



## 研究报告

## 解脂耶罗维亚酵母工程菌合成超长链脂肪酸及温度的影响

赵晨<sup>1,2</sup> 孟慧敏<sup>2,3</sup> 李家欣<sup>2,4</sup> 张培玉<sup>\*1</sup> 李福利<sup>2</sup> 王士安<sup>\*2</sup>

1 青岛大学环境科学与工程学院 山东 青岛 266071

2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 山东 青岛 266101

3 青岛市食品药品检验研究院 山东 青岛 266071

4 中国科学院大学 北京 100039

**摘要:**【背景】解脂耶罗维亚酵母属于产油微生物,大量研究表明该酵母能够高产长链脂肪酸和油脂,但是应用该酵母合成超长链脂肪酸仍待研究。【目的】工程化解脂耶罗维亚酵母合成高值超长链脂肪酸,并研究温度对脂肪酸合成的影响。【方法】合成密码子优化的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)延长酶基因 *AtFAE1*、非洲芥菜(*Brassica tournefortii*)延长酶基因 *BtFAE1* 和碎米芥属植物 *Cardamine graeca* 的延长酶基因 *CgKCS*, 分别构建质粒 pYLEX1-*AtFAE1*、pYLEX1-*BtFAE1*、pYLEX1-*CgKCS* 和 pYLEX1-*AtFAE1*-*BtFAE1*-*CgKCS*。以解脂耶罗维亚酵母菌株 Po1g 为宿主,通过化学法分别转化上述 4 个质粒,获得工程菌 Po1g-*AtFAE1*、Po1g-*BtFAE1*、Po1g-*CgKCS* 和 Po1g-*AtFAE1*-*BtFAE1*-*CgKCS*,比较评价超长链脂肪酸的合成。在此基础上,过表达内源二酯酰甘油酰基转移酶基因 *DGATI* (diacylglycerol acyltransferase)提高产油量,并研究温度对生物量、产油、脂肪酸组成的影响。【结果】在解脂耶罗维亚酵母中 3 个延长酶的延长能力明显不同,*AtFAE1* 主要催化 C20:1 脂肪酸的合成,*BtFAE1* 更有利于芥酸(C22:1)的合成,而 *CgKCS* 能够催化合成神经酸(C24:1),但是三者共表达并未提高神经酸产量。在表达 *CgKCS* 基因的菌株中过表达 *DGATI* 基因,细胞油脂含量提高 50%。温度实验表明,低温有利于解脂耶罗维亚酵母合成不饱和脂肪酸,反之,高温利于其合成饱和脂肪酸。【结论】脂肪酸延长酶基因 *CgKCS* 可直接催化 C18:1 脂肪酸合成 C24:1 的超长链脂肪酸,并且通过优化培养温度可提高不饱和脂肪酸的合成。本研究为构建超长链脂肪酸细胞工厂以及发酵优化提供理论和技术参考。

**关键词:** 超长链脂肪酸, 解脂耶罗维亚酵母, 油脂, 代谢工程, 温度, 发酵

**Foundation items:** Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2017ZB0209); Science and Technology Service Network Initiative, Chinese Academy of Sciences (KFJ-STIS-ZDTP-065); Key Innovation Grant of Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences (QIBEBT ZZBS 201806)

**\*Corresponding authors:** ZHANG Pei-Yu: E-mail: envbio@163.com

WANG Shi-An: Tel: 86-532-80662644; E-mail: wangsa@qibebt.ac.cn

**Received:** 28-01-2019; **Accepted:** 03-04-2019; **Published online:** 15-04-2019

**基金项目:** 山东省自然科学基金(ZR2017ZB0209); 中国科学院 STS 重点项目(KFJ-STIS-ZDTP-065); 中科院青岛生物能源与过程研究所科研创新重点部署基金(QIBEBT ZZBS 201806)

**\*通信作者:** 张培玉: E-mail: envbio@163.com

王士安: Tel: 0532-80662644; E-mail: wangsa@qibebt.ac.cn

**收稿日期:** 2019-01-28; **接受日期:** 2019-04-03; **网络首发日期:** 2019-04-15

## Engineering the yeast *Yarrowia lipolytica* to synthesize very-long-chain fatty acids and the effects of temperature on fatty acids synthesis

ZHAO Chen<sup>1,2</sup> MENG Hui-Min<sup>2,3</sup> LI Jia-Xin<sup>2,4</sup> ZHANG Pei-Yu<sup>\*1</sup> LI Fu-Li<sup>2</sup>  
WANG Shi-An<sup>\*2</sup>

1 Department of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China

2 Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China

3 Qingdao Institute for Food and Drug Control, Qingdao, Shandong 266071, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

**Abstract: [Background]** The yeast *Yarrowia lipolytica* is an oleaginous microorganism and can produce long-chain fatty acids and oils with high cell contents. However, the synthesis of very-long-chain fatty acids by this yeast remains to be investigated. **[Objective]** To engineer *Y. lipolytica* to synthesize very-long-chain fatty acids with high values and evaluate the influences of temperature on biomass, oil production, and fatty acids compositions. **[Methods]** The fatty acids elongation enzyme genes *AtFAE1* in *Arabidopsis thaliana*, *BtFAE1* in *Brassica tournefortii* and *CgKCS* in *Cardamine graeca* were codon-optimized according to the frequency of codon usage in *Y. lipolytica*. The plasmids pYLEX1-*AtFAE1*, pYLEX1-*BtFAE1*, pYLEX1-*CgKCS* and pYLEX1-*AtFAE1-BtFAE1-CgKCS* were constructed and used to transform the host strain *Y. lipolytica* Po1g, generating the yeast strains Po1g-*AtFAE1*, Po1g-*BtFAE1*, Po1g-*CgKCS* and Po1g-*AtFAE1-BtFAE1-CgKCS*. Furthermore, the *DGATI* gene encoding diacylglycerol acyltransferase was overexpressed in the strain Po1g-*CgKCS* to improve oil production. **[Results]** The results showed that the overexpression of *AtFAE1*, *BtFAE1*, and *CgKCS* led to the remarkably difference in the composition and content of fatty acid in *Y. lipolytica*. *AtFAE1* mainly catalyzes the synthesis of C20:1, *BtFAE1* prefers to synthesize erucic acid (C22:1), and *CgKCS* can catalyze the synthesis of nervonic acid (C24:1). Nevertheless, co-expression of the three genes in *Y. lipolytica* did not increase the production of nervonic acid. Overexpression of the gene *DGATI* in Po1g-*CgKCS* apparently increased the oil content by 50%. The results from the temperature experiment showed that a lower temperature benefited the synthesis of unsaturated fatty acids, while a higher temperature benefited the synthesis of saturated fatty acids in *Y. lipolytica* in our tests. **[Conclusion]** The fatty acids elongase *CgKCS* can directly catalyze the synthesis of the C24:1 fatty acid from the C18:1 fatty acid, and the synthesis of unsaturated fatty acids can be improved by optimizing the culture temperature. This study provides theoretical and technical guidance for the construction of cell factories for very-long-chain fatty acids and the optimization of fermentation.

