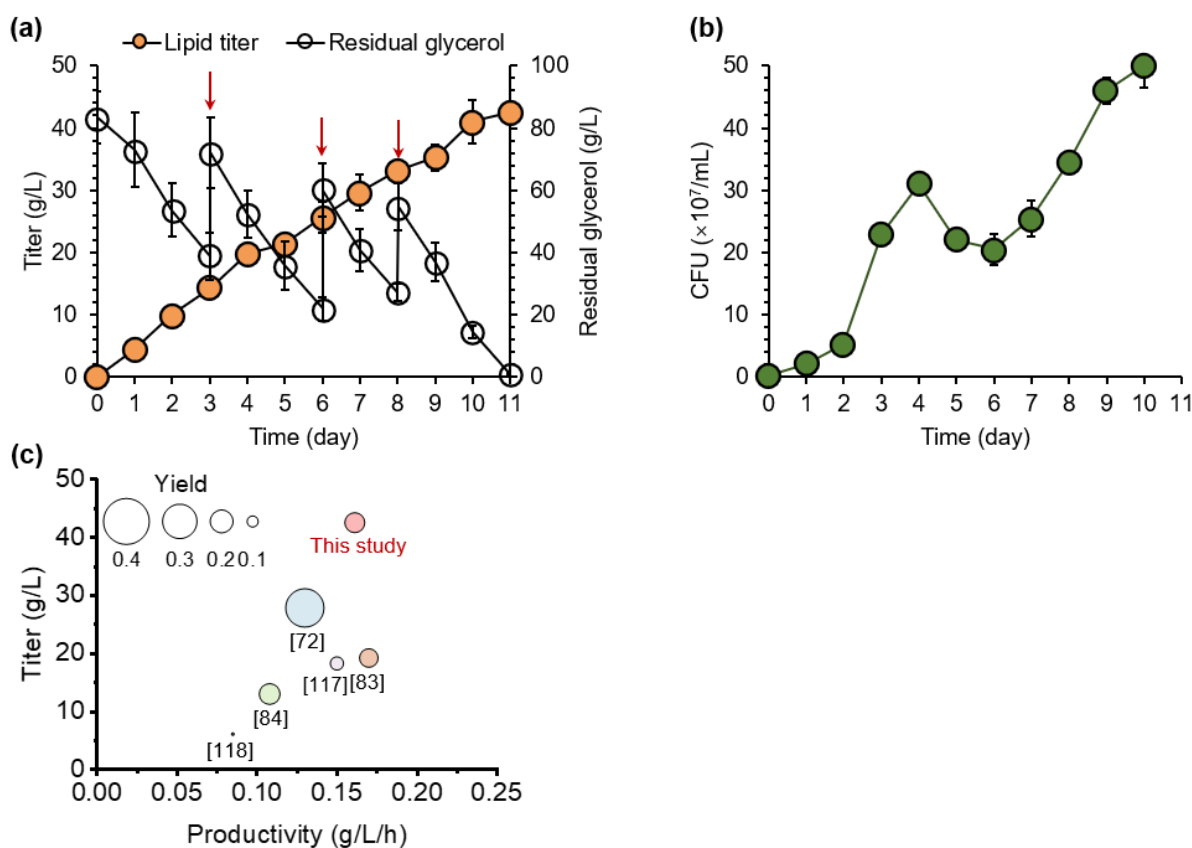


图 3.8 圆红冬孢酵母进化菌株 *R. toruloides*XR20 分批补料发酵粗甘油生产油脂

Fig. 3.8 Fed-batch fermentation for lipid production from crude glycerol by evolved *R. toruloides* XR20: (a) Time curves about lipid titer and residual glycerol; (b) Time curves about CFU; (c) Fermentation performance compared to the reported studies^[72, 83, 84, 117, 118]

3.4 本章小结

圆红冬孢酵母作为一种常见的产油酵母，能利用多种底物，对粗甘油种杂质的耐受能力强，可以作为用粗甘油产微生物油脂的实验菌株。本研究是利用超离心力适应性进化提升菌株利用粗甘油为产微生物的能力，最终得到高产油脂的圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20。通过对菌株 *R. toruloides* XR20 进行细胞表征，摇瓶发酵优化菌株发酵条件来进一步提升菌株 *R. toruloides* XR20 的油脂产量。总结得出以下结论：

(1) 实验室已有的三株产油酵母 (*T. cutaneum* ACCC 20271, *Y. lipolytica* DSM 3286 和 *R. toruloides* CGMCC 2.1389) 在粗甘油中的生长情况均优于纯甘油, 在粗甘油限氮培养基生长 144 h 后, 圆红冬孢酵母的 DCW、油脂产量和油脂含量均最高, 说明圆红冬孢酵母是这三种菌株中最适合用粗甘油产油脂的菌株。

(2) *R. toruloides* CGMCC 2.1389 在粗甘油进化培养基中, 进行超离心力适应性进化 33 代 (共 200 天), 并于传代时逐次提升离心力, 菌株的油脂产量不断上升。最终, 油脂产量提升从最初的 4.5 g/L 至 19.8 g/L, 提高了 3.4 倍将进化菌株命名为 *R. toruloides* XR20。对进化菌株 *R. toruloides* XR20 进行细胞表征, 以原始菌株 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 为对照, *R. toruloides* XR20 的细胞体积较原始菌株增大 3.6 倍, 油脂含量是原始菌株的两倍; 单位细胞壁细胞壁的葡聚糖、甘露聚糖和几丁质含量均降低,; 胞内 NADPH 和乙酰辅酶 A 含量在较原始菌株增加, 使得菌株 *R. toruloides* XR20 油脂产量提升。从 qPCR 结果看出, *R. toruloides* XR20 中 ME 的糖代谢和脂肪酸合成相关基因转录水平上调, 这也促进了脂质积累。

