

利用皮状丝孢酵母对甘蔗渣酶解液产油脂的研究

尚常花^{1,3} 王 闻¹ 朱顺妮¹ 秦 磊¹ 王忠铭¹ 袁振宏^{1,2} 谢 君³

(广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室;中国科学院可再生能源重点实验室;

中国科学院广州能源研究所¹, 广州 510640)

(生物质能源河南省协同创新中心², 郑州 450002)

(华南农业大学新能源与新材料研究所;农业部能源植物资源与利用重点实验室;

广东省普通高等学校生物质能源重点实验室³; 广州 510642)

摘 要 本试验旨在研究碱和高温液态水 2 种预处理方式对发酵的影响。甘蔗渣分别利用碱和高温液态水(LHW)预处理,然后使用纤维素酶进行酶解。在 LHW 和碱预处理后的酶解液中,分别含 22.06 和 39.28 g/L 总糖。不经过浓缩,也不需要添加任何营养物质,酶解液被用于皮状丝孢酵母的油脂发酵试验。经过 3 d 的培养,在 LHW 预处理的酶解液中,皮状丝孢酵母的生物量达到了 8.08 g/L,油脂质量分数为 52.00%,油脂系数高达 19.03%。在碱预处理的酶解液中,经过 8 d 的培养,皮状丝孢酵母的生物量为 13.67 g/L,油脂质量分数为 43.20%,油脂系数为 15.03%。脂肪酸组成分析表明所产油脂与棕榈油的组成相似。试验结果表明,甘蔗渣是一种有前景的产油脂原料,LHW 是一种良好的预处理方式。该研究为利用甘蔗渣发酵产油脂提供了新思路。

关键词 皮状丝孢酵母 高温液态水 碱 预处理 甘蔗渣 油脂

中图分类号: Q93 9. 97 文献标识码: A 文章编号: 1003 - 0174(2017)07 - 0074 - 05

生物柴油因具有可生物降解、清洁、无毒和可再生等特点,引起广泛关注^[1]。此外,生物柴油与传统的石化柴油具有相似的化学特性^[2]。目前,生物柴油的原料主要是植物油,不能满足大规模发展生物柴油的需要。在这种情况下,利用微生物油脂作为生物柴油可持续生产的原料引起人们的关注。

产油微生物因生长快速、可产生大量油脂及油脂的脂肪酸组成与植物油相似等特性,被认为是一种有潜力的生物柴油原料^[3-4]。已经发现细菌、酵母、微藻和丝状真菌等微生物可以积累油脂。

人们已经利用不同的底物来降低微生物油脂的生产成本。这些底物包括淀粉水解液、大米草水解液、甘薯淀粉加工废水、污水污泥、废弃酵母、木质纤维素生物质(麦秸、玉米芯)、食品工业废水^[5-13]。富含糖类的甘蔗作为一种能源作物具有巨大的应用潜力,而甘蔗渣是一种数量丰富的适合于微生物油脂发酵的农业废弃物,因此利用甘蔗渣水解液发酵产油脂不仅可以降低生产成本而且可以改善环境。然

而,利用经碱或者 LHW 预处理后的甘蔗渣的酶解液进行微生物油脂发酵的研究还非常少。皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)是一种可以同时利用葡萄糖和木糖的产油酵母^[14]。*T. cutaneum*不仅可以利用葡萄糖和木糖,还可以利用木质纤维素水解液进行油脂发酵,因此,*T. cutaneum*用于制备生物柴油原料具备很大的潜力。

通常酸水解用于制备木质纤维素的水解液,然而酸水解会产生抑制发酵的物质^[15]。使用酶水解木质纤维素底物可以避免这个问题。对于酶水解而言,预处理是必要的。和 SO₂ 气爆、稀氨预处理、氨纤维膨胀预处理、磷酸预处理及碱预处理等方式相比较,LHW 预处理是一种环境友好型的方式,在此过程中仅需要添加水^[16]。LHW 预处理具有如下优点:副产物较少,对设备的腐蚀较小及对底物的操作简便。