**Keywords:** Very-long-chain fatty acids, *Yarrowia lipolytica*, Lipid, Metabolic engineering, Temperature, Fermentation

解脂耶罗维亚酵母属于产油酵母, 具有产油量大、易培养、繁殖快、易于遗传改造等优点, 其产油可以达到细胞干重的 70%, 并且该酵母属于“生物安全性第一级微生物” (Biosafety class 1 microorganism)<sup>[1-2]</sup>, 近年来, 解脂耶罗维亚酵母被广泛用于微生物油脂和不饱和脂肪酸的开发<sup>[3-4]</sup>。应用解脂耶罗维亚酵母合成长链油脂已经接近理论

水平, 糖油转化率达到 0.269 g/g, 油脂发酵浓度可达到 98.9 g/L<sup>[5]</sup>。然而, 应用解脂耶罗维亚酵母合成超长链脂肪酸仍待研究。

超长链脂肪酸通常指主碳链上碳原子数大于 18 的脂肪酸。已有研究表明多种超长链脂肪酸具有重要应用价值, 例如多不饱和脂肪酸中的二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)具有预防脑血栓、

脑溢血、高血压等心血管疾病的作用<sup>[6]</sup>, 二十二碳六烯酸(DHA)可促进婴儿智力和视力发育<sup>[7]</sup>。此外, 还有多种超长链脂肪酸具有重要应用价值, 但是其生物合成研究和开发仍亟待加强, 如芥酸(C22:1 $\Delta$ 13)、神经酸(C24:1 $\Delta$ 15)、二十六碳酸(C26:0)、二十八碳酸(C28:0)、三十碳酸(C30:0)等。芥酸是重要的化工原料, 主要用于生产芥酸酰胺。神经酸主要以鞘糖脂和鞘磷脂的形式存在于动物大脑白质和髓鞘的神经纤维中, 可用于治疗人的多发性硬化症(multiple sclerosis)等神经紊乱病症<sup>[8-10]</sup>。二十六碳酸、二十八碳酸和三十碳酸等可用于特种合成或医药中间体。

解脂耶罗维亚酵母合成的脂肪酸以 C16 和 C18 链长为主, 因缺少合成超长链脂肪酸的延长酶, 野生型菌株无法合成超长链脂肪酸。但是, 应用代谢工程和合成生物学方法, 有望将该酵母发展为超长链脂肪酸细胞工厂。目前发现的脂肪酸延长酶的种类和数量繁多, 在同一种生物体可有超过 20 种的脂肪酸延长酶, 这些酶的底物专一性往往不同。在酿酒酵母表达植物拟南芥的脂肪酸延长酶基因 *AtFAE1*, 可以催化合成 C20–C26 链长的脂肪酸, 其中 C20:1 脂肪酸比例最高<sup>[11]</sup>。在酿酒酵母表达非洲芥菜(*Brassica tournefortii*)延长酶基因 *BtFAE1*, 能够催化合成 2.3%的芥酸(C22:1)<sup>[12-13]</sup>, 而在酿酒酵母表达碎米芥属植物 *Cardamine graeca* 的延长酶基因 *CgKCS*, 可以催化合成碳链更长的神经酸(C24:1)<sup>[14]</sup>。酿酒酵母是验证基因功能的模式体系, 但是酿酒酵母不是产油酵母, 通常油脂的细胞含量低于 20%<sup>[15]</sup>。上述脂肪酸延长酶基因在产油酵母中表达可能呈现不同于酿酒酵母的结果。本文首先研究了在解脂耶罗维亚酵母表达脂肪酸延长酶基因 *AtFAE1*、*BtFAE1* 和 *CgKCS* 合成超长链脂肪酸的情况。此外, 培养和发酵温度对解脂耶罗维亚酵母生理代谢影响显著<sup>[16]</sup>, 因此本文还以工程菌株为材料, 研究了温度对脂肪酸合成的影响, 该项研究为开发超长链脂肪酸酵母细胞工厂提供理论和技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

实验所用解脂耶罗维亚酵母出发菌株为 Po1g (*MATa*、*leu2-270*、*ura3-302::URA3*、*xpr2-3*), Yeastern Biotech 公司。构建质粒所用大肠杆菌感受态为 *E. coli* Trans1-T1, 购自北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0。1 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa 蒸汽灭菌 30 min, 固体培养基添加 1.5%的琼脂。氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL。

YPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0。0.67 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa 蒸汽灭菌 30 min, 固体培养基添加 1.5%的琼脂。

YNB 培养基(g/L): 葡萄糖 50.00, 酵母提取物 1.50, 尿嘧啶 0.02, 亮氨酸 0.10, YNB 1.70。0.67 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa 蒸汽灭菌 30 min, 固体培养基添加 1.5%的琼脂。

亮氨酸营养缺陷型培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, Leu Minus Media 8.0, 调节 pH 为 5.5。0.67 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa 蒸汽灭菌 30 min, 固体培养基添加 1.5%的琼脂。

### 1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨、琼脂, 北京 Solarbio 公司; 胰蛋白胨、酵母粉, Oxoid 公司; 氯化钠、葡萄糖, 国药集团化学试剂有限公司; YNB (yeast nitrogen base without amino acids), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 尿嘧啶, 上海源叶生物科技有限公司; 亮氨酸, 上海麦克林生化科技有限公司; 亮氨酸营养缺陷型培养基(Leu minus media), 北京泛基诺科技有限公司。

