

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.07.003

腐乳源酵母分离鉴定及其极性脂质分析

Identification and polar lipid composition analysis of yeasts isolated from sufu manufacture

陈思锴¹ 林盛杰² 李理¹CHEN Si-kai¹ LIN Sheng-jie² LI Li¹

(1. 华南理工大学, 广东 广州 510642; 2. 广州市白云联佳精细化工厂, 广东 广州 510445)

(1. South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510642, China;

2. Guangzhou Baiyunlianjia Fine Chemistry Factory, Guangzhou, Guangdong 510445, China)

摘要:从豆腐酸浆及毛坯中鉴定了 23 个分离菌株,测定了其脂肪酶活力并利用超高效液相串联质谱对其中 7 个菌株的脂质进行了分析。结果表明,指纹图谱中包含 2 种鞘氨醇、16 种酰胺、22 种酯类和 3 种脂肪酸。其中,马克斯克鲁维酵母 SP-1 和挪威毕赤酵母 SP-5 中植物鞘氨醇、N,N-二甲基鞘氨醇的相对含量最高。此外,嗜酒假丝酵母 ATW-1、库德里阿兹威毕赤氏酵母 SP-4 和阿米塞毕赤氏酵母 Y 的酯类化合物比较丰富,且其细胞结合型脂肪酶活力也比较高,PCA 分析进一步表明这 3 个菌株脂质组成具有较大的相似性,表明酵母菌中丰富的代谢酯类物质可能与细胞结合型脂肪酶之间存在密切联系。

关键词:超高效液相串联质谱;酵母菌;脂肪酶;脂质指纹图谱;鞘氨醇

Abstract: In order to characterize lipid metabolism of yeasts during sufu manufacture, 23 isolates from sufu pehte and acidic tofu whey were identified. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was used to analyse the lipid fingerprints of 7 strains of yeast, after the determination of lipase activities. It is suggested that lipid fingerprint mainly includes 2 kinds of sphingosine, 16 kinds of amide, 22 kinds of ester and 3 kinds of fatty acid. *Kluyveromyces marxianus* SP-1 and *Candida (Pichia) norvegensis* SP-5 show highest relative amount of 2-Amino-1,3,4-octadecanetriol and N,N-Dimethylsphingosine, which indicates potential for sphingolipids synthesis. *Candida ethanolica* ATW-1, *Pichia kudriavzevii* SP-4 and *Pichia kudriavzevii* Y with higher cell-bound lipase activities have more abundant esters. PCA analysis

further illustrates the lipid composition of these three strains are more similar to each other. The results indicate that the abundant lipids in yeasts may be closely related to cell-binding lipase.

Keywords: ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); yeast; lipase; lipid finger fingerprint; sphingosine

脂质是细胞膜的主要成分,构成了细胞边界,可以储存能量并参与细胞的信号传导过程^[1-2]。对于哺乳动物而言,酵母菌的脂质组成相对简单,脂质代谢相关基因所占比例相对较高,分子遗传分析手段较为成熟,使得酵母在脂质研究中备受关注^[1]。酿酒酵母是研究真核生物脂质调控机制的主要模型生物^[3],耶氏解脂酵母能代谢多种底物并转化成生物脂质^[4],斯达氏油脂酵母^[5]等产油酵母侧重于对甘油酯的代谢分析,酵母脂质组学研究缺乏对其他酯类物质和酰胺类化合物的关注。据报道^[6-7],马克斯克鲁维酵母和库德里阿兹威毕赤酵母可应用于生产生物脂质,但试验所分离的大部分菌种目前未见其脂质方面的研究。

生物样品中脂质种类繁多、基质复杂,故脂质组学分析需要借助先进的分离技术和检测手段^[8]。近年来,基于质谱的脂质组学研究提高了对细胞脂质生物学的认识,但脂质的定性定量问题仍是制约脂质组学发展的主要障碍。超高效液相串联质谱法(UHPLC-MS/MS)能将液相的强分离效果和质谱的高灵敏度、高分辨率以及快速检测的优势良好地结合起来^[9],能对生物体内脂质种类和含量进行监测,是目前脂质组学研究的一种重要手段。研究拟从腐乳厂的酸浆水和毛胚中分离鉴定出多个酵母菌株,着重于酵母的产酶特性分析,并利用 UHPLC-MS/MS 对其中 7 个菌株的脂质组成进行非靶向定性分析,研究酵母菌的脂质组成,旨在为酵母的生产应用以及

基金项目:广州市科技计划项目(编号:201803010118)

作者简介:陈思锴,女,华南理工大学在读硕士研究生。

通信作者:李理(1965—),女,华南理工大学教授,博士。

E-mail: liliscut20@163.com

收稿日期:2020-05-01

脂质组学的发展提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

腐乳毛胚、酸浆水:广东某腐乳厂;

阿米塞毕赤酵母(*Pichia amenthionina* Y):实验室前期从豆腐酸浆水中分离纯化得到;

马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus* K):科汉森公司;

酵母 DNA 快速提取试剂盒:广州东盛生物科技有限公司;

氯仿、甲醇:色谱纯,美国 Sigma 公司。

1.1.2 主要仪器设备

超高效液相串联质谱:UHPLC-/Q-Exactive Plus 型,美国 Thermo scientific 公司;

