

酿酒酵母产脂肪酸乙酯代谢途径改造

姜慧, 张利华, 夏媛媛, 陈献忠*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 脂肪酸乙酯(fatty acid ethyl ester, FAEE)是目前最具有潜力的新型能源,微生物细胞工厂生产FAEE比目前普遍的化学合成方法具有诸多优势,例如对环境污染小、生产成本低等。酿酒酵母具备良好的产乙醇和脂肪酰辅酶A的能力,我们试图通过改造酿酒酵母代谢途径来提高FAEE的前体——脂肪酰辅酶A的产量。通过引入根据酿酒酵母密码子优化的外源基因WS2(蜡酯合成酶基因)构建一条可以利用葡萄糖为底物、经过一系列反应生成FAEE的代谢通路。富集脂肪酰辅酶A需要进一步改造分支途径,例如阻断甾醇酯途径($\Delta ARE1$ 、 $\Delta ARE2$),三酰基甘油途径($\Delta DGA1$ 、 $\Delta LRO1$)和 β 氧化途径($\Delta PXA2$)来减少脂肪酰辅酶A的分流,从而相应的富集脂肪酰辅酶A。结果表明:3个途径的敲除大大增加了FAEE的产量,相较于在原始出发菌株BY4741中表达WS2即菌株BYW2增加了9倍,摇瓶产量达到11.72 mg/L。由于目的产物FAEE产量较低,在摇瓶发酵阶段进行了发酵优化,对是否添加乙醇和菜籽油、发酵时间以及乙醇添加模式这3个因素进行优化。结果表明:添加乙醇和菜籽油明显提升了FAEE产量,最佳发酵时间为60 h,乙醇添加模式为从20 h开始每间隔6 h补加发酵体积的2%,此时FAEE产量达到最高,为144.4 mg/L,是未优化前FAEE产量的12.3倍,是出发菌株BY4741中FAEE产量的480倍。为进一步提升FAEE产量,采用发酵罐发酵并对比了尿嘧啶缺陷菌株BYD5W2和尿嘧啶未缺陷菌株BYD5W2*的FAEE产量的差异,结果显示尿嘧啶缺陷菌株BYD5W2的FAEE最高产量为0.618 g/L,尿嘧啶未缺陷菌株BYD5W2*的FAEE最高产量为1.35 g/L,是目前报道的利用酿酒酵母产FAEE产量中较高的。

关键词: 酿酒酵母;脂肪酸乙酯;ARE1;ARE2;DGA1;LRO1;PXA2;蜡酯合成酶基因WS2;基因敲除;基因整合

中图分类号:Q 547 文章编号:1673-1689(2022)02-0094-12 DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2022.02.012

Metabolic Pathway Modification of *Saccharomyces cerevisiae* for Overproducing Fatty Acid Ethyl Ester

JIANG Hui, ZHANG Lihua, XIA Yuanyuan, CHEN Xianzhong*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Fatty acid ethyl ester (FAEE) is the most potential new energy source in the new century. Compared with the current common chemical synthesis methods, the production of FAEE in microbial cell factories has many advantages, such as low environmental pollution and low

收稿日期: 2020-12-31

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20171138)。

* 通信作者: 陈献忠(1980—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物代谢与催化方面的研究。

E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

production cost. *Saccharomyces cerevisiae* has the talent to produce ethanol and fatty acyl-CoA. The production of fatty acyl-CoA, i.e., the precursor of FAEE, was thus improved by modifying the metabolic pathways of *S.cerevisiae*. By introducing codon-optimized heterogeneous gene *WS2*(wax ester synthase), a metabolic pathway was constructed and it could use glucose as a substrate to generate FAEE through a series of reactions. To enrich the fatty acyl-CoA, it was necessary to further reform its branches, such as blocking sterol ester way ($\Delta ARE1, \Delta ARE2$), triacylglycerol pathway ($\Delta DGA1, \Delta LRO1$) and β -oxidation pathway($\Delta PXA2$) to reduce fatty acyl-CoA utilization. The results showed that the knockout of three pathways greatly increased the yield of FAEE. Strain BYW2 expressing *WS2* gene had a 9-fold increase in FAEE yield compared to the original strain BY4741, and the shake flask yield reached 11.72 mg/L. Due to the low yield of the target product FAEE, the fermentation was optimized in the shaking flask. Three factors including the addition of ethanol and rapeseed oil addition, fermentation time and ethanol addition mode were optimized. The results showed that the addition of ethanol and rapeseed oil significantly increased the yield of FAEE. The optimal fermentation time was 60 h, and the ethanol addition mode was to add 2% of the fermentation volume every 6 h after 20 h. Under the optimal conditions, the highest yield of FAEE reached 144.4 mg/L, which was 12.3 times higher than that before optimization, and 480 times higher than that in the original strain BY4741. In order to further increase the yield of FAEE, the difference of FAEE yield between uracil deficient strain BYD5W2 and uracil non-deficient strain BYD5W2* was compared by fermentation tank. The results showed that the highest FAEE yield of uracil deficient strain BYD5W2 was 0.618 g/L, and that of uracil non-deficient strain BYD5W2* was 1.35 g/L, which was the highest reported FAEE yield by *S. cerevisiae* currently.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, fatty acid ethyl ester, *ARE1*, *ARE2*, *DGA1*, *LRO1*, *PXA2*, wax ester synthase *WS2*, gene knockout, gene integration

酿酒酵母是一种适合微生物大规模长期培养的候选菌,被认为是最具潜力的大规模生产菌种。酿酒酵母具有生长周期短、发酵能力强,容易进行大规模培养等优点,一直是基础及应用研究的主要对象,在食品、医药等领域应用广泛。酿酒酵母也被用于其他具有重要工业价值代谢产物的发酵,例如乙醇、脂肪酰辅酶 A 等。通过分子改造阻断底物葡萄糖的分流从而累积 FAEE 形成的前体物质乙醇和脂肪酰辅酶 A^[1-2],再充分利用 *WS2* 的酯化作用^[3-4],有效生成生物柴油的前体物质 FAEE,这不仅促进了工业和经济的发展,对环境的改善作用也不容小觑。

现阶段对于通过细胞工厂生产 FAEE 的研究并不是很多,更多的研究集中在利用化学合成生产 FAEE 作为柴油的前体物质,不过化学合成高效率的背后却对环境和原料损耗方面有着极大的负担,因此从长远角度考虑,利用细胞工厂生产 FAEE 更顺应时代潮流。目前已尝试在大肠杆菌 *E. coli*、酿酒

酵母 *Saccharomyces cerevisiae*^[5-6]、产油酵母 *Yarrowia lipolytica* 等微生物体内通过代谢途径改造生产 FAEE,其中在产油酵母 *Yarrowia lipolytica* 中通过代谢改造等手段使 FAEE 产量达到 1.18 g/L,是目前报道中最高^[7]。在酿酒酵母中单纯通过基因敲除阻断分支途径以及异源表达 *WS2* 等手段获得的 FAEE 最高产量为 34 mg/L^[8],本研究 FAEE 的代谢改造见图 1,FAEE 摇瓶产量达到 144.4 mg/L,发酵罐产量达到 1.35 g/L,此结果在利用酿酒酵母生产 FAEE 中均处于较高水平。

