

# 基于废物资源化的美极梅奇酵母产油研究现状及应用潜力分析

李倩<sup>1</sup>, 王丹阳<sup>1</sup>, 李安婕<sup>1</sup>, 顾继东<sup>2</sup>

1 北京师范大学 环境学院 水环境模拟国家重点实验室 水沙科学教育部重点实验室, 北京 100875

2 广东以色列理工学院 环境工程系, 广东 汕头 515063

李倩, 王丹阳, 李安婕, 等. 基于废物资源化的美极梅奇酵母产油研究现状及应用潜力分析. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2753-2764.

Li Q, Wang DY, Li AJ, et al. Microbial lipids production from wastes by *Metschnikowia pulcherrima*: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2753-2764.

**摘要:** 清洁可再生能源生物柴油的开发利用是对当今能源短缺环境下化石燃料替代物的有益探索。微生物油脂作为一种可能实现生物柴油廉价、高效生产的原料引起了广泛的关注,但由于封闭式培养模式操作复杂、成本高制约了其大规模应用。美极梅奇酵母 *Metschnikowia pulcherrima* 是一种新型产油酵母,具有适应性强、底物利用范围广、可在开放体系培养等特点,很有潜力代替传统产油微生物,实现基于生物柴油的废水及固废资源化工程应用。文中对美极梅奇酵母相关研究开展了全面调研,在分析其产油研究及应用现状的基础上,总结了美极梅奇酵母在油脂生产方面所具有的独特优势和关键影响因素,突出强调了其在开放体系培养及利用有机废弃物生产微生物油脂的可行性。此外,文中还指出了美极梅奇酵母在油脂产量、产油机理等方面存在的问题与不足,为实现生物柴油高效生产提供了新的方向和思路,有利于进一步促进其工业化应用。

**关键词:** 美极梅奇酵母, 开放体系, 微生物油脂, 生物柴油, 废物资源化

## Microbial lipids production from wastes by *Metschnikowia pulcherrima*: a review

Qian Li<sup>1</sup>, Danyang Wang<sup>1</sup>, Anjie Li<sup>1</sup>, and Jidong Gu<sup>2</sup>

1 Key Laboratory of Water and Sediment Sciences of Ministry of Education, State Key Laboratory of Water Environment Simulation, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

2 Environmental Engineering, Guangdong Technion Israel Institute of Technology, Shantou 515063, Guangdong, China

**Abstract:** Biodiesel is an alternative fuel to addressing the energy shortage problem. Microbial lipids have attracted

**Received:** September 18, 2020; **Accepted:** January 14, 2021

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 51478042, 51778056).

**Corresponding author:** Anjie Li. Tel: +86-10-58806375; E-mail: liaj@bnu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 51478042, 51778056) 资助。

网络出版时间: 2021-01-25

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210125.0859.001.html>

widespread attention as one of the potential feed-stocks for cost-effective and efficient biodiesel production. However, the large-scale production of microbial lipids is hampered by the complexity and the high cost of aseptic culturing approach. *Metschnikowia pulcherrima* is an oleaginous yeast with strong environmental adaptability. It is capable of utilizing a wide spectrum of substrates, and can be cultured under non-sterile conditions. Therefore, this yeast has great potential to replace the traditional oleaginous microorganisms, particularly in the area of recycling wastewater and solid waste for the production of biodiesel. Based on the analysis of lipid production and application conditions of *M. pulcherrima*, this review summarized the unique advantages of *M. pulcherrima* and the key factors affecting lipids production. We further discussed the feasibility of cultivating *M. pulcherrima* on various organic wastes under non-sterile conditions for lipids production. Moreover, we analyzed the challenges associated with *M. pulcherrima*'s in the yield and mechanism for lipids production, and proposed perspectives for how to achieve efficient biodiesel production using this yeast.

**Keywords:** *Metschnikowia pulcherrima*, non-sterile conditions, microbial lipids, biodiesel, waste recycling

能源和环境是制约人类社会长远发展的两个重要难题。随着城市化、工业化进程的不断推进,世界能源需求量越来越高,传统能源危机日趋凸显,造成的环境污染问题亦层出不穷,因此寻找清洁可再生替换能源已迫在眉睫。生物柴油作为一种可再生、环境友好型的生物质能源,由于具有燃烧性能好、安全性高、绿色环保等优势而成为了传统化石燃料的有效替代物,越来越受到各方的重视<sup>[1-2]</sup>。目前国内外用于制备生物柴油的原料主要为动、植物油脂,包括大豆油、菜籽油、猪油、牛油等,不仅成本较高,且易造成“与人争粮,与粮争地”的局面,因此不适合大规模发展应用<sup>[3]</sup>。微生物油脂是指由微生物在一定条件下产生并储存在体内的甘油酯,具有与植物油相似的脂肪酸组成,因而可同样用于生产生物柴油<sup>[4]</sup>。与动、植物油脂相比,微生物油脂的生产可不受气候、地区等因素的限制,周期短,占地面积小,可利用大量有机废弃物和废水,因此具有广阔的开发应用前景,可在缓解世界能源短缺与环境污染现状的同时,实现废物处理与资源回收的双重目标<sup>[5-6]</sup>。

微生物油脂的生产主要依赖于产油微生物,即油脂含量能够超过自身干重 20%的物种,包括细菌、霉菌、酵母、藻类等<sup>[7]</sup>。其中酵母菌由于具有产脂量高、底物利用范围广、易于规模化等

优势而被广泛研究运用于微生物油脂的生产<sup>[7-8]</sup>。然而传统产油酵母较为脆弱敏感,对于不利环境条件如抑制剂等物质的耐受性差,且易受外来菌种的侵染<sup>[9]</sup>。因此,在发酵培养过程中,需要对原材料进行严格的灭菌预处理并保证系统的密闭性以防侵染,致使微生物油脂的生产成本和操作复杂度大幅提升,限制了其实际应用<sup>[10]</sup>。

