

# 解脂耶氏酵母产赤藓糖醇研究进展

李 坤<sup>1</sup>, 牟志勇<sup>1</sup>, 严 鑫<sup>1</sup>, 艾连中<sup>1</sup>, 夏永军<sup>1</sup>, 宋 馨<sup>1</sup>, 田延军<sup>1</sup>, 张 辉<sup>2</sup>, 倪 斌<sup>2</sup>, 杨昞津<sup>1,\*</sup>  
(1.上海理工大学健康科学与工程学院, 上海 200093; 2.上海金枫酒业股份有限公司, 上海 200093)

**摘 要:** 赤藓糖醇是一种天然甜味剂, 因具有热量低、稳定性好、食用安全性高等优点, 被广泛应用于食品、医药及化工等行业。解脂耶氏酵母作为赤藓糖醇的高效发酵菌株, 被广泛用于赤藓糖醇的工业生产中。但目前解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇的相关研究主要集中于发酵过程控制与代谢途径调控等方面, 还存在产量与技术上的瓶颈。基于此, 本文从发酵基质利用、发酵过程控制及基因工程改造代谢途径3个方面对解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇的国内外研究进展进行综述, 以期日后突破解脂耶氏酵母产赤藓糖醇的产量与技术瓶颈提供参考依据。

**关键词:** 解脂耶氏酵母; 赤藓糖醇; 发酵; 代谢途径

## Research Progress on Erythritol Production by *Yarrowia lipolytica*

LI Shen<sup>1</sup>, MU Zhiyong<sup>1</sup>, YAN Xin<sup>1</sup>, AI Lianzhong<sup>1</sup>, XIA Yongjun<sup>1</sup>, SONG Xin<sup>1</sup>, TIAN Yanjun<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, NI Bin<sup>2</sup>, YANG Yijin<sup>1,\*</sup>  
(1. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;  
2. Shanghai Jinfeng Wine Co., Ltd., Shanghai 200093, China)

**Abstract:** Erythritol, a natural sweetener, is widely used in the food, medicinal and chemical industries because of its advantages of low calorie, good stability and high food safety. *Yarrowia lipolytica* is widely used as an efficient fermentation strain for erythritol production. However, the current research on erythritol production by *Yarrowia lipolytica* concentrates on control of the fermentation process and metabolic pathway regulation and has bottlenecks in the yield of erythritol and the fermentation process. On this basis, this article reviews recent progress in research on erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from three aspects: fermentation substrate utilization, fermentation process control and metabolic pathway modification by genetic engineering. This review is expected to provide a reference for breaking the bottlenecks in erythritol production by *Yarrowia lipolytica*.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*; erythritol; fermentation; metabolic pathways

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220830-351

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)17-0196-08

引文格式:

李坤, 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220830-351. <http://www.spkx.net.cn>

LI Shen, MU Zhiyong, YAN Xin, et al. Research progress on erythritol production by *Yarrowia lipolytica*[J]. Food Science, 2023, 44(17): 196-203. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220830-351. <http://www.spkx.net.cn>

解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 是一种可利用多种底物发酵生产不同产品的非常规酵母, 属于半子囊菌纲、耶氏酵母菌属, 其全基因组测序和注释已完成, 共有6条染色体, 基因组全长为20.5 Mb, G+C相对含量为49%<sup>[1]</sup>。*Y. lipolytica*在自然界中分布广泛, 通常存在于

富含脂质和烷烃等疏水性底物的环境中, 其环境适应性强, 可耐受高盐、低温以及过高的酸碱环境, 易培养、安全性高<sup>[2]</sup>, 这些特性使其在工业中应用非常广泛, 如生产柠檬酸、琥珀酸等有机酸<sup>[3]</sup>; 在医药领域可以生产香樟醇、紫苏子醇等具有抗癌、抗肿瘤作用的

收稿日期: 2022-08-30

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32001674); 上海食品微生物工程技术研究中心项目(19DZ2281100); 上海市金山区产学研成果转化项目(2021-CXY-06)

第一作者简介: 李坤(1999—)(ORCID: 0000-0002-8058-2594), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物及其作用机制。

E-mail: lishen20220321@163.com

\*通信作者简介: 杨昞津(1991—)(ORCID: 0000-0002-8591-6258), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为优良食品微生物选育及功能机制解析。E-mail: soliaran@163.com

萜类化合物<sup>[4]</sup>；在食品工业中可用于合成 $\gamma$ -癸内酯、微生物油脂以及糖醇<sup>[5]</sup>。

赤藓糖醇是一种多元醇，其甜度为蔗糖的60%~70%，热量为0.84 kJ/g，仅为蔗糖热量的5%，是热量最低的糖醇<sup>[6]</sup>，也有临床研究证明，其是所有多元醇中副作用最小的<sup>[7]</sup>，可作为蔗糖的替代甜味剂。由于赤藓糖醇溶液为负热量，食用时有凉爽的口感<sup>[8]</sup>，因此在工业生产饮料时添加它可提升饮料口感，深得消费者喜爱。此外，赤藓糖醇分子质量小，可在小肠中被直接吸收，基本不在人体内代谢，约90%随尿液排出体外，故不会引起血糖升高进而触发胰岛素效应，此外，赤藓糖醇还有降低龋齿的作用<sup>[9]</sup>。低热量、高糖度及人体不吸收等特点使赤藓糖醇作为蔗糖替代甜味剂的优势十分突出，因此被越来越多的应用于食品行业如乳制品<sup>[10-11]</sup>、饮品<sup>[12]</sup>及调味品<sup>[13]</sup>等。近年来，赤藓糖醇市场需求量随其应用范围拓宽而增加，但工业上赤藓糖醇的产量不足，因此，提高赤藓糖醇的产量对健康食品产业的发展具有十分重要的意义。

