

研究报告

毕赤酵母中外源表达脂肪酰-CoA 还原酶生产脂肪醇

陆健开¹ 刘毅¹ 郭道义¹ 邓子新^{1,2} 刘天罡^{1,2*}

(1. 武汉大学药学院 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室 湖北 武汉 430071)

(2. 湖北省合成微生物技术工程实验室 武汉生物技术研究院 湖北 武汉 430075)

摘要:【目的】通过在毕赤酵母 *Komagataella pastoris* GS115 中外源表达来源于霍霍巴 [*Simmondsia chinensis* (Jojoba)] 的脂肪酰-CoA 还原酶 Jojoba FAR, 利用微生物发酵生产脂肪醇。

【方法】以质粒 pRL105 为模板 PCR 扩增获得霍霍巴脂肪酰-CoA 还原酶的编码基因, 以 pGAPZαA 为载体构建重组表达质粒 pGAP-far, 并通过电转化法转入 *K. pastoris* GS115, 筛选转化子并发酵, 气相色谱-质谱联用检测发酵产物。【结果】构建了毕赤酵母重组菌株 pGAPZ-far-GS115, 通过摇瓶发酵检测到脂肪醇的合成。随后在 7 L 规模的发酵罐上发酵验证, 得到脂肪醇产量为 134.74 mg/L, 产率为 1.22 mg/(L·h)。【结论】实现了脂肪醇在毕赤酵母中的生物合成, 为工业上利用毕赤酵母生产脂肪醇奠定了一定基础。

关键词: 脂肪酰-CoA 还原酶, 毕赤酵母, 生物发酵, 脂肪醇

Production of fatty alcohol in *Komagataella pastoris* by heterologous expression of fatty acyl-CoA reductase

LU Jian-Kai¹ LIU Yi¹ GUO Dao-Yi¹ DENG Zi-Xin^{1,2} LIU Tian-Gang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, Wuhan University, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China)

(2. Hubei Engineering Laboratory for Synthetic Microbiology, Wuhan Institute of Biotechnology, Wuhan, Hubei 430075, China)

Abstract: [Objective] We selected *Simmondsia chinensis* (Jojoba) fatty acyl-CoA reductase Jojoba FAR for heterologous expression in *Komagataella pastoris* strain GS115 to produce fatty alcohol by fermentation. [Methods] Gene encoding this fatty acyl-CoA reductase was amplified from plasmid pRL105 and cloned into the plasmid pGAPZαA; the recombinant expression plasmid was transformed into *K. pastoris* GS115 by electrotransformation. We detected fatty alcohol from positive transformant by GC-MS. [Results] We constructed a recombinant *K. pastoris* GS115 strain pGAPZ-far-GS115 that produced fatty alcohols in flask fermentation. Afterwards, a fed-batch fermentation was used for further

Foundation item: National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA02A701); National Natural Science Foundation of China (No. 31222002, 31170096)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-27-68755086; E-mail: liutg@whu.edu.cn

Received: May 10, 2015; Accepted: June 23, 2015; Published online (www.cnki.net): March 18, 2016

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2012AA02A701); 国家自然科学基金项目(No. 31222002, 31170096)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-27-68755086; E-mail: liutg@whu.edu.cn

收稿日期: 2015-05-10; 接受日期: 2015-06-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-18

verification. And the engineered strain produced 134.74 mg/L fatty alcohols with a productivity of 1.22 mg/(L·h). **[Conclusion]** Our findings prove the possibility to produce fatty alcohol in *K. pastoris* GS115, provide the potential for industrial production of fatty alcohol by *K. pastoris*.

Keywords: Fatty acyl-CoA reductase, *Komagataella pastoris*, Fermentation, Fatty alcohol

脂肪醇为具有 C8–C22 链长的脂肪族的醇类,是合成表面活性剂、洗涤剂、增塑剂及其他精细化学用品的常用工业原料,被广泛应用于日化、造纸、医药、食品等行业^[1-2],并且具有一定的作为新型燃料的潜力^[3-6]。目前脂肪醇的工业生产主要以棕榈酸仁油、椰子油等天然来源的动植物油脂类化合物及石化来源的烯烃类化合物为原料合成,但这种生产方式使得脂肪醇的产量受到原料、设备、成本和安全生产等方面的制约^[7]。

