

# 餐厨垃圾水解液培养酿酒酵母发酵产油脂的影响因素

孙士权, 蒋昌波, 周谦, 刘青芝, 赵刚, 谭万春, 聂小保, 万俊力, 余关龙

(长沙理工大学水利工程学院, 水沙科学与水灾害防治湖南省重点实验室, 湖南长沙 410114)

**摘要:** 为提高餐厨垃圾水解液发酵产油脂量, 探究其发酵生产特征和影响因素, 以 *Saccharomyces cerevisiae* As2.516 为供试菌株, 以初始餐厨垃圾水解液加入量 90% (V/V)、搅拌速率 180 r/min、通气量 2.5 L/min、发酵周期 10 d 为基础发酵条件进行 1 L 发酵罐发酵。实验结果表明发酵过程受初始 pH 值、温度、接种生物量、还原糖含量及无机盐、金属离子浓度影响。其中最适宜初始培养条件为: pH 值 6、温度 30 °C、接种量 10%, 该条件下生物量、油脂产量及产物转化率最大。以实验最适宜培养条件为基础发酵条件时, *S. cerevisiae* 发酵第 7 d 油脂产量最高, 为 4.26 g/L, 生物量 12.95 g/L, 油脂产率 32.9%。经气相色谱分析发酵所得脂肪酸主要由 C16 及 C18 脂肪酸组成, 其中不饱和脂肪酸占 72.09%。餐厨垃圾水解液中无机盐离子含量丰富, 外加钾、镁、锰等金属离子抑制菌体生长并影响油脂合成, 除微量  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \times 10^{-4}$  g/L) 外, 无需添加其它无机盐。*S. cerevisiae* 利用餐厨垃圾水解底物具有谱宽和抗逆性。

**关键词:** 餐厨垃圾水解液; 微生物油脂; 培养条件; 无机盐离子; 金属离子

文章编号: 1673-9078(2014)11-156-162

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.028

## Factors Influencing Microbial Oil Production from Food Waste

### Hydrolysates by Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae* As2.516

SUN Shi-quan, JIANG Chang-bo, ZHOU Qian, LIU Qing-zhi, ZHAO Gang, TAN Wan-chun, NIE Xiao-bao, WAN Jun-li, YU Guan-long

(School of Hydraulic Engineering, Changsha University of Science and Technology, The Water Wand Science and the Water Disaster Prevent and Control, Key Laboratory of Hunan Province, Changsha 410114, China)

**Abstract:** To increase microbial oil production by fermentation from food waste hydrolysates and to study the characteristics of fermentation production and the factors that influence it, *Saccharomyces cerevisiae* As2.516 was used as a test strain. Fermentation was conducted in a 1-L fermentor, and the fermentation conditions were as follows: initial amount of food waste hydrolysates, 90% (V/V); agitation speed, 180 r/min; aeration rate, 2.5 L/min; fermentation cycle, 10 d. The fermentation process was affected by the initial pH value, temperature, inoculation biomass, content of reducing sugar, and concentrations of inorganic salts and metal ions. The optimal culture conditions were as follows: pH value, 6; temperature, 30 °C; inoculum size, 10%. Under these conditions, the maximum biomass, oil production, and product conversion rate were observed. On day 7 of the fermentation by *S. cerevisiae*, the highest oil yield was attained (4.26 g/L), and the biomass and oil production rate were 12.95 g/L and 32.9%, respectively. The gas chromatography analysis showed that C16 and C18 fatty acids were the main components of the fatty acids produced by fermentation, and unsaturated fatty acids accounted for 72.09%. Inorganic salts were abundant in the food waste hydrolysates; additional potassium, magnesium, manganese, and other ions could inhibit bacterial growth and affect oil production. Therefore, except for a trace amount of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \times 10^{-4}$  g/L), it was not necessary to add additional inorganic salts. *S. cerevisiae*, which used food waste hydrolysates, was characterized as broad-spectrum and stress tolerant.

**Key words:** food waste hydrolysates; microbial oil; culture conditions; inorganic ions; metal ions

生物柴油被普遍认为是化石柴油较有潜能的替代品, 日益受到关注。目前生产生物柴油原料多采用含

收稿日期: 2014-05-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51309032); “港口、海岸及近海工程” 省级重点学科开放课题

作者简介: 孙士权 (1980-), 男, 在职博士, 讲师, 环境科学及水生态

通讯作者: 蒋昌波

油植物, 如大豆 (美国)、油菜 (欧洲)、棕榈 (东南亚)、桐子 (印度) 和蓖麻 (巴西) 等, 原料成本占生物柴油生产总成本的 75%~80%<sup>[1-3]</sup>。所以依靠植物油脂资源成为生物柴油产业进一步发展的主要瓶颈。微生物油脂 (Microbial lipid) 是微生物细胞内积累的单细胞油脂, 其脂肪酸和植物油的组分相似, 且有周期短、可连续生产、可规模化利用等优势, 适于生物柴