本研究分别利用碱和 LHW 预处理甘蔗渣,然后进行酶解。酶解产物不添加任何营养物质直接用于 *T. cutaneum* 的油脂发酵。该工作为将来优化 *T. cutaneum* 利用甘蔗渣酶解产物进行油脂发酵的研究奠定了基础,同时为利用甘蔗渣进行油脂发酵提供了新思路。

基金项目: 广东省自然科学基金(2016A030313171、2016A030312007)

收稿日期: 2016 - 01 - 12

作者简介: 尚常花,男,1980 年出生,助理研究员,微生物学

通讯作者: 袁振宏,男,1953 年出生,教授,生物质能技术

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*) 2.571 购买自中国普通微生物菌种保藏管理中心,保存于 YGP 固体培养基上(0.5% 酵母提取物,1% 葡萄糖,1% 蛋白胨,2% 琼脂粉),生长温度为 28 °C。

1.1.2 主要试剂和仪器

酵母提取物、葡萄糖、蛋白胨、琼脂粉:生工生物工程(上海)股份有限公司;纤维素酶 Cellic CTec2:诺维信公司。

Rtx®-Wax 毛细管柱:Restek 公司;5417R 离心机:Eppendorf 公司;2695e 液相色谱仪:Waters 公司;Biosafer-10D 台式冻干机:赛飞(中国)有限公司;GC-2010 气相色谱仪:Shimadzu 公司。

1.2 方法

1.2.1 甘蔗渣的碱预处理

甘蔗渣在 2% 的 NaOH 溶液中于 80 °C 预处理 2 h,固液比为 1:10(*m/V*),然后使用去离子水洗涤 3 次,烘干至恒重^[17]。最后烘干的甘蔗渣按照 Wang 等^[16]的方法进行酶解。酶解产物于 115 °C 灭菌 30 min。

1.2.2 甘蔗渣的 LHW 预处理

甘蔗渣利用 LHW 进行预处理的条件为 180 °C,4.0 MPa,500 r/min,20 min,所用设备为本实验室设计。去离子水和甘蔗渣的比例为 20:1^[18]。然后按照 Wang 等^[16]的方法进行酶解。

1.2.3 培养基和培养条件

酵母首先在种子培养基 YGP 中培养,培养条件为 28 °C,150 r/min,24 h。然后 5% 的种子培养物用无菌水洗涤后接种至 50 mL 酶解液中进行培养,培养条件为 28 °C,150 r/min。酶解液分别来自甘蔗渣经碱或 LHW 预处理后再用纤维素酶水解的产物。

1.2.4 分析方法

细胞的生长通过测定干重来分析。培养结束后,50 mL 酵母培养物在 8 000 g 下离心 10 min^[19]。离心后细胞沉淀使用去离子水洗涤 2 次,冻干至恒重,然后用于油脂提取和分析^[20]。糖(例如葡萄糖和木糖)含量通过液相色谱仪测定。从冻干的酵母细胞中提取油脂采用 Zhu 等^[3]的方法,该方法对 Bligh 和 Dyer 的经典方法进行了一些修改。油脂系数是油脂产量(g/L)除以消耗的糖浓度(g/L)的值。

测定脂肪酸组成时,首先将脂肪酸甲酯化,然后利用气相色谱仪(配有离子化检测器和 Rtx®-Wax 毛细管柱)测定。

2 结果与讨论

2.1 *T. cutaneum* 的细胞生长和产油脂情况

和前人利用木质纤维素的酸水解液用于发酵产油脂的研究不同,本试验研究了经过碱或 LHW 预处理的甘蔗渣的酶解液用于发酵产油脂的情况^[21]。和 SO₂ 气爆、稀氨预处理、氨纤维膨胀预处理、磷酸预处理及碱预处理等方式相比较,LHW 预处理是一种环境友好的方式,因此本研究中选用了 LHW 预处理。

