



可再生能源
Renewable Energy Resources
ISSN 1671-5292, CN 21-1469/TK

《可再生能源》网络首发论文

题目: 产油酵母发酵醪液油脂提取及溶剂筛选
作者: 宋竞毅, 黄其田, Rasool Kamal, 赵宗保
DOI: 10.13941/j.cnki.21-1469/tk.20220908.001
收稿日期: 2022-03-26
网络首发日期: 2022-09-09
引用格式: 宋竞毅, 黄其田, Rasool Kamal, 赵宗保. 产油酵母发酵醪液油脂提取及溶剂筛选[J/OL]. 可再生能源.
<https://doi.org/10.13941/j.cnki.21-1469/tk.20220908.001>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

产油酵母发酵醪液油脂提取及溶剂筛选

宋竞毅^{1,3}, 黄其田^{1,2}, Rasool Kamal^{1,2}, 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.中国科学院 大连化学物理研究所 大连市能源生物技术重点实验室, 辽宁 大连 116023; 3.中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为建立简易高效的微生物油脂提取方法, 文章以圆红酵母发酵醪液为原料, 直接用溶剂对其进行处理, 评估了 24 种溶剂的提取性能。研究结果表明: 弱极性溶剂, 如甲基叔丁基醚、氯仿、二氯乙烷等可直接从圆红酵母细胞中提取油脂, 而短链醇类极性溶剂及烃类非极性溶剂均不能提取油脂; 使用尼罗红和碘化丙啶对细胞进行染色后发现, 极性和弱极性溶剂破坏了细胞膜和脂滴膜, 有利于提取胞内油脂; 利用低毒性的甲基叔丁基醚和乙酸乙酯处理发酵醪液, 油脂提取率分别达到了 85% 和 59%, 且所得脂质的组成与酸热法提取的油脂相似。

关键词: 微生物油脂; 生物炼制; 绿色溶剂; 湿法提油; 相似相溶

中图分类号: TK6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5292(2022)00-0000-07

0 引言

油脂是人类生活中不可或缺的重要大宗产品, 可替代化石资源作为化学工业和可再生能源产业的基本加工原料。据《中华人民共和国 2021 年国民经济和社会发展统计公报》, 我国 2021 年进口植物油 1 039 万 t, 进口大豆 9 652 万 t, 油脂资源进口依存度远高于原油。近年来, 国际形势多变, 疫情、战争不断, 油脂资源进口有遭到封锁的危险。因此, 我国亟需建设、补充和完善油脂供给的新方式来保障我国的油脂资源供给^[1]。

某些产油微生物可在胞内积累油脂达细胞干重 20% 以上。与种植油料作物相比, 利用产油微生物将碳水化合物和农林废弃物转化为油脂, 具有生产周期短、不受气候和土地限制等优势, 是一种有潜力的新型油脂生产方式。微生物油脂的主要成分是甘油三酯(Triacylglycerol, TAG), 其脂肪酸组成与植物油相似, 因而可用于油脂化工和液体生物燃料行业^{[2],[3]}。

由于产油微生物细胞体积微小、细胞壁坚韧且成分复杂, 导致胞内脂质很难像油料植物种子那样直接压榨得到。微生物油脂的提取方法一般涉及细胞预处理和溶剂提取过程。细胞预处理方法通常有珠磨法、高压均质化等机械方法, 加热、微波、超声、脉冲电击等物理方法以及酸处理、酶

解等化学生物方法^[4]。不同细胞预处理方法对细胞壁的损伤程度不同, 但其目的均是促进溶剂渗透和油脂提取^{[5]-[7]}。为充分提取胞内脂质, 往往使用极性与非极性混合溶剂提取, 如最常用的 Folch 法^[8]和 Bligh-Dyer 法^[9]均采用甲醇-氯仿溶剂体系。这些方法虽能较好地提取脂质, 但细胞预处理过程存在工艺复杂、成本高、废水处置困难等问题, 难以大规模应用。然而, 某些溶剂分子能透过坚韧细胞壁并将胞内脂质从胞内“拽”出来。赵鑫研究发现, 使用氯仿与产油红酵母发酵醪液混合提取油脂, 油脂提取率可达 83%, 但用氯仿处理产油红酵母干细胞, 油脂提取率只有 26.6%^[10]。油脂提取效果受到溶剂性质、菌体材料的理化状态等因素的影响。

