基于代谢组学解析解脂耶氏酵母高产赤藓糖醇突变菌株代谢产物的差异

付　为[1]，宁占国[2]，李　宁[2]，高学秀[2]，杨　帆[1]，李宪臻[1*]

（1. 大连工业大学 生物工程学院，辽宁 大连　116000；2. 山东星光首创生物科技有限公司，山东 乐陵　371481）

摘　要　为探究解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）高产赤藓糖醇突变菌株与原始菌株胞内代谢产物差异及调控机制，非靶向代谢组学采用超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱 UHPLC-Exploris240 系统，对突变菌株及其原始菌株发酵过程中的代谢产物进行差异性分析，共鉴定出 482 个差异代谢产物。随后通过 KEGG 通路富集分析发现，与该菌株赤藓糖醇合成相关的通路被显著富集，其中涉及与碳通量利用相关的通路，初步揭示了碳通量重新分配可能是影响该突变菌株赤藓糖醇产量提高的关键调控机制。同时，研究还表明辅助因子的强化对该突变菌株赤藓糖醇的合成具有协同增效作用。进一步分析发现，作为 *Y. lipolytica* 非氧化途径碳源的甘油在突变菌株胞内的含量升高，随后的发酵实验进一步证明，该突变菌株在混合碳源（甘油/葡萄糖）条件下赤藓糖醇产量可达 73.67 g/L，表明适当的外源甘油对突变菌株的赤藓糖醇合成具有一定的促进效果。本研究通过代谢组学分析，从代谢产物层面为解析 *Y. lipolytica* 赤藓糖醇合成过程中的代谢调控提供了思路，也为后续通过代谢工程策略进行菌株的理性改造从而提高赤藓糖醇合成能力提供了一定的依据。

关键词　解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）；赤藓糖醇；非靶向代谢组学；差异代谢产物；调控机制

中图分类号　Q939.9　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1005－7021(2026)03－0028－11

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2026.03.003

Metabolomics-Based Elucidation for Metabolic Product Differences in High-Erythritol-Producing Mutant Strain of *Yarrowia lipolytica*

FU Wei[1], NING Zhan-guo[2], LI Ning[2], GAO Xue-xiu[2], YANG Fan[1], LI Xian-zhen[1*]

(1. *Dalian University of Technology*, *Dalian* 116000;
2. *Shandong Starlight So True Biological Technology Co., Ltd*, *Laoling* 371481)

Abstract　Untargeted metabolomics analysis using a UHPLC-Exploris240 system was used to analyze intracellular metabolites and regulatory mechanisms between the high erythritol-producing mutant and wild-type strain of *Yarrowia lipolytica* during fermentation. A total of 482 significantly differential metabolites were identified. KEGG pathway enrichment analysis revealed that the pathways related to erythritol biosynthesis of this strain were significantly enriched, involving the pathways related to carbon flux utilization, which also preliminarily revealed that carbon flux redistribution may be a key regulatory mechanism affecting the increase of erythritol production of this mutant strain. In addition, the study also showed that the enhancement of the cofactor had a synergistic effect on erythritol synthesis in this mutant strain. Further analysis revealed that the intracellular content of glycerol, which can serve as a non-oxidative carbon source, significantly increased in the mutant strain. Subsequent fermentation experiments further demonstrated that under mixed carbon source (glycerol/glucose) conditions, the mutant strain achieved a higher erythritol yield of

基金项目：辽宁省教育厅重点攻关项目（LJKZZ20220061）

作者简介：付为　女，博士研究生。研究方向为发酵工程。E-mail：1228436570@qq.com

* 通讯作者。男，教授，博士，博士生导师。研究方向为发酵工程。E-mail：fu18840808926@163.com

收稿日期：2025-08-01

73.67 g/L. This indicates that appropriate exogenous glycerol has a certain promoting effect on erythritol synthesis in the mutant strain. Thus, this study provides insights into the metabolic regulation of erythritol synthesis in *Y. lipolytica* at the metabolite level through metabolomic analysis, and also offers a basis for the rational strain modification via metabolic engineering strategies to enhance erythritol production.

Keywords *Yarrowia lipolytica*; erythritol; untargeted metabolomics; differential metabolites; regulatory mechanism

赤藓糖醇是一种低热量、高耐受性的新型四碳糖醇,广泛存在于水果及发酵食品中[1-2]。赤藓糖醇独特的功能特性使其在众多领域有着广泛的应用。目前,赤藓糖醇已成为成熟的商用产品,其应用领域包括食品、医药、化妆品等,应用前景十分广阔[3-5]。赤藓糖醇主要通过微生物发酵生产,生产菌株多以耐高渗酵母为主[6-8]。解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)作为一种非传统型酵母,具有独特的耐高渗特性和高效的代谢能力,同时,因其基因编辑工具较为齐全且可利用多种底物的特性,使其在工业化赤藓糖醇生产中占据核心地位[9-10]。然而,环境中天然野生型菌株存在产物合成能力低、发酵过程中副产物较多以及菌株本身的工业属性弱等问题,使得赤藓糖醇的生产面临严峻挑战,因此对高产赤藓糖醇优良菌株的需求也变得尤为迫切[10]。近年来,诱变育种技术因成本低、操作简便且适用于工业规模化筛选的特点,在赤藓糖醇生产中展现出显著优势,目前通过诱变选育已成功获得多株高产赤藓糖醇突变菌株[11-12]。但对于高产赤藓糖醇突变菌株胞内生理特点和分子调控机制尚不清晰,难以进一步在分子层面进行合理改造以提高菌株的生产能力,因此对微生物合成、代谢赤藓糖醇机制的探索变得尤为重要。代谢组学是以小分子代谢物为研究对象的分析技术,通过检测生物体受外界刺激后代谢产物的动态变化,揭示代谢网络的变化与表型的关联[13]。代谢组学技术的核心在于分析代谢产物的组成及其变化规律,通过定位差异代谢产物参与的代谢通路,从而阐明突变菌株背后的调控机制[14]。生物体在受到外界条件如紫外线(UV)和常压室温等离子体(ARTP)刺激时,其酶活性或代谢产物浓度很大程度上会发生改变,由于代谢产物能直接反映细胞即时的功能状态,因此代谢组学能够更灵敏地识别出代谢网络的动态变化,使得代谢组学分析更具揭示细胞实时代谢变化的优势[15-17]。相较于靶向检测,非靶向代谢组学采用高分辨率质谱对样本进行无偏向性检测,更强调全局分析能力。近年来,该技术已得到广泛应用,为揭示生命活动的调控规律提供了新视角[18-20]。目前,对于 *Y. lipolytica* 生产赤藓糖醇已有较多研究,通过代谢工程手段改造 *Y. lipolytica* 从而提高赤藓糖醇产量的研究已取得显著成效[21-23]。其中,为突破野生型 *Y. lipolytica* 的代谢瓶颈,诱变手段常被用于野生型菌株的改造[11-12],再通过组学方法解析突变菌株的高产机制。相比于反映 mRNA 表达水平的转录组学,代谢组学则通过直接检测菌株的代谢产物,从而反映基因表达及环境响应的综合结果。目前,代谢组学在微生物的研究中已有较多应用,如通过对代谢产物的探究解析了微生物胞内的代谢机制[24-25]。Campos 等[26]在酿酒酵母中通过代谢组学方法阐明了木糖利用及相关产物的动态变化,为后续菌株的代谢调控提供了理论依据。陈淑怡[27]通过代谢组学检测了不同发酵条件下 *Y. lipolytica* 生产赤藓糖醇时的胞内代谢产物,为赤藓糖醇的高产研究提供了参考。此外,也有研究对 *Y. lipolytica* 中阿拉伯醇脱氢酶和果糖激酶过表达,以及敲除甘露醇脱氢酶基因,通过检测关键代谢产物阿拉伯醇、甘露醇和赤藓糖醇的含量,最后得出该策略可行性的结论,为减少副产物生成和提高碳源向赤藓糖醇合成方向的转化提供了思路[28]。尽管代谢组学在菌株代谢机制解析中的应用占比仍低于转录组学,但由于代谢组学具有直接关联表型、动态响应快、功能注释直观的优势,近年来该技术的应用呈逐渐增长趋势。本研究通过代谢组学技术解析了 *Y. lipolytica* 高产赤藓糖醇突变株与原始菌株在发酵过程中代谢产物的差异,该研究与转录组学分析诱变菌株高产机制的方法相比,代谢组学技术可直接将代谢产物的变化与突变菌株的高产表型关联,能更直接地阐明影响突变菌株赤藓糖醇产量的关键代谢通路及导致赤藓糖醇合成能力提高的调控机制,从而为开发新型