(3) 通过摇瓶发酵对菌株 *R. toruloides* XR20 进行发酵条件优化, 菌株在 C/N 为 100、初始粗甘油浓度为 95.0 g/L (含有甘油约 80.0 g/L)、有机氮(CSL)/无机氮((NH₄)₂SO₄) 为 0.25、KH₂PO₄ 含量为 2.0 g/L 时能够最利于该菌株油脂的生产, 菌株 *R. toruloides* XR20 在优化后发酵条件的摇瓶培养中最高油脂产量为 21.8 g/L。用 3 L 发酵罐对原始菌株 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 和菌株 *R. toruloides* XR20 进行粗甘油产油脂的分批发酵, *R. toruloides* XR20 产出 24.5 g/L 油脂, 较原始菌株 17.4 g/L 的油脂产量提升 40.8%左右, 油脂含量为 65.3%, 油脂得率为 0.32 g/g, 油脂产率为 0.17 g/L/h。菌株 *R. toruloides* XR20 能够利用粗甘油培养基中含有的少量脂肪酸甲酯, 菌株产生的脂肪酸多为油酸和亚油酸, 共占比 57% 以上。对菌株 *R. toruloides* XR20 进行粗甘油分批补料发酵, 甘油每消耗一半时补充粗甘油补料母液至原培养基水平, 补料 3 次, 发酵 11 天, 培养体系中共加入粗甘油 234.0 g/L (含有甘油约 200.0 g/L), 产出 42.56 g/L 油脂, 油脂含量为 74.9%, 油脂得率为 0.182 g/g, 油脂产率为 0.161 g/L/h。

第4章 结论与展望

4.1 结论及创新点

粗甘油是生物柴油的副产物，有产量大、处理难度大和处理成本高等问题。将能利用粗甘油的产油酵母把利用粗甘油转化为微生物油脂，使得生物柴油生产过程中零废弃物排放，是一种可持续的绿色的处理方式。圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*) 鲁棒性强，可利用多种底物，能耐受粗甘油中抑制物，是本实验的理想菌株。本研究通过对圆红冬孢酵母进行超离心力适应性进化，提高了其油脂产量，从而有利于粗甘油的再利用，并促进了生物柴油生产过程中能量的循环。本论文的主要研究结果如下：

(1) 验证实验室已有的超离心适应性进化提升产油酵母油脂含量的方法对菌株 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 有效。对圆红冬孢酵母进行连续 36 代（共 216 天）的超离心力适应性进化（以葡萄糖为底物），离心力逐次提升至 53,000 g，离心时间为 0-15 min，使得圆红冬孢酵母的油脂含量从 47% 提升至 75%，再经过玉米油的进一步筛选最终提升油脂含量至 80%，该进化菌株与原始菌株之间的差异较为稳定。圆红冬孢酵母进化菌株与原始菌株相比，细胞体积增大 10 倍左右，细胞增殖一代所用时间延长 1 h 左右，细胞壁中葡聚糖、甘露聚糖和几丁质含量减少，说明通过进化菌株细胞壁明显变薄，利于体积增大和油脂的积累；胞内 NADPH 和乙酰辅酶 A 含量比原始菌株更高，结合转录组学分析，说明菌株的糖代谢和脂肪酸代谢明显增强，有利于菌株的油脂的生产和积累。

(2) 对三株产油酵母 (*T. cutaneum* ACCC 20271, *Y. lipolytica* DSM 3286 和 *R. toruloides* CGMCC 2.1389) 进行利用粗甘油产油脂能力的评价，圆红冬孢酵母在粗甘油中生长和产油能力更好，将其用于粗甘油产油脂的研究。将 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 在粗甘油限氮培养基中进行连续 33 代（共 200 天）的超离心力适应性进化，离心力逐次提升至 53,000g，离心时间为 0-15 min，使圆红冬孢酵母的油脂产量从 4.5 g/L 提升至 19.8 g/L，提高了 3.4 倍，将该进化菌株命名为 *R. toruloides* XR20。对菌株 *R. toruloides* XR20 进行细胞表征，该进化菌株的油脂含量为 63.6%，是原始菌株的 2 倍左右；细胞体积增大 3.6 倍左右，细胞壁的主要成分含量降低，胞内 NADPH 和乙酰辅酶 A 含量在较原始菌株增加了 15.2% - 42.2% 和 68.8% - 68%，结合 qPCR 结果分析得脂肪酸合成和糖代谢的相关基因均有上调，相关基因的上调会助于 NADPH、丙酮酸和乙酰辅酶 A 的再生，前体物质的充足供应使得菌株 *R. toruloides* XR20 油脂产量大幅提高。

(3) 通过摇瓶发酵和发酵罐的发酵进一步提升菌株 *R. toruloides* XR20 的利用粗甘油产油脂的产量。通过摇瓶发酵对菌株 *R. toruloides* XR20 进行发酵条件优化，菌株在 C/N 为

