

· 工业生物技术 ·

多形汉逊酵母代谢改造生产脂肪酸及发酵条件优化

冯叨^{1,2}, 高教琪², 龚志伟¹, 周雍进^{2,3}

1 武汉科技大学 化学与化工学院, 湖北 武汉 430080

2 中国科学院大连化学物理研究所 生物技术研究部, 辽宁 大连 116023

3 大连市能源生物技术重点实验室, 辽宁 大连 116023

冯叨, 高教琪, 龚志伟, 周雍进. 多形汉逊酵母代谢改造生产脂肪酸及发酵条件优化. 生物工程学报, 2022, 38(2): 760-771.

FENG D, GAO JQ, GONG ZW, ZHOU YJ. Production of fatty acids by engineered *Ogataea polymorpha*. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 760-771.

摘要: 脂肪酸作为一种化工原料, 在生物能源、化妆品、个人护理产品和工业润滑剂等领域具有广泛应用。多形汉逊酵母因其能够利用甲醇、耐高温、底物谱广等优点, 被认为是微生物细胞工厂的理想底盘宿主。本研究首先通过代谢工程构建了产脂肪酸的汉逊酵母细胞工厂。在此基础上, 通过发酵条件优化进一步提升了工程菌株生产性能。在温度 37 °C、pH 6.4、培养基碳氮摩尔比为 120、种子液 OD_{600} 在 6–8 之间时, 摇瓶中工程菌脂肪酸产量达到 1.86 g/L。在发酵罐中, 采用溶氧 (DO) 关联法控制补料速度, 初始培养基碳氮摩尔比为 17.5, 在 DO 高于 30% 时, 补料碳氮摩尔比为 120 的葡萄糖培养基, 脂肪酸产量达到 18.0 g/L, 显示了汉逊酵母作为脂肪酸合成细胞工厂的潜力, 为实现工业化奠定了坚实的理论与应用基础。

关键词: 多形汉逊酵母; 代谢工程; 脂肪酸; 限氮发酵; 发酵条件优化

Received: January 31, 2021; **Accepted:** March 4, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (21922812, 21808216); Liaoning Revitalization Talents Program, China (XLYC1807191); Dalian Science and Technology Innovation Funding, China (2019J12GX030)

Corresponding authors: GONG Zhiwei. Tel: +86-27-68862335; E-mail: gongzhiwei@wust.edu.cn

ZHOU Yongjin J.. Tel/Fax: +86-411-84771060; E-mail: zhouyongjin@dicp.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (21922812, 21808216); 兴辽英才计划 (XLYC1807191); 大连市科技创新基金 (2019J12GX030)

Production of fatty acids by engineered *Ogataea polymorpha*

FENG Dao^{1,2}, GAO Jiaoqi², GONG Zhiwei¹, ZHOU Yongjin J.^{2,3}

1 School of Chemistry and Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430080, Hubei, China

2 Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China

3 Dalian Key Laboratory of Energy Biotechnology, Dalian 116023, Liaoning, China

Abstract: Fatty acids (FA) are widely used as feed stocks for the production of cosmetics, personal hygiene products, lubricants and biofuels. *Ogataea polymorpha* is considered as an ideal chassis for bio-manufacturing, due to its outstanding characteristics such as methylotroph, thermal-tolerance and wide substrate spectrum. In this study, we harnessed *O. polymorpha* for overproduction of fatty acids by engineering its fatty acid metabolism and optimizing the fermentation process. The engineered strain produced 1.86 g/L FAs under the optimized shake-flask conditions (37 °C, pH 6.4, a C/N ratio of 120 and an OD_{600} of seed culture of 6–8). The fed-batch fermentation process was further optimized by using a dissolved oxygen (DO) control strategy. The C/N ratio of initial medium was 17.5, and the glucose medium with a C/N ratio of 120 was fed when the DO was higher than 30%. This operation resulted in a titer of 18.0 g/L FA, indicating the potential of using *O. polymorpha* as an efficient cell factory for the production of FA.

Keywords: *Ogataea polymorpha*; metabolic engineering; fatty acids; nitrogen limitation; process optimization

随着人类社会持续发展持续提速,对洁净能源以及化学品需求也进一步增大^[1]。脂肪酸是一种大宗化学原料,不仅能够通过转酯化反应合成生物柴油,也可以作为诸如化妆品、个人护理产品和工业润滑剂等化工品原料^[2]。目前脂肪酸主要来自动植物油脂,随着其需求量剧增,迫切需要寻找可持续的供给路线^[3]。随着合成生物学的兴起、基因编辑技术的成熟,构建微生物细胞工厂高效合成生物化学品及生物能源成为可能^[4-5]。不同微生物之间存在代谢差异,因此被用于不同目标产物合成,比如生产蛋白^[6]、抗生素^[7]、油脂^[8]等。

脂肪酸是一种化工原料,能广泛应用于生物能源、化妆品、个人护理产品和工业润滑剂等领域。微生物合成是一种潜在的可持续脂肪

酸合成路径^[2-3]。目前,通过代谢工程策略改造大肠杆菌^[9]、解脂耶氏酵母^[10]和酿酒酵母^[11]在批式补料条件下脂肪酸产量分别能达到 21.5、10.4、10.4 g/L (若无特殊说明,本文所述脂肪酶为游离脂肪酸)。特别是系统改造酿酒酵母初级代谢途径并进一步适应性进化,氮限制批式补料发酵脂肪酸产量最高能达到 33.4 g/L^[12]。然而,目前脂肪酸产量还不足以达到工业化水平,除了在这些模式菌株进行进一步代谢工程改造外,尝试其他潜在底盘细胞工厂可能是提高脂肪酸产量的另一种选择。

多形汉逊酵母 (*Ogataea polymorpha*) 是一种非常规酵母 (曾用名 *Hansenula polymorpha*), 因能利用甲醇、繁殖快、耐高温、底物代谢图谱广泛、异源蛋白表达能力强等特点备受关

注^[12-15]。目前 *O. polymorpha* 已被用于生产人乳头瘤蛋白 HPV16^[16-17]、中性粒细胞刺激因子 (GCSF)^[18]、链霉素^[19]和其他蛋白类^[20]化合物以及乙醇等大宗化学品^[21]。这些研究表明 *O. polymorpha* 具有成为微生物细胞工厂的潜力, 应用前景广阔^[22]。特别地, *O. polymorpha* 是一种 Crabtree 阴性菌株, 不积累乙醇等副产物, 在化学品生物合成中具有一定优势, 有望成为高效合成脂肪酸等产物的细胞工厂。