基因编辑靶点提供技术支撑,也为构建高产赤藓糖醇的工程菌株提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 原始菌株 *Yarrowia lipolytica* CICC 33063,保藏于中国工业微生物菌种保藏管理中心;突变菌株 *Yarrowia lipolytica* LX-01 由大连工业大学生物工程学院诱变获得,保藏于中国典型培养物保藏中心,菌种保藏编号为 CCTCC M 20221124。

1.1.2 培养基 YPD 培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 20,酵母浸粉 10,固体培养基添加琼脂粉 20,pH 6;初始发酵培养基(g/L):葡萄糖 260,柠檬酸铵 5.0,酵母提取物 8.0,$MgSO_4$ 0.5,K_2HPO_4 1.0,$CuCl_2$ 0.05,pH 自然;双碳源发酵培养基(g/L):葡萄糖 160,甘油 100,柠檬酸铵 5.0,酵母提取物 8.0,$MgSO_4$ 0.5,KH_2PO_4 1.0,$CuCl_2$ 0.05,pH 自然。所有培养基均采用高温高压灭菌,115 ℃,30 min。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 葡萄糖、蛋白胨、酵母浸粉、柠檬酸铵、琼脂粉、$MgSO_4$、K_2HPO_4、$CuCl_2$,以上药品除非另有说明,均购自天津市科密欧化学试剂有限公司。超净工作台(ZHJH-C1109B,上海智城分析仪器制造有限公司);双层全恒温摇床(ZWY-2102C,北京科普顺科技有限公司);高速冷冻台式离心机(Centrifuge 5804 R,德国艾本德股份公司);安捷伦液相色谱系统(1260 Infinity II,美国安捷伦科技公司);UHPLC-Exploris240 系统(美国赛默飞公司);台式快速离心浓缩干燥器(LNG-T88 型,太仓市华美生化仪器厂);超声波清洗机(SBL-10DT 型,300W-10L,宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 将保存于 -80 ℃的原始菌株 *Y. lipolytica* 及其突变菌株甘油管用接种环挑取一环,分别划线于 YPD 固体培养基,30 ℃恒温培养 72 h 进行复苏活化。挑取活化后的原始菌株及突变株单菌落,分别转接至 YPD 液体培养基中,30 ℃、200 r/min振荡培养 22 h 获得种子液,随后将种子液接入初始发酵培养基,30 ℃摇床发酵培养 96 h。发酵终止后,取培养液经 5 000 × g 离心 10 min,去除上清液并用无菌水洗涤菌体以清除培养基中残留物质,重复 3 次洗涤后收集菌体。

1.2.2 样品处理 取(100 ± 5) mg 原始菌株和突变株菌体于离心管中,添加研磨珠及 400 μL 提取液(*V* 甲醇:*V* 水 = 4:1)用于代谢产物提取。采用冷冻研磨装置(-10 ℃,50 Hz)破碎 6 min,低温(5 ℃)超声处理(40 kHz)0.5 h。随后,4℃条件下 13 000 × g 离心 15 min,收集上清液待测。

1.2.3 色谱和质谱采集条件 采用 UHPLC-Exploris240 系统,配备 ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm × 2.1 mm i.d., 1.8 μm; Waters, Milford, USA)色谱柱进行代谢产物检测;色谱条件:流动相 A 由 95% 水与 5% 乙腈组成(含 0.1% 甲酸),流动相 B 为 47.5% 乙腈、47.5% 异丙醇和 5% 水(含 0.1% 甲酸);色谱柱温度 40 ℃;进样体积 3 μL。质谱条件:质谱检测采用双极性扫描(正离子 + 负离子),质量数采集区间为 70 ~ 1 050 Da;鞘气流速 60 arb;辅助载气 20 arb;加热温度 350 ℃。

1.2.4 赤藓糖醇产量的测定 赤藓糖醇浓度检测采用高效液相色谱法(HPLC)法。分别取原始菌株及其突变株发酵液 1 mL,经离心处理(5 000 × g,10 min)后收集上清液,将上清液经去离子水稀释 5 倍,0.22 μm 滤膜过滤后作为待测样品。色谱分析使用 Agilent 1260 系统,配备氨基糖分析柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 35 ℃,流动相为 *V* 乙腈:*V* 水 = 8:2,流速 1 mL/min。检测采用示差折光检测器,进样体积 10 μL。

1.2.5 菌株生物量的测定 分别取 1 mL 原始株和突变株发酵液,5 000 × g 离心 10 min,去离子水洗涤 2 次,80 ℃干燥至恒重测定细胞干重(DCW)。

1.2.6 数据处理与统计分析 所有试验除另有说明外,均重复 3 次,结果以平均标准差(SD)表示。使用 SPSS 25.0 进行方差分析,采用独立样本 *t* 检验($P < 0.05$)进行显著性差异检验。

2 结果与分析

2.1 代谢组学样品的制备

为了评估高产赤藓糖醇突变菌株及其原始菌株发酵过程中的差异,在含有 30 mL 初始发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中进行突变菌株与原始菌