美极梅奇酵母 *Metschnikowia pulcherrima* 是一种有性生殖酵母,隶属于囊菌属,显微镜下呈均匀球形或椭球形外观,在自然界中分布广泛,常见于水果、花朵、花蜜和树液等<sup>[11-12]</sup>。美极梅奇酵母具有很强的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性和蛋白水解酶活性,可在强酸性 (pH 3.0-4.0) 和高糖浓度 (>100 g/L) 下生存,因此能够利用葡萄糖、蔗糖、果糖等多种碳源,且非常适合作为酿酒酵母的共发酵剂,用于提高葡萄酒的芳香程度<sup>[11,13]</sup>。此外,美极梅奇酵母培养不需要铁和除生物素外的其他维生素,具有独特的抑菌性能,能够有效抵抗外来物种的竞争,因而常用于生物防控领域,尤其是水果采摘后病害的防治<sup>[14-16]</sup>。微生物油脂的生产是美极梅奇酵母研究过程中的重要新发现。目前虽在产油条件的优化、基质的选择、油脂代谢调控机理等方面研究尚浅,但由于具有传统产油微生物所不可比拟的优势,有望克服油脂生产成本高、培养条件苛刻等弊端而具有极大的发展应

用潜力<sup>[17-18]</sup>。本文通过对美极梅奇酵母相关研究开展全面调研,在探究其研究应用现状和热点的基础上,着重分析了美极梅奇酵母油脂生产的特性和优势、主要影响因素以及存在的问题与不足,并对其在油脂生产方面的发展方向和前景进行了展望,以期实现对其全面客观的认识,促进其进一步开发利用。

## 1 美极梅奇酵母研究现状

本文采用计量和分析科学文献数据的信息可视化软件 CiteSpace (引文空间)对美极梅奇酵母研究进行现状及热点剖析发现,关于美极梅奇酵母的研究开始于 1995 年,历时较短,总体文献数量较少(共计 329 篇),目前正处于起步发展阶段。通过关键词聚类分析发现,美极梅奇酵母现有研究可归纳为 5 类,包括“1. 生物防控 (Biological control)”、“2. 脱水 (Dehydration)”、“3. 自然发酵 (Spontaneous fermentation)”、“4. 桑娇维赛葡萄酒 (Sangiovese wine)”以及“5. 产油酵母 (Oleaginous yeast)”。研究表明,美极梅奇酵母具有很强的抑制耐受性、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和蛋白水解酶活性,有利于体系氨基酸的释放和芳香化合物的生产,从而非常适合作为酿酒酵母的共发酵剂,用于提高葡萄酒的芳香程度<sup>[11,19]</sup>。此外,美极梅奇酵母还对苹果采后病害表现出较强的拮抗作用,包括灰霉病、黑斑病等,因而被认为是一种

潜在的生物防治微生物,可用于防治鲜切苹果的食源性病原体和葡萄真菌病害<sup>[13,18]</sup>。

微生物油脂生产是美极梅奇酵母研究过程中的全新发现,2014 年 Santamauro 等<sup>[14]</sup>首次以甘油为碳源,在探究美极梅奇酵母最适生长温度、初始 pH、培养时间等的基础上,实现其油脂含量高达 40% 以上,证明了其油脂积累的可能性。此后关于美极梅奇酵母油脂生产的研究才逐渐受到关注,目前主要集中于底物的选择和培养条件优化两个方面。研究表明,美极梅奇酵母能够利用酿酒废水、藻类水解液等多种有机废物,具有与圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides*、弯曲隐球菌 *Cryptococcus curvatus* 等传统产油酵母相当的生长能力,当以葡萄糖为碳源时,可实现最高生物质产量 115.5 g/L,具体数值如表 1 所示<sup>[20]</sup>。美极梅奇酵母油脂产量受底物种类、浓度、温度、pH、营养物质等多个因素的影响,研究表明,在低温、低 pH、氮限制等条件下,其所能实现的最大油脂含量约 30%–45%,其中以棕榈油酸 (C16:1)、棕榈酸 (C16:0)、亚油酸 (C18:2)、油酸 (C18:1)和硬脂酸 (C18:0)为主,与大豆油、菜籽油、麻风树油等的组分类似,因而可同样适用于生物柴油的生产<sup>[9,12,14,21]</sup>。此外,美极梅奇酵母由于具有独特的生物控制作用模式而能够在开放体系培养,有利于简化传统微生物油脂生产过程、降低油脂成本,显示出极大的研究发展潜力和应用前景。

表 1 不同种产油酵母的最高生物质和油脂产量对比

Table 1 Comparison of the maximum biomass and lipid yield among different oleaginous yeasts

Yeasts	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Lipid yield (g/g)	Lipid productivity g/(L·h)	References
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	115.5	43.9	0.16	0.16	[20]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	185.0	40.0	N.D.	0.88	[22]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	148.0	66.8	0.27	1.20	[23]
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	106.5	67.5	0.23	0.54	[24]
<i>Cryptococcus curvatus</i>	104.1	82.7	0.25	0.47	[25]

All of the carbon sources were glucose; N.D.: not detected.

## 2 美极梅奇酵母油脂生产的特性及优势

### 2.1 安全且耐受性强

美极梅奇酵母隶属梅奇酵母属 (*Metschnikowia*), 自然栖息于完全成熟的果实中, 更常见于受损浆果, 尤其是葡萄中, 是其在收获及发酵酿酒早期均存在的一种酵母, 对于增强葡萄酒的风味、提高其品质具有重要作用<sup>[11,13]</sup>。美极梅奇酵母不具有致病性, 是一种非致病微生物。同时, 由于酿酒环境的极端和复杂性, 使得美极梅奇酵母具有很强的耐酸和耐渗透压能力<sup>[11]</sup>。此外, 有研究表明, 美极梅奇酵母对于常见的生长抑制剂如呋喃基类物质 (糖醛、5-羟甲基糖醛 (HMF)) 及有机酸 (甲酸、乙酸) 等均具有很高的耐受性, 具体耐受浓度限值如表 2 所示。Sitepu 等<sup>[26]</sup>探究了