高速冷冻离心机:CR22G 型,日本日立公司;

紫外分光光度计:UV-5500PC 型,上海元析仪器有限公司;

医用离心机:JW-HR 型,安徽嘉文仪器装备有限公司;

电泳仪:DYY-6C 型,北京六一生物科技有限公司;

紫外凝胶成像系统:WD-9413B 型,广州誉维生物科技仪器有限公司;

基因扩增仪:TR-96/G/H(b)C 型,杭州博日科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酵母分离纯化和鉴定

(1) 酵母菌株的分离纯化:分别取 1 mL 豆腐酸浆水和 1 g 腐乳毛胚于 9 mL 无菌生理盐水中进行梯度稀释,选择适宜梯度的稀释液 1 mL 涂布于 YPD 平板中,再于 28 °C 培养 48 h。挑取疑似酵母菌落进行液体培养并划线分离,如此反复 3~4 次,直至获得纯的单菌落,将划线分离得到的菌株保藏于 50% 的甘油溶液中,并于 -20 °C 保存。

(2) 分子生物学鉴定:对分离获得的菌株进行分子生物学鉴定。采用酵母 DNA 快速提取试剂盒提取酵母菌的基因组 DNA,然后设计 ITS 序列通用引物 ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4:5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3' 进行 PCR 扩增,扩增条件为 94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,46 °C 30 s,72 °C 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。将扩增得到的 DNA 进行测序,并在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对。

1.2.2 脂肪酶活测定

(1) 粗酶液的制备:将过夜活化的酵母菌液按体积分数 1% 接种于 YPD 液体培养基中,30 °C 培养 24 h,离心

获得酵母菌体,用无菌水洗涤 2 次,获得酵母种子液,调节菌液浓度为 10^8 CFU/mL,按体积分数 1% 接种于 20 mL YPD 培养基中,30 °C 摇床培养 24 h,离心,测定上清液脂肪酶活。菌体用无菌水洗涤后,重悬于无菌水中,调节菌液 $OD_{600\text{ nm}}$ 值为 2.5,作为粗酶液用于测定细胞结合型的脂肪酶活。

(2) 酶活测定:参照 GB/T 23535—2009 并修改。试验组锥形瓶中加入 4 mL 4% 聚乙烯醇溶液和 5 mL pH 7.5 的磷酸缓冲液,37 °C 保温 5 min,再加入 1 mL $OD_{600\text{ nm}}$ 为 2.5 的酵母菌液或培养基上清液,混匀,37 °C 保温 30 min,随后加入 15 mL 乙醇(95%)终止反应。用 NaOH 溶液(0.026 mol/L)滴定至中性,记录消耗 NaOH 溶液体积。对照组则先加入乙醇溶液终止反应,再加入酶液。

1.2.3 脂质组成分析

(1) 酵母培养及脂质的提取:将过夜活化的菌液按体积分数 1% 接种到 YPD 培养基,28 °C 摇床培养 48 h,离心收集菌体,用无菌水洗涤 2 次,再次离心收集菌体,冻干保存。取 0.12 g 冻干的酵母菌体于带螺旋盖的玻璃试管中,再加入 2 mL 氯仿—甲醇(1:1)溶液,涡旋提取 1 min。加入 2 mL 0.8 mol/L 的 KOH—甲醇溶液,42 °C、160 r/min 下孵育 30 min。加入 5 mL 氯仿和 2.25 mL 水涡旋直至皂化,3 000 r/min 离心 10 min,取下层有机相过有机膜进样检测^[10]。

(2) UHPLC-ESI-MS/MS:色谱柱为 ACQUITY UP-LC® BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),质谱系统为配备 ESI 离子源和 Orbitrap 的 API14000 质谱仪。色谱分离采用二元的梯度洗脱,溶剂 A 为添加 0.1% 甲酸的水溶液;溶剂 B 为甲醇;流速 300 μL/min,进样量 2 μL。洗脱梯度为 0 min,85% B;2 min,85% B;20 min,100% B;22 min,100% B;22.1 min,85% B。正离子模式下进行质谱分析,扫描范围 150~10 000。所有谱图数据处理采用 X caliber 2.0 软件分析,并与 MZcloud 数据库进行比对确定物质的相关信息。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离

由表 1 可知,酸浆水体系中共分离得到 10 个酵母菌株,除了 1 株膜醭毕赤酵母(*Pichia membranifaciens*) ATW-6 外,其他的 9 个菌株均为嗜酒假丝酵母(*Candida ethanolica*),说明嗜酒假丝酵母的耐酸性较好,酸浆水过酸的环境不适宜其他酵母的生长。嗜酒假丝酵母也存在于红茶菌^[11]、新疆传统发酵酸乳^[12]、龙舌兰酒^[13]等食品中。膜醭毕赤酵母主要应用于柑橘青绿霉病的控制,通过与病原菌进行营养和空间竞争,诱导果树产生抗病性^[14]。

