

# 重金属离子对耶氏解脂酵母油脂积累量及柠檬酸分泌量的影响

张鲁宁<sup>1,2</sup>, 宋元达<sup>1</sup>, 张怀渊<sup>1,\*</sup>

(1. 山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东淄博 255000;

2. 上海科技管理干部学院, 上海 201800)

**摘要:**通过研究不同种重金属离子对生物量、细胞外柠檬酸含量、油脂含量及脂肪酸组成的影响,进一步探究不同浓度梯度下的金属离子对耶氏解脂酵母油脂积累量和柠檬酸分泌量的影响。结果表明,4种金属离子( $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ )均能抑制耶氏解脂酵母细胞的生长,且随着浓度的增加抑制作用更加明显;其中 $\text{Mn}^{2+}$ 能够促进细胞柠檬酸分泌和油脂积累,油脂积累量和柠檬酸分泌量分别在1.0和2.0 mmol/L  $\text{Mn}^{2+}$ 时达到最大值,分别为17.6% (w/w)和6.9 g/L;其他3种金属离子则抑制柠檬酸分泌和油脂合成; $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 影响脂肪酸组成, $\text{Co}^{2+}$ 和 $\text{Ni}^{2+}$ 促进了饱和脂肪酸含量增加,单不饱和脂肪酸的含量急剧下降,而 $\text{Cu}^{2+}$ 则促进脂肪酸不饱和度的增加,亚油酸的含量从7%提高到40%以上。本研究首次探究了金属离子对耶氏解脂酵母微生物油脂积累和柠檬酸分泌的影响,为产油微生物油脂发酵生产提供有力的依据。

**关键词:**耶氏解脂酵母,重金属离子,油脂含量,柠檬酸分泌

## Effect of Heavy Metal Ions on Microbial Oil Contents and Citric Acids Secretion in *Yarrowia lipolytica*

ZHANG Lu-ning<sup>1,2</sup>, SONG Yuan-da<sup>1</sup>, ZHANG Huai-yuan<sup>1,\*</sup>

(1. School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo 255000, China;

2. Shanghai Institute of Science and Technology Management, Shanghai 201800, China)

**Abstract:** The effects of different heavy metal ions on biomass, extracellular citric acid contents, oil contents and fatty acid composition were studied. And the influences of various heavy metal ions on lipid accumulation and citric acids secretion in *Yarrowia lipolytica* were also studied. The results showed that cell growth was inhibited by 4 heavy metal ions ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ ), and the inhibition efficiency increased with increasing concentration of those ions. Citric acid secretion and lipid accumulation also decreased in the presence of 4 heavy metal ions except  $\text{Mn}^{2+}$ . When  $\text{Mn}^{2+}$  concentration was 1.0 mmol/L, the lipids contents reached maximum value (17.6%, w/w). And maximum citric acid production achieved 6.9 g/L with the addition of 2.0 mmol/L  $\text{Mn}^{2+}$ . Furthermore, heavy metal ions also affected the lipid fatty acid composition.  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  increased the contents of saturated fatty acids and decreased monounsaturated fatty acid.  $\text{Cu}^{2+}$  promoted the increase of linoleic acid content (from 7% to 40%). This study could provide a basis for the production of microbial oil and citric acids by fermentation.

**Key words:** *Yarrowia lipolytica*; heavy metal ions; lipid accumulation; citric acids secretion

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)10-0089-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.10.015

引文格式: 张鲁宁, 宋元达, 张怀渊. 重金属离子对耶氏解脂酵母油脂积累量及柠檬酸分泌量的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 89-94, 100.

耶氏解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 是一种产油产酸酵母, 于 1942 年被首次分离得到<sup>[1]</sup>。在一定条件下, 耶氏解脂酵母能将碳水化合物、碳氢化合物和

普通油脂等碳源转化为微生物油脂 (microbial oil), 可用于合成生物柴油 (biodiesel), 缓解日益严重的环境问题和能源安全问题。经基因工程改造的耶氏解

收稿日期: 2019-07-23

作者简介: 张鲁宁 (1987-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: zln@sistm.edu.cn。

\* 通讯作者: 张怀渊 (1987-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: zhyuan004@126.com。

基金项目: 山东省自然科学基金博士基金 (ZR2018BC058); 山东省高等学校科技计划项目 (J17KA133); 上海高校青年科研骨干培养计划 (17CGB21)。

脂酵母也可生产功能性脂肪酸,如 $\alpha$ -亚麻酸<sup>[2]</sup>、二十碳五烯酸(EPA)<sup>[3]</sup>、共轭亚油酸(CLA)<sup>[4]</sup>等。此外,耶氏解脂酵母能够利用糖类、乙醇和醋酸等发酵产生并大量分泌柠檬酸(citric acids)<sup>[5]</sup>。柠檬酸在食品饮料与药品两大领域应用广泛,全球柠檬酸需求稳增,亚太地区尤其是中国柠檬酸市场增长率高。近年来耶氏解脂酵母已被考虑作为柠檬酸生产的潜在菌种而成为研究的热点<sup>[6-8]</sup>。

微生物油脂合成和柠檬酸分泌有着相近的代谢途径(图1)<sup>[9-11]</sup>。大量研究表明,耶氏解脂酵母油脂合成和柠檬酸积累之间的代谢转化与营养限制培养基(如氮、磷、镁)或培养条件(如生长情况、含氧量、pH或温度)有关<sup>[7]</sup>。在细胞内氮源缺乏时,腺苷一磷酸(AMP)浓度下降,TCA循环途径中的异柠檬酸脱氢酶活性受到抑制,导致上游的异柠檬酸和柠檬酸大量积累,线粒体内积累的大量柠檬酸经过线粒体膜上柠檬酸转运蛋白(mitochondrial citrate transporter, mCT)被转运到细胞质中,这个过程是油脂合成和柠檬酸分泌两者共有的。随后进入细胞质的柠檬酸有两条代谢路径,一条是柠檬酸被ATP柠檬酸裂解酶(ATP citrate lyase, ACL)裂解生成乙酰辅酶A用于脂肪酸合成。另一条是柠檬酸被细胞膜上柠檬酸转运蛋白(cytoplasmic citrate transporter, cCT)转运到细胞外。由此可见,柠檬酸是糖酵解与油脂合成的重要连接物,柠檬酸在整个油脂积累过程中占据着重要地位。

