

能源微生物油脂技术进展

赵宗保^{1,2}, 胡翠敏^{1,3}

1 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023

2 大连洁净能源国家实验室(筹), 大连 116023

3 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 微生物油脂技术是缓解生物柴油规模化生产原料短缺的有效途径之一。介绍了国内外利用产油真菌生产能源微生物油脂的现状, 包括拓展发酵原料、选育优良菌株、建立新型调控策略和不同培养模式以及解析油脂过量积累的分子机制; 概括了微生物油脂技术产业化面临的问题及其解决方案; 最后指出了能源微生物油脂研究未来发展方向。

关键词: 微生物油脂, 生物柴油, 木质纤维素, 发酵, 合成生物学, 生物炼制, 生物能源

Progress in bioenergy-oriented microbial lipid technology

Zongbao K. Zhao^{1,2}, and Cuimin Hu^{1,3}

1 *Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China*

2 *Dalian National Laboratory for Clean Energy, Dalian 116023, China*

3 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*

Abstract: Microbial lipid is a potential raw material for biofuel industry. In this review, we summarized recent progress in microbial lipid production by oleaginous fungi in terms of identifying cheap feedstock, developing robust lipid producer, establishing novel strategies and better culture modes for cellular lipid accumulation, as well as revealing the molecular mechanism of oleaginity. We discussed issues, solutions and directions for further development of microbial lipid technology.

Keywords: microbial lipid, biodiesel, lignocellulose, fermentation, synthetic biology, biorefinery, biofuel

当今世界面临化石资源枯竭和自然环境恶化的全球性挑战。对于我国, 一方面近年来石油进口依存度已威胁到国家能源和经济安全, 另一方面过度消耗化石燃料带来的环境问题已成为限制社会经济可持续发展的重要因素。发展可再生能源技术, 减

少化石资源消耗, 受到广泛关注。生物柴油是性能优良、可直接替代化石柴油的生物燃料产品, 其主要化学成分是长链脂肪酸(甲)酯。目前生物柴油生产以动植物油脂为原料, 原料成本占总生产成本的70%以上。大豆油、菜籽油、棕榈油等植物油脂是

Received: November 11, 2010; **Accepted:** December 23, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB707405).

Corresponding author: Zongbao K. Zhao. Tel: +86-411-84379211; E-mail: zhaozb@dicp.ac.cn

国家重点基础研究发展计划(973计划)(No. 2011CB707405)资助。

部分国家生产生物柴油的主要原料。然而,植物油脂长期以来主要是用于满足食用和为油脂化工行业提供原料。据统计,世界植物油年产量只有约1.4亿t,其资源总量显然不适应规模化生物燃料生产。因此,亟需发展新型油脂生产技术,以促进生物柴油产业可持续发展。

通过代谢过程将碳水化合物等有机物转化为油脂,是细胞必需的生物学过程之一。少数微生物可在胞内合成和贮存超过细胞干重20%的油脂,具有该表型的微生物称为产油微生物^[1]。虽然细菌、酵母、霉菌和藻类中都有产油菌株,但以酵母和霉菌类真核产油微生物积累的油脂具有与常规植物油更相近的脂肪酸,也就是说更适合作为生物柴油生产原料。因此,本文仅限于讨论产油酵母和产油霉菌。与种植油料植物相比,利用微生物生产油脂具有以下突出特点:周期短、可连续生产、可规模化利用自然界丰富的碳水化合物资源。早期关于微生物油脂的研究主要是为了解决食用油匮乏的问题,但生产成本高于动、植物来源的油脂。后来,有关微生物油脂的探索集中在获取功能性油脂,如富含多不饱和脂肪酸的油脂^[2]。限于篇幅,本文将不讨论早期以及侧重于高附加值油脂的研究。近来人们意识到通过微生物生产油脂及相关脂肪酸代谢衍生物,对生物柴油产业可持续发展和生物质资源利用具有重要意义^[3]。本文将总结能源油脂发酵相关研究的最新进展并探讨存在的问题和未来发展方向。

1 能源微生物油脂技术的原料与菌株

葡萄糖通常是微生物生长的最适碳源,以葡萄糖作为碳源培养产油微生物的研究很多,菌体油脂含量可达到60%以上,取得了很好的结果^[4-5]。但利用葡萄糖及淀粉质原料大规模进行能源油脂生产,难免会造成“与人争粮,与粮争地”的局面,产生一系列社会经济问题。而且,淀粉质原料成本高。因此,面向生物燃料的油脂发酵技术需要特别关注其他大宗原材料,如农林废弃物(各种作物秸秆)和非粮糖质原料(如菊芋、木薯等)的水解液和工业废

弃物中的有机质。值得注意的是,相对于传统发酵行业成分比较明确的原料,上述原料可以称之为“粗原料”。“粗原料”除含有碳水化合物以外,还含有大量非糖、甚至非有机质成分,它们对微生物生长、代谢和产物生成的影响非常复杂。因此,利用“粗原料”进行生物化学转化要求菌株底物利用谱宽、综合抗逆性高、产物转化率高。