株的发酵培养，检测二者的生物量和赤藓糖醇产量。如图 1 所示，与原始菌株相比，突变菌株在单位时间内能够产生更高的赤藓糖醇产量，但其生物量较低且生长缓慢。研究表明，赤藓糖醇产量的增加通常与细胞生长减弱有关[22]，因此推测，诱变处理可能改变了突变菌株的代谢途径，将更多的能量和资源重新分配到赤藓糖醇合成中而不是促进细胞生长，从而导致相对较低的生物量产量却有着较高的赤藓糖醇产量。为了解突变菌株与原始菌株的代谢产物差异从而探究突变菌株高产赤藓糖醇的机制，将收集的发酵 96 h 的突变菌株与原始菌株经液氮冷冻后进行干冰封存，邮寄至上海美吉生物公司进行菌株胞内代谢产物分析，每个样本设置 6 个平行。

2.2　代谢组学质量控制（Quality Control，QC）分析

在进行质控分析时，取等体积的所有样本混合制备成质控样本，并在 UHPLC-Q Exactive HF-X 分析系统中插入 QC 样本，以考察整个分析过程的重复性。随后，分别在正负离子模式下对原始菌株及突变菌株的代谢产物进行非靶向检测，并将数据进行归一化处理，以便进行不同量级数据间的比较分析。图 2A 显示了组内样本在象限内聚集，表明组内化学成分相似且质量稳定；而组间样本呈现分离，反映了不同菌株代谢产物的差异。图 2B 显示了 QC 样本在分析流程中虽受系统误差影响，但其在 PLS-DA 图中 QC 样本的紧密空间分布表明系统误差控制在可接受范围，该模型为后续分析提供了高置信度的数据支持。

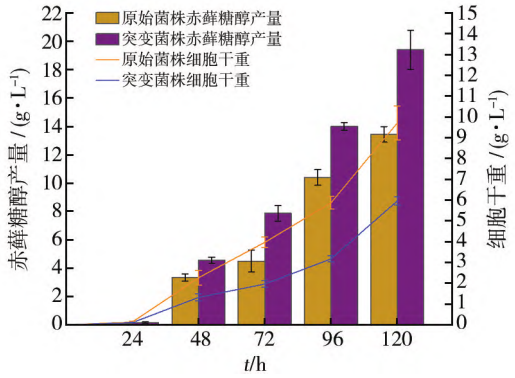


图 1　发酵过程中原始菌株和突变菌株赤藓糖醇产量和细胞干重（DCW）

Fig. 1　Erythritol production and DCW of wild-type and mutant strains during fermentation

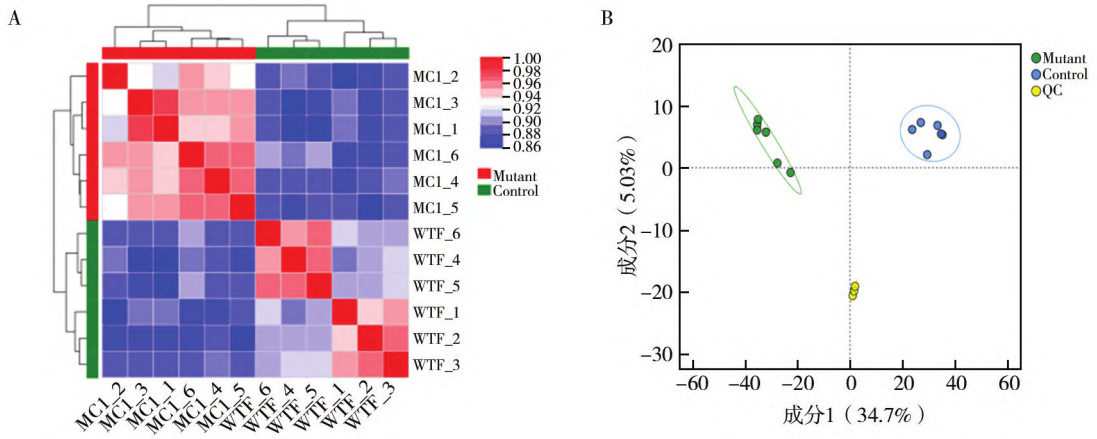


图 2　样品间相关性分析及偏最小二乘判别分析图（PLS-DA）

Fig. 2　Inter-sample correlation analysis and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) plot

A：样品间相关性热图；B：偏最小二乘判别分析图

A：Correlation heat map between samples；B：PLS-DA score plot

如图 3 所示，实验组（突变菌株）与对照组（原始菌株）的代谢产物在 OPLS-DA 得分图中呈现显著分离，表明诱变处理使菌株发酵过程中的代谢产物发生改变。模型置换检验图验证结果显示 R^2 值均高于 Q^2，且 Q^2 回归线与 y 轴截距为 −0.258 8，证实模型拟合度良好且具备较强预测能力。

2.3　代谢产物基于 KEGG 数据库的分类

京都基因与基因百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）化合物分类是

按照代谢产物参与的生物学功能等级划分，通过KEGG 系统化的注释体系有助于进行数据挖掘及生物学意义的分析。按照 KEGG 数据库中的生物学功能分对检测到的代谢产物进行注释，发现代谢产物富集最多的代谢通路主要包括氨基酸代谢、碳水化合物代谢、羧酸、维生素和辅助因子通路。氨基酸对于各种细胞功能和能量来源都非常重要，氨基酸信号不仅调控单个细胞的生长和分裂，同时还是细胞快速应激反应的必要因素，氨基酸可通过调控酶活性、参与能量代谢等途径影响菌株代谢[29-30]。碳水化合物代谢中核酮糖、木酮糖、赤藓糖、葡萄糖和甘油等物质在赤藓糖醇合成过程中均具有重要作用。其中核酮糖和木酮糖为磷酸戊糖途径（pentose phosphate pathway，PPP）中重要的中间产物，可转化赤藓糖醇合成途径中的重要物质 5-磷酸核酮糖（Ribulose-5-phosphate，Ru5P）和 5-磷酸木酮糖（Xylulose-5-phosphate，Xu5P）；赤藓糖为赤藓糖醇的前体物质，可在赤藓糖醇还原酶的作用下生成赤藓糖醇；而葡萄糖和甘油为 *Y. lipolytica* 合成赤藓糖醇的碳源，为菌株的生命活动提供营养物质[11,31]。羧酸代谢中的琥珀酸、延胡索酸、苹果酸和柠檬酸等是三羧酸（tricarboxylic acid，TCA）循环中两种重要的羧酸类物质，突变菌株 TCA 循环中羧酸类物质的变化反映出诱变处理对 TCA 循环产生了影响。在维生素和辅助因子途径中，代谢产物主要包括硫胺素、硫胺素焦磷酸（TPP）和腺嘌呤核苷三磷酸（ATP）等物质，其中 TPP 是许多关键酶的辅因子，涉及众多代谢途径且对于维持细胞生长和抵御代谢胁迫至关重要[32]；ATP 是直接能源物质，对细胞的生长及代谢具有重要作用[33]。

