

β -1,3-葡甘露聚糖酶辅助提取圆红冬孢酵母油脂

靳国杰^{1,3}, 杨晓兵^{1,3}, 沈宏伟^{1,2}, 王雅南^{1,3}, 龚志伟^{1,3}, 赵宗保^{1,2}

1 中国科学院大连化学物理研究所生物技术部, 辽宁 大连 116023

2 大连洁净能源国家实验室(筹)生物能源研究部, 辽宁 大连 116023

3 中国科学院大学, 北京 100049

靳国杰, 杨晓兵, 沈宏伟, 等. β -1,3-葡甘露聚糖酶辅助提取圆红冬孢酵母油脂. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1581-1589.

Jin GJ, Yang XB, Shen HW, et al. β -1,3-glucomannanase assisted lipid extraction from *Rhodospiridium toruloides*. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1581-1589.

摘要: 为考察 β -1,3-葡甘露聚糖酶辅助提取圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* 油脂工艺的应用潜力, 以 *R. toruloides* Y4 发酵醪液为原料, 乙酸乙酯为溶剂, 在 10 L 规模下研究了酶解和萃取条件对油脂提取率的影响, 并进行了初步物料平衡分析。结果表明: 酶处理 0.5 h, 油脂提取率可达 71.1%, 酶解效率与 10 mL 小体系所取得的结果相当。通过多次萃取, 有效缓解了乳化现象对油脂提取的影响。经过 3 次萃取, 油脂提取率、溶剂回收率和总物料回收率分别达 92.9%、87.0%和 94.2%。酶辅助提取油脂工艺可直接利用油脂发酵醪液, 提取率高, 对设备要求低, 具有很好的工业化应用潜力。

关键词: 微生物油脂, 油脂提取, 酶辅助, 圆红冬孢酵母, 放大, 生物柴油

Received: January 19, 2013; **Accepted:** June 28, 2013

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB707405), the Important Directive Project of the CAS Knowledge Innovation Program (No. KSCX2-EW-G-1-3).

Corresponding author: Zongbao K. Zhao. Tel/Fax: +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), 中科院知识创新工程重要方向项目 (No. KSCX2-EW-G-1-3) 资助。

β -1,3-glucomannanase assisted lipid extraction from *Rhodospiridium toruloides*

Guojie Jin^{1,3}, Xiaobing Yang^{1,3}, Hongwei Shen^{1,2}, Yanan Wang^{1,3}, Zhiwei Gong^{1,3}, and Zongbao K. Zhao^{1,2}

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

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

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

Abstract: To evaluate the effectiveness of enzymatic assisted extraction (EAE) of lipid from the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* in the presence of β -1,3-glucomannanase at a larger scale, we investigated the effects of enzymatic treatment and extraction conditions on lipid extraction yields at 10-L scale by using the broth of *R. toruloides* Y4 as the feed and ethyl acetate as the solvent. When it was treated for 0.5 h, the lipid extraction yield reached 71.1%, indicating that the enzymatic treatment process reached similar efficiency to that obtained at 10-mL scale. The inhibitory effect of emulsification was greatly reduced by repeated extraction. After extracted for three times, yields of lipid extraction, solvent recovery and total material recovery reached 92.9%, 87.0% and 94.2% respectively. As it can use the lipid production slurry with good extraction efficiency, EAE technology is promising for industrial production of microbial lipids.