100、初始粗甘油浓度为 95.0 g/L (含有甘油约 80.0 g/L)、有机氮(CSL)/无机氮((NH₄)₂SO₄) 为 0.25、KH₂PO₄ 含量为 2.0 g/L 时最利于该菌株油脂的生产, 菌株 *R. toruloides* XR20 在摇瓶中发酵获得的最高油脂产量为 21.8 g/L。用 3 L 发酵罐对原始菌株 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 和 *R. toruloides* XR20 进行粗甘油产油脂的分批发酵, 经过 144 h 的粗甘油限氮培养基的培养, *R. toruloides* XR20 产出 24.5 g/L 油脂, 较原始菌株 17.4 g/L 的油脂产量提升 40.8% 左右, 其 CFU 能不断增长, 油脂含量为 65.3%, 油脂得率为 0.32 g/g, 油脂产率为 0.17 g/L/h。*R. toruloides* XR20 能够利用粗甘油培养基中含有的少量脂肪酸甲酯, 菌株在粗甘油产生的脂肪酸多为油酸和亚油酸, 共占比 57% 以上。用 3 L 发酵罐对菌株 *R. toruloides* XR20 进行粗甘油分批补料发酵, 培养体系中共加入粗甘油 234.0 g/L (含有甘油约 200.0 g/L), 发酵 11 d 后耗尽所有甘油, 菌株产出 42.56 g/L 油脂, 油脂含量为 74.9%, 油脂得率为 0.182 g/g, 油脂产率为 0.161 g/L/h, 刷新了粗甘油产微生物油脂的最高产量。

本研究的创新点是首次系统验证了超离心力适应性进化技术对圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*) 微生物油脂合成能力的普适性强化作用, 并揭示该方法可协同强化菌株对粗甘油底物的高效转化与脂质定向积累能力。

4.2 展望

本研究验证了超离心力适应性进化提升产油酵母油脂含量的方法在圆红冬孢酵母的可行性。本研究将上述进化方法应用于圆红冬孢酵母将粗甘油转化为微生物油脂的过程中, 有效提升了其油脂含量和产量。进一步通过摇瓶对发酵条件单因素优化、分批发酵和分批补料发酵提升了圆红冬孢酵母利用粗甘油产微生物油脂的产量, 提高了粗甘油的利用率。但是本研究仍需要深入研究以下内容:

(1) 在超离心力胁迫适应性进化过程中, 圆红冬孢酵母的油脂含量和类胡萝卜素含量均得到了提高, 其潜在机制需要进一步探究。

(2) 圆红冬孢酵母 *R. toruloides* XR20 在粗甘油中的适应性进化的体积变化未到达在葡萄糖体系中进化的体积差异, 这表明进化时间和方式可能未达到最佳状态, 因此该菌株利用粗甘油产油脂的产量仍有提升空间。

(3) 本研究并未对圆红冬孢酵母利用粗甘油产微生物油脂, 以及进一步转化为生物柴油的生产过程进行物料和能量的衡算。

参考文献

- [1] Zou C N, Ma F, Pan S Q, et al. Earth energy evolution, human development and carbon neutral strategy [J]. *Petroleum Exploration and Development*, 2022, 49(2): 468-88.
- [2] Lelieveld J, Haines A, Burnett R, et al. Air pollution deaths attributable to fossil fuels: observational and modelling study [J]. *Bmj-British Medical Journal*, 2023, 383.
- [3] Wang J N, Azam W. Natural resource scarcity, fossil fuel energy consumption, and total greenhouse gas emissions in top emitting countries [J]. *Geoscience Frontiers*, 2024, 15(2).
- [4] Murphy R. What is undermining climate change mitigation? How fossil-fuelled practices challenge low-carbon transitions [J]. *Energy Research & Social Science*, 2024, 108.
- [5] Kosamia N M, Samavi M, Uprety B K, et al. Valorization of Biodiesel Byproduct Crude Glycerol for the Production of Bioenergy and Biochemicals [J]. *Catalysts*, 2020, 10(6).
- [6] Hou H T, Lu W, Liu B, et al. Exploring the Role of Fossil Fuels and Renewable Energy in Determining Environmental Sustainability: Evidence from OECD Countries [J]. *Sustainability*, 2023, 15(3).
- [7] Razmjoo A, Kaigutha L G, Rad M A V, et al. A Technical analysis investigating energy sustainability utilizing reliable renewable energy sources to reduce CO₂ emissions in a high potential area [J]. *Renewable Energy*, 2021, 164: 46-57.
- [8] Zhao P T, Shen Y F, Ge S F, et al. Clean solid biofuel production from high moisture content waste biomass employing hydrothermal treatment [J]. *Applied Energy*, 2014, 131: 345-67.
- [9] Moradian J M, Fang Z, Yong Y C. Recent advances on biomass-fueled microbial fuel cell [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1).
- [10] Wang T, Zhou T, Li C R, et al. Development Status and Prospects of Biomass Energy in China [J]. *Energies*, 2024, 17(17).
- [11] Li B L, Haneklaus N. The role of clean energy, fossil fuel consumption and trade openness for carbon neutrality in China [J]. *Energy Reports*, 2022, 8: 1090-8.
- [12] Alper K, Tekin K, Karagöz S, et al. Sustainable energy and fuels from biomass: a review focusing on hydrothermal biomass processing [J]. *Sustainable Energy & Fuels*, 2020, 4(9): 4390-414.
- [13] Tomatis M, Jeswani H K, Azapagic A. Environmental impacts of valorisation of crude glycerol from biodiesel production - A life cycle perspective [J]. *Waste Management*, 2024, 179: 55-65.
- [14] Bansod Y, Crabbe B, Forster L, et al. Evaluating the environmental impact of crude glycerol purification derived from biodiesel production: A comparative life cycle assessment study [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2024, 437.
- [15] Takakuwa N, Nagahama S, Matsumura H, et al. Efficient conversion of crude glycerol into triacylglycerol by the yeast *Pseudozyma* sp. TYC-2187 for biodiesel production [J]. *Journal of Oleo Science*, 2013, 62(8): 605-12.
- [16] Chen J, Yan S, Zhang X, et al. Chemical and biological conversion of crude glycerol derived from waste cooking oil to biodiesel [J]. *Waste Manage*, 2018, 71: 164-75.