真菌 DNA 快速提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 质粒快速抽提试剂盒、*EasyTaq* DNA 聚合酶、DNA Marker, 北京全式金生物技术有限公司; PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒, Omega 公司; Gibson assembly, Applied Biological Materials Inc 公司; 限制性内切酶, Thermo Scientific 公司; 高保真 DNA 聚合酶, KAPA Biosystems 公司。

PCR 扩增仪、离心机, Eppendorf 公司; 气相色谱分析仪, Agilent 公司; 电子天平, Sartorius Group 公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 恒温摇床, 上海智诚实验设备有限公司; 紫外分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 氮吹仪, 天津市恒奥科技发展有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱、培养箱, 上海精宏实验有限公司。

#### 1.4 重组菌株的构建

所需的 PCR 扩增引物见表 1, 由青岛擎科梓熙生物技术有限公司合成, 所有质粒采用 Gibson assembly 法构建。根据真菌 DNA 快速提取试剂盒说明书提取解脂耶罗维亚酵母的基因组 DNA, 以解脂耶罗维亚酵母的基因组 DNA 作为模板, 以 DGAT-F/DGAT-R 为引物序列, 采用 KAPA HiFi 高保真 DNA 聚合酶扩增 *DGAT1* 基因片段。基因 *AtFAE1*、*BtFAE1* 和 *CgKCS* 均由无锡青兰生物科技有限公司合成获得, 以合成的基因为模板, 应用表 1 中引物分别扩增 *AtFAE1*、*BtFAE1* 和 *CgKCS* 基因片段。以解脂耶罗维亚酵母的基因组 DNA 作为模板, 以 TEF1-F/TEF1-R 和 XPR2-F/XPR2-R 作为引物序列, PCR 扩增 TEF1 启动子和 XPR2 终止子。所有质粒的构建以 pYLEX1 为基本骨架, PCR 扩增质粒基本骨架片段。根据构建质粒所需的片段长

度(bp)和所测浓度(ng/μL), 按照摩尔数 1:5 的比例混合到 PCR 管中, 同时添加 5 μL Gibson assembly 试剂, 使得总体积为 10 μL, 体系混匀后 50 °C 连接 1–2 h。取 2 μL 装配产物转化大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1, 通过抗性筛选、PCR 扩增、酶切验证获得重组质粒 pYLEX1-*AtFAE1*、pYLEX1-*BtFAE1*、pYLEX1-*CgKCS*、pYLEX1-*AtFAE1*-*BtFAE1*-*CgKCS* 和 pYLEX1-*CgKCS*-*DGAT1*。将得到的重组质粒用 *Not* I 酶切线性化, 采用醋酸锂转化法转化解脂耶罗维亚酵母, 涂布亮氨酸营养缺陷型筛选平板, 筛选阳性克隆<sup>[17]</sup>。PCR 反应体系 (25 μL): 2×高保真 DNA 聚合酶 12.5 μL, 10 μmol/L 上、下游引物各 1.5 μL; 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 98 °C 20 s, 65 °C 15 s, 72 °C 延伸时间按照 2 000 bp/min 计算, 35 个循环; 72 °C 10 min。

#### 1.5 发酵实验

##### 1.5.1 菌种活化及摇瓶发酵

取-80 °C 保存的解脂耶罗维亚酵母菌株 Po1g 和 Po1g-VL 在 YPD 固体培养基上划线, 置于 28 °C 培养箱培养 48 h, 从固体培养基取单克隆接种于 50 mL YPD 液体培养基, 于 28 °C、250 r/min 培养 27 h 作为种子液, 按 3.5%的接种量将种子液接种于 100 mL

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物	引物序列	长度
Primers	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
p-F	AATTCGTCGTCGCTGAGTC	21
p-R	GTCGACCGATGCCCTTGAGAG	21
<i>AtFAE1</i> -F	catagcacgctgtagatacTTAAGATCGGCCGTTCTGCAC	41
<i>AtFAE1</i> -R	gaattaaacacacatcaacaATGACCTCTGTGAACGTGAAG	41
<i>BtFAE1</i> -F	actttttgcagtactaaccgcagACCTCTGTGAACGTGAAGCTG	44
<i>BtFAE1</i> -R	gcaagaccggcaacgtggggTTAAGATCGGCCGTTCTGCAC	41
<i>CgKCS</i> -F	actttttgcagtactaaccgcagACCTCTATCAACGTGAAGCTG	44
<i>CgKCS</i> -R	gcaagaccggcaacgtggggTTAAGATCGGCCGTTTTGGG	40
DGAT-F	actttttgcagtactaaccgcagACTATCGACTCACAATACTAC	44
DGAT-R	gcaagaccggcaacgtggggTTACTCAATCATTCGGAACTC	41
TEF1-F	tctcaaggcatcggtcgacAGAGACCGGGTTGGCGGCGC	40
TEF1-R	CTGCGGTTAGTACTGCAAAAAGTGCTGGTCTG	31
XPR2-F	CCCCACGTTGCCGGTCTTTC	20
XPR2-R	gctgtcaaacatgagaattcGGACACGGGCATCTCACTTGC	41

注: 小写字母代表 Gibson assembly 装配的重叠片段, 大写字母代表扩增引物。

Note: Lower-case letters represent overlapping fragments for Gibson assembly and upper-case letters represent synthesized primers.

(装液量为 1/5) YNB 发酵培养基。分别在 22、25、28、32 °C 的条件下, 以 250 r/min 转速发酵培养。每个条件设置 3 个平行, 并做一次生物学重复。

### 1.5.2 生长曲线的测定

分别于培养 0、5、14、27、74、120、144、168 h 取适量菌液, 于 600 nm 下测量其吸光度值, 以培养时间为横坐标、 $OD_{600}$  值为纵坐标绘制生长曲线。

### 1.5.3 生物量的测定

将发酵液于 12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用蒸馏水洗涤 2 次, 去掉上清, 置于 85 °C 烘箱烘干至恒重, 计算烘干前后两次离心管的质量差得到菌体的干重。