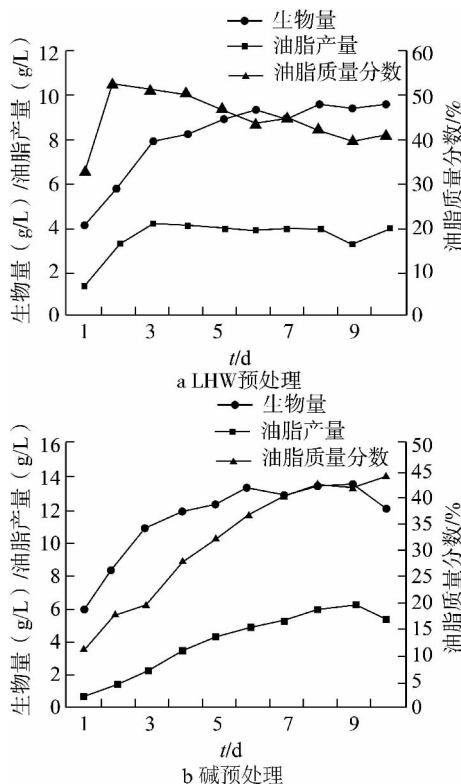
经 LHW 或碱预处理后的甘蔗渣的酶解产物中糖浓度分别为 22.06 g/L(20.51 g/L 葡萄糖和 1.55 g/L 木糖)和 39.28 g/L(25.88 g/L 葡萄糖和 13.40 g/L 木糖)。结果表明:和碱预处理相比较,LHW 预处理产生较少比例的木糖。由于大多数产油微生物不能利用木糖,因此 LHW 预处理更适用于大多数产油微生物的油脂发酵。利用酵母产油脂一般需要添加营养元素和微量元素,但是本试验在甘蔗渣的酶解液中没有添加任何营养物质^[3]。

T. cutaneum 在甘蔗渣酶解产物中的生长和产油脂情况见图 1。图 1a 是采用 LHW 预处理时,*T. cutaneum* 的细胞生长和产油脂情况。图 1a 显示利用 LHW 预处理时,细胞生长没有明显的延滞期,仅 1 d 后,*T. cutaneum* 的生物量就达到了 4.22 g/L,油脂质量分数达到了较高的 33.80%。发酵 3 d 后,油脂产量为 4.20 g/L 和油脂产量最大值 4.28 g/L 非常接近,此时生物量和油脂质量分数为 8.08 g/L 和 52.00%。

图 1b 是采用碱预处理时的细胞生长和产油脂情况。与图 1a 相似,用碱预处理时,细胞生长同样没有明显的延滞期,发酵 1 d 后,生物量达到了 5.96 g/L,油脂质量分数为较低的 11.40%。发酵 8 d 后,油脂产量为 5.91 g/L 和油脂产量最大值 5.97 g/L 非常接近,此时生物量和油脂质量分数为 13.67 g/L 和 43.20%。比较图 1a 和图 1b 发现,碱预处理方式的油脂质量分数、油脂产率和油脂系数(43.20%、0.74 g/L/d 和 0.150 3 g/g 糖)明显低于 LHW 预处理方式(52.00%、1.40 g/L/d 和 0.190 3 g/g 糖)。

Wang 等^[16]的研究发现甘蔗渣经 LHW 预处理后,74.81% 的木聚糖和 31.91% 的木质素被除去,而葡聚糖基本没有损失,这表明 LHW 预处理可有效去

除甘蔗渣中大部分半纤维素和部分木质素,而木糖则残留于LHW预处理后的废液中,该废液可用于*T. cutaneum*的产油脂发酵。Gao等^[17]的研究发现甘蔗渣经碱预处理后,葡聚糖质量分数为63.19%,木聚糖为26.63%,木质素为8.55%,表明碱预处理能有效地保留半纤维素。这可以解释LHW预处理后的甘蔗渣的酶解液中葡萄糖/木糖的值远高于碱预处理的情况。由于微生物会优先利用葡萄糖,因此葡萄糖比例较大的LHW预处理后的酶解液中油脂发酵速度明显高于碱预处理方式中的情况。图1a和图1b均没有发现经典的二次生长现象,而且葡萄糖和木糖的耗尽时间基本一致(图2),表明*T. cutaneum*可以同步利用酶解液中的葡萄糖和木糖,和大多数微生物不能有效利用木糖相比较,这种特性具有明显的优势。



