

恒化培养稀释率和碳氮比对圆红冬孢酵母 油脂积累的影响

沈宏伟^{1,2}, 靳国杰², 胡翠敏², 龚志伟², 白凤武^{1,2}, 赵宗保^{2,3}

1 大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023

2 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023

3 大连洁净能源国家实验室(筹), 辽宁 大连 116023

沈宏伟, 靳国杰, 胡翠敏, 等. 恒化培养稀释率和碳氮比对圆红冬孢酵母油脂积累的影响. 生物工程学报, 2012, 28(1): 56-64.

Shen HW, Jin GJ, Hu CM, et al. Effects of dilution rate and carbon-to-nitrogen ratio on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* under chemostat conditions. Chin J Biotech, 2012, 28(1): 56-64.

摘 要: 采用恒化培养的方法, 考察了稀释率 (D) 和碳氮比 (mol/mol) 对圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* AS 2.138 9 积累油脂的影响。结果表明: 稀释率增大, 油脂含量和油脂得率降低。在 $D=0.02 \text{ h}^{-1}$ 时油脂得率最大, 为 0.18 g 油/g 糖 ; $D=0.14 \text{ h}^{-1}$ 时油脂生成速率最大, 为 $0.09 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ 。碳氮比增大, 油脂含量略有增加。在 $C/N=92$ 时油脂得率最大, 为 0.12 g 油/g 糖 ; $C/N=32$ 时油脂生成速率最大, 为 $0.13 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ 。碳氮比对油脂的脂肪酸组成影响不明显, 油脂的棕榈酸、硬脂酸和油酸总含量超过 85%。

关键词: 圆红冬孢酵母, 恒化培养, 稀释率, 碳氮比, 油脂

Effects of dilution rate and carbon-to-nitrogen ratio on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* under chemostat conditions

Hongwei Shen^{1,2}, Guojie Jin², Cuimin Hu², Zhiwei Gong², Fengwu Bai^{1,2}, and Zongbao K. Zhao^{2,3}

1 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116023, Liaoning, China

Received: April 28, 2011; **Accepted:** September 27, 2011

Supported by: Youth Science Foundation of Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences (No. s201027).

Corresponding author: Zongbao K. Zhao. Tel: +86-411-84379066; Fax: +86-411-84379211; E-mail: zhaozb@dicp.ac.cn

中国科学院大连化学物理研究所青年科学基金 (No. s201027) 资助。

2 Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China

3 Dalian National Laboratory for Clean Energy, Dalian 116023, Liaoning, China

Abstract: The objective of this work is to investigate how dilution rate and carbon-to-nitrogen (C/N) ratio affects lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* AS 2.138 9 in continuous culture. Under steady-state conditions, the increase in dilution rate led to the decrease in lipid content and lipid yield. The highest lipid yield and lipid content at $D=0.02 \text{ h}^{-1}$ were 0.18 g lipid/g sugar and 57.1%, respectively, while the highest lipid productivity and biomass productivity were obtained at $D=0.14 \text{ h}^{-1}$. The increase in C/N ratio led to the increase in lipid content. The highest lipid content of 38% was obtained at C/N=237. The highest lipid yield of 0.12 g lipid/g sugar was obtained at C/N=92. However, the highest lipid productivity of 0.12 g/(L·h) was obtained at C/N=32. No significant changes were observed in terms of fatty acid composition of the lipid produced under different C/N ratios, and these three fatty acids, palmitic acid, stearic acid and oleic acid, took over 85% in all samples.

Keywords: *Rhodospiridium toruloides*, chemostat, dilution rate, carbon-to-nitrogen ratio, lipid

能源短缺和环境污染给当今社会可持续发展带来双重压力。一些研究者认为可再生、环境友好的燃料在近期内最有可能取代化石燃料而缓解这个问题^[1-2]。生物柴油与化石柴油性质相近,但燃烧排放的污染气体远低于化石柴油^[3]。生物柴油所用原料主要来源于植物油脂、动物脂肪和废弃油脂,明显受时间、地点以及季节等条件影响,很难满足生物柴油规模化生产需求。微生物油脂主要指通过酵母、细菌和霉菌等微生物将碳水化合物或碳氢化合物转化成的甘油酯,其脂肪酸成分和植物油相似。由于微生物油脂生产可有计划地实施,已成为潜在的油脂获取新路线^[4]。

