



一株高效同化氨氮霉菌的筛选及其代谢组分析

黄文明¹, 尹梦丽¹, 陈煜¹, 李军训², 王常童¹, 张进¹, 左福元^{1*}

1 西南大学动物科学技术学院, 重庆 402460

2 山东泰山生力源集团股份有限公司, 山东 泰安 271000

黄文明, 尹梦丽, 陈煜, 李军训, 王常童, 张进, 左福元. 一株高效同化氨氮霉菌的筛选及其代谢组分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 161-173.

HUANG Wenming, YIN Mengli, CHEN Yu, LI Junxun, WANG Changtong, ZHANG Jin, ZUO Fuyuan. Screening and metabolomic analysis of a fungal strain efficiently assimilating ammonia nitrogen[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 161-173.

摘要:【目的】本试验旨在通过筛选出一株可以高效同化氨氮的霉菌, 揭示其在不同培养基中的代谢组差异和其发酵饲料的氨基酸含量变化, 明确霉菌氨同化代谢机制。【方法】用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源的培养基分别培养7株木霉(*Trichoderma* spp.)、7株黑曲霉(*Aspergillus niger*)和9株米曲霉(*Aspergillus oryzae*), 筛选氨氮利用率和谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)活性都较高的霉菌为供试菌株, 再利用非靶向代谢组学比较供试菌株在马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基和无机氮培养基中的代谢差异, 测定发酵饲料的粗蛋白质和有机氮含量, 利用氨基酸靶向代谢组学解析供试菌株发酵饲料提取液中氨基酸含量变化。【结果】结果表明, 筛选到的米曲霉MQ28氨氮利用率为54.46%, GS活性为0.61 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$, 均显著高于其他菌株($P<0.05$)。基于比较代谢组学分析, 确定MQ28在氨同化过程中与多种氨基酸代谢密切相关。MQ28发酵使饲料粗蛋白质含量提高22.25% ($P<0.05$), 有机氮含量提高35.83% ($P<0.05$), 饲料提取液中的总氨基酸含量从31.86 mmol/100 g提高到57.69 mmol/100 g ($P<0.05$), 苏氨酸、赖氨酸和精氨酸等14种氨基酸含量均显著提高($P<0.05$), 其中谷氨酸和谷氨酰胺含量分别提高3.46倍和99倍。【结论】综上所述, 米曲霉MQ28具有较高的氨氮利用能力, 可能是通过合成谷氨酰胺调节氨基酸代谢途径来调控氨同化过程, 可以作为生产单细胞蛋白的优良菌株。

关键词: 氨氮同化; 霉菌; 代谢组学; 氨基酸

资助项目: 重庆市技术创新与应用发展专项重点项目(cstc2021jscx-tpyzxX0014)

This work was supported by the Key Project of Chongqing Technology Innovation and Application Development (cstc2021jscx-tpyzxX0014).

*Corresponding author. E-mail: zfuyuan@163.com

Received: 2023-05-15; Accepted: 2023-07-27; Published online: 2023-08-29

Screening and metabolomic analysis of a fungal strain efficiently assimilating ammonia nitrogen

HUANG Wenming¹, YIN Mengli¹, CHEN Yu¹, LI Junxun², WANG Changtong¹, ZHANG Jin¹, ZUO Fuyuan^{1*}

1 College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 402460, China

2 Shandong Taishan Shengliyuan Group Co., Ltd., Tai'an 271000, Shandong, China

Abstract: [Objective] To screen out a fungal strain that can efficiently assimilate ammonia nitrogen, reveal the metabolome differences of the strain in different media and the changes in the amino acid content of the feed fermented with the strain, and clarify the mechanism of its ammonia assimilation. [Methods] Seven strains of *Trichoderma*, 7 strains of *Aspergillus niger*, and 9 strains of *Aspergillus oryzae* were cultured in the media with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the only nitrogen source. The strains with high ammonia nitrogen use efficiency and glutamine synthetase (GS) activity were selected for comparison of the metabolic differences in potato dextrose agar (PDA) plates and inorganic nitrogen plates by non-targeted metabolomics. Furthermore, the crude protein and organic nitrogen content in the feed fermented with different strains was determined, and the changes in amino acid content in the fermented feed extract were measured by amino acid-targeted metabolomics. [Results] The utilization rate of ammonia nitrogen and the glutamine synthetase activity of *A. oryzae* MQ28 were 54.46% and $0.61 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$, respectively, which were higher than those of other strains ($P<0.05$). The comparative metabolomics analysis suggested that MQ28 was associated with the metabolism of multiple amino acids during ammonia assimilation. MQ28 fermentation increased the crude protein and organic nitrogen in the feed by 22.25% and 35.83% ($P<0.05$), respectively. Furthermore, MQ28 fermentation increased the total amino acid content in feed extract from 31.86 mmol/100 g to 57.69 mmol/100 g ($P<0.05$). Specifically, it increased the content of 14 amino acids such as threonine, lysine, and arginine, glutamic acid (by 3.46 folds), and glutamine (by 99 folds) ($P<0.05$). [Conclusion] To sum up, *A. oryzae* MQ28 has high ammonia nitrogen utilization capacity. It may regulate the ammonia assimilation process through the synthesis of glutamine to regulate amino acid metabolism and can be used as an elite strain for the production of single-cell protein.