1.1 利用木质纤维素原料生产油脂

木质纤维素原料主要由纤维素、半纤维素和木素三部分组成。经过一定的物理/化学处理,木质纤维素可以转化为含有单糖的原料(水解液),用于微生物培养。木质纤维素水解液具有2个特别突出的特点:含有水解副产物;六碳糖和五碳糖共存。木质纤维素水解产生的副产物有糠醛、羟甲基糠醛、乙酸、酚类物质等,它们影响微生物生长和代谢。因此,需要筛选抗逆性好的产油菌株。华东理工大学鲍杰等考察了各种副产物对不同产油酵母的毒性,表明乙酸、甲酸、糠醛、香草醛对产油微生物均有较强抑制作用^[6]。本实验室考察了培养基中单一或多种水解副产物存在下,圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* 油脂发酵的行为,发现1mmol/L糠醛可显著抑制该酵母菌生长和油脂积累^[7]。值得特别指出的是,当培养基中多种水解副产物并存时,毒性没有呈现简单的累加特征,说明水解副产物对微生物的影响非常复杂。目前已经有利用木质纤维素水解液发酵产油脂的报道,说明一些产油菌株具有较好的抗逆性。南京师范大学戴传超等从玫瑰花样品中筛选出一株具有木糖同化能力的粘红酵母 *Rhodotorula glutinis*, 将其在树叶水解液中培养,能够获得油脂含量为29%的菌体^[8]。华南理工大学宗敏华等利用经过脱毒处理的稻草水解液培养发酵性丝孢酵母 *Trichosporon fermentans*, 8d后菌体油脂含量达到40%^[9]。青岛生物能源与过程研究所咸漠等考察了混浊红球菌 *Rhodococcus opacus* 在经过离子液体预处理和酶处理的玉米芯水解液中的产油情况,结果表明该菌株利用水解液的效率与葡萄糖相当^[10]。将来可通过诱变或者进化工程的策略进一步提高菌株耐受水解副

产物的能力, 从而更有效地利用木质纤维素水解液生产油脂。

虽然依据水解工艺条件差异, 木质纤维素水解液中各单糖相对含量有差异, 但水解液中通常含有葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖^[11]。水解液六碳糖和五碳糖共存的原料特征, 对生物化学转化提出了挑战。这是因为微生物往往优先利用葡萄糖, 然后再利用木糖; 有的微生物甚至难以利用木糖或前述其他几种出现在水解液中的单糖。如果微生物对单糖底物存在明显的偏好性或专一性, 以水解液为原料进行生物转化时就会有发酵周期长、底物利用率低、产物得率低、废水处理成本高等一系列问题。本实验室的早期研究筛选了 11 株产油酵母的碳源利用能力, 发现所有实验菌株都能利用多种单糖, 包括葡萄糖和木糖^[12]。通过优化培养基组成及发酵条件, 以葡萄糖和木糖为碳源培养斯达氏油脂酵母 *Lipomyces starkeyi*, 混合糖利用率、菌体油脂含量和油脂得率分别达 99%、52% 和 14%^[13]。虽然多数产油微生物具备代谢五碳糖和六碳糖的能力, 也能够转化天然原料水解产物为胞内油脂, 但当多种碳源并存时, 其他碳源的利用会受到葡萄糖抑制, 也就是所谓的葡萄糖效应。葡萄糖效应导致底物利用出现明显延滞期, 发酵周期延长, 降低整个发酵过程的经济性。所以, 开发能够同步利用五碳糖和六碳糖的菌株, 对木质纤维素原料生物转化至关重要。本实验室经过筛选, 发现皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* 能够同步转化葡萄糖和木糖, 底物利用和产物积累都没有出现延滞期, 并且混合糖发酵时间与同等浓度单糖发酵时间相当, 提高了混合糖发酵效率 (待发表)。

1.2 利用甲壳素类生物质和菊芋等高糖植物生产油脂

甲壳素又称几丁质, 主要存在于节肢动物 (如虾、蟹等) 和软体动物中, 是自然界中含量仅次于纤维素的一种多糖, 也是地球上储量最丰富的含氮有机化合物。甲壳素水解得到的 N-乙酰-D-葡糖胺 (GlcNAc) 和氨基葡萄糖, 可能是生物转化制备燃料

和生物基化学品的重要潜在原料。本实验室筛选发现, 多株产油酵母包括白色隐球酵母 *Cryptococcus albidus*、弯曲隐球酵母 *C. curvatus*、*T. fermentans* 和 *T. cutaneum* 能转化 GlcNAc 为油脂, 积累在细胞内, 菌体油脂含量达到 40% 以上^[14]。通过发酵条件优化, *C. curvatus* 菌体油脂含量和油脂得率分别达到 54% 和 16%^[15]。