油合成<sup>[4-5]</sup>。

随着生活水平不断提高,餐厨垃圾产量日益增大(占城市生活垃圾的30%~50%),而目前餐厨垃圾处理理论和技术均存在不足之处<sup>[6-7]</sup>。餐厨垃圾富含有机大分子(如淀粉、蛋白质、纤维素等等),水解后形成可被微生物直接利用的小分子有机物,进而再被转化为乙醇、有机酸、油脂等附加值更高的物质<sup>[8-10]</sup>,这些物质可为生物柴油制备的主要原料,能解决当前限制生物柴油发展的相关原料瓶颈等问题。

笔者等人利用复合酶对餐厨垃圾进行水解预处理后,水解液内含大量的多糖、氨基酸等营养物质,可满足*S. cerevisiae*等为代表的产油脂菌群增殖营养需求<sup>[8]</sup>。但相对于传统发酵行业成分较明确的原料,餐厨垃圾水解液可称之为“粗原料”。“粗原料”除含有碳水化合物以外,还含有大量非糖、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<sup>[11]</sup>。当培养基中多种水解副产物并存时,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会有发酵周期长、底物利用率低、产物得率低、处理成本高等一系列问题<sup>[12]</sup>。为提高餐厨垃圾水解液发酵产油脂量,探究其发酵生产特征和影响因素,本文对一株*S. cerevisiae*菌株在1L发酵罐中分批发酵餐厨垃圾水解液产油脂过程进行监测,研究其产油脂特征和环境因子、无机盐、金属盐类对其影响,探讨*S. cerevisiae*对餐厨垃圾水解底物利用谱宽、抗逆性和产物转化率等特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验用菌株:酿酒酵母*S. cerevisiae*,购于湖南省微生物研究所,来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心CICC31276。

培养基:斜面培养基为PDA培养基,主要成分为马铃薯浸汁(20%)、葡萄糖(20 g/L)、琼脂(20 g/L)。

发酵培养基为餐厨垃圾水解液培养基:餐厨垃圾被复合酶水解后含多类还原糖、氨基酸等<sup>[8]</sup>。其中还原糖(水解液中还原糖主要有葡萄糖、麦芽糖、半乳糖等)质量百分比10.03%~15.12%(均值11.34%),氨基酸态氮含量197.87 mg/L~215.18 mg/L(均值203.1 mg/L)。

主要试验药品均为分析纯:磷酸二氢钾,硫酸镁,硫酸锰,硫酸铜,3,5-二硝基水杨酸,亚硫酸钠,酒石酸钾钠,浓盐酸,甲醇,氯仿,氯化钠,淀粉酶,糖化酶,蛋白酶,纤维素酶等。

试验用发酵罐:自制自控式(BIOT-1CS)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 餐厨垃圾水解液的制备

将原态餐厨垃圾进行分选,剔除里面的纸巾、骨头等杂物,将剩余部分粉碎打浆,按1:1加去离子水混合。再向其中投入淀粉酶、糖化酶、蛋白酶和纤维素酶组成的复合酶,投加量分别为92.5、1250、3000和100(U/g)原料,在pH值为6,温度为55℃条件下,水解30 min后,经4000 r/min离心获得水解液,高压蒸汽灭菌后脱毒备用。

#### 1.2.2 分批发酵方法

挑取适量斜面菌株*S. cerevisiae*于PDA液体培养基中,30℃、180 r/min振荡10 h,再以10%(V/V)接种量转入发酵种子液培养基中,30℃、180 r/min振荡12 h获得种子液(OD<sub>600</sub>≥1.2)。以初始餐厨垃圾水解液加入量90%(V/V)、接种量10%(V/V)、初始pH值6、培养温度30℃、搅拌速率180 r/min、通气量2.5 L/min进行1 L发酵罐分批发酵10 d。每24 h吸取10 mL发酵液,4000 r/min离心15分钟收集上清液和菌体。

#### 1.2.3 发酵过程中各检测指标的测定

(1)菌体密度:每隔4 h取10 mL发酵液样品,4000 r/min离心20 min,以质量分数0.9%(m/V)的NaCl水溶液重悬沉淀,测定OD<sub>600</sub>。

(2)菌体干重:取1 mL于离心管中,4000 r/min、4℃冷冻离心20 min,置于烘箱中80℃烘至恒重。计算公式为:

$$\text{生物量 (g/L)} = (\text{DCW}/V) \times 10^3$$

式中:DCW,细胞干重(g);V,取样体积(mL)。

(3)油脂产量的测定:采用酸热法提取油脂并测定油脂重量。计算公式为:

$$\text{油脂产量 (g/L)} = W_0 \times L / 100$$

式中:W<sub>0</sub>,菌体生物量(g/L);L,菌体产油率(%)。

(4)还原糖:采用DNS法测定上清液中还原糖含量。即吸取100 μL发酵液加入3 mL DNS试剂,沸水浴显色5 min,定容至25 mL。测定OD<sub>550</sub>。