针对微生物油脂,国内外学者做了大量研究工作。通过研究油脂合成发现有机氮源能够提高某些产油微生物胞内的油脂含量^[5-6],在限制硫源^[7]或磷源^[8]条件下也能够促进油脂积累。为了拓展油脂发酵底物来源,甘油^[9-10]、淀粉^[11]、淀粉废水^[12]、菊芋^[13]、糖蜜^[14]和污水^[15]等被用来转化合成油脂。在油脂发酵方式中,进行了批式发酵^[16]、批式补料发酵^[17-18]、连续发酵^[19]和部分

菌体循环的连续发酵^[20]研究。

在一些产油微生物连续培养研究中发现:稀释率下降,胞内油脂含量和细胞干重增加^[21],稀释率减小有助于油脂生产,但稀释率过低对油脂生产不利^[22]。胞内油脂含量随着碳氮比增大而增加,油脂脂肪酸成分不受碳氮比影响,但脂肪酸相对含量有所变化^[14,23]。圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* AS 2.138 9 油脂含量高,生长速度快。研究发现当培养基中的碳氮比为 420 时,胞内油脂含量可达 76%,但在培养 120 h 后,生物量仅为 10.7 g/L^[24]。在两阶段培养中,将第一阶段增殖的圆红冬孢酵母回收后,在第二阶段重悬于葡萄糖培养液中可实现油脂快速积累^[25]。目前,关于圆红冬孢酵母连续培养未见报道。本文采用恒化培养方式,考察在稳态条件下稀释率和碳氮比对圆红冬孢酵母油脂积累的影响。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

圆红冬孢酵母菌 *Rhodospiridium toruloides*

AS 2.138 9 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)

1.2 培养基

YEPD 液体培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 10, 蛋白胨 10, 培养基初始 pH 值用 1 mol/L NaOH 调至 6.0。固体培养基在 YEPD 液体培养基基础上加入 15 g/L 琼脂粉。

批次发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 100, 酵母粉 5, 硫酸铵 5, 七水硫酸镁 0.5, 磷酸二氢钾 0.5。

恒化培养基 1 (g/L): 葡萄糖 70, KH_2PO_4 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, 酵母粉 0.75, 硫酸铵 0.1, pH 5.6。

恒化培养基 2 (g/L): 葡萄糖 40, KH_2PO_4 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, 酵母粉 0.75, 硫酸铵 0.1, pH 5.6。

1.3 培养方法

种子液培养: 将新鲜斜面圆红冬孢酵母接种于 50 mL YEPD 液体培养基中, 于 30 °C、200 r/min 摇床上培养, 培养 24 h 后, 取 20 mL 转接到 180 mL YEPD 液体培养基中, 培养 24 h。

批次培养: 将培养 24 h 的种子接种到 3 L 发酵罐 (上海保兴 3-BG) 中, 接种量为 10%, 接种后体积为 2 L。培养温度 30 °C, pH 通过自动流加 1.5 mol/L NaOH 控制在 5.6, 通气量 50 L/h, 发酵时通过溶解氧与搅拌联动控制溶解氧在 45% 左右。

恒化培养: 批次发酵至 35 h 时, 蠕动泵补加新鲜发酵培养基, 开始恒化培养, 恒化培养工作体积为 1.55 L。间隔一定时间取样, 测量残糖含量和 OD_{600} , 当残糖和 OD_{600} 基本不变时培养进入稳态。当改变培养条件 (稀释率或碳氮比) 后,