Keywords: microbial lipid, lipid extraction, enzyme-assisted, *Rhodospiridium toruloides*, scaling up, biodiesel

为应对化石能源枯竭和环境日益恶化，世界各国采取的重要举措之一是大力发展可再生能源。其中，生物柴油具有能量密度高、润滑性能好、储运安全、抗爆性好、燃烧充分、可再生、环境友好的优点，可直接应用于现有的柴油发动机系统和油料输送系统，是最理想的生物燃料之一^[1]。当前生物柴油的原料主要是动、植物油脂。微生物油脂是微生物在一定条件下发酵生产的油脂，又称单细胞油脂，通常具有和植物油脂相近的脂肪酸组成^[2]。与植物油脂技术相比，微生物油脂技术具有生产周期短、可连续供给、生产潜力大等优势，且不与人争粮，不与粮争地。微生物油脂是解决生物柴油产业原料问题最有效、可持续的途径之一^[3]。

由于现有技术不成熟、生产成本低，微生

物油脂还没有得到广泛应用。简化下游工艺，降低油脂提取能耗和成本是解决微生物油脂工业化应用的关键之一。微生物油脂发酵醪液水分含量高（水分含量占 80%以上）、细胞尺寸小、细胞密度低、物料粘度高^[4]。为了获得干细胞，发酵醪液需经过滤、离心、干燥等脱水工序，能耗占整个下游能耗的 85%以上^[5]。所以基于干细胞的油脂提取方法，如压榨法、压力溶剂法^[6]、索氏提取法等由于能耗过大，很难大规模应用。为降低能耗，可直接用有机溶剂处理湿细胞提取油脂^[7-8]，但通常使用甲醇、氯仿等毒性较大的溶剂。超临界流体虽然可以替代上述溶剂^[9]，但需在高温高压下操作，设备要求高。采用毒性较小的有机溶剂，如正己烷、乙酸乙酯等，处理湿细胞油脂提取效果差。这是因为

这些溶剂透膜性能差,不能有效地进入细胞萃取胞内油脂。

通过适当的方法将细胞破碎,可显著提高油脂提取效率^[10]。文献报道有酸热法、微波辅助法、超声波辅助法、高压蒸汽法、高压均质法、玻璃珠破碎法、渗透压法和酶辅助法等^[11-17]。酸热法酸性强,易造成油脂水解,酸值升高,并且废水易污染环境。酸热法还易破坏高附加值副产物如类胡萝卜素等,降低产品品质。微波辅助法、超声波辅助法、高压蒸汽法、高压均质法和玻璃珠破碎法能耗高,不适合工业化应用。

酶辅助油脂提取法通过酶水解细胞壁,提高油脂浸提效率,可适用于高水分环境,操作条件温和,已广泛应用于植物油脂提取^[18]。有研究者在微藻菌泥中加入蜗牛酶和胰蛋白酶,油脂提取率达到 49.8%^[16]。圆红冬孢酵母 *Rhodospidium toruloides* 产油性能良好,在限氮培养条件下,胞内油脂可占生物量 70%以上^[19]。与微藻不同,*R. toruloides* 属于担子菌门,细胞壁最外层含有大量 β -1,3-葡甘露聚糖,该糖主链是由葡萄糖与甘露糖通过 β -1,4 糖苷键连接而成,侧链由 11~16 个单糖通过 β -1,3 糖苷键与主链连接而成。 β -1,3-葡甘露聚糖酶 (MAN5C) 能够水解 β -1,3-葡甘露聚糖中相邻于 β -1,4 糖苷键的 β -1,3 糖苷键^[20]。在前期工作中,考察了处理条件、溶剂、温度、pH 及酶用量等条件对从 *R. toruloides* Y4 发酵醪液中萃取油脂效率的影响;在优化条件下,以乙酸乙酯为溶剂,油脂提取率达到 96.6%^[17]。本文将反应体系放大至 10 L 规模,考察酶辅助提取 *R. toruloides* 油脂的效果和稳定性,为其工业化应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

圆红冬孢酵母 *Rhodospidium toruloides* Y4 是 *R. toruloides* AS 2.1389 经玉米秸秆水解液驯化所得。*R. toruloides* AS 2.1389 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。

毕赤巴斯德酵母 *Pichia pastoris* (X-33) 为异源表达 β -1,3-葡甘露聚糖酶的宿主菌株,购自 Invitrogen 公司 (美国)。

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。固体培养基在 YEPD 液体培养基基础上加入 15 g/L 琼脂粉。