发酵工程是从微生物代谢机理出发, 在发酵过程中通过底物和条件控制^[23]以实现高产量、高底物转化率和强生产强度三者相对统一的发酵过程优化与控制技术, 是微生物工业化生产的重要环节^[24]。其中产量是目的产物的最终浓度或质量, 转化率是底物最终转化为目的产物的百分数, 生产强度是单位时间、单位体积内目的产物的产量, 一般情况下, 三者无法同时达到最大值, 需要对整个发酵过程综合因素进行评价, 找到最大经济效益的平衡。

因此, 本研究以野生型 *O. polymorpha* NCYC 495 为出发菌株, 通过高效基因编辑技术, 构建了高产脂肪酸的工程菌株。在此基础上, 通过发酵条件优化 (包括培养基 C/N 比, 发酵温度和 pH 值等)^[25], 提高工程菌株脂肪酸生产能力。最后, 通过采用溶氧 (DO) 耦联的批式补料发酵, 脂肪酸产量达到 18.0 g/L, 初步证明了 *O. polymorpha* 作为微生物细胞工厂具有很大的潜力。

1 材料与方法

1.1 实验菌株构建

本实验所需菌株如表 1 所示, 出发菌株 *O. polymorpha* NCYC 495 购自中国普通微生物保藏管理中心 (CGMCC, 编号 2.2412)。出发汉逊酵母为亮氨酸缺陷型, 为了构建产脂肪酸微生物细胞工厂, 本实验室设计了基于

CRISPR/Cas9 的高效基因组编辑系统^[26], 用于敲除基因 *faa1* (图 1A)。具体构建步骤如下: 首先, 构建靶向基因 *faa1* 的 sgRNA 表达载体, 以 *leu2* 作为筛选标记, 其中 20 bp 靶向序列为 5'-ATTGATCCTAACGATAAGCG-3'; 接着, 构建供体 DNA 分子, 分别扩增基因 *faa1* 编码区上下游各 1 000 bp 序列, 通过融合 PCR 方法获得完整供体 DNA 片段; 将 sgRNA 表达载体和供体 DNA 以各 500 ng 的量, 电击转化进入整合有 Cas9 蛋白的重组汉逊酵母, 于 SD 平板 37 °C 静置培养 2-3 d; 转化子经液体 SD 培养基培养后, 提取基因组作为模板, 并以引物 p311 (5'-TAGTCGAGTACTGAGGGGCG-3') 和 p159 (5'-TTGCACCAGGAGGAGTACCT-3') 进行 PCR 验证。阳性克隆在电泳检测中获得更短条带 (图 1B), 将阳性克隆在 YPD 培养基中进行连续传代丢失质粒。质粒丢失后的菌株命名为 23-3。为了避免营养缺陷型对后续实验中细胞生长与脂肪酸合成的影响, 将 *Opleu2* 基因进行了原位回补。以菌株 CGMCC 2.2497 基因组作为模板, 扩增具有完整功能的 *Opleu2* 基因片段, 上下游各含 1 000 bp 序列作为同源臂, 以 1 μg 分别电击转化菌株 495 和 23-3, 于 SD-LEU 平板进行筛选, 利用菌株生长作为筛选压力, 获得的转化子经测序验证正确后, 分别命名为 FD06 和 FD09。

表 1 本实验使用菌株列表

Table 1 Strains used in this study

Strain name	Genotype	Source
<i>Ogataea polymorpha</i>	Wild type; diploid	CGMCC, 2.2497
<i>Ogataea polymorpha</i>	Wild type; <i>MATa leu1.1</i>	CGMCC, 2.2412
23-3	<i>MATa leu1.1 faa1Δ</i>	This study
FD06	<i>MATa leu1.1::Opleu2</i>	This study
FD09	<i>MATa leu1.1::Opleu2 faa1Δ</i>	This study

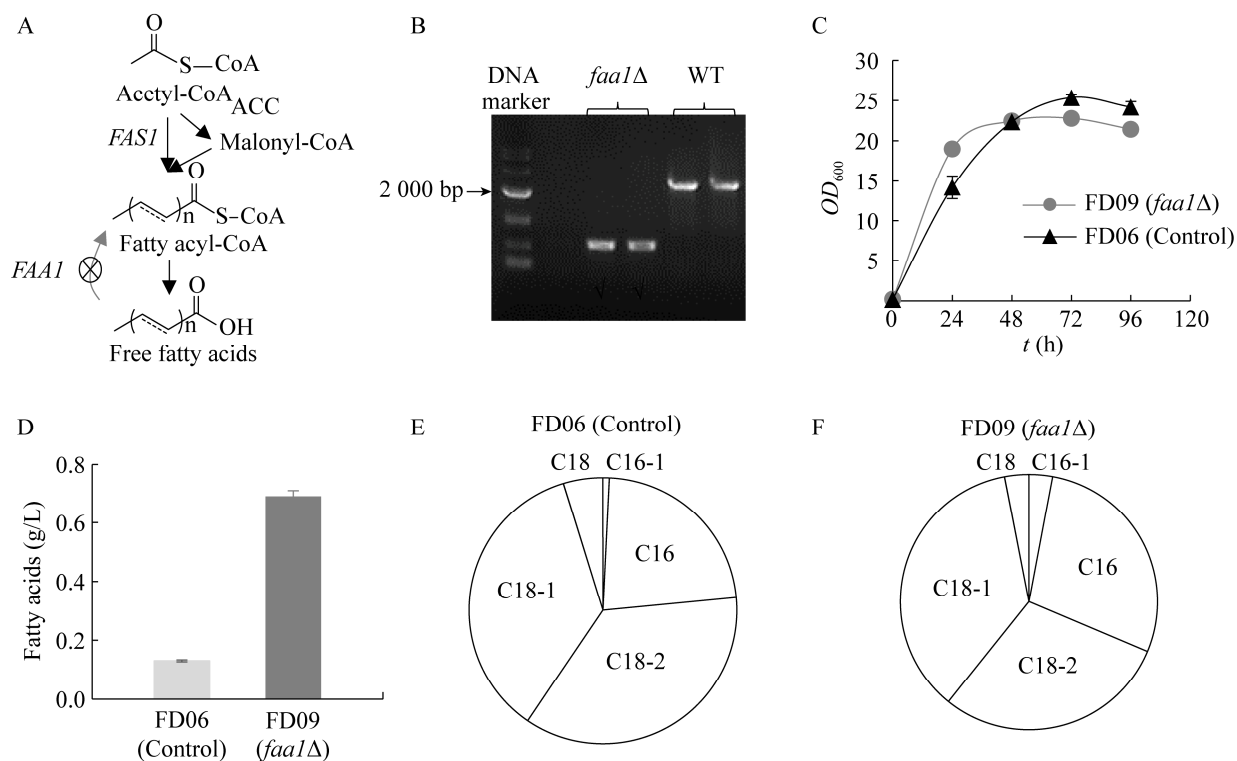


图1 *Ogataea polymorpha* 野生型与工程菌生长情况与脂肪酸产量 A: 脂肪酸生物合成途径; B: 基因 *faa1* 敲除阳性克隆 PCR 验证; C: 细胞生长曲线; D: 脂肪酸产量; E: 对照菌株 FD06 脂肪酸组成; F: *faa1Δ* 菌株 FD09 脂肪酸组成

Figure 1 Growth and fatty acid production of wild type and engineered *O. polymorpha*. (A) The biosynthetic pathway of fatty acids. (B) PCR verification of the seamless deletion of gene *faa1*. (C) Growth profile. (D) Fatty acid titers. Fatty acids profile in control strain FD06 (E) and engineered strain FD09 (F).