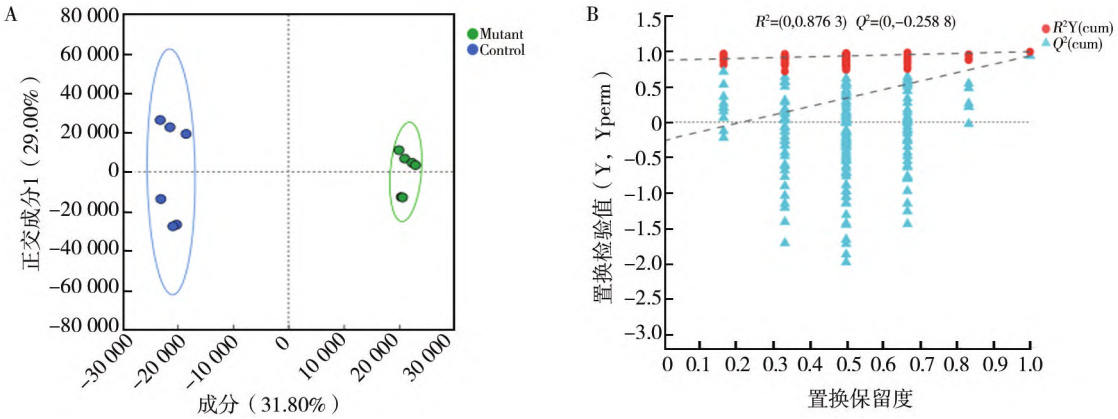


图 3 正交偏最小二乘判别分析得分图（OPLS-DA）及模型置换检验图

Fig. 3 Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) score plot and permutation test plot

A：OPLS-DA 得分图；B：代谢产物置换图

A：OPLS-DA score plot ; B：Permutation validation plot of the OPLS-DA model

2.4 突变菌株及原始菌株发酵过程中差异代谢产物统计

通过 OPLS-DA 分析中代谢产物的 VIP 值和单变量分析中的 *P* 值进行差异代谢产物的筛选，并通过火山图可视化呈现差异代谢产物的分布特征。图 4A 所示的火山图分析呈现了菌株经诱变处理后的差异代谢产物的特征分布。其中，红色标记表示显著上调物质，蓝色标记表示显著下调物质，标记尺寸与变量重要性参数（VIP）呈正相关。如图 4B 所示，共鉴定出 482 个差异代谢产物，其中 244 个呈上调趋势，238 个呈下调趋势，这种代谢产物组成的动态变化不仅揭示了诱变处理对菌株代谢网络的影响，也为筛选目标代谢产物及开展 KEGG 通路富集研究奠定了数据基础。

2.5 差异代谢产物 KEGG 通路富集分析

为了表明诱变处理对突变菌株代谢途径的影响从而与其高产表型进行关联，对筛选出的差异代谢产物进行了 KEGG 通路富集分析，并绘制通路富集气泡图。

图 5 为采用气泡图对差异代谢产物进行的可视化呈现，显示了诱变处理对菌株发酵代谢产物产生的影响。TCA 循环是需氧生物主要的分解

代谢过程,该途径产生大量自由能来支持菌株生长和代谢需求,差异代谢产物在 TCA 循环中的积累表明了诱变处理影响了 TCA 循环的正常运行,进而影响了菌株的生长和代谢,这与图 1 中显示的突变菌株较低的生物量一致。此外,差异代谢产物在氨基酸合成代谢途径也得到了积累,生命最基本的特征是新陈代谢,氨基酸合成代谢途径是细胞中物质新陈代谢的主要途径,该途径将能量生成与物质代谢紧密结合在一起。其中,丙氨酸是细胞内等渗调节的主要相容性渗透物,与细胞适应高渗等胁迫条件有关[34],而精氨酸和天冬酰胺与细胞抵御胁迫有关[35-36]。Lei 等[37]研究发现,一些氨基酸如天冬氨酸、赖氨酸的水平变化有利于提高 Hsp12 的表达水平和细胞内海藻糖的积累,从而提高酵母的抗胁迫能力。ABC 转运蛋白是一类依赖 ATP 且广泛参与代谢产物输入与输出的跨膜转运体,ABC 转运蛋白可运输糖类、氨基酸、脂质等营养物质,同时排出毒性代谢产物来维持细胞内环境稳态[38-40],差异代谢产物在 ABC 转运蛋白途径中富集,因此推测 ABC 转运蛋白可能与赤藓糖醇的分泌和运输有关。此外,PPP 是赤藓糖醇合成的主要途径,该途径通过氧化分支生成 NADPH 和非氧化分支提供赤藓糖醇的直接前体赤藓糖-4-磷酸(Erythrose-4-phosphate, E4P)[41]。差异代谢产物在 PPP 中的富集表明了诱变处理影响了该途径的正常进行,由于 PPP 是赤藓糖醇的主要合成途径,因此会影响菌株对赤藓糖醇的合成能力。尽管该途径富集分析并不显著($P = 0.12$),这可能源于该通路代谢物在本研究检测平台上的高覆盖率导致其背景比例较高,因而需要更多数量的差异代谢产物才能达到富集标准。

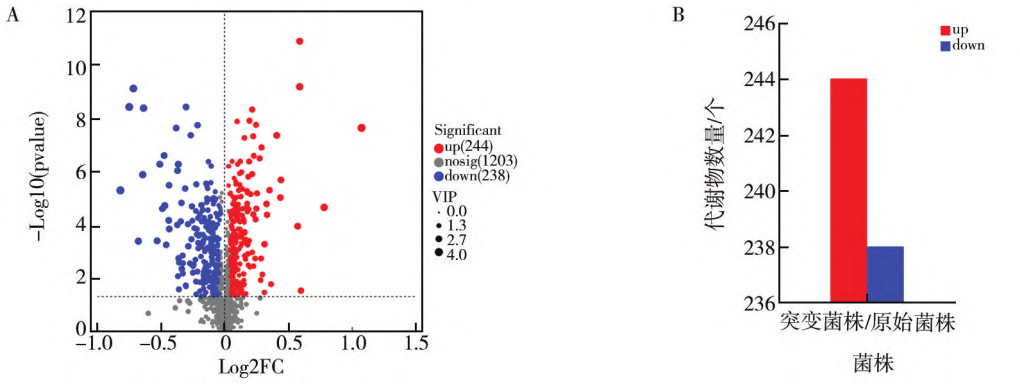


图 4 突变菌株及原始菌株差异代谢产物统计及火山图

Fig. 4 Statistical of differential metabolites and volcano plot for mutant strain and wild-type strain

A:差异代谢产物火山图; B:差异代谢产物统计

A: Volcano plot of metabolites; B: Statistical of differential metabolites

2.6 关键代谢产物聚类热图和 KEGG 通路富集分析

在特定的实验背景下,代谢产物相对含量的变化是为了响应实验处理呈现出特定的变化趋势,为了解关键差异代谢产物的相对含量以及所涉及的代谢通路,本研究对其进行了聚类富集和 KEGG 通路富集分析。