- [17] Yang F X, Hanna M A, Sun R C. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5.
- [18] Math M C, Kumar S P, Chetty S V. Technologies for biodiesel production from used cooking oil — A review [J]. *Energy for Sustainable Development*, 2010, 14(4): 339-45.
- [19] Ma F, Hanna M A. Biodiesel production: a review [J]. *Journal Series #12109, Agricultural Research Division, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska—Lincoln*. 1 [J]. *Bioresource Technology*, 1999, 70(1): 1-15.
- [20] Saladini F, Patrizi N, Pulselli F M, et al. Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 66: 221-7.
- [21] Maheshwari P, Haider M B, Yusuf M, et al. A review on latest trends in cleaner biodiesel production: Role of feedstock, production methods, and catalysts [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022, 355.
- [22] Farouk S M, Tayeb A M, Abdel-Hamid S M S, et al. Recent advances in transesterification for sustainable biodiesel production, challenges, and prospects: a comprehensive review [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2024, 31(9): 12722-47.
- [23] Kumar L R, Kaur R, Tyagi R D, et al. Identifying economical route for crude glycerol valorization: Biodiesel versus polyhydroxy-butyrates (PHB) [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 323.
- [24] Wang H, Li H P, Lee C K, et al. A systematic review on utilization of biodiesel-derived crude glycerol in sustainable polymers preparation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 261.
- [25] Li Q, Huang B, He Q F, et al. Production of succinate from simply purified crude glycerol by engineered *Escherichia coli* using two-stage fermentation [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5.
- [26] Raman A A A, Tan H W, Buthiyappan A. Two-Step Purification of Glycerol as a Value Added by Product From the Biodiesel Production Process [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2019, 7.
- [27] Raza M, Inayat A, Abu-Jdayil B. Crude Glycerol as a Potential Feedstock for Future Energy via Thermochemical Conversion Processes: A Review [J]. *Sustainability*, 2021, 13(22).
- [28] Kumar L R, Yellapu S K, Tyagi R D, et al. A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 293.
- [29] Luo X L, Ge X M, Cui S Q, et al. Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 215: 144-54.
- [30] Legodi L M, Moganedi K L M. Selection of oleaginous yeasts isolated from sugarcane bagasse as the potential producers of single cell oils and other metabolites [J]. *Annals of Microbiology*, 2023, 73(1): 21.
- [31] Celińska E, Drożdżyńska A, Jankowska M, et al. Genetic engineering to improve 1,3-propanediol production in an isolated *Citrobacter freundii* strain [J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(1): 48-60.
- [32] Ma J S, Jiang H, Hector S B, et al. Adaptability of *Klebsiella pneumoniae* 2e, a Newly Isolated 1,3-Propanediol-Producing Strain, to Crude Glycerol as Revealed by Genomic Profiling [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(10).