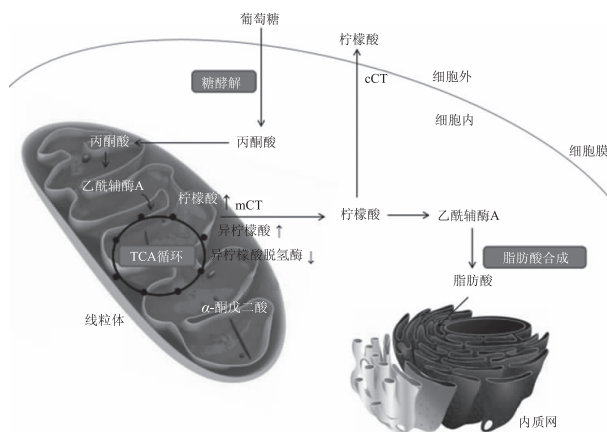


图1 酵母油脂合成和柠檬酸分泌的代谢途径<sup>[7,9-11]</sup>

Fig.1 Metabolism pathway of oil synthesis and organic acid secretion in yeast<sup>[7,9-11]</sup>

注:mCT:mitochondrial citrate transporter, 线粒体膜上柠檬酸转运蛋白;cCT:cytoplasmic citrate transporter, 细胞膜上柠檬酸转运蛋白。

重金属离子会影响微生物产油产酸。过量重金属离子 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Cd}^{2+}$ 能抑制*Aspergillus niger*的生长和柠檬酸分泌<sup>[12]</sup>。而 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 和 $\text{Zn}^{2+}$ 则能促进*Aspergillus niger*柠檬酸分泌<sup>[13-14]</sup>。为了探究重金属离子对耶氏解脂酵母产油产酸的影响,本研究选取了11种重金属离子,通过测定生物量、细胞外柠檬酸含量、油脂含量及脂肪酸组成等指标,从中筛选出对耶氏解脂酵母产油产酸影响相对显著的重金属离子,并进一步研究了不同浓度梯度下的此类重金属

离子对耶氏解脂酵母油脂含量和柠檬酸分泌的影响。为进一步探究产油微生物油脂积累和柠檬酸分泌两者代谢路径间的生化关系打下铺垫,为今后寻求微生物油脂及柠檬酸的工业生产提供理论帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

耶氏解脂酵母 *Yarrowia lipolytica* CICC1778 (ATCC 20460) 中国工业微生物菌种保藏中心;葡萄糖、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NiCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{HCl}$ 、硫酸铵、丙三醇、甲醇、三氯甲烷 均为分析纯,国药(集团)上海化学试剂公司;正己烷(色谱纯) 国药(集团)上海化学试剂公司;酵母提取物、胰蛋白胨 Oxoid 公司;无氨基酵母氮源(Yeast Nitrogen Base Without Amino acids, YNB) 生工工程(上海)股份有限公司;脂肪酸标准品、柠檬酸标准品 Sigma公司。

SW-CJ-1FD 型超净工作台 上海智诚仪器厂;MLS-3750 型灭菌锅 SANYO Electric Co., Ltd;ZHWY-2102 型回转式恒温摇床 上海智城分析仪器制造有限公司;EL204 型电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;PB3002-N 型分析电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;4K15 型高速冷冻离心机 上海博鑫仪器有限公司;DK-8D 型电热恒温水浴锅 上海森信实验仪器有限公司;Thermo707 型超低温冰箱 REVC0;QSC-12T 型氮吹仪 上海泉岛公司;GC 2010 型气相色谱仪 日本岛津制造所;Agilent 1100 高效液相色谱仪 美国 Agilent Technologies 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 培养基配制

1.2.1.1 种子培养基 葡萄糖 20 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L。分装成 50 mL/瓶, 115 °C 灭菌 20 min。

1.2.1.2 产脂产酸培养基 甘油 100 g/L, YNB 1.7 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g/L。分装成 50 mL/瓶, 115 °C 灭菌 20 min。

1.2.2 重金属离子溶液配制 根据金属离子氯化物的溶解度, 分别称取适量的  $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{CrCl}_3$  固体配制成 0.5 mol/L 的水溶液; 分别称取适量的  $\text{NiCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$  固体配制成 1.0 mol/L 的水溶液; 称取适量的  $\text{MgCl}_2$  固体配制成 0.3 mol/L 的水溶液, 115 °C 灭菌 20 min。分别称取适量  $\text{FeCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{AlCl}_3$  固体配制成 0.5 mol/L 的水溶液, 过滤灭菌。

1.2.3 菌种培养 从保菌管中取 100  $\mu\text{L}$  含有 30% (w/v) 甘油的菌液, 加入种子培养基, 在 28 °C 200 r/min 摇床中培养 24 h; 收集 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 于 5000 r/min 下离心 5 min, 弃上清, 超净台内取少量产脂产酸培养基吹吸菌体沉淀, 使其再次悬浮, 然后转移至产脂产酸培养基内, 在 28 °C 200 r/min 摇床中培养 80 h。

1.2.4 重金属离子类型对耶氏解脂酵母的影响 在产脂产酸培养基(50 mL)中, 分别加入终浓度为

2 mmol/L的 Zn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Cr<sup>3+</sup> 11种重金属离子,发酵培养80 h,以无重金属离子添加的空白组为对照组,测定生物量、柠檬酸含量、油脂含量及脂肪酸组成等指标,筛选出对耶氏解脂酵母油脂含量和柠檬酸分泌量有影响的重金属离子。

1.2.5 不同浓度梯度的重金属离子对耶氏解脂酵母的影响 将筛选出的 Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 4种重金属离子分别设置成不同的浓度梯度: Mn<sup>2+</sup>: 0(对照)、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L; Co<sup>2+</sup>: 0(对照)、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L; Cu<sup>2+</sup>和 Ni<sup>2+</sup>: 0(对照)、0.25、0.50、0.75和1.00 mmol/L。发酵培养80 h,测定生物量、柠檬酸含量、油脂含量及脂肪酸组成等指标,探究不同浓度梯度的重金属离子对耶氏解脂酵母的影响。