微生物生物合成脂肪醇是一种新型绿色环保的生产方式,具有原料来源便宜、合成工艺简便、环境污染少等优势^[5-6]。在微生物体内主要有 3 条脂肪醇合成途径(图 1A,以大肠杆菌为例):以脂酰-ACP 为底物合成脂肪醇, Liu 等在大肠杆菌内表达来源于细长聚球藻(*Synechococcus elongates*)的 *aar* 基因,脂肪醇产量达到 0.75 g/L^[8];以自由脂肪酸为底物合成脂肪醇, Cao 等利用来源于水稻(*Oryza sativa*)的 DOX 合成奇数碳链的脂肪醇,其产量为 1.95 g/L^[9];以及以脂酰-CoA 为底物合成脂肪醇, Liu 等利用来源于 *Marinobacter aquaeolei* VT8 的 Maqu-2220 合成脂肪醇,产量为 1.725 g/L^[10]。目前生物合成脂肪醇主要以大肠杆菌和酿酒酵母为工程菌株,在大肠杆菌内最高产量可达 1.95 g/L^[9],在酿酒酵母中也达到了 1.1 g/L^[11],但是在其他微生物表达系统中生物合成脂肪醇鲜有报道^[12-13]。相对于大肠杆菌和酿酒酵母,以毕赤酵母作为宿主具有独特的优异性:(1) 其发酵过程不易污染;(2) 外源基因在宿主体内以染色体整合形式存在,遗传稳定性高;(3) 培养条件简单,菌体生物量大;(4) 具有较强的耐酸性(pH 3.0–7.0),适合工业大规模连续发酵^[14-15]。

毕赤酵母体内合成的脂肪酸以 C16、C18 链长为主,且主要以脂酰-CoA 的形式存在^[16-17]。

2000 年, Metz 纯化了来源于霍霍巴 [*Simmondsia chinensis* (Jojoba)] 的脂酰-CoA 还原酶 Jojoba FAR,发现该酶主要偏好较长碳链的底物^[18]。随后, Tan 等在蓝细菌中异源表达了 Jojoba FAR 及来源于鼠、拟南芥等的脂酰-CoA 还原酶,发现表达 Jojoba FAR 能够合成脂肪醇,并且主要以 C16 和 C18 链长的脂肪醇为主^[19]。本文首次在毕赤酵母中外源表达 Jojoba FAR,构建的工程菌株成功合成以 C18 链长为主的脂肪醇,为工业生物合成专一性链长的脂肪醇提供了新途径(图 1B)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Escherichia coli* XL1-blue、*Komagataella pastoris* GS115 菌株为本实验室保藏。载体 pGAPZαA 购自美国 Invitrogen 公司。

1.1.2 基因与相关引物合成: 研究中所使用的 *Jojoba FAR* 基因由南京金斯瑞科技有限公司合成,原始序列信息来源于 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。基因序列按照酵母密码子优化,优化后的序列为:
ATGGAAGAAATGGGTTCAATCTTGAATTTT
GGATAATAAGGCTATCTTGTTACCGGTGCCAC
TGGTTCCTTGCTAAGATTTTTGTTGAAAAGGT
ATTGAGAAGTCAACCTAACGTTAAAAAGTTGT
ATTTGTTGTTGAGAGCTACAGATGACGAAACC
GCTGCATTGAGATTGCAAAACGAAGTTTTCGG
TAAAGAATTGTTTAAAGTATTGAAGCAAATTT
GGGTGCAAACCTTTTACTCTTTCGTCTCAGAAA
AGGTTACAGTTGTTCCAGGTGACATTACCGGT
GAAGACTTGTGTTTGAAGGATGTTAATTTGAA
GGAAGAAATGTGGAGAGAAATAGATGTCGTTG
TAACTTAGCCGCTACAATTAATTTTCATCGAAA
GATACGACGTCTCATTGTTGATTAACACCTACG
GTGCTAAGTACGTTTTGGATTTTCGCTAAGAAAT
GCAATAAGTTGAAGATATTTGTACATGTCTCTA
CTGCTTACGTTTCAGGTGAAAAGAATGGTTTG