-
- [33] Jensen T L, Kvist T, Mikkelsen M J, et al. Production of 1,3-PDO and butanol by a mutant strain of *Clostridium pasteurianum* with increased tolerance towards crude glycerol [J]. *Amb Express*, 2012, 2.
- [34] Vodnar D C, Dulf F V, Pop O L, et al. L (+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* NRRL 395 on biodiesel crude glycerol [J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12.
- [35] Anastácio G S, Santos K O, Suarez P A Z, et al. Utilization of glycerin byproduct derived from soybean oil biodiesel as a carbon source for heterologous protein production in *Pichia pastoris* [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 152: 505-10.
- [36] Ferreira P, Mota M, Belo I. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* from crude glycerol: Influence of oxygen mass transfer rate (OTR) [J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 208: S48-S.
- [37] Kumar L R, Yellapu S K, Tyagi R D, et al. Purified crude glycerol by acid treatment allows to improve lipid productivity by *Yarrowia lipolytica* SKY7 [J]. *Process Biochemistry*, 2020, 96: 165-73.
- [38] Martín-Hernández G C, Chmielarz M, Müller B, et al. Enhanced glycerol assimilation and lipid production in *Rhodotorula toruloides* CBS14 upon addition of hemicellulose primarily correlates with early transcription of energy-metabolism-related genes [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1).
- [39] Li-Beisson Y, Thelen J J, Fedosejevs E, et al. The lipid biochemistry of eukaryotic algae [J]. *Progress in Lipid Research*, 2019, 74: 31-68.
- [40] Feng H, Zhang J. Review of Lipid Accumulation Utilizing Filamentous Fungi *Umbelopsis Isabellina* [J]. *Shanghai Ligong Daxue Xuebao/Journal of University of Shanghai for Science and Technology*, 2017, 39: 381-8.
- [41] Maza D D, Barros J M, Guillamón J M, et al. Valorization of Sugarcane Vinasse and Crude Glycerol for Single-Cell Oils Production by *Rhodotorula glutinis* R4: A Preliminary Approach to the Integration of Biofuels Industries for Sustainable Biodiesel Feedstock [J]. *Fermentation-Basel*, 2024, 10(4).
- [42] Ye Y, Liu M J, Yu L H, et al. *Nannochloropsis* as an Emerging Algal Chassis for Light-Driven Synthesis of Lipids and High-Value Products [J]. *Marine Drugs*, 2024, 22(2).
- [43] Khoo K S, Ahmad I, Chew K W, et al. Enhanced microalgal lipid production for biofuel using different strategies including genetic modification of microalgae: A review [J]. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2023, 96.
- [44] Almutairi A W. Harnessing waste glycerol to mitigate salinity constraints in freshwater microalgae cultivation for enhanced biodiesel recovery [J]. *Journal of King Saud University Science*, 2024, 36(7).
- [45] Zhou J J, Wang M, Saraiva J A, et al. Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches [J]. *Food Chemistry*, 2022, 384.
- [46] Tanamool V, Enmak P, Kaewkannetra P. Batch Fermentation of Salt-Acclimatizing Microalga for Omega-3 Docosahexaenoic Acid Production Using Biodiesel-Derived Crude Glycerol Waste as a Low-Cost Substrate [J]. *Fermentation-Basel*, 2024, 10(2).
- [47] Wang M, Ye X X, Bi H W, et al. Microalgae biofuels: illuminating the path to a sustainable future amidst challenges and opportunities [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*,

- 2024, 17(1).
- [48] Yang Y, Heidari F, Hu B. Fungi (Mold)-Based Lipid Production [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1995: 51-89.
- [49] Kalampounias G, Dritsas P, Karayannis D, et al. Polyunsaturated Fatty Acids from *Thamnidium elegans* and *Mortierella alpina* Suppress Prostate Cancer Cell Proliferation and Migration [J]. *Fermentation-Basel*, 2024, 10(11).
- [50] Tang X, Chen H, Gu Z, et al. Comparative Proteome Analysis between High Lipid-Producing Strain *Mucor circinelloides* WJ11 and Low Lipid-Producing Strain CBS 277.49 [J]. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 2017, 65(24): 5074-82.
- [51] Jeennor S, Anantayanon J, Panchanawaporn S, et al. Reengineering lipid biosynthetic pathways of *Aspergillus oryzae* for enhanced production of γ -linolenic acid and dihomogamma-linolenic acid [J]. *Gene*, 2019, 706: 106-14.
- [52] 柳杰, 刘文慧, 王晚晴, et al. 产油微生物及其发酵原料的研究进展 [J]. *环境工程*, 2017, 35(3): 132.
- [53] Matouk A M, Abu-Elreesh G M, Abdel-Rahman M A, et al. Response surface methodology and repeated-batch fermentation strategies for enhancing lipid production from marine oleaginous *Candida parapsilosis* Y19 using orange peel waste [J]. *Microbial Cell Factories*, 2025, 24(1).
- [54] Wang Y N, Liu F J, Liu H D, et al. Regulation of autophagy and lipid accumulation under phosphate limitation in *Rhodotorula toruloides* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1046114.
- [55] Wu S, Zhao X, Shen H, et al. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1803-7.
- [56] Blazeck J, Hill A, Liu L Q, et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production [J]. *Nature Communications*, 2014, 5.
- [57] Dishisha T, Jain M, Hatti-Kaul R. High cell density sequential batch fermentation for enhanced propionic acid production from glucose and glycerol/glucose mixture using *Acidipropionibacterium acidipropionici* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1).
- [58] Xu P, Li L Y, Zhang F M, et al. Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(31): 11299-304.
- [59] Samul D, Leja K, Grajek W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production [J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(3): 891-8.
- [60] Sitepu I R, Garay L A, Sestric R, et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production [J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(7): 1336-60.
- [61] Liu S, Zhang M, Ren Y, et al. Engineering *Rhodospiridium toruloides* for limonene production [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 243.
- [62] Jiao X, Lyu L, Zhang Y, et al. Reduction of lipid-accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* through CRISPR/Cas9-mediated inactivation of lipid droplet structural proteins [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2021, 368(16).
- [63] Lee J W, Yook S, Koh H, et al. Engineering xylose metabolism in yeasts to produce biofuels and chemicals [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 67: 15-25.