1.2.6 菌体收集及生物量测定 菌体收集及生物量测定参照林义等<sup>[15]</sup>方法。量取4 mL培养80 h后的菌液于5 mL离心管(事先烘干称重 m<sub>1</sub>, g)中,在4000 r/min下,离心3 min,弃上清,用4 mL去离子水洗涤沉淀,在4000 r/min下离心3 min,弃去上清,沉淀冷冻干燥后称重 m<sub>2</sub>(g)。

$$\text{生物量(g/L)} = (m_2 - m_1) \times 250 \quad \text{式(1)}$$

1.2.7 脂质提取及脂肪酸甲酯化 脂质提取及脂肪酸甲酯化参照 Papanikolaou 等<sup>[16]</sup>方法。量取2 mL培养80 h后的菌液于提脂瓶中,在4000 r/min下离心3 min,弃去上清,用4 mL去离子水洗涤沉淀,在4000 r/min下离心3 min,弃去上清,沉淀用于提取脂质。

1.2.7.1 脂质提取 加入2 mL 4 mol/L的HCl溶液,80℃水浴3 h。水浴结束后,冷却至室温,加入1 mL甲醇、2 mL氯仿和100 μL标样 C<sub>15:0</sub>,震荡30 min,在3000 r/min下离心3 min,下层液体移至新玻璃瓶,氮气吹干。

1.2.7.2 甲酯化 氮吹后加入1 mL 10%盐酸-甲醇溶液,60℃水浴3 h。水浴结束后加入1 mL饱和NaCl溶液、2 mL正己烷,在3000 r/min条件下离心3 min,取1 mL上层清液移入气相瓶。

1.2.8 脂肪酸含量测定 脂肪酸含量测定参照陈海元等<sup>[17]</sup>方法。使用气相色谱仪对样品进行检测,气相色谱柱为 DB-WAX column (30 m × 0.32 mm, 0.22 μm),氢离子火焰(FID)检测器,载气为氢气,流量为40 L/min,检测条件为:检测器温度为260℃,进样口温度为240℃,进样量为1 μL,分流比15.4:1,柱升温程序为120℃保持3 min,以5℃/min的速率升温至190℃,再以4℃/min的速率升温至220℃,保持2 min。使用内标法(C<sub>15:0</sub>)根据气相图中色谱峰的出峰时间和峰面积进行脂肪酸分析。

$$\text{油脂含量(\%)} = \text{油脂质量(W1, mg)} / \text{细胞干重(W2, mg)} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.2.9 柠檬酸含量测定 柠檬酸含量测定参照 Papanikolaou 等<sup>[16]</sup>方法。量取1.5 mL培养80 h后的菌液于离心管中,在12000 r/min下离心5 min,取1 mL上层清液移入液相瓶。使用高效液相色谱仪对样品进行检测,色谱柱为:Ecosil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为:甲醇/水/磷酸 = 5: 95: 0.05,流速

为0~8 mL/min,柱温为30℃,检测器为UV-210 nm,进样量为10 μL。以已知浓度的柠檬酸的标准样品作为参比,计算各样品的柠檬酸的浓度。

### 1.3 数据处理

每组实验3个重复,结果以平均值 ± 标准差(X ± SD)表示。试验数据采用SPSS统计软件(V16.0)进行统计分析,多组数据比较时,采用ANOVA进行Duncan's多重比较进行差异分析(P < 0.05)。

## 2 结果与分析

### 2.1 重金属离子类型对耶氏解脂酵母产脂产酸的影响

在重金属离子浓度为2 mmol/L的环境中,探索并鉴定了 Zn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Cr<sup>3+</sup> 11种重金属离子对耶氏解脂酵母油脂积累量和柠檬酸分泌量的影响(表1)。Cu<sup>2+</sup>和 Ni<sup>2+</sup>明显抑制其生物量,与对照组相比,生物量分别下降了86%和73%。Mn<sup>2+</sup>促进柠檬酸分泌,相比于对照组柠檬酸分泌量增加了83%; Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup>和 Fe<sup>3+</sup>则抑制柠檬酸分泌,与对照组相比,柠檬酸分泌量分别下降了95%、81%、80%和76%。Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>明显抑制其油脂积累,相比于对照组油脂含量分别下降了81%和65%。不同类型重金属离子影响耶氏解脂酵母脂肪酸组成见表2, Cu<sup>2+</sup>和 Ni<sup>2+</sup>使 C<sub>18:2</sub>的组成比明显增多, C<sub>18:0</sub>的组成比大幅减少; Co<sup>2+</sup>明显降低了 C<sub>18:1</sub>的组成比, Cr<sup>3+</sup>增加了 C<sub>18:1</sub>的组成比; Fe<sup>2+</sup>降低了 C<sub>18:0</sub>的组成比。

表1 重金属离子对耶氏解脂酵母的生物量、柠檬酸分泌量和油脂含量的影响

Table 1 Effect of heavy metal ions on biomass, citric acid secretion and lipid contents in *Yarrowia lipolytica*

重金属离子 (2.0 mmol/L)	生物量 (g/L)	柠檬酸 (g/L)	油脂含量 (%)
对照组	10.33 ± 0.46 <sup>a</sup>	3.72 ± 0.73 <sup>c</sup>	14.30 ± 0.68 <sup>a</sup>
Zn <sup>2+</sup>	9.05 ± 0.03 <sup>b</sup>	2.74 ± 0.45 <sup>d</sup>	11.10 ± 0.74 <sup>c</sup>
Ni <sup>2+</sup>	2.76 ± 0.27 <sup>f</sup>	0.72 ± 0.22 <sup>f</sup>	5.03 ± 0.16 <sup>e</sup>
Mg <sup>2+</sup>	9.17 ± 0.19 <sup>b</sup>	3.34 ± 0.39 <sup>c</sup>	14.44 ± 0.39 <sup>a</sup>
Mn <sup>2+</sup>	9.45 ± 0.34 <sup>b</sup>	6.80 ± 0.37 <sup>a</sup>	13.54 ± 0.98 <sup>b</sup>
Ca <sup>2+</sup>	10.43 ± 0.27 <sup>a</sup>	5.67 ± 0.41 <sup>b</sup>	13.14 ± 0.14 <sup>b</sup>
Co <sup>2+</sup>	6.95 ± 0.19 <sup>c</sup>	2.73 ± 0.32 <sup>d</sup>	10.58 ± 0.43 <sup>d</sup>
Cu <sup>2+</sup>	1.45 ± 0.09 <sup>g</sup>	0.20 ± 0.08 <sup>f</sup>	2.76 ± 0.54 <sup>b</sup>
Fe <sup>2+</sup>	7.95 ± 0.23 <sup>d</sup>	1.08 ± 0.23 <sup>e</sup>	9.68 ± 0.73 <sup>c</sup>
Fe <sup>3+</sup>	9.00 ± 0.22 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.16 <sup>f</sup>	9.92 ± 0.32 <sup>c</sup>
Al <sup>3+</sup>	9.65 ± 0.25 <sup>b</sup>	3.28 ± 0.34 <sup>c</sup>	9.75 ± 0.43 <sup>c</sup>
Cr <sup>3+</sup>	8.00 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.74 ± 0.24 <sup>f</sup>	7.83 ± 0.83 <sup>f</sup>

