



产油酵母

Rhodosporidium toruloides

利用廉价原料发酵生产微生物油脂

Microbial lipid production by oleaginous yeast

Rhodosporidium toruloides using low-cost substrates

周稳稳 著

中国农业科学技术出版社



产油酵母

Rhodosporidium toruloides

利用廉价原料发酵生产微生物油脂

Microbial lipid production by oleaginous yeast

Rhodosporidium toruloides using low-cost substrates

周稳稳 著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

产油酵母 *Rhodospiridium toruloides* 利用廉价原料发酵生产微生物
油脂 / 周稳稳著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2017. 1

ISBN 978 - 7 - 5116 - 2236 - 5

I. ①产… II. ①周… III. ①发酵 - 油脂制备 - 研究

IV. ①TQ920. 6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 187516 号

责任编辑 贺可香

责任校对 贾海霞

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010)82106638 (编辑室) (010)82109704 (发行部)
(010)82109703 (读者服务部)

传 真 (010)82109709

网 址 <http://www.castp.cn>

经销者 各地新华书店

印刷者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 850mm × 1 168mm 1/32

印 张 4.75

字 数 120 千字

版 次 2017 年 1 月第 1 版 2017 年 1 月第 1 次印刷

定 价 28.00 元

— 版权所有 · 翻印必究 —

前 言

化石能源日益枯竭，迫使各国转向替代能源开发，以保证国家安全和经济平稳发展。生物柴油是生物能源的重要组成部分，近几年来生物柴油需求量激增，其原料供应压力也日益增大。以植物油脂为原料的高成本问题，限制了生物柴油的产量和推广。微生物油脂是生产生物柴油的良好原料，但培养基经济性问题是制约微生物油脂发展的瓶颈。鉴于此，本书主要介绍产油菌株圆红冬孢酵母（*Rhodospiridium toruloides*）以廉价原料为底物的发酵产油工艺和方法，以期为提高微生物油脂生产效率，降低生产成本提供参考。

本书共分为六章，第一章介绍了微生物油脂的研究背景。第二章介绍了 *R. toruloides* 以生物乙醇废水为底物的发酵产油规律，探讨了补加碳源的浓度和时间对废水 COD 降解率和油脂含量的影响。第三章介绍了木薯生物乙醇废水——木薯淀粉水解液联合发酵产油工艺。第四章阐述了生物乙醇废水中几种代表性有机酸对 *R. toruloides* 生长和产油的影响。*R. toruloides* 可利用苹果酸、琥珀酸和柠檬酸为唯一碳源进行生长和油脂积累，且酵母在高浓度有机酸中有良好的耐受性。第五章介绍了单因素和响应面结合的方法研究金属离子对圆红冬孢酵母生长和产油的影响。第六章阐述了以木薯淀粉水解液为培养基发酵生产微生物油脂过程的优化技术。

作者曾在四川大学化学工程学院张永奎教授实验室从事微生

物油脂的研究工作，积累了一些前期研究结果。此外，本书还结合了很多最新的文献资料和研究成果对 *R. toruloides* 利用廉价原料发酵产油的重要研究内容进行了阐述，供读者参考。但因作者水平有限，欠缺和不妥之处在所难免，恳请广大读者不吝指正。

最后，感谢山西农业大学引进人才博士科研启动费项目（2013YJ03）对本书出版的支持。

著 者

目 录

第一章 微生物油脂的研究背景	(1)
第一节 微生物油脂概述	(2)
一、微生物油脂及其特点	(2)
二、产油微生物的种类	(3)
三、微生物油脂生物合成及代谢调控	(6)
第二节 培养条件对菌体生长及油脂合成的影响	(10)
一、碳源、氮源和碳氮比	(10)
二、pH 值	(13)
三、温度	(13)
四、溶氧量	(14)
五、培养方式	(15)
第三节 微生物细胞反应过程计量学	(18)
一、细胞反应的元素衡算方程	(18)
二、细胞反应过程的得率系数	(19)
第四节 微生物油脂生产存在的问题及研究工作展望 ..	(20)
一、微生物油脂生产存在的问题	(20)
二、研究工作展望	(21)
参考文献	(22)
第二章 圆红冬孢酵母利用生物乙醇废水发酵产油	(36)
第一节 实验材料和仪器	(37)
一、菌种	(37)