45 种产油酵母分别在不同浓度的糖醛、5-羟甲基糖醛及乙酸中的生长状况。结果显示, 不同种产油酵母的耐受抑制性差异很大, 在最高被测浓度 1.0 g/L、2.0 g/L 及 2.5 g/L 条件下, 只有包括美极梅奇酵母在内的 5 种酵母可以保持良好生长。Fan 等<sup>[27]</sup>同样探究了美极梅奇酵母对不同种抑制剂的耐受能力。结果发现, 美极梅奇酵母对糖醛、5-羟甲基糖醛及有机酸 (甲酸、乙酸、乙酰丙酸) 等的耐受浓度值均达 0.01 mol/L 以上, 高于解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica*、粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* 和 *R. toruloides* 等大多数的产油酵母。由此可见, 美极梅奇酵母生命力顽强, 能够适应多种不利环境条件, 非常适合作为工业微生物。

表 2 不同种产油酵母的抑制耐受性差异对比

Table 2 Comparison of tolerance to different inhibitory factors among different oleaginous yeasts

Yeasts	Suitable pH for growth	Acetic acid (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	References
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	3.0–10.0	15 <sup>a</sup>	2.00	1.00	[26,28]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	3.0–8.0	26 <sup>b</sup>	0.80	0.50	[29-32]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	4.0–10.0	30 <sup>c</sup>	0.05	1.00	[33-34]
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	3.0–8.0	40 <sup>c</sup>	1.85	0.50	[31,35]
<i>Cryptococcus curvatus</i>	4.0–10.0	30 <sup>c</sup>	1.00	3.00	[7,36-37]

<sup>a,b,c</sup> Maximum tolerance concentration to acetic acid when the pH is set at 5.0, 7.0 and 6.0, respectively.

### 2.2 具有独特的抗菌性能

除了高耐受性, 美极梅奇酵母还被证明具有极强的抗菌活性, 这主要是源于其独特的生物控制作用模式。在一定条件下, 美极梅奇酵母以 cyclodileucine (cyclo(Leu-Leu)) 为前体, 通过非酶促反应氧化形成 pulcherriminic acid, 这是一种可溶、可扩散性中间体, 一旦与铁相遇便会螯合形成红色不溶性复合物 pulcherrimin, 描述为 2,5-diisobutyl-3,6-dihydroxy-pyrazine-1,4-dioxide, 从而消耗底物中的铁元素, 抑制其他病原微生物的生长<sup>[15,38]</sup>。因此, 美极梅奇酵母的拮抗作用主要是基于铁的耗竭, 而铁是病原菌生长所必需和诱导致病的前提条件<sup>[39]</sup>。此外, 美极梅奇酵母还能分

泌细胞外裂解酶, 如几丁质酶和葡萄糖苷酶等, 这些都有助于提高其整体的抗菌活性<sup>[18]</sup>。目前已知可受美极梅奇酵母拮抗作用影响的物种有: 酵母菌包括星形假丝酵母 *Candida stellata*、葡萄汁酵母 *Saccharomyces uvarum*、酒香酵母 *Brettanomyces*、德克酵母 *Dekkera*、汉森氏酵母 *Hanseniaspora*; 其他真菌包括灰霉菌 *Botrytis cinerea*、青霉菌 *Penicillium*、链格孢属 *Alternaria* 及念珠菌属 *Monilia spp.*等<sup>[11,40]</sup>。

对于传统的产油微生物, 如 *R. toruloides*<sup>[41]</sup>、*C. curvatus*<sup>[42]</sup>、*Y. lipolytica*<sup>[43]</sup>等, 虽具有较高的脂质富集能力, 但同时其生长对环境较为敏感, 易污染, 培养过程中严格的密闭条件限制了其实

际应用。美极梅奇酵母由于具有独特的抗菌性能而非常适合在开放体系培养。Santamauro 等<sup>[14]</sup>的研究结果证明了这一结论。在 500 L 的开放式搅拌槽反应器中,美极梅奇酵母以甘油为碳源实现了优势生长,且生物量随培养时间的增加而稳定增加,直至 2.06 g/L。因此,美极梅奇酵母培养过程无需严格的灭菌和无菌条件,大大降低了油脂生产成本及风险,有效促进微生物油脂的发展与应用。

### 2.3 底物利用范围广

底物利用范围广是实现产油微生物工业应用的重要基础。已有研究表明,美极梅奇酵母利用常规碳源葡萄糖<sup>[21]</sup>、甘油<sup>[14]</sup>等的效果良好,在适宜条件下,可实现油脂产量达自身干重的 40% 以上,这是目前美极梅奇酵母油脂生产研究中所能达到的最高含脂量水平。此外,美极梅奇酵母由于耐受性强而适于在多种复杂底物中培养。如 Tamilalagan 等<sup>[12]</sup>利用蒸馏厂废水和木质纤维素水解液联合培养美极梅奇酵母,在 6 L 的混合废水中实现生物质产量 34 g/L 及脂质含量 37.2%,并在甲酯化后成功运用于实验室规模柴油机。Abeln 等<sup>[44]</sup>探究了美极梅奇酵母对 12 种不同海藻水解液的利用情况,结果显示,当以褐藻水解物为碳源时,美极梅奇酵母可实现最高生物质产率 0.14 g/g,脂质含量达 30% 以上,同时伴随有较高浓度 2-苯乙醇 (2-PE) 的产生。Longanesi 等<sup>[19]</sup>以木屑的微波水解液为碳源,探究美极梅奇酵母生长利用情况。结果发现,木屑最高水解效率为 85%,主要水解产物为 C5-C6 的单糖和二糖,在 25 °C 摇瓶培养条件下,美极梅奇酵母可实现最高生物质和脂质产量分别为 8 g/L 和 42%。由此可见,除甘油外,美极梅奇酵母还能够代谢多种以 C5-C6 单糖、低聚糖为主的糖类物质,包括葡萄糖、半乳糖、山梨糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、海藻糖、木糖等<sup>[45]</sup>,底物利用范围广阔。因此,利用美极梅奇酵母生产微生物油脂可有效促进各类有机废物如工业有机废水、藻类、木屑等