连续流加 5 个工作体积培养基, 然后开始取样, 每间隔 3 h 取 1 次, 共取 3 次, 分析生物量和残糖, 基本恒定时确定为稳态。

$$D = \frac{F}{V} \quad (D: \text{稀释率, h}^{-1}; F: \text{补料速率, L/h};$$

V : 工作体积, L)。

1.4 分析方法

1.4.1 生物量测定

发酵液离心去掉上清液, 收集沉淀, 加入蒸馏水离心洗涤 2 次, 于 105 °C 烘至恒重, 以 g 干菌体/L 发酵液表示菌体生物量。

1.4.2 油脂提取

采用酸热法, 油脂含量为油脂量占生物量的质量百分数^[13]。

1.4.3 残糖测定

采用山东省科学院生产的 SBA-50B 生物传感分析仪进行葡萄糖测定。

1.4.4 氮含量的测定

凯氏定氮法, 用 KDN-2C 型定氮仪 (上海嘉定纤检) 测定。

1.4.5 油脂脂肪酸组成分析

采用 GC-7890 型气相色谱仪进行分析。色谱条件为: FFAP 石英毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.4 μm); 进样器温度 250 °C; 进样量 0.2 μL; 载气 N_2 41 mL/min, 检测器 (FID) 温度 280 °C; H_2 33 mL/min, 空气 100 mL/min; 柱温 190 °C; 分流进样。脂肪酸通过对照标准样品定性, 采用面积归一法确定相对含量。

2 结果与分析

2.1 连续培养中稳态的确定

圆红冬孢酵母在批次培养进行到 35 h 后, 开

始以 $D=0.02\text{ h}^{-1}$ 的稀释率补加新鲜的恒化培养基 1, 并以相同速率排出发酵液。随着恒速补料进行, 发酵液中残糖逐步升高, 生物量逐渐下降。当连续培养进行到 265 h 后, 发酵液中残糖和 OD_{600} 不再变化, 培养进入了相对稳态。此时, 发酵液中残糖稳定在 55 g/L 左右, OD_{600} 在 12 左右 (图 1)。从恒速补料到进入稳态培养了 230 h, 运行了 4.6 个工作体积, 这与其他产油酵母恒化培养中到达稳态的结论基本一致^[26]。因此, 在圆红冬孢酵母连续培养中, 条件改变后流加 5 个工作体积培养可进入稳态。

2.2 稀释率对油脂积累的影响

通过流加恒化培养基 2, 稀释率从 0.02 h^{-1} 增加到 0.24 h^{-1} , 圆红冬孢酵母胞内油脂含量和生物量呈现出相反趋势。油脂含量从 57.1% 下降到 10.4%, 生物量由 4.0 g/L 下降到不足 0.5 g/L, 而残糖含量则逐渐升高 (图 2)。可见稀释率对圆红冬孢酵母油脂含量和生物量影响比较明显。

Gill 等考察在以葡萄糖为底物的情况下, 稀释率从 0.06 h^{-1} 到 0.21 h^{-1} 对 *Candida* 107 油脂积累的影响, 在稀释率为 0.06 h^{-1} 时获得最大油脂含量, 为 40%^[27]。Alvarez 等以甘蔗糖蜜为底物, 考察不同稀释率对 *Rhodotorula glutinis* 油脂积累的影响, 发现随着稀释率减小, 胞内油脂含量逐渐增加, 在稀释率为 0.04 h^{-1} 时获得了最大油脂含量^[14]。可见在不同产油微生物和不同底物条件下, 胞内油脂含量均随着稀释率减小而增大。工业生产过程中产物得率和生产强度是两个重要指标。从表 1 中可以看到, 随着稀释率增大, 油脂得率和菌体得率逐渐下降, 在 0.02 h^{-1} 时油脂得率和菌体得率均最大, 分别为 0.18 g 油/g 糖和 0.31 g 菌体/g 糖。当稀释率由 0.24 h^{-1} 减小到 0.02 h^{-1} 时, 油脂得率提高 9 倍, 菌体得率提高 1.8 倍。油脂最大生产强度出现在 $D=0.14\text{ h}^{-1}$ 时, 表明在此条件下油脂合成和菌体生长均处在较旺盛状态。