R. toruloides Y4 批次发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 60.6, 酵母粉 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1。灭菌后按 1% (V/V) 加入已过滤除菌的微量元素母液^[21]。

BMGY 液体培养基 (g/L): 甘油 10, 酵母粉 10, 蛋白胨 20, YNB 13.4, 生物素 4×10^{-4} , 0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲体系 (pH 6.0)。

Pichia pastoris 批次发酵培养基 (g/L): CaSO_4 0.93, K_2SO_4 18.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.9, KOH 4.13, 甘油 40。每升培养基中加入 26.7 mL 85% H_3PO_4 。

1.3 培养方法

1.3.1 制备重组 β -1,3-葡甘露聚糖酶 (pIMAN5C)

利用工程菌株毕赤巴斯德酵母 *Pichia pastoris* X-33 在 15 L 发酵罐上表达 pIMAN5C^[22]。发酵液在 4 °C、11 397×g 下离心 1 h, 所得上清先用 6 层普通滤纸抽滤, 再用孔径为 0.22 μm 滤膜抽滤, 冻干。所得 pIMAN5C

酶粉的酶活为 460 U/g。pIMAN5C 酶粉酶活按照文献方法测定, 酶活单位的定义为: 酶反应体系在 37 °C、pH 4.5 的条件下, 每分钟释放 10 μg 还原糖所需的酶量为 1 U^[22]。

1.3.2 酶处理 *R. toruloides* Y4 发酵醪液

R. toruloides Y4 在 15 L 发酵罐上批式补料发酵^[23], 得生物量为 124.3 g/L、油脂量为 75.0 g/L、含水量为 84.1% (W/W)的发酵醪液。取 10 L 发酵醪液, 用 5 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 6.0, 水浴加热至 90 °C, 保温 15 min, 之后水浴冷却至 25 °C。按照已优化的条件^[17]向发酵液中加入 46.5 g pIMAN5C 酶粉, 用 8 mol/L HCl 调 pH 至 4.0, 25 °C 下搅拌 3 h。

1.3.3 发酵醪液油脂萃取

用 5 mol/L NaOH 溶液调节酶处理后 *R. toruloides* Y4 发酵醪液的 pH 至 6.0, 加入 10 L 乙酸乙酯, 室温下搅拌 4 h, 转速为 600 r/min。在 11 397×g 下离心 10 min (以下同), 取出有机相和清液, 向乳化相中加入 8 L 乙酸乙酯, 搅拌 1 h, 离心, 分出有机相和清液, 向乳化相中再加入 5 L 乙酸乙酯, 搅拌 1 h, 离心, 分出有机相和清液。

1.4 分析方法

1.4.1 生物量测定

将 *R. toruloides* Y4 发酵醪液在 6 200×g 下离心 5 min, 菌体用去离子水洗涤 2 次, 在 105 °C 下烘至恒重, 以 g 干菌体/L 发酵液表示菌体生物量。

1.4.2 发酵醪液油脂量测定

采用酸热法^[11]提取发酵液总油脂, 以 g 油/L 发酵液表示油脂量, 作为衡量酶辅助法油脂提取率的标准。

1.4.3 酶处理过程中油脂提取率测定

在 1.3.2 酶处理过程中, 每隔 0.5 h, 取出 5 mL 发酵醪液, 加入 10 mL 乙酸乙酯, 振荡混匀 5 min, 在 9 700×g 下离心 10 min (以下同), 取有机相, 余相中加入 10 mL 乙酸乙酯, 振荡混匀 5 min, 离心, 取有机相, 将 2 次萃取得到的有机相合并, 用等体积 0.1% NaCl 溶液洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 旋转蒸发, 在 105 °C 下烘至恒重。所得油脂量与标准油脂量比较, 得油脂提取率。