的开发利用,有望实现废物处理与资源回收的双重目标。

## 3 影响美极梅奇酵母油脂生产的因素

### 3.1 温度

温度是影响产油微生物培养最重要的环境因素之一,在最终发酵所得油脂产量和组成中起关键作用。产油酵母油脂合成的最适温度一般为 25–30 °C,在低于 20 °C 或高于 35 °C 时,脂合成酶活性降低,代谢活动减弱,从而导致油脂产量明显下降<sup>[46]</sup>。温度对油脂组分的影响源于细胞对外界温度的变化所产生的一系列适应性反应。通常情况下,不饱和脂肪酸的熔点低于饱和脂肪酸,短链脂肪酸的熔点低于长链脂肪酸<sup>[47]</sup>。因此,降低温度,产油酵母会趋向于合成更多的不饱和脂肪酸,如棕榈油酸和油酸等,以维持细胞膜的正常流动性;而当温度升高时,油脂平均链长增长,有利于细胞膜的正常流动及通透性的增强<sup>[47-48]</sup>。

美极梅奇酵母生长和油脂富集能力亦受温度影响明显,但不同的是,其更适合于在较低温度下培养。如 Santamauro 等<sup>[14]</sup>以 10% (W/V) 的甘油为碳源,探究了美极梅奇酵母分别在 15 °C、20 °C 和 25 °C 下的生长和脂质积累情况。结果表明,温度对美极梅奇酵母油脂产量的影响显著,15 °C 下可实现最高的脂质含量约 26%。Abeln 等<sup>[21]</sup>以 80 g/L 的葡萄糖为碳源,同样探究了美极梅奇酵母在 15–30 °C 下的生长状况。结果显示,低温更有助于美极梅奇酵母生物质和脂质的生产,15 °C 下具有最高的生物质和脂质产量,分别为 34.6 g/L 和 13.2 g/L。由于其在低温条件下积累油脂的特点,目前针对美极梅奇酵母的研究常采用两阶段培养模式。如 Tamilalagan 等<sup>[12]</sup>以蒸馏废水和木质纤维素水解液联合培养美极梅奇酵母,第一阶段为促进其生长,设置培养温度为 25 °C,3 d 后,调节温度至 15 °C 以下,以使剩余碳源更多地流向脂质积累方向。结果显示,在此条件下,美极梅奇酵母可实现较高的脂质产量,达 35% 以上。因此,

控制培养温度是提高美极梅奇酵母脂质产量的有效方式之一,尤其适用于北方较低温的环境条件。

### 3.2 pH 值

微生物的物质代谢、生命活动与 pH 值密切相关,主要表现为影响微生物合成油脂过程中关键酶的活性和微生物细胞膜的结构。当体系 pH 值发生变化时,发酵液中离子浓度及形态亦会随之变化,从而影响细胞对其吸收利用效率,阻碍膜间信号传导,降低微生物的代谢功能活性。不同种类微生物的最适产油 pH 值不同,酵母为 3.6–6.0,微藻为 6.0–9.0,霉菌为中性至微碱性<sup>[48-49]</sup>。因此,在微生物培养过程中,通过调节体系 pH 值于适宜范围内,可有效提高其脂质产量。

美极梅奇酵母由于参与葡萄酒发酵过程而具有较强的酸碱耐受性。根据 Spadaro 等<sup>[28]</sup>的研究结果,美极梅奇酵母可生长的 pH 范围为 3.0–10.0,其中当 pH 值为 5.5–6.0 时,其生物质的产量最高。郭东起等<sup>[50]</sup>将美极梅奇酵母接种于初始 pH 值分别为 4.5、5.0、5.5 和 6.0 的 YPD (酵母膏 1%,蛋白胨 2%,葡萄糖 2%) 培养基中,22 h 后发现,当初始 pH 为 5.0 时,美极梅奇酵母的生长最好,生物质产量最高,而当初始 pH 为 6.0 时,其生长最差。Abeln 等<sup>[21]</sup>亦探究了初始 pH 值对美极梅奇酵母生物质和脂质产量的影响,结果显示,当初始 pH 值在 4.0–5.0 范围内时,美极梅奇酵母生物量和脂质产量均保持恒定,未发生明显变化。因此,弱酸性条件更有利于美极梅奇酵母的生长和脂质积累,对于实现其大规模开发应用具有重要积极作用。

### 3.3 营养物质的含量

氮源是微生物生长和代谢过程中必不可少的营养物质,主要用于合成蛋白质、酶和核酸等生物繁殖和代谢所必需的大分子。研究表明,当氮源充足时,促进细胞的生长,而当氮源缺乏时,则会导致代谢向脂肪酸合成途径进行<sup>[48]</sup>。因此,引入碳/氮 (C/N) 比的概念,适宜范围内,C/N 越高,油脂含量越高。磷 (P)、硫 (S) 等元素含量对微生物油脂生产的影响与氮源类似,即较高的

C/P 或 C/S 更有利于细胞脂质的积累<sup>[51-52]</sup>。目前,氮、磷、硫等营养元素的限制已成为提高细胞油脂含量最为有效和成熟的方式方法,尤其是氮限制,在微生物油脂生产研究中应用广泛。此外,金属离子的含量,如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  等,也可能影响微生物油脂的生产,研究发现其不仅能够参与细胞膜的合成,还可以改变产油微生物的渗透压和关键酶活性,进而影响微生物油脂的积累<sup>[48,53]</sup>。