赤藓糖醇可由化学合成法和微生物发酵法进行生产，但化学合成法存在生产效率低、周期长、成本高、操作危险等缺点，很难实现大规模工业化生产<sup>[14]</sup>。微生物发酵法不仅可消除化学合成法的弊端，还有生产条件温和、产品质量稳定、食品安全性高等优势，故已成为目前生产赤藓糖醇最受生产厂家与研究者青睐的方法<sup>[15]</sup>。在微生物发酵法中，酵母菌是最常用于生产发酵赤藓糖醇的菌种，如耶氏酵母属（*Yarrowia*）、金担子菌属（*Aureobasidium*）、念珠菌属（*Moniliella*）、假丝酵母属（*Candida*）和圆酵母属（*Torula*）等菌属。由表1可以看出，解脂耶氏酵母发酵的赤藓糖醇产量显著高于其他几种酵母，这可能是得益于它的以下特性：1）解脂耶氏酵母的抗胁迫能力强，对低温高盐等条件有耐受性<sup>[16]</sup>，与对生产条件要求严苛的赤藓糖醇相适配；2）基因结构独特<sup>[17]</sup>，其基因组中存在特异的染色体复制起始位点并含有大量内含子，可以采用选择性剪切提高基因编码效率<sup>[1]</sup>。3）可利用底物非常广泛<sup>[18]</sup>，可选择性强，能够极大地节约成本；4）该菌是美国食药局评价食品添加剂安全性指标——一般认为安全（generally recognized as safe, GRAS）认证的安全工业微生物<sup>[19]</sup>，其安全性很高。因此，目前国内外工业上生产赤藓糖醇均以解脂耶氏酵母发酵为主，Magdalena等<sup>[20]</sup>以*Y. lipolytica* Wratislavia K1为生产菌株，采用连续分批发酵的方式生产出81.9 g/L的赤藓糖醇；刘金龙等<sup>[21]</sup>采用两阶段葡萄糖质量浓度调控策略将*Yarrowia lipolytica* JZ-204生产赤藓糖醇产量提高至92.66 g/L；Rymowicz等<sup>[22]</sup>以粗甘油为底物，利用*Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1发酵生产赤藓糖醇，产量达到170 g/L。可见，解脂耶氏酵母用于发酵生产赤藓糖醇具有巨大潜力。

表1 可合成赤藓糖醇的主要酵母菌

Table 1 Major yeast strains capable of producing erythritol

菌株名称	底物/碳源	赤藓糖醇产量/(g/L)	参考文献
<i>Yarrowia lipolytica</i>	葡萄糖	148.0	[23]
<i>Candida sorbosivorans</i>	葡萄糖	60.2	[24]
<i>Aureobasidium pullulans</i>	木糖	31.8	[25]
<i>Torula corallina</i>	葡萄糖	63.8	[26]
<i>Moliniella pollinis</i>	葡萄汁	96.9	[27]

近些年来，许多学者通过研究新型发酵技术与改进发酵工艺等提高解脂耶氏酵母发酵生产赤藓糖醇的产量，但是仍存在一定的瓶颈。研究表明，发酵基质利用、发酵过程控制以及代谢途径改造均对解脂耶氏酵母的赤藓糖醇产量有重要影响，基于此，本文将从以上3个方面对提升解脂耶氏酵母的赤藓糖醇产量研究进行综述，以期为今后提高赤藓糖醇产量提供研究思路与参考。

## 1 解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇的发酵基质利用

### 1.1 碳源的利用优化

培养基对解脂耶氏酵母发酵起着至关重要的作用，培养基既要保证解脂耶氏酵母生长需要，还要确保赤藓糖醇的产量，同时还需避免副产物的生成，因此有很多研究者对培养基进行优化，其中针对碳源和氮源的研究较多。

目前，用解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇主要的碳源有葡萄糖和甘油。二者相比，以葡萄糖作为碳源时，赤藓糖醇产率较高，但副产物较多；以甘油为底物时，虽然产量略低，但副产物较少，可获得的赤藓糖醇和副产物比率更高<sup>[28]</sup>。Jeya等<sup>[29]</sup>以葡萄糖、甘油等为不同的碳源，对菌株*P. tsukubaensis* KN75生产赤藓糖醇的结果进行比较，发现以葡萄糖为碳源时生产的赤藓糖醇浓度最高。Mironczuk等<sup>[30]</sup>研究发现，发酵菌株*Y. lipolytica* Wratislavia K1以甘油为底物生产赤藓糖醇可使副产物相对含量降到10%以下。然而，以葡萄糖和甘油为底物生产赤藓糖醇不仅成本较高，还不利于我国绿色可持续发展理念的开展。所以近些年研究者致力于开发出如粗制甘油、废弃食用油（waste cooking oil, WCO）等可替代碳源。

在发现的可替代碳源中，粗制甘油使用较多，Tomaszewska等<sup>[31]</sup>对比研究了了解脂耶氏酵母在以纯甘油和粗制甘油为碳源的情况下赤藓糖醇的产量，结果表明解脂耶氏酵母以粗制甘油为底物合成赤藓糖醇量为80.5 g/L，略低于纯甘油发酵的产量（84.1 g/L）。Mironczuk等<sup>[30]</sup>通过半连续发酵*Y. lipolytica* Wratislavia K1，以粗制甘油和纯甘油作为碳源进行比较，以粗甘油生产的产率达到0.54 g/g，高于纯甘油组（0.43 g/g）。粗制甘油是生物柴油

工业生产中的副产物,将其作为碳源生产赤藓糖醇的产量虽略低于对照组,但从经济成本与环境因素角度考虑,这无疑是更好的选择。此外,*Y. lipolytica*利用粗制甘油生产赤藓糖醇的优势非常明显,其不仅能够化学成分复杂的粗制甘油中顺利生长,且粗制甘油中含有的一些其他化合物,如氢氧化钠、氯化钠、Ca或K<sup>[31]</sup>,也可被*Y. lipolytica*利用以提高赤藓糖醇产量<sup>[32]</sup>,将其作为碳源应用到赤藓糖醇生产中既可有效降低生产成本,还可为生物柴油工业解决处理废弃副产物。

除粗制甘油外,WCO也可被利用,Liu Xiaoyan等<sup>[33]</sup>的研究表明,解脂耶氏酵母M53可以利用WCO作为底物生产赤藓糖醇,在5 L发酵罐培养基中发酵72 h后可得到22.1 g/L赤藓糖醇,产率为0.74 g/g。由此证明解脂耶氏酵母可利用WCO作为替代碳源生产赤藓糖醇,这是由于解脂耶氏酵母具有可在油脂中生长的特性,也从侧面印证*Y. lipolytica*的许多特性非常适合生产赤藓糖醇;此外,该方法产生赤藓糖醇的同时也会产生脂肪酶,脂肪酶的产生同样需要消耗WCO,这正是利用WCO作为碳源得到赤藓糖醇产量不及以葡萄糖和甘油为底物的重要原因之一。上述两种替代碳源在正常情况下若随意丢弃不仅会对环境造成负担,也会浪费资源,而通过微生物转化的方式不仅可以降低环境污染和资源浪费,还可以节约生产成本,因此,基于解脂耶氏酵母的特性对两者加以利用用于生产赤藓糖醇在生产中具有重要意义。