菊芋是一种耐贫瘠、耐寒、耐旱的多年生高产、高糖植物, 可在沿海滩涂地、盐碱地种植, 不额外占用耕地。菊芋中主要成分为低聚果糖, 较易水解为单糖。本实验室以去皮菊芋为原料, 通过酸处理得到菊芋汁, 用于培养 *R. toruloides*, 总糖利用率高达 95%, 细胞油脂含量达到 40%^[16]。在 15 L 发酵罐中, 采用重复补料方式补充菊芋水解液, 最终油脂含量提高到 57%^[17]。中国海洋大学池振明等将菊粉酶基因导入亚罗解脂酵母 *Yarrowia lipolytica*, 利用菊粉和菊芋提取物生产微生物油脂, 菌体油脂含量分别达到 48% 和 50%^[18]。以菊芋为原料生产微生物油脂, 不仅能够部分解决原料来源问题, 同时也可有效地解决滩涂、盐碱地荒置问题。

1.3 利用工业有机废弃物生产油脂

产油微生物底物谱广泛, 除了能够利用以上碳源外, 还能够将工业有机废弃物转化成油脂。废糖蜜作为制糖工业副产物, 是一种富含碳水化合物的废弃资源。宗敏华等以废糖蜜为主要原料, 培养 *T. fermentans*, 菌体油脂含量达到 62%^[5]。土耳其学者 Donmez 等以糖蜜为原料培养解脂假丝酵母 *Candida lipolytica*、热带假丝酵母 *C. tropicalis* 和粘性红圆酵母 *R. mucilaginosa*, 菌体油脂分别达到 60%、46% 和 69%^[19]。上述结果说明, 废糖蜜可以作为油脂发酵的原料。粗甘油是生物柴油工业的副产物, 由于其纯化过程成本高, 通常作为工业废料对待。美国南伊利诺大学梁燕娜等利用粗甘油培养 *C. curvatus*, 菌体油脂含量达到 52%^[20]。北京化工大学谭天伟等探索利用工业废水生产油脂。以味精生产废水为原料培养 *R. glutinis* 时, 由于其 C/N (mol/mol) 比太低, 不适合积累油脂, 菌体油脂含量在 10% 左右, 但补加碳

源提高废水 C/N 比后, 菌体油脂含量提高到 20%, COD 降解率为 45%^[21]。在 300 L 发酵罐规模下, 利用淀粉废水培养 *R. glutinis*, 发酵 30~40 h 生物量达到 40 g/L, 菌体油脂含量 35%, COD 降解率达 80%^[22]。利用工业废弃物生产油脂不仅可以为生物柴油提供原料, 同时也对环境治理具有重要意义。

2 油脂发酵调控策略新进展

由于当前对产油微生物遗传背景的认识非常有限, 尚难以进行分子靶向性调控油脂积累代谢。因此, 关于产油微生物发酵调控主要依赖生物化学工程方法, 即通过控制培养基营养可得性及环境条件来促进油脂生物合成, 这也是发酵工程中最通用的策略。

2.1 培养基营养限制调控油脂积累

当前认为产油微生物在氮限制条件下油脂过量积累。培养基中氮源耗尽, 腺苷酸 (AMP) 脱氢酶活性增加, AMP 大量转化为肌苷酸和氨, 线粒体中 AMP-依赖型异柠檬酸脱氢酶活性抑制, 三羧酸循环低迷, 导致柠檬酸积累, 并被转运到胞浆中, 生成乙酰-CoA, 然后在脂肪酸合成酶的作用下合成脂肪酰-CoA, 并最终生成脂肪酸甘油酯^[23]。因此, 油脂发酵中最常用的调控策略是改变培养基的氮元素供给, 即改变培养基 C/N 比。本实验室研究了 C/N 比对 *R. toruloides* 油脂含量的影响, 表明油脂含量随 C/N 比增大而提高, 经过优化, C/N 比为 420 时, 油脂含量达到 76%^[4]。希腊学者 Papanikolaou 等考察多种营养元素限制培养基中刺孢小克银汉霉 *Cunninghamella echinulata* 和深黄被孢霉 *Mortierella isabellina* 油脂积累时发现, 培养基中 C/N 比从 83.5 增加到 133.5 时, *C. echinulata* 和 *M. isabellina* 的油脂含量分别从 36% 和 50% 提高到 47% 和 56%^[24]。同时 Papanikolaou 等还研究了高糖浓度下 *M. isabellina* 油脂积累, 固定培养基中氮源浓度, 改变初始葡萄糖浓度来改变培养基初始 C/N 比, 当培养基初始 C/N 比在 150~340 时, 菌体油脂含量在 50%~55% 之间^[25]。