圆红酵母(*Rhodotorula toruloides*)是综合性状极其优良的产油酵母, 可利用复杂原料发酵, 胞内油脂含量可达细胞干重的 70% 以上, 已被广泛应用于微生物油脂技术研究中^[11]。为建立简易高效的油脂提取方法, 本文以圆红酵母发酵醪液为原料, 直接用溶剂对其进行处理, 并评估了 24 种溶剂的提取性能。这些溶剂包括醇类、醚类、酯类、烷烃类及氟代烷和氯代烷类。通过对细胞进行染色观察和对所提取的油脂进行组分分析, 初步揭示了溶剂性质与提取能力的关系。最终提出了采用甲基叔丁

收稿日期: 2022-03-26。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2103700); 大连市重点领域创新团队支持计划项目(2021RT04)。

通讯作者: 黄其田(1987-), 女, 博士研究生, 工程师, 研究方向为生物质能源生物转化技术。E-mail: huangqitian@dicp.ac.cn

基醚处理发酵醪液的微生物油脂提取新方法。

1 材料与方法

1.1 菌株

圆红酵母 CGMCC 2.1389 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 培养基

YEPD 培养基 (g/L): 酵母浸粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 琼脂粉 18 (用于固体培养基), pH 值为 6.0。

限氮培养基 (g/L): 葡萄糖 50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, 酵母浸粉 0.75, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, 每升培养基补加 10 mL 痕量元素溶液。

痕量元素溶液 (g/L)^[12]: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.055, 一水合柠檬酸 0.52, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.076, 18 M H_2SO_4 100 μL 。

1.3 油脂提取溶剂

甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、正丁醇、六氟异丙醇、1,1,1,3,3-五氟丁烷、2H,3H-十氟戊烷、甲基叔丁基醚、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、碳酸二甲酯、1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、三氯甲烷、四氯化碳、石油醚、环己烷、正己烷、正辛烷、异戊醇、甲基异丁基酮和水分别记为 S1, S2, S3, ..., S22, S23, S24。除水外,所有溶剂均为分析纯,购于天津市大茂化学试剂厂

1.4 含油菌悬液制备

使用 15-L 发酵系统 (Blbio-15FMT) 进行圆红酵母油脂发酵,在 7.2 L 的限氮培养基中以 10% 的接种量加入 YEPD 培养基活化两次后的种子液,通空气比为 $0.6 \text{ m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{min})$,发酵温度为 30°C ,搅拌转速为 200 r/min,罐压为 0.06 MPa,共发酵 120 h。发酵结束后,发酵液的菌体含量为 16.15 g/L,菌体含油量为 0.65 g/g,将发酵液作为油脂提取的原料。

1.5 油脂提取方法

1.5.1 溶剂法

使用 24 种溶剂直接提取发酵液中的油脂 (与水互溶的使用正己烷反萃),水提取组作为空白对照,酸热法提取的脂质为总油脂。取发酵液 10 mL 与等体积溶剂混合,在温度为 30°C ,转速为 200 r/min 的培养箱中提取 60 min,然后在常温下离心 (8 000 r/min) 3 min,分离萃取相,加入等体积的质量分数为 0.1% 的氯化钠溶液洗涤,萃取相过无水

硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂后,在 105°C 下烘干油脂至恒重,得到各溶剂直接提取的油脂。

1.5.2 酸热法 (Acid-Heating Extraction, AHE)

每克干细胞加入 6 mL 4 mol/L 的 HCl 溶液,在 78°C 下水解 1 h; 然后加入等体积的氯仿和甲醇,涡旋振荡 5 min; 随后在常温下离心 (8 000 r/min) 5 min,分离有机相,再加入等体积的氯仿进行二次萃取,分离并合并有机相。加入等体积的质量分数为 0.1% 的氯化钠溶液洗涤,萃取相过无水硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂后,在 105°C 下烘干油脂至恒重^[13]。

1.6 染色及观察方法

1.6.1 细胞内脂滴状态检查

尼罗红 (Nile Red) 染料可将活细胞内的脂质体染成红色。菌液中加入终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的尼罗红丙酮溶液将提油前后的细胞染色 (避光染色 5 min)^[14], 在显微镜细胞成像系统 RFP 荧光通道下放大 400 倍观察染色情况。

1.6.2 细胞存活情况及细胞膜情况检查

碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 染料可对失去膜的完整性的细胞染色,也可用于鉴别细胞是否死亡。菌液中加入终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的碘化丙啶溶液将提油前后的细胞染色 (避光染色 15 min), 在显微镜细胞成像系统 RFP 荧光通道下放大 400 倍观察染色情况。