Keywords: ammonia nitrogen assimilation; fungal strain; metabolomics; amino acid

蛋白质饲料资源自给率低是制约我国畜牧业健康、可持续发展的主要因素。单细胞蛋白 (single cell protein, SCP) 在解决蛋白质短缺问题上具有较大潜力^[1-2]。目前, 用于生产 SCP 的微生物主要有细菌、酵母、霉菌和微藻。酵母和霉菌因具有较快的生长速度和较高的蛋白质含量

成为生产 SCP 的主要菌种^[3]。霉菌具有丰富的酶系, 工业酶中有大约 50% 是由霉菌生产的^[4]。有研究表明, 酵母菌的蛋白酶活力为 55–82 U/mL^[5], 黑曲霉的蛋白酶活力可达到 1 543.01 U/mL^[6]。有研究表明, 霉菌是较适合固态发酵的微生物, 能够提高固态发酵饲料的粗蛋白质含量^[7]。

Baldensperger 等^[8]利用黑曲霉(*Aspergillus niger*)发酵香蕉废料使其蛋白质含量从 6% 提高到 18%。顾赛红等^[9]利用黑曲霉(*Aspergillus niger*)发酵使棉籽粕的粗蛋白质含量提高 10.92%，除精氨酸外的必需氨基酸含量均增加。这些结果表明，霉菌是生产 SCP 的优良菌株。

氮是微生物生长的关键条件，而氮同化是微生物将无机氮变为有机氮的重要过程。有研究表明，细菌和酵母菌在谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)和谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)的作用下利用 NH_4^+ 合成谷氨酰胺和谷氨酸，谷氨酰胺和谷氨酸是其他氨基酸合成的前体物质，可以通过合成其他氨基酸促进蛋白质合成^[10-13]。对于霉菌氮同化的研究却鲜有报道。本试验拟从 23 株霉菌中筛选出一株可以高效同化氮的霉菌，并利用非靶向代谢组学和氨基酸靶向代谢组学揭示霉菌在不同培养基中的代谢组差异和其发酵饲料的氨基酸含量变化，揭示霉菌氮同化的代谢机制，为利用霉菌生产 SCP 提供优良菌株。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

试验所选用的 23 株霉菌为山东泰山生力源集团股份有限公司用于生产发酵饲料的保藏菌种，其中，木霉(*Trichoderma* spp.) 7 株，编号分别为 M8-M14；黑曲霉(*Aspergillus niger*) 7 株，编号分别为 HQ15-HQ21；米曲霉(*Aspergillus oryzae*) 9 株，编号分别为 MQ22-MQ30。

1.2 培养基和主要试剂

无机氮培养基：3%葡萄糖，2%硫酸铵，0.2%磷酸氢二钾，0.1%磷酸二氢钾；麦麸培养基：60%麦麸，40%大豆皮，5%硫酸铵。马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基，广东环凯微生物科技有限公司；葡萄糖、硫酸铵、磷

酸氢二钾、磷酸二氢钾，北京索莱宝科技有限公司；甲醇(LC-MS 级)、乙腈(LC-MS 级)，Merck 公司；谷氨酰胺合成酶(GS)试剂盒，南京建成生物工程研究所。

1.3 高效同化氮菌株的筛选

1.3.1 初筛

将 23 株霉菌同时接种到无机氮固体培养基中，于 30 °C 恒温培养箱中培养 48 h 后观察其生长状况，选择菌落直径大于 1 cm 的菌株，采用三区划线法对其进行纯化与保藏。

1.3.2 复筛

将初筛的菌株用接种环钩取一环接种到 100 mL 无机氮液体培养基中，每株菌 3 个重复，于 30 °C、150 r/min 的恒温摇床中培养 48 h 后将菌液放于 4 °C 冰箱保存待测。取 1 mL 菌液 5 000 r/min 离心 15 min，取上清，根据国标 HJ 535—22009 测定菌液和空白培养基的氮含量，根据公式(1)计算氮利用率；利用 GS 试剂盒测定 GS 活性。选择氮利用率和 GS 活性都较高的菌株为供试菌株。

$$\text{氮利用率} = (M_0 - M_1) / M_0 \quad (1)$$

式中： M_0 为空白培养基的氮含量； M_1 为菌液中剩余氮含量。

1.4 生长曲线的绘制

将供试菌株接种到 PDA 液体培养基中培养 48 h 作为种子液，然后以 2% (体积分数)的接种量将种子液分别接种于 100 mL 的无机氮液体培养基和 PDA 液体培养基中，在 30 °C、150 r/min 的恒温摇床中培养 0、12、24、28、32、36、40、44、48、52、56 和 60 h 后取样，每个时间点设 3 个重复，用分光光度计测定 OD_{600} 值，调整 OD_{600} 值在 0.1-0.8，然后以时间为横坐标， OD_{600} 值×稀释倍数为纵坐标绘制生长曲线。

1.5 供试菌株的代谢组分析

1.5.1 样品准备

将供试菌株分别接种到 PDA 液体培养基和

无机氮液体培养基中, 每种培养基设 3 个重复, 于 30 °C、150 r/min 的恒温摇床中培养到菌株对数生长期时取 2 mL 菌液 5 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液到新的离心管中, 经液氮冷冻后保存到-80 °C 冰箱待测。

1.5.2 样品提取

吸取 100 μ L 菌液上清液, 加入 500 μ L 含有内标的提取液(甲醇:乙腈体积比 1:1, 内标浓度 20 mg/L), 涡旋混匀 30 s; 超声 10 min (冰水浴), 重复 3 次; -20 °C 静置 1 h; 将样本 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后取 500 μ L 上清液于 EP 管中; 在真空浓缩器中干燥; 向干燥后的代谢物中加入 160 μ L 提取液(乙腈:水体积比 1:1)复溶; 涡旋混匀 30 s, 超声 10 min (冰水浴), 重复 3 次; 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后取 120 μ L 上清液于 2 mL 进样瓶中。每个样本各取 10 μ L 混合成质控样本(quality control, QC)上机检测。

1.6 供试菌株发酵饲料的蛋白质含量测定和氨基酸组学分析

1.6.1 霉菌种子的制备

将 40 g 含水量为 50% 的麦麸装入 250 mL 三角瓶, 于 121 °C 灭菌 30 min。切取供试菌株的斜面单菌落 1/3, 接种于三角瓶中, 在 32 °C 培养箱中培养 3 d 后 40 °C 烘干, 粉碎后放于-20 °C 冰箱保存备用。