二、试剂	(37)
三、实验仪器	(38)
四、培养基及废水性质	(39)
第二节 实验方法	(39)
一、初始 COD、pH 值和接种量优化实验	(39)
二、碳源补加实验	(40)
第三节 分析方法	(40)
第四节 生物量能量衡算方程	(41)
第五节 结果和讨论	(43)
一、初始 COD 浓度、pH 值和接种量优化	(43)
二、优化条件下圆红冬孢酵母在废水中的生长和产油 规律	(46)
三、补加碳源对废水处理和酵母产油的影响	(50)
四、废水发酵产油过程能量衡算	(52)
五、脂肪酸组成分析	(54)
第六节 本章小结	(56)
参考文献	(56)
第三章 木薯生物乙醇废水—木薯淀粉水解液联合发酵 产油	(61)
第一节 实验材料和仪器	(62)
一、菌种	(62)
二、实验试剂和培养基	(62)
三、实验仪器	(62)
第二节 实验方法	(63)
一、菌种的驯化和筛选	(63)
二、废水对驯化后菌株的生物毒性试验	(63)
三、不同糖浓度废水产油实验	(63)
第三节 分析方法	(65)

第四节 结果与讨论	(65)
一、驯化菌株与原始菌株生长特性比较	(65)
二、废水初始 COD 浓度对驯化后菌株的生物毒性 试验	(67)
三、不同碳源浓度下废水发酵产油	(67)
第五节 本章小结	(72)
参考文献	(72)
第四章 响应面法优化培养基金属离子组成	(75)
第一节 实验材料和仪器	(76)
一、菌种	(76)
二、实验试剂	(76)
三、实验仪器	(76)
四、培养基	(76)
第二节 实验方法	(77)
一、响应面实验原理	(77)
二、单因素实验	(77)
三、Box - Behnken 设计实验	(78)
四、验证实验	(78)
五、分析方法	(78)
六、统计方法	(78)
第三节 结果和讨论	(79)
一、金属离子单因素实验	(79)
二、BBD 实验	(84)
第四节 本章小结	(90)
参考文献	(92)
第五章 有机酸对圆红冬孢酵母发酵产油的影响	(96)
第一节 引言	(96)
第二节 实验材料和仪器	(96)

一、菌种	(96)
二、实验试剂	(97)
三、实验仪器	(97)
四、培养基	(97)
第三节 实验方法	(98)
一、限氮培养基有机酸添加实验	(98)
二、限碳培养基有机酸添加实验	(98)
三、以有机酸为唯一碳源发酵实验	(98)
第四节 分析方法	(99)
第五节 结果与讨论	(99)
一、限氮培养基中添加有机酸对酵母生长和产油的影响	(99)
二、限碳培养基添加有机酸对酵母生长和产油的影响	(102)
三、有机酸为唯一碳源发酵产油	(104)
四、有机酸影响机理分析	(108)
第六节 本章小结	(111)
参考文献	(111)
第六章 木薯淀粉水解液发酵产油	(117)
第一节 实验材料和仪器	(117)
一、菌种	(117)
二、实验试剂	(118)
三、培养基	(118)
四、木薯淀粉水解液制备	(119)
第二节 实验方法	(119)
一、糖浓度梯度的设定	(119)
二、木薯水解液补料分批发酵	(119)
三、发酵罐 (5-L) 补料分批发酵	(120)

四、废水回用实验	(120)
第三节 分析方法	(121)
第四节 结果和讨论	(121)
一、木薯淀粉水解液浓度对产油的影响	(121)
二、摇瓶补料分批发酵	(123)
三、发酵罐补料分批培养	(125)
四、加氮摇瓶补料分批发酵	(126)
五、质量和能量衡算	(128)
六、脂肪酸组成分析	(131)
七、产油发酵废水回用工艺研究	(132)
第五节 本章小结	(138)
参考文献	(138)

第一章 微生物油脂的研究背景

化石能源储备日益枯竭和由其消耗造成的 CO_2 不平衡引发了世界性气候和环境问题，迫使各国转向替代能源的开发，以减少对化石能源的依赖，降低能源消耗对环境的危害，保证国家安全和经济平稳发展。

以运输用燃料为例，各种替代能源都得到迅速的发展。电能 在锂离子电池商业化进程的推动下得到了长足的发展。对运输用电能的生命周期分析表明，无论其来源如何，其对环境的好友好性 优于所有液体燃料^[1]。但是电能在运输行业的应用受到电网分布、可持续原料供应、电驱动车保有量和锂资源等限制。此外，电能也无法应用于航海和航空运输系统。气态燃料，如液化石油气和甲烷等，也被进一步的研究和开发。从废弃的有机质中得到的甲烷符合可持续发展的要求，得到了广泛关注。氢气也是颇受关注的清洁能源。但是气体燃料能量密度低的缺点极大地限制了其应用^[2]。由此看来，能量密度高的新型液体燃料的开发势在必行。

