

# 皮状丝孢酵母 B3 利用木薯淀粉发酵生产微生物油脂

袁锦云<sup>1,2</sup>, 艾佐佐<sup>1</sup>, 张志斌<sup>1</sup>, 颜日明<sup>1</sup>, 曾庆桂<sup>1</sup>, 朱筠<sup>1,2</sup>

1 江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 南昌 330022  
2 宜春学院 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 宜春 336000

**摘要:** 对皮状丝孢酵母 B3 以木薯淀粉水解液为碳源发酵生产微生物油脂培养条件进行了优化, 并在 2 L 发酵罐中对菌体生长和油脂积累进行了考察。摇瓶实验表明, 木薯淀粉水解液的浓度高于 90 g/L 时不利于菌体的生长和油脂积累, 皮状丝孢酵母 B3 发酵生产微生物油脂的最适氮源及其浓度、最适 C/N 比和 pH 分别为酵母提取物 3.0 g/L、116、6.0, 在此条件下培养 144 h 菌体生物量、油脂产量和油脂含量分别达到 15.2 g/L、6.22 g/L 和 40.9%; 在 2 L 发酵罐中分批发酵 44 h 后菌体生物量、油脂产量和油脂含量分别达 28.7 g/L、12.27 g/L 和 42.8%。以皮状丝孢酵母 B3 所产油脂制备生物柴油, 其主要组成包括棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯等, 且理化特性符合相关国家标准, 可作为一种有潜力的化石燃料替代品。

**关键词:** 皮状丝孢酵母 B3, 木薯淀粉, 微生物油脂, 生物柴油

## Microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* B3 using cassava starch

Jinyun Yuan<sup>1,2</sup>, Zuozuo Ai<sup>1</sup>, Zhibin Zhang<sup>1</sup>, Riming Yan<sup>1</sup>, Qinggui Zeng<sup>1</sup>, and Du Zhu<sup>1,2</sup>

1 Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources of Jiangxi Province, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China  
2 Key Laboratory for Research on Active Ingredients in Natural Medicine of Jiangxi Province, Yichun University, Yichun 336000, China

**Abstract:** Microbial oil, as raw material for biodiesel, can be produced by *Trichosporon cutaneum* B3 using cassava starch hydrolysate. Batch cultures demonstrated that there was little inhibitory effect with the concentration of cassava starch hydrolysate up to 90 g/L. The favorable initial pH, C/N molar ratio, nitrogen source and its concentration were 6.0, 116, yeast extract and 3.0 g/L, respectively. Under the optimized conditions, dry biomass reached 15.2 g/L and lipid content reached 40.9% after culture for 144 h in flask. Batch cultures in a 2 L stirred-tank fermenter were run for 44 h and resulted in dry biomass, lipid content and lipid yield of 28.7 g/L, 42.8% and 12.27 g/L, respectively. The chemical compositions of biodiesel prepared from lipids of *T. cutaneum* B3 mainly included palmitic acid methyl ester, stearic acid methyl ester, oleic acid methyl ester and linoleic acid methyl ester etc., and its main physicochemical properties were in compliance with relevant national diesel standards. Therefore, the biodiesel prepared from lipids of *T. cutaneum* B3 can serve as a potential fossil fuel alternatives.

**Keywords:** *Trichosporon cutaneum* B3, cassava starch, microbial oil, biodiesel

**Received:** October 13, 2010; **Accepted:** February 18, 2011

**Supported by:** Academic and Technical Leaders Training Program for Major Subjects of Jiangxi Province.

**Corresponding author:** Du Zhu. Tel: +86-795-3200616; E-mail: zhudu12@163.com

江西省主要学科学术与技术带头人培养计划资助。

作为一种可替代化石燃料的可再生新能源,生物柴油已引起人们的广泛关注。迄今,生物柴油的制备主要以植物油脂为原料,存在原料短缺、生产成本高等问题,这严重制约了其产业化进程<sup>[1-2]</sup>。大部分微生物油脂的脂肪酸组成和一般植物油相近,且微生物具有细胞增殖快、生产周期短、生长所需的原料丰富等优点,因此微生物油脂发酵生产成为生物柴油产业和生物经济的重要研究方向<sup>[3]</sup>。由于微生物油脂发酵生产存在培养基原料成本高、油脂产率低等问题,导致微生物油脂用于制备生物柴油在经济上不可行。