### 1.5.4 油脂的提取

发酵培养结束后, 用 50 mL 离心管收集发酵培养液, 6 000 r/min 高速离心 10 min 收集菌体, 油脂提取方法采用酸热法<sup>[18]</sup>: 1 g 湿菌体加入 4 mol/L 盐酸 10 mL, 振荡混匀, 室温放置 1 h, 沸水浴 8 min, 立即放于 -20 °C 速冷 30 min; 然后加入氯仿-甲醇(1:1, 体积比)充分混合, 4 000 r/min 离心 5 min; 收集下层氯仿层, 加入等体积质量分数为 0.15% 的氯化钠, 4 000 r/min 离心 5 min; 收集氯仿层, 使用氮吹快速除去氯仿得到油脂, 比较前后两次离心管的质量得到油重, 产油量(g/L)以

每升菌液的油重表示, 细胞油脂含量以油重与菌体干重的比率表示。

### 1.5.5 脂肪酸甲酯化

对提取的油脂称重后, 在玻璃管中添加 2.6 mL 甲醇-硫酸溶液(体积比 98:2), 于 85 °C 烘箱反应 3 h, 放入冰箱冷却, 添加 1 mL 饱和氯化钠溶液和 1 mL 正己烷, 振荡混匀后于 4 000 r/min 离心 5 min, 收集上层氯仿层添加到气相色谱小瓶中, 编号进行气相色谱分析<sup>[19]</sup>。

### 1.5.6 气相色谱分析脂肪酸成分

色谱检测条件如下: 色谱柱为 HP-5 (30 m×0.32 mm×0.25 μm); 进样温度: 250 °C; 检测器温度: 250 °C; 进样体积: 1 μL; 起始柱温为 140 °C, 保持 1 min, 以 10 °C/min 升温至 180 °C, 保持 2 min, 以 5 °C/min 升温至 210 °C, 保持 4 min, 以 5 °C/min 升温至 250 °C, 保持 4 min。以面积归一法得到各脂肪酸组分的相对含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 解脂耶罗维亚酵母工程菌的构建

解脂耶罗维亚酵母本身不能合成超长链脂肪酸, 需要表达外源脂肪酸延长酶基因, 构建外源合成途径, 实现超长链脂肪酸的合成(图 1)。选择不

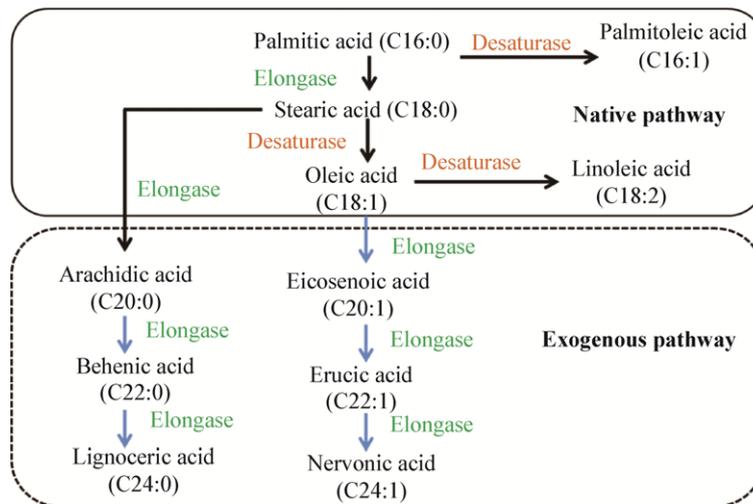


图 1 解脂耶罗维亚酵母合成超长链脂肪酸的代谢途径设计

Figure 1 Design of metabolic pathways for synthesis of very-long-chain fatty acids in *Y. lipolytica*

注: 实线框内为内源途径, 虚线框内为外源途径。

Note: Full line denotes the native pathway. Dotted line denotes the exogenous pathway.

同的脂肪酸延长酶和产油基因构建了重组质粒 pYLEX1-AtFAE1、pYLEX1-BtFAE1、pYLEX1-CgKCS、pYLEX1-AtFAE1-BtFAE1-CgKCS 和 pYLEX1-CgKCS-DGAT1，转化解脂耶罗维亚酵母出发菌株 Po1g，通过诊断 PCR 和序列测定筛选阳性工程菌株，分别命名为 Po1g-AtFAE1、Po1g-BtFAE1、Po1g-CgKCS、

Po1g-AtFAE1-BtFAE1-CgKCS 和 Po1g-VL (表 2)。

## 2.2 工程菌合成超长链脂肪酸

### 2.2.1 单基因表达菌株

测定解脂耶罗维亚酵母 Po1g-AtFAE1、Po1g-BtFAE1 和 Po1g-CgKCS 培养至第 5 天时的脂肪酸组成，结果如图 2 所示。出发菌株 Po1g 主要合成链

表 2 本研究所用菌株和质粒

Table 2 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
Po1g	<i>MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-3</i>	Yeastern
Po1g-AtFAE1	Po1g, pYLEX1-AtFAE1	This work
Po1g-BtFAE1	Po1g, pYLEX1-BtFAE1	This work
Po1g-CgKCS	Po1g, pYLEX1-CgKCS	This work
Po1g-AtFAE1-BtFAE1-CgKCS	Po1g, pYLEX1-AtFAE1-BtFAE1-CgKCS	This work
Po1g-VL	Po1g, pYLEX1-CgKCS-DGAT1	This work
Plasmids		
pYLEX1	pINA1269-Leu	Yeastern
pYLEX1-AtFAE1	pYLEX1, PTEF1-AtFAE1-TXPR2	This work
pYLEX1-BtFAE1	pYLEX1, PTEF1-BtFAE1-TXPR2	This work
pYLEX1-CgKCS	pYLEX1, PTEF1-CgKCS-TXPR2	This work
pYLEX1-AtFAE1-BtFAE1-CgKCS	pYLEX1, PTEF1-AtFAE1-TXPR2, PTEF1-BtFAE1-TXPR2, PTEF1-CgKCS-TXPR2	This work
pYLEX1-CgKCS-DGAT1	pYLEX1, PTEF1-CgKCS-TXPR2, PTEF1-DGAT1-TXPR2	This work