美极梅奇酵母作为微生物油脂生产领域的新发现,目前关于营养物质含量的影响研究相对有限。Santamauro 等<sup>[14]</sup>以 10% (W/V) 的甘油为碳源,探究了  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  及硫元素的含量对美极梅奇酵母生长的影响。结果显示,美极梅奇酵母生物质产量受上述 4 种元素含量的影响较小,即使当 3 种金属离子都不添加时,其生物质产率也仅降低了 15%。Abeln 等<sup>[21]</sup>以 80 g/L 的葡萄糖为底物,采用 2 L 的搅拌槽反应器 (Stirred tank reactors, STRs),探究了氨氮浓度对美极梅奇酵母脂质生产的影响。结果发现,随着氨氮浓度的增加,美极梅奇酵母油脂产量逐渐降低,当氨氮浓度为 1.0 g/L (C/N=60.1) 时,得到最高脂含量 (43.8±1.7)%。上述研究结果表明,氮限制对于美极梅奇酵母油脂产量的提高同样有效,且  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  及硫元素等的含量对其生长的影响较小。然而这些金属离子对于美极梅奇酵母脂质生产的影响尚不明确,且缺乏针对磷、硫限制方式的可行性评估,因此,关于美极梅奇酵母营养物质含量的影响研究还需不断深入和完善。

## 4 美极梅奇酵母油脂生产的局限性

### 4.1 油脂产量普遍较低

研究表明,常规产油酵母如 *R. toruloides*、*C. curvatu*、*Y. lipolytica* 等具有良好的脂质积累能力,在特定培养条件下,可富集达自身干重 60%–70% 的脂质<sup>[54-56]</sup>。与之相比,美极梅奇酵母虽具有耐受性强、底物利用范围广、可在开放体

系培养等不可比拟的优势,但其油脂产量却普遍较低。如表 3 所示,在不同培养条件下美极梅奇酵母所能实现的最高油脂产量仅为 30%–45%,远低于常规产油酵母的脂含量。因此,提高油脂产量将成为美极梅奇酵母油脂生产研究的首要任务。目前已有的提升策略主要包括两个方面,一是从产油微生物自身角度出发,根据其脂代谢途径及特征,采用基因工程方法进行油脂合成相关酶的超表达或阻断其他竞争途径,如脂肪酸的  $\beta$ -氧化、磷脂的生物合成及磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 向草酰乙酸的转化等<sup>[56-57]</sup>;二是通过控制培养基成分或培养条件,如温度、pH 值、营养物质的含量等,引导代谢流由碳源指向油脂的生物合成<sup>[17,58]</sup>。

#### 4.2 油脂生产机制尚不明确

美极梅奇酵母是微生物油脂生产领域的新发现。已有结果表明,美极梅奇酵母属于有性生殖,经减数分裂形成孢子进行增殖,而在孢子正式形成之前,其二倍体细胞会首先分化为厚垣孢子,又称“pulcherrima”细胞,显示具有脂质积累的能力<sup>[60]</sup>。施加合适的外界环境刺激,如氮限制等,会显著增加“pulcherrima”细胞的比例,因此可有效提高美极梅奇酵母脂质产量<sup>[14]</sup>。这些研究成果均证明了美极梅奇酵母用于微生物油脂生产的可能性,但其具体的脂质合成机制却并未涉及。此外,从分类学角度看,美极梅奇酵母并不是产油酵母,但与传统产油酵母相比,二者同属于酵母属,因此传统产油酵母的油脂生产机制则成为了探究美极梅奇酵母脂质合成机理的重要参考和依据<sup>[60]</sup>。

目前针对传统产油酵母的油脂生产机制研究已较为完善,主要包括 3 个关键步骤<sup>[58,61]</sup>: (1) 乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 羧化形成丙二酸单酰辅酶 A (Malonyl-CoA); (2) 酰基链的延长; (3) 甘油三酯 (TAG) 的形成。具体合成途径如图 1 所示,所涉及关键途径酶有: 乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC)、脂肪酸合成酶 (FAS)、二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT) 等。乙酰辅酶 A 和还原型辅酶 II (NADPH) 作为产油酵母胞内油脂合成的必要条件,分别为合成脂肪酸提供前体物质及还原力<sup>[62]</sup>。因此,当以葡萄糖或甘油为底物时,相应的 ATP-柠檬酸裂解酶 (ACL) 和苹果酸酶 (ME) 则成为了影响油脂合成代谢的两个关键酶<sup>[8,63]</sup>。细胞中 ACL 的主要作用是催化柠檬酸裂解反应,提供油脂合成所需的乙酰辅酶 A (ATP+柠檬酸+辅酶 A  $\rightarrow$  ADP+Pi+酰基辅酶 A+草酰乙酸),其活性与产油微生物的油脂积累能力具有很强的相关性<sup>[8]</sup>。ME 能够催化苹果酸氧化脱羧生成丙酮酸和 NADPH,以供脂肪酸的合成。微生物油脂的积累程度与 ME 紧密相关,当其活性被抑制时,油脂积累量也随之下降<sup>[63]</sup>。ACL 和 ME 已成为产油微生物在基因层面的重要研究对象,常通过基因工程手段来调控其表达活性,进而影响细胞脂质积累水平<sup>[52]</sup>。同样,当以乙酸盐为底物时,酰基辅酶 A 合成酶 (ACS) 亦具有重要作用,不仅可直接催化乙酸盐生成乙酰辅酶 A,同时其活性的增加会显著提高乙酸盐的同化吸收速率,从而促进脂质的生物合成。

表 3 美极梅奇酵母在不同培养条件下的油脂产量

Table 3 Lipid yield of *Metschnikowia pulcherrima* under different culture conditions

Carbon sources	Culturing mode	Lipid yield (%)	References
Glycerol	Batch in flask	40.0	[14]
Macroalgae hydrolysate	Batch in stirred tank reactor	37.0	[44]
Distillery spent wash with lignocellulosic hydrolysate	Two stage batch in bench-top fermenter	37.2	[12]
Glucose	Batch in stirred tank reactor	43.8	[21]
Distillery spent wash	Batch in flask	35.0	[59]
Lignocellulosic hydrolysate	Batch in flask	42.0	[19]