1.6.2 固态发酵

试验组以 0.5% (质量分数) 的接种量将霉菌种子接种于含水量为 50% 的麦麸培养基中, 置于 32 °C 培养箱中培养 36 h 后 45 °C 烘干、粉碎, 保存于-20 °C 冰箱待测。对照组不接种霉菌, 其余和试验组相同, 每组 3 个重复。

1.6.3 粗蛋白质和有机氮含量的测定

样品中的粗蛋白质含量测定参照国标 GB/T 6432—2018。无机氮含量测定参照国标 GB 5009.234—2016 的方法并略作修改: 称取 0.2 g

样品放入消化管, 加入 1 g 氧化镁后利用凯氏定氮仪测定样品中的无机氮含量。样品粗蛋白质含量减去无机氮含量即为有机氮含量。

1.6.4 代谢物提取

称取 20 mg 饲料样本于 EP 管中, 加 2 个小钢珠, 向样本中加入 1 000 μ L 提取液(乙腈:甲醇:水的体积比 2:2:1, 含同位素标记内标混合物, -40 °C 预冷), 涡旋混匀 30 s; 40 Hz 研磨处理 4 min, 超声 5 min (冰水浴), 重复 3 次; -40 °C 静置 1 h; 将样本 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液稀释 5 倍, 涡旋混匀 30 s; 取 80 μ L 上清液稀释液至进样瓶中, 用于超高液相色谱串联质谱法 (ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS) 分析。

1.7 数据统计和分析

利用 SPSS 22 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), LSD (least significant digit) 多重比较。统计结果以 $P < 0.05$ 具有统计学意义, 用“平均值 \pm 标准差”表示。使用 MassLynx V4.2 采集代谢组原始数据, 通过 Progenesis QI 软件做峰提取、峰对齐等数据处理操作, 基于 Progenesis QI 软件在线 METLIN 数据库、公共数据库以及百迈客自建库进行鉴定。基于正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 模型的变量重要性投影 (variable Importance in projection, VIP) 值、单变量分析的 P -value 和差异倍数 (fold change) 来筛选, 选取 $VIP \geq 1$ 、 P -value ≤ 0.05 、 $|\text{fold change}| \geq 1$ 的代谢物为差异代谢物。对差异代谢物进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集通路分析。通过 Agilent MassHunter Work Station Software (B.08.00, Agilent Technologies) 对 25 种氨基酸进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 高效同化氮的霉菌筛选

23 株霉菌中共有 7 株霉菌在无机氮培养基中的菌落直径>1 cm (表 1), 生长良好且稳定, 分别为 M13、M14、HQ15、HQ21、MQ25、MQ26 和 MQ28。MQ28 的菌落直径显著大于其余菌株 ($P<0.05$)。MQ28 的氮氮利用率和 GS 活性分别为 54.46% 和 0.61 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$, 均显著高于其余菌株 ($P<0.05$, 表 2)。因此, 选择 MQ28 为供试菌株。

2.2 菌株的生长曲线

MQ28 在 PDA 培养基和无机氮培养基中的生长曲线如图 1 所示, 在无机氮培养基中, MQ28 在 0–24 h 为延迟生长期, 24–48 h 为对数生长期, 48–60 h 稳定期; 在 PDA 培养基中, MQ28 在 0–24 h 为延迟生长期, 24–44 h 为对数生长期, 44–52 h 为稳定期。这说明 MQ28 在无机氮培养基中仍然生长良好。

表 1 霉菌的菌落直径

Table 1 The diameter of the mold colony

Strain No.	Colony diameter (cm)
M13	3.03±0.17b
M14	1.60±0.08d
HQ15	1.82±0.10d
HQ21	1.37±0.12d
MQ25	2.45±0.04c
MQ26	2.67±0.12c
MQ28	4.49±0.09a
<i>P</i> -value	<0.05

The different letter means significant difference ($P<0.05$).

表 2 菌株的氮氮利用率和 GS 活性

Table 2 Ammonia nitrogen utilization and GS activity of the strain

Strain No.	Ammonia nitrogen utilization (%)	GS activity ($\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$)
M13	40.17±0.13c	0.08±0.01d
M14	45.74±0.14b	0.37±0.07c
HQ15	51.17±0.08a	0.50±0.12b
HQ21	26.73±0.04d	0.04±0.03d
MQ25	28.16±0.06d	0.07±0.01d
MQ26	42.88±0.07b	0.14±0.02d
MQ28	54.46±0.03a	0.61±0.01a
<i>P</i> -value	<0.05	<0.05

The different letter means significant difference ($P<0.05$).

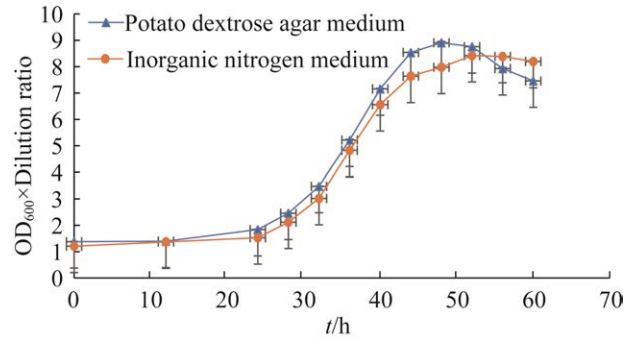


图 1 菌株在不同培养基中的生长曲线

Figure 1 Growth curves of the strain in different media. The standard deviation in the figure shows the degree of dispersion of the results of the three measurements.