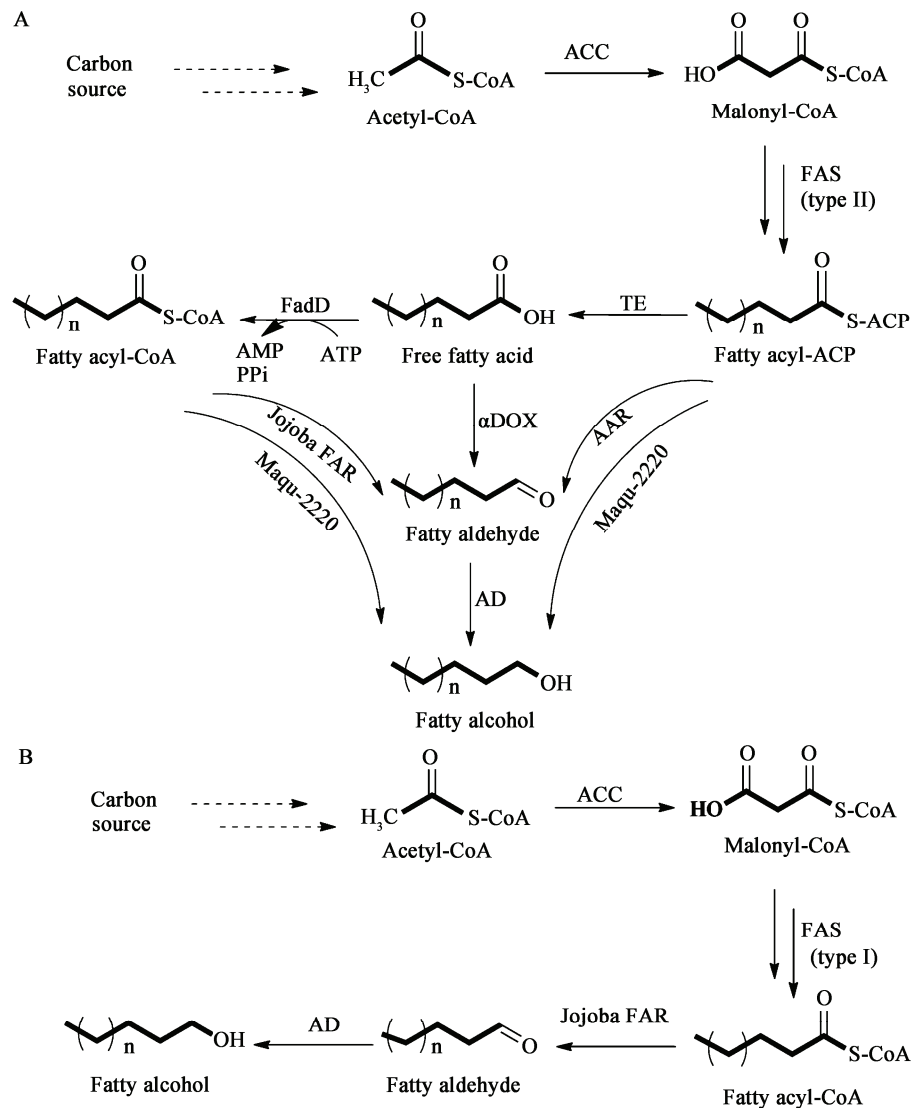


图 1 脂肪醇的生物合成途径

Figure 1 The biosynthesis pathways of fatty alcohol

注: A: 大肠杆菌; B: 毕赤酵母. ACC: 乙酰辅酶 A 羧化酶; FAS: 脂肪酸合酶; TE: 硫酯酶; FadD: 脂酰辅酶 A 合成酶; AD: 乙醇脱氢酶.

Note: A: *E. coli*; B: *K. pastoris*. ACC: Acetyl-CoA carboxylase; FAS: Fatty acid synthase; TE: Thioesterase; FadD: Fatty acyl-CoA synthetase; AD: Alcohol dehydrogenase.

ATCTTAGAAAAGCCTTATTACATGGGTGAATCT
TTGAACGGTAGATTGGGTTTGGATATAAACGTA
GAAAAGAAATTGGTTGAAGCAAAGATTAATGA
ATTGCAAGCAGCCGGTGCCACTGAAAAATCCA
TTAAGAGTACAATGAAGGATATGGGTATAGAA
AGAGCTAGACACTGGGGTTGGCCAAACGTTTA
CGTTTTTACTAAGGCATTGGGTGAAATGTTGTT
GATGCAATACAAGGGTGACATTCCTTTGACTAT
AATCAGACCAACAATCATAACTTCCACATTCA

AAGAACCATTTCCTGGTTGGGTGCGAAGGTGTT
AGAACAATTGATAACGTCCCTGTTTATTACGGT
AAAGGTAGATTGAGATGTATGTTATGCGGTCCT
TCTACCATAATCGACTTAATCCCAGCTGATATG
GTCGTTAACGCTACTATTGTAGCAATGGTCGCA
CATGCCAATCAAAGATATGTTGAACCAGTAAC
CTACCACGTTGGTTCTTCAGCTGCAAATCCTAT
GAAATTATCTGCATTGCCAGAAATGGCCCATAG
ATACTTCACAAAGAATCCATGGATAAACCCCTGA

TAGAAATCCAGTACATGTCGGTAGAGCCATGG
TATTTTCCAGTTTCTCAACCTTCCACTTGTATTT
GACTTTGAACTTTTTATTGCCATTGAAGGTTTT
GGAAATCGCAAACACTATTTTCTGTCAATGGTT
CAAGGGTAAATACATGGACTTGAAGAGAAAG
ACAAGATTGTTGTTGAGATTGGTTGATATCTAT
AAACCTTACTTATTTTTCCAAGGTATCTTCGAT
GACATGAACACAGAAAAGTTGAGAATAGCCG
CTAAGGAATCTATCGTTGAAGCCGACATGTTTT
ATTTTCGATCCAAGAGCTATTAATTGGGAAGACT
ACTTTTTGAAGACTCATTTTCCTGGTGTCTGTTG
AACATGTATTGAACTAA。合成基因 *Jojoba FAR*
通过 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点插入到载体 pYES2
上,得到质粒 pRL105^[20]。实验中使用的引物均由
Primer 5 软件设计,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.1.3 主要试剂和仪器: Phusion DNA polymerase
和 DNA 限制性内切酶,美国 New England Biolabs
公司;PCR 产物纯化试剂盒、胶回收产物纯化试剂
盒和质粒小量提取试剂盒,美国 Axygen Scientific
公司;T4 DNA ligase,立陶宛 Fermentas 公司;*Taq*
DNA polymerase,日本 TaKaRa 公司;抗生素 Zeocin,
美国 Life Technologies 公司;脂肪醇标品,美国
Sigma-aldrich 公司和梯希爱(上海)化成工业发展有
限公司;色谱级有机试剂,美国 Thermo Fisher
Scientific 公司;其余分析纯化学试剂,国药集团化
学试剂有限公司。