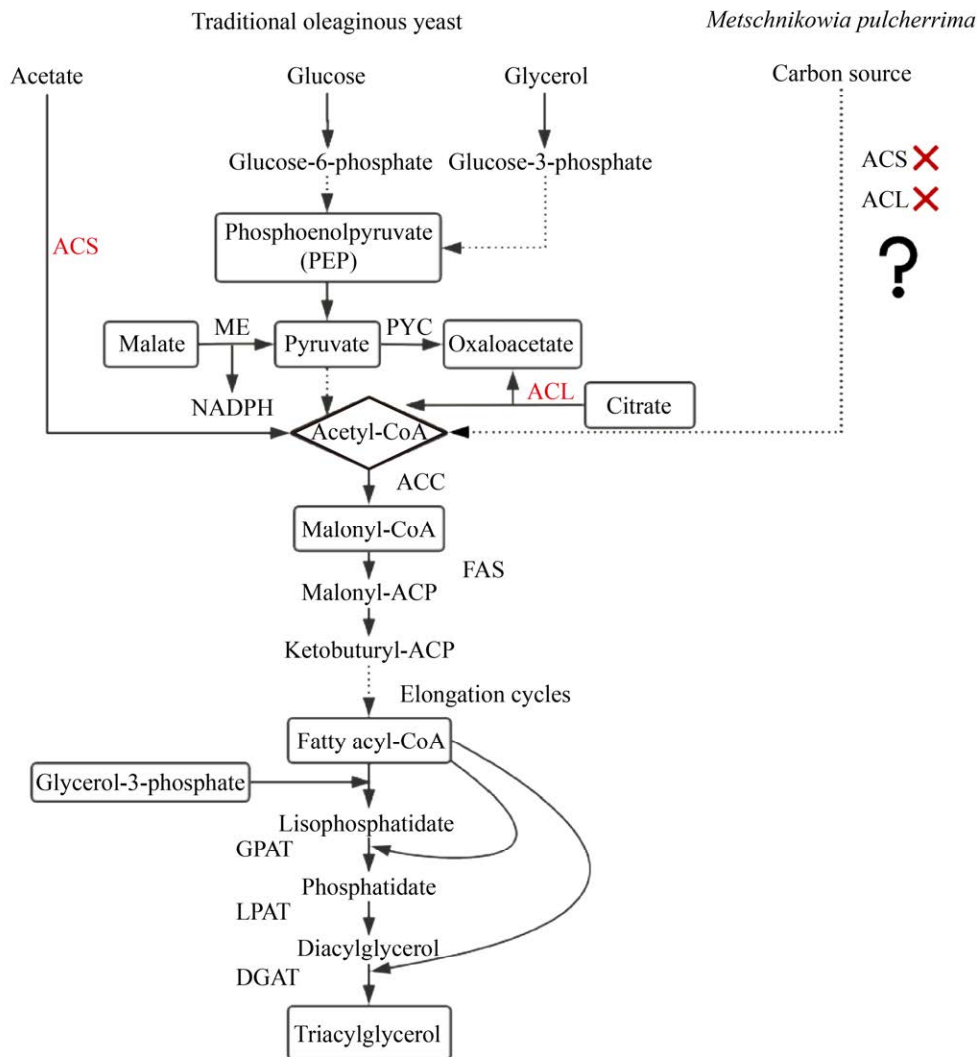


图 1 美极梅奇酵母与传统产油酵母 TAG 合成途径的对比

Fig. 1 Comparison of the TAG synthesis pathway between *Metschnikowia pulcherrima* and traditional oleaginous yeasts.

为探究美极梅奇酵母脂质合成的可能途径,本文利用 NCBI 数据库检索获取了其基因组以及传统产油酵母部分重要的脂质合成相关酶的基因序列,包括 ME、ACL、ACS、ACC、FAS、DGAT 等。通过比对分析发现,ME、ACC、FAS 以及 DGAT 四种酶的基因序列与美极梅奇酵母基因组序列的匹配度分别为 91%、83%、96% 和 55%,表明这些酶都很可能存在于美极梅奇酵母中,且匹配度越高,可能性越大;而用于合成乙酰辅酶 A 的关键酶 ACL 和 ACS 却并未比对到。因此,美极梅奇酵

母中乙酰辅酶 A 的产生可能并不依赖于 ACL 和 ACS 的作用,未来研究则可以此为切入点,实现对美极梅奇酵母油脂生产机制全面深入的探究。

## 5 总结与展望

美极梅奇酵母作为一种新型产油酵母,克服了以往产油微生物油脂生产成本低、反应条件苛刻等弊端,具有耐受性强、底物利用范围广、可在开放体系内培养等一系列优点,在实现生物柴油制备、减轻环境污染的同时促进了废物资源化



进程,具有良好的研究开发价值和推广应用前景。但目前关于美极梅奇酵母油脂生产的研究尚处于起步阶段,还存在着许多问题未得到有效解决,例如如何优化其操作培养条件,提高其微生物油脂产量;明确油脂生产的代谢调控机理,如乙酰辅酶A的来源、关键酶的种类及作用等。随着这些关键技术和理论的解决与突破,以及清洁可再生能源需求日益增加,利用美极梅奇酵母制备生物柴油将越来越凸显出其优势及重要意义。