(5)氨基酸态氮:采用甲醛滴定法测定。

(6)油脂脂肪酸成分:根据GB/T 17376-1998进行微生物油脂甲酯化预处理,采用Agilent 6890N型气相色谱仪检测该脂肪酸甲酯。FID检测器;DB-1(30.0 m×0.25 mm×0.25 μm)型毛细管色谱柱;柱温170℃,检测室温度280℃,气化室温度250℃,控制升温速度3℃/min至220℃,并保持5 min;使用氮气作为载气,控制流速为28.5 mL/min;分流比为50:1(V/V);

进样量 1 μL。脂肪酸通过对照标准样品定性,用面积归一法确定相对含量。

(7) pH 值及无机盐、金属离子:依据《水和废水监测分析方法》测定。

### 1.2.4 数据分析

采用 Origin8.0 软件对实验数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养条件对 *S. cerevisiae* 发酵产油脂的影响

响

对照组实验条件为水解液原始 pH、温度和初定接种量,其值为 6、温度 25 °C 和接种量为 15% (V/V),实验过程将对对照组实验条件作影响因子个值整合于总体实验。由图 1a 可知,在初始 pH 为 5~7 的范围内生物量和油脂含量均较高。当 pH 值从 5 增加到 6 时,生物量和油脂含量随 pH 值升高而显著提高并达到最大值,分别为 12.94 g/L 和 34.4%。此后,随着 pH 值增大到 7,生物量和油脂含量呈现缓慢下降趋势,而当 pH 值继续增大时,生物量和油脂产量开始显著下降。这说明碱性条件明显抑制 *S.cerevisiae* 细胞增长和油脂积累,实验进一步证明了酵母菌喜欢偏酸性环境。由于环境 pH 值对微生物生命活动影响较大,其不仅能改变细胞膜上电荷,且直接关系到培养基中营养物质离子化程度,决定细胞对营养物质吸收和代谢产物排泄情况,影响微生物生长代谢<sup>[13-14]</sup>。尽管 *S.cerevisiae* 微生物能够适应较广 pH 值范围,其通过控制氢离子进出细胞保持细胞内部始终维持中性环境,当 pH 值在 5~7 范围内时, *S.cerevisiae* 通过自身代谢活动改变环境的 pH 值,影响其自身的生长繁殖和代谢产物的形成,所以本实验偏酸性条件下生物量和油脂含量均较高。

图 1b 反映培养温度从 20 °C 增加到 30 °C 过程中,发酵性丝孢酵母生物量和油脂含量变化特征,随温度升高 *S. cerevisiae* 生物量和油脂含量均逐渐增大,在 30 °C 时达到最大值,分别为 11.88 g/L 和 32.7%;但温度进一步升高生物量和油脂含量下降。温度是微生物细胞生长繁殖一个重要因素<sup>[14]</sup>。 *S.cerevisiae* 和其它微生物一样都只能适应一定温度范围。起始阶段, *S.cerevisiae* 细胞生长速率随温度升高而增大,当温度为 30 °C, *S.cerevisiae* 细胞生长速率随温度升高开始下降,直到温度为 40 °C,其后生长速率接近零。温度对 *S.cerevisiae* 影响可能存在 2 个方面:首先, *S.cerevisiae* 生长过程实际上是一系列酶促反应过程,

在环境低温阶段内不断升高,细胞内生化反应速度加快,从而导致新陈代谢加速以及代谢产物合成时间提前;其次,随着温度升高,细胞内热敏物质(蛋白质、核酸等)可能受到不可逆破坏,同时酶失活加快,导致 *S.cerevisiae* 细胞老化,发酵周期减短,目标产物产量下降。除了对细胞生长的影响,温度还影响产油微生物油脂含量和组成<sup>[14-15]</sup>。