气相色谱-质谱联用仪(Thermo Scientific TSQ
Quantum XLS Triple Quadrupole GC-MS/MS)和色
谱柱 TR-WaxMS (30 m×0.25 mm×0.25 μm)均购自美国
Thermo Fisher Scientific 公司;KRH-BIO300 型发
酵罐控制系统,江苏科海生物工程设备有限公司。

1.1.4 培养基: (1) LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10,
酵母提取物 5, NaCl 5; 固体培养基另加琼脂粉 15。
LB 培养基用于重组大肠杆菌的培养。(2) YEPD 培
养基(g/L): 酵母提取物 10, 胰蛋白胨 20, 葡萄糖
20。YEPD 培养基用于毕赤酵母的培养。(3) BSA
基础培养基(g/L): 甘油 40.00, K₂SO₄ 18.20,
MgSO₄·7H₂O 14.90, KOH 4.13, CaSO₄·2H₂O 0.93,

生物素 0.87, 组氨酸 2.00, 同时加 H₃PO₄ (85%)
26.70 mL/L, 微量盐溶液 4.35 mL/L, 用氨水调节
pH 至 5.0; 其中微量金属溶液(g/L)中含: FeSO₄·7H₂O
65.00, ZnSO₄·7H₂O 42.19, CuSO₄·5H₂O 6.00,
MnSO₄·H₂O 3.00, CoCl₂·6H₂O 0.50, Na₂MoO₄·2H₂O
0.20, KI 0.08, H₃BO₃ 0.02。

1.2 实验方法

1.2.1 重组表达载体的构建: 根据脂肪酰-CoA 还
原酶基因序列设计上下游引物: FAR-F:
5'-CGATTCGAAATGGAAGAAATGGGTTCATC
TTG-3' (下划线为 *Sfu* I 酶切位点); FAR-R:
5'-GCAGAATTCTTAGTTCAATACATGTTCAACG
ACACC-3' (下划线为 *Eco*R I 酶切位点)。以质粒
pRL105 为模板, PCR 扩增 *Jojoba FAR* 基因。PCR
反应体系(20 μL)为: 5×HF buffer 4.0 μL, 引物
(10 μmol/L)各 1.0 μL, 模板(约 10 mg/L) 1.0 μL,
dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μL, Phusion DNA
polymerase 0.2 μL, 双蒸水为 12.4 μL。PCR 反应条
件为: 98 °C 30 s; 98 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C
60 s, 30 个循环; 72 °C 8 min。凝胶电泳确认扩增
产物后,用 Axygen 公司的 PCR 产物纯化试剂盒纯
化 PCR 产物,随后经限制性内切酶 *Sfu* I 和 *Eco*R I
双酶切,并胶回收纯化。载体质粒 pGAPZαA 上含
有一段胞外分泌信号,位于 *Sfu* I 和 *Eco*R I 酶切位
点之间,因此载体质粒用 *Sfu* I 和 *Eco*R I 双酶切,
以删除载体上原有的胞外分泌信号。胶回收和纯化
载体片段。*Jojoba FAR* 基因与载体片段在 16 °C 酶
连反应 3 h,酶连产物直接转化至 XL1-blue 感受态
细胞,在 30 °C 培养箱中静置复苏 1–2 h,复苏培养
物涂布于 25 mg/L Zeocin 抗性平板上。挑取转化子
扩大培养,随后取 2 mL 菌液提取质粒,凝胶电泳
及酶切验证。挑取酶切验证正确的质粒,进一步送
测序公司测序验证,获得正确的重组表达载体命名
为 pGAP-*far*。

1.2.2 重组菌株构建: 载体 pGAP-*far* 经限制性内
切酶 *Avr* II 酶切后,回收线性化的 DNA 片段约 5 μg,
溶于 10 μL 纯水中。按照 Invitrogen 公司毕赤酵母

操作手册制备毕赤酵母感受态细胞。然后将 10 μ L 线性化的载体加入制备好的感受态细胞中, 冰上放置 10 min 后, 1 500 V、5 ms 电击一次, 加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液。30 $^{\circ}$ C 静置复苏培养 1–2 h 后, 涂布于含有 120 mg/L Zeocin 抗性的 YPD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3–6 d。转化子经 PCR 验证, 正确的重组菌株命名为 pGAPZ-*far*-GS115。同时将空载体 pGAPZ α A 线性化后电转化毕赤酵母 GS115, 构建对照重组菌株 pGAPZ-GS115。

1.2.3 摇瓶发酵实验: 分别挑取重组菌株 pGAPZ-*far*-GS115 和对照菌株 pGAPZ-GS115 的单克隆接种于 5 mL YPD 中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜。然后以 1% 的接种量转接至 100 mL YPD 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 发酵培养 32 h 后收集培养物。