## REFERENCES

- [1] Vidigal IG, Siqueira AF, Melo MP, et al. Applications of an electronic nose in the prediction of oxidative stability of stored biodiesel derived from soybean and waste cooking oil. *Fuel*, 2021, 284: 119024.
- [2] 刘樟楠,刘宏娟,张建安,等.耐乙酸粘红酵母合成油脂. *生物工程学报*, 2016, 32(3): 339-346.  
Liu ZN, Liu HJ, Zhang JA, et al. Lipid synthesis by an acidic acid tolerant *Rhodotorula glutinis*. *Chin J Biotech*, 2016, 32(3): 339-346 (in Chinese).
- [3] 李晓贞. 生物柴油的研究进展. *化工中间体*, 2011, 8(11): 15-19.  
Li XZ. Advances in the production of biodiesel. *Chem Intermed*, 2011, 8(11): 15-19 (in Chinese).
- [4] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002, 51: 1-52.
- [5] 钟琦,吴慧昊,代军飞,等.微生物油脂提取技术的研究进展. *中国酿造*, 2015, 34(7): 125-128.  
Zhong Q, Wu HH, Dai JF, et al. Research progress on extraction technique of microbial oils. *Chin Brew*, 2015, 34(7): 125-128 (in Chinese).
- [6] 柳杰,刘文慧,王晚晴,等.产油微生物及其发酵原料的研究进展. *环境工程*, 2017, 35(3): 132-136.  
Liu J, Liu WH, Wang WQ, et al. Research advances in oleaginous microorganisms and fermenting materials. *Environ Eng*, 2017, 35(3): 132-136 (in Chinese).
- [7] Saini R, Hegde K, Brar SK, et al. Advanced biofuel production and road to commercialization: an insight into bioconversion potential of *Rhodospiridium* sp. *Biomass Bioenerg*, 2020, 132: 105439.
- [8] 张国玲,杜伟,刘德华.酵母油脂及用于生物柴油制备研究进展. *化工进展*, 2013, 32(4): 791-798.  
Zhang GL, Du W, Liu DH. Research progress in biodiesel production from yeast lipid. *Chem Ind Eng Prog*, 2013, 32(4): 791-798 (in Chinese).
- [9] Vasconcelos B, Teixeira JC, Dragone G, et al. Oleaginous yeasts for sustainable lipid production-from biodiesel to surf boards, a wide range of "green" applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(9): 3651-3667.
- [10] Ma YQ, Gao Z, Wang QH, et al. Biodiesels from microbial oils: opportunity and challenges. *Bioresour Technol*, 2018, 263: 631-641.
- [11] Morata A, Loira I, Escott C, et al. Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology. *Fermentation*, 2019, 5(3): 63.
- [12] Tamilalagan A, Singaram J, Rajamohan S. Generation of biodiesel from industrial wastewater using oleaginous yeast: performance and emission characteristics of microbial biodiesel and its blends on a compression injection diesel engine. *Environ Sci Pollut Res*, 2019, 26(11): 11371-11386.
- [13] Kántor A, Hutková J, Petrová J, et al. Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*, 2016, 5(3): 282-285.
- [14] Santamauro F, Whiffin FM, Scott RJ, et al. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 34.
- [15] Gore-Lloyd D, Sumann I, Brachmann AO, et al. Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Mol Microbiol*, 2019, 112(1): 317-332.
- [16] 郭东起,蒋楠,刘亚军,等.低温环境下提高美极梅奇酵母菌生防效果的研究. *食品研究与开发*, 2016, 37(8): 170-173.  
Guo DQ, Jiang N, Liu YJ, et al. The study on improving the biocontrol effect of *Metschnikowia pulcherrima* under low environmental temperature.

- Food Res Dev, 2016, 37(8): 170-173 (in Chinese).
- [17] 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.  
Zhao ZB, Hu CM. Progress in bioenergy-oriented microbial lipid technology. Chin J Biotech, 2011, 27(3): 427-435 (in Chinese).
- [18] Pawlikowska E, James SA, Breierova E, et al. Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates. Anton Leeuw, 2019, 112(10): 1425-1445.
- [19] Longanesi L, Bouxin FP, Fan JJ, et al. Valorisation of sawdust through the combined microwave-assisted hydrothermal pre-treatment and fermentation using an oleaginous yeast. Biomass Convers Bior, 2020. DOI: 10.1007/s13399-020-00757-3.
- [20] Abeln F, Chuck CJ. Achieving a high-density oleaginous yeast culture: Comparison of four processing strategies using *Metschnikowia pulcherrima*. Biotechnol Bioeng, 2019, 116(12): 3200-3214.
- [21] Abeln F, Chuck CJ. The role of temperature, pH and nutrition in process development of the unique oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima*. J Chem Technol Biotechnol, 2020, 95(4): 1163-1172.
- [22] Pan JG, Kwak MY, Rhee JS. High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen-enriched air. Biotechnol Lett, 1986, 8(10): 715-718.
- [23] Qiao KJ, Wasylenko TM, Zhou K, et al. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. Nat Biotechnol, 2017, 35(2): 173-177.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Sitepu I, Selby T, Lin T, et al. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. J Ind Microbiol Biot, 2014, 41(7): 1061-1070.
- [27] Fan JJ, Santomauro F, Budarin VL, et al. The additive free microwave hydrolysis of lignocellulosic biomass for fermentation to high value products. J Clean Prod, 2018, 198: 776-784.
- [28] Spadaro D, Ciavarella A, Dianpeng Z, et al. Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. Can J Microbiol, 2010, 56(2): 128-137.
- [29] Elfeky N, Elmahmoudy M, Bao YM. Manipulation of culture conditions: tool for correlating/improving lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis*. Processes, 2020, 8(2): 140.
- [30] Lin ZN, Zhou YJ, Wu J, et al. Effect of multiple inhibitions in corncob hydrolysate on the lipid production by *Rhodotorula glutinis*. Energy Fuels, 2017, 31(11): 12247-12255.
- [31] Chen X, Li ZH, Zhang XX, et al. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 159(3): 591-604.
- [32] Zhang W, Wu J, Zhou YJ, et al. Enhanced lipid production by *Rhodotorula glutinis* CGMCC 2.703 using a two-stage pH regulation strategy with acetate as the substrate. Energy Sci Eng, 2019, 7(5): 2077-2085.
- [33] Gao RL, Li ZF, Zhou XQ, et al. Enhanced lipid production by *Yarrowia lipolytica* cultured with synthetic and waste-derived high-content volatile fatty acids under alkaline conditions. Biotechnol Biofuels, 2020, 13: 3.
- [34] Hamimed S, Barkaoui T, Trabelsi I, et al. High-performance biological treatment of tuna wash processing wastewater using *Yarrowia lipolytica*. Environ Sci Pollut Res, 2020. DOI: 10.1007/s11356-020-10586-6.
- [35] Hu CM, Zhao X, Zhao J, et al. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. Bioresour Technol, 2009, 100(20): 4843-4847.
- [36] Yu XC, Zheng YB, Dorgan KM, et al. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. Bioresour Technol, 2011, 102(10): 6134-6140.
- [37] Qian XD, Gorte O, Chen L, et al. Continuous self-provided fermentation for microbial lipids