## 1.2 氮源的选择利用

在解脂耶氏酵母发酵生产赤藓糖醇过程中氮源的组成及其浓度至关重要,为提高产量,许多研究人员探究了最佳氮源及其添加量。常用的氮源主要是无机氮源铵盐和有机氮源酵母提取物,有研究对二者进行对比,Rywinska等<sup>[34]</sup>以*Y. lipolytica* Wratislavia K1为研究对象,利用多种无机氮源和有机氮源进行发酵产赤藓糖醇实验,结果表明,氯化铵、硫酸铵和酵母提取物是此菌株生产赤藓糖醇的最佳氮源,其中硫酸铵的赤藓糖醇产率最高;以酵母提取物为氮源生产赤藓糖醇的产量略低于以硫酸铵为氮源,且酵母提取物价格昂贵,因此不适用于工业生产。Magdalena等<sup>[20]</sup>研究发现,以无机氮源硫酸铵为*Y. lipolytica* Wratislavia K1的氮源时,添加量为4.6 g/L时可使赤藓糖醇产量最高,达103.4 g/L,产率为1.12 g/(L·h)。上述研究表明,氮源中的硫酸铵和酵母提取物都会有利于提高赤藓糖醇产量,但综合多种成本、产量等因素,认为硫酸铵更适合于工业生产,且硫酸铵添加量为4.6 g/L时对提高*Y. lipolytica* Wratislavia K1菌株的赤藓糖醇产率效果最好。

## 1.3 培养基中其他营养素

除培养基主要营养成分外,培养基中存在的矿物质、表面活性剂和维生素等其他营养素也可能影响赤藓糖醇的产量。

通过添加金属离子来改变细胞的通透性,可增加赤藓糖还原酶(erythrose reductase, ER)活性<sup>[35]</sup>。不同的金属离子有不同的影响,已有研究表明,Cu<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>的添加可以增加ER活性,从而提高赤藓糖醇产量,而Mn<sup>2+</sup>通过改变细胞膜通透性来提升产量。Janek等<sup>[36]</sup>研究各种金属离子对赤藓糖醇合成的影响,发现Cu<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>均对赤藓糖醇产量有影响。此外,金属离子的浓度也对赤藓糖醇产量有影响,有研究表明,添加0.25 mmol/L硫酸锌可使赤藓糖醇产量提高37%<sup>[36]</sup>;Lee等<sup>[37]</sup>在发酵培养基中添加10 mg/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O和10 mg/L MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O后,发现ER活性和最终赤藓糖醇产量分别提高34%和33%<sup>[38]</sup>。解脂耶氏酵母对这些二价离子具有较高的耐受性<sup>[39]</sup>,因此可以添加这些金属离子来提高产量。

表面活性剂可能对赤藓糖醇生产产生多种影响。Magdalena等<sup>[40]</sup>在解脂耶氏酵母甘油发酵的培养基中加入表面活性剂TritonX-100、Span 20和Tween 80,实验发现,加入0.25 g/L的Span 20后,赤藓糖醇产量增加15%,达到142 g/L,产率从0.62 g/(L·h)提高到1.1 g/(L·h)。然而,较高添加量的Span 20或补充其他的表面活性剂会对赤藓糖醇生产造成不利影响。

维生素也可能对赤藓糖醇的产生具有影响,如Tomaszewska等<sup>[41]</sup>发现硫胺素对利用*Y. lipolytica*生产赤藓糖醇有影响。但是有研究表明,核黄素、生物素和叶酸等维生素会降低赤藓糖醇的产量<sup>[41]</sup>,这类维生素对赤藓糖醇的产生有抑制作用,因此应控制其添加量。

## 2 解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇的发酵过程控制

### 2.1 发酵工艺的影响

不同的发酵方式对解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇的最终产量有显著影响(表2),生产中主要应用分批补料发酵和反复分批发酵两种方式。在分批补料发酵中,不同菌种所产生的副产物种类与产量不同,这可能是导致赤藓糖醇产量差异的原因之一。分批发酵虽然具有操作简单特点,但其生产赤藓糖醇的浓度普遍较低,所以要进行分批补料发酵,以保持底物浓度维持在较高浓度水平上。与传统的分批发酵相比,反复分批发酵通过延长有效的生产阶段,可以获得更好的动态性和更高的生物合成效率<sup>[31]</sup>,从而提高赤藓糖醇的产量并抑制副产物的产生<sup>[41]</sup>。

**表2 不同发酵工艺对解脂耶氏酵母发酵生产赤藓糖醇的影响**  
**Table 2 Effect of different fermentation processes on the production of erythritol by *Yarrowia lipolytica***

发酵工艺	解脂耶氏酵母菌株	转化率/%	产量/(g/L)	产率/(g/(L·h))	副产物/产量	参考文献
分批补料发酵	<i>Y. lipolytica</i> Wratislavia K1	—	201.2	—	多元醇、有机酸低于10% (相对含量,下同)	[41]
分批补料发酵	<i>Y. lipolytica</i> CICC 1675	49	194.3	0.95	甘露醇 36.8 g/L	[42]
反复分批培养 (底物纯甘油)	<i>Y. lipolytica</i> K1	43	220.0	0.54	<10%	[30]
反复分批培养 (底物粗甘油)	<i>Y. lipolytica</i> K1	56	155.5	0.43	<10%	[30]
反复分批培养 (纯甘油为底物)	<i>Y. lipolytica</i> MK1	77	224.0	0.54	<2.3%	[43]
连续分批发酵 (纯甘油为底物)	<i>Y. lipolytica</i> Wratislavia K1	52	103.4	1.12	<1.2 g/L	[20]

注:一.文献中未提及。下同。

Magdalena等<sup>[20]</sup>将连续分批发酵应用于*Y. lipolytica* Wratislavia K1菌株的生产中,使赤藓糖醇的产率提升至1.12 g/(L·h),该方法是先分批发酵24 h,再进行连续的生物合成,与分批补料发酵相比,连续分批发酵提高了最终产品的浓度、生产率和产量,且由于培养物的pH值较低,赤藓糖醇的生物合成可以在非无菌条件下进行,从而可降低能耗、节约成本。

### 2.2 发酵条件的影响

在发酵过程中渗透压、温度、pH值、溶氧量等培养条件对赤藓糖醇产量都有显著影响。当以葡萄糖为底物时,优化后的最佳pH值偏中性;而以甘油为底物时,最佳pH值偏小。通气速率也会对产量有影响,使用*Y. lipolytica* Wratislavia K1发酵时,最佳通气速率为1.08 L/min,比通气速率0.6 L/min条件下的产量高(表3)。研究发现,提高葡萄糖浓度有利于酵母大量合成赤藓糖醇<sup>[44]</sup>。但随着底物浓度的上升,渗透压便成为一种环境胁迫因素,将对酵母细胞生长和代谢产生影响,那么如何使产物产率和酵母生产强度共同提高是目前需解决的问题。

**表3 解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇的最佳发酵条件对比**  
**Table 3 Comparison of optimal fermentation conditions for producing erythritol by different strains of *Y. lipolytica***