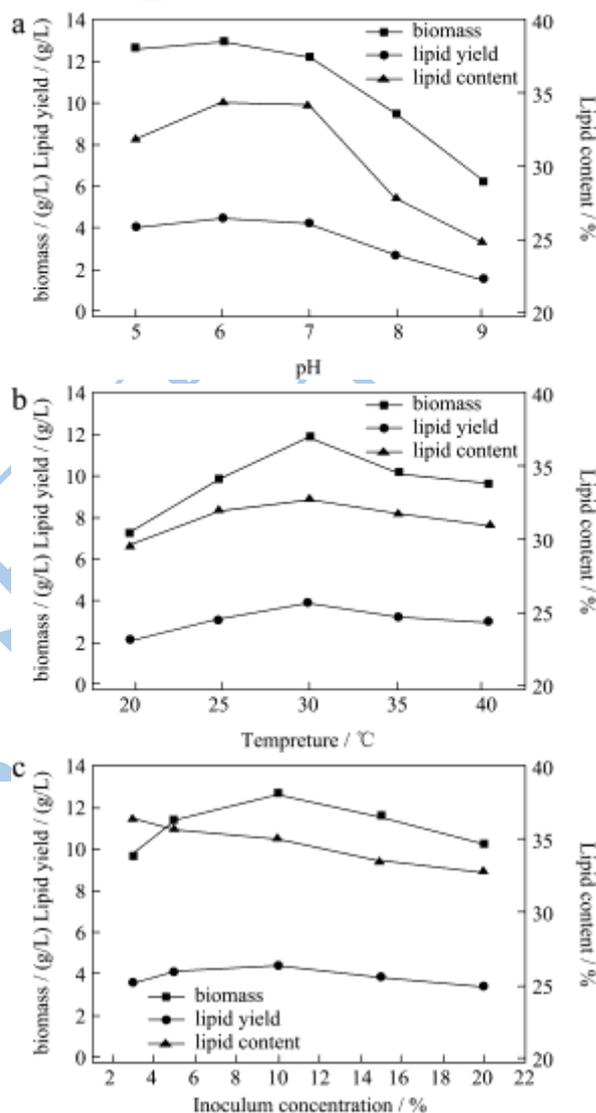


图 1 不同培养条件下 *S. cerevisiae* 利用餐厨垃圾水解液发酵的细胞浓度、还原糖残余量和油脂积累变化图

Fig.1 Plots showing changes in cell concentration, residual amounts of reducing sugar, and fat accumulation during the fermentation of food waste hydrolysates using *S. cerevisiae* under various conditions

由图 1c 可知,当接种量从 3% 增加到 10% 时,细胞生物量与油脂产量随接种量提高而逐渐增大至 12.63 g/L 和 4.42 g/L,此后生物量和油脂产量随接种量增加而下降;但随接种量增加,油脂产率却不断下降。接种量在许多真菌发酵过程中起重要作用<sup>[16]</sup>。适

适宜的接种量可降低杂菌污染概率，缩短发酵时间，提高发酵效率。但接种量过大易导致菌体生长过快，黏度增加，有害物质积累，最终影响产物合成。实验过程中随着接种量增加，*S.cerevisiae* 生物量与油脂产量先增后减，但油脂产率随接种量增加却不断下降。原因可能是种子液培养基富含氮源，当接种量增多时，餐厨垃圾水解液培养基中氮源增多，有利于酵母细胞生长，但不利于油脂的合成和积累。当接种量 10% 时，油脂产量最高。

## 2.2 餐厨垃圾水解液发酵产油脂

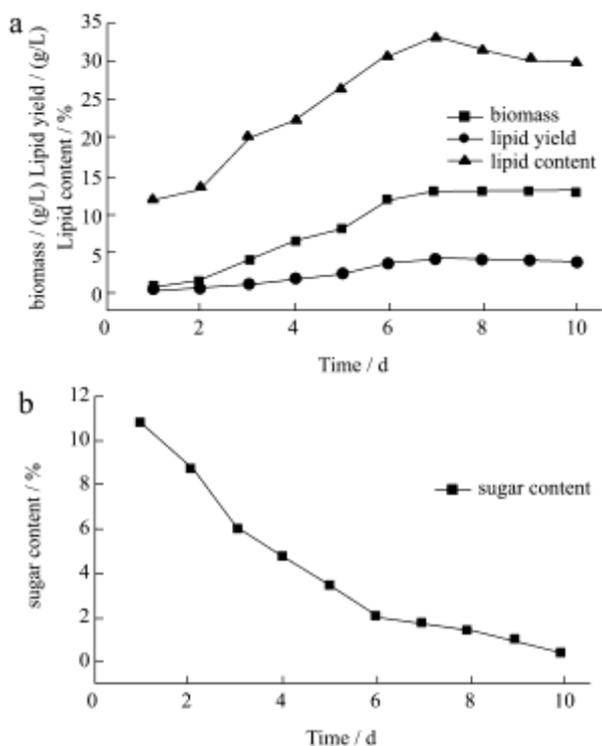


图 2 *S. cerevisiae* 利用餐厨垃圾水解液发酵产油脂与糖利用过程曲线

Fig.2 Curves of oil production and sugar utilization during the fermentation of food waste hydrolysates using *S. cerevisiae*