寻找新的廉价而优质的微生物油脂发酵培养基原料,开发新的微生物油脂生产工艺,提高发酵过程中细胞生物量及油脂含量,从而降低生产成本成为目前研究重点。迄今,国内外已有不少利用工农业废弃物和可再生资源发酵生产微生物油脂的报道<sup>[4-6]</sup>。木薯作为非粮作物,不仅具有适应性强、生长快、产量大、可生长于山野荒地、不与粮食争地等优点<sup>[7]</sup>,而且木薯淀粉水解为还原糖的转化率高,成为发酵生产微生物油脂的良好候选原料。研究和开发以木薯淀粉为原料生产微生物油脂的发酵工艺,不仅能降低微生物油脂的生产成本,而且能增加农民的收入,带动地区经济发展,具有巨大的经济价值和良好的社会效益。

本研究选用本实验室经诱变选育获得的皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* B3 为发酵菌株,以木薯淀粉水解液为碳源,进行了皮状丝孢酵母 B3 发酵产油脂的摇瓶培养条件优化,并考察了其在 2 L 发酵罐中培养的生长和油脂积累情况,分析了以其所产油脂制备的生物柴油的成分及主要理化性能,为利用皮状丝孢酵母 B3 发酵微生物油脂进而合成生物柴油奠定研究基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 木薯淀粉样品

木薯淀粉购自广西武鸣县恒星淀粉厂。

#### 1.1.2 发酵菌种

皮状丝孢酵母 B3 由本实验室筛选并经诱变选育而得。

#### 1.1.3 培养基

固体培养基:葡萄糖:70 g/L;酵母提取物:1 g/L;NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>:0.5 g/L;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.75 g/L;CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O:0.4 g/L;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:0.4 g/L;琼脂:20 g/L;pH 6.0。

种子培养基:葡萄糖:70 g/L;酵母提取物:1 g/L;NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>:0.5 g/L;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.75 g/L;CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O:0.4 g/L;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:0.4 g/L;初始 pH 6.0。

摇瓶发酵培养基:以不同浓度木薯淀粉水解液(其浓度以其含还原糖浓度计,下同)为碳源,根据实验需要选择不同的氮源及初始 pH;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:1.5 g/L;CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O:0.4 g/L;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:0.4 g/L。

2 L 发酵罐培养基:木薯淀粉水解液 60 g/L,酵母提取物 3 g/L,其他营养盐成分和含量与摇瓶相同。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 木薯淀粉水解液的制备

称取适量木薯淀粉,加入适量冷水调匀后将 pH 调节至 7.0,再加入适量 90 °C~100 °C 的热水使其糊化,加入 α-淀粉酶(北京东华强盛生物技术有限公司,酶活:4 000 U/g,α-淀粉酶加量:10 U/g 木薯淀粉干重),搅匀后 88 °C 水浴 40 min;冷却后将 pH 调节至 5.5,加入糖化酶(张家港市金源生物化工有限公司,酶活:100 000 U/g,糖化酶加量:1 000 U/g 木薯淀粉干重),搅匀后 65 °C 水浴 40 min。4 000 r/min 离心 10 min,上清液至于 4 °C 保存备用。

### 1.2.2 生物量的测定

浊度法:取发酵液,测定其在 600 nm 下的光密度值 (*OD*<sub>600</sub>) 以此衡量菌体相对生长量。

干重法:收集稳定期的发酵液,4 000 r/min 离心 10 min,蒸馏水洗涤菌体 1~2 次后取沉淀,60 °C 烘至恒重,称重。

### 1.2.3 发酵液中还原糖、总糖及氨基氮的测定

还原糖的测定:采用斐林试剂法<sup>[8]</sup>。

总糖的测定: 取 1 mL 经离心后的发酵液上清, 加入 6 mol/L 的盐酸 5 mL, 煮沸 10 min, 用 6 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至中性。其后步骤同还原糖的测定。

氨基氮含量测定: 采用甲醛滴定法测定<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.4 微生物油脂的提取

油脂提取及测定: 采用索氏提取法。将烘干后的菌体研成粉末后装入索氏提取器, 石油醚加热回流提取 8 h, 旋转蒸发去除石油醚, 真空干燥至恒重即得油脂, 称重<sup>[10]</sup>。