另外,挑取 24 种溶剂提油后的菌泥划线至 YEPD 固体培养基上,于 28°C 下培养 3 d,检查细胞存活情况。

1.7 分析方法

1.7.1 中性脂组成分析

使用高效薄层色谱法 (HPTLC) 分离极性脂和中性脂^[15]。标准品为 0.303 g/L 的磷脂 (PL)、0.806 g/L 的甘油单酯 (MAG)、1.612 g/L 的甘油二酯 (DAG)、0.509 g/L 的游离脂肪酸 (FFA) 和 5.002 g/L 的甘油三酯 (TAG)。将提取的 24 组油脂样品使用氯仿稀释 20 倍后,用自动点样器 (起始点样位置为 20 mm,点样长度为 3 mm,点样间隔为 6 mm,总上样量为 4 μL ,硅胶板尺寸为 20 cm \times 10 cm) 点样至硅胶板,然后在装有展开剂 (正己烷,无水乙醚和冰醋酸的体积比为 80:40:1) 的层析缸中展开 10~15 min; 使用染色液 (质量体积分数为 8% 的 H_3PO_4 和质量体积分数为 10% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

的混合溶液)将硅胶板均匀染色,吹干后在 160 ℃下加热 4 min 取出,显色的硅胶板固定在 Biostep-CD60 型 HPTLC 扫描仪中,在 540 nm 的波长下扫描得到谱图。

1.7.2 油脂脂肪酸组分分析

在 70 mg 油脂中加入质量分数为 5% 的 KOH/CH₃OH 溶液 0.5 mL,在 70 ℃下回流 50 min,再加入 0.7 mL BF₃ 甲醇溶液(醚合三氟化硼和甲醇的体积比为 4:10)继续回流 10 min。冷却后加入 1 mL 正己烷和 1 mL 超纯水,使脂肪酸甲酯被萃取进入正己烷层,经超纯水洗涤 2 次后,使用 7890B-7000D 型气质联用仪分析脂肪酸组成。

气相色谱检测条件:GC 色谱柱 HP-5MS 5% phenyl methyl silox (30 m×250 μm×0.25 μm),进样器温度为 250 ℃,进样量为 1 μL,载气总流量为 114.1 mL/min,分流比为 100:1,检测器(FID)温度为 300 ℃;H₂ 流量为 30 mL/min,空气流量为 300 mL/min;柱温采取梯度升温,其中 0~1 min 保持 80 ℃,1~19.75 min 持续升温至 230 ℃,19.75~24.75 min 持续升温至 245 ℃,24.75~33.25 min 持续升温至 280 ℃并保持 5 min。脂肪酸甲酯通过质

谱分析定性,用面积归一法确定相对含量。

2 结果与讨论

2.1 溶剂对圆红酵母油脂提取的影响

常见的微生物油脂提取溶剂有甲醇,乙醇,氯仿,正己烷,乙酸乙酯等,以这些常用溶剂为基础,延伸出性质梯度性变化的溶剂及衍生物,并尝试使用其他可能的溶剂(多来自常用溶剂、绿色或生物基溶剂、还有食品、医用溶剂或工业添加剂)^[16]。这些溶剂的蒸气压较高,易于与油脂分离,除几种醇类以外,其他溶剂均可与水相分层,且能大量获取。发酵后期的圆红酵母中存在 TAG,DAG,MAG 和 FFA,它们均属于中性脂,脂类分子以脂肪酸为结构单元^[17],通常占总脂质的 80%以上,是微生物油脂的主要组分。还有一类来源于膜结构的 PL,属于极性脂,一般占总脂质的 10%以下。基于“相似相溶”原理,非极性溶剂可较好地溶解脂质,且极性溶剂能与极性脂形成氢键从而破坏膜结构,因此使用极性各异的溶剂进行油脂提取^[18]。