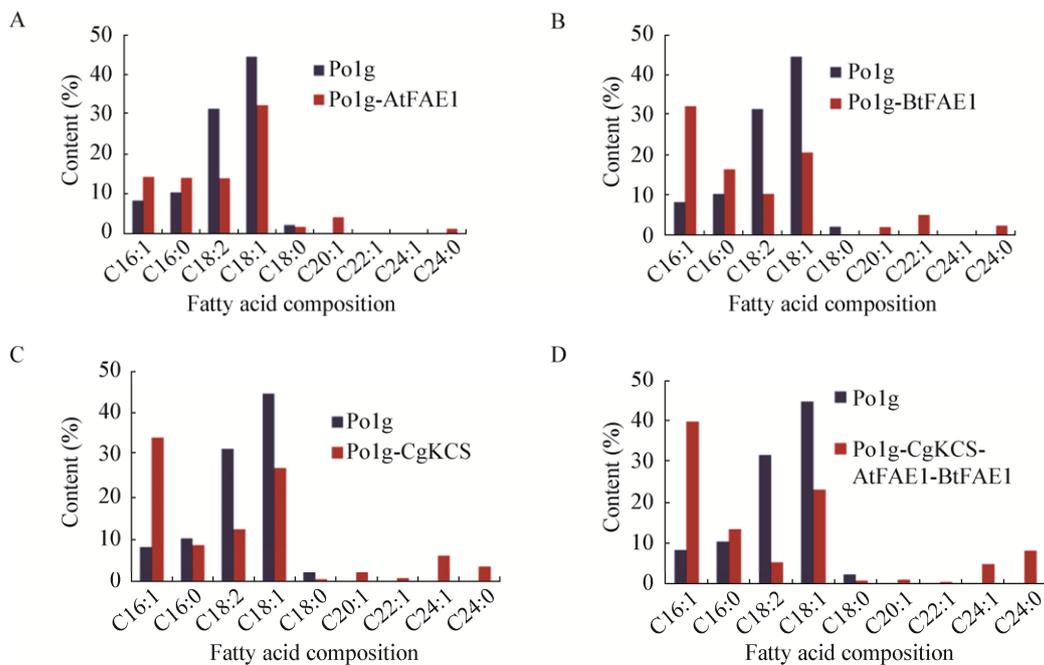


图 2 解脂耶罗维亚酵母工程菌的脂肪酸组成变化

Figure 2 Fatty acid composition in *Y. lipolytica*

Note: A: Po1g-AtFAE1; B: Po1g-BtFAE1; C: Po1g-CgKCS; D: Po1g-AtFAE1-BtFAE1-CgKCS.

长为 C16 和 C18 的脂肪酸,其中 C18:1 为主要组分,含量接近总脂肪酸的一半。而工程菌株 Po1g-AtFAE1 能够合成 C20:1 脂肪酸,占总油脂的 4.4%; Po1g-BtFAE1 能够合成芥酸(C22:1),占总油脂的 5.3%; Po1g-CgKCS 能够合成神经酸(C24:1),占总油脂的 6.4%,并且合成少量 C20:1 和 C22:1。3 种单基因表达菌株的 C16:1 含量均比出发菌株高,而 C18:1 含量均低于出发菌株。

### 2.2.2 多基因共表达菌株

测定 3 基因共表达菌株 Po1g-AtFAE1-BtFAE1-CgKCS 的脂肪酸组成,结果显示神经酸含量占总油脂的 5.1%,比只表达 CgKCS 的含量降低 1.4%, C24:0 含量占总油脂的 8.5%,比只表达 CgKCS 的含量增加了 4.5%。这表明脂肪酸延长酶 AtFAE1、BtFAE1 和 CgKCS 并没有协同延长单不饱和脂肪

酸, CgKCS 基因可直接催化油酸(C18:1)合成神经酸(C24:1)(图 2D)。基于此,在 Po1g-CgKCS 基础上,过表达内源二酯酰甘油酰基转移酶基因 *DGATI* 得到菌株 Po1g-VL,发酵培养 5 d 后测定细胞油脂含量。结果显示,过表达 *DGATI* 基因可以有效提高细胞油脂含量, Po1g、Po1g-CgKCS 和 Po1g-VL 的细胞油脂含量分别为 17%、18% 和 27%,菌株 Po1g-VL 与 Po1g-CgKCS 相比细胞油脂含量提高了 50%,脂肪酸组成也出现一定变化,尤其是 C16:0、C18:2 和 C24:0 (图 3)。

### 2.3 温度对解脂耶罗维亚酵母生长、产油和脂肪酸组成的影响

以工程菌株 Po1g 为研究对象,首先设置了 4 个不同温度 28、31、34、37 °C 开展预实验,结果表明 37 °C 对解脂耶罗维亚酵母生长具有明显胁迫作用(图 4A)。

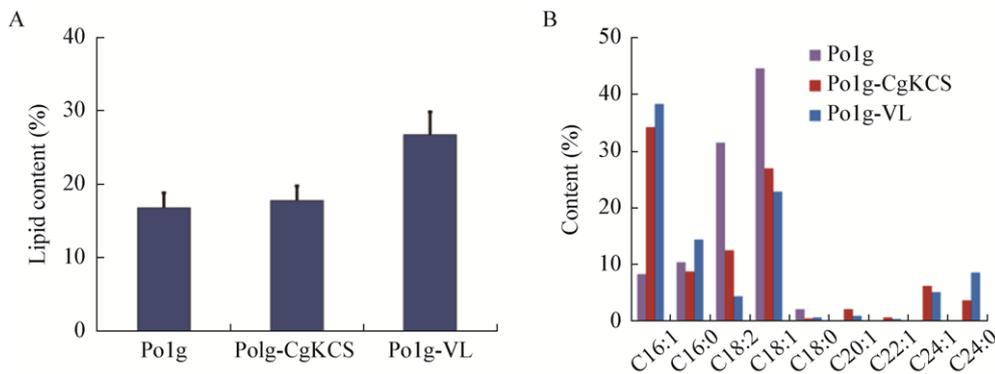


图 3 解脂耶罗维亚酵母高表达 *DGATI* 基因的细胞油脂含量(A)和脂肪酸组成(B)

Figure 3 Lipid content (A) and fatty acid composition (B) in *Y. lipolytica* overexpressing the gene *DGATI*