菌株	底物	pH	溶氧条件	产量/(g/L)	参考文献
<i>Y. lipolytica</i> DSM70562 mutant	葡萄糖	5.5	—	40.0	[45]
<i>Y. lipolytica</i> Wratislavia K1	甘油	3.0	通气速率1.08 L/min 转速800 r/min	192.0	[46]
<i>Y. lipolytica</i> Wratislavia K1	甘油	3.0	通气速率0.60 L/min 转速800 r/min	170.0	[20]
<i>Y. lipolytica</i> FT-3	葡萄糖	6.0	氧气体积分数30%~40%	187.0	[47]

已有研究表明,渗透压胁迫是影响赤藓糖醇产量的关键因素之一,渗透压主要可通过调节底物浓度和添加额外的盐进行调节<sup>[48]</sup>。提高渗透压可促进赤藓糖醇产量增加,减少副产物,然而渗透压也不是越高越好,

Yang Libo等<sup>[42]</sup>对赤藓糖醇批量生产中的最佳渗透压进行测定,结果显示,当初始渗透压在4.05~4.29 Osmol/kg时赤藓糖醇产量最高,高于此范围会延长菌株生长的延滞期,导致赤藓糖醇产量下降。一般地,酵母细胞在发酵初期易受到渗透压的影响出现发酵被抑制或停滞的现象,从而导致发酵效率下降<sup>[49]</sup>。为解决这一问题, Yang Libo等<sup>[42]</sup>在利用解脂耶氏酵母分批补料发酵生产赤藓糖醇时,首次采用两阶段调控渗透压的方法,将发酵过程分为两个不同渗透压的阶段以维持赤藓糖醇的高生产速率,第一阶段(菌体生长阶段,0~96 h)通过补充底物甘油维持渗透压为4.25 Osmol/kg来减少高渗透压对酵母生长的抑制,而后在对数生长期结束时(96 h)停止补充甘油;第二阶段,132 h以后控制渗透压为4.94 Osmol/kg,以维持赤藓糖醇的高生产速率,发酵完成后赤藓糖醇产量达194.3 g/L,产率达0.95 g/(L·h),分别比单一阶段补料发酵方法提高25.7%、2.2%。由此可见,渗透压是发酵生产赤藓糖醇中的重要参数,控制在最佳渗透压可实现赤藓糖醇的高产率和高生产强度的统一。由此可见,解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇时,甘油不仅可作为底物,还可作为渗透压调节剂使用。

### 2.3 生产菌种的选育

为得到产赤藓糖醇的优质解脂耶氏酵母菌株,研究人员主要采用自然分离筛选、诱变育种和基因工程改造3种方法进行选育。20世纪中期, Binkley等<sup>[50]</sup>首次报道酵母菌可用来生产赤藓糖醇,其采用的菌株便是通过自然分离筛选的方法从蜂巢中分离得到的酵母菌种。该研究创酵母产赤藓糖醇之先河,对后续研究具有深远影响。但研究逐渐发现利用此法提取的菌株生产赤藓糖醇的产量较低, Rymowicz等<sup>[22]</sup>使用自然分离筛选的原始菌株*Y. lipolytica* 1.22生产赤藓糖醇,产量仅为0.31 g/g。因此,近些年很少有研究者直接使用自然分离筛选出的菌株进行发酵,而是采用其他方法如诱变育种等手段处理自然分离的菌株以获得更高产的菌种,从而提高赤藓糖醇产量,并取得了良好效果。

王凤伟等<sup>[51]</sup>利用氯化锂(LiCl)和硫酸二乙酯(diethyl sulfate, DES)对解脂耶氏酵母JunA-6进行化学诱变处理后得到耐高渗菌株WX 506,该菌株的赤藓糖醇产量达到67.5 g/L,是原始菌株JunA-6的4.2倍。化学诱变剂一般通过使酵母碱基烷基化、使DNA复制时产生碱基错配等方式使关键酶基因突变从而改变其性状,虽然其具有成本低、效果好等优点,但现阶段使用的大部分化学诱变剂对人体有一定损伤;而物理诱变是通过紫外线、等离子体等技术使关键酶基因的DNA分子链发生断裂引起损伤从而导致突变,其具有操作简单、安全性高、无污染等优点,所以物理诱变育种比化学诱变育种应用更广泛。Ghezelbash等<sup>[52]</sup>通过

紫外线照射 *Y. lipolytica* DSM70562 得到 *Y. lipolytica* 突变菌株, 其赤藓糖醇产量为 39.76 g/L, 比原始菌株提高了 1.65 倍, 经过对 ER 的基因测序和分析发现, 产量增加的原因是 ER 蛋白上的 Asp<sup>270</sup> 被 Glu<sup>270</sup> 取代。Qiu Xueliang 等<sup>[23]</sup> 利用紫外线诱变和常压室温等离子体诱变结合的方式对 *Y. lipolytica* BBE-18 进行处理, 最终获得的突变菌株 *YliUA8*, 其赤藓糖醇产量可达 148 g/L 的, 远高于原始菌株 BBE-18 (43 g/L)。对 *Y. lipolytica* 进行物理诱变处理后明显提高其赤藓糖醇产量, 尤其是利用紫外诱变与等离子体诱变相结合的方法作用效果最明显。

综上, 诱变选育仍是获得优良菌株的重要方式, 但其有一些不足之处, 如诱变的方向和性质无法控制、有利变异较少等, 若想克服这些缺点并在此基础上进一步提高赤藓糖醇产量, 则需结合其他方法如优化发酵过程和改造代谢途径等共同作用。