根据生成 FAEE 过程中前体物质富集以及前体物质酯化将代谢途径改造分为 Module I 和 Module II 两个模块,Module I 分子改造主要为基因敲除,Module II 分子改造主要为基因整合。Module I 通过对编码甾醇酰基转移酶的基因 *ARE1*、*ARE2* 敲除来阻断甾醇酯途径;对编码甘油酰基转移酶的基因 *LRO1*、*DGA1* 敲除来阻断三酰基甘油途径以及对

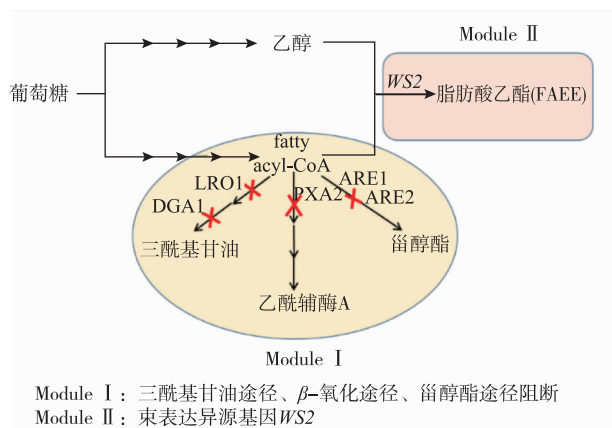


图1 代谢改造酿酒酵母产FAEE的策略

Fig. 1 Metabolic modification of *S. cerevisiae* for FAEE production

编码长链脂肪酸转运体的基因 *PXA2* 的敲除来阻断

β 氧化途径; Module I 中 3 条途径阻断最终富集 FAEE 前体物质——脂肪酰辅酶 A。Module II 是在 Module I 基础上再异源表达, 酿酒酵母密码子优化的蜡酯合成酶基因 *WS2* 将乙醇和 Module I 中富集的脂肪酰辅酶 A 在 *WS2* 酯化作用下转化成我们所需的产物 FAEE^[9]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株, 质粒和引物 实验所用菌株见表 1, BY4741 是酿酒酵母组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和尿嘧啶缺陷型菌株; 质粒 pMRI-21: 由作者所在实验室保藏, 见表 2; pMD19-T Simple 载体: 购自 TaKaRa 公司; PCR 引物: 由苏州泓迅生物科技股份有限公司合成, 见表 3。

表 1 本研究涉及菌株

Table 1 Strains involved in this study

菌株	基因型	来源
BY4741	His、Leu、Met、尿嘧啶缺陷	作者所在实验室
BYD1	BY4741($\Delta ARE1, \Delta URA3$)	本研究
BYD2	BY4741($\Delta ARE1, \Delta ARE2, \Delta URA3$)	本研究
BYD3	BY4741 ($\Delta ARE1, \Delta ARE2, \Delta DGA1, \Delta URA3$)	本研究
BYD4	BY4741 ($\Delta ARE1, \Delta ARE2, \Delta DGA1, \Delta LRO1, \Delta URA3$)	本研究
BYD5	BY4741($\Delta ARE1, \Delta ARE2, \Delta DGA1, \Delta LRO1, \Delta PXA2, \Delta URA3$)	本研究
BYW2	BY4741(<i>HO::gda-URA3-TDH3-WS2-CYC1</i>) $\Delta URA3$	本研究
BYD5W2	BYD5(<i>HO::gda-URA3-TDH3-WS2-CYC1</i>) $\Delta URA3$	本研究
BYD5W2*	BYD5(<i>HO::gda-URA3-TDH3-WS2-CYC1</i>)	本研究

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

质粒	相关特征	来源
pMRI-21	具有反向启动子 GAL1, GAL10	本实验室
ARE1-g-U	Ts-ARE1- <i>gda-URA3</i> (ARE1 敲除盒)	本研究
ARE2-g-U	Ts-ARE2- <i>gda-URA3</i> (ARE2 敲除盒)	本研究
DGA1-g-U	Ts-DGA1- <i>gda-URA3</i> (DGA1 敲除盒)	本研究
LRO1-g-U	Ts-LRO1- <i>gda-URA3</i> (LRO1 敲除盒)	本研究
PXA2-g-U	Ts-PXA2- <i>gda-URA3</i> (PXA2 敲除盒)	本研究
Ts-HO- <i>gda-URA3</i>	筛选标记 <i>gda-URA3</i> 的构建	本研究
Ts-HO- <i>gda-URA3-TDH3-WS2-CYC1</i>	<i>HO</i> 位点处 <i>WS2</i> 表达盒的构建	本研究

表 3 本研究所用引物
Table 3 Primers used in this study

引物名称	序列(5'— 3')	酶切位点
ARE1-F	ATCTACGTGTTCCGATGGAT	
ARE1-R	CTTGCCCGTAGAACTTGGT	
ARE2-F	CAATCTATAACAGTGGACGACGAG	
ARE2-R	CACAATTCCACCAGTCACCGT	
DGA1-F	TTCTTTGTCTCTCCGTTT	
DGA1-R	GGCACTAGGTTAATATTCCC	
LRO1-F	TCTACTTTCTTTAAATAGCCCTT	
LRO1-R	TCAAATCGAATGAAATTGCCGT	
PXA2-F	AGCTCAATACGCAAACCTCAC	
PXA2-R	AAAGCCCGCCTAGAATACGAAAT	
ReARE1-R	TGCTCTAGACCTGCTCTTCGACATGATTCCG	<i>Xba</i> I
ReARE1-F	TGCTCTAGATGGCTCTTCATAACAAACACC	<i>Xba</i> I
ReARE2-R	TGCTCTAGAAATCCCAACAATATCAGTCC	<i>Xba</i> I
ReARE2-F	TGCTCTAGATTTCTAAAGTAGGTCACAG	<i>Xba</i> I
ReDGA1-R	TGCTCTAGAAAACCAACTTTTACGCTTT	<i>Xba</i> I
ReDGA1-F	TGCTCTAGAACATCATAAGCCTTTGTCTG	<i>Xba</i> I
ReLRO1-R	CGGACTAGTCGCTCCAAAGGCAGTTCCA	<i>Spe</i> I
ReLRO1-F	CGGACTAGTGTCTTCTGCTCTCTCGCTTG	<i>Spe</i> I
RePXA2-R	TGCTCTAGAACTGCATCTAGCTCTATCGGAAG	<i>Xba</i> I
RePXA2-F	TGCTCTAGAAACAATTAAGCCAGTGCCAAAG	<i>Xba</i> I
gda393-F	TCTAGAACAGGGTGAACGTTACAGAA	
gda393-R	GTATGGTGCACCTCTCAGTTTCGCCCTTTGACGTTG	
SC-URA3-F	CTGAGAGTGCACCATAACCACA	
SC-URA3-R	TCTAGACCCGGGTTTTTCGCCCTTTGACGTT	
gda-F	TATACCGCTCGGACTACTACAGGCTGAACGTTACAGAA	
URA3-R	ATCTTCATTGCGTTTTTCGCCCTTTGACGTT	
HO-F	CGTGCCTGCGATGAGATAC	
HO-R	GGCGTATTTCTACTCCAGCA	
HOleftF	CCATGGATGAGGCCCGGACAGCATC	
HOleftR	GTTACCCCTGTTCTAGACACCAGGTCAGCTAGGGAG	
HOrightF	GCGAAAACCCGGGTCTAGATTGTATCGAGATCACTTTTCGTG	
HOrightR	CCATGGTGGGCCAATCGCGTAAAAAG	
TDH3-F	GTGTGGGGGATCACTATACTAGCGTTGAATGTTAGCG	
TDH3-R	ATTACCGATCCGGGTTTTGTTTTATGTGTGTTTTATTC	
ACT1-F	ACTTTCAACGTTCCAGCCTTC	
ACT1-R	CGTAAATTGGAACGACGTGAGTA	
ACT1-qPF	GTCTGGATTGGTGGTTCT	
ACT1-qPR	GTGAACGATAGATGGACC	
WS2-qPF	GGCACTCTCCAAATCTTC	
WS2-qPR	CTGCCTTTTTATCCTTG	