1.2 主要试剂和仪器

葡萄糖、无水磷酸二氢钾、琼脂粉、七水硫酸镁购自生物工程(上海)股份有限公司, 无氨基酵母氮源购自北京酷来搏科技公司, 蛋白胨购自北京奥博星公司, 酵母粉购自 Oxoid 公司, 硫酸铵和微量元素溶液中的各种试剂购自天津市科密欧化学试剂有限公司, Macy UV-1100 紫外可见分光光度计, 美析(中国)仪器有限公司; ZQZY-CF8 三层组合全温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; Sigma 1-16 高速离心机, 美国 SIGMA 公司; Gas Chromatograph-Trace 1 300, 美国 Thermo 公司; 生物传感分析仪 SBA-40D, 山东省科学院生物研究所; 平行生物

反应系统 (Parallel Bioreactor Systems-DASGIP), 德国 Eppendorf。

1.3 实验方法

1.3.1 种子液培养

从 -80°C 取出保存的 *O. polymorpha* 产脂肪酸工程菌甘油管, 于 YPD 平板划线活化, 培养 3 d 后, 从中挑取单菌落于 SD 平板划线, 继续培养 2 d。再从活化的 SD 平板中挑取 3 个单菌落于 3 管 3 mL 优化过的初始 Delft 培养基^[27]中, 于 37°C 、200 r/min 恒温摇床培养 16–18 h。Delft 培养基成分: 20 g/L $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 14.4 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mL/L 微量元素和 1 mL/L 维生素, 用 3 mol/L KOH 调 pH 值至 5.6。

微量元素配方 (g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.45, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.5, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3, H_3BO_3 1.0, KI 0.1, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 19, 最终 pH 为 4.0。维生素溶液配方 (g/L): $\text{D-C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 0.05, $\text{D-C}_9\text{H}_{16}\text{CaNO}_5^+$ 1.0, $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$ 1.0, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{P}$ 1.0, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ 1.0, $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$ 0.2 和 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 25。按照初始 OD_{600} 为 0.1 接种至 20 mL 发酵培养基, 发酵培养基同为 20 g/L 葡萄糖 Delft。SD 培养基为 20 g/L 葡萄糖, 6.7 g/L 无氨基酵母氮源, 固体平板加入 2% 琼脂粉。

种子液洗涤, 取 5 mL 种子液培养基 $1\ 000 \times g$ 离心 5 min, 用等体积无菌水洗涤两次之后测 OD_{600} , 进行体积换算后接种。

1.3.2 培养基碳氮比优化

第一组碳氮摩尔比为 6、15、60、300、600、1 200, 第二组碳氮摩尔比为 60、120、180、240、300。首先配制 1 L 不含硫酸铵的 Delft 培养基, 20 g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 14.4 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mL 微量元素和 1 mL 维生素。其中葡萄糖为 400 g/L 母液, 单独灭菌后加入, 微量元素和维生素过滤除菌后加入。分别按照每瓶 18 mL 分装至 100 mL 锥形瓶, 最后参照表 2 加入 70 g/L

表 2 不同碳氮摩尔比发酵加入 70 g/L 硫酸铵量
Table 2 The volume of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ used in fermentation with different C/N ratios

C/N ratio	70 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mL)
6	2.095
15	0.838
60	0.210
120	0.105
180	0.070
240	0.058
300	0.042
600	0.021

1 200 0.010

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和灭菌水至 20 mL。每样 3 个平行, 接种后于 37 °C、200 r/min 恒温摇床发酵。

1.3.3 批式补料发酵罐

首先在 3 mL Delft 中准备一级种子液, 过夜培养后转接 100 μL 至 20 mL Delft 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养。发酵罐初始培养基为每罐 300 mL Delft, 配方与摇瓶相同。补料培养基为碳氮摩尔比为 120 的培养基, 成分为 500 g/L $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 15 g/L KH_2PO_4 , 2.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9.17 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mL/L 微量元素和 5 mL/L 维生素。

采用溶氧关联补料。将平行生物反应器设置为当发酵罐溶氧超过 30% 则进行自动补料, 低于 30% 或高于 70% 停止补料, 补料速率为 3 mL/h; 温度维持在 37 °C, pH 维持在 5.6; 采用 2 mol/L KOH 和 2 mol/L HCl 调节 pH。

1.3.4 测定方法

菌体浓度用紫外分光光度计在波长 600 nm 下进行测定。葡萄糖浓度用生物传感分析仪进行测定。取样品于 1.5 mL 离心管, $13\ 000 \times g$ 离心 3 min, 取上清, 稀释糖浓度至 1 g/L 以内, 取 25 μL 进样。

脂肪酸提取方法: 将发酵液稀释后取 100 μL 加入到 100 μL 去离子水和 10 μL 氢氧化四乙胺中, 再加入 200 μL 甲酯化试剂 (200 mmol/L 碘甲烷-二氯甲烷溶液, 含 100 mg/L 十五烷酸作为内标物), 1 600 r/min 振荡 30 min。之后 $2\ 000 \times g$ 离心 10 min, 取下层有机相部分, 挥发干后用 200 μL 正己烷重悬进样。

脂肪酸含量测定采用美国赛默飞气相色谱仪 Gas Chromatograph-Trace 1 300。方法如下: 进样口温度为 280 °C, 采用氢火焰离子检测器 (FID), 温度为 250 °C, 分析毛细管柱型号为 HP-5 (30 m \times 0.25 cm, 0.25 μm 膜厚度)。分离载

气为氮气, 流速 1 mL/min。升温程序: 初始温度 40 °C 保留 2 min, 以 30 °C/min 升至 180 °C, 接着以 4 °C/min 升至 200 °C 保留 1 min, 最后以 2 °C/min 升至 240 °C 并维持 10 min。