注:不同小写字母表示同列数据差异性显著(P < 0.05);表2~表6同。

综上所述, Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>对生长有明显的抑制作用,也严重影响了柠檬酸分泌量和油脂积累量;同时也促进了脂肪酸不饱和度的增加; Co<sup>2+</sup>增加了饱和脂肪酸的组成比; Mn<sup>2+</sup>对柠檬酸分泌有明显的促进作用。

表2 重金属离子对耶氏解脂酵母脂肪酸组成的影响  
Table 2 Effect of heavy metal ions on fatty acid profile in *Yarrowia lipolytica*

金属离子 (2.0 mmol/L)	脂肪酸组成(%)				
	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>
对照组	16.92 ± 0.65 <sup>c</sup>	6.00 ± 0.34 <sup>d</sup>	14.25 ± 0.51 <sup>b</sup>	55.34 ± 0.31 <sup>d</sup>	7.49 ± 0.40 <sup>i</sup>
Zn <sup>2+</sup>	11.44 ± 0.31 <sup>g</sup>	6.00 ± 0.14 <sup>d</sup>	9.26 ± 0.20 <sup>e</sup>	59.54 ± 0.18 <sup>b</sup>	13.76 ± 0.25 <sup>e</sup>
Ni <sup>2+</sup>	14.72 ± 0.22 <sup>e</sup>	6.76 ± 0.27 <sup>d</sup>	5.03 ± 0.16 <sup>b</sup>	41.59 ± 0.03 <sup>e</sup>	31.06 ± 0.04 <sup>b</sup>
Mg <sup>2+</sup>	15.74 ± 0.42 <sup>d</sup>	7.01 ± 0.21 <sup>c</sup>	9.78 ± 0.38 <sup>e</sup>	57.71 ± 0.69 <sup>c</sup>	8.76 ± 0.14 <sup>b</sup>
Mn <sup>2+</sup>	16.76 ± 0.69 <sup>c</sup>	6.11 ± 0.79 <sup>d</sup>	13.35 ± 0.49 <sup>c</sup>	55.68 ± 0.47 <sup>d</sup>	8.10 ± 0.31 <sup>b</sup>
Ca <sup>2+</sup>	16.82 ± 0.34 <sup>c</sup>	7.01 ± 0.13 <sup>c</sup>	12.65 ± 0.41 <sup>d</sup>	55.14 ± 0.55 <sup>d</sup>	8.38 ± 0.18 <sup>b</sup>
Co <sup>2+</sup>	18.41 ± 0.57 <sup>b</sup>	1.95 ± 0.34 <sup>e</sup>	32.57 ± 0.44 <sup>a</sup>	35.40 ± 0.69 <sup>f</sup>	11.68 ± 0.58 <sup>f</sup>
Cu <sup>2+</sup>	19.02 ± 0.12 <sup>a</sup>	11.37 ± 0.29 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.50 <sup>i</sup>	25.29 ± 0.21 <sup>g</sup>	41.76 ± 1.29 <sup>a</sup>
Fe <sup>2+</sup>	12.10 ± 0.28 <sup>f</sup>	7.32 ± 0.33 <sup>c</sup>	7.01 ± 0.31 <sup>g</sup>	59.55 ± 0.25 <sup>b</sup>	14.01 ± 0.89 <sup>d</sup>
Fe <sup>3+</sup>	11.26 ± 0.13 <sup>g</sup>	6.93 ± 0.23 <sup>d</sup>	9.09 ± 0.21 <sup>e</sup>	57.58 ± 0.38 <sup>c</sup>	15.15 ± 0.37 <sup>c</sup>
Al <sup>3+</sup>	14.96 ± 1.29 <sup>e</sup>	8.97 ± 0.99 <sup>b</sup>	9.40 ± 0.87 <sup>e</sup>	55.98 ± 2.41 <sup>d</sup>	10.68 ± 1.87 <sup>g</sup>
Cr <sup>3+</sup>	11.95 ± 1.03 <sup>g</sup>	6.92 ± 1.26 <sup>d</sup>	8.49 ± 1.17 <sup>f</sup>	62.58 ± 2.34 <sup>a</sup>	10.06 ± 1.49 <sup>g</sup>

## 2.2 不同浓度梯度的 Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 对耶氏解脂酵母产脂产酸的影响

2.2.1 Mn<sup>2+</sup> 对耶氏解脂酵母油脂积累量及柠檬酸分泌量的影响 如图2所示,不同浓度的 Mn<sup>2+</sup> 对耶氏解脂酵母生物量没有显著影响(各实验组生物量约 10 g/L);对油脂积累量有一定的促进作用,但未表现出明显的浓度梯度效应, Mn<sup>2+</sup> 在 1.0 和 2.5 mmol/L 时,油脂含量分别达到峰值(17.6% 和 17.2%); Mn<sup>2+</sup> 对柠檬酸分泌的促进作用与浓度梯度有一定的规律,随着 Mn<sup>2+</sup> 浓度升高,柠檬酸分泌量呈现先增加后减少趋势,在 2.0 mmol/L 左右,柠檬酸的分泌量达到最大值(6.9 g/L)。不同浓度的 Mn<sup>2+</sup> 对耶氏解脂酵母脂肪酸组成无明显影响,各浓度梯度之间的脂肪酸组成比无规律(表3)。