注:下划线是酶切位点序列.

1.1.2 主要培养基

LB 培养基(组分 g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5, NaCl 10。

YPD 培养基(组分 g/L):蛋白胨 20,酵母粉 10,葡萄糖 20。

MM 培养基(组分 g/L):YNB 6.7,葡萄糖 20,硫酸铵 10。

SM 培养基(组分 g/L):YNB 6.7,葡萄糖 20,硫酸铵 10,尿嘧啶 0.06。

筛选培养基(组分 g/L):YNB 6.7,葡萄糖 20,硫酸铵 10,尿嘧啶 0.06,5-FOA 1。

发酵培养基(组分 g/L):葡萄糖 20,YNB 6.7,酵母粉 6,蛋白胨 3,K₂HPO₄ 7.2,KH₂PO₄ 9.3,醋酸 3,尿嘧啶 0.06。

BYD5W2 发酵罐培养基(组分 g/L):葡萄糖 60,YNB 6.7,酵母粉 18,蛋白胨 3,K₂HPO₄ 7.2,KH₂PO₄ 9.3,醋酸 3,尿嘧啶 0.06。

BYD5W2* 发酵罐培养基(组分 g/L):葡萄糖 60,YNB 6.7,酵母粉 18,蛋白胨 3,K₂HPO₄ 7.2,KH₂PO₄ 9.3,醋酸 3。

1.1.3 主要试剂与仪器 正己烷(色谱级)、乙酸乙酯(色谱级):阿拉丁试剂公司产品;酵母氨基(YNB)、5-氟乳清酸(5-FOA):上海生物工程股份有限公司产品;月桂酸乙酯(Ethyl dodecanoate)、肉豆蔻酸乙酯(Ethyl myristate)、棕榈酸乙酯(Ethyl palmitate)、硬脂酸乙酯(Ethyl Stearate)、二十酸乙酯(Ethyl arachidate)、顺-9-十八稀酸乙酯(cis-9-Octadecenoic acid ethyl ester/Ethyl oleate):Sigma 公司产品;十七烷酸乙酯(Ethyl heptadecanoate)、顺-9-十六稀酸乙酯(Ethyl cis-9-Hexadecenoate):TCI 公司产品;一步克隆试剂盒(ClonExpress II One Step Cloning Kit):南京诺唯赞生物科技有限公司产品;酵母 RNA 提取试剂盒:Takara 生物试剂公司(SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus))产品。

隔水式恒温培养箱:上海精宏试验设备有限公司制造;PCR 扩增仪:上海东胜兴业科学仪器有限公司制造;控温摇床:太仓市实验设备厂制造;UV-2100 可见分光光度计:上海尤尼科有限公司制造;干燥箱:杭州汇尔仪器设备有限公司制造;高速台式离心机、ISQ 单四级杆气质联用仪、超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱联用仪:赛默飞世尔科技有限公司制造;自动高压蒸汽灭菌锅:日本三洋

电机公司制造;超净工作台:苏州净化设备厂制造;电泳凝胶成像系统:BIO-RAD 公司制造;实时荧光定量基因扩增仪:美国伯乐公司制造;全自动制冰机:GRANT 公司制造;生物传感分析仪:山东省科学院生物研究所制造;pH 计:梅特勒-托利多公司制造。

1.2 方法

1.2.1 敲除盒构建过程 对酿酒酵母 BY4741 基因组进行分析,获得 5 个基因,分别为 *ARE1*、*ARE2*、*DGA1*、*LRO1*、*PXA2* 基因,根据基因序列构建敲除盒。以基因 *ARE1* 敲除盒构建为例,设计引物 ARE1-F 和 ARE1-R,以酿酒酵母 BY4741 基因组为模板,PCR 扩增 *ARE1* 基因,经 PCR 试剂盒纯化后,与 pMD19-T Simple 载体进行连接,获得重组质粒 Ts-ARE1;以质粒 Ts-ARE1 为模板,设计引物 ReARE1-F 和 ReARE1-R(分别添加 *Xba* I 酶切位点),反向 PCR 得到片段 ARE1U-Ts-ARE1D,凝胶回收该片段,将该片段与质粒 Ts-HO-gda-URA3 同时经限制性内切酶 *Xba* I 消化,凝胶回收后将片段 ARE1U-Ts-ARE1D 与片段 gda393-URA3 连接,获得重组质粒 Ts-ARE1-gda393-URA3。以上述重组质粒为模板,用引物 ARE1-F 和 ARE1-R,PCR 得到敲除盒 ARE1U-gda393-URA3-ARE1D,见图 2。利用相似策略,构建其他基因敲除盒。

1.2.2 *ARE1* 等基因敲除过程 以尿嘧啶缺陷型菌株 BY4741 为出发菌株,以 *URA3* 基因为筛选标记,采用醋酸锂转化法^[10]将敲除盒依次转入酿酒酵母 BY4741 中^[14]。敲除盒转入宿主后涂布到 MM 固体培养基挑取转化子,提取基因组,PCR 验证鉴定出正确转化子;将上述步骤正确的转化子涂布到 5-FOA 培养基上,再次挑选转化子,提取基因组,PCR 初步验证弹出 *URA3* 基因后,将 PCR 产物送至公司测序,序列比对无误后保藏正确菌株;此方法可以重复利用筛选标记^[15-16]。

1.2.3 *WS2* 整合框构建过程 对酿酒酵母 BY4741 基因组进行分析,选取整合位点 HO^[11],根据基因序列构建整合框。首先设计引物 HO-F 和 HO-R,以酿酒酵母 BY4741 基因组为模板,PCR 扩增 HO 基因,经 PCR 试剂盒纯化后,与 pMD19-T Simple 载体进行连接,获得重组质粒 Ts-HO;以质粒 Ts-HO 为模板,设计引物 ReHO-F 和 ReHO-R(分别添加 *Xba* I 酶切位点),反向 PCR 得到片段 HOU-Ts-HOD,凝