液体生物燃料按其原料来源可以分为 3 代^[2]：第一代生物能源技术已经发展纯熟（如以玉米为原料发酵生产乙醇），但其产生竞争粮食分配的问题使其可持续发展和推广受到限制；以工业废料、非粮食作物等生物质为原料的第二代生物燃料技术比第一代有更高的可持续发展性，但由于原料水解成本高和能量转化效率低等问题，其大规模生产技术还不成熟；第三代生物燃料技

术基于直接将光能固定为燃料或者燃料前体的光合作用^[3]，但该技术尚处于初期研发阶段。

生物柴油是以可再生的油脂资源经过酯化或转酯化工艺制得。生物柴油的性质与普通柴油非常相似，主要成分是长链（C14 ~ C20）脂肪酸甲酯，不含硫和芳烃，十六烷值高，同时可生物降解，闪点高，无毒，有机挥发物少，具有优良的润滑性能和溶解性，是一种优质的清洁柴油^[4,5]。生物柴油的原料目前主要来源于植物油、餐饮废油等，其原料成本占总生产成本的70% ~ 85%，使其产业化受到经济性的限制^[6]。因此，开发廉价生物柴油原料是推动生物柴油的生产应用的关键。目前最具潜力的油料来源之一是微生物油脂^[7]。产油微生物种类繁多，且有些微生物能利用多种碳源，将其转化为油脂储存在胞内，其产物脂肪酸甘油酯是制备生物柴油的良好原料。

第一节 微生物油脂概述

一、微生物油脂及其特点

微生物油脂（Microbial lipid），又称单细胞油脂（Single cell oil, SCO），是产油酵母、霉菌、细菌和藻类等微生物在一定条件下将培养基中多余的营养物质转化并储存在菌体内的油脂，主要是由长链脂肪酸组成的甘油三酯（Tricacylglycerols, TAGs），脂肪酸组成以 C16 和 C18 为主^[8]。

TAGs 的主要功能普遍认为是作为碳源及能源的储备化合物，因它具有比碳水化合物和蛋白质更高的热值，氧化后将产生很高的能量。此外它还能维持膜的结构完整，使其功能正常。TAGs 在能量贮存和能量平衡上占有重要的地位，且具有比游离脂肪酸

相低的生物毒性，因而成为不同种类脂肪酸合适的贮存形式。

微生物油脂作为动植物油脂的替代品，具有以下几方面的特点。

(1) 脂肪酸组成相似，都以 1 - 油酸 - (或棕榈酸) - 2 - 油酸 - 3 - 棕榈酸 - (或油酸) - 甘油为主，如 SUU, UUS 或 SUS 型 (S 代指饱和脂肪酸，U 代指不饱和脂肪酸)。

(2) 其他可溶物含量低。如色素 (类胡萝卜素，叶绿素等)、甾酮类 (植物油脂中的植物甾醇类，动物油脂中的胆固醇和酵母中的麦角固醇等)、磷脂 (卵磷脂等)、脂蛋白、糖脂、碳水化合物、维生素 E、维生素 A、维生素 D、蜡、醚及脂肪酸的降解物、蛋白质和碳水化合物等。这些物质大都可借助工程手段分离开来，且其中某些组分具有高附加值^[9]。

此外，同依赖油料植物获取油脂的传统方法相比，利用微生物油脂生产还有具有以下几方面优势^[10]。

(1) 生产周期短，生产效率高。微生物代谢活力强，适应性强，易于培养和品种改良。

(2) 所需劳动力低，占地面积小，且不受场地、气候和季节变化等的限制，能连续大规模生产。

(3) 其生产所需原材料来源丰富且廉价，可利用农副产品、食品加工及造纸业的废弃物 (如乳清、糖蜜、木材糖化液等) 为培养基原料，有利于废物再利用和环境保护。

由于微生物油脂具有上述特点，大力开发微生物油脂，降低其原料成本、提高生产效率具有重要意义，推动微生物油脂的工业化生产将为解决日益增长的生物柴油原料需求提供可靠的解决途径。

二、产油微生物的种类

自然界中部分微生物在适当的培养条件 (如某些营养缺乏) 下能在胞内贮存质量超过其细胞干重 20% (w/w) 的油脂，具有这种

表型的微生物称为产油微生物^[11]。虽然众多微生物可以在体内积累相当数量的油脂,但是并不是所有的微生物都适合作为生物柴油原料油脂的生产菌种。产油微生物包括酵母、霉菌、微藻和细菌等。表 1-1 列出了几种代表性产油微生物及其油脂含量。