经不同溶剂提取油脂后,使用薄层色谱法做定性半定量分析,结果见图 1(S 为脂质标准品的层析条带)。

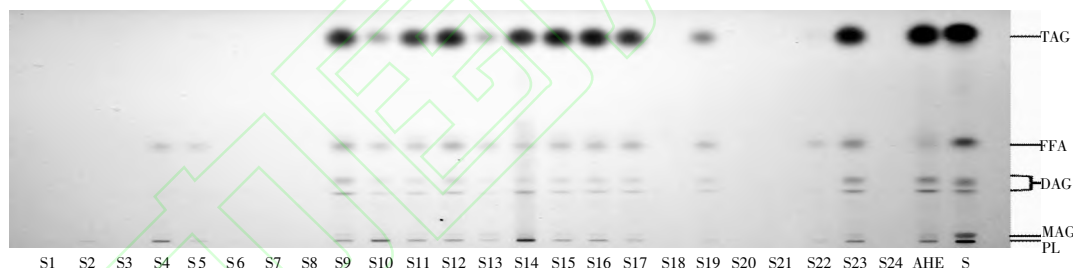
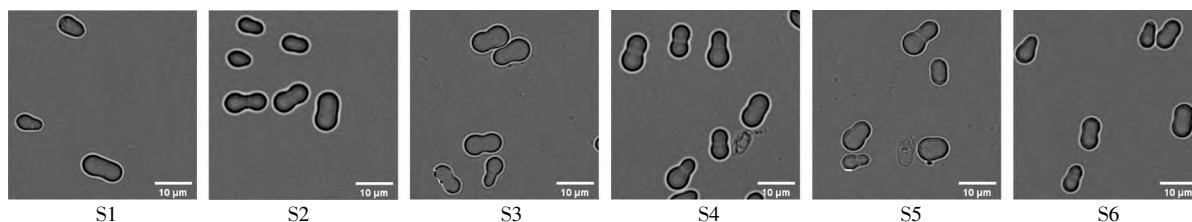


图 1 24 种溶剂提取脂质的 HPTLC 分析

Fig.1 HPTLC analysis of 24 solvents extracted lipids

从图 1 可以看出:S9,S11,S12,S14,S15,S16,S17 和 S23 提取的细胞内脂质较多、种类齐全,提油能力强;S10,S13 和 S19 提取的脂质较少,但脂质种类较全,提油能力偏弱;S2,S4,S5 和 S22 只能提取极少的部分极性脂,拥有较长碳链的 S4,S5 和 S22 还可提取一些游离脂肪酸;S1,S3,S6,S7,S8,S18,S20 和 S21 几乎提不出脂质。

24 种溶剂提油后,细胞的显微观察结果如图 2(S24 作为空白对照)所示。从图 2 可以看出,提油后的细胞形态可大致分为 3 种。第一种,细胞体积较大,胞内脂滴膜融合,但脂质没有透出细胞,如 S1,S2,S3,S4,S5,S6,S10,S13 和 S22,这些多为醇类溶剂提取后的细胞,醇类溶剂极性较强,易与水互溶,与中性脂相溶性较差,即使