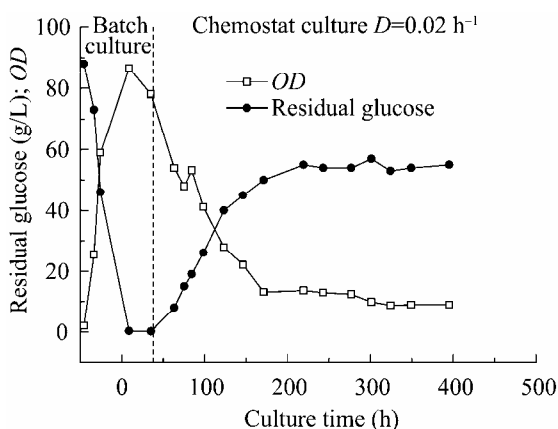


图 1 圆红冬孢酵母的连续培养
Fig. 1 Continuous culture of *R. toruloides*.

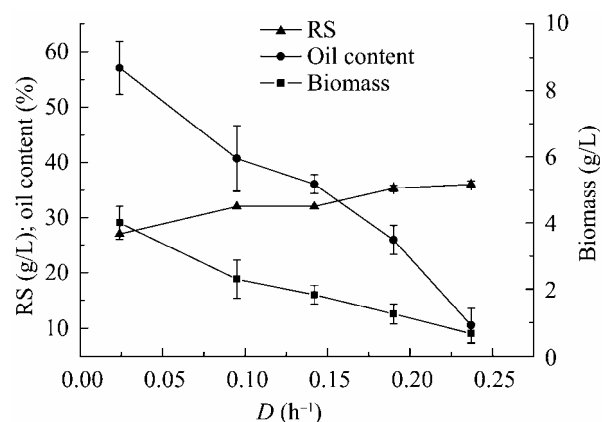


图 2 稀释率对圆红冬孢酵母油脂发酵的影响
Fig. 2 Effect of dilution rate on lipid accumulation by *R. toruloides*.

表 1 不同稀释率下油脂发酵结果

Table 1 Results of lipid production by *R. toruloides* in under different dilution rate

D (h^{-1})	$^a r_{\text{lipid}}$ ($\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$)	$^b r_x$ ($\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$)	$^c Y_{o/s}$ (g/g)	$^d Y_{x/s}$ (g/g)
0.02	0.05±0.01	0.10±0.01	0.18±0.03	0.31±0.04
0.10	0.09±0.02	0.22±0.06	0.12±0.03	0.29±0.07
0.14	0.09±0.01	0.26±0.04	0.08±0.01	0.23±0.04
0.19	0.06±0.01	0.24±0.06	0.07±0.02	0.27±0.10
0.24	0.02±0.00	0.16±0.07	0.02±0.00	0.17±0.06

a: lipid productivity, g lipid/ (L·h); b: biomass productivity, g biomass/(L·h); c: lipid yield, g lipid/g glucose; d: biomass yield, g biomass/g glucose.

从以上结果可以看出: 稀释率对圆红冬孢酵母连续发酵生产微生物油脂影响较大。在低稀释率下有利于获得较高油脂得率, 但不利于提高油脂生产强度。因为在较低稀释率下, 氮源严重不足, 限制了微生物增殖。由于油脂是胞内产物, 其产量同时受到胞内油脂含量和微生物数量影响。

2.3 碳氮比对油脂积累的影响

在产油微生物培养过程中, 当氮源匮乏时腺苷一磷酸 (AMP) 脱氨酶活性增强, 将 AMP 转化为肌苷一磷酸 (IMP) 和氨。通常产油酵母线粒体中异柠檬酸脱氢酶 (ICDH) 为 AMP 依赖型脱氢酶, 细胞内 AMP 浓度降低将减弱该酶的活性, 导致线粒体内柠檬酸含量增加。柠檬酸透过线粒体膜进入细胞溶胶, 在腺苷三磷酸: 柠檬酸