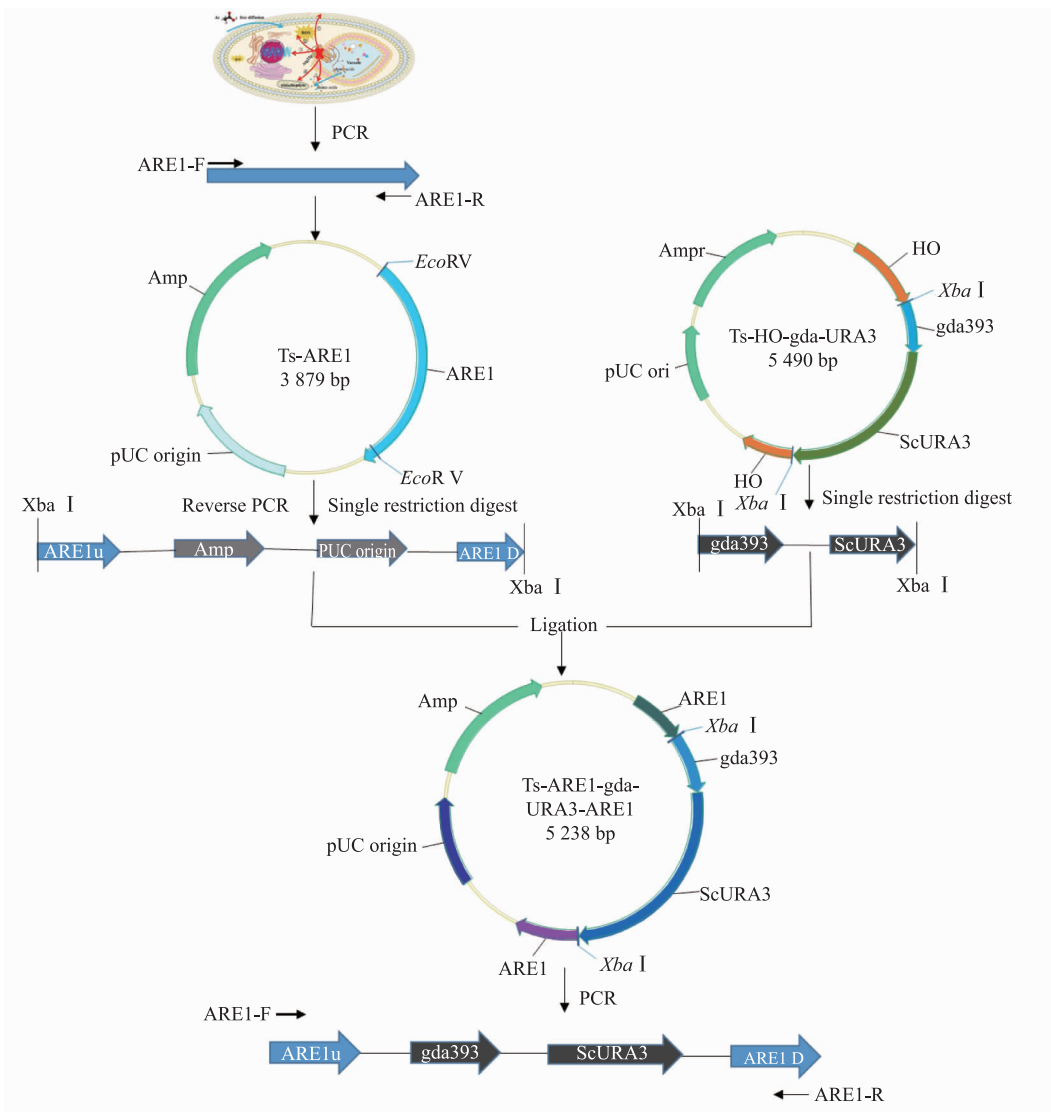


图 2 重组质粒 *TS-ARE1-gda-URA3* 构建过程

Fig. 2 Construction process of recombinant plasmid *TS-ARE1-gda-URA3*

胶回收后将片段 HOU-Ts-HOD 与片段 *gda393-URA3*(两端具有 *Xba I* 酶切位点)连接,获得重组质粒 *Ts-HO-gda393-URA3*。以 *PMRI-21* 质粒为载体骨架,将 *GAL10* 启动子替换成酿酒酵母强启动子 *TDH3*^[12-13],蜡酯合成酶基因 *WS2* 是根据酿酒酵母密码子优化后的基因,两端带有酶切位点 *BamH* 和 *XhoI*,通过酶切连接可以将蜡酯合成酶基因 *WS2* 插入质粒 *PMRI-21* 的启动子 *TDH3* 和终止子 *CYC1* 之间,形成 *WS2* 的表达框,质粒命名为 *pMRI-21-TDH3-WS2-CYC1*。用 *Sma I* 酶切 *Ts-HO-gda393-URA3* 将其线性化,最后通过一步连接将 *WS2* 表达框 *TDH3-WS2-CYC1* 连接到 *Ts-HO-gda393-URA3* 上形成重组质粒 *Ts-HO-gda393-URA3-TDH3-*

WS2-CYC1。以上述重组质粒为模板,用引物 *HO-F* 和 *HO-R*,PCR 得到 *WS2* 整合框 *HO-gda393-URA3-TDH3-WS2-CYC1*,具体整合框构建过程见图 3。

1.2.4 *WS2* 基因整合过程 以 *BYD5* 为出发菌株,仍以 *URA3* 基因为筛选标记,采用醋酸锂转化法将整合框转入出发菌株中^[14]。整合框转入宿主后涂布到 MM 固体培养基挑取转化子,提取基因组,PCR 验证鉴定出正确转化子;将上述步骤正确的转化子涂布到 5-FOA 培养基上,再次挑选转化子,提取基因组,PCR 初步验证弹出 *URA3* 基因后,将 PCR 产物送至公司测序,序列比对无误后保藏正确菌株;此方法可以重复利用筛选标记^[14-15]。