- [64] Chattopadhyay A, Maiti M K. Lipid production by oleaginous yeasts [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2021, 116: 1-98.
- [65] Kamineni A, Shaw J. Engineering triacylglycerol production from sugars in oleaginous yeasts [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 239-47.
- [66] Lee J W, Yook S, Koh H, et al. Engineering xylose metabolism in yeasts to produce biofuels and chemicals [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 67: 15-25.
- [67] Zhang H, Zhang L, Chen H, et al. Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP:citrate lyase from *Mus musculus* [J]. *The Journal of Biotechnology*, 2014, 192 Pt A: 78-84.
- [68] Morin N, Cescut J, Beopoulos A, et al. Transcriptomic analyses during the transition from biomass production to lipid accumulation in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Public Library of Science ONE*, 2011, 6(11): e27966.
- [69] Diwan B, Parkhey P, Gupta P. From agro-industrial wastes to single cell oils: a step towards prospective biorefinery [J]. *Folia Microbiologica (Praha)*, 2018, 63(5): 547-68.
- [70] 高振, 马晓宇, 高明, et al. 圆红冬孢酵母利用生物柴油副产物粗甘油产油脂的影响因素分析 [J]. *环境工程*, 2020, 38(08): 52-7.
- [71] Uprety B K, Dalli S S, Rakshit S K. Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities [J]. *Energy Conversion and Management*, 2017, 135: 117-28.
- [72] Polburee P, Limtong S. Economical lipid production from crude glycerol using *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMKU-RK253 in a two-stage cultivation under non-sterile conditions [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2020, 138: 105597.
- [73] Wang Y, Zhang S, Pötter M, et al. Overexpression of $\Delta 12$ -Fatty Acid Desaturase in the Oleaginous Yeast *Rhodospiridium toruloides* for Production of Linoleic Acid-Rich Lipids [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 180(8): 1497-507.
- [74] Chmielarz M, Blomqvist J, Sampels S, et al. Microbial lipid production from crude glycerol and hemicellulosic hydrolysate with oleaginous yeasts [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 65.
- [75] Spier F, Buffon J G, Burkert C A. Bioconversion of Raw Glycerol Generated from the Synthesis of Biodiesel by Different Oleaginous Yeasts: Lipid Content and Fatty Acid Profile of Biomass [J]. *Indian Journal Of Microbiology*, 2015, 55(4): 415-22.
- [76] Munch G, Sestric R, Sparling R, et al. Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 185: 49-55.
- [77] Xu J, Zhao X, Wang W, et al. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 65: 30-6.
- [78] Bansal N, Dasgupta D, Hazra S, et al. Corrigendum to “Effect of utilization of crude glycerol as substrate on fatty acid composition of an oleaginous yeast *Rhodotorula mucilagenosa* IPL32: Assessment of nutritional indices” [Bioresour. Technol. 309 (2020) 123330–123338] [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 359: 127509.
- [79] Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, et al. Lipid production for second generation biodiesel by

- the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis* [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 111: 398-403.
- [80] Yen H-W, Yang Y-C, Yu Y-H. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis* [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 114(4): 453-6.
- [81] Boonyarit J, Polburee P, Khaenda B, et al. Lipid Production from Sugarcane Top Hydrolysate and Crude Glycerol with *Rhodospiridiobolus fluvialis* using a Two-Stage Batch-Cultivation Strategy with Separate Optimization of Each Stage [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3).
- [82] Karamerou E E, Theodoropoulos C, Webb C. Evaluating feeding strategies for microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis* [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2017, 17(3): 314-24.
- [83] Leiva-Candia D E, Tsakona S, Kopsahelis N, et al. Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 190: 57-65.
- [84] Uçkun Kiran E, Trzcinski A, Webb C. Microbial oil produced from biodiesel by-products could enhance overall production [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 129: 650-4.
- [85] Sriphuttha C, Boontawan P, Boonyanan P, et al. Simultaneous Lipid and Carotenoid Production via *Rhodotorula paludigena* CM33 Using Crude Glycerol as the Main Substrate: Pilot-Scale Experiments [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(24).
- [86] Yen H-W, Liu Y X, Chang J-S. The effects of feeding criteria on the growth of oleaginous yeast—*Rhodotorula glutinis* in a pilot-scale airlift bioreactor [J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2015, 49: 67-71.
- [87] Wu C C, Okano K, Religia P, et al. Combination of Two-Stage Continuous Feeding and Optimized Synthetic Medium Increases Lipid Production in *Lipomyces starkeyi* [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2025, 25(1).
- [88] Wang X L, Sun Y Q, Pan D T, et al. Kinetics-based development of two-stage continuous fermentation of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2024, 17(1).
- [89] Zhu Z, Zhang S, Liu H, et al. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides* [J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 1112.
- [90] Lin X, Wang Y, Zhang S, et al. Functional integration of multiple genes into the genome of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2014, 14(4): 547-55.
- [91] Wang S, Kamal R, Zhang Y, et al. Expression of VHb Improved Lipid Production in *Rhodospiridium toruloides* [J]. *Energies*, 2020, 13(17): 4446.
- [92] Hirasawa T, Maeda T. Adaptive Laboratory Evolution of Microorganisms: Methodology and Application for Bioproduction [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(1).
- [93] Sandberg T E, Salazar M J, Weng L L, et al. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology [J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 1-16.
- [94] Sun X M, Ren L J, Zhao Q Y, et al. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11.
- [95] Tsigirga A, Theodosiou E, Patsios S I, et al. Novel evolved *Yarrowia lipolytica* strains for