#### 1.2.5 生物柴油的制备、组成及理化性能分析

生物柴油的制备: 取微生物油脂 200 mg, 加 0.4 mol/L 的 KOH-甲醇溶液 5 mL 和正己烷 5 mL, 剧烈振荡 3 min, 在 30 °C 水浴中放置 4 h, 加水 5 mL, 静置分层, 取正己烷层, 真空干燥至恒重即得生物柴油, 称重<sup>[11]</sup>。

脂肪酸甲酯成分测定: 采用气相色谱法进行成分分析, 参照 GB/T 17377-2008<sup>[12]</sup>。

生物柴油的理化性能分析: 密度测定参照 GB/T 1884-2000<sup>[13]</sup>; 运动粘度测定参照 GB/T 265-1988<sup>[14]</sup>; 闪点测定参照 GB/T 261-1983<sup>[15]</sup>; 酸值测定参照 GB/T 264-1983<sup>[16]</sup>; 硫含量测定参照 GB/T 380-1977<sup>[17]</sup>; 十六烷值测定参照 GB/T 386-1991<sup>[18]</sup>。

#### 1.2.6 培养条件

摇瓶培养: 在 250 mL 锥形瓶中进行, 装液量为 75 mL, 5% 的接种量, 摇床转速为 200 r/min, 培养温度为 28 °C。

发酵罐培养: 采用 2 L 发酵罐 (德国 B. Braun), 装液量为 1.3 L, 5% 的接种量, 培养温度为 28 °C, 通气量 1 vvm, 发酵过程中用 NaOH 溶液调节 pH 6.0, 改变转速以控制溶氧在 10% 以上。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同初始浓度木薯淀粉水解液对 *T. cutaneum* B3 生长和油脂产量的影响

微生物油脂的合成需要以培养基中的碳源物质

作为原料, 但是过高的碳源浓度又会对菌体的生长产生抑制作用。为研究不同初始浓度的木薯淀粉水解液对 *T. cutaneum* B3 生长的影响, 在发酵培养基中分别添加了 10~300 g/L 的木薯淀粉水解液, 考察 *T. cutaneum* B3 在不同初始浓度木薯淀粉水解液培养基中的生长情况。

在木薯淀粉水解液的初始浓度低于 90 g/L 的培养基中, 菌体前 24 h 的长势大致相同。但是当发酵培养基中木薯淀粉水解液的初始浓度高于 90 g/L 时, 菌体的生长明显受到了抑制。而木薯淀粉水解液的初始浓度在 30~90 g/L 范围内, 其生长速率变化不大, 这说明 *T. cutaneum* B3 对不同浓度的木薯淀粉水解液有一个较大的生长适宜范围 (图 1)。*T. cutaneum* B3 在不同初始浓度木薯淀粉水解液的培养基中培养 144 h 的摇瓶发酵数据见表 1。当发酵培养基中的初始木薯淀粉水解液浓度从 10 g/L 增加至 80 g/L 时, 生物量和油脂产量分别从 1.4 g/L 和 0.28 g/L 增至 15.6 g/L 和 6.66 g/L。发酵培养基中的初始木薯淀粉水解液浓度为 90 g/L 时, 尽管油脂含量提高至 45.3%, 但是生物量和油脂产量分别下降到 13.1 g/L 和 5.93 g/L, 当发酵培养基中的初始木薯

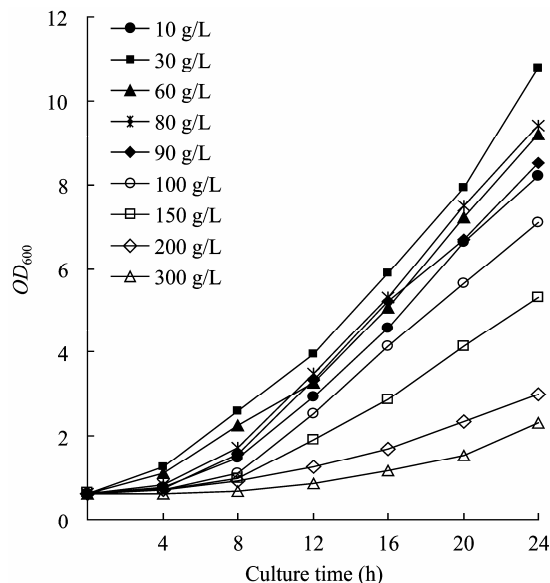


图 1 木薯淀粉水解液浓度对 *T. cutaneum* B3 生长的影响  
Fig. 1 Effect of cassava starch hydrolysate concentration on the growth of *T. cutaneum* B3.