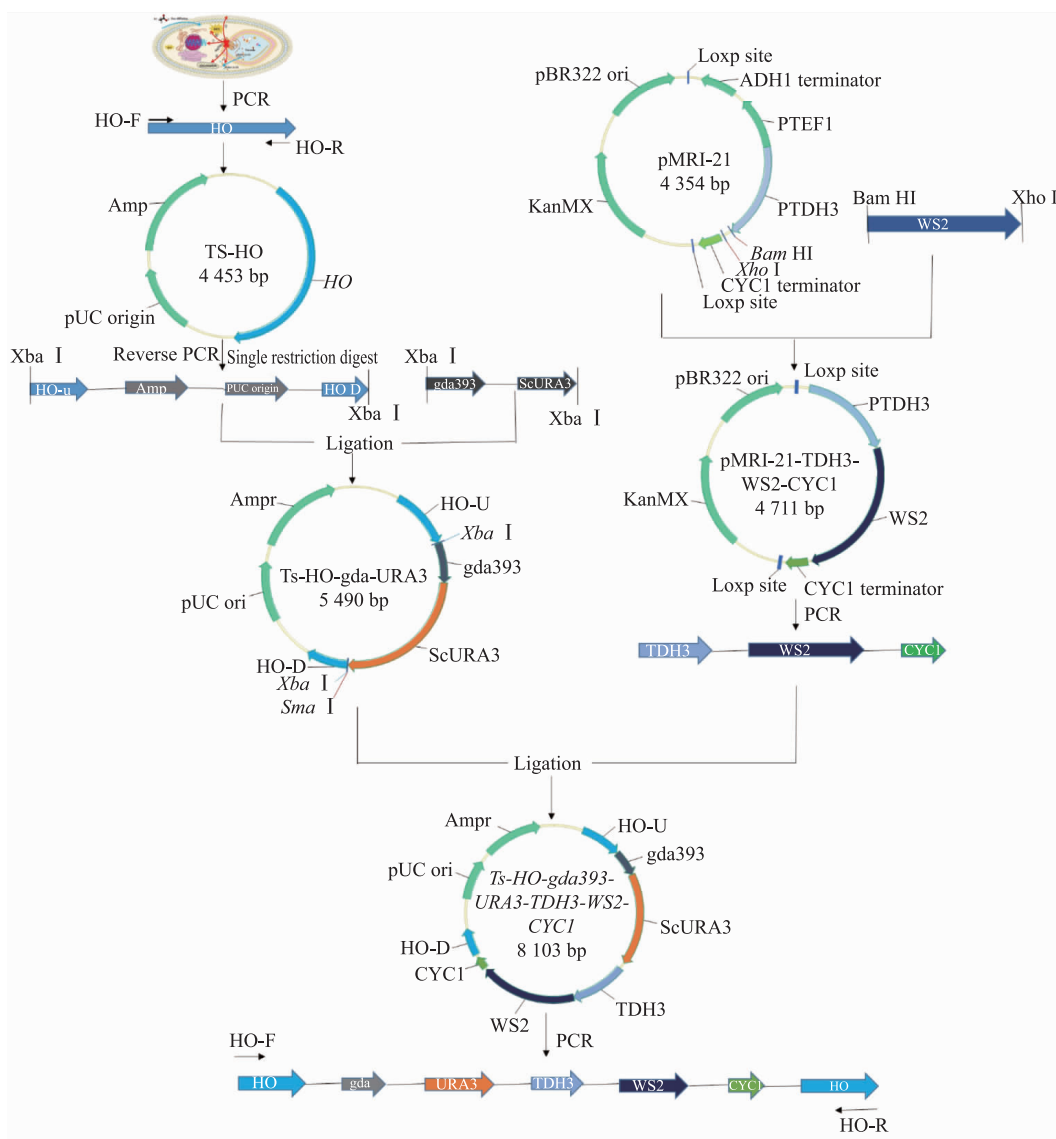


图3 WS2整合框的构建

Fig. 3 Construction of WS2 integration box

1.2.5 摇瓶发酵优化 从 -70°C 超低温冰箱中取出甘油管保藏的重组酿酒酵母菌株,挑取菌株于YPD固体平板上划线活化,置 30°C 培养箱中培养48 h获得单菌落。从平板上挑取单菌落接种至10 mL的YPD液体培养基中培养36 h,以体积分数2%接种体积分数接种于50 mL YPD液体培养基中,于 30°C 、200 r/min摇床中发酵培养60 h^[6]。在发酵过程中对是否添加乙醇和菜籽油、发酵时间以及乙醇添加模式这3个因素进行优化。

1.2.6 发酵罐发酵实验 从平板上分别挑取尿嘧啶缺陷菌株BYD5W2的单菌落和尿嘧啶未缺陷菌株BYD5W2*的单菌落,接种至10 mL的YPD液体

培养基中培养36 h,以2%接种体积分数接种于50 mL YPD液体培养基中,培养至OD为2时以10%接种体积分数接种于3 L的发酵罐。发酵过程中待初始葡萄糖低于5 g/L时开始流加80 g/dL葡萄糖以维持发酵罐的糖质量浓度为10 g/L,乙醇从36 h开始保持流加量为8 mL/h,首次添加乙醇时一次性添加体积分数2%菜籽油并通过手动补加5 mol/L NaOH调节发酵罐pH保持在5.5左右。在发酵罐发酵过程中,从12 h开始每4 h取样检测OD和葡萄糖质量浓度,从48 h开始每12 h取样检测FAEE产量。

1.2.7 产物FAEE的提取 取发酵液10 mL,加入终质量浓度5 mg/mL的蜗牛酶振荡混匀,置 37°C

培养箱反应 12 h 进行初步破壁处理,然后再利用超声波破碎仪在 35 W 冰上低温破碎 100 min 破壁,使细胞彻底释放出产物。在超声破碎细胞后立即向细胞液中加入 20 mL 正己烷,上下颠倒使其充分混匀,在振荡仪上振荡 15 s 后于 7 000 r/min 离心 10 min,分离并收集有机层。重复添加正己烷进行二次萃取,在真空离心浓缩仪中利用正己烷的易挥发性对萃取的 FAEE 进行浓缩^[16]。

1.2.8 GC-MS 分析 将萃取浓缩后的样品按比例复溶于正己烷中,过膜后取 1 mL 进行气质检测。气质分析条件为:DB-5MS 毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm),进样器温度和柱温均为 300 °C。升温程序:起始 80 °C,维持 1 min;然后以 2 °C/min 升温至 100 °C;15 °C/min 升温至 280 °C,保持 2 min;最后以 30 °C/min 升温至 300 °C,保持 3 min。质谱:EI 离子源,四级杆检测器;电离能 70 eV,离子源表面温度为 280 °C^[17]。

2 结果与讨论

2.1 Module I 基因突变株的构建

构建了 *ARE1*、*ARE2*、*DGA1*、*LRO1* 和 *PXA2* 基因敲除盒质粒,用限制性内切酶 *Xba* I 单酶切验证,条带大小均与理论一致,测序结果表明 *ARE1*、*ARE2*、*DGA1*、*LRO1* 和 *PXA2* 基因敲除质粒构建成功。

用上述重组质粒为模板,PCR 扩增出相应的敲除盒,通过醋酸锂转化法依次转入宿主中,挑取转化子,并提取基因组;使用对应同源臂外侧上下游引物进行验证,验证正确后,将转化子弹出 *URA3* 后再依次用上述引物扩增,扩增条带大小均与理论