- enhanced growth and lipid content under high concentrations of crude glycerol [J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 62.
- [96] Liu Q, Lu M, Jin C, et al. Ultra-centrifugation force in adaptive evolution changes the cell structure of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* into a favorable space for lipid accumulation [J]. *Biotechnology And Bioengineering*, 2022, 119(6): 1509-21.
- [97] Choi J W, Song N E, Hong S P, et al. Engineering *Bacillus subtilis* J46 for efficient utilization of galactose through adaptive laboratory evolution [J]. *Amb Express*, 2024, 14(1).
- [98] Kumar L R, Yellapu S K, Tyagi R D, et al. Microbial lipid and biodiesel production from municipal sludge fortified with crude glycerol medium using pH-based fed-batch strategy [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9(1): 105032.
- [99] Wang M, Yang Y, Han L, et al. Cell mechanical microenvironment for cell volume regulation [J]. *The Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(5): 4070-81.
- [100] Gaubitz C, Prouteau M, Kusmider B, et al. TORC2 Structure and Function [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 41(6): 532-45.
- [101] Niles B J, Powers T. TOR complex 2-Ypk1 signaling regulates actin polarization via reactive oxygen species [J]. *Molecular Biology Of The Cell*, 2014, 25(24): 3962-72.
- [102] Liu Q, Li Y, Hou W, et al. Cellulase mediated stress triggers the mutations of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* with super-large spindle morphology and high lipid accumulation [J]. *Biotechnology Journal*, 2023, 18(8): e2300091.
- [103] Puerner C, Kukhaleishvili N, Thomson D, et al. Mechanical force-induced morphology changes in a human fungal pathogen [J]. *Bmc Biology*, 2020, 18(1): 122.
- [104] Minc N, Boudaoud A, Chang F. Mechanical Forces of Fission Yeast Growth [J]. *Current Biology*, 2014, 24(12): 1436.
- [105] Kumar L R, Yellapu S K, Tyagi R D, et al. Purified crude glycerol by acid treatment allows to improve lipid productivity by *Yarrowia lipolytica* SKY7 [J]. *Process Biochemistry*, 2020, 96: 165-73.
- [106] Chattopadhyay A, Mitra M, Maiti M K. Recent advances in lipid metabolic engineering of oleaginous yeasts [J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 53: 107722.
- [107] Chen J, Zhang X, Yan S, et al. Lipid production from fed-batch fermentation of crude glycerol directed by the kinetic study of batch fermentations [J]. *Fuel*, 2017, 209: 1-9.
- [108] Kamal R, Liu Y, Li Q, et al. Exogenous l-proline improved *Rhodospiridium toruloides* lipid production on crude glycerol [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 159.
- [109] Bellou S, Triantaphyllidou I E, Mizerakis P, et al. High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium [J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 234: 116-26.
- [110] Zhao D, Li C. Multi-omics profiling reveals potential mechanisms of culture temperature modulating biosynthesis of carotenoids, lipids, and exopolysaccharides in oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* ZHK [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2022, 171: 114103.
- [111] Liu L-p, Zong M-H, Hu Y, et al. Efficient microbial oil production on crude glycerol by *Lipomyces starkeyi* AS 2.1560 and its kinetics [J]. *Process Biochemistry*, 2017, 58.
- [112] Wang Y, Zhang S, Zhu Z, et al. Systems analysis of phosphate-limitation-induced lipid

- accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 148.
- [113] Wu S, Zhao X, Shen H, et al. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1803-7.
- [114] Zhao Y, Song B, Li J, et al. *Rhodotorula toruloides*: an ideal microbial cell factory to produce oleochemicals, carotenoids, and other products [J]. *World journal of microbiology & biotechnology*, 2021, 38(1): 13.
- [115] Hassan T, Rahman M M, Rahman M A, et al. Opportunities and challenges for the application of biodiesel as automotive fuel in the 21st century [J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2022, 16(5): 1353-87.
- [116] Mathiazhakan K, Ayed D, Tyagi R D. Kinetics of lipid production at lab scale fermenters by a new isolate of *Yarrowia lipolytica* SKY7 [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 221: 234-40.
- [117] Signori L, Ami D, Posterl R, et al. Assessing an effective feeding strategy to optimize crude glycerol utilization as sustainable carbon source for lipid accumulation in oleaginous yeasts [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 75.
- [118] Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge T T, et al. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids [J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(1): 210-8.

致谢

三年硕士生涯即将结束，回想这三年的点点滴滴有很多难忘的事情。从最开始接触全新课程和实验的不适应，到后来游刃有余地处理各种生活和实验问题，真的感觉自己成长了很多。这三年主要的时间都是和实验室小伙伴和舍友们一起度过，跟大家的相处中受益颇多。在这期间有很多给予我帮助和鼓励的师长和朋友，最后在这里对大家表示深深感谢和由衷的祝福。

首先，要感谢我的导师鲍杰老师和张斌老师对我实验上的悉心指导，为我点亮了学术之路。其次，感谢刘祺师姐和张翼师兄对我分析和解决实验问题的帮助，感谢同窗王洁、实验室师兄师姐师弟师妹，以及舍友李梦瑶、张景悦、王钰迪的陪伴与支持，这些共同奋斗的日子，是我宝贵的回忆。最后，感谢家人和朋友一直以来的理解与鼓励，你们是我坚实的后盾。希望大家都能有光明的未来，以后越来越好。

王新茹

学术成果

Xinru Wang, Bin Zhang, Jie Bao. Adaptive evolution of *Rhodospiridium toruloides* under ultra-centrifugal stress and fractionation leads to a high microbial lipid production using crude glycerol feedstock[J]. Journal of Biotechnology (已投稿, 未发表)

鲍杰. 王新茹. 张斌. 一株能利用粗甘油产微生物油脂的圆红冬孢酵母及其应用 (专利申请号: 202510721660.7)