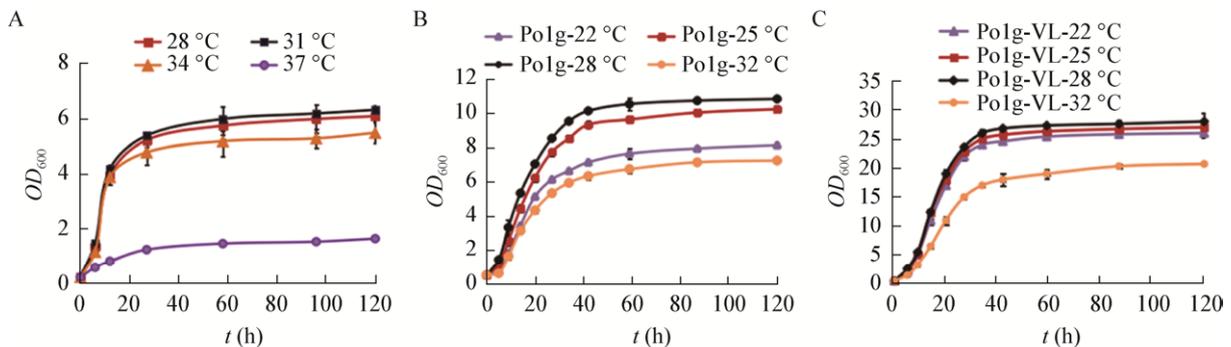


图 4 不同温度下解脂耶罗维亚酵母的生长差异

Figure 4 The growth of *Y. lipolytica* under different temperatures

注: A: 温度预实验结果; B: Po1g 菌株的生长情况; C: Po1g-VL 菌株的生长情况。

Note: A: Preliminary experiment; B: The growth of the strain Po1g; C: The growth of the strain Po1g-VL.

基于这一结果,在低于 37 °C 的范围内设置了 4 个温度 22、25、28、32 °C,研究了温度对解脂耶罗维亚酵母生长、产油以及脂肪酸组成的影响。

### 2.3.1 温度对解脂耶罗维亚酵母生长的影响

出发菌株 Po1g 与工程菌株 Po1g-VL 在 4 种不同温度下培养 5 d 的生长情况如图 4B 和 4C 所示。随温度变化,两株菌呈现了相同的生长趋势,都是在 28 °C 条件下生长最快且稳定期的生物量最大,其次为 25、22、32 °C。不同的是, Po1g-VL 菌株在所有温度条件下的生物量明显大于出发菌株 Po1g,在 28 °C 培养条件下 Po1g-VL 的  $OD_{600}$  最高为 28.0,而 Po1g 仅为 10.8,可能原因是工程菌株 Po1g-VL 回补了营养缺陷型基因 *Leu*,并高表达了产油基因 *DGAT1*。

### 2.3.2 温度对解脂耶罗维亚酵母产油的影响

出发菌株 Po1g 与工程菌株 Po1g-VL 在 4 种不同温度下培养 5 d 后的细胞油脂含量和产油量如图 5 所示。Po1g 和 Po1g-VL 的细胞油脂含量均随着温度升高而降低,22 °C 条件下最大,分别为 23.2% 和 33.2%,与 Po1g 相比, Po1g-VL 的细胞油脂含量提高了 43%,表明 *DGAT1* 基因的有效表达促进了细胞油脂的合成。Po1g 和 Po1g-VL 的油脂产量

也是在 22 °C 培养条件下最大,分别为 0.9 g/L 和 2.3 g/L。可见,在本研究测试范围内最适产油温度(22 °C)不同于最适生长温度(28 °C)。

### 2.3.3 温度对解脂耶罗维亚酵母脂肪酸组成的影响

应用气相色谱测定了不同培养温度下工程菌株 Po1g-VL 和出发菌株 Po1g 的脂肪酸组成(图 6)。随着温度的改变,两株菌在总饱和脂肪酸和总不饱和脂肪酸上表现了一致趋势,都是随温度升高饱和脂肪酸含量增加而不饱和脂肪酸含量降低,其中工程菌株 Po1g-VL 在 22 °C 总不饱和脂肪酸含量达到 72.2% (图 6A 和 6B)。在单一脂肪酸组分含量上,两株菌既表现了一致趋势,也有相反的结果。

出发菌株 Po1g 主要合成链长为 C16 和 C18 脂肪酸,其中油酸(C18:1) 含量最高,占总脂肪酸的 50% 以上。在各组分中,软脂酸(C16:0)和亚油酸(C18:2)随温度变化表现出明显的含量变化,其中软脂酸含量随温度升高而明显升高,由 22 °C 条件下的 6.8% 升至 32 °C 条件下的 12.5%,接近 1 倍;亚油酸的含量随温度升高明显下降,由 22 °C 条件下的 23.5% 降至 32 °C 条件下的 13.9% (图 6C)。

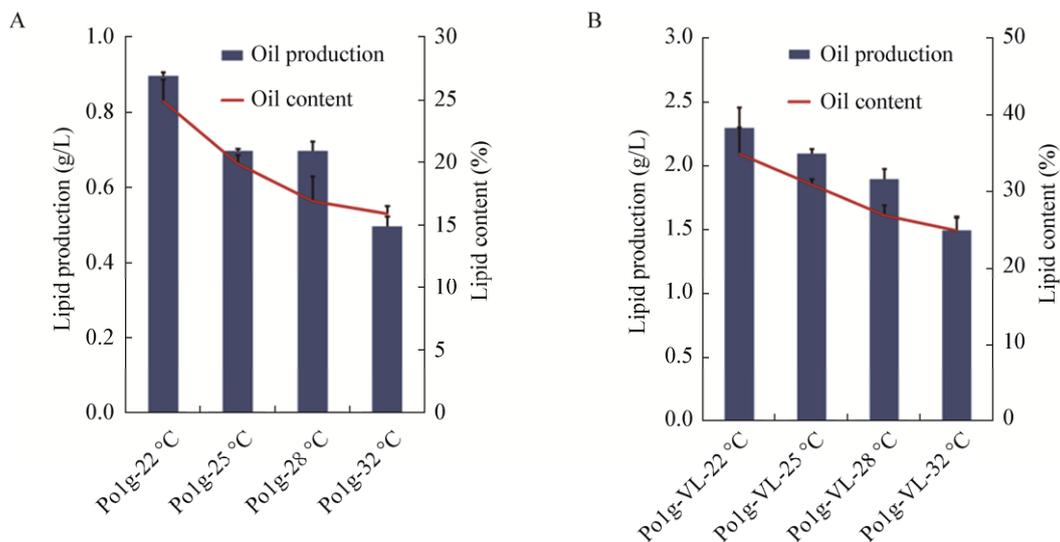


图 5 不同温度下 Po1g (A)与 Po1g-VL (B)油脂产量和细胞油脂含量的变化

Figure 5 The lipid production and lipid content of Po1g (A) and Po1g-VL (B) under different temperatures