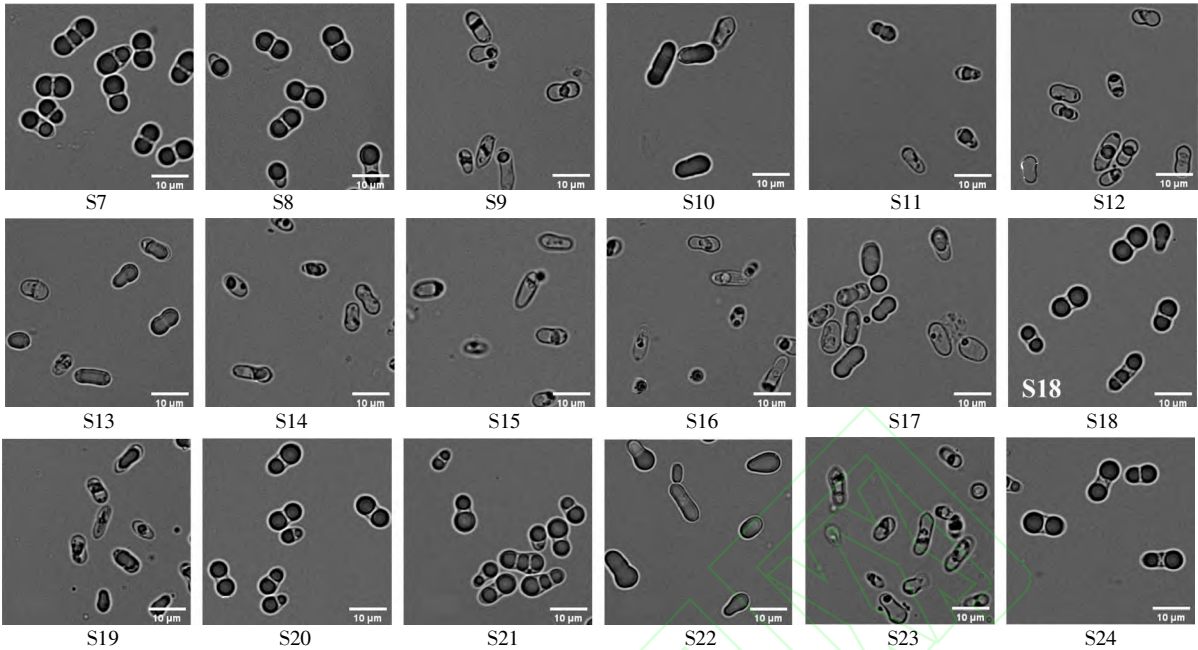


图 2 24 种溶剂直接提油后的细胞镜检图

Fig.2 Microscopic examination of cells after lipid extraction in 24 solvents

破坏了细胞膜也难以提出被“细胞壁笼”包裹的油脂。第二种,细胞体积明显变小,呈空壳状,大脂滴消失,仅残留少许脂质,如 S9,S11,S12,S14,S15,S16,S17 和 S19,这些多为酯类、醚类、氯代烷类等弱极性溶剂提取后的细胞,溶剂可以穿透细胞壁和细胞膜将胞内脂质萃取出来。第三种,细胞与脂滴形态均正常,如 S7,S8,S18,S20

和 S21,这些多为烷烃、氟代烷等非极性溶剂提取后的细胞,非极性溶剂无法进入细胞,不会破坏胞内脂滴,也无法直接提取油脂。

将提油后的菌泥划线至 YEPD 平板上,细胞的生长情况如图 3 所示。从图 3 可以看出,使用 S7,S8,S18,S19,S20,S21 和 S24 提油后,细胞仍然存活,与图 2 中的结果可以相互印证。

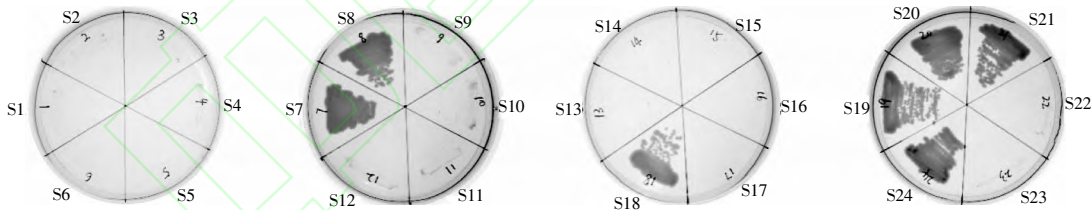


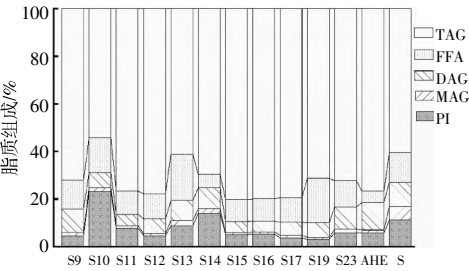
图 3 24 种溶剂提油后的细胞存活状况

Fig.3 Survival of cells after lipid extraction with 24 solvents

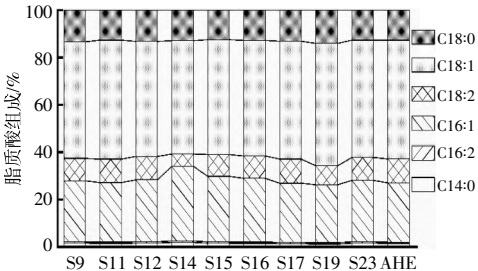
2.2 溶剂对油脂组成及脂肪酸组成的影响

由于不同溶剂对胞内各种脂质的溶解度不

同,因此,本文分析了各溶剂提出油脂的脂质组成和脂肪酸组成,结果见图 4。



(a)油脂的脂质组成



(b)油脂的脂肪酸组成

图 4 各溶剂获取油脂的脂质组成及脂肪酸组成

Fig.4 Lipid composition and fatty acid composition of lipids obtained by effective solvent extraction

从图 4(a)可以看出:S10,S13 和 S19 提取的油脂量少,脂质组成较为片面,与酸热法提出的脂质组成相比,差异过大;S14 的提取效果较好,但 TLC 板上出现了拖尾,可能影响数据分析;其余溶剂提出的油脂中,TAG 占总脂质的 70%~80%,DAG 占 5%~10%,MAG 占 1%~2%,FFA 占 9%~12%,PL 占 4%~6%,其中 FFA 的占比较酸热法高。综上可知,溶剂的性质会影响脂质提取的偏好性。