表 1 *T. cutaneum* B3 在不同初始浓度木薯淀粉水解液中的生物量和油脂产量Table 1 Effect of initial cassava starch hydrolysate concentration on cell growth and lipid accumulation of *T. cutaneum* B3

Initial reducing sugar (g/L)	Biomass (g/L)	Lipid yield (g/L)	Lipid content (%)	Sugar utilization (%)	$Y_{x/c}$ (g/g)	$Y_{oil/c}$ (g/g)
10	1.4	0.28	20.1	98	0.143	0.029
20	3.2	0.78	24.5	97	0.165	0.040
30	7.4	2.06	27.9	93	0.265	0.074
40	10.3	3.21	31.2	93	0.277	0.086
50	13.6	5.11	37.6	90	0.302	0.114
60	14.8	6.14	41.5	86	0.287	0.119
70	15.3	6.26	40.9	77	0.284	0.116
80	15.6	6.66	42.7	70	0.279	0.119
90	13.1	5.93	45.3	52	0.280	0.127
100	10.6	4.60	43.4	39	0.272	0.118
150	6.9	2.75	39.8	20	0.230	0.092
200	5.1	2.05	40.2	13	0.196	0.079
300	4.5	1.82	40.5	8	0.188	0.076

All cultures were performed at 28 °C, initial pH 6.0 and 200 r/min for 144 h.

淀粉水解液浓度进一步提高至 150 g/L 时,生物量和油脂产量仅为 6.9 g/L 和 2.75 g/L。发酵培养基中的初始木薯淀粉水解液浓度高于 90 g/L,生物量和油脂产量下降,说明过高的基质浓度对 *T. cutaneum* B3 的生长和油脂积累均有不利影响。导致这种现象的原因可能有两方面:一是过高的基质浓度产生的高渗透压抑制了菌体的生长<sup>[6,19]</sup>,二是过高的糖浓度会使代谢产生的有机酸大量累积,导致发酵液的 pH 值降低,从而不利于菌体的生长和脂肪的合成<sup>[20]</sup>。此外,从培养基中糖的利用率来看,当发酵培养基中的初始木薯淀粉水解液浓度低于 50 g/L 时,虽然糖的利用率均在 90% 以上,但生物量和油脂产量没有达到最佳。综合考虑生物量、油脂含量、油脂产量、糖的利用率和油脂得率等因素,选取 60 g/L 为后续摇瓶实验培养基中木薯淀粉水解液的浓度。

## 2.2 不同氮源浓度对 *T. cutaneum* B3 生长和油脂产量的影响

通过对不同氮源(包括  $KNO_3$ 、 $NH_4Cl$ 、 $NH_4NO_3$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、牛肉膏、酵母提取物、蛋白胨)的筛选,结果表明酵母提取物为 *T. cutaneum* B3 生长和油脂

积累的最适氮源(数据未列出)。

培养基中氮源的浓度对产油菌体的生长和油脂积累有着很大的影响,氮源是菌体生长所必须的,但是过量的氮源又不利于菌体中油脂的积累,因此在微生物油脂发酵中控制碳源和氮源的使用比例十分重要<sup>[6,20]</sup>。研究表明,低浓度的有机氮源有利于菌体中油脂的积累,但是不利于生物量的提高。当酵母提取物的浓度为 4.0 g/L 时,生物量达到最大值 16.4 g/L,但是其油脂含量仅为 31.6%。当酵母提取物的浓度为 3.0 g/L 时,虽然获得的生物量 15.4 g/L 和油脂含量 38.7% 均不是最高值,但是获得了最高的油脂产量 5.97 g/L,此时的 C/N 比为 116。当 C/N 比从 36 提高至 345,菌体内油脂含量随 C/N 比的提高而增加,但当 C/N 比提高至 687 时油脂含量出现了轻微的下降。同时,当酵母提取物的浓度低于 4.0 g/L 时,生物量随着酵母提取物浓度的提高而增加,但是当酵母提取物的浓度高于 4.0 g/L 时生物量反而下降(表 2)。实验中观察到在高浓度的有机氮源的培养基中 *T. cutaneum* B3 的菌丝较长,致使培养液非常粘稠,严重影响溶氧从而抑制了菌体的生长。