2.3 供试菌株在不同培养基中的代谢组分析

2.3.1 差异分组的正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)

由图 2 可知, R^2Y 为 1, Q^2Y 为 0.997, 这说明此模型能够反映两组之间 100% 的差异, 并且此模型对差异代谢物的预测能力为 99.7%, 即该模型筛选的差异代谢物较为可靠。为进一步验证 OPLS-DA 模型的可靠性, 需要进行置换检验, 结果如图 3 所示。差异代谢物的 R^2Y 值普遍高于 Q^2Y 值, 这说明 OPLS-DA 模型的建模训练集和测试集的独立性较好; Q^2Y 拟合回归线的斜率为正且截距为负, 说明模型有效、没有过拟合。

2.3.2 差异代谢物筛选

基于非靶向代谢组技术, 在默认模式下共检测到 3 235 个代谢物, 其中有 2 049 个差异显著代谢物, 819 个显著上调, 1 230 个显著下调。差异代谢物主要包含氨基酸、有机酸、脂类等初级代谢物, 苷类、醇类、醛类、酮类、酯类、胺类和抗生素等次级代谢物。根据差异代谢物含量的高低, 筛选出在无机氮培养基中相对含量较高

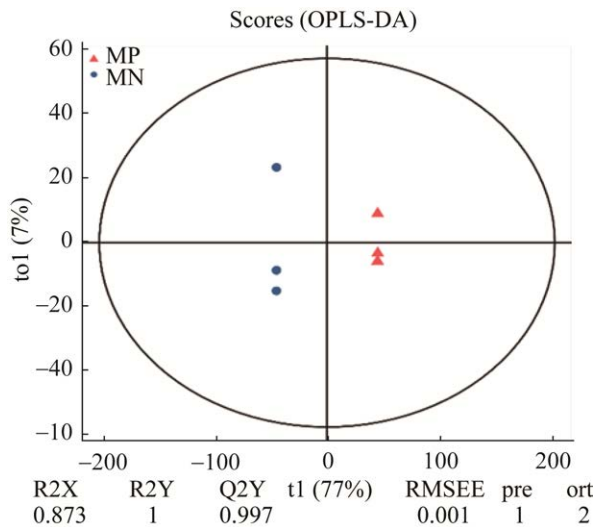


图2 OPLS-DA 得分图

Figure 2 OPLS-DA score graph. MN is inorganic nitrogen culture medium sample, MP is PDA culture medium sample. R2X represents the interpretation rate of the established model to the quantitative metabolite, R2Y represents the interpretation rate of the established model to the sample grouping matrix, and Q2Y represents whether the established model can distinguish the correct sample grouping by the amount of metabolic expression.

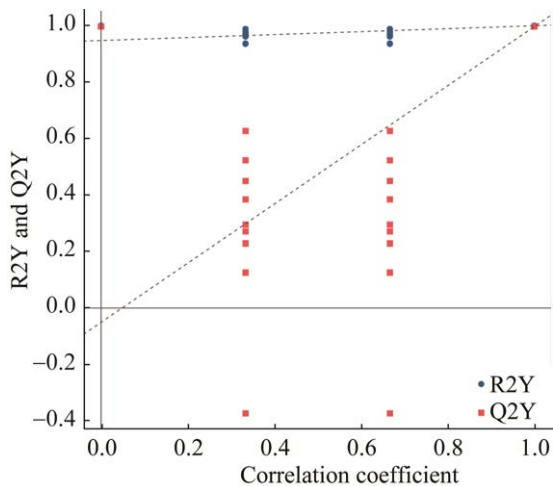


图3 OPLS-DA 模型置换检验图

Figure 3 OPLS-DA model permutation test chart in the figure. The blue and red dots represent the R2Y and Q2Y of the model after replacement respectively, and the two dashed lines are the regression lines fitted by R2Y and Q2Y.

的 27 种代谢物, 分别为氨基酸类、小肽、抗生素类、有机酸类、维生素类和脂类(表 3)。与 PDA 培养基相比, 无机氮培养基中丙氨酸、组氨酸和赖氨酸等 10 种氨基酸及其衍生物上调, 亮氨酸下调; 高肌肽上调; 无水四环素、兰多霉素 D 和紫霉素等 5 种抗生素上调, 新霉素 B 和 34a 脱氧利福霉素 W 下调; 茴香酸、己酸等 4 种有机酸下调; 甲氧基乙酸上调; 维生素 K3 和生物素 A 上调; 磷脂酰胆碱下调。

2.3.3 差异代谢物的 KEGG 分析

对差异代谢物 KEGG 的注释结果进行富集分析, 筛选出富集差异代谢物数量较多的 30 个代谢通路(表 4)。在默认模式下, 差异代谢物富集的 30 个代谢通路里有 11 个是关于氨基酸的代谢, 其次是 12、14 和 16 元大环内酯的生物合成、嘧啶代谢、双组分系统和三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环等。这说明氨基酸代谢可能是米曲霉 MQ28 氨同化过程的关键代谢通路。

2.4 供试菌株发酵饲料的粗蛋白质、有机氮含量和氨基酸定量分析

发酵组的粗蛋白质含量和有机氮含量显著高于对照组($P < 0.05$, 表 5), 其中粗蛋白质含量提高 22.25%, 有机氮含量提高 35.83%。发酵组和对对照组提取液的氨基酸总量分别为 57.69 mmol/100 g 和 31.86 mmol/100 g ($P < 0.05$, 表 6)。发酵组中的 4-氨基丁酸、酪氨酸、beta-丙氨酸、丙氨酸、谷氨酸、羟基脯氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、瓜氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸和鸟氨酸含量显著高于对照组($P < 0.05$), 色氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和 3-甲基-L-组氨酸的含量显著低于对照组($P < 0.05$), 苯基丙氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、脯氨酸和甘氨酸的含量和对照组无显著性差异($P > 0.05$)。