综上分析, Mn<sup>2+</sup> 对耶氏解脂酵母的生长情况及脂肪酸组成无明显影响,但适宜浓度下会促进油脂积累与柠檬酸分泌。

2.2.2 Co<sup>2+</sup> 对耶氏解脂酵母油脂积累量及柠檬酸分泌量的影响 如图3所示,相比于对照组, Co<sup>2+</sup> 的添加会抑制耶氏解脂酵母的生长,但与浓度梯度之间未呈现明显关系。低浓度 Co<sup>2+</sup> (0.5 mmol/L) 对油脂积累和柠檬酸分泌有一定的促进作用;随着 Co<sup>2+</sup> 浓度增加,油脂含量与浓度梯度之间无明显规律,但柠檬酸分泌量随浓度增加而减少,在 2.0 mmol/L 时柠檬酸分泌量相比于对照组抑制了 43%。表4中 Co<sup>2+</sup>

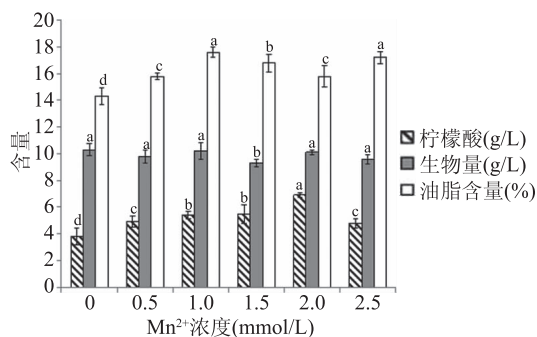


图2 不同浓度 Mn<sup>2+</sup> 对耶氏解脂酵母生物量、油脂含量及柠檬酸分泌的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of Mn<sup>2+</sup> on biomass, lipid contents and citric acid secretion in *Yarrowia lipolytica*

注:不同小写字母表示同一指标不同浓度之间差异显著,  $P < 0.05$ ; 图2~图5同。

明显增加了 C<sub>18:0</sub> 组成比,明显减少了 C<sub>16:1</sub>、C<sub>18:1</sub> 组成比,但与浓度梯度之间无规律。Co<sup>2+</sup> 是否通过抑制  $\Delta 9$ -脂肪酸去饱和酶阻碍  $\Delta 9$  位上双键的形成而降低 C<sub>16:1</sub>、C<sub>18:1</sub> 组成比有待研究。

综合分析, Co<sup>2+</sup> 抑制耶氏解脂酵母的生长,低浓度 Co<sup>2+</sup> (0.5 mmol/L) 对油脂积累及柠檬酸分泌有一定的促进作用,高浓度条件下 ( $\geq 1.0$  mmol/L) 对柠檬酸分泌有明显的抑制效果; Co<sup>2+</sup> 的添加促使饱和脂肪酸含量上升,单不饱和脂肪酸含量下降。

表3 不同浓度 Mn<sup>2+</sup> 对耶氏解脂酵母脂肪酸组成的影响

Table 3 Effect of different concentrations of Mn<sup>2+</sup> on fatty acid profile in *Yarrowia lipolytica*

Mn <sup>2+</sup> 浓度 (mmol/L)	脂肪酸组成(%)				
	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>
0	16.92 ± 0.65 <sup>b</sup>	6.00 ± 0.34 <sup>a</sup>	14.25 ± 0.51 <sup>b</sup>	55.34 ± 0.81 <sup>b</sup>	7.49 ± 0.40 <sup>c</sup>
0.5	16.16 ± 0.78 <sup>b</sup>	6.46 ± 0.57 <sup>a</sup>	12.32 ± 0.34 <sup>d</sup>	55.56 ± 0.61 <sup>b</sup>	9.49 ± 0.53 <sup>a</sup>
1.0	17.36 ± 0.39 <sup>a</sup>	5.44 ± 0.53 <sup>b</sup>	15.03 ± 0.68 <sup>a</sup>	54.15 ± 0.47 <sup>c</sup>	8.03 ± 0.65 <sup>b</sup>
1.5	16.29 ± 0.42 <sup>b</sup>	5.30 ± 0.68 <sup>b</sup>	13.83 ± 0.52 <sup>c</sup>	57.01 ± 0.52 <sup>a</sup>	7.58 ± 0.49 <sup>c</sup>
2.0	16.76 ± 0.69 <sup>b</sup>	6.11 ± 0.79 <sup>a</sup>	13.35 ± 0.49 <sup>c</sup>	55.68 ± 0.47 <sup>b</sup>	8.10 ± 0.31 <sup>b</sup>
2.5	17.35 ± 0.49 <sup>a</sup>	4.88 ± 0.13 <sup>c</sup>	15.68 ± 0.37 <sup>a</sup>	54.50 ± 0.85 <sup>c</sup>	7.58 ± 0.23 <sup>c</sup>

表4 不同浓度  $\text{Co}^{2+}$  对耶氏解脂酵母脂肪酸组成的影响

Table 4 Effect of different concentrations of  $\text{Co}^{2+}$  on fatty acid profile in *Yarrowia lipolytica*

$\text{Co}^{2+}$ 浓度 (mmol/L)	脂肪酸组成(%)				
	$\text{C}_{16:0}$	$\text{C}_{16:1}$	$\text{C}_{18:0}$	$\text{C}_{18:1}$	$\text{C}_{18:2}$
0	16.92 ± 0.85 <sup>c</sup>	6.00 ± 0.34 <sup>a</sup>	14.25 ± 0.51 <sup>d</sup>	55.34 ± 0.81 <sup>a</sup>	7.49 ± 0.40 <sup>d</sup>
0.5	20.42 ± 0.77 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.24 <sup>b</sup>	27.02 ± 0.79 <sup>c</sup>	38.14 ± 0.59 <sup>c</sup>	12.22 ± 0.51 <sup>b</sup>
1.0	20.10 ± 0.69 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.56 <sup>d</sup>	27.45 ± 0.23 <sup>c</sup>	39.22 ± 0.61 <sup>b</sup>	13.24 ± 0.59 <sup>a</sup>
1.5	18.24 ± 0.49 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.78 <sup>d</sup>	31.37 ± 0.43 <sup>b</sup>	38.04 ± 0.47 <sup>c</sup>	12.35 ± 0.62 <sup>b</sup>
2.0	18.41 ± 0.57 <sup>b</sup>	1.95 ± 0.34 <sup>c</sup>	32.57 ± 0.44 <sup>a</sup>	35.40 ± 0.69 <sup>d</sup>	11.68 ± 0.58 <sup>c</sup>