表 2 不同酵母提取物浓度对 *T. cutaneum* B3 生长和油脂积累的影响Table 2 Effect of yeast extract concentration on cell growth and lipid accumulation of *T. cutaneum* B3<sup>a</sup>

Yeast extract (g/L)	C/N ratio <sup>b</sup>	Biomass (g/L)	Lipid yield (g/L)	Lipid content (%)	Sugar utilization (%)	Y <sub>X/C</sub> (g/g)	Y <sub>oil/C</sub> (g/g)
0.5	687	6.3	2.6	41.3	35	0.300	0.124
1.0	345	7.6	3.3	43.4	43	0.295	0.128
1.5	230	8.7	3.74	42.9	52	0.279	0.120
2.0	173	11.3	4.56	40.5	71	0.265	0.107
2.5	139	13.5	5.43	40.1	86	0.262	0.105
3.0	116	15.4	5.97	38.7	91	0.282	0.109
3.5	100	16.2	5.88	36.2	83	0.325	0.118
4.0	87	16.4	5.19	31.6	85	0.322	0.102
4.5	78	12.8	3.48	27.2	62	0.344	0.094
5.0	70	12.1	2.81	23.3	59	0.342	0.079
10.0	36	8.3	1.63	19.6	42	0.329	0.065

<sup>a</sup> The carbon source was glucose (60 g/L), and all cultures were performed at 28 °C, initial pH 6.0 and 200 r/min for 144 h. <sup>b</sup> Assuming that yeast extract includes 7% N (W/W) and 12% C (W/W).

虽然酵母提取物为 *T. cutaneum* B3 生长和油脂积累的最适氮源, 但由于使用该氮源存在生产成本较高的问题, 无法应用于工业化生产, 而廉价的无机氮源又不能有效促进菌体生长和油脂的形成, 因此寻找更为廉价的有机氮源势在必行。为此, 我们考察了提取油脂后的废弃细胞代替氮源的可行性。结果表明, 在总氮含量为 0.50 g/L 废弃细胞酶解液中补加 1.0 g/L 的酵母提取物不仅可完全代替 3.0 g/L 酵母提取物, 而且还能提高油脂产量 33.7% (结果另文发表); 此外, 探讨废弃细胞酶解液补加黄豆饼粉、玉米浆等较为廉价的有机氮源完全代替酵母提取物的研究正在进行之中。

### 2.3 初始 pH 对 *T. cutaneum* B3 生长和油脂积累的影响

培养基 pH 值会直接影响到细胞膜的渗透性, 从而影响菌体对培养基中离子的吸收和利用, 并最终影响菌体对碳源的利用效率<sup>[6,21]</sup>, 因此控制发酵培养基 pH 的稳定成为提高生物量和油脂产量的关键。不同初始 pH 对 *T. cutaneum* B3 生物量和油脂含量的影响结果见表 3。当培养基的初始 pH 为 6.0 时, 生物量和油脂产量分别为 15.2 g/L 和 6.22 g/L, 均高于其

他初始 pH 的生物量和油脂产量; 当培养基的初始 pH 处于 5.5~7.0 之间时, 培养 144 h 后所得的生物量和油脂产量相差并不大。

### 2.4 2 L 发酵罐中的分批发酵

为考察 *T. cutaneum* B3 在 2 L 发酵罐中的菌体生长、油脂积累、基质消耗等情况, 摇瓶发酵得出的结果被用于 *T. cutaneum* B3 在 2 L 发酵罐中的放大实验。从图 2 可知, 培养 44 h 后生物量达到 28.7 g/L, 油脂产量达到 12.27 g/L, 油脂含量为 42.8%。与摇瓶相比, *T. cutaneum* B3 在 2 L 发酵罐中的生物量提高了 88.8%, 菌体含油量增加了 1.9%, 油脂产量提高了 97.3%, 发酵周期也大幅度缩短 (由摇瓶的 144 h 缩短至 44 h)。这主要是由于发酵罐较之摇瓶能够提供更好的混合和供氧条件以及稳定的 pH 环境, 有利于菌体生长以及产物合成潜力的有效发挥。此外, 在发酵过程中, 菌体的含油量从接种时的 19.1% 逐渐上升至 44 h 的 42.8% (图 2), 这表明 *T. cutaneum* B3 油脂含量的高低与细胞生长密切相关。因此在后续的研究中, 采用补料分批培养方法适当地补充碳源和氮源, 延长发酵时间, 将有可能增加菌体生物量和含油量, 从而提高油脂产量。