1.2.4 脂肪醇的提取及检测: 取 5 mL 发酵培养液, 加入 0.2 g 玻璃珠, 同时加入 C15 脂肪醇标准品作为内标, 剧烈涡旋振荡 5 min 以破碎酵母细胞, 随后加入 15 mL 乙酸乙酯, 剧烈振荡 15 min, 静置分层后取上层有机相转移至小圆底烧瓶中, 旋转蒸干, 最

后溶于 500 μ L HPLC 级的正己烷中。气相色谱-质谱联用(GC-MS)检测发酵产物。为了确认目标产物的具体链长, 用正己烷作为溶剂配制 20 mg/L 的 C12、C14、C15、C16、C18、C20 的直链脂肪醇混标, 同样 GC-MS 检测。色谱条件如下: 50 $^{\circ}$ C 保持 2 min 后, 以 10 $^{\circ}$ C/min 速度上升至 240 $^{\circ}$ C, 保持 10 min。

1.2.5 发酵培养条件: 挑取重组菌株 pGAPZ-*far*-GS115, 接种于 5 mL 液体 YPD 培养基中 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜。然后以 1% 的接种量转接到 200 mL 的 YPD 培养基中 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 16–24 h, OD_{600} 值达到 15 时, 将 200 mL 种子培养液全部接种到装有 2 L BSA 基础培养基的 7 L 发酵罐中。通过补加氨水或者磷酸控制 pH 值为 5.0, 并通过控制发酵罐搅拌转速(200–1 000 r/min), 维持溶氧量 >20%。当发酵罐内甘油消耗殆尽, 溶氧显著回升时, 流加补料培养基 100 mL。补料培养基成分为: 甘油 500.0 g/L, 生物素 2.4 mg/L, 微量盐溶液 12.0 mL/L^[21–22]。接种培养 14 h 后按时间点取样。取 1 mL 发酵液稀释至合适倍数测量 OD_{600} , 取 1 mL 发

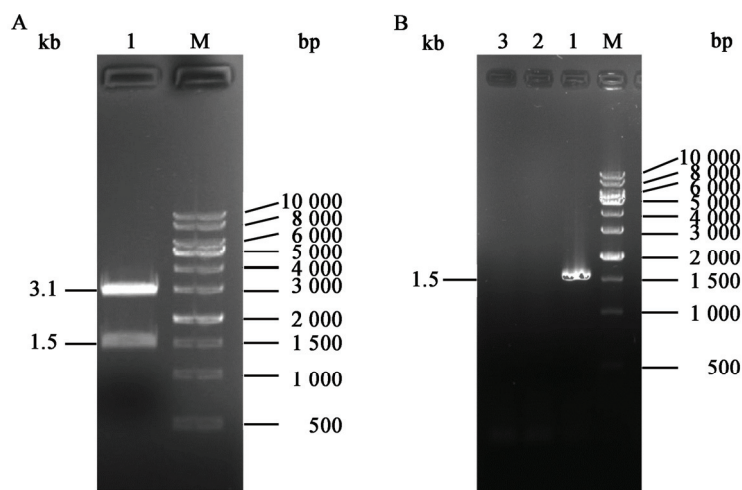


图 2 pGAP-*far* 酶切验证电泳图(A)及重组菌株 PCR 验证电泳图(B)

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of digesting recombinant vector with restriction enzyme (A) and verification of recombinant strain by PCR (B)

注: M: 1 kb DNA marker; A: 1: 限制性内切酶 *Sfu*I 和 *Eco*R I 对 pGAP-*far* 酶切验证片段, *far* 基因 1.5 kb; B: 1: pGAPZ-*far*-GS115 的 PCR 扩增片段; 2: pGAPZ-GS115 的 PCR 扩增(阴性对照); 3: GS115 的 PCR 扩增产物(阴性对照)。

Note: M: 1 kb DNA marker; A: 1: *Sfu*I and *Eco*R I digested products of pGAP-*far* (gene *far*: 1.5 kb); B: 1: PCR products of pGAPZ-*far*-GS115; 2: PCR products of pGAPZ-GS115 (negative control); 3: PCR products of GS115 (negative control).