虽然不如氮限制策略使用广泛, 磷限制在油脂

发酵中也有报道。本实验室在优化 *R. toruloides* 发酵条件时发现, 降低 KH_2PO_4 浓度能显著提高菌体油脂含量^[4]。通过考察不同 C/P 比对该酵母产油的影响, 表明磷限制也是一种非常有效的油脂积累调控策略。在培养基初始 C/N 比为 22 时, 将初始 C/P 比由 72 提高到 9 552, 油脂含量由 21% 提高到 62%^[26]。此外, 对硫限制的初步探索也获得了类似结论。培养基初始 C/N 比为 28, 将初始 C/S 比由 150 提高到 46 750, 油脂含量则由 20% 提高到 58%^[27]。磷和硫是合成核酸、蛋白质和辅酶的必需元素, 这两种元素的缺乏可导致细胞增殖受抑制, 但脂肪酸及油脂合成代谢仍然比较活跃, 所以导致胞内油脂积累。

非氮限制调控策略对利用氮含量丰富的天然原料或废弃物等“粗原料”生产油脂具有重要意义。前面提到的菊芋汁、甲壳素水解产物和味精废水等, 总氮含量比较高, 直接用于培养产油微生物, 往往菌体油脂含量不高。如果采用适当的技术脱除磷源, 提高原料的 C/P 比, 可以使底物更有效地转化为油脂^[28]。

2.2 小分子调控油脂积累

除了不同营养限制因素能够促进油脂积累以外, 近年来也有一些关于小分子调控产油微生物的报道。日本学者 Kimura 等考察了多种香料成分对 *L. starkeyi* 产油能力的影响, 表明浓度为 20 mg/L 的茴香脑、松油醇、乙酰苯等能使产油微生物生长或油脂积累提高 10%~46%^[29]。希腊学者 Papanikolaou 等发现甜橙精油对 *Y. lipolytica* 生长和产油有影响。增加培养基中精油添加量, 酵母生物量大幅度降低, 产物中饱和脂肪酸含量增加^[30]。本实验室考察了真菌群体感应分子色醇对 *L. starkeyi* 产油能力的影响。接种培养 36 h 后向培养基添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 色醇, 生物量、油脂量和油脂得率系数分别增加 7.4%、13.9% 和 14.2%, 并且发酵时间缩短 13.3%^[31]。由此可见, 通过在产油发酵过程中使用某些小分子化合物, 可能达到提高油脂生产效率, 甚至调节产物中脂肪酸相对含量的效果。小分子调控油脂积累不仅简单易行, 而且对于研究产油微生物油脂代谢调控的分子

基础具有重要价值。

2.3 应用不同发酵模式调控油脂发酵

通常利用微生物生产胞内产物, 可以采用的培养方式有 3 种: 批式培养、补料-批式培养和连续培养。文献中产油微生物的培养方式主要是批式培养。在批式培养过程中, 由于菌体生长受到培养基中营养物初始浓度限制, 当菌体生长到一定浓度时, 培养基中一种或几种营养物质浓度成为细胞增殖的限制因素。简单地提高限制性营养物质的初始浓度, 不一定能提高生长量; 相反高浓度营养物质还可对细胞产生毒害作用。因此, 采用批式培养很难获得很高的产物浓度和生产强度。梁燕娜等以粗甘油为碳源培养 *C. curvatus* 生产油脂, 在批式培养条件下, 甘油浓度为 20 g/L 时生物量约为 6 g/L, 提高甘油浓度至 40 g/L 时, 菌体生长受到明显抑制; 而在补料-批式培养条件下, 初始甘油浓度为 30 g/L 左右, 经过多次补料, 生物量最终达到 30 g/L 以上, 菌体密度明显提高^[20]。本实验室采取三种补料-批式培养方式提高 *R. toruloides* 油脂发酵的生产强度。首先采取间歇补料方式, 即在培养基中葡萄糖浓度降低至 5 g/L 时补加高浓度糖溶液至 50 g/L, 在 144 h 内重复 5 次补料, 最终油脂生产强度为 0.36 g/(L·h); 其次采取连续流加的补料方式, 将葡萄糖浓度控制在 5 g/L, 相同时间内油脂生产强度提高到 0.57 g/(L·h); 最后采取重复-补料-批式培养的方式, 培养 358 h, 平均油脂生产强度为 0.55 g/(L·h)^[32]。此外, 为缩短发酵时间, 减少原料消耗, 本实验室还提出了细胞增殖和油脂积累分离的两阶段培养模式, 用于制备微生物油脂。将增殖阶段获得的 *R. toruloides* 细胞直接重悬接种于葡萄糖水溶液中, 通气培养, 发现菌体内快速积累油脂, 最终油脂含量超过 55%^[33]。两阶段培养模式可节省氮源及其他辅料, 减少油脂发酵生产废水排放; 并且由于油脂积累阶段几乎无细胞增殖, 碳源全部用于生产油脂, 产物得率高。