- production from acetate by using oleaginous yeasts *Cryptococcus podzolicus* and *Trichosporonporosum*. *Renew Energ*, 2020, 146: 737-743.
- [38] Oro L, Ciani M, Comitini F. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol*, 2014, 116(5): 1209-1217.
- [39] Spadaro D, Droby S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci Technol*, 2016, 47: 39-49.
- [40] Sipiczki M. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(10): 6716-6724.
- [41] Ling JY, Xu YB, Lu CS, et al. Accelerated lipid production from distillery wastewater by *Rhodospiridium toruloides* using an open-bubble-column reactor under non-aseptic conditions. *Int Biodeter Biodegr*, 2019, 143: 104720.
- [42] Huang XF, Shen Y, Luo HJ, et al. Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid. *Bioresour Technol*, 2018, 247: 395-401.
- [43] Gao RL, Li ZF, Zhou XQ, et al. Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* culture with synthetic and food waste-derived volatile fatty acids for lipid production. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 247.
- [44] Abeln F, Fan JJ, Budarin VL, et al. Lipid production through the single-step microwave hydrolysis of macroalgae using the oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Algal Res*, 2019, 38: 101411.
- [45] Chuck C, Santomauro F, Scott R. Method of increasing lipid accumulation in *Metschnikowia pulcherrima* cells: US, 20160002679. 2016-01-07.
- [46] 陈韵, 钟先锋, 陆丽珠, 等. 影响产油酵母菌合成油脂的因素研究现状. *农产品加工(上半月)*, 2019(11): 87-90.  
Chen Y, Zhong XF, Lu LZ, et al. Research status of factors affecting the synthesis of oils by oleaginous yeast. *Farm Product Process*, 2019(11): 87-90 (in Chinese).
- [47] 陶杰. 产油菌株筛选及利用木质纤维素水解物产微生物柴油研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2008.  
Tao J. Screening of oil-producing strains and research on producing microbial diesel from lignocellulose hydrolysate[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2008 (in Chinese).
- [48] 聂刚. 油脂酵母利用玉米秸秆水解液生产油脂的研究[D]. 吉林: 东北电力大学, 2017.  
Ni G. Research on microbial oil production by oleaginous yeast with corn straw hydrolysate[D]. Jilin: Northeast Electric Power University, 2017 (in Chinese).
- [49] Di Fidio N, Dragoni F, Antonetti C, et al. From paper mill waste to single cell oil: enzymatic hydrolysis to sugars and their fermentation into microbial oil by the yeast *Lipomyces starkeyi*. *Bioresour Technol*, 2020, 315: 123790.
- [50] 郭东起, 康婕. 生防酵母菌培养条件研究. *农产品加工·学刊(下)*, 2014(1): 17-20.  
Guo DQ, Kang J. Culture conditions of *Metschnikowia pulcherrima*. *Acad Period Farm Products Process*, 2014(1): 17-20 (in Chinese).
- [51] Yang XB, Jin GJ, Gong ZW, et al. Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process. *Biochem Eng J*, 2014, 91: 86-91.
- [52] 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.
- [53] Ma XY, Gao Z, Gao M, et al. Microbial lipid production from food waste saccharified liquid and the effects of compositions. *Energy Convers Manage*, 2018, 172: 306-315.
- [54] Bhatia SK, Gurav R, Choi TR, et al. Effect of synthetic and food waste-derived volatile fatty acids on lipid accumulation in *Rhodococcus* sp. YHY01 and the properties of produced biodiesel. *Energy Convers Manage*, 2019, 192: 385-395.
- [55] Gong ZW, Shen HW, Zhou WT, et al. Efficient conversion of acetate into lipids by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 189.
- [56] Lin JT, Li SY, Sun MZ, et al. Microbial lipid production by oleaginous yeast in D-xylose solution

- using a two-stage culture mode. *RSC Adv*, 2014, 4(66): 34944.
- [57] Llamas M, Magdalena JA, González-Fernández C, et al. Volatile fatty acids as novel building blocks for oil-based chemistry via oleaginous yeast fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 117(1): 238-250.
- [58] Courchesne NMD, Parisien A, Wang B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol*, 2009, 141(1/2): 31-41.
- [59] Anbarasan T, Jayanthi S, Ragina Y. Investigation on synthesis of biodiesel from distillery spent wash using oleaginous yeast *Metschnikowia Pulcherrima*. *Materials Today Proc*, 2018, 5(11): 23293-23301.
- [60] Lachance MA. *Metschnikowia*: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. *Yeast*, 2016, 33(11): 563-574.
- [61] 郭小宇, 杨兰, 李宪臻, 等. 提高微生物油脂生产能力的研究进展. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2295-2305.  
Guo XY, Yang L, Li XZ, et al. Advance in enhancing production of microbial lipids. *Microbiology*, 2013, 40(12): 2295-2305 (in Chinese).
- [62] 刘猛. 利用纤维素乙醇废水培养粘红酵母生产微生物油脂[D]. 北京: 北京化工大学, 2017.  
Liu M. Utilization of *Rhodotorula glutinis* cultivation in cellulosic ethanal wastewater for production of microbial lipid[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2017 (in Chinese).
- [63] 程万, 林辉, 赵宇华, 等. 苹果酸酶调控微生物油脂积累的研究进展. *科技通报*, 2010, 26(6): 853-857.  
Cheng W, Lin H, Zhao YH, et al. Research progress on malic enzyme regulating the accumulation of microbial oils. *Bull Sci Technol*, 2010, 26(6): 853-857 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)