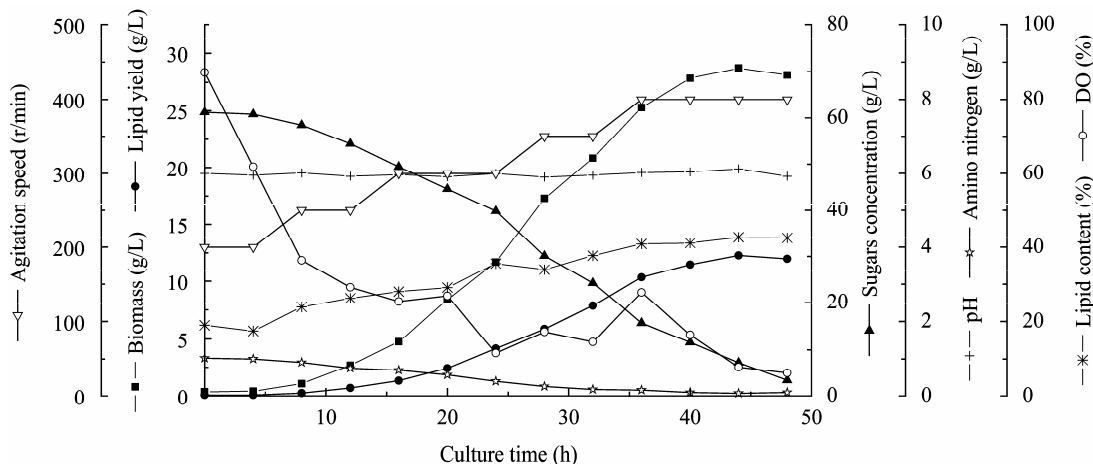


图2 利用 *T. cutaneum* B3 在 2 L 发酵罐中生产微生物油脂

Fig. 2 Profile of lipid production by *T. cutaneum* B3 in a 2 L fermenter.

表3 不同初始 pH 对 *T. cutaneum* B3 生长和油脂积累的影响

Table 3 Effect of initial pH on cell growth and lipid accumulation of *T. cutaneum* B3

Initial pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Lipid yield (g/L)
4.5	9.2	33.8	3.11
5.0	12.6	37.3	4.70
5.5	15.0	40.6	6.09
6.0	15.2	40.9	6.22
6.5	14.4	41.3	5.95
7.0	13.7	38.9	5.33
7.5	12.9	39.5	5.10
8.0	12.5	38.1	4.76
8.5	11.2	40.3	4.51
9.0	10.4	38.6	4.01

All cultures were performed at 28 °C and 200 r/min for 144 h.

## 2.5 生物柴油组成及理化性能分析

以 *T. cutaneum* B3 微生物油脂为原料制备生物柴油, 所得生物柴油中酯含量超过 99%。所制备的生物柴油组成主要包括棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯等, 质量分数分别为 20.92%、13.34%、53.48%、8.23%, 这些组成成分的含量达到所合成生物柴油总量的 96% (表 4), 且所制备的生物柴油的密度、黏度、闪点、酸值、硫含量、十六烷值均符合柴油机燃料调和用生物柴油 (BD100) 国家标准<sup>[22]</sup> (表 5)。以上数据表明, 利用 *T. cutaneum* B3 以木薯淀粉水解液为碳源发酵所产油脂制备的生物柴油可作为一种有潜力的化石燃料替代品。

表4 利用 *T. cutaneum* B3 所产油脂生产的生物柴油成分

Table 4 Components of biodiesel produced from *T. cutaneum* B3 using cassava starch hydrolysate