裂解酶 (ACL) 作用下裂解生成乙酰辅酶 A 和草酰乙酸, 在脂肪酸合酶 (FAS) 作用下完成脂酰辅酶 A 合成^[28]。

在考察碳氮比对油脂含量影响研究中, Turcotte 等研究发现碳氮比为 77 时, 不论何种氮源菌体内油脂含量均在 30% 以上^[29]。李永红等通过优化培养基, 在碳氮比为 420 时, 圆红冬孢酵母油脂含量达到 76%^[24]。Papanikolaou 等报道当培养基碳氮比从 83.5 增加到 133.5 时, 刺孢小克银汉霉 *Cunninghamella echinulata* 油脂含量从 36% 增加到 47%; 深黄被孢霉 *Mortierella isabellina* 油脂含量由 50% 提高到 56%^[30]。本文通过恒化培养的方式, 在 $D=0.1 \text{ h}^{-1}$ 的条件下考察了碳氮比对圆红冬孢酵母油脂发酵的影响 (表 2)。

表 2 不同碳氮比培养基主要成分

Table 2 Composition of medium in different C/N ratios

C/N (mol/mol)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Yeast extract (g/L)	Glucose (g/L)
237	0.2	0.75	40
92	0.5	0.75	40
41	1.5	0.75	40
32	2.0	0.75	40
18	4.0	0.75	40

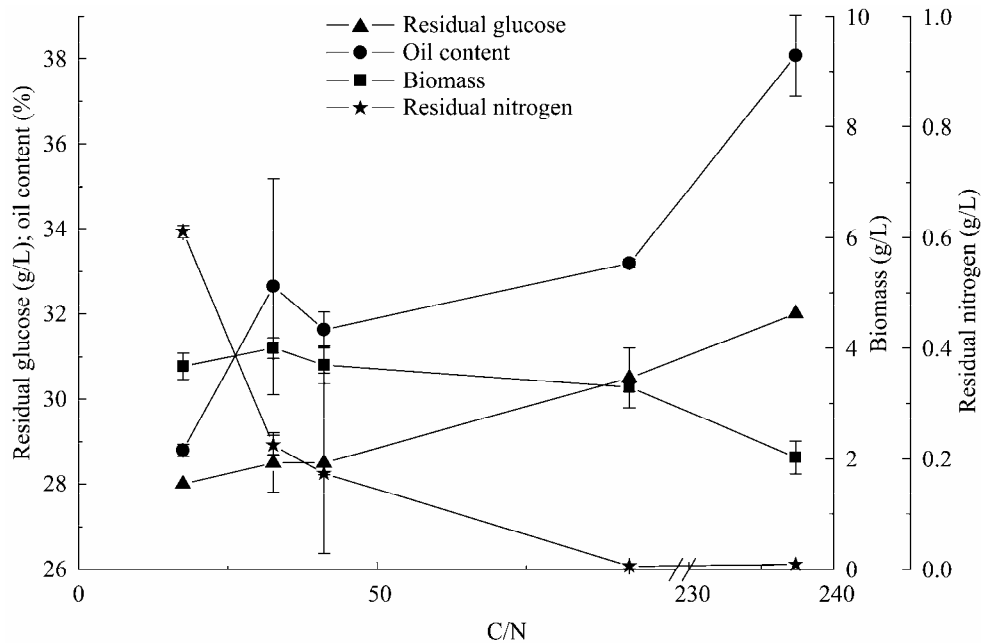


图3 碳氮比对圆红冬孢酵母油脂积累的影响

Fig. 3 Effect of C/N ratios on lipid accumulation by *R. toruloides*.

从图3中可以看出：培养基中初始碳氮比增大，菌体内油脂含量逐渐增大。当碳氮比由18增大到237时，菌体内油脂含量由28.8%增加到38.0%，仅提高9.2%。可见，在恒化培养中增大碳氮比虽然能够提高菌体内油脂含量，但是变化不明显。因为在连续培养过程中，油脂积累不仅和培养基初始碳氮比相关，同时也受稀释率影响。在碳氮比一定的情况下，稀释率较大，单位时间内流过生物反应器的培养基较多，导致反应器内营养成分丰富，氮源充足，因此不利于油脂积累。而随着稀释率减小，反应器内氮源匮乏，有利于油脂积累。而当稀释率一定的情况下，培养基中碳氮比越大，反应器内氮源较为匮乏，有利于油脂生成。反之，则不利于油脂合成。但当碳源充足情况下，油脂合成更依赖