图 2 为以初始餐厨垃圾水解液加入量 90%、接种量 10%、pH 6、培养温度 30 °C、搅拌速率 180r/min、通气量 2.5 L/min 条件下对 *S. cerevisiae* 发酵过程中菌体生长、还原糖消耗和油脂积累变化过程 10 d 监测。发酵起始时餐厨垃圾水解液中还原糖质量百分比为 11.34% (mg/mg)。由图 2b 可知，餐厨垃圾水解液中还原糖被 *S. cerevisiae* 较好的利用于发酵产脂，在 0~6 d 时间内，还原糖含量呈直线性下降，第 6 d 进入发酵延迟期，但其发酵延迟期比其他利用单一葡萄糖碳源培养基的发酵长<sup>[13]</sup>。油脂产量在前 5 d 相对较低，在第 7 d 达到最大值 4.26 g/L，油脂产率亦达到 32.93%，在第 8 d 后油脂量和油脂产率不断下降。生物量第 7 d

达到 12.95 g/L 后稍有下降但基本维持稳定。

餐厨垃圾水解液中复杂的组成成分异于生物生长培养基，*S. cerevisiae* 发酵起始阶段 (1~2 d，见图 2)，菌体生物量和油脂产量低于已有关于产油脂发酵报道<sup>[17]</sup>。此阶段，*S. cerevisiae* 处于对餐厨垃圾水解液环境条件进行适应调整阶段。随着对发酵环境的适应，*S. cerevisiae* 开始高效利用还原糖快速增殖。发酵第 5 d，细胞积累速率减缓，*S. cerevisiae* 细胞从菌体积累转向为油脂积累，主要是 *S. cerevisiae* 中油脂积累的关键因子被激活使酵母大量积累油脂。实验后期培养基中适宜 *S. cerevisiae* 利用的还原糖的含量较少时，菌体有利用体内积累的油脂维持自身代谢趋势。虽然餐厨垃圾水解液相对于单一还原糖基质属于“粗原料”，除含有碳水化合物以外，还含有大量非糖、非有机质成分，但对发酵所得微生物油脂进行气相色谱分析和实验数据说明 *S. cerevisiae* 对餐厨垃圾水解液底物利用具有谱宽和抗逆性，而其影响产物转化率的因素较多，进一步提高其转化率为后期研究的方向之一。

实验后期对发酵所得微生物油脂进行气相色谱分析，结果见表 1。*S. cerevisiae* 利用餐厨垃圾水解液发酵所得脂肪酸主要由 C16 和 C18 脂肪酸组成，其中不饱和脂肪酸占 72.09%。其脂肪酸成分与植物油脂十分相似，即主要为油酸、亚油酸、棕榈油酸、软脂酸等，说明实验所得微生物油脂可作为替代植物油脂制备生物柴油的原料。

表 1 微生物油脂组分分析

Table 1 Analysis of fatty acid components in microbial oil

保留时间/s	微生物油脂组分	含量/%
7.468	豆蔻酸甲酯 (C14:0)	3.274
10.951	棕榈油酸甲酯 (C16:1)	5.148
11.423	软脂酸甲酯 (C16:0)	15.789
15.418	亚油酸甲酯 (C18:2)	10.914
15.609	油酸甲酯 (C18:1)	56.027
16.389	硬脂酸甲酯 (C18:0)	8.847

以廉价废弃物为原料发酵生产微生物油脂是缓解能源危机一个重要研究思路，也是最近研究较多的热点问题。笔者归纳整理了部分微生物利用不同廉价原料发酵生产微生物油脂的情况，见表 2。*S. cerevisiae* 利用餐厨垃圾水解液发酵产油脂具有相对较高油脂产率，且餐厨垃圾量大、廉价、易收集，可无限再生，工业化生产有广阔的发展前景。

## 2.3 无机盐浓度对酿酒酵母发酵产油脂的影响

餐厨垃圾中 NaCl 等无机盐含量高,同时还含有钙、铁、钾、镁、锰、铜等微量无机盐金属离子。对真菌而言,某些无机盐金属离子作为必要微量元素参与微生物油脂代谢的相关氧化还原酶反应,无机盐金

属离子含量影响油脂合成速率和产油量。表 3 为实验测得原态餐厨垃圾水解液中部分金属离子含量,由表 3 可知,实验水解液中镁、锰离子含量相对较高。

表 2 微生物利用不同廉价原料产油统计

Table 2 Summary of microbial oil production by fermentation using various cheap raw materials

微生物	原料	生物量/(g/L)	油脂得率/%	油脂产量/(g/L)	参考文献
刺孢小克银汉霉	甘油	6.2	53.2	3.3	[18]
深黄被孢霉	甘油	7.8	25.6	2.0	[18]
毛霉	木薯淀粉	28.0	17.8	5.0	[19]
斯达油脂酵母	城市污水	9.4	68.0	6.4	[20]
深黄被孢霉	淀粉	10.4	36.0	3.7	[21]
刺孢小克银汉霉	果胶	4.1	10.0	0.4	[22]
酿酒酵母	餐厨垃圾	12.95	32.93	4.26	本文