除液态发酵模式以外, 近年来有一些工作探索了将固态发酵模式应用于获取微生物油脂。中国科学院过程工程研究所陈洪章等用经汽爆预处理的麦

秆为原料, 接种培养一种可分泌纤维素酶的植物内生真菌, 油脂得率为 42 mg/g 干物质^[34]。浙江大学赵宇华等利用米曲霉 *Aspergillus oryzae* 转化麦秆生产微生物油脂, 在优化条件下油脂得率为 62 mg/g 干物质^[35]。希腊学者 Vayenas 等开发了一种半固态培养模式, 利用 *M. isabellina* 转化甜高粱为微生物油脂。当培养体系中水含量为 92% 时, 油脂得率为 110 mg/g 干物质^[36]。

3 产油真菌油脂积累机制研究进展

对于产油微生物, 尤其是产油酵母的油脂过量积累机制, 当前还主要停留在生化水平上, 详细内容可以参考最新的文献^[23,37]。一般认为, 产油酵母线粒体中的异柠檬酸脱氢酶 (ICDH) 受到 AMP 的变构调节。当胞内氮源匮乏时, AMP 在脱氨酶作用下转化为肌苷酸和氨, 导致线粒体中柠檬酸积累, 并被转运到胞浆中。产油酵母中含有 ATP-柠檬酸裂解酶 (ACL), 可以将柠檬酸裂解为乙酰 CoA 和草酰乙酸, 并进一步在脂肪酸合酶 (FAS) 作用下完成脂肪酰 CoA 和油脂合成。值得注意的是, 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 基因组不含有编码 ACL 的基因, 进一步表明油脂过量积累的表型具有特定的代谢基础。然而在产油真菌卷枝毛霉 *Mucor circinelloides* 和高山被孢霉 *M. alpina* 中 ICDH 的体外活性并不完全依赖于 AMP^[38]。ACL 催化反应的另一产物草酰乙酸经苹果酸脱氢酶还原成苹果酸, 再在苹果酸脱氢酶 (ME) 作用下氧化脱羧得到丙酮酸, 并释放 NADPH。研究表明, 产油微生物油脂积累与 ME 代谢调控有关: ME 受到抑制, 则油脂积累下降。这是因为虽然代谢网络中有许多可生成 NADPH 反应, 但脂肪酸合成碳链延伸反应所需的 NADPH 几乎完全来源于 ME 催化的反应^[39]。在 *M. circinelloides* 中过表达编码 ME 的基因, 发现油脂积累量提高 2.5 倍^[40]。但是, 由于 FAS 生成每个 2 碳单元 (-CH₂CH₂-) 需要消耗 2 分子 NADPH, 而 ACL 活性在生成 1 分子 2 碳单元合成前体乙酰 CoA

时只能最终得到 1 分子 NADPH。因此,从化学计量关系分析,脂肪酸合成还需要其他途径供给还原当量。由于脂肪酸和油脂是还原度很低的代谢产物,生物合成需要消耗大量还原当量。目前人们对产油微生物中还原当量供给途径还缺乏清晰了解。

本实验室最近克隆了产油酵母 *L. starkeyi* 编码 IDH 的基因,通过荧光定量 PCR 技术在转录水平验证了 IDH 活性与胞内油脂积累的关系^[41]。分离、鉴定了产油酵母 *R. toruloides* 编码 IDH 的基因,通过 *S. cerevisiae* 基因替换实验发现,异源表达 *R. toruloides* 的 IDH 活力受培养环境 C/N 比调控,并与胞内油脂含量密切相关^[42]。另外,分离得到了来源于 *L. starkeyi* 一个 ME 基因,并且研究了相应重组蛋白的生化性质^[43]。

对产油微生物的组学研究仍处于初始阶段。*Y. lipolytica* CLIB122 是目前已经完成全基因组测序的产油酵母,其基因组大小为 20 Mb,其单倍体菌株含有 6 条染色体^[44]。但相对于其他高产油酵母,当以碳水化合物为碳源时,*Y. lipolytica* 胞内油脂含量通常低于 20%,因此并非真正意义上的产油酵母。美国能源部 Joint Genome Institute 已经完成 *L. starkeyi* NRRL Y11557 的全基因组草图,相信不久即可为产油机制研究提供大量新信息。Athenstaedt 等应用蛋白质组学方法研究了 *Y. lipolytica* ATCC 20460 胞内脂肪粒 (Lipid particle) 相关的蛋白质,发现碳源和培养条件对脂肪粒的蛋白质和脂肪化学组成具有明显影响^[45]。本实验室开展了油脂发酵过程差异蛋白质组学研究。利用限氮培养诱导 *R. toruloides* 和 *L. starkeyi* 油脂积累,通过二维液相色谱/串联质谱技术分析不同培养阶段细胞的蛋白质组,进行比较及半定量蛋白质组学分析。从 *R. toruloides* 样品中鉴定出 114 种差异表达的蛋白质,其中 46 种蛋白质在油脂合成过程中表达水平有显著变化^[46]。从 *L. starkeyi* 样品中鉴定出 289 种差异表达的蛋白质,其中 81 种蛋白质在油脂合成过程中表达水平有显著变化^[47]。这些结果不仅说明了培养环境氮源匮乏对油脂积累代谢的影响,而且为深入探讨胞内油脂代谢的机制