于稀释率^[31]。生物量随着碳氮比增加呈现逐渐下降。这主要是因为当碳氮比大于92时，发酵液中氨氮含量仅为0.01 g/L，氮源成为生长限制因素，导致生物量下降。Hassan等通过连续发酵发现：随着被消耗碳氮比减小，生物量和油脂含量均呈下降趋势^[23]，李永红等在油脂批式发酵研究中也表明：胞油脂含量随着初始碳氮比减小而下降^[24]。可见，油脂发酵初始碳氮比和被消耗碳氮比均与产油微生物胞内油脂含量呈相同趋势。

通过表3可以看出：随着培养基中碳氮比增大，油脂得率变化不大。菌体得率在碳氮比从18增加到92时变化不大，在237时明显降低。可见在高碳氮比下细胞生长明显受到抑制。李永红等^[24]的研究论文也有过相同报道，但其在批式

发酵中碳氮比高达 694 时才产生抑制作用,这是因为两种培养模式不同。批式培养过程中的环境随培养时间变化,恒化培养在稳态条件下其环境相对稳定,更有利于考察不同条件对微生物生长和产物积累影响。油脂生成速率和菌体生成速率随着碳氮比增大均先升高后降低。在碳氮比为 32 时,获得最大油脂生成速率和菌体生成速率,分别为 0.13 g/(L·h) 和 0.40 g/(L·h)。

2.4 碳氮比对油脂脂肪酸成分的影响

将油脂转酯化后,采用气相色谱法对 5 个不

同碳氮比下获得的油脂脂肪酸成分进行分析。从表 4 中可以看到:不同碳氮比对油脂脂肪酸组成影响不大,脂肪酸主要包括肉豆蔻酸 (14:0)、棕榈酸 (16:0)、棕榈油酸 (16:1)、硬脂酸 (18:0)、油酸 (18:1)、亚油酸 (18:2) 和亚麻酸 (18:3),这和已报道的结果一致^[18]。油脂脂肪酸成分主要是棕榈酸、硬脂酸和油酸,三者的含量占油脂总脂肪酸含量 85% 以上。这些油脂的脂肪酸组成和含量表明其可作为生物柴油的原料^[32]。

表 3 不同碳氮比下油脂发酵结果

Table 3 Results of lipid production by *R. toruloides* under different C/N ratios

C/N	^a r_{lipid} (g/(L·h))	^b r_x (g/(L·h))	^c $Y_{o/s}$ (g/g)	^d $Y_{x/s}$ (g/g)
18	0.11±0.00	0.37±0.01	0.09±0.00	0.31±0.01
32	0.13±0.01	0.40±0.01	0.11±0.00	0.35±0.03
41	0.12±0.01	0.37±0.02	0.10±0.01	0.33±0.04
92	0.11±0.00	0.33±0.01	0.12±0.01	0.35±0.02
237	0.08±0.00	0.20±0.02	0.10±0.01	0.25±0.02

a: lipid productivity, g lipid/(L·h); b: biomass productivity, g biomass/(L·h); c: lipid yield, g lipid/g glucose; d: biomass yield, g biomass/g glucose.

表 4 不同碳氮比下油脂脂肪酸成分

Table 4 Fatty acids compositions of lipid samples produced under different initial C/N ratios

C/N	Relative amount of total fatty acids (% W/W)						
	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
237	1.3	26.6	0.9	15.4	47.3	5.4	3.0
92	1.0	23.9	1.4	14.3	50.2	6.3	2.9
41	1.2	27.6	0.4	14.9	46.5	6.6	2.8
32	2.0	33.5	0.6	18.7	40.1	3.8	1.2
18	1.3	26.2	0.7	15.4	45.0	8.3	3.0

3 结论

圆红冬孢酵母经过5个工作体积恒化培养后进入稳态。在稳态条件下,菌体内油脂含量、油脂得率和菌体得率随稀释率增大而减小。油脂生成速率和菌体生成速率在稀释率为 0.14 h^{-1} 时最大。在稳态条件下,随着碳氮比增大,菌体油脂含量逐渐增加。当碳氮比从18增加到237时,油脂含量提高9.2%。碳氮比对菌体得率影响不明显,但油脂得率随碳氮比增大有所增高。在碳氮比为32时,获得最大油脂生成速率和菌体生成速率。在低稀释率和高碳氮比时,有利于胞内油脂积累,但由于在此条件下氮源严重缺乏,菌体生长受到限制,不利于提高油脂生产强度。碳氮比对油脂脂肪酸组成没有明显影响,但脂肪酸相对含量上有所不同,棕榈酸、硬脂酸和油酸总含量超过85%。