表 3 餐厨垃圾水解液部分无机离子含量 (mg/L)

Table 3 Concentrations of the inorganic ions in food waste

hydrolysates				
金属离子	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
含量	158.47~162.75	17.91~21.24	0.16~0.20	2.01~2.35
平均含量	160.76	19.38	0.18	2.27

由图 3a 可知,生物量、油脂产量在水解液中外添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  实验组含量均小于对照组(外添量为 0 g/L),随着  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  外添量增加,*S.cerevisiae* 菌体生物量和油脂产量均受抑制,且在突然于培养基添加 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  后,*S.cerevisiae* 产油率下降明显。*S.cerevisiae* 在代谢过程中产生各种代谢产物,部分代谢物改变微生物生长环境 pH 值,影响微生物细胞的积累。其一可能是  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为一种较常用的缓冲剂,它不仅能够维持餐厨垃圾水解液培养基中 pH 值的稳定,同时  $\text{K}^+$  亦是许多胞内代谢酶辅助因子,通过影响酶活性变化而影响 *S.cerevisiae* 菌体的积累和油脂合成<sup>[20]</sup>。其次随基质内  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度的增大,*S.cerevisiae* 菌体生物量和油脂产量均受抑制,钾在天然食物中分布广泛(如马铃薯、胡萝卜、豆类等均为高含钾食物),其以无机盐形式保留在餐厨垃圾水解液中,如表 3 所示,培养基质中无机盐含量丰富,具有较高的离子强度,过多添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  将进一步加大培养基离子强度进而抑制菌体生长和油脂积累。

镁离子是 *S.cerevisiae* 生长和油脂合成的重要元素。 $\text{Mg}^{2+}$  为众多关键酶(如磷酸果糖激酶、丙酮酸脱羧酶、丙酮酸激酶、柠檬酸裂解酶、异柠檬酸脱氢酶等)的辅助因子或激活剂<sup>[23]</sup>,对呼吸作用、基质中糖代谢等有重要影响。外加  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  对 *S.cerevisiae* 利用餐厨垃圾水解液发酵产油脂影响与  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对发

酵过程影响相似。生物量和油脂产量在水解液中外添加  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  实验组含量均小于对照组(外添量为 0 g/L),且 *S.cerevisiae* 菌体生物量和油脂产量均随着  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  浓度升高而降低,如图 3b 所示。可能因为在小米、玉米、紫菜、豆类以及一些蔬菜等常见食物中  $\text{Mg}^{2+}$  均值含量达到(50~270) mg/L,在餐厨垃圾水解时  $\text{Mg}^{2+}$  被保留在水解液中,水解液中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度满足发酵需求,额外添加  $\text{Mg}^{2+}$  含量产生抑制作用。

锰离子作为微量元素,在脂肪酸代谢过程中担任关键酶苹果酸酶的重要辅助因子,研究表明<sup>[15]</sup>,在同等含量苹果酸酶的条件下, $\text{Mn}^{2+}$  比  $\text{Mg}^{2+}$  更易促进 NADPH 形成,因此  $\text{Mn}^{2+}$  对微生物油脂积累具有重要影响。外添加少量  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $1 \times 10^{-3}$  g/L) 实验组相对于对照组(外添量为 0 g/L)对生物量和油脂产量并没有太大影响,但当添加量继续增大时,油脂产率开始下降。由图 3c 可知,*S.cerevisiae* 生物量随着  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  浓度增高呈下降趋势,外加  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  对 *S.cerevisiae* 细胞生长和油脂积累均产生抑制和减少影响,可能是因为餐厨垃圾水解液中已经存在一定量的  $\text{Mn}^{2+}$ ,额外增加其含量,可能造成 *S.cerevisiae*  $\text{Mn}^{2+}$  中毒,产生副作用。

由图 3d 可知,与外加  $\text{Mg}^{2+}$  及  $\text{K}^+$  的影响不同,添加微量 ( $1 \times 10^{-4}$  g/L) 的  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  虽对 *S.cerevisiae* 生物量没有显著影响,却相对于对照组(外添量为 0 g/L)明显提高了其在餐厨垃圾水解液中的油脂产率。但当  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  添加量持续增加时,油脂含量和油脂产率开始减少和下降,菌体生物量积累受到同样影响。可能是较高的  $\text{Cu}^{2+}$  浓度对 *S.cerevisiae* 的部分关键酶活性产生副作用,或在与其他共存金属离子如  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  等竞争关键酶结合位点导致竞争性抑制<sup>[23]</sup>,影