由图 6 可知,与赤藓糖醇合成相关的关键代谢产物主要富集在糖酵解(Embden-Meyerhof-Pamos,EMP)、PPP 及 TCA 循环中。如图 6A 所示,TCA 循环中的延胡索酸、琥珀酸、苹果酸含量呈上升趋势,说明诱变处理使 TCA 循环代谢能力减弱,导致相关物质不能及时代谢而在 TCA 循环中积累。此外,突变菌株 EMP 途径中的 6-磷酸葡糖酸(6-Phosphogluconate,6-PG)含量显著下降,6-PG是 PPP 途径中通过酶催化 6-磷酸葡萄糖获得,6-PG 经 6-磷酸葡糖酸脱氢酶(6-Phosphogluconate Dehydrogenase,6PGDH)可脱羧生成 Ru5P 和 NADPH,从而间接支持赤藓糖醇合成[42]。同时,6-PG 也是 PPP 氧化阶段的关键中间体。在突变菌株中,诱变处理使 6-PG 被更多的消耗进而增加了 NADPH 和 Ru5P 的供应,6-PG 含量的变化对赤藓糖醇的生成起到关键作用。从图 6 中还观察到 PPP 中与赤藓糖醇合成密切相关的物质

Ru5P 和 Xu5P 含量也发生了变化，二者可通过一系列的酶反应生成赤藓糖-4-磷酸（Erythrose 4-phosphate，E4P），从而与赤藓糖醇的合成之间存在高度的关联性。同时，突变菌株中 3-磷酸甘油酸（3-PGA）含量显著增加，3-PGA 涉及糖酵解/糖异生、PPP 以及甘油酯代谢等代谢途径，EMP 过程以 3-PGA 为起始物质，经过酶的催化反应可逐步转化为有利于提高酵母的抗协迫能力的丝氨酸[38]。此外，3-PGA 由 1，3-二磷酸甘油酸经磷酸甘油酸激酶催化生成，可通过底物水平磷酸化直接产生 ATP，这是 EMP 中首个 ATP 生成步骤，可为后续生物反应提供能量[42]。与原始菌株相比，突变菌株中甘油含量呈上升趋势，表明突变菌株通过代谢途径合成了更多的甘油从而在胞内积累，推测甘油作为 *Y. lipolytica* 非氧化途径的碳源，对菌株赤藓糖醇的产生具有重要影响。突变菌株中硫胺素含量也表现为上升趋势，基于前面分析中硫胺素的重要性，说明一些辅因子对突变菌株中赤藓糖醇的产生具有一定作用。同时，赤藓糖醇生产过程中以 E4P 为前体物质生成的分支酸（如酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸）的含量呈下降趋势，表明突变菌株减少了赤藓糖醇前体物质 E4P 的消耗，更多的分配给合成赤藓糖醇的方向，从而有助于突变菌株中赤藓糖醇产量的提高[32]。

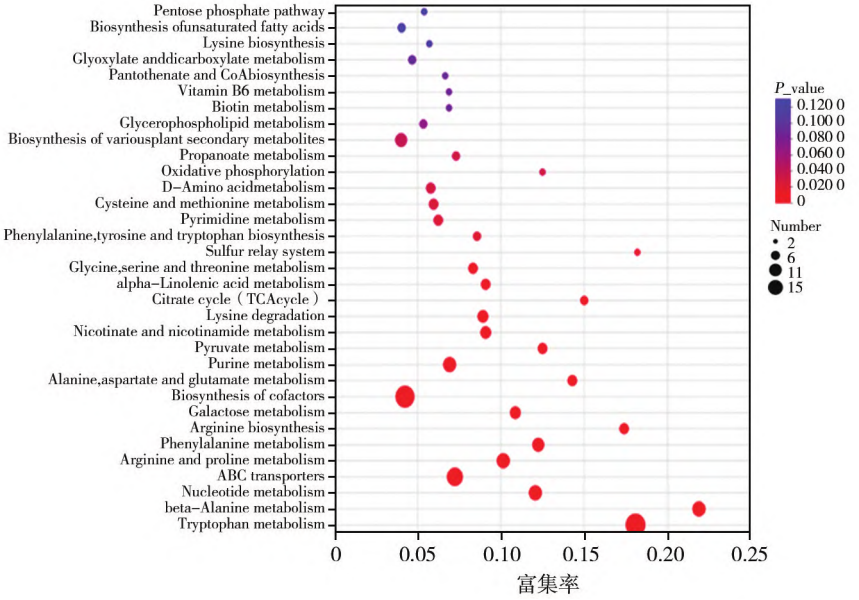
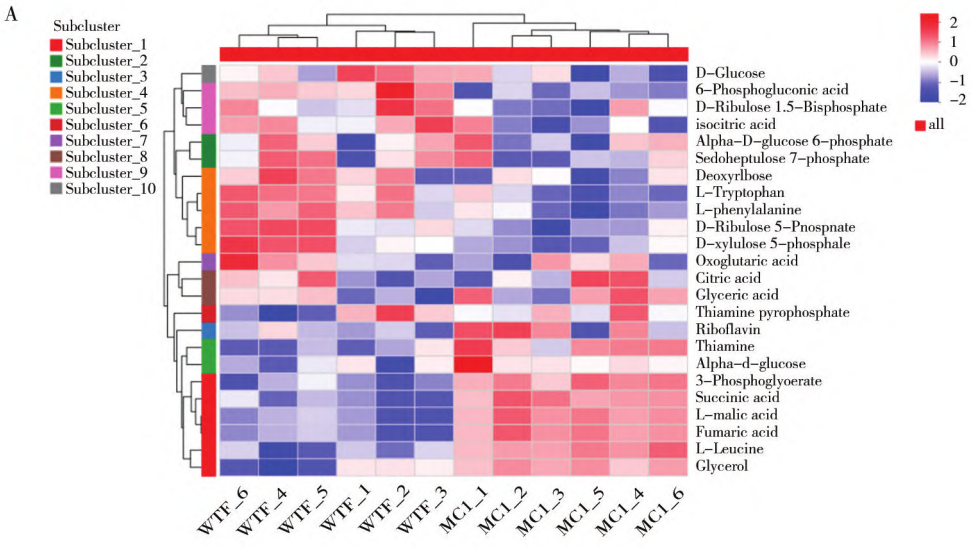