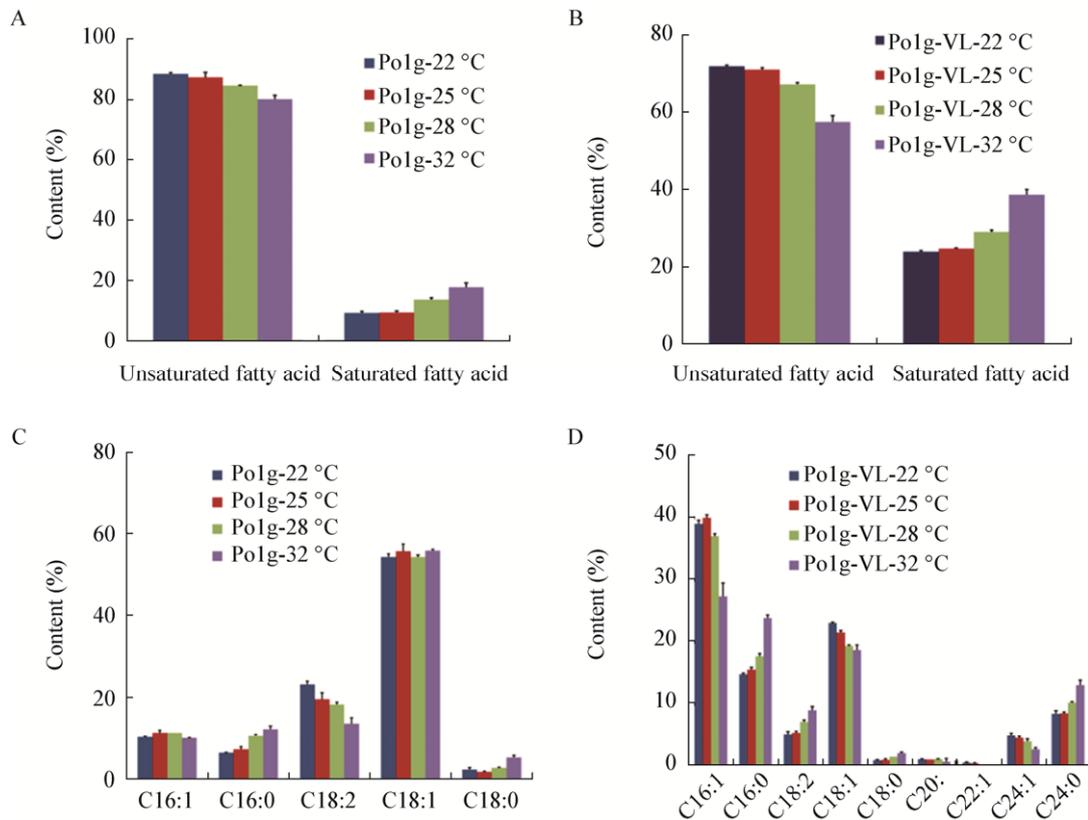


图 6 不同温度下 Po1g 与 Po1g-VL 的脂肪酸变化

Figure 6 The fatty acid change of Po1g and Po1g-VL under different temperatures

注: A: Po1g 的总饱和脂肪酸与总不饱和脂肪酸; B: Po1g-VL 的总饱和脂肪酸与总不饱和脂肪酸; C: Po1g 的脂肪酸组成; D: Po1g-VL 的脂肪酸组成。

Note: A: The total saturated and unsaturated fatty acid content of Po1g; B: The total saturated and unsaturated fatty acid content of Po1g-VL; C: The fatty acid composition of Po1g; D: The fatty acid composition of Po1g-VL.

工程菌株 Po1g-VL 除了合成 C16 和 C18 脂肪酸, 还合成了 C24 脂肪酸, 并且合成少量 C20 和 C22 链长的脂肪酸。各脂肪酸组分在 22 °C 和 32 °C 条件下展现了明显的差异, 其中饱和脂肪酸组分软脂酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)和木焦油酸(C24:0)在 32 °C 下比 22 °C 含量提高 52% 至 110%, 单不饱和脂肪酸棕榈油酸(C16:1)、油酸和神经酸在 32 °C 下比 22 °C 含量降低 19% 至 45%。值得关注的是 Po1g-VL 菌株的亚油酸含量随温度升高而升高, 22、25、28、32 °C 下分别为 5.1%、5.3%、7.1%、9%, 这种趋势与出发菌株 Po1g 相反(图 6D)。

### 3 讨论与结论

随着油脂类可再生能源产品和功能食品需求

的增长, 解脂耶罗维亚产油酵母被广泛用于长链脂肪酸和油脂的开发研究, 但是应用该酵母合成超长链脂肪酸仍待研究。虽然超长链脂肪酸在医药、大健康、化工等领域具有重要应用价值, 目前还缺乏相关产品的微生物细胞工厂。在超长链脂肪酸的合成中, 脂肪酸延长酶尤为关键。本文通过研究不同来源的脂肪酸延长酶在解脂耶罗维亚酵母的表达, 发现延长酶 CgKCS 可催化合成神经酸(C24:1), BtFAE1 可催化合成芥酸(C22:1), AtFAE1 可催化合成 C20:1 脂肪酸。但是, 共表达这 3 个酶未能提高神经酸产量, 这表明 CgKCS 可直接催化 C18:1 脂肪酸合成 C24:1 脂肪酸, 而 C20:1 脂肪酸和芥酸含量较少, 可能为中间产物。3 个酶共用底物油酰基

辅酶 A (C18:1), 并与酯化酶和去饱和酶竞争该底物, 底物竞争可能是 3 个酶共表达仅明显检测到神经酸的主要原因。该发现也暗示, 虽然在酵母中脂肪酸延长是通过丙二酰辅酶 A 脱羧每次添加一个二碳单元, 但在应用代谢工程构建超长链脂肪酸菌株时, 目标产物的获得并不一定遵循逐一增加二碳单元的思路。