注:发酵条件为28℃、150 r/min,数值取3次试验的平均值,余同。

图1 *T. cutaneum* 利用甘蔗渣的酶解液发酵时细胞生长和产油脂情况

2.2 *T. cutaneum* 油脂发酵的底物利用情况

为了阐明*T. cutaneum*利用酶解产物发酵时底物的同化规律,对糖浓度随时间变化的情况进行了描述(图2)。图2a和图2b分别代表LHW和碱预处理方式下糖消耗情况。图2表明在2种预处理方式

下获得的酶解液中,*T. cutaneum*均可以同时利用葡萄糖和木糖。图2a显示在LHW预处理方式下,葡萄糖消耗很快,3d后培养基中葡萄糖含量仅为0.26 g/L,木糖的含量从初始的1.56 g/L降低到0.49 g/L。图2a还显示在LHW预处理方式下,木糖的利用速率明显低于葡萄糖,这应该与微生物对葡萄糖的优先利用有关。

图2b表明在碱预处理方式下,葡萄糖的消耗速率明显低于LHW预处理方式的。发酵6d后,培养基中葡萄糖含量为0.61 g/L。随着葡萄糖的消耗,木糖的利用速率有所升高,最终葡萄糖和木糖被耗尽。总体来看,LHW预处理方式下糖的利用速率明显高于碱预处理方式的。

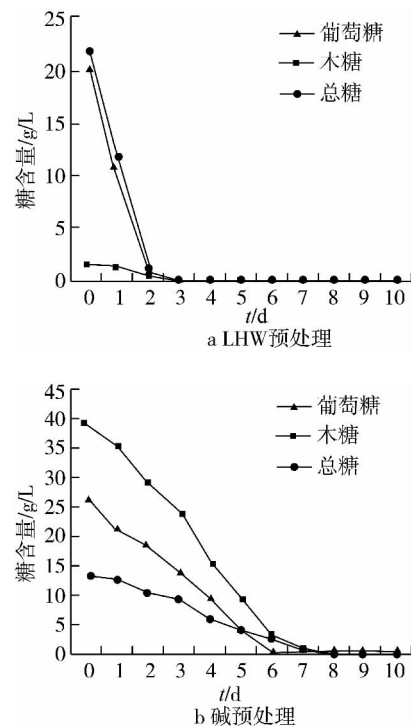


图2 *T. cutaneum* 利用甘蔗渣的酶解液发酵时糖利用情况

2.3 *T. cutaneum* 油脂发酵和前人研究的比较

从*T. cutaneum*提取的油脂主要由软脂酸、硬脂酸和亚油酸组成,在LHW和碱2种预处理方式下,不饱和脂肪酸的比例分别为8.90%和13.56%(表1)。从*T. cutaneum*提取的油脂其脂肪酸组成类似于棕榈油,表明该油脂是一种有前景的生物柴油原料。

Chen等^[11]利用玉米芯的酸水解液培养*T. cutaneum*进行油脂发酵,油脂产率为0.99 g/L/d,远低于本研究在LHW预处理方式下的油脂产率1.40 g/L/d。此外本研究在LHW预处理方式下获得的油脂系数

0.190 3 显著高于前人的研究(表 2)。

表 1 *T. cutaneum* 发酵所产油脂的脂肪酸组成

| 预处理方式 | 脂肪酸组成 | | | | |
|-------|--------|--------|--------|-------|-------|
| | C16:0 | C18:0 | C18:2 | C22:1 | C24:1 |
| 碱 | 26.06% | 60.38% | 11.91% | 0.47% | 1.18% |
| LHW | 32.28% | 58.82% | 8.47% | 0.43% | 0% |