由于 S10 和 S13 提取的油脂太少,难以进行转酯化,因此,对其余样品进行转酯化并做 GC-MS 分析。由图 4(b)可知,除 S14 提取的油脂中 C18:2 含量偏低外,其余各溶剂提取的油脂的脂肪酸组成均与酸热法相当。上述数据表明,在脂质和脂肪酸组成方面,溶剂法提取的油脂与常规提取方法提取的油脂差异不大,且溶剂直接提取脂质无需干燥也无需破碎细胞壁,单纯的物理提取过程能较好的保留胞内产物,可以作为快速提取胞内脂质的手段,使检测胞内脂质类等产物更加高效。

2.3 溶剂多参数评价

选择提油溶剂时,首先要考虑溶剂的提油能力及其对环境的友好程度,然后是分离难度和价

格。另外,高效的提油溶剂往往具有相似的性质,可以从溶剂理化性质上判断该溶剂是否适合用来提取油脂。其中,溶剂 S1,S2,S3,S4,S6 和 S22 与水互溶,无法直接提取出脂质,不考虑使用。

表 1 列出了部分溶剂的性质。表 1 中,溶剂 S9,S11,S12,S14,S15,S16,S17 和 S23 的油脂提取效果较好,具备有效提取溶剂的特征,再根据溶剂分离难易程度、logP 和毒性,可排除溶剂 S11,S12,S14,S15,S16,S17 和 S23。就本实验而言,符合最多溶剂提取筛选条件的是 S9,即甲基叔丁基醚。甲基叔丁基醚是一种环境友好的溶剂,具有提油性能优良、便于蒸发分离和回收以及便宜易得的优点。据报道,甲基叔丁基醚常被用作动物细胞的脂质提取溶剂,含油萃取物经洗涤后可直接作为气相色谱样品分析使用^[19]。另外,S11 自身可被生物降解,也是一种绿色的选择,但缺点是油脂提取率较低、在水中的残留较高。一般而言,弱极性的酯类、醚类、酮类溶剂适合直接提取细胞内脂质,而烷烃类溶剂虽提不出胞内油脂但对细胞影响较小,适合无损提取胞外脂质^[20]。

表 1 溶剂性质一览表

Table 1 List of solvent properties

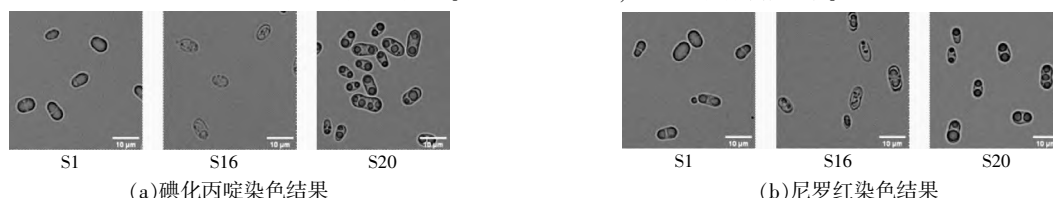
溶剂	S9	S11	S12	S14	S15	S16	S17	S19	S23	S24
油脂提取率/%	85	59	75	79	80	92	66	40	77	0
蒸气压 [*] /kPa	27	9.7	3.33	13.33(29.4℃)	57.3(25℃)	25.9(25℃)	11.94	10.40	2.13	2.34
logP	0.94	0.71	1.24	1.48	1.19	1.97	2.64	3.44	1.31	不存在
可用性 ^{**}	可用	可用	未知	不可用	不可用	不可用	不可用	可用	未知	可用

注: * 在未注明情况下,默认为 20℃下的实验结果; ** 溶剂选择指南^[21]描述溶剂可用性。

2.4 不同溶剂油脂提取机制分析

为确定提取机制,使用碘化丙啶对失去细胞膜完整性的细胞进行染色,使用尼罗红对细胞内脂滴进行染色,以观察溶剂对细胞的作用。图 5 为碘化丙啶和尼罗红对提油后细胞的染色结果。从

图 5 可以看出:S1 提油后,细胞膜和脂滴膜被破坏,脂滴融为一体,油脂未被提出;S16 提油后,细胞膜和脂滴膜也受到破坏,大部分细胞内脂滴消失,油脂被提出胞外;S20 提油后,细胞膜未受到破坏,且胞内脂滴完好。