和理性改造产油微生物提供了重要信息。

总之,当前产油真菌的遗传背景信息非常有限,分子操作技术不成熟,导致揭示油脂过量积累的分子机制和菌株改造研究进展缓慢。

4 能源微生物油脂技术存在的问题和展望

发酵法生产油脂,具有周期短、可连续运行、原料丰富、生产潜力大等突出优点。利用单糖为原料,目前油脂发酵已达到较高水平,如菌体密度达到 151 g/L,油脂产量 72 g/L^[48]。但是,规模化生产微生物油脂,尚面临一些问题。首先是发酵原料问题。由于采用单糖或淀粉质原料生产油脂不仅成本高,而且原料供给总量难以保障。因此,能源油脂发酵必须使用其他非粮原料,包括木质纤维素原料、工业有机废弃物等。总体上,木质纤维素资源处理成可发酵原料的技术还不成熟。针对原料问题,需要特别关注产油菌株的原料适应性和抗逆性。在未来的工作中,应研究复杂原料条件下产油微生物生长代谢规律,建立与油脂发酵相匹配的原料处理方法,改造产油菌株的底物利用能力。能源油脂发酵还面临新的生物化学工程问题。油脂是微生物的胞内产物,尚不能自然分泌到胞外,必须经过分离提取工艺才能从发酵醪液回收得到。在进行高密度油脂发酵时,氧传递等工程问题非常明显。因此,通过传统诱变手段或现代分子生物学手段,创建分泌包括油脂在内脂肪酸代谢衍生物的菌株,对简化产物分离、提高得率、实现能源油脂的连续生产具有重大意义。如果单从生物柴油制备技术看,直接利用产油微生物干菌体进行甲酯化制备生物柴油,省去了油脂提取步骤,也可能降低生物柴油总生产成本^[49]。

成本高是能源微生物油脂生产的制约因素之一。但是,目前还较少考虑能源微生物油脂伴生产物的价值。按照生物炼制和绿色化学理念,原料经油脂发酵转化后得到的物质需要进一步以“吃干榨尽”的方式转化为多种产品。例如,可开发利用油脂提取剩余物,从中分离得到高值化产品;也可以从微生物油脂中分离高值化产品。常见的产油红酵母,

可同时产生类胡萝卜素、甾醇、脂肪酶等产品, 值得进行深入研究。另外, 应用合成生物学理念构建生产包括油脂在内的脂肪酸代谢衍生物的菌株, 设计产物的化学结构和组成, 也可能显著改善技术经济性。例如, 通过对大肠杆菌 *Escherichia coli* 基因组进行改造, 获得了以葡萄糖为碳源合成脂肪酸的工程菌株, 在批式培养条件下脂肪酸浓度达到 2.5 g/L^[50]。通过对 *E. coli* 脂肪酸代谢途径进行系统再设计, 通过敲除产物降解基因、过表达内源基因、敲入具有新功能的外源基因等手段, 得到一系列可利用葡萄糖为碳源过量生产脂肪酸、脂肪醇和脂肪酸乙酯的工程菌株; 更重要的是, 通过向 *E. coli* 中导入来源于粪堆梭菌 *Clostridium stercorarium* 的木聚糖内切酶基因和来源于卵形拟杆菌 *Bacteroides ovatus* 的木聚糖酶基因, 工程菌株可以直接利用木聚糖为碳源产生脂肪酸乙酯^[51]。日本 Kamisaka 等敲除了 *S. cerevisiae* 的转录因子 *SNF2*, 进一步过表达甘油二酯酰基转移酶, 突变株油脂含量提高到 30%^[52]。值得注意的是, 虽然 *E. coli*、*S. cerevisiae* 等模式材料易于进行遗传操作, 但它们产生脂肪酸代谢衍生物, 尤其是油脂, 的能力还远低于已知的产油微生物菌株。模式材料衍生的工程菌株可能存在如产物耐受性低、原料适应范围窄、抗逆性弱等性状缺陷。因此, 选择合适的宿主进行改造, 已逐步受到重视和认可, 并将成为今后研究的热点^[53]。针对产油能力突出的 *R. toruloides*, 本实验室已着手开展其营养缺陷型菌株和遗传操作方法研究^[42,54]。开展产油微生物基因工程和靶向性菌株改造研究, 将是未来重要的研究方向之一。

总之, 将生物质资源转化为包括油脂在内的脂肪酸代谢衍生物, 已经成为当前生物能源研究的重要方向, 日益受到重视^[55]。能源微生物油脂技术可为生物柴油产业提供原料, 已经取得很大进展。但是, 规模化生产微生物油脂, 正如规模化生产其他生物燃料产品一样, 仍然面临着困难^[56]。随着现代生物技术和合成生物学不断发展, 能源微生物油脂研究在生物炼制和绿色化学理念指导下, 将持续改善过程的综合技术经济性, 最终为生物燃料生产提