一致,最终测序结果表明构建成功,将成功构建的菌株分别命名为 BYD1、BYD2、BYD3、BYD4、BYD5。

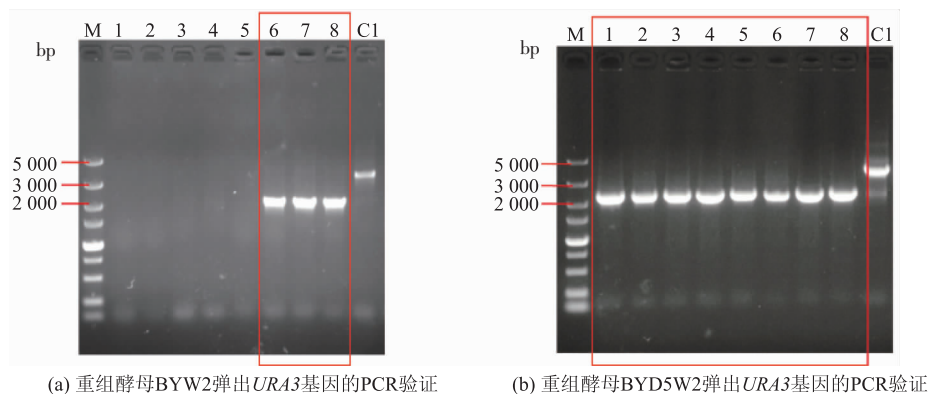
2.2 Module II 蜡酯合成酶 *WS2* 基因的表达

HO 位点的敲除不影响宿主细胞及其他生理功能,因此在酿酒酵母染色体整合表达操作中,HO 位点成为首要选择。根据 PARTOW 等人的研究筛选出 *TDH3*、*TEF1*、*PGK1*、*TPI* 等启动子均为酿酒酵母中的强启动子^[12-13],因此选择其中较优的 *TDH3* 启动子以及对应终止子 *CYC1* 过表达目的基因 *WS2*,以提高表达效率。

构建了 *WS2* 基因整合框质粒,用限制性内切酶 *Nco* I 单酶切验证,条带大小与理论一致,测序结果表明 *WS2* 基因整合框质粒构建成功。

用上述重组质粒为模板,PCR 扩增出相应的整合框,将其通过醋酸锂转化法分别转入宿主 BY4741 和 BYD5 中,挑取转化子,并提取基因组;使用对应同源臂外侧上下游引物进行验证,理论上应扩增出 2 100 bp 的条带,将 *WS2* 整合表达在 BYD5 中且未弹出 *URA3* 的菌株命名为 *BYD5W2**;将转化子弹出 *URA3* 后再依次用上述引物扩增,理论上应扩增出 2 100 bp 的条带,PCR 结果与预期大小一致,C1 为上述未弹出 *URA3* 的对照菌株,见图 4。将 PCR 产物纯化并送公司测序,结果显示构建成功,将成功构建的菌株分别命名为 BYW2 和 BYD5W2。

蜡酯合成酶基因 *WS2* 表达后进行荧光定量 PCR 验证,如图 5 所示,以 *ACT1* 为内参基因,*WS2* 基因表达量为内参基因 *ACT1* 的 1.42 倍,证明 *WS2* 已成功表达。



(a) 重组酵母BYW2弹出*URA3*基因的PCR验证

(b) 重组酵母BYD5W2弹出*URA3*基因的PCR验证

图 4 *WS2* 转化 BY4741, BYD5 弹 *URA3* 验证

Fig. 4 *WS2* transform BY4741 and BYD5 projectile *URA3* for verification

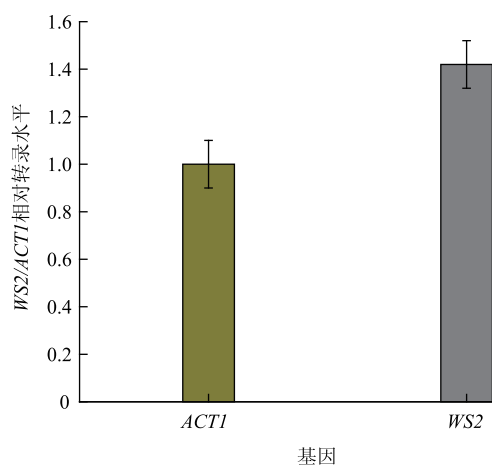


图5 WS2 基因荧光定量 PCR

Fig. 5 Fluorescence quantitative PCR of WS2 gene

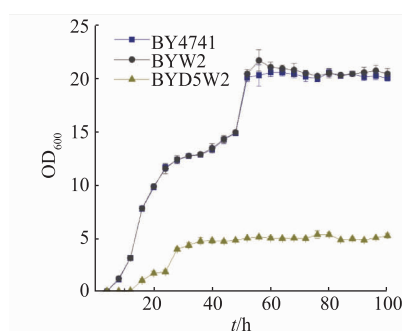
2.3 FAEE 摇瓶发酵优化

FAEE 摇瓶发酵过程中, 首先对菌株生长情况进行探索, 见图 6(a)。原始出发菌株 BY4741 的菌体浓度 OD_{600} 最大为 20.3, BYW2 在出发菌株 BY4741 的基础上有些许提升, 菌体浓度 OD_{600} 达到 21.7, 而目的菌株 BYD5W2 相较于 BY4741 与 BYW2 生长明显受限, 菌体浓度 OD_{600} 只能达到 5.1。由此可见, 甾醇酯途径、三酰基甘油途径以及 β 氧化途径的敲除会阻碍菌株的生长。

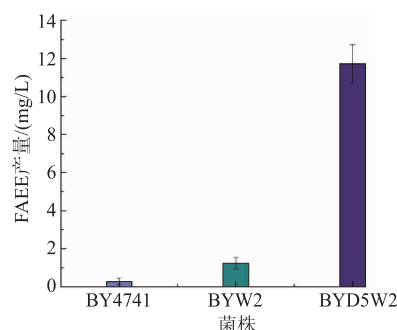
从菌株 BY4741, BYW2 和 BYD5W2 出发, 对 FAEE 产量进行测定, 见图 6(b)。在只补加葡萄糖的发酵条件下, 菌株 BYD5W2 的 FAEE 产量最高, 为 11.72 mg/L; FAEE 不同碳链混标质谱图见图 6(c), 样品 BYD5W2 中 FAEE 检测质谱图见图 6(d)。

乙醇作为 FAEE 生产的两大前体物质之一, 由于其价格低廉且易获取, 通过直接外源添加的方式满足 FAEE 生产需求; 酿酒酵母可以利用油性碳源, 使其成为将废油等油性物质转化为有用且廉价的酯化原料的合适宿主。另外, 培养基中存在菜籽油等疏水底物, 可以触发细胞外脂肪酶的分泌, 将植物油水解成甘油和脂肪酸, 为 FAEE 生产提供充足碳源, 从而提升 FAEE 产量。

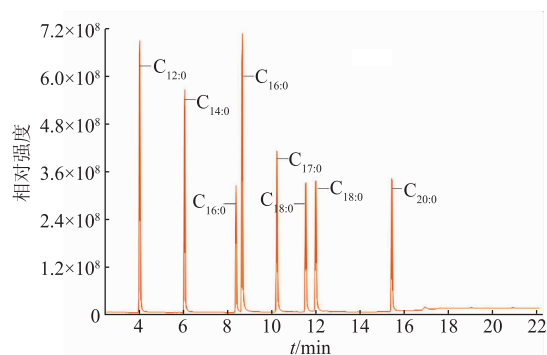
因此后期对菌株 BYD5W2 进行发酵优化, 从添加乙醇和菜籽油、发酵时间以及乙醇添加模式 3 个因素考察。如图 7(a) 所示, 只补加葡萄糖发酵时, BYD5W2 的 FAEE 产量为 11.72 mg/L, 在此基础上补加乙醇, FAEE 产量提升到 36.1 mg/L, 相对于只补加葡萄糖, FAEE 产量提升了 3.1 倍; 在此基础上