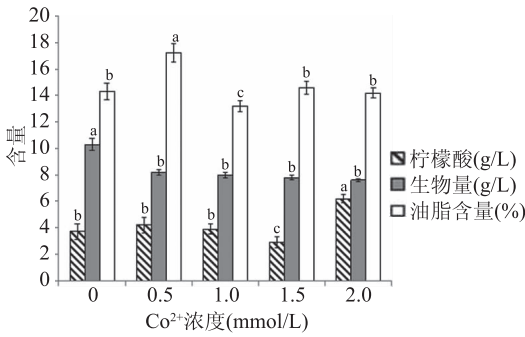


图3 不同浓度  $\text{Co}^{2+}$  对耶氏解脂酵母生物量、油脂含量及柠檬酸分泌的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of  $\text{Co}^{2+}$  on biomass, lipid contents and citric acid secretion in *Yarrowia lipolytica*

2.2.3  $\text{Cu}^{2+}$  对耶氏解脂酵母油脂积累量及柠檬酸分泌量的影响  $\text{Cu}^{2+}$  对生物量、柠檬酸和油脂含量均有不同程度的抑制,而高浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  ( $>1.0$  mmol/L) 能够完全抑制酵母细胞柠檬酸的分泌,而低浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\leq 0.5$  mmol/L) 对油脂含量和柠檬酸分泌无明显的抑制,但高浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  (1.0 mmol/L) 则表现出强烈的抑制作用,其油脂积累量相比于对照组下降了 94%,已基本抑制了耶氏解脂酵母的油脂积累;同时柠檬酸分泌也几乎被完全抑制(图4)。即在耶氏解脂酵母中,过量的  $\text{Cu}^{2+}$  既抑制了柠檬酸的分泌,也影响了油脂积累。研究表明,过量金属离子  $\text{Cu}^{2+}$  虽然抑制了 *Aspergillus niger* 的生长和柠檬酸分泌,但是细胞中脂质和多糖含量大大增加<sup>[12]</sup>。两者不同表现对应的机理有待解析。 $\text{Cu}^{2+}$  降低了  $\text{C}_{18:0}$  组成比,增加了  $\text{C}_{18:2}$  组成比。随着  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的增加,  $\text{C}_{18:0}$  组成比明显降低,  $\text{C}_{18:2}$  组成比大幅增加。同时,高浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\geq 0.75$  mmol/L) 也使得  $\text{C}_{18:1}$  组成比大幅减少。当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度达到 1.0 mmol/L,  $\text{C}_{18:2}$  组成比相比于对照组增加了近 4.6 倍(表5)。高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  是否可以促进

表5 不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  对耶氏解脂酵母脂肪酸组成的影响

Table 5 Effect of different concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  on fatty acid profile in *Yarrowia lipolytica*

$\text{Cu}^{2+}$ 浓度 (mmol/L)	脂肪酸组成(%)				
	$\text{C}_{16:0}$	$\text{C}_{16:1}$	$\text{C}_{18:0}$	$\text{C}_{18:1}$	$\text{C}_{18:2}$
0	16.92 ± 0.85 <sup>c</sup>	6.00 ± 0.34 <sup>d</sup>	14.25 ± 0.51 <sup>a</sup>	55.34 ± 0.81 <sup>c</sup>	7.49 ± 0.40 <sup>c</sup>
0.25	12.94 ± 0.47 <sup>d</sup>	8.07 ± 0.31 <sup>c</sup>	6.89 ± 0.35 <sup>b</sup>	60.50 ± 0.47 <sup>a</sup>	11.60 ± 0.53 <sup>d</sup>
0.50	10.94 ± 0.30 <sup>c</sup>	9.01 ± 0.69 <sup>b</sup>	5.36 ± 0.28 <sup>c</sup>	59.87 ± 0.59 <sup>b</sup>	14.81 ± 0.48 <sup>c</sup>
0.75	22.34 ± 0.79 <sup>a</sup>	8.80 ± 0.32 <sup>c</sup>	4.86 ± 0.47 <sup>d</sup>	30.18 ± 0.34 <sup>d</sup>	33.82 ± 0.14 <sup>b</sup>
1.00	20.38 ± 0.46 <sup>b</sup>	10.68 ± 0.45 <sup>a</sup>	3.81 ± 0.43 <sup>c</sup>	23.31 ± 0.46 <sup>c</sup>	41.81 ± 0.29 <sup>a</sup>

$\text{C}_{18:0}$ 、 $\text{C}_{18:1}$  向  $\text{C}_{18:2}$  的转化及其机制有待探究。

综合分析,  $\text{Cu}^{2+}$  对耶氏解脂酵母的生长情况具有明显抑制作用,低浓度条件下对油脂积累及柠檬酸分泌的影响不明显,高浓度对两者均表现出明显的抑制作用。

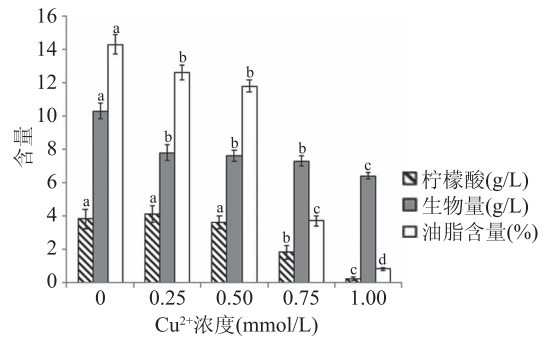


图4 不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  对耶氏解脂酵母生物量、油脂含量及柠檬酸分泌的影响

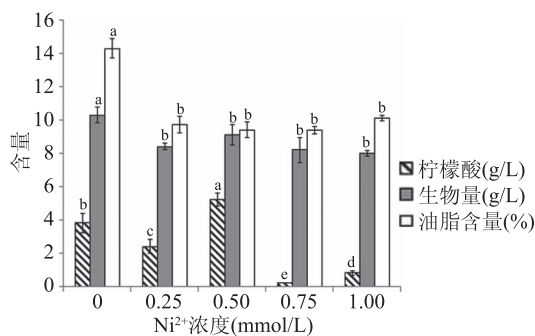
Fig.4 Effect of different concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  on biomass, lipid contents and citric acid secretion in *Yarrowia lipolytica*