表 2 不同微生物利用不同碳源产油脂的情况

| 菌株 | 碳源 | 油脂质量分数 | 油脂系数 | 参考文献 |
|----------------------|---------|--------|---------|------|
| <i>T. cutaneum</i> | 玉米秆水解液 | 39.2% | 0.15 | [22] |
| <i>T. cutaneum</i> | 玉米芯酸水解液 | 36% | 0.174 | [11] |
| <i>T. dermatis</i> | 玉米芯酶水解液 | 40.1% | 0.167 | [23] |
| <i>T. fermentans</i> | 稻秆水解液 | 40.1% | 0.119 | [24] |
| <i>T. fermentans</i> | 甘蔗渣酸水解液 | 39.9% | 0.111 8 | [25] |
| <i>T. cutaneum</i> | 甘蔗渣酶水解液 | 52.0% | 0.190 3 | 本研究 |

3 结论

本研究中 *T. cutaneum* 可以同时利用酶解液中的葡萄糖和木糖进行有效的油脂发酵。这为高效利用甘蔗渣生产油脂奠定了基础。由于 LHW 预处理能避免环境污染,且该过程产生的废液中的木糖依然可以用于发酵产油脂,另外 LHW 预处理后的甘蔗渣的酶解液进行发酵时的油脂质量分数(52.00%)、油脂产率[1.40 g/(L·d)]和油脂系数(0.190 3)均很高,而这 3 个指标均可以明显降低生产成本,因此 LHW 预处理后的甘蔗渣的酶解产物用于 *T. cutaneum* 的油脂发酵既可以以一种环境友好的方式处理农业废弃物,又可以高效地以较低成本生产微生物油脂作为生物柴油的原料,是一种有前景的方法,该方法为高效利用甘蔗渣产油脂提供了新思路。

参考文献

- [1] Adamczak M, Bornscheuer U T, Bednarski W. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009, 111(8): 808–813
- [2] Raetz K D. Challenges and advances in making microalgae biomass a cost efficient source of biodiesel [J]. *MMG 445 Basic Biotechnology* 2009(5): 37–43
- [3] Zhu L Y, Zong M H, Wu H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation [J]. *Bioresource Technology* 2008, 99(16): 7881–7885
- [4] Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2011, 113(8): 1052–1073
- [5] Han X, Miao X L, Wu Q Y. High quality biodiesel production from heterotrophic growth of *Chlorella protothecoides* in fermenters by using starch hydrolysate as organic carbon [J]. *Journal of Biotechnology* 2006, 126(4): 499–507
- [6] 沈珺珺, 李富超, 杨庆利, 等. 皮状丝孢酵母利用大米草水解液发酵生产微生物油脂 [J]. *海洋科学*, 2007, 31(8): 38–41
Shen J J, Li F C, Yang Q L, et al. Fermentation of *Spartina anglica* acid hydrolysate by *Trichosporon cutaneum* for microbial lipid production [J]. *Marine Sciences*, 2007, 31(8): 38–41
- [7] 杜鹃, 王宏勋, 金红林, 等. 甘薯淀粉废水发酵生产微生物油脂的研究 [J]. *生物加工过程* 2007, 5(1): 33–36
Du J, Wang H X, Jin H L, et al. Fatty acids production by fungi growing in sweet potato starch processing waste water [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2007, 5(1): 33–36
- [8] Angerbauer C, Siebenhofer M, Mittelbach M, et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(8): 3051–3056
- [9] Ryu B G, Kim J, Kim K, et al. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry [J]. *Bioresource Technology* 2013, 135: 357–364
- [10] Yu X, Zheng Y, Dorgan K M, et al. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(10): 6134–6140
- [11] Chen X F, Huang C, Xiong L, et al. Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by *Trichosporon cutaneum* [J]. *Biotechnology Letters* 2012, 34(6): 1025–1028
- [12] 冯冲, 李领川, 赵国欣, 等. 玉米秸秆水解液发酵产生物油脂动力学研究 [J]. *中国粮油学报* 2012, 27(10): 13–17
Feng C, Li L C, Zhao G X, et al. Dynamics study on microbial oils production by corn straw hydrolysate fermentation [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association* 2012, 27(10): 13–17
- [13] 王斐, 罗登林, 刘建学. 微生物利用食品工业废水发酵产油脂的研究进展 [J]. *中国粮油学报* 2013, 28(12): 124–128
Wang F, Luo D L, Liu J X. The progress of oils yield from microorganisms using food industrial waste water [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2013, 28(12): 124–128
- [14] Hu C, Wu S, Wang Q, et al. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum* [J]. *Biotechnology for Biofuels* 2011, 4(1): 25
- [15] Huang C, Wu H, Liu Q P, et al. Effects of aldehydes on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Tricho-*