Components	Fatty acid methyl ester content (%)
Methyl tetradecanoate (C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> )	0.24
Hexadecanoic acid methyl ester (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	20.92
9-Hexadecenoic acid methyl ester (C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	0.18
Heptadecanoic acid methyl ester (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	0.14
Methyl cis-10-Heptadecenoate (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	0.068
Octadecanoic acid methyl ester (C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> )	13.34
9-Octadecenoic acid methyl ester (C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	53.48
9, 12-Octadecadienoic acid methyl ester (C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	8.23
9, 12, 15-Linolenic acid methyl ester (C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	0.79
Eicosanoic acid methyl ester (C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> )	0.52
11-Eicosenoic acid methyl ester (C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> )	0.11
Methyl behenate (C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub> )	0.36
Tetracosanoic acid methyl ester (C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub> )	0.96

表5 微生物油脂生物柴油主要理化性能分析

Table 5 Main properties of biodiesel from microbial oil

Properties	Biodiesel from microbial oil	National standard of biodiesel (GB-T 20828-2007)
Density (kg/L, at 20 °C)	0.856	0.82–0.9
Viscosity (mm <sup>2</sup> /s, 40 °C)	4.8	0.9–6.0
Flash point (°C)	135.0	≥ 130
Acid value (mg KOH/g)	0.351	≤ 0.8
Sulphur content (%)	0.003	≤ 0.05
Cetane number	54.3	≥ 49

### 3 结论

本实验优化了 *T. cutaneum* B3 以木薯淀粉水解液为碳源生产微生物油脂的发酵条件, 探讨了不同基质浓度和 pH 值对其生物量、油脂产量的影响, 研究了其在 2 L 发酵罐中的生长和油脂积累过程。结果表明, 当木薯淀粉水解液的浓度高于 90 g/L 时不利于 *T. cutaneum* B3 的生长和油脂积累; *T. cutaneum* B3 发酵生产微生物油脂的最适氮源及其浓度、最适 C/N 比和 pH 分别为酵母提取物 3.0 g/L、116、pH 6.0, 在此条件下发酵 144 h, 其生物量、油脂产量和油脂含量分别达到 15.2 g/L、6.22 g/L 和 40.9%。在 2 L 机械搅拌发酵罐中培养 44 h, *T. cutaneum* B3 生物量达到 28.7 g/L, 油脂产量达到 12.27 g/L, 油脂含量为 42.8%。理化性能分析表明, 以 *T. cutaneum* B3 所产油脂制备的生物柴油, 完全符合柴油机燃料调和用生物柴油 (BD100) 国家标准, 可作为一种有潜力的化石燃料替代品。

木薯淀粉作为一种产量大、价格便宜的可再生资源, 用作发酵生产微生物油脂的培养基原料有着独特的优势。而且研究结果表明, 提高 *T. cutaneum* B3 油脂的发酵产量可以从提高生物量和通过延长培养时间来提高菌体的油脂含量两方面着手, 其油脂产量的提高仍有巨大的潜力。为提高以木薯淀粉为原料发酵生产微生物油脂的产量, 本研究小组已经着手了补料分批式发酵生产微生物油脂工艺的研究。

### REFERENCES

- [1] Li Q, Du W, Liu DH. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnology*, 2008, 80(5): 749–756.
- [2] Subramaniam R, Dufreche S, Zappi M, et al. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37(12): 1271–1287.
- [3] Zhao ZB. Toward cheaper microbial oil for biodiesel oil. *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] Xue FY, Miao JX, Zhang X, et al. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Biores Technol*, 2008, 99(13): 5923–5927.
- [5] Huang C, Zong MH, Wu H, et al. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Biores Technol*, 2009, 100(19): 4535–4538.
- [6] Zhu LY, Zong MH, Wu H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Biores Technol*, 2008, 99(16): 7881–7885.
- [7] Fang J, Pu WH, Zhang HJ. The development status of cassava industry at home and abroad. *Chin Agri Sci Bull*, 2010, 26(16): 353–361.
- 方佳, 濮文辉, 张慧坚. 国内外木薯产业发展近况. *中国农学通报*, 2010, 26(16): 353–361.
- [8] Li XM, Yang JH, Zhang LQ, et al. Comparisons of determination approaches of reducing sugar. *Shandong Science*, 2008, 21(2): 18–20.
- 李雪梅, 杨俊慧, 张利群, 等. 还原糖测定方法的比较. *山东科学*, 2008, 21(2): 18–20.
- [9] Ning ZX. *Food Composition Analysis Manual*. Beijing: China Light Industry Press, 1998: 119–121.
- 宁正祥. 食品成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 119–121.
- [10] Li ZF, Zhang L, Shen XJ, et al. A Comparative study on four method of fungi lipid extraction. *Microbiology*, 2001, 28(6): 72–75.
- 李植峰, 张玲, 沈晓京, 等. 四种真菌油脂提取方法的比较研究. *微生物学通报*, 2001, 28(6): 72–75.
- [11] Lu Y, Zhai Y, Liu MS, et al. Biodiesel production from algal oil using cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as feedstock. *J Appl Phycol*, 2010, 22(5): 573–578.
- [12] GB/T 17377-2008, Animal and vegetable fats and oils-Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids.
- GB/T 17377-2008 动植物油脂脂肪酸甲酯的气相色谱分析.
- [13] GB/T 1884-2000, Crude petroleum and liquid petroleum products-Laboratory determination of density-hydrometer method.
- GB/T 1884-2000 原油和液体石油产品密度实验室测定法 (密度计法).