REFERENCES

- [1] Nigam PS, Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog Energy Combust*, 2011, 37(1): 52–68.
- [2] Murphy JD, Singh A, Pant D, et al. Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: challenges and perspectives. *Bioresour Technol*, 2010, 101(13): 5003–5012.
- [3] Vicente G, Martínez M, Aracil J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour Technol*, 2004, 92(3): 297–305.
- [4] Meng X, Yang JM, Xu X, et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energ*, 2009, 34(1): 1–5.
- [5] Fakas S, Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, et al. Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(4): 1062–1070.
- [6] Evans CT, Ratledge C. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous Yeasts. *J Gen Microbiol*, 1984, 130(7): 1693–1704.
- [7] 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.
- [8] Wu SG, Hu CM, Jin GJ, et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol*, 2010, 101(15): 6124–6129.
- [9] Meesters PAEP, Huijberts GNM, Eggink G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 45(5): 575–579.
- [10] Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT, et al. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem*, 2011, 46(1): 210–218.
- [11] Li M, Liu GL, Chi Z, et al. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass Bioenerg*, 2010, 34(1): 101–107.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Alvarez RM, Rodriguez B, Romano JM, et al. Lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis* on sugar cane molasses in single-stage continuous culture. *World J Microb Biot*, 1992, 8(2): 214–215.

- [15] Angerbauer C, Siebenhofer M, Mittelbach M, et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour Technol*, 2008, 99(8): 3051–3056.
- [16] Kurosawa K, Boccazzi P, de Almeida NM, et al. High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production. *J Biotechnol*, 2010, 147(3/4): 212–218.
- [17] Zhang J, Fang X, Zhu XL, et al. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O₃ grown in fed-batch culture. *Biomass Bioenerg*, 2011, 35(5): 1906–1911.
- [18] Li YH, Zhao ZB, Bai FW. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 41(3): 312–317.
- [19] Ratledge C, Hall MJ. Accumulation of lipid by *Rhodotorula glutinis* in continuous culture. *Biotechnol Lett*, 1979, 1(3): 115–120.
- [20] Ykema A, Verbree EC, Kater MM, et al. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in wheypermeate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 29(2/3): 211–218.
- [21] Ganuza E, Izquierdo MS. Lipid accumulation in *Schizochytrium* G13/2S produced in continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(5): 985–990.
- [22] Papanikolaou S, Aggelis G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol*, 2002, 82(1): 43–49.
- [23] Hassan M, Blanc PJ, Granger LM, et al. Lipid production by an unsaturated fatty acid auxotroph of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown in single-stage continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 40(4): 483–488.
- [24] Li YH, Liu B, Zhao ZK, et al. Optimized culture medium and fermentation 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.
- [25] 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.
- [26] Paredes-López O, Camargo-Rubio E, Ornelas-Vale A. Influence of specific growth rate on biomass yield, productivity, and composition of *Candida utilis* in batch and continuous culture. *Appl Environ Microb*, 1976, 31(4): 487–491.
- [27] Gill CO, Hall MJ, Ratledge C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Appl Environ Microb*, 1977, 33(2): 231–239.
- [28] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002, 51: 1–51.
- [29] Turcotte G, Kosaric N. The Effect of C/N ratio on lipid production by *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788. *Biotechnol Lett*, 1989, 11(9): 637–642.
- [30] 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.
- [31] Yoon SH, Rhee JA. Quantitative physiology of *Rhodotorula glutinis* for microbial lipid production. *Process Biochem*, 1983, 18(5): 2–4.
- [32] Liu B, Zhao ZK. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J Chem Technol Biotechnol*, 2007, 82(8): 775–780.