1.4.4 萃取过程中油脂提取率测定

在 1.3.3 的第一次萃取过程中, 每隔 0.5 h, 取出 10 mL, 在 6 200×g 下离心 5 min, 取有机相, 余相在 9 700×g 下离心 10 min, 取有机相。将两次离心得到的有机相合并, 用等体积 0.1% NaCl 溶液洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 旋转蒸发, 在 105 °C 下烘至恒重。所得油脂量与标准油脂量比较, 得油脂提取率。

1.4.5 萃取过程中乳化率测定

在 1.3.3 的第 1 次萃取过程中, 每隔 0.5 h, 取出 10 mL, 在 6 200×g 下离心 5 min, 取有机相, 余相在 9 700×g 下离心 10 min, 取有机相, 将两次离心得到的有机相合并, 测定体积。乳化率 (%) = $(V_t - V_f) / V_t \times 100$ (V_t : 萃取溶剂总体积, mL; V_f : 离心所得的萃取溶剂体积, mL)。

1.4.6 多次萃取的油脂提取率测定

将 1.3.3 的第 1 次萃取得到的有机相旋转蒸发, 得到的油脂量与标准油脂量比较, 得单次萃取的油脂提取率。同样, 将第 2 次、第 3 次萃取得到的有机相旋转蒸发, 得到的油脂量与之前得到的油脂量相加, 与标准油脂量比较, 先后得萃取 2 次、3 次的总油脂提取率。

1.4.7 多次萃取的溶剂回收率测定

测定 1.3.3 的第 1 次萃取得到的有机相体积, 与加入的乙酸乙酯的体积比较, 得第 1 次萃取的溶剂回收率。同样, 测定第 2 次和第 3 次萃取得到的有机相体积, 与之前萃取得到的有机相体积相加, 并与累计使用乙酸乙酯的体积比较, 先后得萃取 2 次、3 次的总溶剂回收率。

1.4.8 清液干物质质量的测定

将 1.3.3 萃取过程所得全部清液混合, 取样品在 105 °C 下烘至恒重, 称重计算清液干物质质量。

1.4.9 菌渣量的测定

在 1.3.3 萃取结束后, 将剩余的菌体和乳状液混合, 在 105 °C 下烘至恒重, 称重得菌渣量。

1.4.10 物料回收率的测定

物料回收率为回收物料的干物质质量占初始物料干物质的比例。其中, 初始物料包括 *R. toruloides* Y4 发酵醪液和过程中加入的酶粉、酸液和碱液, 回收的物料包括提取到的油脂、清液和菌渣。

1.4.11 油脂脂肪酸组成及酸值分析

取油脂样品, 按文献方法测定酸值^[24], 并进行甲酯化和脂肪酸组成分析^[23]。

2 结果与分析

2.1 酶处理时间对油脂提取的影响

微生物油脂是胞内产物, 被细胞壁和细胞膜所包裹, 直接用有机溶剂萃取, 效率不高。为提高效率, 需要破碎细胞壁。产油酵母 *R. toruloides* Y4 细胞壁主要成分为 β -1,3-葡甘露聚糖, 可被 MAN5C 水解。在前期工作中, 通过工程菌表达获得了重组的 pIMAN5C^[22]。在

10 mL 规模下, *R. toruloides* Y4 发酵醪液分别经 pIMAN5C 发酵上清和透析过的 pIMAN5C 酶液处理, 油脂提取率分别达到 93.5% 和 96.6%^[17]。酶处理的前 1 h 是酶解效率主导油脂提取率的阶段。前 0.5 h 油脂提取率从 75.6% 增加到 82.3%, 其后趋于稳定。本文在 10 L 规模研究酶辅助微生物油脂提取法。发现随着酶处理时间增加, 油脂提取率逐渐增加 (图 1), 说明细胞壁酶解程度逐渐增加。酶处理 3 h, 油脂提取率达到 81.1%。其中, 前 0.5 h 油脂提取率的提高很快, 从 33.2% 增加到 71.1%, 说明这段时间 pIMAN5C 酶解效率很高。这与 10 mL 体系的规律类似, 说明放大酶解体系没有影响酶解效率, 提取工艺的酶处理阶段稳定性高。