由表 2 可知,毛胚中共分离得到 13 个菌株,包括 3 株马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、3 株 *Diutina* (*Candida*) *mesorugosa*、2 株库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)、3 株挪威毕赤(*Pichia norvegensis*)和 2 株阿萨希毛孢子菌(*Trichosporon asahii*)。马克斯克鲁维酵母已通过美国 GRAS 和欧洲 QPS 安全认证^[15],可在高达 45~52 °C 的温度下生长,其碳源代谢谱十分广泛^[16]。该菌种在面包生产中具有一定研究和应用价值,能够改善发酵面包的风味和质构^[17-18]。库德里阿兹威氏毕赤酵母在西非一种自然发酵的面团 Mawe 中是优势菌种^[19],该菌种也存在于猪肉肠、芝士、葡萄酒渣、可可豆和米糠中^[20]。Hong 等^[21]发现,库德里阿兹威氏毕赤酵母 SJP-SNU 含有致病性相关基因,但未见其致病

表 1 腐乳酸浆水中酵母分离菌株鉴定结果

Table 1 The identification result of yeasts isolated from acidic tofu whey

编号	鉴定结果
ATW-1	<i>Candida ethanolica</i> (嗜酒假丝酵母)
ATW-2	<i>Candida ethanolica</i> (嗜酒假丝酵母)
ATW-3	<i>Candida ethanolica</i> (嗜酒假丝酵母)
ATW-4	<i>Candida ethanolica</i> (嗜酒假丝酵母)
ATW-5	<i>Candida ethanolica</i> (嗜酒假丝酵母)
ATW-6	<i>Pichia membranifaciens</i> (膜醭毕赤酵母)
ATW-7	<i>Candida ethanolica</i> (嗜酒假丝酵母)
ATW-8	<i>Candida ethanolica</i> (嗜酒假丝酵母)
ATW-9	<i>Candida ethanolica</i> (嗜酒假丝酵母)
ATW-10	<i>Candida ethanolica</i> (嗜酒假丝酵母)

表 2 腐乳毛胚中酵母分离菌株鉴定结果

Table 2 The identification result of yeasts isolated from sufu pehtze

编号	鉴定结果
SP-1	马克斯克鲁维酵母(<i>Kluyveromyces marxianus</i>)
SP-2	<i>Diutina</i> (<i>Candida</i>) <i>mesorugosa</i>
SP-3	<i>Diutina</i> (<i>Candida</i>) <i>mesorugosa</i>
SP-4	库德里阿兹威毕赤酵母(<i>Pichia kudriavzevii</i>)
SP-5	挪威毕赤酵母[<i>Candida</i> (<i>Pichia</i>) <i>norvegensis</i>]
SP-6	阿萨希毛孢子菌(<i>Trichosporon asahii</i>)
SP-7	阿萨希毛孢子菌(<i>Trichosporon asahii</i>)
SP-8	挪威毕赤酵母[<i>Candida</i> (<i>Pichia</i>) <i>norvegensis</i>]
SP-9	<i>Diutina</i> (<i>Candida</i>) <i>mesorugosa</i>
SP-10	马克斯克鲁维酵母(<i>Kluyveromyces marxianus</i>)
SP-12	马克斯克鲁维酵母(<i>Kluyveromyces marxianus</i>)
SP-13	挪威毕赤酵母[<i>Candida</i> (<i>Pichia</i>) <i>norvegensis</i>]
SP-14	库德里阿兹威毕赤酵母(<i>Pichia kudriavzevii</i>)

性报道,同时含有植酸酶和纤维素酶基因,该菌株的益生特性和安全性需进一步研究。*P. kudriavzevii* MF-121^[21]和 *P. kudriavzevii* DMKU 3-ET15^[22]在高温条件下也能高产乙醇,其 MF-121 菌株对酸、乙醇、温度、盐均具有较高的耐受性^[23-24]。Hellström 等^[25]从一种坦桑尼亚的发酵食品中分离得到挪威毕赤酵母;且发酵初期的挪威毕赤酵母占其中非酿酒酵母的 14%^[26]。*Diutina* (*Candida*) *mesorugosa* 与某些感染性疾病相关^[27]。阿萨希毛孢子菌是一种罕见的条件性真菌病原体,可导致免疫缺陷患者发生系统性感染,甚至对嗜中性粒细胞减少的患者具有生命威胁^[28-29]。

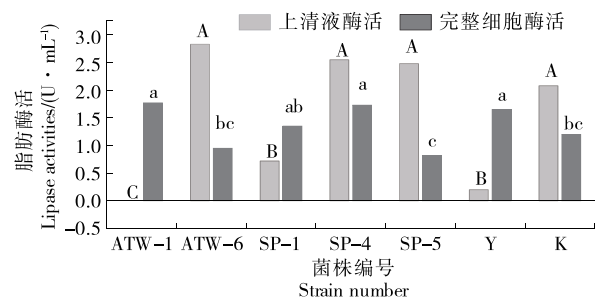
考虑到菌种的安全性和差异性,从分离的 23 株菌株中各选择 1 株嗜酒假丝酵母 ATW-1、膜醭毕赤酵母 ATW-6、马克斯克鲁维酵母 SP-1、库德里阿兹威毕赤酵母 SP-4 和挪威毕赤酵母 SP-5 共 5 株酵母菌株进行后续试验,并选取实验室前期分离的阿米塞毕赤酵母(*Pichia amethionina*) Y 和商业菌株马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*) K 进行对比。前期研究^[30]表明,阿米塞毕赤酵母 Y(*Pichia amethionina*)对温度和 NaCl 具有较高的耐受性,能降低大豆豆腥味成分,产生酯类香气成分。