供可靠技术。

REFERENCES

- [1] Thorpe RF, Ratledge C. Fatty acid distribution in triglycerides of yeasts grown on glucose or *n*-alkanes. *J Gen Microbiol*, 1972, 72(1): 151-163.
- [2] Cohen Z, Ratledge C. *Single Cell Oils*. Champaign: AOCS Press, 2005: 1-20.
- [3] Zhao ZB. Toward cheaper microbial oil for biodiesel. *China Biotechnol*, 2005, 25(2): 8-11.
赵宗保. 加快微生物油脂研究为生物柴油产业提供廉价原料. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(2): 8-11.
- [4] Li YH, Liu B, Zhao ZB, et al. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chin J Biotech*, 2006, 22(4): 650-656.
李永红, 刘波, 赵宗保, 等. 圆红冬孢酵母菌发酵产油脂培养基及发酵条件的优化研究. *生物工程学报*, 2006, 22(4): 650-656.
- [5] Zhu LY, Zong MH, Wu H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresour Technol*, 2008, 99(16): 7881-7885.
- [6] Chen X, Li ZH, Zhang XX, et al. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 159(3): 591-604.
- [7] Hu CM, Zhao X, Zhao J, et al. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol*, 2009, 100(20): 4843-4847.
- [8] Dai CC, Tao J, Xie F, et al. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr J Biotechnol*, 2007, 6(18): 2130-2134.
- [9] Huang C, Zong MH, Wu H, et al. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresour Technol*, 2009, 100(19): 4535-4538.
- [10] Li Q, Jiang XL, He YC, et al. Evaluation of the biocompatible ionic liquid 1-methyl-3-methylimidazolium dimethylphosphite pretreatment of corn cob for improved saccharification. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(1): 117-126.
- [11] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J Biotechnol*, 1997, 56(1): 1-24.
- [12] Li YH, Liu B, Sun Y, et al. Screening of oleaginous yeasts for broad-spectrum carbohydrates assimilation capacity.

- China Biotechnol, 2005, 25(12): 39–44.
李永红, 刘波, 孙艳, 等. 广谱碳源产油酵母菌的筛选. 中国生物工程杂志, 2005, 25 (12): 39–44.
- [13] Zhao X, Kong XL, Hua YY, et al. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. Eur J Lipid Sci Tech, 2008, 110(5): 405–412.
- [14] Wu SG, Hu CM, Zhao X, et al. Production of lipid from *N*-acetylglucosamine by *Cryptococcus curvatus*. Eur J Lipid Sci Tech, 2010, 112(7): 727–733.
- [15] Wu SG, Zhao X, Hu CM, et al. Screening of fungi for microbial oil production using *N*-acetyl-D-glucosamine. China Biotechnol, 2008, 28(11): 58–62.
吴思国, 赵鑫, 胡翠敏, 等. 转化 *N*-乙酰-D-葡糖胺产油真菌的筛选. 中国生物工程杂志, 2008, 28(11): 58–62.
- [16] Hua YY, Zhao X, Zhao J, et al. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using Jerusalem artichoke tubers. China Biotechnol, 2007, 27(10): 59–63.
华艳艳, 赵鑫, 赵金, 等. 圆红冬孢酵母发酵菊芋块茎产油脂的研究. 中国生物工程杂志, 2007, 27(10): 59–63.
- [17] Zhao X, Wu SG, Hu CM, et al. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4. J Ind Microbiol Biot, 2010, 37(6): 581–585.
- [18] Zhao CH, Cui W, Liu XY, et al. Expression of inulinase gene in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and single cell oil production from inulin-containing materials. Metab Eng, 2010, 12(6): 510–517.
- [19] Karatay SE, Dönmez G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. Bioresour Technol, 2010, 101(20): 7988–7990.
- [20] Liang YN, Cui Y, Trushenski J, et al. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. Bioresour Technol, 2010, 101(19): 7581–7586.
- [21] Xue FY, Miao JX, Zhang X, et al. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. Bioresour Technol, 2008, 99(13): 5923–5927.
- [22] Xue FY, Gao B, Zhu YQ, et al. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. Bioresour Technol, 2010, 101(15): 6092–6095.
- [23] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Adv Appl Microbiol, 2002, 51: 1–51.
- [24] Papanikolaou S, Sarantou S, Komaitis M, et al. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. J Appl Microbiol, 2004, 97(4): 867–875.
- [25] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. Bioresour Technol, 2004, 95(3): 287–291.
- [26] Wu SG, Hu CM, Jin GJ, et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. Bioresour Technol, 2010, 101(15): 6124–6129.
- [27] Wu SG, Zhao X, Shen HW, et al. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. Bioresour Technol, 2011, 102(2): 1803–1807.
- [28] Wu SG. Studies on yeast oil fermentation by sulfate and phosphate regulation under nitrogen-sufficient conditions [D]. Dalian: Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, 2010.
吴思国. 氮源丰富条件下酵母油脂发酵硫和磷调控策略的研究[D]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2010.
- [29] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Inhibition of lipid accumulation and lipid body formation in oleaginous yeast by effective components in spices, carvacrol, eugenol, thymol, and piperine. J Agri Food Chem, 2006, 54(10): 3528–3534.
- [30] Papanikolaou S, Gortzi O, Margeli E, et al. Effect of Citrus essential oil addition upon growth and cellular lipids of *Yarrowia lipolytica* yeast. Eur J Lipid Sci Tech, 2008, 110(11): 997–1006.
- [31] Wu S, Hua YY, Zhong CB, et al. The effect of tryptophol on lipid fermentation by *Lipomyces starkeyi*. Microbiol China, 2008, 35(2): 200–203.
武双, 华艳艳, 仲崇斌, 等. 色醇对斯达氏油脂酵母产油能力的影响. 微生物学通报, 2008, 35(2): 200–203.
- [32] Zhao X, Hu CM, Wu SG, et al. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. J Ind Microbiol Biot, 2010, doi: 10.1007/s10295-010-0808-4.
- [33] Lin JT, Shen HW, Zhang ZH, et al. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* in a two-stage culture mode. Chin J Biotech, 2010, 26(7): 997–1002.
林金涛, 沈宏伟, 张泽会, 等. 圆红冬孢酵母两阶段培养法生产微生物油脂. 生物工程学报, 2010, 26(7):