2 结果与分析

2.1 脂肪酸合成 *O. polymorph* 工程菌构建

在微生物细胞中, 脂肪酸的生物合成前体为乙酰辅酶 A (acetyl-CoA), 乙酰辅酶 A 首先作为脂肪酸合酶的起始单元, 并在乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acc1) 催化下延伸成丙二酸单酰辅酶 A, 脂肪酸合酶 (Fas) 依次催化丙二酸单酰辅酶 A 的脱羧延伸, 依次添加二碳单位, 合成脂酰辅酶 A, 最后经过硫酯酶催化释放脂肪酸。细胞内存在逆途径, 通过脂酰辅酶 A 合成酶重新激活脂肪酸合成脂酰辅酶 A, 用以控制细胞内的脂肪酸稳态 (图 1A)。汉逊酵母中脂酰辅酶 A 合成酶由 *faa1* 基因编码。为了增加脂肪酸的积累, 我们敲除了 *faa1* 基因 (图 1B)。为了避免营养缺陷型对菌株生长的影响, 进一步回补了 *leu2* 基因, 分别获得对照菌株 FD06 和 *faa1*Δ 菌株 FD09 (表 1)。由图 1C 和 1D 可见, *faa1* 敲除后略微降低了细胞的生长速率, 但大幅度提升了脂肪酸积累, 产量从 0.13 g/L 提高到 0.69 g/L。汉逊酵母主要合成 16 碳和 18 碳的直链脂肪酸, 其中棕榈酸 (C16), 油酸 (C18-1) 和亚油酸 (C18-2) 占比最大, 达到 90% 以上; 棕榈油酸 (C16-1) 和硬脂酸 (C18) 含量很少; 且对照菌株与 *faa1*Δ 菌株在脂肪酸组成方面没有显著的差异 (图 1E-1F)。因此, 后续脂肪酸合成条件的优化均采用菌株 FD09 进行实验。

2.2 *Ogataea polymorph* 脂肪酸最佳碳氮摩尔比 (C/N)

根据文献[28]报道, 产油微生物能在氮限制条件下大量积累油脂。因此尝试优化碳氮摩尔

比 (C/N) 来提高脂肪酸的产量。固定 20 g/L 葡萄糖作为碳源, 通过调整硫酸铵浓度将碳氮摩尔比设置为 6、15、60、300、600、1 200, 在摇瓶中考察细胞生长以及脂肪酸产量。由图 2B 生长曲线可知, C/N 低于 60 时酵母生长速率基本一致, 说明 C/N 低于 60 时氮源足够支持酵母正常生长, 且不会影响生长速度。随着 C/N 提高, 脂肪酸产量显著增加 (图 2A)。但当 C/N 高于 300 时, 酵母生长受到限制 (图 2B)。尽管 C/N 为 300 和 60 时脂肪酸产量一样, 但 C/N 为 300 时, 葡萄糖消耗明显下降且不能耗完 (图 2C), 表明氮源限制超过了细胞生长所需的最低要求。当 C/N 提高到 1 200 时, 葡萄糖几乎没有消耗 (图 2C), 且脂肪酸产量和细胞生长急剧下降 (图 2A-2B)。在 C/N 低于 60 时, 细胞生长和葡萄糖消耗虽然很快, 但不利于脂肪酸合成。因此, 最优 C/N 应在 60-300 之间。

我们进一步细化脂肪酸发酵培养基 C/N, 探究了 C/N 比为 60、120、180、240、300 时 *O. polymorph* 产脂肪酸能力。当 C/N 为 120 时, 脂肪酸产量达到最高值 1.42 g/L (图 3A)。与前期结果相似, 随着 C/N 提高, 酵母生长和葡萄糖消耗明显降低 (图 3B-3C), 当 C/N 为 120 时葡萄糖在 96 h 刚好能够耗尽, 脂肪酸产量也最高。因此, 我们确定 *O. polymorph* 产脂肪酸的最佳 C/N 为 120, 即在尽量不影响生长的情况下, 能最大限度将葡萄糖转化为脂肪酸。值得一提的是, 在 C/N 为 120 条件下, 葡萄糖消耗曲线几乎呈一条直线, 表明在此 C/N 下耗糖速率为定值 (图 3C)。这对于工业化补料具有重要意义, 有助于计算补料速率和设计补料策略。

2.3 培养条件对 *O. polymorph* 产脂肪酸影响

2.3.1 培养温度对 *O. polymorph* 生长和脂肪酸产量的影响

为了探究不同温度下 *O. polymorph* 的生长

和产脂肪酸能力, 在 C/N 分别为 60 和 120 的

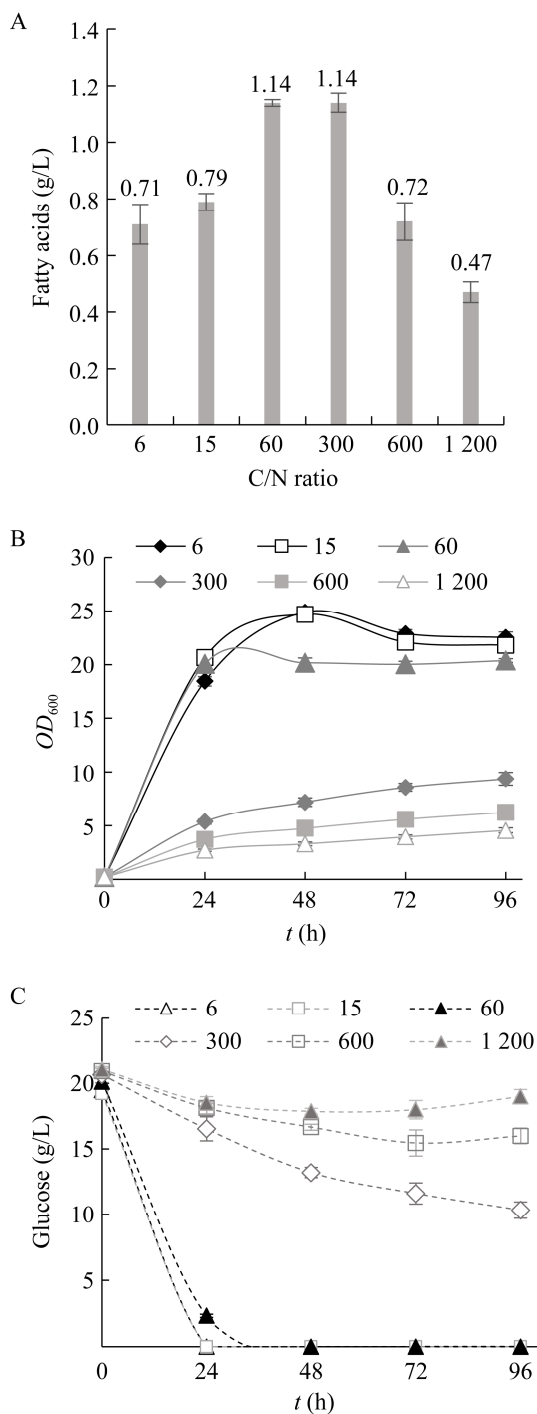


图2 C/N 为 6-1 200 对 *O. polymorpha* 合成脂肪酸产量的影响 A: 脂肪酸产量; B: *O. polymorpha* 生长曲线; C: 葡萄糖消耗曲线

Figure 2 Effect of C/N ratio on fatty acid

production of *O. polymorpha*. (A) Fatty acid titers. (B) Growth profiles. (C) Glucose consumptions.