2.2 脂肪酶酶活

由图 1 可知,菌株 ATW-6、SP-4、SP-5 与 K 的上清液脂肪酶酶活显著高于其他 3 个菌株,为 2.08 ~ 2.83 U/mL,菌株 ATW-1 与菌株 Y 的上清液基本无脂肪酶酶活。胡珺等^[31]发现,未优化产酶条件前,芽孢杆菌酶活仅为 2.17 U/mL。枯草芽孢杆菌 U5 脂肪酶酶活为 3.30 U/mL,优化后可达 4.30 U/mL^[32]。菌株 ATW-6 的上清液酶活最高,为 2.83 U/mL,与上述提到的芽孢杆菌进行对比,其优势比较突出。就细胞结合型脂肪酶活而言,菌株 ATW-1、SP-4 和 Y 的酶活高于其他菌株,基本处于 1.70 U/mL 左右,说明上清液脂肪酶酶活与细胞结合型脂肪酶活之间不存在必然联系。

2.3 脂质非靶向分析

由图 2 可知,菌株 ATW-1、ATW-6、SP-4、Y 和 K 的



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 1 酵母菌株的脂肪酶酶活

Figure 1 The activities of lipase in yeasts

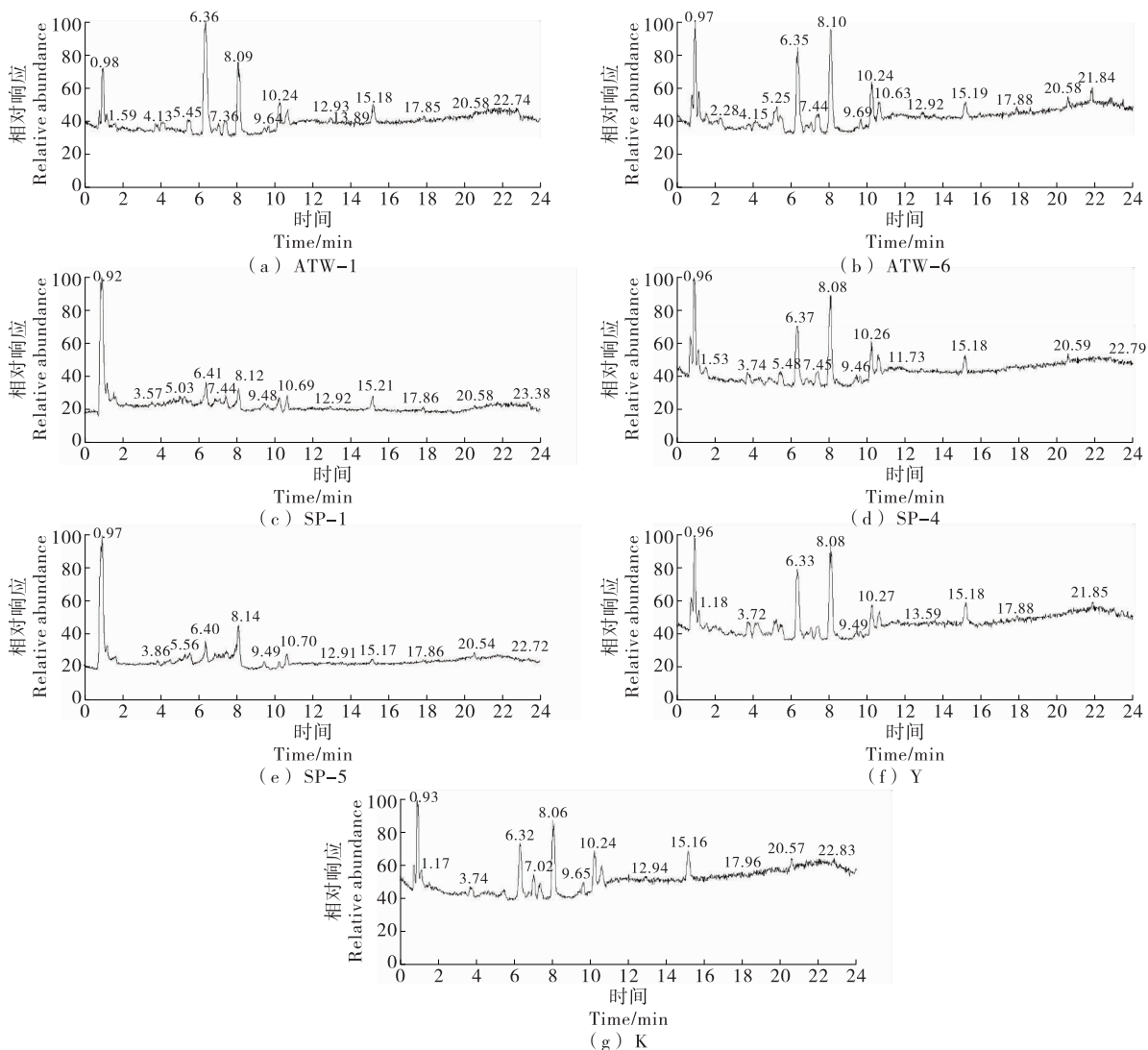


图 2 酵母提取物的 UHPLC-MS/MS 总离子流图

Figure 2 Total ion chromatography of UHPLC-MS/MS in yeast extract

峰位置和强度较为接近,0.98,6.36,8.09 min 处的相对响应较强。而菌株 SP1、SP5 的中间离子峰信号较弱,说明这两株酵母与其他酵母的脂质组成存在差异。