- [14] GB/T 265-1988, Petroleum products—determination of kinematic viscosity and calculation of dynamic viscosity. GB/T 265-1988 石油产品运动粘度测定法和动力粘度计算法.
- [15] GB/T 261-2008, Determination of flash point—Pensky Martens closed cup method. GB/T 261-2008. 闪点的测定 (宾斯基-马丁闭口杯法).
- [16] GB/T 264-1983, Petroleum products—determination of acid number. GB/T 264-1983 石油产品酸值测定法.
- [17] GB/T 380-1977, Petroleum products—determination of sulphur—Lamp method. GB/T 380-1977 石油产品硫含量测定法 (燃灯法).
- [18] GB/T 386-1991, Diesel fuels—determination of ignition quality by the cetane method. GB/T 386-1991 柴油着火性质测定法 (十六烷值法).
- [19] Zhao X, Hu CM, Wu SG, et al. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. J Ind Microbiol Biotechnol, 2010, doi: 10.1007/s10295-010-0808-4.
- [20] Li YH, Zhao ZB, Bai FW. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. Enzyme Microbial Technol, 2007, 41(3): 312–317.
- [21] Wang C, Li H, Wang QQ, et al. Effect of pH on growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* cultured in biogas slurry. Chin J Biotech, 2010, 26(8): 1074–1079. 王翠, 李环, 王钦琪, 等. pH 值对沼液培养的普通小球藻生长及油含量积累的影响. 生物工程学报, 2010, 26(8): 1074–1079.
- [22] GB/T 20828-2007, Biodiesel blend stock (BD100) for diesel engine fuels. GB/T 20828-2007 柴油机燃料调和用生物柴油 (BD100).

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 中国至 2050 年农业科技发展路线图 (英文版)

赵其国 著作

开本: 大 16 开 营销分类: 农业 装帧: 平装

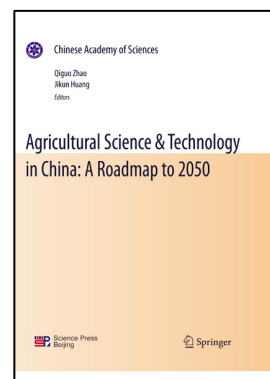
ISBN 978-7-03-029978-9 ¥108.00 2011 年 1 月出版

#### 内容简介

本书明确了至 2050 年全球和我国农业发展面临的挑战与机遇, 预测我国未来对农业科技的重大需求, 提出至 2050 年我国农业科技领域发展战略目标、分阶段目标, 提出各阶段农业科技发展的主要方向及可突破的重大科学技术问题, 形成未来农业科技发展的总体路线图, 并提出为实现以上目标所需要的体制、资源、人才等方面的政策建议。

**读者对象** 本报告可作为政府部门、科研机构、大学、企业进行科技战略决策的重要参考, 也可供国内外专家、学者研究和参考。

**编辑推荐** 作者“中国科学院农业领域战略研究组”成员均为我国农业领域权威专家。语言简洁明了, 表述清晰。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: [www.dangdang.com](http://www.dangdang.com) [www.joy.com](http://www.joy.com) [www.amazon.cn](http://www.amazon.cn) [www.beifabook.com](http://www.beifabook.com)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目