表 3 主要差异代谢物

Table 3 Major differential metabolites

Category	Metabolite name	<i>P</i> -value	VIP	Regulated
Amino acids	Alanine	0.03	1.07	Up
	Phenylalanine	0.03	1.07	Up
	S-adenosyl-L-homocysteine	0.01	1.12	Up
	5,6,7,8-tetrahydrofolyl-L-glutamic acid	0.00	1.13	Up
	L-ornithine	0.01	1.13	Up
	Leucine	0.00	1.14	Down
	Lysine	0.03	1.07	Up
	Threonine	0.00	1.13	Up
	N-acetyl-DL-serine	0.01	1.11	Up
	Histidine	0.00	1.13	Up
	Arginine	0.00	1.13	Up
Small peptide	Homocarnosine	0.01	1.12	Up
Antibiotics	Anhydrotetracycline	0.05	1.04	Up
	Neomycin B	0.00	1.14	Down
	2'''-N-acetyl-6'''-deamino-6'''-hydroxyparomomycin	0.01	1.11	Up
	34a-deoxy-rifamycin W	0.00	1.14	Down
	Landomycin D	0.02	1.09	Up
	Aclacinomycin N	0.01	1.13	Up
	Viomycin	0.02	1.09	Up
Organic acids	Anisic acid	0.00	1.14	Down
	D(-)- β -hydroxy butyric acid	0.00	1.13	Down
	3-methyl pyruvic acid	0.02	1.08	Down
	Hexanoic acid	0.00	1.14	Down
	Methoxyacetic acid	0.01	1.11	Up
Vitamins	Vitamin K3	0.03	1.08	Up
	Biochanin A	0.01	1.12	Up
Lipids	PC (16:1(9Z)/0:0)	0.00	1.14	Down

表 4 差异代谢物涉及的代谢通路

Table 4 Metabolic pathways involved in differential metabolites

No.	KEGG metabolic pathway	Number of differential metabolites
1	Arginine and proline metabolism (ko00330)	17
2	Biosynthesis of 12,14 and 16 membered macrolides (ko00522)	15
3	Pyrimidine metabolism (ko00240)	12
4	D-amino acid metabolism (ko00470)	12
5	Two-component system (ko02020)	11
6	Tryptophan metabolism (ko00380)	10
7	Tyrosine metabolism (ko00350)	10
8	Citrate cycle (TCA cycle) (ko00020)	9
9	beta-alanine metabolism (ko00410)	9
10	Biosynthesis of ornithine, lysine and niacin-derived alkaloids (ko01064)	8
11	Phenylalanine metabolism (ko00360)	8
12	Degradation of aminobenzoate (ko00627)	8
13	Arachidonic acid metabolism (ko00590)	8
14	Glycine, serine and threonine metabolism (ko00260)	8
15	Toluene degradation (ko00623)	7
16	Serotonergic synapses (ko04726)	7
17	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis (ko00960)	7
18	Biosynthesis of shikimate pathway alkaloids (ko01063)	7
19	Niacin and niacinamide metabolism (ko00760)	7
20	Alpha-linolenic acid metabolism (ko00592)	7
21	Riboflavin metabolism (ko00740)	6
22	Linoleic acid metabolism (ko00591)	6
23	Histidine metabolism (ko00340)	6
24	Diterpenoid biosynthesis (ko00904)	5
25	Carotenoid biosynthesis (ko00906)	5
26	Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis (ko00524)	5
27	Lysine biosynthesis (ko00300)	5
28	Retrograde endocannabinoid signaling (ko04723)	4
29	Alanine, aspartate and glutamate metabolism (ko00250)	4
30	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism (ko00520)	4

表 5 发酵组和对照组中粗蛋白质和有机氮的含量

Table 5 Contents of crude protein and organic nitrogen in fermentation group and unfermented group (%)

Items	Fermentation group	Unfermented group
Crude protein	23.90±1.17a	19.55±1.06b
Organic nitrogen	19.41±0.27a	14.29±0.05b

Different letters in the same row indicate significant difference ($P<0.05$).

表 6 发酵组和对照组中 25 种氨基酸的含量

Table 6 Contents of 25 amino acids in fermentation group and the unfermented group (mmol/100 g)

Amino acid	Fermentation group	Unfermented group
Tryptophan	0.21±0.02b	3.03±0.11a
Phenylalanine	0.56±0.12	0.54±0.02
Methionine	0.08±0.01	0.07±0.01
Valine	1.30±0.28	1.28±0.14
4-aminobutyric acid	7.16±1.33a	4.86±0.06b
Tyrosine	1.75±0.29a	0.65±0.03b
Proline	1.63±0.30	1.79±0.04
Beta-alanine	0.63±0.08a	0.47±0.02b
Alanine	7.82±1.75a	5.19±0.06b
Glycine	1.68±0.30	1.94±0.12
Glutamic acid	9.23±1.80a	2.07±0.09b
Hydroxyproline	0.33±0.05a	0.14±0.01b
Threonine	1.64±0.22a	0.68±0.03b
Aspartic acid	1.28±0.23b	2.39±0.02a
Glutamine	16.00±1.66a	0.16±0.03b
Serine	2.10±0.30a	0.65±0.02b
Citrulline	0.12±0.03a	0.02±0.01b
Asparagine	2.13±0.30b	5.02±0.09a
Arginine	0.77±0.13a	0.53±0.02b
3-methyl-L-histidine	0.01±0.00b	0.02±0.00a
Lysine	0.57±0.09a	0.21±0.01b
Histidine	0.55±0.15a	0.12±0.01b
Ornithine	0.13±0.02a	0.03±0.00b
1-methyl-L-histidine	N.D.	N.D.
5-hydroxylysine	N.D.	N.D.
Total	57.69±9.48a	31.86±0.96b

Different letters in the same row indicate significant difference ($P<0.05$). N.D.: The target compound was not detected in this sample. 0.00: Standard deviation \leq 0.001.