由图 3 可知,酵母脂质化合物包括 2 种鞘氨醇、16 种酰胺、22 种酯类、3 种脂肪酸 4 大类物质。酰胺是以长链脂肪酸酰胺为主;酯类主要包括长链脂肪酸甲酯、芳香酯类和单甘油酯 3 大类;脂肪酸包括二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸和 α -亚麻酸 3 种。其中,酯类是酵母脂质的主要组成成分,同时菌株 ATW-1、SP-4 与 Y 检测出的酯类物质相对多于其他菌株。这 3 个菌株的上清液脂肪酶活较低,但其细胞结合型脂肪酶活却较高,与其代谢产物中存在较为丰富的酯类物质似乎有一定的相关性。

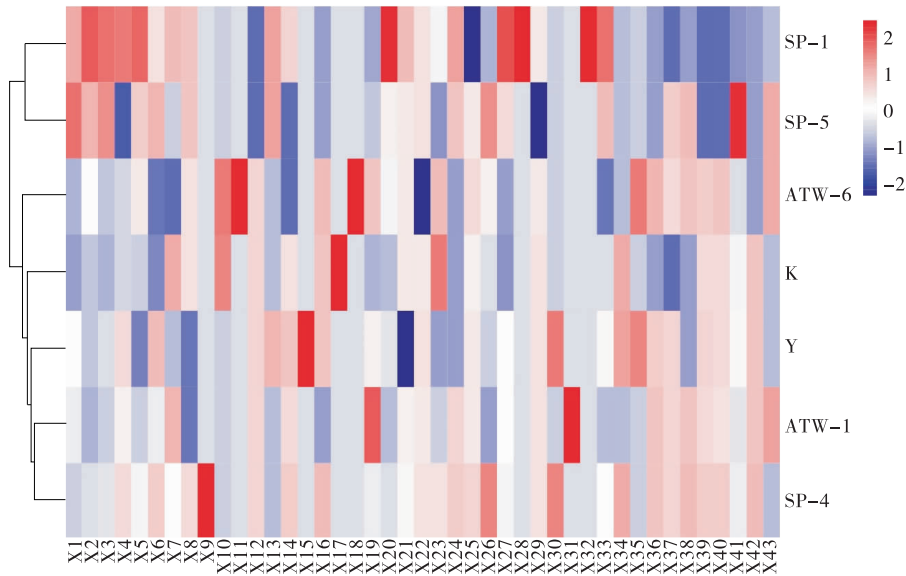
由图 4 可知,前 3 个主成分的积累方差贡献达到了 71.5%。基于前两个主成分可知,菌株 SP-4、ATW-1、Y

和 K 的位置较为接近,位于第 1 组分的负端和第 2 组分的正端,说明样品组成较为相似,与 TIC 图一致;而菌株 SP1、SP5、ATW-6 则分别分布于第 1、第 4 和第 3 象限,说明与其他菌株脂质组成差异较大。

2.4 鞘氨醇代谢分析

7 株酵母菌株中均存在 *N,N*-二甲基鞘氨醇和植物鞘氨醇。鞘氨醇属于鞘脂化合物,是合成神经酰胺的前体物质^[33],而鞘脂在哺乳动物角质层的保水性和表皮通透性屏障功能中发挥着重要作用^[34]。

由图 5 可知,马克斯克鲁维酵母 SP-1 中植物鞘氨醇相对含量最高,其次为挪威毕赤酵母 SP-5。植物鞘氨醇是较为常见的一种鞘氨醇,解脂假丝酵母(*Candida lipolytica*)33M 菌株所产神经酰胺主要是以 18 碳和 20 碳的植物鞘氨醇与脂肪酸酰化形成^[35],酵母神经酰胺的磷酸