图 5　差异代谢产物 KEGG 通路富集分析

Fig. 5　KEGG pathway enrichment analysis of differential metabolites



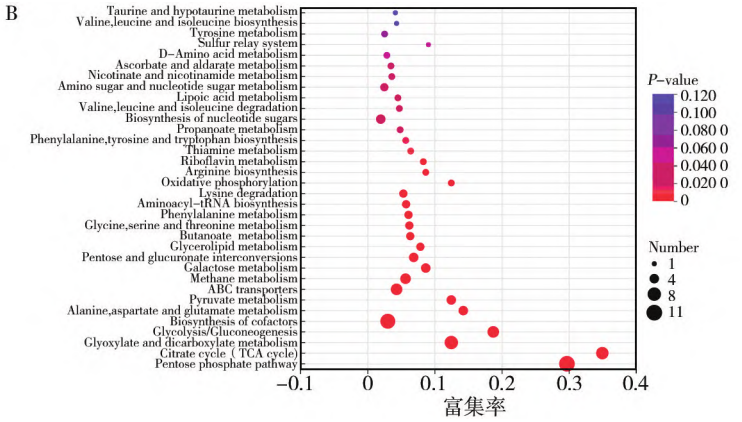


图 6　关注代谢产物的聚类热图(A)及 KEGG 通路富集分析(B)

Fig. 6　Clustering heatmap of target metabolites(A) and KEGG pathway enrichment analysis(B)

WTF_1 ~ WTF_6 表示为原始菌株的 6 个平行样品；MC1_1 ~ MC1_6 表示为突变菌株的 6 个平行样品

WTF_1-WTF_6 represent six parallel samples of the original strain; MC1_1-MC1_6 represent six parallel samples of the mutant strain

图 7 为 *Y. lipolytica* 中赤藓糖醇合成通路图。*Y. lipolytica* 通过中心碳代谢途径完成碳源葡萄糖的分解与转化，该途径主要包括 EMP、TCA 循环和 PPP，为糖的三个主要代谢途径，也可作为细胞的生化前体和能量供应途径[43]。葡萄糖经跨膜转运进入胞内后，通过 EMP 氧化分解为丙酮酸并生成 ATP，丙酮酸进一步进入 TCA 循环释放大量还原当量，并通过氧化磷酸化形成 ATP 构成生物体核心能量代谢体系，这是核心能量供应途径，也是生物体获取能量的主要方式之一。PPP 是葡萄糖氧化分解的另一个具有重要生理作用的代谢途径，在葡萄糖代谢流的 G6P 节点处分流产生，并与 EMP 共同构成葡萄糖氧化分解的分支代谢途径[42]。PPP 与 EMP 之间存在着密切的联系，它们通过共享中间产物和相互转换机制，共同参与细胞代谢活动，以满足不同生理需求，为细胞提供能量和合成所需的重要生理物质。此外，PPP 还以 NADPH 的形式为细胞反应提供还原力，也为核苷酸和氨基酸的生物合成提供前体，以缓解还原力不足对赤藓糖醇合成的限制[44-45]。诱变作用使突变菌株中 TCA 循环、EMP 以及 PPP 途径中积累了差异代谢产物，说明诱变影响了这些途径的正常进行，由于这三条途径是碳通量利用的主要通路，因此突变菌株中碳通量的分布可能受到影响而进行重新分配，最终导致突变菌株的赤藓糖醇产量升高。此外，由藓糖醇合成途径可知，甘油是 *Y. lipolytica* 通过非氧化途径生成赤藓糖醇的可用碳源，在该途径下，甘油通过甘油激酶对甘油进行利用，随后在 TIM 以及 TKL 等关键酶的作用下，通过非氧化途径直接合成赤藓糖醇的前体物质 E4P。由于突变菌株胞内甘油含量升高，所以推测甘油可能在突变菌株高产赤藓糖醇表型改变中起到不可或缺的作用。

2.7　突变菌株在双碳源条件下的发酵

为了探究突变菌株高产表型与甘油介导菌株非氧化途径的关联，本研究在保证总碳源不变的情况下，在初始培养基中添加了部分甘油，检测突变菌株的赤藓糖醇产量。

由图 8 可知，在保证总碳源含量不变的前提下，突变菌株在添加 10% 甘油的培养基中，单位时间内的赤藓糖醇产量增加，表明甘油的存在会对突变菌株赤藓糖醇的合成产生影响，这对于代谢组学得到的高产突变菌株与原始菌株胞内代谢产物甘油量的差异有很好的指向性。当发酵 192 h 时，突变菌株在添加 10% 甘油的培养基中赤藓糖醇产量为 73.67 g/L，高于葡萄糖培养基中的赤藓糖醇产量(42.13 g/L)和甘油培养基中的赤藓糖醇产量(61.67 g/L)。这与 Sparling 等[46]的研究结果类似，该研究表明了当使用适当的混合碳源发酵时，代谢产物脂质的产量会优于单独碳源的发酵结果。同时，本研究发现培养基中添加的甘油会优先于葡萄糖而被消耗，这与 Sparling 等的研究结果也保持一致。双碳源发酵实验表明，

培养基中添加甘油可使突变菌株在同等发酵条件下有着更高的赤藓糖醇产量，进一步证明了甘油对于突变菌株赤藓糖醇产量的提高可能起到关键性作用。

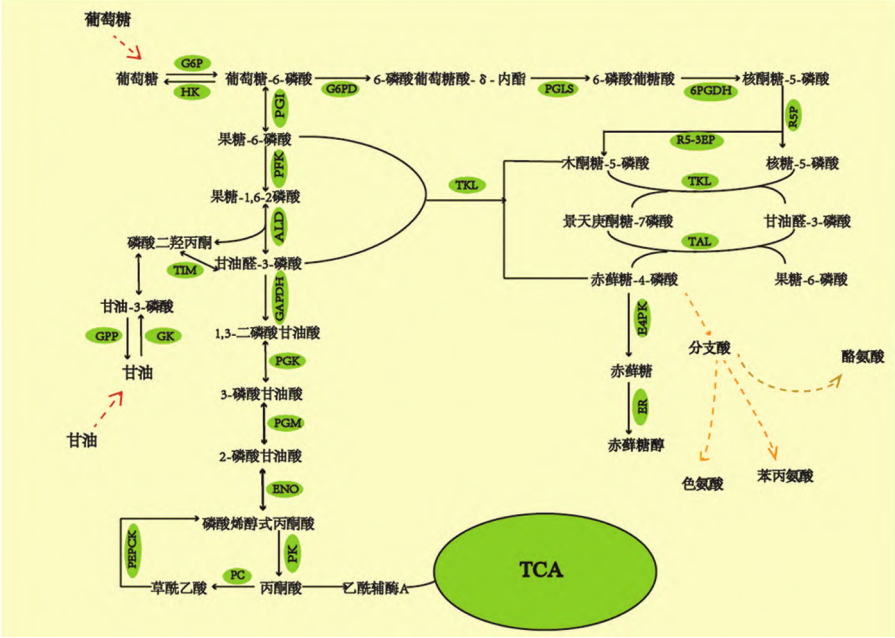


图 7　解脂耶氏酵母中赤藓糖醇合成途径

Fig. 7　Erythritol biosynthetic pathway in *Yarrowia lipolytica*

HK：己糖激酶；G6P：葡萄糖-6-磷酸酶；G6PD：葡萄糖-6-磷酸脱氢酶；PGLS：6-磷酸葡萄糖酸内酯酶；6PGDH：6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶；PGI：磷酸葡萄糖异构酶；GK：甘油激酶；PFK：磷酸果糖激酶；TKL：转酮酶；TAL：转醛酶；TIM：磷酸丙糖异构酶；GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶；E4PK：赤藓糖-4 磷酸激酶；PGK：磷酸甘油酸激酶；PGM：磷酸甘油酸变位酶；ENO：烯醇化酶；ER：赤藓糖还原酶；PEPCK：磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶；PK：丙酮酸激酶；PC：丙酮酸羧化酶；RPI：核糖-5-P 异构酶；ALD：醛缩酶