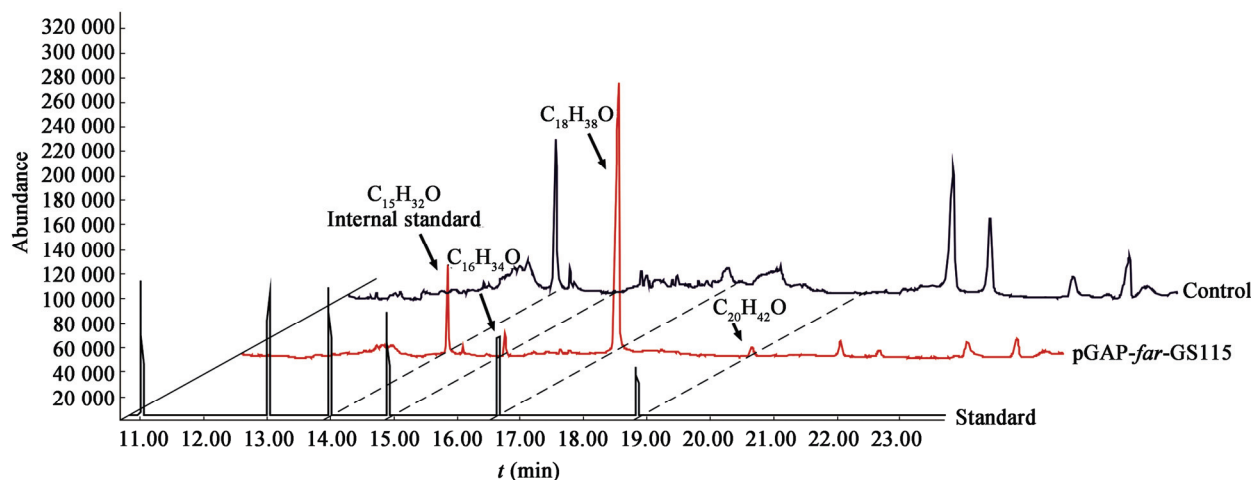


图3 发酵产物的 GC-MS 分析

Figure 3 GC-MS analysis of the fermentation production

酵液在转速 14 000 r/min 条件下离心 10 min 后弃去上清,并用无菌水重悬洗涤菌体、烘干后称量菌体重量,取 5 mL 发酵液萃取产物后分析脂肪醇含量。

2 结果与分析

2.1 表达载体和重组菌株的构建

以 pRL105 为模板,PCR 扩增获得 *Jojoba FAR* 基因。酶切片段后,连接载体 pGAPZαA,启动子为组成型启动子 P_{GAP} ^[23-24]。表达载体 pGAP-*far* 的酶切验证结果如图 2A 所示。随后将重组质粒 pGAP-*far* 线性化后转化至毕赤酵母 GS115 中。用引物 FAR-F 和 FAR-R PCR 验证转化子,正确的重组菌株命名为 pGAPZ-*far*-GS115。

2.2 发酵产物中脂肪醇的检测

工程菌株 pGAPZ-*far*-GS115 及对照菌株 pGAPZ-GS115 摇瓶培养 32 h,发酵产物 GC-MS 检测结果如图 3 所示。通过比对 C12、C14、C15、C16、C18、C20 的直链脂肪醇标品,对照菌株 pGAPZ-GS115 发酵液中未检测到脂肪醇的产生,重组菌株 pGAPZ-*far*-GS115 样品中可以检测到 C16、C18 和 C20 链长脂肪醇的产生(图 3),摇瓶发酵实验脂肪醇的产量为 48.9 mg/L,且 C18 的脂肪醇含量占脂肪醇总量的 94.7%(图 4)。该结果表明 *Jojoba*

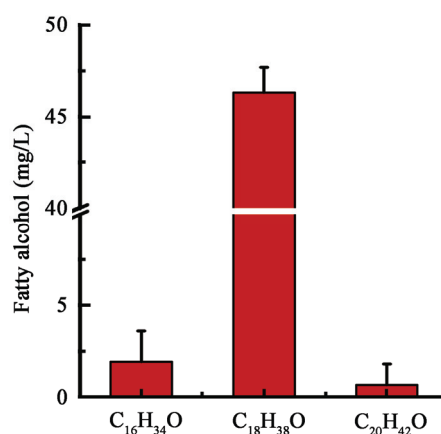


图4 脂肪醇组分分析

Figure 4 Analysis for the composition of fatty alcohol

FAR 可以在毕赤酵母中催化底物合成脂肪醇,且以 C18 链长的直链脂肪醇为主要产物。

2.3 重组菌株 pGAP-*far*-GS115 发酵合成脂肪醇的分析

随后对重组菌株 pGAPZ-*far*-GS115 进行罐上发酵验证,发酵结果如图 5 所示,脂肪醇产量与菌体生长表现出明显的正相关性。在发酵实验中,脂肪醇产量达到 134.74 mg/L,产率为 1.22 mg/(L·h)。重组菌株 pGAPZ-*far*-GS115 生物合成的脂肪醇以 C18 的直链脂肪醇为主要产物,在脂肪醇达到最高产量

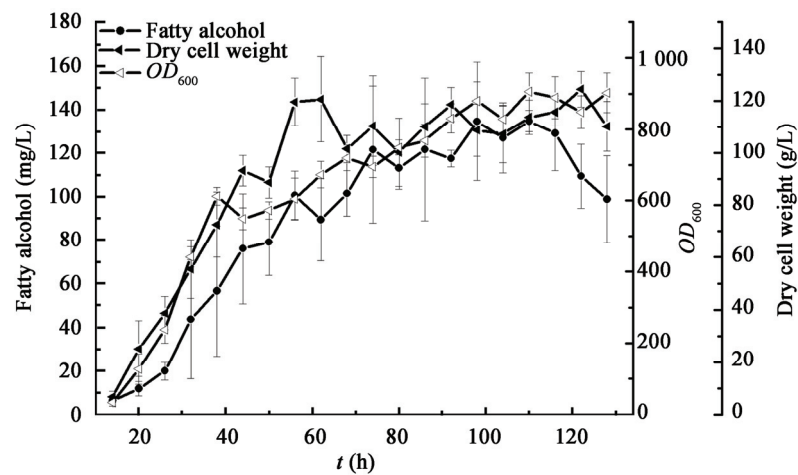


图 5 重组菌株 pGAPZ-*far*-GS115 发酵时间对脂肪醇产量的影响
Figure 5 Results of fermentation of pGAPZ-*far*-GS115