2.2.4  $\text{Ni}^{2+}$  对耶氏解脂酵母油脂积累量及柠檬酸分泌量的影响 如图5,  $\text{Ni}^{2+}$  对耶氏解脂酵母生长的抑制作用不明显。油脂含量虽受到  $\text{Ni}^{2+}$  的抑制,但是与浓度无明显相关性。柠檬酸分泌量随着  $\text{Ni}^{2+}$  浓度增加表现出先上升后下降的趋势,在 0.5 mmol/L 时柠檬酸分泌量达到最大值(5.2 g/L),相比对照组增加了 37%。随着  $\text{Ni}^{2+}$  浓度升高,  $\text{C}_{16:0}$ 、 $\text{C}_{18:0}$  组成比明显降低,  $\text{C}_{18:1}$  组成比有所增加。当  $\text{Ni}^{2+}$  浓度为 1.0 mmol/L 时,相比对照组,  $\text{C}_{16:0}$  组成比下降了 42%,  $\text{C}_{18:1}$  组成比增加了 21%(表6)。

综合分析,  $\text{Ni}^{2+}$  对耶氏解脂酵母的生长和油脂积累量有一定的抑制作用,与浓度梯度无明显相关性;柠檬酸分泌量与浓度梯度有一定的相关性,随浓度增加表现为先增加后减少的趋势,在 0.5 mmol/L 柠

表6 不同浓度 Ni<sup>2+</sup> 对耶氏解脂酵母脂肪酸组成的影响Table 6 Effect on fatty acid profile in *Yarrowia lipolytica* under different concentrations of Ni<sup>2+</sup>

Ni <sup>2+</sup> 浓度 (mmol/L)	脂肪酸组成(%)				
	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>
0	16.92 ± 0.85 <sup>a</sup>	6.00 ± 0.34 <sup>b</sup>	14.25 ± 0.51 <sup>a</sup>	55.34 ± 0.81 <sup>c</sup>	7.49 ± 0.40 <sup>d</sup>
0.25	15.20 ± 0.59 <sup>b</sup>	6.23 ± 0.76 <sup>b</sup>	12.11 ± 1.22 <sup>b</sup>	58.24 ± 2.10 <sup>d</sup>	8.22 ± 0.86 <sup>c</sup>
0.50	13.55 ± 0.66 <sup>c</sup>	6.50 ± 0.83 <sup>b</sup>	10.03 ± 1.34 <sup>c</sup>	59.35 ± 2.22 <sup>c</sup>	10.57 ± 0.99 <sup>a</sup>
0.75	11.64 ± 0.49 <sup>d</sup>	7.41 ± 1.04 <sup>a</sup>	7.94 ± 0.94 <sup>d</sup>	64.55 ± 2.85 <sup>b</sup>	8.47 ± 1.28 <sup>c</sup>
1.00	9.86 ± 0.47 <sup>e</sup>	7.04 ± 1.00 <sup>a</sup>	6.57 ± 0.78 <sup>e</sup>	67.14 ± 1.90 <sup>a</sup>	9.39 ± 1.35 <sup>b</sup>

图5 不同浓度 Ni<sup>2+</sup> 对耶氏解脂酵母生物量产脂量及柠檬酸分泌的影响Fig.5 Effect on biomass, lipid contents and citric acid secretion in *Yarrowia lipolytica* under different concentrations of Ni<sup>2+</sup>

柠檬酸分泌量达到最大值(5.2 g/L)。

### 3 讨论与结论

产油产酸微生物是获取微生物油脂和柠檬酸等有机酸的重要来源,在食品药品中具有广泛应用价值<sup>[18-21]</sup>。认识和调控微生物油脂合成和柠檬酸分泌代谢途径,具有重要的理论与现实价值。柠檬酸是糖酵解与油脂合成的重要连接物。柠檬酸转运时会特异性的选择金属离子先形成柠檬酸盐络合物,后通过转运蛋白进行转运<sup>[9]</sup>。*Streptococcus* 突变菌株的柠檬酸转运系统依托 Fe<sup>3+</sup> 进行转运,柠檬酸先与 Fe<sup>3+</sup> 形成柠檬酸盐,后依托转运蛋白进行转运<sup>[22]</sup>; *E.faecalis* 转运柠檬酸则依托 Ca<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 和 Pb<sup>2+</sup><sup>[14]</sup>。耶氏解脂酵母柠檬酸转运蛋白特异性选择何种重金属离子优先络合有待验证。此外,过量金属离子 Cu<sup>2+</sup> 对 *Aspergillus niger* 和 *Yarrowia lipolytica* 生长、柠檬酸分泌量和油脂积累量影响的不同表现对应的机理有待解析。Co<sup>2+</sup> 是否通过抑制 Δ9-脂肪酸去饱和酶阻碍 Δ9 位上双键的形成而降低 C<sub>16:1</sub> 和 C<sub>18:1</sub> 组成比、高浓度 Cu<sup>2+</sup> 是否可以促进 C<sub>18:0</sub> 和 C<sub>18:1</sub> 向 C<sub>18:2</sub> 的转化及其机制等仍有待探究。

### 参考文献

- [1] Gálvez-López D, Chávez-Meléndez B, Vázquez-Ovando A, et al. The metabolism and genetic regulation of lipids in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2019, 50(1): 23-31.
- [2] Cordova L T, Alper H S. Production of α-linolenic acid in *Yarrowia lipolytica* using low-temperature fermentation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(20):

8809-8816.

- [3] Xue Z, Sharpe P L, Hong S P, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 734-740.
- [4] Imatoukene N, Verbeke J, Beopoulos A, et al. A metabolic engineering strategy for producing conjugated linoleic acids using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101: 4605-4616.
- [5] Mitrea L, Trif M, Cătoi A F, et al. Utilization of biodiesel derived-glycerol for 1,3-PD and citric acid production [J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16: 190.
- [6] Abril Ochoa-Estropier, Stéphane E, Guillouet D. stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 170: 35-41.
- [7] Timoumi, A, Guillouet S E, Molina-Jouve C, et al. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(9): 3831-3848.
- [8] Magdalena Rakicka, Zbigniew Lazar, Anita Rywińska, et al. Efficient utilization of inulin and glycerol as fermentation substrates in erythritol and citric acid production using *Yarrowia lipolytica* expressing inulinase [J]. Chemical Papers, 2016, 70(11): 1452-1459.
- [9] Sun J, Aluvila S, Kotaria R, et al. Mitochondrial and plasma membrane citrate transporters: Discovery of selective inhibitors and application to structure/function analysis [J]. Mol Cell Pharmacol, 2010, 2: 101-110.
- [10] Papanikolaou S, Beopoulos A, Koletti A, et al. Importance of the methyl-citrate cycle on glycerol metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168: 303-314.
- [11] Morgunov I G, Kamzolova S V, Lunina J N. The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 7387-7397.
- [12] Tsekova K, Dentshev D, Todorova D. Effect of cadmium and copper on the production of citric acid by *Aspergillus niger* [J]. Folia Microbiologica, 2000, 45(4): 331-334.
- [13] Netik A, Torres N V, Riol J M, et al. Uptake and export of citric acid by *Aspergillus niger* is reciprocally regulated by manganese ions [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -

(下转第 100 页)

enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese Natto: A typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. *Experientia*, 1987, 43(10):1110-1111.

[7] 李江伟, 冉国侠, 陈新梅. 豆豉溶栓酶的分离纯化及其体外溶栓作用[J]. *中国生化药物杂志*, 1999, 20(3):148-150.

[8] 朱新军. 冬枣贮藏保鲜的影响因素及保鲜技术研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2008(14):5864-5865.

[9] 李璐琦, 葛含静, 兰永丽, 等. 黑米红枣乳酸菌发酵饮料品质分析[J]. *西北农业学报*, 2018, 27(9):1387-1394.

[10] 雷昌贵, 陈锦屏, 卢大新. 红枣的营养成分及其保健功能[J]. *现代生物医学进展*, 2006, 6(3):56-57.

[11] Zhang H, Jiang L, Ye S, et al. Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) from China [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(6):1461-1465.

[12] Shen X C, Tang Y P, Yang R H, et al. The protective effect of *Zizyphus jujuba* fruit on carbon tetrachloride - induced hepatic injury in mice by anti-oxidative activities [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122(3):555-560.

[13] Amal Bakr Shori. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages [J]. *Food Bioscience*, 2016, 13(11):2709-2719.

[14] 徐长亮. 残次果蔬 L 型乳酸发酵饮料及其功能的初步研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012.

[15] 缪晓平, 邓开野. 红枣乳酸发酵饮料的研制[J]. *江西食品工业*, 2010(2):40-42.

[16] 高晗, 付素芳, 刘锐萍. 红枣发酵复合茶饮料的研制[J]. *饮料工业*, 2003(1):19-22.

[17] 赵瑞香, 孙俊良. 发酵乳制品[J]. *中国乳品工业*, 1999, 27(6):26-28.

[18] 夏泉鸣, 周洋, 赵黎明, 等. 离子交换法提取大枣中环磷酸腺苷(cAMP)的工艺研究[J]. *生物技术进展*, 2012, 2(4):288-292.

[19] 李湘利, 刘静. 乳酸菌发酵法生产金丝枣饮料的研究[J]. *食品工业*, 2007(2):54-55.

[20] 张丽华, 王小媛, 刘梦培, 等. 植物乳杆菌发酵红枣汁的

工艺条件优化及体外抗氧化活性[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(1):83-88.

[21] 王超, 林小晖, 杜冰. 乳酸菌发酵型饮料的研究现状与前景[J]. *饮料工业*, 2018, 21(1):68-70.

[22] Filannino P, Azzi L, Cavoski I, et al. Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) juice through lactic acid fermentation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 163(2-3):184-192.

[23] 张庆, 王凤, 黄卫宁, 等. 植物乳杆菌发酵对燕麦蛋白溶解度和营养特性的影响[J]. *食品科学*, 2011, 32(17):204-209.

[24] 安兴娟, 张瑶, 姬阿美, 等. 植物乳杆菌发酵枸杞胡萝卜汁工艺的优化[J]. *天津科技大学学报*, 2016, 31(3):20-24.

[25] Hütt P, Songisepp E, Rätsep M, et al. Impact of probiotic *Lactobacillus plantarum* TENSIA in different dairy products on anthropometric and blood biochemical indices of healthy adults [J]. *Beneficial Microbes*, 2015, 6(3):473-474.

[26] 杨芳媛, 赵智慧, 赵锦, 等. 枣中环磷酸腺苷的研究进展[J]. *塔里木大学学报*, 2016, 28(3):119-122.

[27] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.35-2016 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[28] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 12456-2008 食品中总酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[29] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.7-2016 食品中还原糖的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[30] 迟明梅, 刘秋华. 红枣山楂芦荟复合饮料的研制[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(9):202-207.

[31] 王宇. 基于复合发酵法的低糖红枣汁制备的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2015.

[32] 张明娟, 李薇, 庞晓明. 枣果中环磷酸腺苷(cAMP)的提取工艺及含量测定[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(5):228-231.

(上接第 94 页)

*Biomembranes*, 1997, 1326(2):287-294.

[14] Blancato V S, Magni C, Lolkema J S. Functional characterization and Mn<sup>2+</sup> ion specificity of a Ca<sup>2+</sup> - citrate transporter from *Enterococcus faecalis* [J]. *FEBS Journal*, 2006, 273(22):5121-5130.

[15] 林义, 钟添华, 骆祝华, 等. 尼罗红染色法筛选产油酵母及定量检测胞内油脂含量的研究[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(1):125-137.

[16] Papanikolaou S, Galiotou - Panayotou M, Chevalot I, et al. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica* [J]. *Current Microbiology*, 2006, 52(2):134-142.

[17] 陈海元, 王永健. 食用油中脂肪酸甲酯的气相色谱分析[J]. *食品安全*, 2012, 7:325.

[18] Armenta R E, Valentine M C. Single-cell oils as a source of

omega-3 fatty acids: An overview of recent advances [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2013, 90(2):167-182.

[19] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production [J]. *Biochimie*, 2004, 86(11):807.

[20] Tong Z, Zheng X, Tong Y, et al. Systems metabolic engineering for citric acid production by *Aspergillus niger* in the post-genomic era [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1):28.

[21] Ledesma - Amaro R, Lazar Z, Rakicka M, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to produce chemicals and fuels from xylose [J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38:115-124.

[22] Korithoski B, Krastel K, Cvitkovich D G. Transport and metabolism of citrate by *Streptococcus mutans* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(13):4451-4456.