响 *S.cerevisiae* 菌体生物量积累。

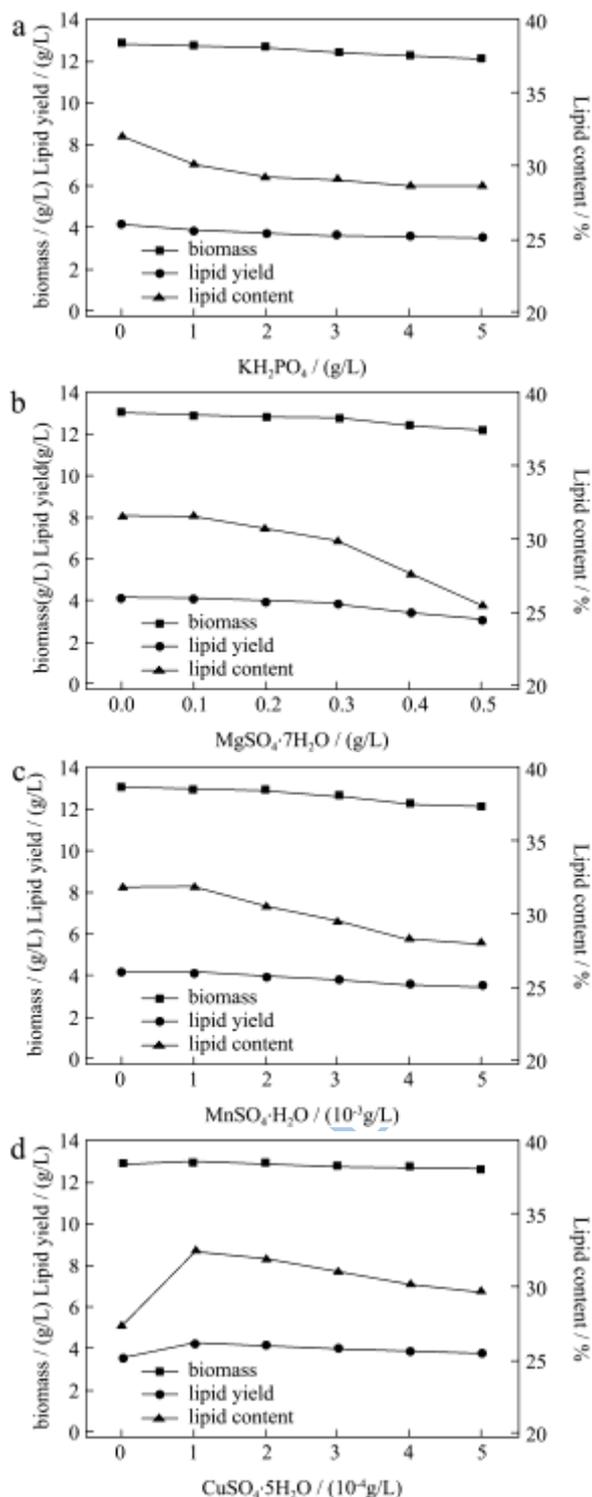


图3 外加无机离子条件下 *S. cerevisiae* 利用餐厨垃圾水解液发酵的细胞浓度、还原糖残余量和油脂积累程度图

Fig.3 Plots showing changes in cell concentration, residual amounts of reducing sugar, and fat accumulation during the fermentation of food waste hydrolysates using *S. cerevisiae* under different conditions with the addition of inorganic ions

### 3 结论

3.1 *S.cerevisiae* 能较好地利用餐厨垃圾水解液发酵产油脂。发酵第7d油脂产量最高，为4.26 g/L，生物量为12.95 g/L，油脂产率为32.9%。经气相色谱分析发酵所得脂肪酸主要由C16及C18脂肪酸组成，与植物油脂成分十分相似，而且其中不饱和脂肪酸占72.09%，是制备生物柴油的较理想替代原料。

3.2 餐厨垃圾水解液培养 *S.cerevisiae* 发酵产油脂最适初始pH值为6，生物量和油脂含量分别为12.94 g/L和34.4%；在碱性条件下会显著抑制酿酒酵母细胞增长和油脂积累；最适培养温度为30℃，该条件下生物量和油脂产量达到最大值，分别为11.88 g/L和32.7%；最适接种量为10%，该条件下生物量与油脂产量最大，分别为12.63 g/L和4.42 g/L，但油脂产率随着接种量增加不断下降。

3.3 餐厨垃圾水解液中无机盐离子含量丰富，外加钾、镁、锰等金属离子会抑制 *S.cerevisiae* 菌体生长同时影响油脂合成，除微量  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \times 10^{-4}$  g/L) 外，无需添较多的无机盐。与其他一些人工合成培养基相比，简化了培养基配制步骤。