3 讨论

3.1 高效同化氮的霉菌筛选

微生物可以利用氮合成微生物蛋白,其合成效率与微生物的氮同化能力密切相关。凌晓^[14]从不同样品中筛选出具有高氮利用能力的酿酒酵母的蛋白质含量高达 62.22%。马霞飞等^[15]筛选的非蛋白氮(non-protein nitrogen, NPN)利用能力较强的两株酵母菌的蛋白质含量分别为 48.78%和 58.71%。霉菌具有丰富的酶系,利用益生菌发酵不仅能提高蛋白质含量,还能够降低一些霉菌毒素含量^[16]。目前对于霉菌氮同化的研究鲜有报道。本试验用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源的培养基,筛选出一株氮氮利用率和 GS 活性都较高的米曲霉,其氮氮利用率为 54.46%, GS 活性为 0.61 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$ 。凌晓^[14]从 8 株酵母菌中筛选出 3 株可以高效同化氮的菌株,这 3 株酵母菌在培养 5 d 后,氮氮利用率分别为 36.99%、12.42%和 15.77%, GS 活性分别为 0.85、0.30、0.28 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ 。而曹玉飞^[17]以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源的培养基,筛选出的 10 株东方伊萨酵母氮氮利用率均在 10%以下,17 株马克思克鲁维酵母氮氮利用率为 30%–55%,34 株假丝酵母氮氮利用率为 40%–80%。这说明本研究筛选到的米曲霉 MQ28 具有较好的氮氮利用能力,可以作为生产 SCP 的备用菌株。

3.2 菌株在不同培养基中的非靶向代谢组学分析

OPLS-DA 是一个有监督的模型,模型的两个得分值, R2Y 说明了模型的可解释性, R2Y 越接近 1,说明能解释两组分类的信息越多,即两组之间的差异越大。而 Q2Y 则说明模型的可预测性, Q2Y 越接近 1,说明模型的可预测性越强,即模型越可靠。为避免 OPLS-DA 模型出现过拟合现象,需要对其进行置换检验,置换检验是一种外部验证方法,若 Q2Y 拟合回归线的斜

率为正且截距为负,则说明模型不存在过拟合现象。本试验中 R2Y 为 1, Q2Y 为 0.997, 这说明该模型较可靠且两组间的差异较大,置换检验中 Q2Y 拟合回归线的斜率为正且截距为负,说明该模型不存在过拟合现象^[18]。

微生物氨同化主要有两种途径:一是 α -酮戊二酸和氨在谷氨酸脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GDH) 参与下生成谷氨酸,谷氨酸和氨在 GS 作用下生成谷氨酰胺^[19-20];另一途径是谷氨酰胺的酰胺氮通过谷氨酸合成酶 (glutamate synthase, GOGAT) 转移到 α -酮戊二酸上,然后将 GOGAT 反应与 GS 反应耦合,实现了一个不可逆的谷氨酸生成途径^[21]。因此,GS 在微生物氨同化中有极其重要的作用,而 GS 的基因表达明显受到代谢物水平的调节,主要通过碳骨架和氨基酸的相对含量来控制^[22]。本研究通过比较代谢组学分析发现,相比于 PDA 培养基,无机氮培养基中相对含量较高的差异代谢物以氨基酸为主。通过 KEGG 通路分析发现,富集差异代谢物数量较多的代谢通路主要包括各种氨基酸代谢、双组分系统和三羧酸(TCA)循环等。

氨基酸代谢除了与蛋白质合成密切相关,也参与 ATP 生成,核苷酸合成和氧化还原平衡等代谢途径,以支持细胞和生物体功能^[23]。本研究中,相比于 PDA 培养基,无机氮培养基中的丙氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸和精氨酸等均显著上调,这说明米曲霉 MQ28 的氨同化过程可能与这些氨基酸代谢密切相关。氨同化的有效运转需要大量 ATP、碳骨架和还原力的参与^[24],而碳代谢,尤其是 TCA 循环,可以为氨同化提供 ATP、碳骨架和还原力。本研究中,无机氮培养基里富集在 TCA 循环里的琥珀酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸等显著下调,这可能是因为琥珀酸、柠檬酸和 α -酮戊二酸都参与 TCA 循环,生成 ATP

和还原力供氨同化有效运转。双组分系统是微生物中主要的信号转导系统,氮调节蛋白在双组分系统调控微生物氮代谢过程中起着关键作用。GLNL 和 GLNK 是在双组分转运调节系统中的两个重要氮调节蛋白,GLNK 可以直接感知 NH_4^+ 的浓度,通过信号转导调节基因 *glnL* 的表达,进而由转录调节蛋白 GLNL 调控氨转运蛋白 *atmB* 的表达,*atmB* 可以保持细胞内外的氮源平衡^[25]。本试验中,无机氮培养基里富集在双组分系统的代谢物较多,可能是因为米曲霉 MQ28 在利用 NH_4^+ 合成蛋白质时双组分系统高效运作导致的。本试验中,米曲霉 MQ28 还产生了一些多糖、腺苷和三萜类等物质,这些功能性物质除了具有抗炎、抗菌、抗疲劳和抗疟疾的作用外,还可以保护肺和肝脏,增强免疫力和抗氧化能力^[26-27]。

3.3 供试菌株发酵饲料的粗蛋白质、有机氮含量和氨基酸定量分析

本研究结果表明,发酵组粗蛋白质含量、有机氮含量和提取液中的氨基酸总量显著高于对照组,其中,谷氨酸和谷氨酰胺含量分别提高 3.46 倍和 99 倍。这说明 MQ28 可能是通过氨同化作用提高饲料蛋白质含量。谷氨酰胺是动物体内最丰富的氨基酸,可用于所有细胞,作为生产烟酰胺、腺嘌呤磷酸盐、核苷酸、嘌呤、嘧啶、抗氧化剂和许多其他生物合成途径的物质,这些途径涉及细胞的完整性及其正常功能^[28]。在真菌氨同化过程中,谷氨酰胺是氨同化的主要产物^[29],除了作为酰胺化反应的底物外,还通过 *w*-酰胺酶转化为氨基酸的 α -氨基、 α -酮戊二酸和铵。谷氨酰胺也可以在 GS 作用下直接被同化为 α -氨基氮。*w*-酰胺酶途径释放的铵不仅被 GDH 同化,也被 GS 同化,从而导致谷氨酰胺的循环运行,在这个循环中,氨基酸不断被合成^[30]。