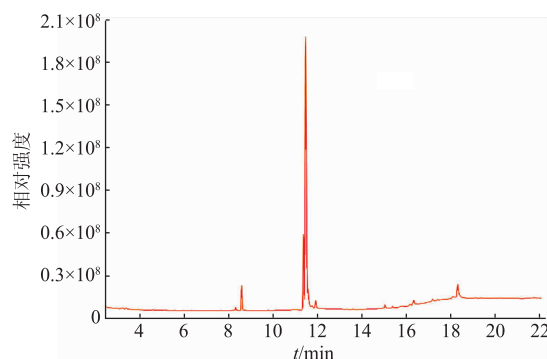
(a) 重组菌 BY4741、BYW2、BYD5W2 以葡萄糖为碳源的细胞生长



(b) 重组菌 BY4741、BYW2、BYD5W2 以葡萄糖为碳源的 FAEE 产量



(c) FAEE 中 8 个不同长度碳链的混标气相-质谱检测结果



(d) 样品 BYD5W2 的 FAEE 检测气相-质谱图

图6 重组菌 BY4741、BYW2、BYD5W2 摇瓶水平的细胞生长和 FAEE 生产

Fig. 6 Cell growth and FAEE shake-flask production by precom -binant strains of BY4741, BYW2 and BYD5W2

继续补加体积分数 2% 菜籽油,FAEE 产量提升到 59.3 mg/L,相对于仅补加葡萄糖时 FAEE 产量提升了 5.1 倍。结果表明,FAEE 发酵过程中补加乙醇和菜籽油会显著提升 FAEE 产量。

在摇瓶中添加乙醇和菜籽油,对发酵时间进行优化,分别发酵 48、60、72、84、96 h 终止发酵,测定 FAEE 产量。如图 7(b)所示,发酵时间为 60 h 时 FAEE 产量最高,为 59.3 mg/L。

确定发酵时间为 60 h 后,对乙醇的添加模式进行探索,由于一次性加入过量乙醇会影响菌体生长^[9],所以采用分批等量的方式以相同间隔时间进行乙醇的添加。如图 7(c)所示,首次补加乙醇时间取 12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56 h,发现在 20 h 开始补加乙醇,每次补加量为体积分数 2%,间隔时间为 6 h 时,FAEE 产量最高,为 144.4 mg/L。

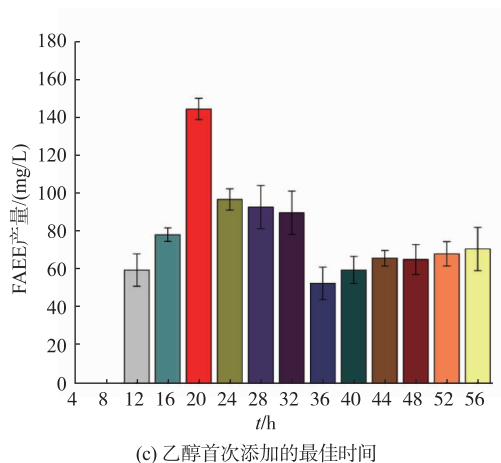
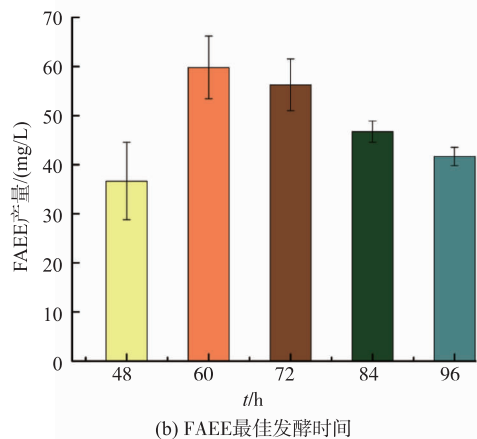
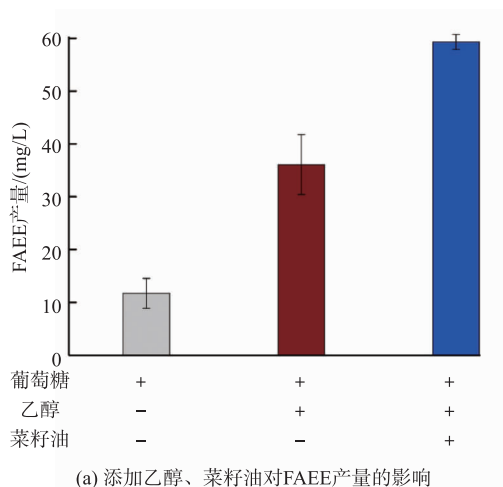


图 7 BYD5W2 摇瓶发酵优化

Fig. 7 BYD5W2 shake flask fermentation optimization

2.4 发酵罐发酵检测 FAEE

在摇瓶发酵过程中,BYD5W2 生长受到影响,菌体浓度 OD₆₀₀ 只能达到 5.1,这也是限制 FAEE 产量的重要因素之一,因此采用发酵罐发酵,并对比了尿嘧啶缺陷菌株 BYD5W2 与尿嘧啶未缺陷菌株 BYD5W2* 的 FAEE 产量的差别,如图 8(a)所示,尿嘧啶缺陷的 BYD5W2 菌株最大菌体浓度 OD₆₀₀ 达到 24.8,尿嘧啶未缺陷的 BYD5W2* 菌株最大菌体浓度 OD₆₀₀ 可以达到 35.2;如图 8(b)所示,尿嘧啶缺陷的 BYD5W2 菌株的 FAEE 最高产量为 0.618 g/L,而尿嘧啶未缺陷的 BYD5W2* 菌株的 FAEE 最高产量达到了 1.35 g/L。

3 结 语

作者对酿酒酵母代谢途径进行改造,阻断甾醇酯途径、三酰基甘油途径和 β 氧化途径以减少脂肪酰辅酶 A 的分流,成功构建了不同突变株菌株;利用同源重组在 HO 位点整合表达了根据酿酒酵母密码子优化的外源蜡酯合成酶基因 WS2,在 WS2 的酯化作用下乙醇和脂肪酰辅酶 A 形成 FAEE. 为了提升 FAEE 产量,摇瓶发酵阶段对是否添加乙醇和菜籽油、发酵时间以及乙醇添加模式这 3 个方面进行优化,与此同时进行发酵罐发酵进一步提升 FAEE 产量,获得以下结论:

阻断甾醇酯途径、三酰基甘油途径和 β 氧化途径显著提升了 FAEE 产量,相较于 BYW2 菌株 FAEE 产量提升了 9 倍。以 BYD5W2 为出发菌株,FAEE 发酵过程中补加乙醇和体积分数 2% 菜籽油