2.2 萃取时间对油脂提取和乳化的影响及乳化层的破除

在酶处理 3 h 后, 向发酵醪液加入等体积乙酸乙酯, 搅拌混匀, 发现发酵醪液与乙酸乙酯形成稳定的乳状液, 静置 1 h 不分层。这是因为细胞壁水解释放出胞内蛋白质、糖脂、磷脂等

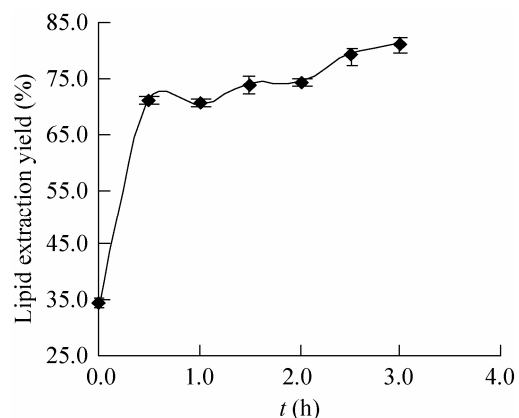


图 1 酶处理时间对油脂提取率的影响

Fig. 1 Effect of enzymatic treatment time on lipid extraction yields.

两性物质, 作为表面活性剂分布在乙酸乙酯、油脂等有机相和水相之间的界面层中, 降低了界面张力, 形成了乳液。乳化现象将严重影响油脂提取^[25]。增加萃取时间, 有机相和水相接触更加充分, 乳液更加稳定, 乳化率增加, 油脂提取率降低 (图 2)。当萃取 1 h 时, 乳化率达到 44.7%, 油脂提取率降低到 46.4%, 此后趋于稳定。在充分酶解的情况下, 油脂提取率与乳化率呈反相关。要获得好的油脂提取效果, 必须降低乳化率。

降低乳化率的方法很多, 最常用的是离心破乳和酶破乳^[26]。提高离心加速度或者增加离心时间可以破除乳化层, 但是能耗高。利用蛋白酶、磷脂酶水解蛋白质和磷脂等表面活性物质可以降低乳化率, 但成本高。本文采用多次萃取的方来破除乳化层, 提高油脂提取率。使用乙酸乙酯第 1 次萃取的油脂提取率和溶剂回

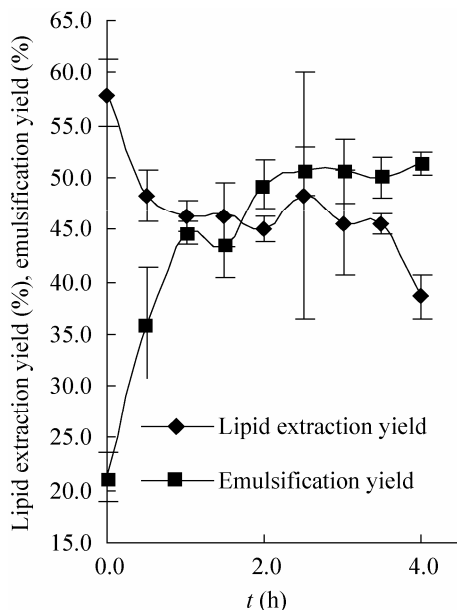


图 2 萃取时间对油脂提取率和乳化率的影响
Fig. 2 Effect of extraction time on lipid extraction yields and emulsification yields.