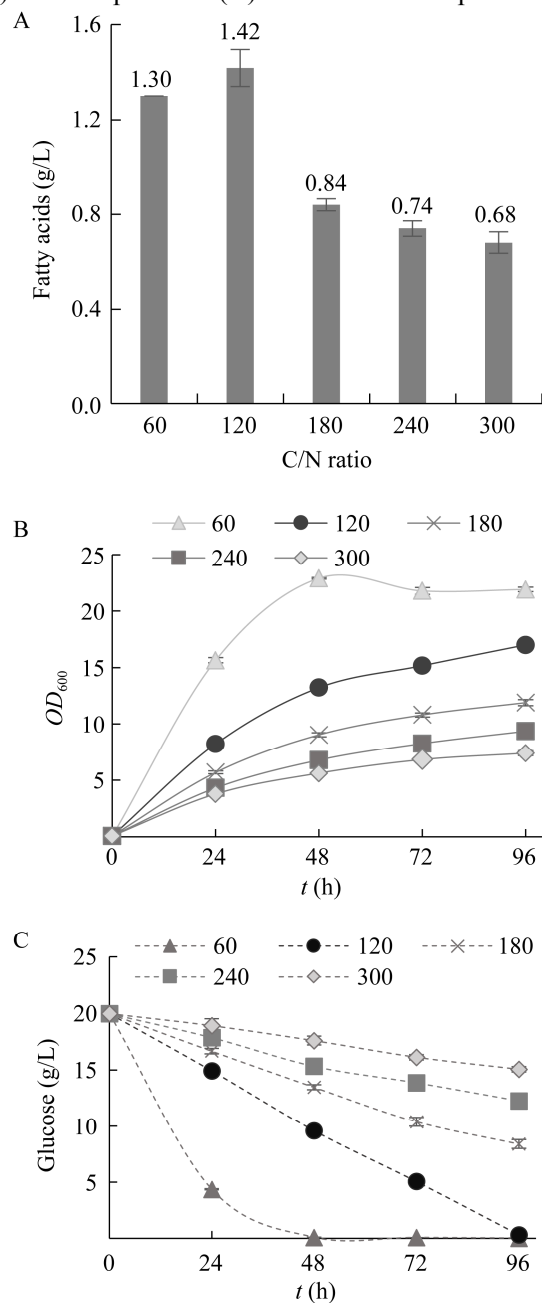


图3 进一步优化 C/N 提高 *O. polymorpha* 脂肪酸产量 A: C/N 为 60、120、180、240、300 时脂肪酸产量; B: *O. polymorpha* 生长曲线; C: 葡萄糖消耗曲线

Figure 3 Further optimization of C/N ratio for improving the production of fatty acids in *O. polymorpha*. (A) Fatty acids titers at different

C/N ratio. (B) Growth profiles. (C) Glucose consumption profiles.

Delft 培养基中, 比较不同种子液培养温度和发酵温度对酵母的影响。分别设计 4 组不同种子液培养温度-发酵培养温度进行比较, 分别为: 30 °C-30 °C, 30 °C-37 °C, 37 °C-30 °C, 37 °C-37 °C, 发酵液分别用 C/N 为 60 和 120 的 Delft 培养基。

结果再次表明, C/N 为 120 更有利于细胞生长和脂肪酸合成 (图 4)。种子液培养温度对细胞生长和脂肪酸产量影响很小, 发酵时培养温度对脂肪酸合成有很大影响。当 C/N 为 60, 发酵培养温度为 37 °C 时, 酵母生长更快 (图 4C), 脂肪酸产量也更高 (图 4B)。当 C/N 为 120 时, 细胞生长略微有所提高 (图 4D), 脂肪酸产量显著

提升, 产量提高了 52%, 最高产量达到 1.86 g/L (图 4B), 得率为 (0.076 ± 0.002) g/g 葡萄糖。

2.3.2 种子液状态对 *O. polymorph* 生长和脂肪酸产量的影响

种子细胞的活性与状态可能对细胞生长和脂肪酸产量有较大影响, 因此采用培养不同时期的种子细胞进行脂肪酸发酵生产。分别选取对数生长期前期 ($OD_{600}=4$)、中期 ($OD_{600}=8$) 和后期 ($OD_{600}=14$) 的种子细胞, 接种到发酵培养基中进行培养。并且清洗种子细胞以减少种子培养液中的代谢物对后期发酵的影响。结果表明, 种子液的状态对最终生物量没有影响 (图 5)。种子液 OD_{600} 在 8 左右时, 脂肪酸产量