- sporon fermentans* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011 ,59(9) : 4606 – 4013
- [16] Wang W , Zhuang X , Yuan Z , et al. High consistency enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse pretreated with liquid hot water [J]. Bioresource Technology ,2012 , 108: 252 – 257
- [17] Gao Y , Xu J , Zhang Y , et al. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis [J]. Bioresource Technology , 2013 ,144: 396 – 400
- [18] Yu Q , Zhuang X , Yuan Z , et al. Two – step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose [J]. Bioresource Technology , 2010 ,101(13) : 4895 – 4899
- [19] Xue F , Miao J , Zhang X , et al. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium [J]. Bioresource Technology 2008 ,99(13) : 5923 – 5927
- [20] Park S J , Choi Y E , Kim E J , et al. Serial optimization of biomass production using microalga *Nannochloris oculata* and corresponding lipid biosynthesis [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering 2012 ,35(1 – 2) : 3 – 9
- [21] Tsigie Y A , Wang C Y , Truong C T , et al. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Polg grown in sugarcane bagasse hydrolysate [J]. Bioresource Technology ,2011 ,102 (19) : 9216 – 9222
- [22] Hu C , Wu S , Wang Q , et al. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum* [J]. Biotechnology for Biofuels 2011 ,4(1) : 25
- [23] Huang C , Chen X F , Xiong L , et al. Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs [J]. Bioresource Technology 2012 ,110: 711 – 714
- [24] Huang C , Zong M H , Wu H , et al. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans* [J]. Bioresource Technology 2009 ,100(19) : 4535 – 4538
- [25] 李日锋. 基于甘蔗渣水解液的发酵性丝孢酵母发酵产油脂的研究 [D]. 广州: 华南理工大学 2010
- Li R F. Study on microbia oil production from bagasse hydrolysate by *Trichosporon fermentans* [D]. Guangzhou: South China University of Technology 2010.

Oil Production from Enzymatic Hydrolysate of Sugarcane Bagasse by *Trichosporon Cutaneum*

Shang Changhua^{1 3} Wang Wen¹ Zhu Shunni¹

Qin Lei¹ Wang Zhongming¹ Yuan Zhenhong^{1 2} Xie Jun³

(Guangdong Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development , Key Laboratory of Renewable Energy of Chinese Academy of Sciences , Guangzhou Institute of Energy Conversion of Chinese Academy of Sciences¹ , Guangzhou 510640)

(Collaborative Innovation Centre of Biomass Energy , Henan Province² Zhengzhou 450002)

(Institute of New Energy and New Materials , South China Agricultural University; Key Laboratory of Energy Plant Resources and Utilization , Ministry of Agriculture , P. R. China; Key Laboratory of Biomass Energy of Guangdong Regular Higher Education Institutions³ , Guangzhou 510642)

Abstract The purpose of this paper aimed to study the effects of two kinds of pretreatment methods (base and liquid hot water) on the fermentation. Sugarcane bagasse was pretreated by base and liquid hot water (LHW) , and then hydrolyzed with cellulase. The enzymatic hydrolysate contained 22.06 g/L and 39.28 g/L sugar respectively pretreated with LHW and base. Without concentration or adding other nutrients , the hydrolysate was used for lipid production using *Trichosporon cutaneum*. After 3 days , the biomass was 8.08 g/L with lipid content of 52.00% , lipid coefficient of 19.03% when pretreated by LHW. After 8 days , the biomass was 13.67 g/L with lipid content of 43.20% , lipid coefficient of 15.03% when pretreated by base. The fatty acid profile of this lipid was similar to that of palm oils. Therefore , sugarcane bagasse was a promising material for oil production , and LHW was a promising pretreated method. This study offered a new thinking for oil production using sugarcane bagasse.

Key words *Trichosporon cutaneum* , liquid hot water , base , pretreatment , sugarcane bagasse , lipid