收率分别只有 29.0% 和 30.0% (图 3), 此时体系乳化程度高, 油脂提取率低。通过移除清液, 补加乙酸乙酯, 2 次萃取的总油脂提取率和总溶剂回收率分别达到 87.6% 和 86.1%; 而 3 次萃取后分别达到 92.9% 和 87.0%, 已接近于 10 mL 规模的最优值。在多次萃取过程中, 移除清液降低了体系中蛋白质和磷脂等生物表面活性剂含量。补加乙酸乙酯促进乳滴合并, 降低乳化层稳定性, 从而提高了油脂提取率和溶剂回收率。在实际生产中, 离心得到包含乙酸乙酯和油脂的有机相由于远未达到油脂溶解度, 可直接用于下一轮萃取。这样可减少有机溶剂使用量, 降低溶剂回收能耗。

2.3 酶辅助提取油脂的工艺流程和物料衡算

如图 4 所示, 酶辅助提取 *R. toruloides* 油脂的工艺流程包括发酵醪液热处理、酶处理、萃取、离心分离和溶剂蒸发。本研究表明全流程的物料回收率达到 94.2%。酶处理、萃取和离心

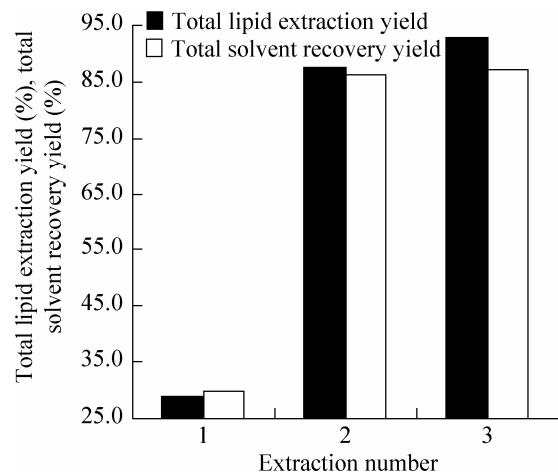


图 3 萃取次数对总油脂提取率和总溶剂回收率的影响
Fig. 3 Effect of extraction number on total lipid extraction yields and total solvent recovery yields.

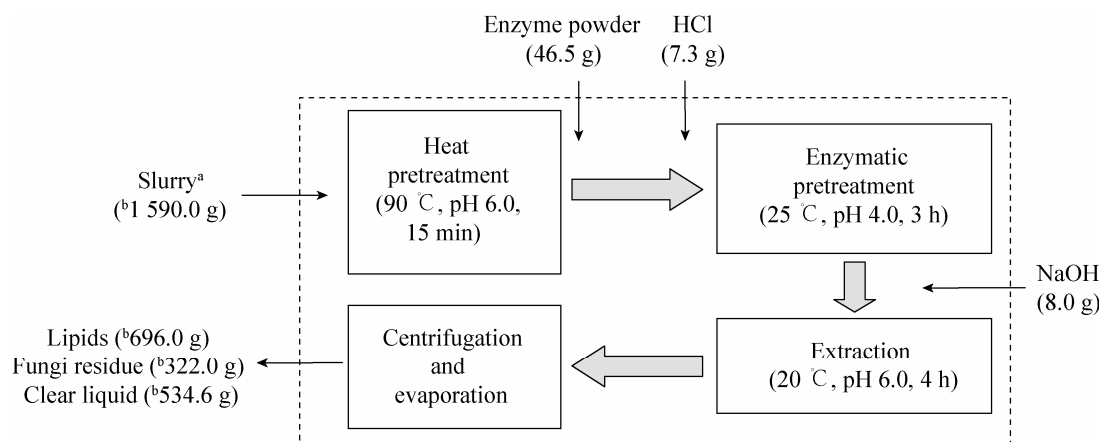


图4 酶辅助法提取 *R. toruloides* 油脂工艺流程图

Fig. 4 Enzyme-assisted *R. toruloides* lipid extraction process flow diagram. a: containing cell mass of 1 243.0 g; b: the dry weight.