谷氨酰胺在细胞代谢中具有广泛的作用,细

胞质中的谷氨酰胺可以通过线粒体谷氨酰胺转运体 SLC1A5 运输到线粒体中, 然后通过谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)转化为谷氨酸, 释放铵离子^[31]。这些线粒体谷氨酸通过 SLC25A18 和 SLC25A22 转运体从线粒体输出到胞浆, 在几种转氨酶的作用下参与谷胱甘肽、丙氨酸、丝氨酸和精氨酸的生物合成^[32]。此外, 谷氨酸也可以在吡咯啉-5-羧酸合成酶(Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS)和谷氨酸脱羧酶作用下降解为瓜氨酸^[33]和 4-氨基丁酸。因此, 本试验中, 发酵组丙氨酸、丝氨酸、瓜氨酸、精氨酸和 4-氨基丁酸含量均显著上升。有研究证明, 谷氨酰胺用于合成色氨酸的吡啶部分和组氨酸的咪唑基^[34], 色氨酸脱氨产生相应的 α -酮酸, 通过 α -酮酸脱羧酶(keto acid decarboxylase, KDC)脱羧为醛, 然后在酒精脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADHs)作用下还原为色胺醇(TryOH)^[35], TryOH 通过调节丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和蛋白激酶 AGC (protein kinase A, G, C, AGC)信号通路促进丝状真菌的生长^[36]。本试验中, 发酵组色氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺的含量显著下降, 这可能是由于色氨酸被大量用于促进霉菌生长, 而天冬氨酸在天冬氨酸转氨酶作用下生成了谷氨酸。

4 结论

本试验以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源的培养基筛选出高效同化无机氮的米曲霉 MQ28, 其氮氮利用率为 54.46%, GS 活性为 0.61 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$ 。MQ28 的氮同化作用与氨基酸代谢密切相关, 使无机氮培养基中的丙氨酸、组氨酸和赖氨酸等 10 种氨基酸及其衍生物显著上调。MQ28 发酵后显著提高了饲料中的粗蛋白质、有机氮含量以及苏氨酸、赖氨酸、精氨酸等 14 种氨基酸

的含量, 其中, 谷氨酸和谷氨酰胺含量分别提高 3.46 倍和 99 倍。这说明米曲霉 MQ28 可能是通过合成谷氨酰胺调节氨基酸代谢途径来调控氮同化过程。MQ28 还能产生多种抗炎、抑菌的代谢产物, 是一株具有开发应用前景的菌株。

参考文献

- [1] JONES SW, KARPOL A, FRIEDMAN S, MARU BT, TRACY BP. Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 61: 189-197.
- [2] CARRANZA-MÉNDEZ RC, CHÁVEZ-GONZÁLEZ ML, SEPÚLVEDA-TORRE L, AGUILAR CN, GOVEA-SALAS M, RAMOS-GONZÁLEZ R. Production of single cell protein from orange peel residues by *Candida utilis*[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2022, 40: 102298.
- [3] ANUPAMA RP, RAVINDRA P. Value-added food: single cell protein[J]. *Biotechnology Advances*, 2000, 18(6): 459-479.
- [4] SAKEKAR AA, GAIKWAD SR, PUNEKAR NS. Protein expression and secretion by filamentous fungi[J]. *Journal of Biosciences*, 2021, 46(1): 5.
- [5] 乔传丽, 金丹, 蒋艾廷, 薛林林, 卢士玲, 李宝坤. 传统发酵酸牛奶中产蛋白酶酵母菌的筛选及产酶条件优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(5): 73-78. QIAO CL, JIN D, JIANG AT, XUE LL, LU SL, LI BK. Screening of yeast with high protease activities from traditional yogurt and optimization of enzyme conditions[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(5): 73-78 (in Chinese).
- [6] 吴重德, 刘孟华, 杨珊, 周荣清. 响应面法优化酸性蛋白酶发酵条件的研究[J]. *中国酿造*, 2008, 27(4): 13-16. WU CD, LIU MH, YANG S, ZHOU RQ. Optimization of fermentation conditions for producing acid protease using response surface methodology[J]. *China Brewing*, 2008, 27(4): 13-16 (in Chinese).
- [7] VALENTINO MJG, GANADO LS, UNDA JR. Single cell protein potential of endophytic fungi associated with bamboo using rice bran as substrate[J]. *Advances in Applied Science Research*, 2016, 7(3): 68-72.
- [8] BALDENSPERGER J, LE MER J, HANNIBAL L, QUINTO PJ. Solid state fermentation of banana wastes[J]. *Biotechnology Letters*, 1985, 7(10): 743-748.