3.4 *S. cerevisiae* 对餐厨垃圾水解底物利用谱宽、抗逆性。

### 参考文献

- [1] S Kent Hoekman, Amber Brocha, Curtis Robbinsa, et al. Review of biodiesel composition, properties, and specifications [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012, 16(1): 143-169
- [2] Y C Sharma, B Singh, S N Upadhyay. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review [J]. Fuel, 2008, 87(12): 2355-2373
- [3] 何平伟, 邓放明. 劣质食用油碱催化酯交换制备生物柴油初探[J]. 现代食品科技, 2012, 28(6): 684-687
- [4] HE Ping-wei, DENG Fang-ming. Preliminary study on biodiesel production via koh catalyzed transesterification of inferior edible oil [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(6): 684-687
- [5] Chao Huang, Min-hua. Zong, Hong Wu, et al. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans* [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(19): 4535-4538
- [6] Jienu Lian, Manuel Garcia-Perez, Ralph Coates, et al. Yeast fermentation of carboxylic acids obtained from pyrolytic aqueous phases for lipid production [J]. Bioresource Technology, 2012, 118: 177-186
- [6] Nalina Haiza Mohd Yasin, Tabassum Mumtaz, Mohd Ali

- Hassan, et al. Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review [J]. Journal of Environmental Management, 2013, 130: 375-385
- [7] 乔长晟,宋可,张娟琨,等.餐厨垃圾原位处理菌株的筛选和鉴定[J].现代食品科技,2013,29(4):756-761
- QIAO Chang-sheng, SONG Ke, ZHANG Juan, et al. Screening and identification strains for in situ kitchen waste treatment [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(4): 756-761
- [8] 孙士权,周谦,蒋昌波,等.餐厨垃圾发酵产油脂的复合酶制剂水解试验[J].长沙理工大学学报(自然科学版),2014,11(1):99-103
- SUN Shi-quan, ZHOU Qian, JIANG Chang-bo, et al. Test conditions of enzymatic hydrolysis garbage for microbial oils production [J]. Journal of Changsha University of Science and Technology (Nature Science), 2014, 11(1): 99-103
- [9] Aikaterini Ioannis Vavouraki, Evangelos Michael Angelis, Michael Kornaros. Optimization of thermo-chemical hydrolysis of kitchen wastes [J]. Waste Management, 2013, 33(3): 740-745
- [10] Seungdo Kim, Bruce E. Dale. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues [J]. Biomass Bioenergy, 2004, 26(4): 361-375
- [11] 赵宗保,胡翠敏.能源微生物油脂技术进展[J].生物工程学报,2011,27(3):427-435
- ZHAO Zong-bao, HU Cui-min. Progress in bioenergy-oriented microbial lipid technology [J]. Chin J Biotech, 2011, 27(3): 427-435
- [12] Amin Talebian-Kiakalaieh, Nor Aishah Saidina Amin, Hossein Mazaheri. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil [J]. Applied Energy, 2013, 104: 683-710
- [13] Meikandhan Thiru, Santosh Sankh, Vidhya Rangaswamy. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus* [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(22): 10436-10440
- [14] Apiradee Hongsthong, Patcharapom Deshnum, Kalyanee Paithoonrangarid, et al. Differential responses of three acyl-lipid desaturases to immediate temperature reduction occurring in two lipid membranes of *Spirulina platensis* strain C1 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 96(6): 519-524
- [15] Lina Fayez Yousef, Michal Wojno, Warren A. Dick, et al. Lipid profiling of the soybean pathogen *Phytophthora sojae* using fatty acid methyl esters (FAMES) [J]. Fungal Biology, 2012, 116(5): 613-619
- [16] Hung-Chang Chen, Tse-Ming Liu. Inoculum effects on the production of  $\gamma$ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21(2): 137-142
- [17] Zhiwei Gong, Qian Wang, Hongwei Shen, et al. Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production [J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 20-24
- [18] Stylianos Fakas, Seraphim Papanikolaou, Athanasios Batsos, et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* [J]. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(4): 573-580
- [19] Muammer Demir, Irfan Turhan, Ahmet Kucukcetin, et al. Oil production by *Mortierella isabellina* from whey treated with lactase [J]. Bioresource Technology, 2013, 128: 365-369
- [20] C. Angerbauer, M. Siebenhofer, M. Mittelbach, et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 3051-3056
- [21] Sulepom Kitcha, Benjamas Cheirsilp. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source [J]. Energy Procedia, 2011, 9: 272-282
- [22] Feiyan Xue, Jinxin Miao, Xu Zhang, et al. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 5923-5827
- [23] Katarina Jernejc, Matic Legiša. The influence of metal ions on malic enzyme activity and lipid synthesis in *Aspergillus niger* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 217(2): 185-190