HK: Hexokinase; G6P: Glucose-6-phosphatase; G6PD: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; PGLS: 6-Phosphogluconolactonase; 6PGDH: 6-Phosphogluconate dehydrogenase; PGI: Phosphoglucose isomerase; GK: Glycerol kinase; PFK: Phosphofructokinase; TKL: Transketolase; TAL: Transaldolase; TIM: Triosephosphate isomerase; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; E4PK: Erythrose-4-phosphate kinase; PGK: Phosphoglycerate kinase; PGM: Phosphoglycerate mutase; ENO: Enolase; ER: Erythritol reductase; PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase; PK: Pyruvate kinase; PC: Pyruvate carboxylase; RPI: Ribose-5-phosphate isomerase; ALD: Aldolase

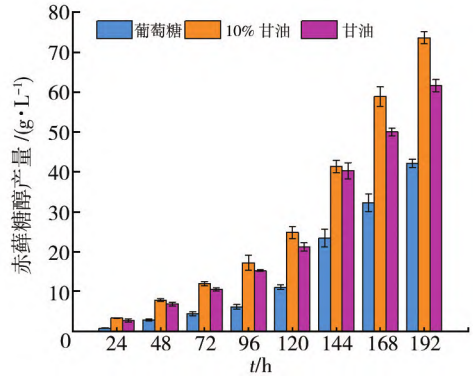


图 8　双碳源发酵模式下突变菌株的赤藓糖醇产量

Fig. 8　Erythritol production by mutant strain under dual carbon source fermentation mode

3　讨　论

本研究以 *Y. lipolytica* 高产赤藓糖醇突变菌株及其原始菌株为研究材料，探讨发酵过程中胞内代谢产物的差异。代谢组学结果显示，原始菌株和突变菌株的发酵代谢产物存在显著差异，与赤藓糖醇合成相关的代谢途径被显著富集，主要包括与碳通量利用相关的代谢通路如 EMP、PPP、TCA 循环，初步揭示了碳流的平衡改变对突变菌株赤藓糖醇产量的影响。代谢组学还揭示了硫胺素活性辅酶 TPP 等辅因子对赤藓糖醇的合成的可能影响。此外进一步发现，甘油在突变菌株胞内含量升高，且发酵结果也表明了在混合碳源

(甘油/葡萄糖)条件下发酵的赤藓糖醇产量最高,说明外源添加适量的甘油可强化突变菌株中赤藓糖醇的合成。基于此,推测突变菌株可能在分子水平上调控了突变菌的代谢途径,从而使甘油对赤藓糖醇的生物合成发挥调控作用,最终实现赤藓糖醇产量的增加。该发现为赤藓糖醇生产菌株的代谢工程改造提供了新的视角(如构建甘油响应型启动子、开发双碳源适配调控模块等),并阐明了微生物碳源的协同利用对产物的影响。

目前,*Y. lipolytica* 作为国内外生产赤藓糖醇的核心菌株已被广泛应用,对其进行的代谢工程改造也取得了显著成效。研究人员期望在现有基因改造靶点的基础上,能进一步探索出新的关键基因,以实现赤藓糖醇合成强度的提高。当前,新靶点的挖掘多依赖转录组学与蛋白组学[47-48],但存在一定局限性,如当生物体受到环境刺激时,生物体在基因转录和蛋白质翻译这两个层面,可能不会立即出现快速可观测的变化,导致基于基因转录及翻译水平进行的相关探索可能无法快速获得理想结果。相反,外界刺激对酶活性及代谢产物含量往往产生较大的影响,因此基于代谢产物分析的代谢组学更能体现细胞的实时动态变化,其通过直接检测代谢产物,可反映基因表达及环境响应的综合结果[49]。近年来,由于非常规菌株 *Y. lipolytica* 生产赤藓糖醇的调控机制尚不完全清晰,且鲜有研究从代谢产物角度对调控机制进行探究,因此在一定程度上制约了赤藓糖醇的相关研究。为此,本研究基于代谢组学对突变菌株发酵过程中的胞内代谢产物进行分析,初步探究突变菌株赤藓糖醇的高产机制,为解析赤藓糖醇合成代谢网络调控机制提供思路,也为后续菌株改造以提高赤藓糖醇产量提供参考。

参考文献:

[1] 杨文丽. 基于蔗糖原料的赤藓糖醇工程菌株构建[D]. 济南:齐鲁工业大学,2023.

[2] Mandar SD, Pranav PK, Pramod SK, et al. Erythritol production from sugar based feedstocks by *Moniliella pollinis* using lysate of recycled cells as nutrients source[J]. Process Biochemistry, 2021, 112: 45-52.

[3] 张妍,张丽,李宝磊,等. 赤藓糖醇的国内外研究进展[J]. 饮料工业,2022,25(5): 76-79.

[4] Daza-Serna L, Serna-Loaiza S, Masi A, et al. From the culture broth to the erythritol crystals: An opportunity for circular economy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(10): 4467-4486.

[5] Nakagawa Y, Kasumi T, Ogihara J, et al. Erythritol: Another C4 platform chemical in biomass refinery[J]. ACS Omega, 2020, 5(5): 2520-2530.

[6] 刘芳美, 赵学群, 沙如意, 等. 赤藓糖醇微生物合成研究进展[J]. 生物加工过程, 2022, 20 (2): 195-205.

[7] Khatape AB, Rangaswamy V, Dastager SG. Strain improvement for enhanced erythritol production by Moniliella pollinis Mutant-58 using jaggery as a cost-effective substrate[J]. International Microbiology, 2023, 27(2): 581-596.

[8] 姚丰. 高产赤藓糖醇解脂耶氏酵母菌株的筛选鉴定及发酵工艺优化[D]. 上海:华东理工大学, 2020.

[9] 李砷, 牟志勇, 严鑫, 等. 解脂耶氏酵母产赤藓糖醇研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44 (17): 196-203.

[10] Huang LG, Xiao BW, Wang JW, et al. Advances in efficient biosynthesis of erythritol by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40 (3): 665-686.