分离都在常温常压下进行, 与酸热法、高压蒸汽法、微波辅助法、超临界萃取法相比, 能耗低。由于细胞和酶易于分散在水相中, 萃取操作在低搅拌速率下即可达到充分混合, 与玻璃珠破碎法和高压均质法相比, 动力消耗低。由于热处理和酶处理都在发酵罐中进行, 没有使用特殊设备, 与超声波辅助法相比, 设备使用少, 成本低。由于 pIMAN5C 只选择性水解细胞壁中相邻于 β -1,4 糖苷键的 β -1,3 糖苷键, 酶处理后细胞壁保留了一定的结构完整性^[17], 有利于菌体回收利用。由于过程中 pH 调节幅度小, 与酸热法相比, 引入酸碱量少, 清液中含盐量

低, 便于处理, 对环境污染少。综上分析, 酶辅助提取 *R. toruloides* 油脂工艺的设备使用少、菌渣回收容易, 适应工业化生产。

2.4 油脂脂肪酸组成和酸值分析

从表 1 可以看出, 酶辅助法提取油脂的脂肪酸组成与总油脂相似, 以棕榈酸 (C16)、棕榈油酸 (C16:1)、油酸 (C18:1)、亚油酸 (C18:2) 和亚麻酸 (C18:3) 等 C16、C18 系脂肪酸为主。已有研究表明, *R. toruloides* Y4 油脂含有中性脂、糖脂、鞘脂和磷脂等不同极性的组分, 中性脂占 81%~88%^[27]。在酶辅助提取油脂的过程中, 中性脂更易被有机溶剂萃取, 而糖脂、鞘

表1 总油脂和酶辅助法油脂的脂肪酸组成

Table 1 Fatty acid compositions of the total lipids and lipids extracted by enzyme-assisted

Lipids	Relative fatty acid content (% W/W) ^a								
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SFA	USFA
Total lipids	1.1±0.0	24.4±0.1	0.7±0.0	7.6±0.0	54.9±0.1	8.9±0.2	2.4±0.1	33.1±0.2	66.9±0.5
EAE lipids	1.5±0.0	28.7±0.1	0.9±0.4	9.6±0.1	50.2±0.3	7.1±0.0	2.0±0.3	39.8±0.2	60.2±1.0

a: values are represented as $\bar{x} \pm s$ deviations of three replicates. SFA: saturated fatty acids. USFA: unsaturated fatty acids. EAE lipids: enzyme-assisted extraction lipids.

脂和磷脂等极性亲水分子分散在水相,形成乳化层,提取率较低^[16]。与糖脂、鞘脂、磷脂相比,中性脂的饱和脂肪酸(SFA)含量较高^[28],所以酶辅助法提取的油脂中SFA较多。采用酸热法和酶辅助法提取的油脂的酸值分别为(8.3±0.30) mg KOH/g和(2.9±0.2) mg KOH/g。这可能是由于酶辅助法提取油脂操作条件温和,油脂水解程度低,自由脂肪酸生成少,而且相对于其他中性脂,自由脂肪酸由于极性较高,提取效率较低。酶辅助法油脂的酸值可满足碱催化酯交换反应制备生物柴油的要求^[29]。

3 结论

本文在 10 L 规模下验证了酶辅助提取 *R. toruloides* 油脂工艺的有效性,通过多次萃取,油脂提取率和物料回收率均达到 90%以上。该法对设备要求低,油脂提取率高,放大适应性好,具有很好的工业化应用潜力。