### 3 基于代谢途径的基因工程改造

#### 3.1 解脂耶氏酵母产赤藓糖醇代谢途径

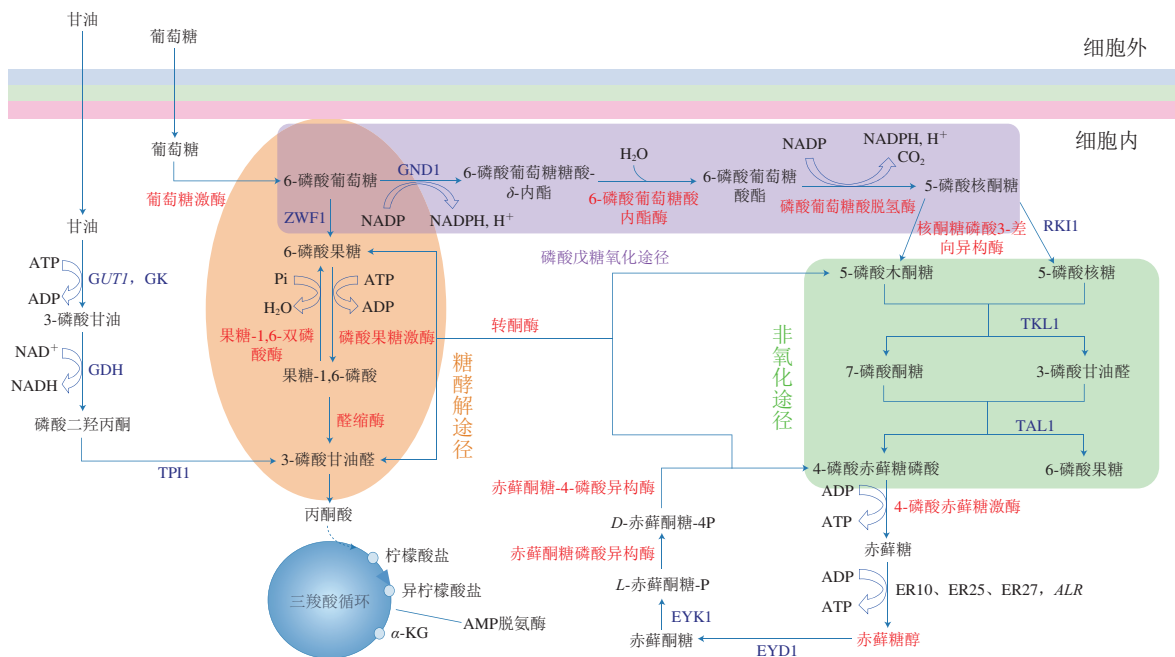
通常, 工业上解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇主要以葡萄糖和甘油为底物, 而不同底物发酵生产赤藓糖醇的代谢途径亦不同<sup>[53]</sup> (图1)。解脂耶氏酵母经过磷酸戊糖途径的氧化与非氧化途径生成赤藓糖醇, 当以葡萄糖为底物时, 葡萄糖在葡萄糖激酶的催化下转变成 6-磷酸葡萄糖后直接进入磷酸戊糖氧化途径, 再通过 6-磷酸

葡萄糖脱氢酶、核酮糖磷酸-3-差向异构酶以及转酮酶 (transketolase, TKL1) 的作用下经过磷酸戊糖氧化与非氧化阶段最后合成赤藓糖醇<sup>[52]</sup>。而以甘油为底物时, 甘油在甘油激酶 (glycerol kinase, GK)、甘油-3-磷酸脱氢酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GDH) 以及磷酸甘油醛异构酶 (triosephosphate isomerase, TPI1) 的作用下, 先转化成 3-磷酸甘油醛进入糖酵解途径, 3-磷酸甘油醛在该途径中经醛缩酶、果糖-1,6-双磷酸酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, GND1) 的催化下生成 6-磷酸葡萄糖后进入磷酸戊糖氧化途径最终生产赤藓糖醇, 在此过程中, 中间产物丙酮酸进入三羧酸循环<sup>[54]</sup>。Niang 等<sup>[55]</sup> 研究发现, 赤藓糖醇可以进一步在赤藓糖醇脱氢酶 (erythritol dehydrogenase, EYD1) 的催化作用下被降解为赤藓酮糖, 赤藓酮糖又可在赤藓酮糖激酶 (erythritone kinase, EYK1) 和赤藓酮糖磷酸异构酶的催化作用下转化成赤藓酮糖磷酸, 赤藓酮糖与赤藓酮糖磷酸均可被细胞利用。

#### 3.2 赤藓糖醇代谢途径改造

与传统的菌种选育相比, 通过定向改造代谢途径来提高赤藓糖醇产量的代谢工程方法具有很多优点, 如周期短和效率高等, 因此近些年来应用此方法优化解脂耶氏酵母产赤藓糖醇产量的研究较多。

大量研究表明, 磷酸戊糖途径对赤藓糖醇的合成至关重要 (表4)。Mironczuk 等<sup>[53]</sup> 发现通过过表达参与磷酸戊糖途径的几种基因——*TKL1*、*TAL1*、*ZWF1*、



ZWF1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase); RKI1. 核酮糖-5-磷酸异构酶 (ribose-5-phosphate isomerase); TAL1. 转醛酶 (transaldolase); ER 由基因 *ALR* 编码; GK 由基因 *GUT1* 编码。

图1 解脂耶氏酵母中赤藓糖醇代谢途径<sup>[53]</sup>

Fig. 1 Metabolic pathways of erythritol in *Yarrowia lipolytica*<sup>[53]</sup>

*GND1*, 可以使赤藓糖醇的产量提高58%以上。过表达目标产物限速步骤关键酶的基因可能对赤藓糖醇产量影响更大, Cheng Huiling等<sup>[56]</sup>以 *Y. lipolytica* CGMCC 7326 为研究对象, 过表达合成赤藓糖醇最后一个步骤的ER基因 (*ER10*、*ER25*和*ER27*) 并进行分析, 结果表明, 3种基因单独过表达都可以提高赤藓糖醇产量, 其中过表达*ER27*后产量最高, 可达182.0 g/L。还有学者探究了过表达合成途径起始步骤酶的基因对赤藓糖醇产量的影响, Mironczuk等<sup>[57]</sup>以 *Y. lipolytica* A101为研究对象, 探究过表达甘油激酶基因*GK*和甘油-3-磷酸脱氢酶基因*GDH*对赤藓糖醇产量的影响, 结果表明, *GK*的过表达可使赤藓糖醇产量提高24%, 而过表达*GDH*基因则没有提高产量。还有研究发现, 过表达合成途径起始步骤酶的基因没有过表达后续步骤关键酶基因的效果好。可见, 代谢途径中决定赤藓糖醇终产量的限速步骤可能在代谢途径起点, 也可能在代谢途径终点, 未来仍需深入研究磷酸戊糖途径对解脂耶氏酵母产赤藓糖醇的影响与调控机制。

表4 提高解脂耶氏酵母赤藓糖醇产量的代谢途径改造方法及效果汇总  
Table 4 Efficiencies of metabolic pathway modifications to improve the production of erythritol by *Yarrowia lipolytica*