X1. *N,N*-二甲基鞘氨醇 X2. 鞘氨醇 X3. 十六酰胺 X4. 硬脂酰胺 X5. 油酸酰胺 X6. 烟酰胺 X7. 芥酸酰胺 X8. 二十二酰胺 X9. α -亚麻酸乙醇酰胺 X10. 脯氨酸酰胺 X11. 油酰乙醇酰胺 X12. *N,N*-二乙基-3-甲基苯甲酰胺 X13. 十八碳四烯酰甘氨酸 X14. *N*-乙酰腐胺 X15. *N*1-乙酰精胺 X16. 戊基芬太尼 X17. 油酰苯胺 X18. *N*8-乙酰亚精胺 X19. 9(*Z*),11(*E*),13(*E*)-十八碳三烯酸甲酯 X20. 三(2,4-二叔丁基)亚磷酸苯酯 X21. 十六烯酸甲酯 X22. 邻苯二甲酸二甲酯 X23. 棕榈酸甲酯 X24. 顺式-12-十八酸甲酯 X25. 蓖麻油酸甲酯 X26. 3-(3,5-二叔丁基-4-羟基苯基)丙酸正十八烷醇酯 X27. 新蛇床内酯 X28. 邻苯二甲酸二异丁酯 X29. 二十二碳六烯酸甲酯 X30. 异烟酸甲酯 X31. 滨蒿内酯 X32. 鲁望素 X33. 4-羟基香豆素 X34. 2-花生酰甘油酯 X35. 1-硬脂酰甘油酯 X36. 2-亚油酸甘油酯 X37. 纽甜 X38. 鳄梨酸 1-乙酸酯 X39. 2-(14,15-环氧二十碳三烯酰基)甘油酯 X40. PPG Acrylate *n*10 X41. 二十碳五烯酸 X42. 二十二碳六烯酸 X43. α -亚麻酸

图3 UHPLC-MS/MS的热图分析

Figure 3 Heat map analysis of the result from UHPLC-MS/MS

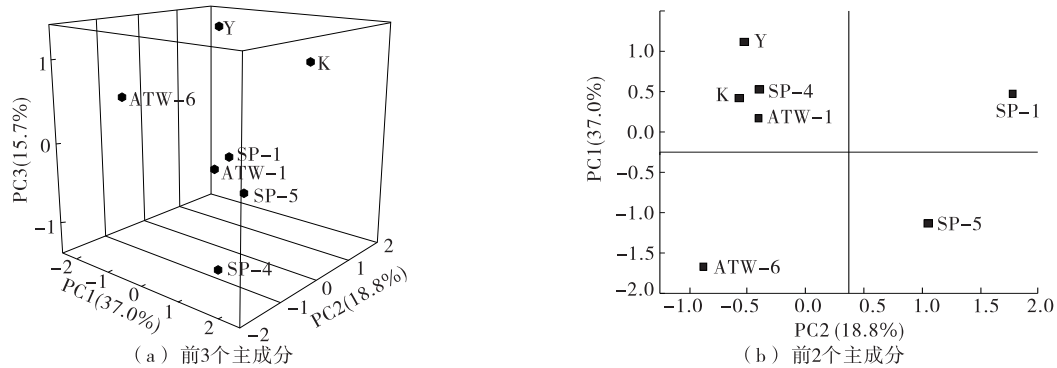


图4 主成分分布图

Figure 4 Distribution of samples of the first three PCs and the first two PCs

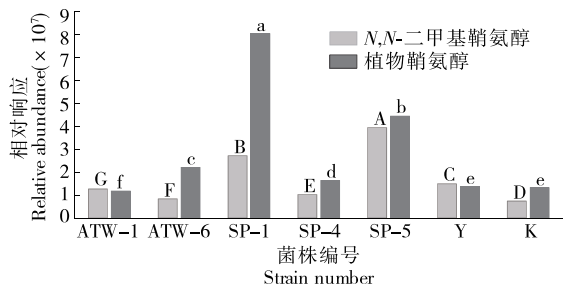


图5 酵母中植物鞘氨醇和 *N,N*-二甲基鞘氨醇的相对响应
Figure 5 The relative abundance of *N,N*-dimethylsphingosine and 2-Amino-1,3,4-octadecanetriol in yeasts

肌醇衍生物均以含植物鞘氨醇基的鞘磷脂化合物为主^[36]。挪威毕赤酵母 SP-5 中 *N,N*-二甲基鞘氨醇含量最高,其次为 SP-1。*N,N*-二甲基鞘氨醇是氨基上的氢被两个甲基取代而形成,二甲基鞘氨醇不但是一种蛋白激酶 C 的抑制剂,也是特异性的鞘氨醇激酶抑制剂,其抗癌作用已成为化疗发展的基础。由于鞘氨醇及其衍生物种类和结构的多样性,不同培养条件、酵母菌中鞘脂的种类也存在差异^[37-38],酵母菌株中极有可能存在其他未知结构的鞘脂类化合物。

3 结论

从豆腐酸浆水和腐乳毛胚中共分离得到 23 个菌株,

利用 ITS 测序技术进行菌种鉴定。结果表明,酸浆水中分离得到 1 株膜醭毕赤酵母(*Pichia membranifaciens*)和 9 株嗜酒假丝酵母(*Candida ethanolica*);毛胚中分离得到 3 株马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、3 株 *Diutina* (*Candida*) *mesorugosa*、2 株库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)、3 株挪威毕赤酵母(*Pichia norvegensis*)和 2 株阿萨希毛孢子菌(*Trichosporon asahii*)。通过对酵母菌脂肪酶活和脂质组成进行分析发现,菌株 ATW-1、SP-4 和 Y 的细胞结合型脂肪酶活高于其他菌株,同时菌株 ATW-1、SP-4 和 Y 中的酯类物质相对比较丰富,PCA 分析进一步表明这 3 个菌株脂质组成具有一定相似性。酵母菌中丰富的代谢酯类物质可能与细胞结合型脂肪酶之间存在密切联系,与上清液的脂肪酶活力无关。马克斯克鲁维酵母 SP-1 和挪威毕赤酵母 SP-5 中鞘氨醇相对响应较高,推测这两个菌株在鞘脂合成方面具有一定研究潜力,后续可进行鞘脂的定量分析,充分挖掘酵母中丰富的脂质资源。