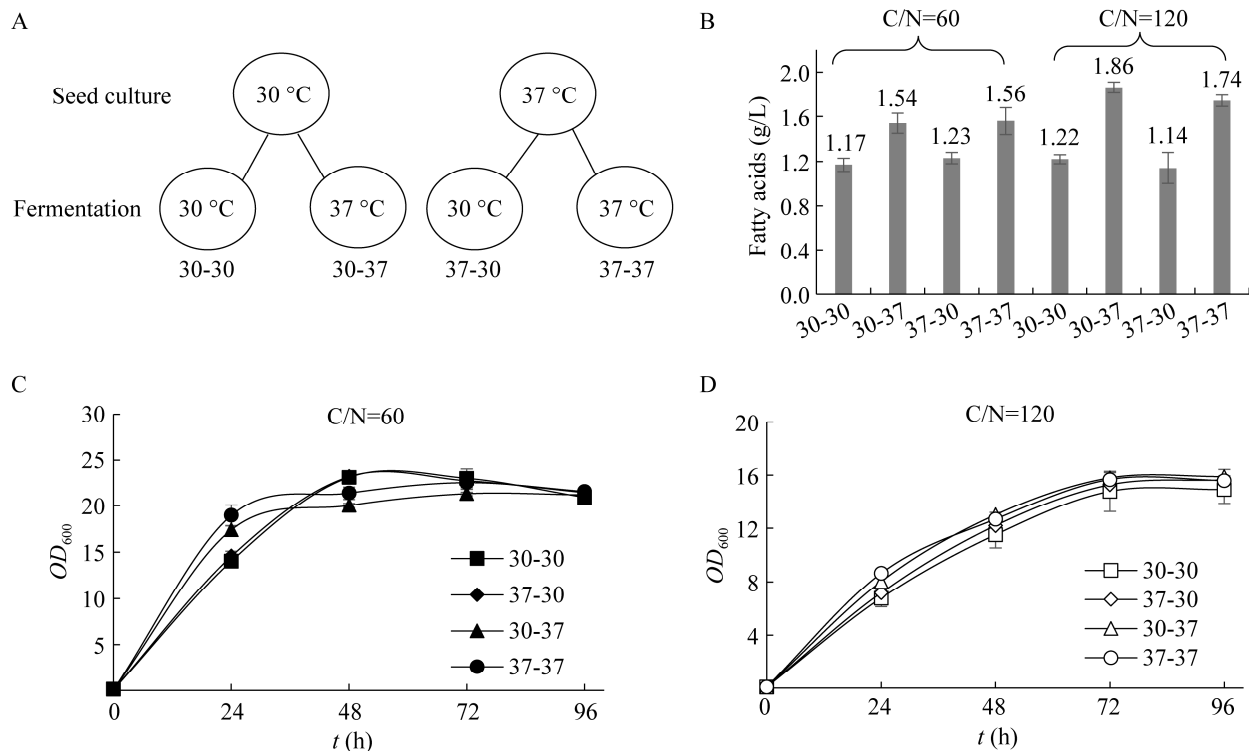


图 4 不同温度和 C/N 发酵条件下的生长曲线与脂肪酸产量 A: 种子液和发酵液温度设置; B: 脂肪酸产量; C/N=60 时 (C) 和 C/N=120 时 (D) 细胞在不同温度培养条件下生长情况

Figure 4 Cell growth and fatty acids production under different temperatures and C/N ratios. (A) The

scheme of temperature setting for seed and fermentation cultures. (B) The fatty acids titers. Growth profiles under different temperatures and a C/N ratio of 60 (C) and 120 (D).

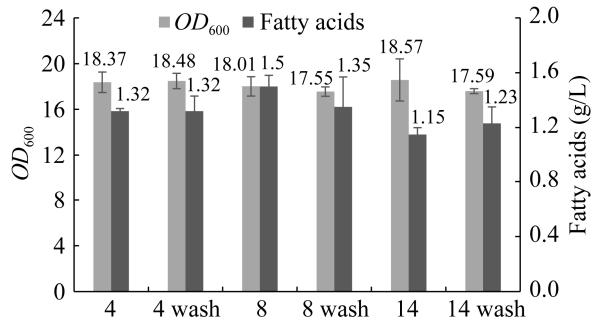


图5 种子液状态发酵对 *O. polymorph* 生产脂肪酸影响 Wash 表示用去离子水洗种子液

Figure 5 The effect of seed culture condition on fatty acid production of *O. polymorph*. Wash indicates the seed culture was washed using deionized water.

最高。另外，清洗种子液对脂肪酸产量影响较小。这些结果说明采用对数中期的种子细胞进行发酵，有利于 *O. polymorph* 高效合成脂肪酸。

2.3.3 *O. polymorph* 产脂肪酸最佳 pH

我们前期发现 C/N 会影响细胞的生长和脂肪酸合成，测定不同 C/N 发酵终点 pH 值，发现 pH 值变化与 C/N 呈正相关 (图 6A)。在 pH 为 5.6 的初始培养基中，高 C/N 培养基 pH 值几乎没有变化，而低 C/N pH 明显下降，最低达到 2.7 左右，明显偏酸性。因此，我们尝试对发酵培养基 pH 进行优化。在 C/N 为 120 的培养基中分别调初始 pH 为 4.4、5.4、6.4 和 7.4。发现初始 pH 值越低，*O. polymorph* 生长越好，能更快达到平台期 (图 6B)，表明菌株更偏好酸性环境。而脂肪酸产量随着 pH 值升高逐步提高，在 pH 6.4 时脂肪酸产量达到最高值 1.85 g/L (图 6C)。另外，我们在实验中发现 pH 为 6.4 的条件下脂肪酸会以固体颗粒析出，而 pH 为 4.4 时并未发现这种情况。这在一定程度上解除了底物抑制，有利于脂肪酸合成。

2.4 批次补料脂肪酸发酵

有研究报道，溶氧关联补料策略能够提高 *O. polymorph* 在批次补料过程中合成植酸酶的

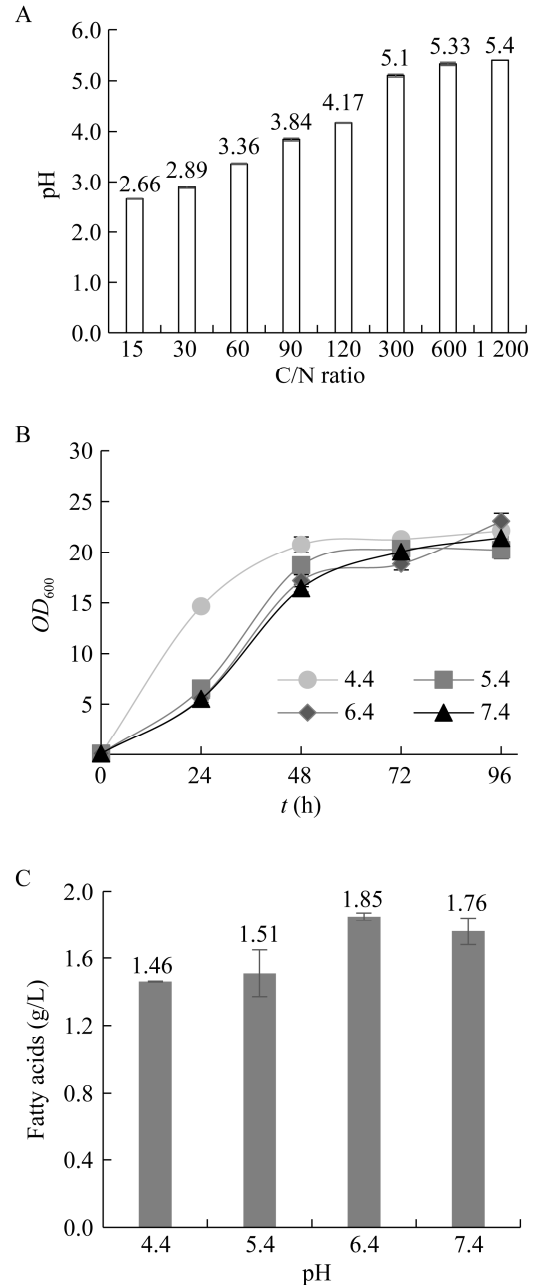


图6 pH对 *O. polymorph* 生长和产脂肪酸的影响 A: 不同 C/N 条件下的发酵终点 pH; B: 不同初始 pH 条件下菌株生长曲线; C: 不同初始 pH 条件下脂肪酸产量

件下脂肪酸产量

Figure 6 Effect of different pH on cell growth and fatty acid production of *O. polymorph*. (A) The final pH of culture under different C/N ratios. Growth profiles (B) and fatty acid titers (C) under different initial pH.