(a) 碘化丙啶染色结果

(b) 尼罗红染色结果

图 5 碘化丙啶及尼罗红对提油后细胞的染色图

Fig.5 Staining of cells after lipid extraction with PI and Nile Red using solvents

根据前述内容,可将溶剂分为 3 类:

①可进入细胞但难以提出油脂的极性溶剂。这类溶剂有明显的极性官能团,易溶于水,可破坏

和溶解细胞膜、脂滴膜,但由于极性较大,与中性脂亲和力较低,难以提取出油脂,只有碳链较长的丙醇、丁醇、戊醇等提取出了部分自由脂肪酸。

②可进入细胞且能提出脂质的弱极性溶剂。这类溶剂虽然属于非极性溶剂,但由于分子结构不对称造成了弱极性,可以溶解极性脂、中性脂并带出胞外。

③无法进入细胞也不能提出脂质的非极性溶剂。这类溶剂无法穿透细胞膜,但因如此,细胞受到影响较小,在提油后,细胞仍可以存活。

上述3类溶剂的提取机制如图6所示。

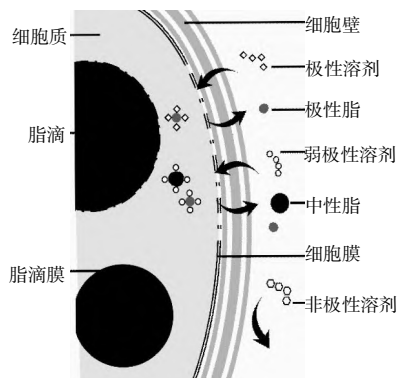


图6 3类溶剂的油脂提取途径

Fig.6 Lipid extraction routes from the three types of solvents

溶剂传质到胞内油脂的途径为溶剂相-细胞壁-细胞膜-细胞质基质-脂滴膜-油脂。对于极性溶剂来说,通过细胞壁、细胞膜、细胞质基质、脂滴膜比较轻松,阻力主要集中在对油脂的溶解上;对于弱极性溶剂来说,不论是细胞膜还是胞内油脂都能溶解,容易从胞内提出脂质,只是不同溶剂会表现出不同的溶解性能;对于非极性溶剂来说,细胞壁间隙的水分、极性的细胞膜、细胞质基质和脂滴膜均是传质的阻碍,导致非极性强的溶剂即使与油脂存在很好的相容性也无法提取胞内油脂。可见,从本质上讲,溶剂提取是对细胞膜的溶解和对油脂的溶解,这也印证了Folch法和Bligh-Dyer法的极性与非极性溶剂的配合使用可使提取效果最好。若使用单一溶剂提油,溶剂性质应介于极性与非极性之间。

胞内脂质含量可能是影响油脂提取率的重要因素,胞内脂滴小,脂滴与细胞壁间隙大,溶剂接触到胞内油脂的路径长、阻力大,提取效果就会较差;反之,胞内脂滴大,脂滴与细胞壁间隙小,且增大的脂滴对细胞壁有由内到外的压力,可见,高油脂含量更有利于提油。此外,本实验完全基于湿细胞提取,细胞周围的水可微溶弱极性溶剂,在提取中起到了重要作用^[10]。

3 结论

本文选用24种性质各异的溶剂提取圆红酵母发酵液中的胞内油脂,使用薄层色谱法及气相色谱-质谱法分析油脂的脂质组成和脂肪酸组成,使用碘化丙啶和尼罗红染色揭示溶剂提取胞内脂质的机理,得到以下结论。

①根据溶剂提油特点将溶剂分为可进入细胞的极性溶剂、可进入细胞且能提出脂质的弱极性溶剂以及无法进入细胞的非极性溶剂。提取胞内油脂的主要机制为溶剂对细胞膜等极性脂的破坏和对中性脂的溶解。另外,提油效果除了与溶剂类型和细胞类型有关外,还与胞内脂质含量、菌体理化状态关系密切。

②由于弱极性溶剂对极性脂和中性脂均能溶解,可作为直接提取脂质的溶剂,且得到油脂的脂质组成和脂肪酸组成均与酸热法得到的油脂相似,具有良好的相容性。使用油脂提取能力良好的弱极性溶剂提取油脂具有便于分离、纯化、回收,无需加热或添加其他试剂等优点。