- 997–1002.
- [34] Peng XW, Chen HZ. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. *Bioresour Technol*, 2008, 99(9): 3885–3889.
- [35] Lin H, Cheng W, Ding HT, et al. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. *Bioresour Technol*, 2010, 101(19): 7556–7562.
- [36] Economou CN, Makri A, Aggelis G, et al. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresour Technol*, 2010, 101(4): 1385–1388.
- [37] Liu B, Sun Y, Liu YH, et al. Progress on microbial glyceride biosynthesis and metabolic regulation in oleaginous microorganisms. *Acta Microbiol Sin*, 2005, 45(1): 153–156.
刘波, 孙艳, 刘永红, 等. 产油微生物油脂生物合成与代谢调控研究进展. *微生物学报*, 2005, 45(1): 153–156.
- [38] Wynn JP, Hamid AA, Li YH, et al. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*, 2001, 147(10): 2857–2864.
- [39] Ratledge C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30(6): 1047–1050.
- [40] Zhang Y, Adams IP, Ratledge C. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology*, 2007, 153(7): 2013–2025.
- [41] Tang W, Zhang SF, Wang Q, et al. The isocitrate dehydrogenase gene of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is linked to lipid accumulation. *Can J Microbiol*, 2009, 55(9): 1062–1069.
- [42] Yang F. Studies on molecular microbiology of *Rhodospiridium toruloides* [D]. Dalian: Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, 2010.
杨帆. 圆红冬孢酵母的分子微生物学研究[D]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2010.
- [43] Tang W, Zhang SF, Tan HD, et al. Molecular cloning and characterization of a malic enzyme gene from the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Mol Biotechnol*, 2010, 45(2): 121–128.
- [44] Dujon B, Sherman D, Fischer G, et al. Genome evolution in yeasts. *Nature*, 2004, 430(6995): 35–44.
- [45] Athenstaedt K, Jolivet P, Boulard C, et al. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *Proteomics*, 2006, 6(5): 1450–1459
- [46] Liu HW, Zhao X, Wang FJ, et al. Comparative proteomic analysis of *Rhodospiridium toruloides* during lipid accumulation. *Yeast*, 2009, 26(10): 553–566.
- [47] Liu HW, Zhao X, Wang FJ, et al. The proteome analysis of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *FEMS Yeast Res*, 2011, 11(1): 42–51.
- [48] Li YH, Zhao ZB, Bai FW. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb Tech*, 2007, 41(3): 312–317.
- [49] Liu B, Zhao ZB. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J Chem Technol Biot*, 2007, 82(8): 775–780.
- [50] Lu XF, Vora H, Khosla C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production. *Metab Eng*, 2008, 10(6): 333–339.
- [51] Steen EJ, Kang YS, Bokinsky G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 2010, 463(7280): 559–562.
- [52] Kamisaka Y, Tomita N, Kimura K, et al. *DGAI* (diacylglycerol acyltransferase gene) overexpression and leucine biosynthesis significantly increase lipid accumulation in the *Asnf2* disruptant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 2007, 408(1): 61–68.
- [53] Alper H, Stephanopoulos G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(10): 715–723.
- [54] Yang F, Zhang SF, Tang W, et al. Identification of the orotidine-5'-monophosphate decarboxylase gene of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Yeast*, 2008, 25(9): 623–630.
- [55] Rude MA, Schirmer A. New microbial fuels: a biotech perspective. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(3): 274–281.
- [56] Richard TL. Challenges in scaling up biofuels infrastructure. *Science*, 2010, 329(5993): 793–796.