[11] Rywińska A, Tomaszewska-Hetman L, Juszczyk P, et al. Enhanced production of erythritol from glucose by the newly obtained UV mutant *Yarrowia lipolytica* K1UV15[J]. Molecules, 2024, 29(2): 630-643.

[12] 赵静宇,陈泉,马琳琳,等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变介导的赤藓糖醇生产菌的筛选与优化[J]. 生物加工过程, 2022, 20(3): 263-269.

[13] Horak I, Engelbrecht G, Van Rensburg PJJ, et al. Microbial metabolomics: Essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing Bacillus species as bionematicides [J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(2): 326-343.

[14] Griffin JL. Twenty years of metabonomics: So what has metabonomics done for toxicology? [J]. Xenobiotica, 2020, 50(1): 110-114.

[15] 沈央红, 方金玉, 朱军莉, 等. 代谢组学在食品质量安全领域的应用进展[J]. 食品科学, 2023, 44(5): 282-289.

[16] Adeniji AA, Babalola OO. Metabolomic applications for understanding complex tripartite plant-microbes interactions: Strategies and perspectives[J]. Biotechnology Reports, 2020, 25: e00425.

[17] Li S, Tian Y, Jiang P, et al. Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(9): 1448-1469.

[18] Leng W, Wu X, Shi T, et al. Untargeted metabolomics on skin mucus extract of *Channa argus* against *Staphylococcus aureus*: Antimicrobial activity and mechanism[J]. Foods, 2021, 10(12): 2995.

[19] Lan M, Weng M, Lin Z, et al. Metabolomic analysis of anti-

microbial mechanism of polysaccharides from *Sparassis crispa* based on HPLC-Q-TOF/MS [J]. Carbohydrate Research, 2021, 503: 108299.

[20] Guo C, He Y, Wang Y, et al. NMR-based metabolomic investigation on antimicrobial mechanism of *Salmonella* on cucumber slices treated with organic acids [J]. Food Control, 2022, 135: 108973.

[21] Wang N, Chi P, Zou YW, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for thermoresistance and enhanced erythritol productivity[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13(1): 176-195.

[22] Zhang L, Nie MY, Liu F, et al. Multiple gene integration to promote erythritol production on glycerol in *Yarrowia lipolytica* [J]. Biotechnology Letters, 2021, 43(7): 1277-1287.

[23] Yang SL, Pan XW, Wang Q, et al. Enhancing erythritol production from crude glycerol in a wild-type *Yarrowia lipolytica* by metabolic engineering [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1054243-1054256.

[24] 张非. 杆菌霉素 D 高产菌株的发酵优化及其代谢组学分析[D]. 郑州:河南大学, 2024.

[25] 代浩然,马晟利,韩烨,等. 基于代谢组学研究 XLS 对白色念珠菌的代谢变化及抑菌机制[J]. 口腔医学研究, 2024, 40(5): 407-412.

[26] Campos CG, Ribeiro JAA, Almeida JRM, et al. Targeted metabolomics of xylose-fermenting yeasts based on mass spectrometry [J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1859: 155-169.

[27] 陈淑怡. 解脂亚罗酵母产赤藓糖醇优化及其高产菌株代谢组学分析[D]. 泉州:华侨大学, 2023.

[28] Wang YT, Zhao LX, Wei LJ, et al. Metabolic engineering of erythritol production from glycerol by *Yarrowia lipolytica* [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2024, 29: 119-127.

[29] Suzuki A, Iwata J. Amino acid metabolism and autophagy in skeletal development and homeostasis[J]. Bone, 2021, 146: 115881.

[30] Nesterov SV, Yaguzhinsky LS, Podoprigora GI, et al. Amino Acids as Regulators of Cell Metabolism [J]. Biochemistry (Moscow), 2020, 85: 393-408.

[31] Rywińska A, Tomaszewska-Hetman L, Lazar Z, et al. Application of new *Yarrowia lipolytica* transformants in production of citrates and erythritol from glycerol[J]. International Journal of Molecular Sciences. 2024, 25(3): 1475.

[32] 邱学良. 产赤藓糖醇亚罗解脂酵母的耐热机制分析及组合策略改造[D]. 无锡:江南大学, 2020.

[33] Tan KY, Li CY, Li YF, et al. Real-time monitoring ATP in mitochondrion of living cells: A specific fluorescent probe for ATP by dual recognition sites [J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(3): 1391-2180.

[34] Abe H, Yoshikawa N, Sarower MG, et al. Physiological function and metabolism of free D-alanine in aquatic animals[J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 2005, 28(9): 1571-1577.

[35] Nomura K, Iwahashi H, Iguchi A, et al. Depletion of arginine in yeast cells decreases the resistance to hydrostatic pressure [J]. High Pressure Research, 2015, 35(3): 310-316.

[36] Rashmi D, Barvkar VT, Nadaf A, et al. Integrative omics analysis in *Pandanus odorifer* reveals the role of asparagine synthetase in salinity tolerance[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-16.

[37] Lei HJ, Feng L, Peng F, et al. Amino acid supplementations enhance the stress resistance and fermentation performance of lager yeast during high gravity fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 187(2): 540-555.

[38] Bilsing FL, Anlauf MT, Hachani E, et al. ABC transporters in bacterial nanomachineries[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(7): 6227.

[39] Tawbeh A, Gondcaille C, Trompier D, et al. Peroxisomal ABC transporters: An update[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 6093.

[40] Vauthier V, Housset C, Falguières T. Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters[J]. Biochemical Pharmacology, 2017, 135: 1-11.

[41] Rzechonek DA, Dobrowolski A, Rymowicz W, et al. Recent advances in biological production of erythritol[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018,38(4):620-633.

[42] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(第3版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.

[43] Noor E, Eden E, Milo R, et al. Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy[J]. Molecular Cell 2010, 39(5): 809-820.

[44] Regnat K, Mach RL, Mach-Aigner AR. Erythritol as sweetener-wherefrom and whereto? [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(2): 587-595.

[45] Tang H, Ju X, Zhao J, et al. Engineering ribose-5-phosphate isomerase B from a central carbon metabolic enzyme to a promising sugar biocatalyst[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(2): 509-523.

[46] Sparling R, Levin DB. Growth and neutral lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* on various carbon substrates under nutrient-sufficient and nutrient-limited conditions [J]. Bioresource Technology, 2014, 164: 41-46.

[47] 孙佳彤,杨会侠,李虹谕,等. 红松雄球花原基分化的转录组分析[J]. 沈阳农业大学学报,2025,56(3):51-60.

[48] 何德鑫,王晓东,毕文波,等. 大豆细胞质雄性不育系及其保持系花器官生理及转录组差异分析[J]. 沈阳农业大学学报,2025,56(6):103-112.

[49] 吴健平,罗莎莎,陈学文,等. 基于 LC-MS/MS 的代谢组学解析益生菌发酵棕榈粕的营养特性[J]. 饲料工业,2025,46(15):151-159.

中国知网 https://www.cnki.net