附录 I

表 1 第三章 RT-qPCR 实验引物

Table 1 Primers for RT-qPCR in chapter 3

Gene ID	Annotation	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
RHTO_03915	ACL	GCCGAGGGCAAGCAGTGGAT	CGAAGGGTGAGGGCAGAACG
RHTO_02004	ACC	TCATCGCCAACAATGGTATCGC	CGCTCGCTTCCGAACGTCTC
RHTO_02657	ELO	CAGTCATCTTTGGAGGACAGGC	CATCAGGGCGAGAAGGAGGC
RHTO_02032	FAS1	GAGGGCGACGACGAGAAGGA	CGGACGCAAAGTGGTTGAAGG
RHTO_02139	FAS2	CAAGCAGCACTACTGGGACCTCT	CCCTCGATGCCGACAACACG
RHTO_03910	FAD1	GAGGGCTACCACA ACTTCCACC	GCCAATCCGAGCTTCGACAT
RHTO_06538	FAD2	CCGCCGTTTCGTCTACCCAA	TACCCGAGACCCGCGAGCAT
RHTO_02273	GPD	CTCATCGGGAGCGGAAACTG	AGTCCTCCTCGTAGCACCACA
RHTO_06391	GPAT	CTGGCGTTCCTACACCGACTA	CCGCTTCTCCGTCACTTCT
RHTO_06718	LPAT	TTACCTCCGCCTGACGACTTTC	CACTGGTTGTCCTTTCCTTGC
RHTO_05653	PAP	CAAACGGAGCTTGCATGACG	CCCCTGACAGCGGGAGAAG
RHTO_01962	DGAT	GACGCCCGAGGAGCTATACAC	GGAGGAAGAAGACGCCGAGTA
RHTO_06753	GUT1	GGTCGTGCTCAAGTCCAAGAAG	AAGTCGGTTTGCTGGTGCTG
RHTO_08013	GPD	AGCGACGACGAGACGGACAA	TGGCGAGGAAAGGAGCGAGA
RHTO_03817	GCY1	GGACGTGGAAGAGCGAGCCT	CGTTTCCTTGCGACCACTTGA
RHTO_06134	GUP	GTCACCACCGTCGCCAAGGA	CGAGGATTTGCGAAAGCATGTAG
RHTO_01329	TPI	CTCGCCC GCAAGGGTATCTC	TGACCCAGTTCAAGCCGATGT
RHTO_01292	GAPD	ATCGGTATCTCAGGCTTTGGG	GGTTGATGGCGACGACTTGC
RHTO_00033	PGK	ATCACCAACAACCAGCGCATCA	GCGACGGGCTTGAGCGAGTA
RHTO_07820	PGM	CCAGATCGCAGCAGGAAACG	TCGCCGTGAGGAGGATACCG
RHTO_00323	ENO	AAGTCCAAGTATCTCGGCAAGGG	CCGTCAAGCTGGATGAGGAAG
RHTO_01610	PYK	TGAACTTCTCGCACGGCTCG	TGTTGCCGGTACGGATCTCG
RHTO_01852	PDHA	AAGGTCAAGGTCCAGCTCCACG	GGCCATCTCCATACGGCGCATCTCG
RHTO_01754	PDHB	TCGCCAGCTCCATGCCTCTT	TCCCTCCTTGACCTTCCACTCC

续表 1

Gene ID	Annotation	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
RHTO_03915	CS	GCCGAGGGCAAGCAGTGGAT	CGAAGGGTGAGGGCAGAACG
RHTO_02628	PC	ACGCCTGTCGCAGCCTACCT	GCCCGCTTCTTCGACCTTGC
RHTO_03795	ME	CCAACTCGGACCAAAAGAACT	TCAATCCAGCGAGGAAGGTAT
RHTO_05318	ACO	GGGTTGCCAGAGGGAAAGGT	AAGACGGTCTGTGCGGGTGG
RHTO_04315	IDH	AGGGCTGAGGGAGCTGTGAC	GCAGGGCGGAGGTTGTCGTA
RHTO_00034	α KDH	GTCGCCGTCTCAGGCATCAA	GACGACGACGCTGTGCTTGTA
RHTO_01205	SCS	CGCAGCACGCTCCATTCTCA	CGGTAAAGCCCTGGCAGATGA
RHTO_00723	SDH	ACCACTCGCCGAGCACAGA	CGCTCAAGAGGCGCTCAAAG
RHTO_05746	FH	CCTTCACGTCTTACTCTGCCATCC	CCGCCAATGTCAAAGTTCTGCA
RHTO_06555	MDH	CACCTGTCACATCGGGCTCA	GCGGTGTCAAAGTGCGTGTAG
RHTO_03109	MLS	AACCCTATGACCATCGAGCAGAA	TCTCACTCGCACTCGGGAAAC
RHTO_04998	ICL	CTGTATGTTGGCAAGGAGGAGAA	GAAGCGGAAGACGGTGAAGG
RHTO_04669	DAK1	CTACGACACGACCCTCCTTCTCC	CTCGCAAACACCTGCCCCACT
RHTO_02931	Actin	CAGAAGGACTCGTACGTCGGTG	TCTTCTCCATGTCGTCCCAGTT

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 伍拾叁 页

立卷人_____

检查人_____

立卷时间_____