原始菌株	产量/ (g/L)	产率/ (g/g)	改造方法	改造后 产量/(g/L)	改造后 产率/(g/g)	参考 文献
<i>Y. lipolytica</i> MK1	25.3	0.25	过表达 <i>GND1</i>	40.2	0.40	[53]
<i>Y. lipolytica</i> MK1	25.3	0.25	过表达 <i>ZWF1</i>	42.5	0.43	[53]
<i>Y. lipolytica</i> MK1	25.3	0.25	过表达 <i>TKL1</i>	51.1	0.51	[53]
<i>Y. lipolytica</i> MK1	25.3	0.25	过表达 <i>TAL1</i>	46.7	0.47	[53]
<i>Y. lipolytica</i> CGMCC7326	154.0	0.51	过表达 <i>ER10</i>	174.0	0.58	[56]
<i>Y. lipolytica</i> CGMCC7326	154.0	0.51	过表达 <i>ER25</i>	177.0	0.59	[56]
<i>Y. lipolytica</i> CGMCC7326	154.0	0.51	过表达 <i>ER27</i>	182.0	0.61	[56]
<i>Y. lipolytica</i> A101	57.7	—	过表达 <i>GUT1</i>	71.3	—	[57]
<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	55.8	0.46	过表达 <i>TKL1</i>	—	0.59	[58]
<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	55.8	0.46	过表达 <i>ALR</i>	—	0.57	[58]
<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	55.8	0.46	过表达 <i>GUT1</i> 、 <i>GUT2</i>	—	0.54	[58]
<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	55.8	0.46	过表达 <i>GUT1</i> 、 <i>TKL1</i>	79.4	0.61	[58]
<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	55.8	0.46	过表达 <i>GUT1</i> 、 <i>ALR</i>	—	0.61	[58]
<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	55.8	0.46	过表达 <i>GUT1</i> 、 <i>TPII</i>	—	0.56	[58]
<i>Y. lipolytica</i> A101	57.7	—	过表达 <i>GUT1</i> 、 <i>GDH</i>	78.0	—	[58]
<i>Y. lipolytica</i> CGMCC7326	154.0	0.51	过表达 <i>ER10</i> 、 <i>ER25</i> 、 <i>ER27</i> 、 <i>ZWF1</i> 、 <i>GND1</i>	190.0	0.63	[56]
<i>Y. lipolytica</i> W29	30.7	0.39	敲除 <i>EYK1</i>	35.7	0.49	[59]
<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	55.8	0.46	敲除 <i>EYK1</i> 、过表达 <i>GUT1</i> 、 <i>TKL1</i>	80.6	0.53	[60]
<i>Y. lipolytica</i> POIF	16.0	0.24	过表达 <i>GUT1</i> 、 <i>TPII</i> 、 <i>TKL1</i> 、 <i>TAL1</i> ; 敲除 <i>EYD1</i>	40.0	—	[54]
<i>Y. lipolytica</i> POIF	16.0	0.24	过表达 <i>GUT1</i> 、 <i>TPII</i> 、 <i>TKL1</i> 、 <i>TAL1</i> 、 <i>RKII</i> 敲除 <i>EYD1</i>	52.0	0.52	[54]

赤藓糖醇合成的关键酶基因有很多, 单个过表达可能有一些局限性, 协同调控多个基因可能提高赤藓糖醇的最终产量, 有研究采用多个基因组合过表达的方式以进一步提高赤藓糖醇产量。Carly等<sup>[59]</sup>以 *Y. lipolytica* JMY2900为研究对象, 研究组合过表达各关键基因对赤藓糖醇产量的影响。结果表明, 当组合过表达

起始步骤的甘油激酶基因 (*GUT1*) 与中间步骤转酮酶基因 (*TKL1*) 或终点步骤赤藓糖还原酶基因 (*ALR*) 时, 赤藓糖醇产率有明显提升, 均提升至0.61 g/g。Mironczuk等<sup>[57]</sup>在菌株 *Y. lipolytica* A101中共表达*GK*和*GDH*使赤藓糖醇的产量提高35%。Cheng Huiling等<sup>[56]</sup>组合过表达ER基因 (*ER10*、*ER25*、*ER27*)、*ZWF1*和*GND1*, 最终所得赤藓糖醇产量达到190 g/L。经对比发现, 组合过表达*ER10*、*ER25*、*ER27*、*ZWF1*和*GND1* 5种基因时产率最高, 达到0.63 g/g。除过表达关键酶基因外, 还可以通过基因敲除的方式敲除分解赤藓糖醇途径的酶基因来增加赤藓糖醇产量, Carly等<sup>[59]</sup>敲除 *Y. lipolytica* W29的编码赤藓酮糖激酶的*EYK1*基因后发现, 赤藓糖醇产率提升至0.49 g/g。

敲除分解赤藓糖醇途径的基因与过表达关键酶基因均可提高赤藓糖醇产量, 有研究者试图将二者结合以提高赤藓糖醇产量, Frederic等<sup>[58]</sup>先敲除会使产生的赤藓糖醇分解的赤藓酮糖激酶基因*EYK1*, 然后结合*GUT1*和*TKL1*的过表达, 可使赤藓糖醇产量提高44%。Zhang Ling等<sup>[54]</sup>以解脂耶氏酵母*Pol1*为研究对象, 在其中联合过表达*GUT1*、*TPII*、*TKL1*和*TAL1* 4种基因, 并敲除分解赤藓糖醇的赤藓糖醇脱氢酶基因*EYD1*得到工程菌株MY11, 可将产率提高150%; 在此工程菌的基础之上再过表达核糖5-磷酸异构酶基因*RKII*, 可使产量较原始菌株提高225% (表4)。

上游启动子或转录因子等元件因可调控关键酶基因进而也可影响赤藓糖醇产量。Trassaert等<sup>[60]</sup>在*EYD1*和*EYK1*启动子区域内鉴定出4个调控元件模块, 并利用诱变元件模块和杂交启动子构建出不同强度的诱导启动子, 这组赤藓糖醇诱导的杂交启动子可以调节基因表达水平, 有望应用于赤藓糖醇的工业化生产中以提高产量。Qiu Xueliang等<sup>[23]</sup>利用赤藓糖醇响应转录因子EryD, 构建了一种可用于快速筛选和鉴定高产赤藓糖醇菌株的传感器调节系统, 并获得一株高产赤藓糖醇菌株yliUA8, 该菌株发酵可产148 g/L的赤藓糖醇。

综上所述, 在解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇研究中, 代谢途径改造是一种非常有效的提高产量的方法。然而在目前的研究中, 使用此法改造的多是解脂耶氏酵母W29和*Pol1*等产量较低的菌株, 对工业菌种的代谢途径改造相对较少。因此, 在未来的研究中可将其应用在工业菌种上, 提高工业赤藓糖醇的产量。

## 4 结 语

赤藓糖醇是一种健康甜味剂, 具有很多优点, 在人们越来越注重健康生活方式的今天, 其需求在不断增长, 且其在食品工业的应用将有望改善过量摄入糖带来的

危害。因此,如何高效、低成本生产赤藓糖醇成为研究关键。目前,赤藓糖醇主要由酵母菌发酵生产,其中解脂耶氏酵母是主要的菌种。近年来,研究者们通过发酵基质选择、发酵过程控制以及代谢途径改造等方法来提高赤藓糖醇产量,均获得有效成果。即使如此,解脂耶氏酵母合成赤藓糖醇的研究还面临许多问题需进一步探索,比如诱变育种提高产量与代谢途径中关键酶突变导致的酶活性提高有关,未来可探究体外定向进化提高关键酶的活性,而应用反向代谢工程在胞内表达进化后的酶,从而达到提高赤藓糖醇产量的效果;目前已有学者发现,耐高温的解脂耶氏酵母菌株赤藓糖醇产量更高,但其分子作用机制尚不清楚,有待继续探索;目前已知渗透压对解脂耶氏酵母代谢合成赤藓糖醇具有重要影响,但潜在的分子机制尚不清楚,还需进一步探索研究。