表 1 不同时间点脂肪醇各组分产量分析 Table 1 Fatty alcohol composition analysis at different time points				
发酵时间 Time (h)	脂肪醇产量 Fatty alcohol (mg/L)			
	C16-OH	C18-OH	C20-OH	总产量 Total
14	0.43±0.37	5.93±0.35	—	6.36±0.61
20	1.89±1.31	9.99±2.30	—	11.88±3.35
26	1.64±0.27	17.31±3.93	1.23±0.53	19.97±4.06
32	3.50±2.46	38.15±23.47	2.17±1.05	43.61±27.10
38	3.47±1.83	50.66±26.36	2.76±1.32	56.60±29.82
44	3.62±0.66	69.14±22.16	3.47±2.16	75.97±25.15
50	3.68±1.90	73.50±13.44	2.13±1.85	78.93±15.11
56	4.16±1.09	93.90±10.13	3.11±2.74	100.57±11.16
62	3.75±1.06	83.38±16.87	2.60±2.24	89.30±18.91
68	4.79±1.14	94.03±12.27	3.12±2.80	101.42±10.41
74	3.53±0.82	114.56±30.83	4.15±3.60	121.58±33.93
80	4.89±2.53	105.37±9.02	3.49±3.03	113.04±9.68
86	4.92±1.97	113.72±29.98	3.55±3.27	121.67±32.88
92	4.44±0.64	110.10±4.19	3.49±3.13	117.50±3.87
98	19.63±2.55	110.46±9.42	5.74±1.14	134.61±27.10
104	6.82±2.39	118.39±17.77	1.75±0.30	126.96±16.21
110	5.84±0.62	124.43±4.65	5.39±0.61	134.74±4.89
116	5.37±1.04	118.94±16.44	5.54±1.03	129.16±17.24
122	4.34±1.13	102.55±12.88	2.89±2.57	109.30±14.73
128	4.07±0.41	91.29±19.12	3.83±0.68	106.04±21.98

注：—：GC-MS 未检测出对应产物。
Note: —: GC-MS did not detect the corresponding products.

时, C18 脂肪醇占总量的 92.35%, 同时还有少量 C16 和 C20 的脂肪醇生成(表 1)。发酵后期, 脂肪醇产量达到最高值后开始迅速下降, 这可能是由于生成的脂肪醇被毕赤酵母脂肪醇氧化酶(FAOD)、脂肪醛脱氢酶(FALGH)重新氧化成脂肪酸所致^[25]。

3 结论与讨论

工作中首次将来源于霍霍巴的脂肪酰-CoA 还原酶基因 *Jojoba FAR* 整合到毕赤酵母 GS115 染色体上, 得到重组菌株 pGAPZ-*far*-GS115。摇瓶培养表明该重组菌株可以成功合成脂肪醇。发酵罐发酵验证结果显示, 脂肪醇产量可达到 134.74 mg/L。合成的脂肪醇以 C18 的直链脂肪醇为主要产物, 约占脂肪醇产物的 92.35%。

在研究中, 重组菌株 pGAPZ-*far*-GS115 的脂肪醇产量与目前在酿酒酵母中合成脂肪醇的最高产量相比仍有较大差距。在 2015 年, Feng 等在酿酒酵母中过表达来自于 *Barn owl* (*Tyto alba*) 的脂肪酰-CoA 还原酶, 获得 45 mg/L 的脂肪醇产量, 经过优化和改造途径后摇瓶发酵得到了 330 mg/L 的脂肪醇产量, 进一步发酵罐上得到了 1.1 g/L 的脂肪醇产量^[11]。罐上发酵脂肪醇的产量与摇瓶相比提高了约 3 倍, 是目前酵母生产脂肪醇的最高产量。研究在毕赤酵母中表达了 *Jojoba FAR* 基因, 摇瓶发酵可以达到 48.9 mg/L 的脂肪醇产量, 与在酿酒酵母中只表达末端还原酶的产量处于同一水平, 进一步罐上发酵获得 134.74 mg/L 的产量, 与摇瓶产量相比增加约 3 倍。在该菌株中进行进一步的代谢工程改造, 如提高前体的供应和平衡辅因子 NADPH 的合成, 阻断脂肪酸的氧化及脂肪酰-CoA 的竞争去路等, 将可能有助于显著提高脂肪醇产量。研究同时发现发酵后期脂肪醇可能存在再氧化现象导致其产量明显降低。因此在随后的工作中, 阻断生成的脂肪醇被重新利用是一个值得尝试的策略。总之, 本工作为利用毕赤酵母生产脂肪醇奠定了基础, 为工业化生产脂肪醇提供了有效的途径。