参考文献

- [1] GASPAR M L, AREGULLIN M A, JESCH S A, et al. The emergence of yeast lipidomics[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2007, 1 771(3): 241-254.
- [2] ZUellig T, KOEFELER H C. High resolution mass spectrometry in lipidomics [J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2020, DOI: 10.1002/mas.21627.
- [3] EJSING C S, SAMPAIO J L, SURENDRANATH V, et al. Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(7): 2 136-2 141.
- [4] ZHAO C, GU D, NAMBOU K, et al. Metabolome analysis and pathway abundance profiling of *Yarrowia lipolytica* cultivated on different carbon sources[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 206: 42-51.
- [5] TAKAKU H, MATSUZAWA T, YAOI K, et al. Lipid metabolism of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(14): 6 141-6 148.
- [6] TAMPITAK S, LOUHASAKUL Y, CHEIRSILP B, et al. Lipid production from *Hemicellulose* and *Holocellulose Hydrolysate* of palm empty fruit bunches by newly isolated Oleaginous yeasts[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(6): 1 801-1 814.
- [7] SANKH S, THIRU M, SARAN S, et al. Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain [J]. *Fuel*, 2013, 106: 690-696.
- [8] 刘虎威, 白玉. 脂质组学及其分析方法[J]. *色谱*, 2017(1): 86-90.
- [9] 张婷婷. 极性脂质的质谱分析方法研究及其应用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2015: 5-9.
- [10] FERDOUSE J, YAMAMOTO Y, TAGUCHI S, et al. Glycosylceramide modifies the flavor and metabolic characteristics of sake yeast[J]. *PeerJ*, 2018, 6(9): e4768.
- [11] 王春龙. 红茶菌发酵饮料中的菌群分析与功能评价[D]. 天津: 天津科技大学, 2017: 25.
- [12] 努尔古丽·热合曼, 陈晓红, 董明盛. 新疆酸驼乳微生物种群结构的 PCR-DGGE 分析[J]. *食品科学*, 2010, 31(11): 136-140.
- [13] ALCAZAR-VALLE M, GSCHAEGLER A, GUTIERREZ-PULIDO H, et al. Fermentative capabilities of native yeast strains grown on juices from different Agave species used for tequila and mezcal production[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019, 50(2): 379-388.
- [14] JIAN M. Control of blue and green mold decay of citrus fruit by *Pichia membranifaciens* and induction of defense responses[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 135(1): 120-127.
- [15] 吴玥, 周峻岗, 吕红. 信号肽对木聚糖酶在马克斯克鲁维酵母中分泌表达的影响[J]. *复旦学报(自然科学版)*, 2017, 56(4): 446-454.
- [16] 侯胜博, 冯华良, 高教琪, 等. 马克斯克鲁维酵母的木糖和阿拉伯糖发酵[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(6): 923-935.
- [17] 杨文丹, 张宾乐, 庄靓, 等. 发酵麦麸对面包面团生化特征及烘焙学特性的影响[J]. *食品与机械*, 2018, 34(3): 6-11.
- [18] 邹奇波, 程新, 陈诚, 等. 混菌发酵酸面团对全麦面包风味与烘焙学特性的影响[J]. *食品与机械*, 2020, 36(4): 32-39.
- [19] HOUNG BÉDJI M, JOHANSEN P, PADONOU S W, et al. Occurrence of lactic acid bacteria and yeasts at species and strain level during spontaneous fermentation of mawè, a cereal dough produced in West Africa[J]. *Food Microbiology*, 2018, 76: 267-278.
- [20] CHAMNIPA N, THANONKEO S, KLANRIT P, et al. The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2018, 49(2): 378-391.
- [21] HONG S M, KWON H J, PARK S J, et al. Genomic and probiotic characterization of SJP-SNU strain of *Pichia kudriavzevii*[J]. *Amb Express*, 2018, 8(1): 80.
- [22] YUANGSAARD N, YONGMANITCHAI W, YAMADA M, et al. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(3): 577-588.
- [23] HISAMATSU M F T, KARITA S, MISHIMA T, et al. Isolation and identification of a novel yeast fermenting ethanol under acidic conditions[J]. *J Appl Glycosci*, 2006, 53(2): 111-113.
- [24] KITAGAWA T T K, SUGIYAMA H. Construction of a beta-glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(5): 1 841-1 853.