#### 参考文献:

- [1] 李运清. 解脂耶氏酵母研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2015, 38(1): 8-13.
- [2] 荣兰新, 刘士琦, 朱坤, 等. 代谢工程改造解脂耶氏酵母合成羧酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1360-1372. DOI:10.13345/j.cjb.210626.
- [3] 崔志勇. 解脂耶氏酵母非同源基因组整合方法的建立及其在琥珀酸合成中的应用[D]. 济南: 山东大学, 2019: 1-3.
- [4] 宋以梅, 贾秀伟, 李树标, 等. 工业微生物解脂耶氏酵母及其应用研究[J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(9): 77-86. DOI:10.13523/j.cb.2004055.
- [5] 王晖, 薛庆节, 杨媛媛, 等. 解脂耶氏酵母在食品工业中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(8): 291-297. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.016960.
- [6] MARTAU G A, COMAN V, VODNAR D C. Recent advances in the biotechnological production of erythritol and mannitol[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2020, 40(5): 608-622. DOI:10.1080/07388551.2020.1751057.
- [7] 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: 1-4. DOI:10.27169/d.cnki.gwqgu.2020.001097.
- [8] 陈文, 刘璇, 杨春晓, 等. 赤藓糖醇生产及在食品工业上应用的研究进展[J]. 食品工业, 2018, 39(2): 266-269.
- [9] 王趁趁, 王金伟, 庞明利, 等. 赤藓糖醇抗龋齿功能研究进展及应用前景[J]. 食品安全导刊, 2014(18): 60-62. DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2014.18.044.
- [10] 唐海尧, 陈雅萍, 梁茵茵, 等. 赤藓糖醇在岭丰糯荔枝果肉酸奶加工过程中的应用与研究[J]. 食品安全导刊, 2022(19): 151-154. DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2022.19.009.
- [11] 陈娟, 何维彬, 吕常旭, 等. 赤藓糖醇玫瑰花风味酸奶的研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(6): 1959-1965. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2022.06.028.
- [12] 高圣君, 茅俊. 赤藓糖醇对柠檬汁饮料中维生素C保护作用的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 49-51; 58. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.03.038.
- [13] 周思好, 李贤才, 杨宇, 等. 不同糖醇对绿茶卡仕达酱品质特性的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(4): 31-35; 41. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.006.
- [14] 高蕾蕾, 刘峰, 栾庆民, 等. 赤藓糖醇生产与应用研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2020, 28(3): 1-4. DOI:10.19482/j.cn11-3237.2020.03.01.
- [15] 李俊霖, 郭传庄, 王松江, 等. 赤藓糖醇的特性及其应用研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(10): 169-172. DOI:10.19804/j.issn1006-2513.2019.10.022.
- [16] GONCALVES F A G, COLEN G, TAKAHASHI J A. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry[J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 476207. DOI:10.1155/2014/476207.
- [17] 孔婧, 朱坤, 刘士琦, 等. 代谢工程改造解脂耶氏酵母合成植物萜类化合物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1302-1313. DOI:10.13344/j.microbiol.china.200588.
- [18] SMITA S Z. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*[J]. Food Chemistry, 2014, 152: 1-10. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.11.117.
- [19] GROENEWALD M, BOEKHOUT T, NEUVEGLISE C, et al. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2014, 40(3): 187-206. DOI:10.3109/1040841X.2013.770386.
- [20] MAGDALENA R, BEATA R, ANITA R, et al. Technology of efficient continuous erythritol production from glycerol[J]. Journal of Cleaner Production, 2016, 139: 905-913. DOI:10.1016/j.jclepro.2016.08.126.
- [21] 刘金龙, 孙锡友, 赵国群, 等. 两阶段调控葡萄糖质量浓度强化赤藓糖醇发酵的研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(6): 88-92.
- [22] RYMOWICZ W, ANITA R, MARCINKIEWICZ M. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(3): 377-380. DOI:10.1007/s10529-008-9884-1.
- [23] QIU Xueliang, XU Peng, ZHAO Xinrui, et al. Combining genetically-encoded biosensors with high throughput strain screening to maximize erythritol production in *Yarrowia lipolytica*[J]. Metabolic Engineering, 2020, 60: 66-76. DOI:10.1016/j.ymben.2020.03.006.
- [24] SAURABH S, SANJANA M, JYOTSANA D, et al. High production of erythritol from *Candida sorbosivorans* SSE-24 and its inhibitory effect on biofilm formation of *Streptococcus mutans*[J]. Bioresource Technology, 2015, 198: 31-38. DOI:10.1016/j.biortech.2015.08.146.
- [25] GUO Jian, LI Junxia, CHEN Yefu, et al. Improving erythritol production of *Aureobasidium pullulans* from xylose by mutagenesis and medium optimization[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 180(4): 717-727. DOI:10.1007/s12010-016-2127-3.
- [26] LEE J K, JUNG H M, KIM S Y, et al. 1,8-Dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin biosynthesis inhibitors increase erythritol production in *Torula corallina*, and DHN-melanin inhibits erythrose reductase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3427-3434. DOI:10.1128/AEM.69.6.3427-3434.2003.
- [27] HIJOSA V M, GARITA C J, PANIAGUA G A I, et al. By-products of sugar factories and wineries as feedstocks for erythritol generation[J]. Food and Bioprocess Technology, 2021, 126: 345-355. DOI:10.1016/j.fbp.2021.02.001.
- [28] MAGDALENA R P, ALEKSANDRA M M, EWELINA C, et al. Scale-up of the erythritol production technology-process simulation and techno-economic analysis[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 257: 120533. DOI:10.1016/j.jclepro.2020.120533.
- [29] JEYA M, LEE K M, TIWARI M K, et al. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(2): 225-231. DOI:10.1007/s00253-009-1871-5.
- [30] MIRONCZUK A M, FURGALA J, RAKICKA M, et al. Enhanced production of erythritol by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated

- batch cultures[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(1): 57-64. DOI:10.1007/s10295-013-1380-5.
- [31] KOBAYASHI Y, IWATA H, MIZUSHIMA D, et al. Erythritol production by *Moniliella megachiliensis* using nonrefined glycerol waste as carbon source[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 60(5): 475-480. DOI:10.1111/lam.12391.
- [32] TOMASZEWSKA L, RYWINSKA A, GLADKOWSKI W. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(9): 1333-1343. DOI:10.1007/s10295-012-1145-6.
- [33] LIU Xiaoyan, YU Xinjun, LV Jinshun, et al. A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil[J]. Food and Bioproducts Processing, 2017, 103: 86-94. DOI:10.1016/j.fbp.2017.03.002.
- [34] RYWINSKA A, MARCINKIEWICZ M, CIBIS E, et al. Optimization of medium composition for erythritol production from glycerol by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2015, 45(6): 515-529. DOI:10.1080/10826068.2014.940966.
- [35] KANK Pei, LI Liangzhi, YA Lishi, et al. Enhancement of erythritol production in *Trichosporonoides oedocephalis* by regulating cellular morphology with betaine[J]. Chemical Papers, 2019, 73(8): 2065-2072. DOI:10.1007/s11696-019-00766-1.
- [36] JANEK T, DOBROWOLSKY A, BIEGALSKA A, et al. Characterization of erythrose reductase from *Yarrowia lipolytica* and its influence on erythritol synthesis[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 118. DOI:10.1186/s12934-017-0733-6.
- [37] LEE J K, HA S J, KIM S Y, et al. Increased erythritol production in *Torula* sp. by Mn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22: 983-986. DOI:10.1023/A:1005672801826.
- [38] MAGDALENA R, ANITA R, ZBIGNIEW L, et al. Two-stage continuous culture-technology boosting erythritol production[J]. Journal of Cleaner Production, 2017, 168: 420-427. DOI:10.1016/j.jclepro.2017.09.060.
- [39] TOMASZEWSKA L, RYMOWICZ W, RYWINSKA A. Mineral supplementation increases erythrose reductase activity in erythritol biosynthesis from glycerol by *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(6): 3069-3078. DOI:10.1007/s12010-014-0745-1.
- [40] MAGDALENA R, ANITA R, KRZYSZTOF C, et al. Enhanced production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* in media containing surfactants[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(2): 417-423. DOI:10.1016/j.bjm.2016.01.011.
- [41] TOMASZEWSKA L, RYWINSKA A, RYMOWICZ W. High selectivity of erythritol production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*[J]. Biomass & Bioenergy, 2014, 64: 309-320. DOI:10.1016/j.biombioe.2014.03.005.
- [42] YANG Libo, ZHAN Xiaobei, ZHENG Zhiyong, et al. A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol[J]. Bioresource Technology, 2014, 151: 120-127. DOI:10.1016/j.biortech.2013.10.031.
- [43] ALEKSANDRA M M, DOBROWOLSKI A, RAKICKA M, et al. Newly isolated mutant of *Yarrowia lipolytica* MK1 as a proper host for efficient erythritol biosynthesis from glycerol[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(1): 61-68. DOI:10.1016/j.procbio.2014.10.020.
- [44] PARK J, SEO B, KIM J, et al. Production of erythritol in fed-batch cultures of *Trichosporon* sp.[J]. Journal of Fermentation & Bioengineering, 1998, 86(6): 577-580. DOI:10.1016/S0922-338X(99)80010-5.
- [45] 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. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2022.03.004.
- [46] OH D K, CHO C H, LEE J K, et al. Increased erythritol production in fed-batch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2001, 26(4): 248-252. DOI:10.1038/sj.jim.7000122.
- [47] 田强, 秦海青, 邱学良, 等. *Yarrowia lipolytica* 酵母产赤藓糖醇的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2015(9): 121-124.
- [48] YANG Libo, DAI Xiaomeng, ZHENG Zhiyong, et al. Proteomic analysis of erythritol-producing *Yarrowia lipolytica* from glycerol in response to osmotic pressure[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(7): 1056-1069. DOI:10.4014/jmb.1412.12026.
- [49] PANCHAL C J, STEWART G G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain[J]. Journal of the Institute of Brewing, 1980, 86(5): 207-210. DOI:10.1002/j.2050-0416.1980.tb06867.x.
- [50] BINKLEY W W, WOLFORM M I. Biosynthesis of erythritol in a new yeast[J]. Journal of the American Chemical Society, 1950, 72: 4778-4782.
- [51] 王凤伟, 詹晓北, 郑志永, 等. 耐高渗产赤藓糖醇酵母的诱变筛选与鉴定[J]. 工业微生物, 2013, 43(1): 59-63.
- [52] GHEZELBASH G R, NAHVI I, EMAMZADEH R. Improvement of erythrose reductase activity, deletion of by-products and statistical media optimization for enhanced erythritol production from *Yarrowia lipolytica* mutant 49[J]. Current Microbiology, 2014, 69(2): 149-157. DOI:10.1007/s00284-014-0562-3.
- [53] MIRONCZUK A M, BIEGALSKA A, DOBROWOLSKI A. Functional overexpression of genes involved in erythritol synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 77. DOI:10.1186/s13068-017-0772-6.
- [54] ZHANG Ling, NIE Mingyue, LIU Feng, et al. Multiple gene integration to promote erythritol production on glycerol in *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology Letters, 2021, 43(7): 1277-1287. DOI:10.1007/S10529-021-03113-1.
- [55] NIANG P M, ARGUELLES A A, STEELS S, et al. In *Yarrowia lipolytica* erythritol catabolism ends with erythrose phosphate[J]. Cell Biology International, 2020, 44(2): 651-660. DOI:10.1002/cbin.11265.
- [56] CHENG Huiling, WANG Siqi, BILAL M, et al. Identification, characterization of two NADPH-dependent erythrose reductases in the yeast *Yarrowia lipolytica* and improvement of erythritol productivity using metabolic engineering[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 133. DOI:10.1186/s12934-018-0982-z.
- [57] MIRONCZUK A M, RZETCHONEK D A, BIEGALSKA A, et al. A novel strain of *Yarrowia lipolytica* as a platform for value-added product synthesis from glycerol[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 180. DOI:10.1186/s13068-016-0593-z.
- [58] CARLY F, VANDERMIES M, TELEK S, et al. Enhancing erythritol productivity in *Yarrowia lipolytica* using metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42: 19-24. DOI:10.1016/j.mben.2017.05.002.
- [59] TRASSAERT M, VANDERMIES M, CARLY F, et al. New inducible promoter for gene expression and synthetic biology in *Yarrowia lipolytica*[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 141: 16. DOI:10.1186/s12934-017-0755-0.
- [60] CARLY F, GAMBOA M H, VANDERMIES M, et al. Identification and characterization of *EYK1*, a key gene for erythritol catabolism in *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(17): 6587-6596. DOI:10.1007/s00253-017-8361-y.