微生物产油通常需要胁迫诱导, 培养和发酵条件对油脂和脂肪酸组成往往具有重要影响。本文通过研究温度对解脂耶罗维亚酵母产油的影响, 发现低温有利于不饱和脂肪酸合成, 而高温有利于饱和脂肪酸合成。类似的趋势也在其它微生物中有所报道, 如: 米曲霉合成油脂<sup>[20]</sup>, 红冬孢酵母合成多不饱和脂肪酸<sup>[21]</sup>, 三角褐指藻和微拟球藻合成饱和脂肪酸<sup>[22]</sup>。微生物的脂肪酸组成影响膜流动性, 细胞膜脂中饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的平衡是影响膜流动性的重要生物物理因素。在低温条件下, 通常微生物细胞通过增加不饱和脂肪酸合成, 以降低脂质双分子层中饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例, 实现低温适应<sup>[23-24]</sup>。值得指出的是, 本研究发​​现工程菌株 Po1g-VL 的亚油酸含量随温度升高而升高(图 6D), 不符合低温有利于不饱和脂肪酸合成的规律, 这可能与工程菌中亚油酸的底物浓度及去饱和酶的活性有关。

综上, 本研究表明, 可以通过表达不同的脂肪酸延长酶实现解脂耶罗维亚酵母合成芥酸、神经酸等超长链脂肪酸, 而且低温有利于解脂耶罗维亚酵母合成不饱和脂肪酸, 高温利于其合成饱和脂肪酸。本研究为构建超长链脂肪酸细胞工厂以及发酵优化提供理论和技术参考。

## REFERENCES

- [1] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2002, 51: 1-52
- [2] Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise 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
- [3] Xu P, Qiao KJ, Ahn WS, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(39): 10848-10853
- [4] Xie DM, Miller E, Sharpe P, et al. Omega-3 production by fermentation of *Yarrowia lipolytica*: from fed-batch to continuous[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 798-812
- [5] Qiao KJ, Wasylenko TM, Zhou K, et al. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(2): 173-177
- [6] Saravanan P, Davidson NC, Schmidt EB, et al. Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids[J]. *Lancet*, 2010, 376(9740): 540-550
- [7] Li WZ, Wang L. Research progress on genetic engineering for long-chain polyunsaturated fatty acids EPA and DHA[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(8): 1-7 (in Chinese)  
李文宗, 王磊. 长链多不饱和脂肪酸 EPA、DHA 的基因工程研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 1-7
- [8] de Vries GJ, Mocking R, Lok A, et al. Fatty acid concentrations in patients with posttraumatic stress disorder compared to healthy controls[J]. *Journal of Affective Disorders*, 2016, 205: 351-359
- [9] Assies J, Pouwer F, Lok A, et al. Plasma and erythrocyte fatty acid patterns in patients with recurrent depression: a matched case-control study[J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10635
- [10] Tanaka K, Shimizu T, Ohtsuka Y, et al. Early dietary treatments with Lorenzo's oil and docosahexaenoic acid for neurological development in a case with Zellweger syndrome[J]. *Brain and Development*, 2007, 29(9): 586-589
- [11] Trenkamp S, Martin W, Tietjen K. Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(32): 11903-11908
- [12] Sun XQ, Pang H, Li MM, et al. Evolutionary pattern of the *FAEI* gene in *Brassicaceae* and its correlation with the erucic acid trait[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83535
- [13] Pang H, Li Y, Li MM, et al. Cloning and function verification of *FAEI* gene in some species of *Brassicaceae*[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2013, 22(1): 8-13 (in Chinese)  
庞慧, 李莹, 李密密, 等. 十字花科植物 *FAEI* 基因的克隆与功能验证[J]. *植物资源与环境学报*, 2013, 22(1): 8-13
- [14] Taylor DC, Francis T, Guo YM, et al. Molecular cloning and characterization of a *KCS* gene from *Cardamine graeca* and its heterologous expression in *Brassica* oilseeds to engineer high nervonic acid oils for potential medical and industrial use[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(9): 925-938

- [15] Czabany T, Athenstaedt K, Daum G. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2007, 1771(3): 299-309
- [16] Timoumi A, Guillouet SE, Molina-Jouve C, et al. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(9): 3831-3848
- [17] Chen DC, Beckerich JM, Gaillardin C. One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 48(2): 232-235
- [18] Xiao AF, Jiang XL, Ni H, et al. Study on the relationship between intracellular metabolites and astaxanthin accumulation during *Phaffia rhodozyma* fermentation[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2015, 18(3): 148-153
- [19] Tian DY. Cloning of KCS genes from microalgae and *Malania oleifera*, and the preliminary exploration of producing nervonic acid by *Yarrowia lipolytica*[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University of Science & Technology, 2015 (in Chinese)  
田德雨. 微藻和蒜头果来源 3-酮脂酰-CoA 合酶基因克隆及耶鲁维亚酵母(*Yarrowia lipolytica*)产神经酸的初步研究[D]. 青岛: 青岛科技大学硕士学位论文, 2015
- [20] Miranti A, Arbianti R, Utami TS. Effect of pH, temperature and medium agitation rate in production of AA, DHA, EPA from *Aspergillus oryzae* with submerged fermentation[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2018, 105: 012113
- [21] He SW, Yang ZJ, Lin LB, et al. Correlation of polyunsaturated fatty acids and the cold adaptation of *Rhodospiridium kratochvilovae*[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2014, 36(4): 594-599 (in Chinese)  
何仕武, 杨昭杰, 林连兵, 等. 多不饱和脂肪酸与红冬孢酵母低温适应性的关系研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2014, 36(4): 594-599
- [22] Zhao T, Han XT, Zhan TR, et al. Effect of temperature on growth and lipid properties of four oil-producing microalgae[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(6): 1140-1148 (in Chinese)  
赵婷, 韩笑天, 詹天荣, 等. 温度对四种产油微藻生长和油脂特性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(6): 1140-1148
- [23] Chintalapati S, Kiran MD, Shivaji S. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation[J]. *Cellular and Molecular Biology*, 2004, 50(5): 631-642
- [24] Zhang Q, Wang Z, He SW, et al. Effects of polyunsaturated fatty acids on the cold adaptation of microorganisms[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012, 24(1): 58-62 (in Chinese)  
张琦, 王志, 何仕武, 等. 多不饱和脂肪酸对微生物低温适应性的影响[J]. 生命科学, 2012, 24(1): 58-62