表 1-1 常见产油微生物及其油脂含量

Table 1-1 Lipid contents of some common oleaginous microorganisms

Microorganism	$Y_{L/X}$ (%)	Microorganism	$Y_{L/X}$ (%)
Microalgae		Bacterium	
<i>Botryococcus braunii</i> ^a	75	<i>Arthrobacter</i> sp. ^a	>40
<i>Cylindrotheca</i> sp. ^a	37	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ^a	38
<i>Nitzschia</i> sp. ^a	47	<i>Rhodococcus opacus</i> ^a	25
<i>Schizochytrium</i> sp. ^a	77	<i>Bacillus alcalophilus</i> ^a	24
Yeast		Fungi	
<i>Candida curvata</i> ^a	58	<i>Aspergillus oryzae</i> ^a	57
<i>Cryptococcus albidus</i> ^a	65	<i>Mortierella isabellina</i> ^a	86
<i>Lipomyces starkeyi</i> ^a	64	<i>Humicola lanuginosa</i> ^a	75
<i>Rhodotorula glutinis</i> ^a	72	<i>Mortierella vinacea</i> ^a	66
<i>Rhodosporidium toruloides</i> ^b	83	<i>Mortierella ramanniana</i> ^d	24
<i>Cryptococcus curvatus</i> ^c	25	<i>Mucor circinelloides</i> ^e	30

a: from literature^[12]; b: from literature^[9]; c: from literature^[13]; d: from literature^[14]; e: from literature^[15]

产油微生物胞内油脂的最大积累量是由其基因决定的。因此,不同种属产油微生物体内能够积累的最大油脂含量差异很大。此外,不同微生物体内油脂的脂肪酸组成也有一定的差异。由表 1-2,可见 C16-C18 的脂肪酸占到脂肪酸组成的大多数。有些菌株所生产的油脂中不饱和脂肪酸含量高^[16],在保健食品

方面具有加大的开发潜力。但不饱和脂肪酸含量高的油脂容易腐败变质，而饱和脂肪酸含量高的油脂性质稳定，因此作为生物柴油的原料，不饱和度低的油脂更为理想，如多数产油酵母生产的油脂^[17]。

表 1-2 不同种类产油微生物的脂肪酸组成^[10]

Table 1-2 Lipid compositions of some microorganisms^[10]

Microorganisms	Lipid composition (w/total lipid)					
	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3
Microalga	12 ~ 21	55 ~ 57	1 ~ 2	58 ~ 60	4 ~ 20	14 ~ 30
Yeast	11 ~ 37	1 ~ 6	1 ~ 10	28 ~ 66	3 ~ 24	1 ~ 3
Fungi	7 ~ 23	1 ~ 6	2 ~ 6	19 ~ 81	8 ~ 40	4 ~ 42
Bacterium	8 ~ 10	10 ~ 11	11 ~ 12	25 ~ 28	14 ~ 17	—

微藻被誉为“阳光驱动的细胞工厂”可以将二氧化碳固定并转化为能源物质。其生长迅速，光和效率大大高于能源植物以及油脂含量高等特点使其成为极具开发潜力的生物能源原料之一^[18~23]。能够利用光能和无机碳源生长的微藻具备环境优势，但是培养微藻需要很大的培养面积以更好的吸收和转化光能，同时以二氧化碳为营养原料也使得其生长比利用有机碳源的微生物需要更长的生长周期。产油细菌可以利用简单的有机碳源为原料，快速积累生物质，很多在 24h 内即可达到最大生物量，但是多数细菌油脂含量偏低如表 1-1 所示。只有极少数细菌的油脂含量可以达到 70% 以上，如放线菌属^[24]。关于产油酵母和产油霉菌的报道较多，很多菌株在特定条件下油脂含量都高达 60% ~ 70%^[25~28]，且酵母和霉菌繁殖迅速，对底物转化效率高，能够实现高密度培养，其脂肪酸组成特点也满足生物柴油对原料的需求。