效率^[29]。溶氧关联补料操作简便,易于自动化控制,有望提高 *O. polymorph* 在批式补料过程中的脂肪酸产量。本研究分别将溶氧阈值设置为 15%和 30%两组,当溶氧超过设定值时,发酵罐会自动补料,溶氧低于设定值或高于 70%时,停止补料。我们初始的培养基为 Delft 培养基,含有 20 g/L 葡萄糖 (C/N 为 17.5),葡萄糖耗尽时开始补料。补料培养基为葡萄糖浓度 500 g/L、C/N 为 120 的培养基。我们发现 *O. polymorph* 生长旺盛,在 13 h 初始培养基中葡萄糖即消耗殆尽 (图 7A)。相比于前期批式发酵过程,补料后 *O. polymorph* 增长速率有所降低,但 OD_{600} 最高能达到 221。脂肪酸产量随着菌体生长而增加 (图 7A)。另外,在发酵过程中会有较多脂肪酸析出,并黏附于发酵罐壁和其他器件上。因此在发酵终点取样后,还需将发酵罐壁、搅拌桨、pH 电极和溶氧电极等处的脂肪酸刮下,搅拌均匀后再取样。最终脂肪酸产量分别达到 18.0 g/L 和 17.3 g/L (图 7B),得率均能达到 (0.08 ± 0.003) g/g 葡萄糖。这表明溶氧阈值设置为 15%和 30%都能获得很好

的脂肪酸产量。

我们发现,工程菌在 52–71 h 生长会出现一段停滞期,菌株完全不生长。推测可能是溶氧充足条件下 *O. polymorph* 呼吸作用太强,更快地消耗碳氮源导致。后期之所以生长可能是细胞自噬为自身提供了新的氮源。经过计算发现,这段时间的 C/N 在 70 左右,因此推断在发酵罐中, *O. polymorph* 产脂肪酸细胞工厂的最佳 C/N 应小于 70。

3 总结与展望

为了拓展脂肪酸生物合成路线,本研究构建了 *O. polymorph* 脂肪酸生物合成菌株,并优化了发酵工艺。采用葡萄糖作为发酵底物与其他工程菌进行更直观的比较。首先在摇瓶水平探究了 C/N 对 *O. polymorph* 生长和脂肪酸合成的影响,最佳 C/N 为 120。进一步对发酵液温度、种子培养状态和发酵液 pH 值进行优化,确定工程菌在 37 °C、种子液 OD_{600} 为 6–8、培养基初始 pH 为 6.4、C/N 为 120 时,摇瓶中脂肪酸产量最高可达 1.86 g/L,显著高于已报道代谢工程菌株大肠杆菌 (1.1 g/L)^[9]、酿酒酵母 (1.2 g/L)^[12]以及解脂耶氏酵母菌株 (0.5 g/L)^[9]。

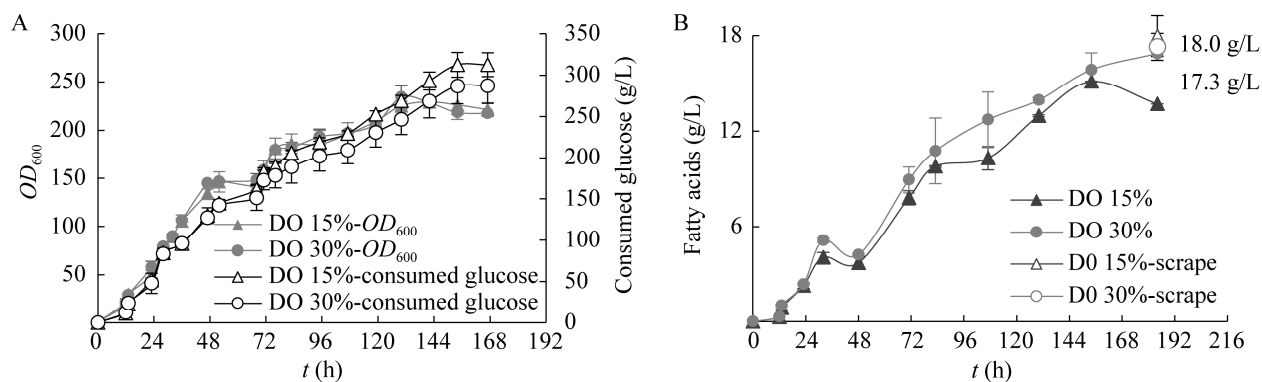


图7 溶氧关联批式补料发酵下 *O. polymorpha* 生长和产脂肪能力 A: 细胞生长曲线和葡萄糖消耗曲线; B: 脂肪酸产量

Figure 7 The cell growth and fatty acid production of *O. polymorpha* under DO-controlled fed-batch fermentation. (A) Growth and glucose consumptions. (B) Fatty acids titers.

值得一提的是, 这些工程菌株都经过系统代谢工程改造, 而本研究 *O. polymorpha* 仅敲除 *faa1* 基因并进行发酵条件优化就能提高脂肪酸产量至 1.86 g/L, 表明其作为底盘生物具有一定的潜力。最后, 优化了批式发酵条件, 通过溶氧关联补料能够使微生物保持旺盛生长, 并发现脂肪酸生产和生长相偶联, 最终脂肪酸浓度达到 18.0 g/L, 得率能达到 0.08 g/g 葡萄糖, 为理论得率的 26%。尽管 *O. polymorpha* 展现了脂肪酸的生物合成潜力, 但与工程化解脂耶氏酵母 (得率 0.14 g/g 葡萄糖)^[10] 和酿酒酵母 (得率 0.1 g/g 葡萄糖)^[11] 仍有差距, 这可能是由于前体乙酰 CoA 或者 NADPH 供应不足。将来对 *O. polymorpha* 进一步代谢工程改造, 有望进一步提高脂肪酸生产能力。

本研究为 *O. polymorpha* 高产脂肪酸微生物细胞工厂构建与工艺优化做了一定探索, 证明 *O. polymorpha* 作为细胞工厂生产化学品具有一定的潜力^[30]。随着未来代谢工程和新的在线检测技术的发展, 将进一步从分子水平和发酵水平提高 *O. polymorpha* 的脂肪酸生产能力, 并拓展 *O. polymorpha* 的产物谱; 还将尝试以甲醇作为底物进行脂肪酸生产, 降低生产成本^[12]。

REFERENCES

- [1] Statistical review of world energy. Britain [EB/OL]. [2021-03-04]. <http://www.indiaenvironmentportal.org.in/files/file/bp-stats-review-2020-full-report.pdf>.
- [2] Zhou YJ, Buijs NA, Zhu ZW, et al. Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories. *Nat Commun*, 2016, 7: 11709.
- [3] 高教琪, 段兴鹏, 周雍进. 酵母细胞工厂生产脂肪酸

及其衍生物. *生物加工过程*, 2018, 16(1): 19-30.