参考文献

- [1] Hreczuch W, Szymanowski J. Synthesis of surfactants with narrow-range distribution of the polyoxyethylene chain[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996, 73(1): 73-78
- [2] Maag H. Fatty acid derivatives: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1984, 61(2): 259-267
- [3] Nozzi NE, Desai SH, Case AE, et al. Metabolic engineering for higher alcohol production[J]. Metabolic Engineering, 2014, 25: 174-182
- [4] Yu AQ, Pratomo Juwono NK, Leong SS, et al. Production of fatty acid-derived valuable chemicals in synthetic microbes[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2014, 2: 78
- [5] Zhou YJ, Zhao ZB. Advanced biofuel-oriented engineering of fatty acid pathway: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(9): 1261-1267 (in Chinese)
周雍进, 赵宗保. 先进生物燃料导向的脂肪酸途径合成生物学改造[J]. 生物工程学报, 2011, 27(9): 1261-1267
- [6] Fu AS, Liu R, Zhu J, et al. Genetic engineering of microbial metabolic pathway for production of advanced biodiesel[J]. Hereditas, 2011, 33(10): 1121-1133 (in Chinese)
付爱思, 刘然, 朱静, 等. 遗传改造微生物代谢途径生产新型柴油燃料的研究进展[J]. 遗传, 2011, 33(10): 1121-1133
- [7] Wang XL, Yi XH, Xian M, et al. Research progress on synthesis of fatty alcohols[J]. Amino Acid & Biotic Resources, 2014, 36(3): 20-24 (in Chinese)
王晓璐, 易晓华, 咸漠, 等. 脂肪醇制备研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2014, 36(3): 20-24
- [8] Liu R, Zhu FY, Lu L, et al. Metabolic engineering of fatty acyl-ACP reductase-dependent pathway to improve fatty alcohol production in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 22: 10-21
- [9] Cao YX, Xiao WH, Liu D, et al. Biosynthesis of odd-chain fatty alcohols in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 113-123
- [10] Liu AQ, Tan XM, Yao L, et al. Fatty alcohol production in engineered *E. coli* expressing *Marinobacter* fatty acyl-CoA reductases[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(15): 7061-7071
- [11] Feng XY, Lian JZ, Zhao HM. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to improve 1-hexadecanol production[J]. Metabolic Engineering, 2015, 27: 10-19
- [12] Youngquist JT, Schumacher MH, Rose JP, et al. Production of medium chain length fatty alcohols from glucose in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2013, 20: 177-186
- [13] Zheng YN, Li LL, Liu Q, et al. Optimization of fatty alcohol biosynthesis pathway for selectively enhanced production of C12/14 and C16/18 fatty alcohols in engineered *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 65
- [14] Fang W, Zhang L, Gu ZH, et al. Constitutive expression of AMP deaminase from *Streptomyces murinus* in *Pichia pastoris* GS115 using the GAP promoter[J]. Microbiology China, 2014, 41(10): 2022-2028 (in Chinese)
方炜, 张梁, 顾正华, 等. 用 GAP 启动子在 *Pichia pastoris* GS115 中组成型表达鼠灰链霉菌腺苷酸脱氢酶[J]. 微生物学通报, 2014, 41(10): 2022-2028
- [15] Byrne B. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2015, 32: 9-17
- [16] Klug L, Daum G. Yeast lipid metabolism at a glance[J]. FEMS Yeast Research, 2014, 14(3): 369-388
- [17] Viljoen BC, Kock JLF, Lategan PM. Long-chain fatty acid composition of selected genera of yeasts belonging to the Endomycetales[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1986, 52(1):

- 45-51
- [18] Metz JG, Pollard MR, Anderson L, et al. Purification of a *Joroba* embryo fatty acyl-coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122(3): 635-644
- [19] Tan XM, Yao L, Gao QQ, et al. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in *Cyanobacteria*[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(2): 169-176
- [20] Liu R. Engineering of microbial metabolic pathway for biosynthesis of fatty alcohols[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan University, 2012 (in Chinese)
刘然. 改造微生物代谢途径生物合成脂肪醇[D]. 武汉: 武汉大学硕士学位论文, 2012
- [21] Goodrick JC, Xu M, Finnegan R, et al. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 74(6): 492-497
- [22] Zhao W, Wang JW, Deng RQ, et al. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35(3): 189-195
- [23] Cao DY, Liu Q, He XY, et al. Progress in GAP promoter derived constitutive expression system of *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2013, 4(4): 1217-1221 (in Chinese)
曹东艳, 柳倩, 贺晓云, 等. 源于 GAP 启动子的毕赤酵母组成型表达系统的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(4): 1217-1221
- [24] Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter[J]. *Gene*, 1997, 186(1): 37-44
- [25] Iwama R, Kobayashi S, Ohta A, et al. Fatty aldehyde dehydrogenase multigene family involved in the assimilation of *n*-alkanes in *Yarrowia lipolytica*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(48): 33275-33286

(上接 p.1180)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

- 3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。
- 3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>