REFERENCES

- [1] Demirbas A. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energ Policy*, 2007, 35(9): 4661–4670.
- [2] Teng H, Mu Y, Yang TK, et al. Advances in biodiesel research. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 892–902 (in Chinese).
滕虎, 牟英, 杨天奎, 等. 生物柴油研究进展. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 892–902.
- [3] Zhao ZB, Hu CM. Progress in bioenergy-oriented microbial lipid technology. *Chin J Biotech*, 2011, 27(3): 427–435 (in Chinese).
赵宗保, 胡翠敏. 能源微生物油脂技术进展. *生物工程学报*, 2011, 27(3): 427–435.
- [4] Lee AK, Lewis DM, Ashman PJ. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J Appl Phycol*, 2009, 21(5): 559–567.
- [5] Teixeira RE. Energy-efficient extraction of fuel and chemical feedstocks from algae. *Green Chem*, 2012, 14(2): 419–427.
- [6] White PM, Potter TL, Strickland TC. Pressurized liquid extraction of soil microbial phospholipid and neutral lipid fatty acids. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(16): 7171–7177.
- [7] Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957, 226(1): 497–509.
- [8] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911–917.
- [9] Halim R, Gladman B, Danquah MK, et al. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresour Technol*, 2011, 102(1): 178–185.
- [10] Cooney M, Young G, Nagle N. Extraction of bio-oils from microalgae. *Sep Purif Rev*, 2009, 38(4): 291–325.
- [11] Li W, Du W, Li YH, et al. Enzymatic transesterification of yeast oil for biodiesel fuel production. *Chin J Process Eng*, 2007, 7(1): 137–140 (in Chinese).
里伟, 杜伟, 李永红, 等. 生物酶法转化酵母油脂合成生物柴油. *过程工程学报*, 2007, 7(1): 137–140.
- [12] Balasubramanian S, Allen JD, Kanitkar A, et al. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system—design, optimization, and quality characterization. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 3396–3403.
- [13] Lee JY, Yoo C, Jun SY, et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour Technol*, 2010, 101: S75–S77.
- [14] Zhu JY, Zhang HM, Hu YC, et al. Comparison on

- lipid extraction methods of *Schizochytrium* sp. for industrialization. *Food Sci Technol*, 2011, 36(9): 32–35 (in Chinese).
- 朱婧瑶, 张红漫, 胡耀池, 等. 面向工业化的裂殖壶菌 DHA 油脂提取方法研究. *食品科技*, 2011, 36(9): 32–35.
- [15] Yoo G, Park WK, Kim CW, et al. Direct lipid extraction from wet *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using osmotic shock. *Bioresour Technol*, 2012, 123: 717–722.
- [16] Liang K, Zhang Q, Cong W. Enzyme-assisted aqueous extraction of lipid from microalgae. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(47): 11771–11776.
- [17] Jin GJ, Yang F, Hu CM, et al. Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol*, 2012, 111: 378–382.
- [18] Gibbins RD, Aksoy HA, Ustun G. Enzyme-assisted aqueous extraction of safflower oil: optimisation by response surface methodology. *Int J Food Sci Technol*, 2012, 47(5): 1055–1062.
- [19] 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 (in Chinese).
- 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.
- [20] Arai M, Lee TH, Murao S. Substrate specificity of *Penicillium lilacinum* enzyme lytic to cell wall of *Rhodotorula glutinis* and structure of *Rhodotorula* cell wall glucomannan. *Curr Microbiol*, 1978, 1(3): 185–188.
- [21] 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.
- [22] Yang F, Zhang SF, Jin GJ, et al. Purification and characterization of a β -1,3-glucomannanase expressed in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 49(2): 223–228.
- [23] 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.
- [24] He DP, Chen T. *Microbial Oil*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 241–242 (in Chinese).
- 何东平, 陈涛. *微生物油脂学*. 北京: 化学工业出版社, 2005: 241–242.
- [25] Campbell KA, Glatz CE, Johnson LA, et al. Advances in aqueous extraction processing of soybeans. *J Am Oil Chem Soc*, 2011, 88(4): 449–465.
- [26] Chabrand RM, Kim HJ, Zhang C, et al. Destabilization of the emulsion formed during aqueous extraction of soybean oil. *J Am Oil Chem Soc*, 2008, 85(4): 383–390.
- [27] Wu SG, Hu CM, Jin GJ, et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol*, 2010, 101(15): 6124–6129.
- [28] Yoshida H, Yoshida N, Kuriyama I, et al. Profiles of lipid components, fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in Jack beans (*Canavalia gladiata* DC.). *Food Chem*, 2013, 136(2): 807–812.
- [29] Kumar R, Tiwari P, Garg S. Alkali transesterification of linseed oil for biodiesel production. *Fuel*, 2013, 104: 553–560.

(本文责编 郝丽芳)