Gao JQ, Duan XP, Zhou YJ. Production of fatty acids and their derivatives by yeast cell factories. *Chin J Bioprocess Eng*, 2018, 16(1): 19-30 (in Chinese).

- [4] Nielsen J. Yeast cell factories on the horizon. *Science*, 2015, 349(6252): 1050-1051.
- [5] Colin VL, Rodríguez A, Cristóbal HA. The role of synthetic biology in the design of microbial cell factories for biofuel production. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 601834.
- [6] Van Dijk JM, Hecker M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 3.
- [7] Tornqvist EGM, Peterson WH. Penicillin production by high-yielding strains of *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol*, 1956, 4(5): 277-283.
- [8] Cho HU, Park JM. Biodiesel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes. *Bioresour Technol*, 2018, 256: 502-508.
- [9] Xiao Y, Bowen CH, Liu D, et al. Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(5): 339-344.
- [10] Ledesma-Amaro R, Dulermo R, Niehus X, et al. Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids. *Metab Eng*, 2016, 38: 38-46.
- [11] Yu T, Zhou YJ, Huang MT, et al. Reprogramming yeast metabolism from alcoholic fermentation to lipogenesis. *Cell*, 2018, 174(6): 1549-1558.
- [12] 高教琪, 周雍进. 甲醇生物转化的机遇与挑战. *合成生物学*, 2020, 1(2): 158-173.
Gao JQ, Zhou YJ. Advances in methanol bio-transformation. *Syn Bio J*, 2020, 1(2): 158-173 (in Chinese).
- [13] Van Dijk R, Faber KN, Kiel JAKW, et al. The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 26(9/10): 793-800.
- [14] 陈凤菊, 卢善发, 胡敦孝. 多形汉逊酵母外源基因表达系统. *生物工程学报*, 2001, 17(3): 246-249.
Chen FJ, Lu SF, Hu DX. Advances in the expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Chin J*

- Biotech, 2001, 17(3): 246-249 (in Chinese).
- [15] Manfrão-Netto JHC, Gomes AMV, Parachin NS. Advances in using *Hansenula polymorpha* as chassis for recombinant protein production. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 94.
- [16] 李巍巍, 何秀萍, 郭雪娜, 等. 人乳头瘤病毒 16 亚型 L1 蛋白在多形汉逊酵母中的优化表达. *生物工程学报*, 2009, 25(10): 1516-1523.
- Li WW, He XP, Guo XN, et al. Optimized expression of the L1 protein of human papillomavirus in *Hansenula polymorpha*. *Chin J Biotech*, 2009, 25(10): 1516-1523 (in Chinese).
- [17] Bredell H, Smith JJ, Görgens JF, et al. Expression of unique chimeric human papilloma virus type 16 (HPV-16) L1-L2 proteins in *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, 2018, 35(9): 519-529.
- [18] Talebkhan Y, Samadi T, Samie A, et al. Expression of granulocyte colony stimulating factor (GCSF) in *Hansenula polymorpha*. *Iran J Microbiol*, 2016, 8(1): 21-28.
- [19] Wetzel D, Müller JM, Flaschel E, et al. Fed-batch production and secretion of streptavidin by *Hansenula polymorpha*: evaluation of genetic factors and bioprocess development. *J Biotechnol*, 2016, 225: 3-9.
- [20] Bredell H, Smith JJ, Prins WA, et al. Expression of rotavirus VP6 protein: a comparison amongst *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res*, 2016, 16(2): fow001.
- [21] Kata I, Semkiv MV, Ruchala J, et al. Overexpression of the genes *PDC1* and *ADH1* activates glycerol conversion to ethanol in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Yeast*, 2016, 33(8): 471-478.
- [22] 钱卫东, 施春阳, 王婷. 多形汉逊酵母作为细胞工厂的应用研究进展. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(4): 55-59.
- Qian WD, Shi CY, Wang T. Progress in research on the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* cell factory. *Chin J Vet Med*, 2012, 39(4): 55-59 (in Chinese).
- [23] Broach JR. Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 2012, 192(1): 73-105.
- [24] 刘龙, 李江华, 堵国成, 等. 发酵过程优化与控制技术的研究进展与展望//中国生物工程学会 2014 年学术年会暨全国生物技术大会. 温州: 中国生物工程学会, 2014.
- Liu L, Li J, Du G, et al. Progress on fermentation optimization and control technology. Wenzhou: Annual meeting of Chinese Society of Biotechnology, 2014.
- [25] Sokchea H, Thi HP, Dinh PL, et al. Effect of time, C/N ratio and molasses concentration on *Saccharomyces cerevisiae* biomass production. *J Vet Anim Res*, 2018, 1(1): 1-7.
- [26] Gao JQ, Gao N, Zhai XX, et al. Recombination machinery engineering for precise genome editing in methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. *iScience*, 2021, 24(3): 102168.
- [27] 刘爽, 高教琪, 薛闯, 等. 多形汉逊酵母提高生长性能的培养基优化. *生物加工过程*, 2020, 18(1): 116-125.
- Liu S, Gao JQ, Xue C, et al. Medium optimization for growth of *Ogataea polymorpha*. *Chin J Bioprocess Eng*. 2020, 18(1):116-125 (in Chinese).
- [28] Kerkhoven EJ, Kim YM, Wei SW, et al. Leucine biosynthesis is involved in regulating high lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *mBio*, 2017, 8(3): e00857-17.
- [29] Charoenrat T, Antimanon S, Kocharin K, et al. High cell density process for constitutive production of a recombinant phytase in thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica* using table sugar as carbon source. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 180(8): 1618-1634.
- [30] 高琳惠, 蔡鹏, 周雍进. 甲醇酵母代谢工程研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 1-14.
- Gao LH, Cai P, Zhou YJ. Advances in metabolic engineering of methylotrophic yeasts. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 1-14 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)