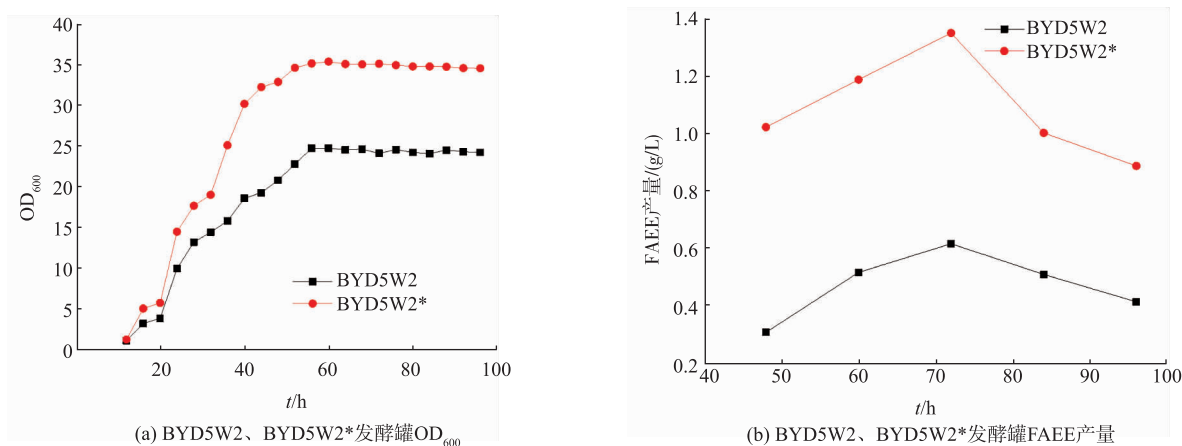


图 8 5 L 发酵罐水平优化 FAEE 生产

Fig. 8 Optimization of FAEE production in 5 L bioreactor

会显著提升 FAEE 产量, 达到 59.3 mg/L, 相对于只添加葡萄糖发酵的 FAEE 产量提升了 5.1 倍; 最佳发酵时间为 60 h, 从 20 h 开始分批定量补加体积分数 2% 的乙醇, 间隔补加时间为 6 h 时, FAEE 产量最高, 达到 144.4 mg/L, 相对于只添加葡萄糖发酵菌株 BYD5W2 的 FAEE 产量提升了 12.3 倍。发酵罐发

酵比较了尿嘧啶缺陷菌株 BYD5W2 与尿嘧啶未缺陷菌株 BYD5W2* 的 FAEE 产量的差别, 结果表明, 尿嘧啶未缺陷菌株 BYD5W2* 的 FAEE 产量最高, 达到 1.35 g/L, 是目前报道的酿酒酵母中产 FAEE 产量较高的水平。

参考文献:

- [1] DE JONG B W, SHI S, VALLE-RODR GUEZ J O, et al. Metabolic pathway engineering for fatty acid ethyl ester production in *Saccharomyces cerevisiae* using stable chromosomal integration[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2015, 42(3):477-486.
- [2] BOUKE, WIM, DE, et al. Physiological and transcriptional characterization of *Saccharomyces cerevisiae* engineered for production of fatty acid ethyl esters[J]. *FEMS Yeast Research*, 2015, 8(1):26-34.
- [3] VALLE-RODR GUEZ J O, B S S A, A V S, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid ethyl esters, an advanced biofuel, by eliminating non-essential fatty acid utilization pathways[J]. *Applied Energy*, 2014, 115(4):226-232.
- [4] FERREIRA R, TEIXEIRA P G, SIEWERS V, et al. Redirection of lipid flux toward phospholipids in yeast increases fatty acid turnover and secretion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018:1262-1267.
- [5] 刘军锋. 第三代生物柴油的开发研究[D]. 北京:北京化工大学, 2013.
- [6] NG T K, YU A Q, LING H, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* towards food waste bioremediation: production of fatty acid ethyl esters from vegetable cooking oil[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(1):31-40.
- [7] GAO Q, CAO X, HUANG Y, et al. Overproduction of fatty acid ethyl esters by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* through metabolic engineering and process optimization[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 114(2):131-137.
- [8] SHI S, VALLE-RODR GUEZ J O, SIEWERS V, et al. Engineering of chromosomal wax ester synthase integrated *Saccharomyces cerevisiae* mutants for improved biosynthesis of fatty acid ethyl esters[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2014, 111(9):1740-1747.
- [9] ERIKSEN D T, HAMEDIRAD M, YUAN Y, et al. Orthogonal fatty acid biosynthetic pathway improves fatty acid ethyl ester production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(7):808-814.

- [10] 项峥,陈献忠,张利华,等.利用可重复使用的 *URA3* 标记基因建立热带假丝酵母基因敲除系统[J]. 遗传,2014,36(10): 1053-1061.
- [11] 尹紫良,王长丽,葛菁萍.酿酒酵母 W5 核酸内切酶基因 *HO* 的克隆及生物信息学分析[J]. 生物技术通讯,2019,30(4):473-478,537.
- [12] PARTOW S,SIEWERS V,BJM S,et al. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*,2010,27(11):955-964.
- [13] SUN J ,SHAO Z ,ZHAO H ,et al. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology & Bioengineering*,2012,109(8):2082-2092.
- [14] 张利华. 热带假丝酵母遗传操作系统的建立及在二元酸合成中的应用[D]. 无锡:江南大学,2016.
- [15] 张利华,陈献忠,陈振,等. 热带假丝酵母肉毒碱乙酰基转移酶基因的删除及功能鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(8):880-887.
- [16] 范丽苹. 生物柴油基因工程菌的构建[D]. 北京:北京化工大学,2013:1-104.
- [17] 杨长晓,田玉琼,张誉. 气相色谱内标法测定鱼油软胶囊中总 Omega-3 FAEE 的含量[J]. 预防医学情报杂志,2018,112(7): 237-242.
- [18] 陈世琼. 实时荧光 PCR 快速检测果汁中酿酒酵母的初步研究[J]. 食品工业科技,2013,34(7):319-321.
- [19] 杜永静,陈叶福,李洁,等. *FAS2* 基因过表达对酿酒酵母风味酯生成能力的影响[J]. 现代食品科技,2018,34(7):87-94.
- [20] KIM H M,CHAE T U,CHOI S Y,et al. Engineering of an oleaginous bacterium for the production of fatty acids and fuels[J]. *Nature Chemical Biology*,2019,15(7):353-357.

科 技 信 息

欧盟批准里氏木霉 CBS 143953 生产的内切 1,4- β -木聚糖酶作为饲料添加剂

2021 年 11 月 30 日,欧盟发布条例(EU) 2021/2096,批准里氏木霉 CBS 143953(*Trichoderma reesei* CBS 143953)生产的内切 1,4- β -木聚糖酶(Endo-1,4-beta-xylanase)作为饲料添加剂用于所有家禽、育肥猪、仔猪和所有小型猪种,本条例自发布之日起第二十天生效。

该添加剂所属类别为“功能性添加剂”,功能组别为“消化增强剂”;识别号为 4a11;用于所有家禽时在含水质量分数 12%全价饲料中的最低活性单位为 625 U/kg,用于育肥仔猪(断奶和哺乳)以及所有小型猪种时最低活性单位为 2 000 U/kg;批准期限至 2031 年 12 月 20 日。

[信息来源]江苏省技术性贸易措施信息平台.欧盟批准里氏木霉 CBS 143953 生产的内切 1,4- β -木聚糖酶作为饲料添加剂[EB/OL]. (2021-12-1).http://www.tbguide.com/xwdt/gwxw/202112/t20211201_1853399.html