三、微生物油脂生物合成及代谢调控

随着合成生物学和代谢组学技术的兴起和发展,人类对微生物油脂生物合成途径的探索以及对其代谢途径的定向修饰取得了很多成果^[11,29~36]。

微生物油脂的积累大体可分为两个阶段,发酵培养的前期为细胞增殖期,这个时期微生物要消耗培养基中的碳源和氮源,以保证菌体代谢旺盛和增殖过程。在这一阶段中细胞也合成油脂,但主要用于细胞骨架的组成,即以体质脂形式存在。当培养基中碳源充足而某些营养成分缺乏时^[37,38],菌体细胞分裂速度锐减,微生物基本不再进行细胞繁殖,而过量的碳元素继续被细胞吸入,在细胞质中经糖酵解途径进入三羧酸循环,同时甘油三酯的积累过程被激活^[39]。微生物产生油脂的过程,本质上与动植物合成油脂的过程相似,首先合成脂肪酸(中性油脂),然后再合成磷脂和脂肪酸三甘油酯,合成途径如图1-1所示。长链脂肪酸的合成从乙酰 CoA 羧化酶催化羧化开始,然后经过多次链延长,或再经过去饱和作用等完成整个生化过程。脂肪酸合成酶是由3个 α 亚基和3个 β 亚基构成的六聚体,由基因*fas1*编码。亚基 α 上的磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(phosphopantetheine transferase, PPT)可将其辅酶泛酸盐装载于 β 亚基上,激活 β 亚基的乙酰基转移蛋白(acyl carrier protein, ACP)。酵母通过 ACP 转移乙酰 CoA 至 KS (β -Ketoacyl-ACP synthase)。然后 FAS 反复催化 KS、KR (β -ketoacyl-ACP reductase)、DH (β -hydroxyacyl-ACP dehydratase) 和 EAR (enoyl-ACP reductase) 直至七个循环后生成棕榈酰-ACP (C-16)^[40~42]。然后, AG3PAT (acyl-CoA-1-acyl-G3P acyltransferase) 接入第二个乙酰基团, PAP (phosphatidate phosphatase) 脱去 PA (phosphatidic acid) 生成 DAG (diacylglycerol)。DAG 通过 DGAT (acyl-CoA: DAG acyl-

transferase) 进一步酰化合成 TAG^[43]。

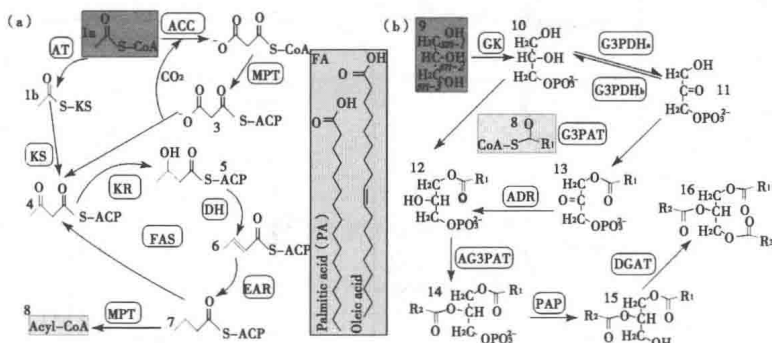


图 1-1 酵母中甘油三酯 (TAG) 合成途径^[31]

Fig. 1-1 Triacylglycerol (TAG) synthesis in yeast

(a) FA synthesis; (b) TAG synthesis from acyl-CoA and glycerol; ACC, Acetyl-CoA carboxylase; ACP, Acyl carrier protein; AT/MPT, Ac(et)yl transacylase/malonyl-palmitoyl transacylase; DH, β -Hydroxyacyl-ACP dehydratase; EAR, Enoyl-ACP reductase; KR, β -Ketoacyl-ACP reductase; KS, β -Ketoacyl-ACP synthase; PPT, Phosphopantetheine transferase; ADR, 1-Acyl-DHAP-reductase; AG3PAT, Acyl-CoA-1-acyl-G3P acyltransferase; DGAT, Acyl-CoA: DAG acyltransferase; G3PAT, Acyl-CoA: G3P acyltransferase; GK, Glycerol kinase; G3PDH, G3P dehydrogenase; PAP, Phosphatidate phosphatase; 1b, acetyl-KS; 3, malonyl-ACP; 4, acetoacetyl-ACP; 5, β -hydroxybutyryl-ACP; 6, β -trans-butenoyl-ACP; 7, butyryl-ACP; 10, glycerol-3-phosphate (G3P); 11, dihydroxyacetone-phosphate (DHAP); 12, 1-acyl-G3P; 13, 1-acyl-DHAP; 15, diacylglycerol (DAG)

培养基中碳源充足其他营养缺乏,尤其是氮源缺乏是引发油脂积累的关键^[25,44~46]。图 1-2 简要说明了产油酵母中与 TAG 合成代谢调控相关的一些重要步骤^[9]。当培养基中氮源耗尽时,产油微生物细胞中的腺苷一磷酸 (AMP) 脱氨酶 (Adenosine monophosphate deaminase, AMD) 活性增加,AMP 脱氨酶将 AMP 大量转化为肌苷一磷酸 (IMP) 和氨,以应对缺氮环境^[47]。而