(下转第 58 页)

- of enoxacin and ofloxacin by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection in biofluids and drugs and its application to pharmacokinetics[J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(9): 941-947.
- [2] 林维宣. 各国食品中农兽药残留限量规定[M]. 大连: 大连海事大学出版社, 2002: 1 291-1 381.
- [3] KUMAR K, THOMPSON A, SINGH A K, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33(1): 250-256.
- [4] 陈志民, 卢军, 黄梅英, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法测定豆芽中恩诺沙星和环丙沙星[J]. *理化检验: 化学分册*, 2019, 55(8): 927-931.
- [5] 万位宁, 陈熹, 居学海, 等. 固相萃取—超高效液相色谱串联质谱法同时检测禽畜粪便中多种抗生素残留[J]. *分析化学*, 2013, 41(7): 993-999.
- [6] 陶进江, 潘桂根, 刘木华, 等. 基于表面增强拉曼光谱的鸭肉中己烯雌酚残留检测[J]. *食品与机械*, 2019, 35(2): 82-86, 195.
- [7] 徐念薇, 黄轶群, 赖克强. 基于表面增强拉曼光谱快速检测苹果汁中亚胺硫磷[J]. *食品与机械*, 2019, 35(5): 72-77.
- [8] 陈思, 郭平, 骆鹏杰, 等. 拉曼光谱法快速检测硬糖中的诱惑红[J]. *食品与机械*, 2016, 32(4): 76-79.
- [9] 卢丹, 赵武奇, 高贵田, 等. 基于二维相关技术的氯吡啶拉曼光谱分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2019, 39(5): 1 464-1 467.
- [10] 胡潇, 吴瑞梅, 朱晓宇, 等. 表面增强拉曼光谱结合二维相关谱快速检测茶叶中的毒死蜱残留[J]. *光学学报*, 2019, 39(7): 440-449.
- [11] 胡潇, 黄俊仕, 朱晓宇, 等. 二维相关光谱在大米中甲基毒死蜱特征变量优选的应用[J]. *分析测试学报*, 2019, 38(8): 946-952.
- [12] 温珍才. 基于分子光谱技术的茶树籽油掺杂检测方法研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2015: 82-89.
- [13] 陈达, 许云涛, 李奇峰, 等. 基于多尺度二维相关拉曼光谱的橄榄油掺杂检测[J]. *纳米技术与精密工程*, 2016, 14(1): 60-65.
- [14] NODA I. Advances in two-dimensional correlation spectroscopy[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2004, 36(2): 143-165.
- [15] 马君, 孔德地, 韩晓红. 应用银溶胶膜探测水中抗生素的表面增强拉曼光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2013, 33(10): 2 688-2 693.
- [16] 彭义杰. 应用表面增强拉曼光谱检测鸭肉中青霉素类抗生素残留的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2016: 18-19.
- [17] 杨仁杰, 刘蓉, 徐可欣. 二维相关光谱结合最小二乘法测定牛奶中的掺杂尿素[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(6): 259-263.
- [18] ZHANG Yuan-yuan, HUANG Yi-qun, ZHAI Fu-li, et al. Analyses of enrofloxacin, furazolidone and malachite green in fish products with surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(2): 845-850.
- (上接第 16 页)
- [25] HELLSTROM A M, VAZQUES-JUAREZ R, SVANBERG U, et al. Biodiversity and phytase capacity of yeasts isolated from Tanzanian togwa[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 136(3): 352-358.
- [26] FLORENTINA M R, ELENA B, GETUTA N, et al. Yeast biodiversity evolution over decades in Dealu Mare-Valea Calugareasca vineyard[J]. *Romanian Biotechnological Letters*, 2011, 16(1): 113-120.
- [27] MING Chun-yan, HUANG Jin, WANG Yan-yan, et al. Revision of the medically relevant species of the yeast genus *Diutina*[J]. *Medical Mycology Official Publication of the International Society for Human & Animal Mycology*, 2018, 57(2): 226-233.
- [28] 万力, 宋志霞, 杨芦荟, 等. 腹膜透析隧道阿萨希毛孢子菌感染 1 例[J]. *中国真菌学杂志*, 2018, 13(2): 93-94.
- [29] RAJU D S, SUGUNAN A, KEECHILATTU P, et al. Chemoport-related fungemia caused by *Trichosporon asahii*[J]. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 2020, 42(3): 393-400.
- [30] 冯静文. *Pichia amethionina* Y 的分离鉴定及去除豆腥味研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017: 27, 46.
- [31] 胡珺, 杜新凯, 王常高, 等. 产脂肪酶菌株的筛选鉴定及产酶条件优化[J]. *中国酿造*, 2016, 35(11): 39-43.
- [32] 贺秋红, 巩志金, 颜梅. 产脂肪酶菌株的筛选、鉴定及发酵培养基优化[J]. *中国酿造*, 2019, 38(10): 84-88.
- [33] GRÖSCH S, SCHIFFMANN S, GEISLINGER G. Chain length-specific properties of ceramides[J]. *Progress in Lipid Research*, 2012, 51(1): 50-62.
- [34] TSUJI K, MITSUTAKE S, ISHIKAWA J, et al. Dietary glucosylceramide improves skin barrier function in hairless mice[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2006, 44(2): 101-107.
- [35] RUPCIC J, MARIC V. Cerebrosides of *Candida lipolytica* yeast[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2004, 64(3): 416.
- [36] MEGYERI M, RIEZMAN H, SCHULDINER M, et al. Making sense of the yeast sphingolipid pathway[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(24): 4 765-4 775.
- [37] DICKSON R C, LESTER R L. Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1999, 1 438(3): 305-321.
- [38] KWUN K H, LEE J H, RHO K H, et al. Production of ceramide with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2006, 133(3): 203-210.