- [9] 顾赛红, 孙建义, 李卫芬. 黑曲霉 PES 固体发酵对棉籽粕营养价值的影响[J]. 中国粮油学报, 2003, 18(1): 70-73.
GU SH, SUN JY, LI WF. Effects of solid fermentation by *A. niger* PES on nutritional value of cottonseed meal[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2003, 18(1): 70-73 (in Chinese).
- [10] SIMS AP, FOLKES BF. A kinetic study of the assimilation of [¹⁵N]-ammonia and the synthesis of amino acids in an exponentially growing culture of *Candida utilis*[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences, 1964, 159(976): 479-502.
- [11] MAGASANIK B. Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Eukaryotic Cell, 2003, 2(5): 827-829.
- [12] YUAN J, DOUCETTE CD, FOWLER WU, FENG XJ, PIAZZA M, RABITZ HA, WINGREEN NS, RABINOWITZ JD. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*[J]. Molecular Systems Biology, 2009, 5: 302.
- [13] GILL S, PULIDO O. Glutamate Receptors in Peripheral Tissue: Excitatory Transmission Outside the CNS[M]. Boston, MA: Springer US, 2005.
- [14] 凌晓. 高氨氮利用酵母筛选及其固态发酵苜蓿粉的应用研究[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2021.
LING X. Screening of yeast with high ammonia nitrogen utilization and its application in solid-state fermentation of alfalfa powder[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [15] 马霞飞, 郭艳丽, 张铁鹰. 高非蛋白氮利用能力酵母菌的筛选与诱变[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(10): 2724-2732.
MA XF, GUO YL, ZHANG TY. High non-protein nitrogen utilization capacity yeast screening and mutagenesis[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(10): 2724-2732 (in Chinese).
- [16] 陈颀. 有益霉菌固体发酵饲料原料提升其营养成分与利用的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2017.
CHEN Q. Study on raising nutrients and usage of raw materials of animal feed by solid-state fermenting with probiotics[D]. Changsha: Master Dissertation of Hunan Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [17] 曹玉飞. 耐高温酵母菌高氨氮同化率菌株的筛选和发酵条件研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学硕士学位论文, 2014.
CAO YF. Screening and study on fermenting conditions of thermotolerant and high ammonia assimilation rate yeast strains[D]. Wuhan: Master Thesis of Wuhan University of Light Industry, 2014 (in Chinese).
- [18] 欧阳红军, 刘义军, 袁源, 静玮, 张利, 李积华. HS-SPME-GC-MS 结合 OPLS-DA 分析提取方法对牛油果油挥发性香气化合物的影响[J]. 南方农业学报, 2021, 52(3): 779-788.
OUYANG HJ, LIU YJ, YUAN Y, JING W, ZHANG L, LI JH. HS-SPME-GC-MS coupled with OPLS-DA to analyze the effects of extraction methods on volatile aroma compounds of avocado oil[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(3): 779-788 (in Chinese).
- [19] TEMPEST DW, MEERS JL, BROWN CM. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route[J]. Biochemical Journal, 1970, 117(2): 405-407.
- [20] ROON RJ, EVEN HL, LARIMORE F. Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bacteriology, 1974, 118(1): 89-95.
- [21] HUMMELT G, MORA J. Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1980, 96(4): 1688-1694.
- [22] 周忠新. 蔗糖对不同氮源培养下水稻根部氨同化相关酶活性的影响[D]. 武汉: 武汉大学硕士学位论文, 2005.
ZHOU ZX. Effects of sucrose on activities of enzymes related to ammonia assimilation in rice roots under different nitrogen sources[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan University, 2005 (in Chinese).
- [23] KELLY B, PEARCE EL. Amino assets: how amino acids support immunity[J]. Cell Metabolism, 2020, 32(2): 154-175.
- [24] HODGES M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(370): 905-916.
- [25] LIU G, VIJAYARAMAN SB, DONG Y, LI X, ANDONGMAA BT, ZHAO L, TU J, HE J, LIN L. *Bacillus velezensis* LG37: transcriptome profiling and functional verification of GlnK and MnrA in ammonia assimilation[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 215.

- [26] FINIMUNDY TC, BARROS L, CALHELHA RC, ALVES MJ, PRIETO MA, ABREU RMV, DILLON AJP, HENRIQUES JAP, ROESCH-ELY M, FERREIRA ICFR. Multifunctions of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer: a highly nutritious food and a source for bioactive compounds[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 150-158.
- [27] DAS SK, MASUDA M, SAKURAI A, SAKAKIBARA M. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects[J]. Fitoterapia, 2010, 81(8): 961-968.
- [28] CRUZAT V, MACEDO ROGERO M, NOEL KEANE K, CURI R, NEWSHOLME P. Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation[J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1564.
- [29] MORA J. Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*[J]. Microbiological Reviews, 1990, 54(3): 293-304.
- [30] CALDERÓN J, MORETT E, MORA J. Omega-amidase pathway in the degradation of glutamine in *Neurospora crassa*[J]. Journal of Bacteriology, 1985, 161(2): 807-809.
- [31] YOO HC, PARK SJ, NAM M, KANG J, KIM K, YEO JH, KIM JK, HEO Y, LEE HS, LEE MY, LEE CW, KANG JS, KIM YH, LEE JN, CHOI J, HWANG GS, BANG S, HAN JM. A variant of SLC1A5 is a mitochondrial glutamine transporter for metabolic reprogramming in cancer cells[J]. Cell Metabolism, 2020, 31(2): 267-283. e12.
- [32] STINE ZE, DANG CV. Glutamine skipping the Q into mitochondria[J]. Trends in Molecular Medicine, 2020, 26(1): 6-7.
- [33] WU G, KNABE DA. Arginine synthesis in enterocytes of neonatal pigs[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 1995, 269(3): R621-R629.
- [34] STADTMAN ER. Regulation of glutamine synthetase activity[J]. EcoSal Plus, 2004, 1(1). DOI:10.1128/ecosalplus.3.6.1.6.
- [35] ZHANG DL, WANG FJ, YU Y, DING S, CHEN TP, SUN WJ, LIANG CC, YU B, YING HJ, LIU D, CHEN Y. Effect of quorum-sensing molecule 2-phenylethanol and *ARO* genes on *Saccharomyces cerevisiae* biofilm[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(9): 3635-3648.
- [36] CUI GB, HUANG CW, BI XP, WANG YX, YIN K, ZHU LY, JIANG ZD, CHEN BS, DENG YZ. Aminotransferase SsAro8 regulates tryptophan metabolism essential for filamentous growth of sugarcane smut fungus *Sporisorium scitamineum*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): e0057022.