③甲基叔丁基醚提油性能优良,油脂提取率可达85%,还有毒性小和易分离的优点,是理想的油脂提取溶剂。甲基叔丁基醚的含油萃取物经洗涤后可使用气相色谱直接分析。

参考文献:

- [1] 汪庆卓,宋萍,黄和.合成生物技术驱动天然的真核油脂细胞工厂开发[J].合成生物学,2021,2(6):920-941.
- [2] Ratledge C, Wynn J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms [J].Advances in Applied Microbiology, 2002,51:1-52.
- [3] Meng X, Yang J, Xu X, et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms [J].Renewable Energy, 2009,34(1):1-5.
- [4] Khot M, Raut G, Ghosh D, et al. Lipid recovery from oleaginous yeasts: Perspectives and challenges for industrial applications[J].Fuel, 2020, 259: 116292.
- [5] Jin G, Yang F, Hu C, et al. Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* [J].Bioresource Technology, 2012, 111: 378-382.
- [6] 李强,黄其田,赵宗保.碱热法辅助提取圆红冬孢酵母油脂[J].可再生能源,2020,38(11):1421-1426.
- [7] Selvakumar P, Sivashanmugam P. Ultrasound assisted

- oleaginous yeast lipid extraction and garbage lipase catalyzed transesterification for enhanced biodiesel production [J]. *Energy Conversion and Management*, 2019, 179: 141–151.
- [8] Jordi Folch M L, G H Sloanestanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497–509.
- [9] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8): 911–917.
- [10] 赵鑫. 微生物油脂发酵过程优化及提取工艺研究 [D]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2010.
- [11] Wen Z, Zhang S, Odoh C K, et al. *Rhodospiridium toruloides*—A potential red yeast chassis for lipids and beyond [J]. *FEMS Yeast Research*, 2020, 20(5): foaa038.
- [12] Wu S, Hu C, Jin G, et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides* [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(15): 6124–6129.
- [13] 李植峰, 张玲, 沈晓京, 等. 四种真菌油脂提取方法的比较研究 [J]. *微生物学通报*, 2001, 28(6): 72–75.
- [14] Chung T Y, Kuo C Y, Lin W J, et al. Indole-3-acetic-acid-induced phenotypic plasticity in *Desmodesmus alga* [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 10270.
- [15] 张琦. 圆红冬孢酵母脂滴区室化代谢调控甘油二酯合成 [D]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2019.
- [16] Jagers J, Wrobeln A, Ferenz K B. Perfluorocarbon-based oxygen carriers: From physics to physiology [J]. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 2021, 473(2): 139–150.
- [17] Chattopadhyay A, Maiti M K. Lipid production by oleaginous yeasts [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2021, 116: 1–98.
- [18] Halim R, Danquah M K, Webley P A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(3): 709–732.
- [19] Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia T V, et al. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics [J]. *Journal of Lipid Research*, 2008, 49(5): 1137–1146.
- [20] Jackson B A, Bahri P A, Moheimani N R. Repetitive non-destructive milking of hydrocarbons from *Botryococcus braunii* [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, 79: 1229–1240.
- [21] Catherine M A, John D H, Richard K H, et al. Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide [J]. *Green Chemistry*, 2016, 18: 3879–3890.

Lipid extraction from oleaginous yeast fermentation mash and solvent selection

Song Jingyi^{1,3}, Huang Qitian^{1,2}, Kamal Rasool^{1,2}, Zhao Zongbao^{1,2}

(1.Laboratory of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2.Dalian Key Laboratory of Energy Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 3.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To establish a simple and efficient method for lipid extraction, this paper explored the extraction performance of 24 solvents by directly treating the fermentation mash of *Rhodotorula toruloides* with the organic solvents. The results showed that weak-polar solvents such as methyl-tert-butyl ether (MTBE), chloroform and dichloroethane could directly extract lipids from the yeast cells, while polar solvents of short-chain alcohol and non-polar solvents of hydrocarbon were unable to do the extraction. Analysis of cells stained with Nile Red and propidium iodide showed that polar and weak-polar solvents disrupted the cell and lipid droplet membranes, facilitating the extraction of intracellular lipids. Relatively less toxic MTBE and ethyl acetate were used to treat the fermentation mash, and lipid extraction rates of 85% and 59% were achieved, respectively, and the lipid composition was similar to that of the acid-heating extraction.

Key words: microbial lipids; biorefinery; green solvent; wet cell lipid extraction; like dissolves like