



发酵产泡性能降低的解脂耶氏酵母菌株的获得及其评价

张悦, 徐硕, 王楠, 池萍, 张馨月, 程海荣*

上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240

张悦, 徐硕, 王楠, 池萍, 张馨月, 程海荣. 发酵产泡性能降低的解脂耶氏酵母菌株的获得及其评价. 微生物学报, 2022, 62(11): 4165–4175.

Zhang Yue, Xu Shuo, Wang Nan, Chi Ping, Zhang Xinyue, Cheng Hairong. Construction and characterization of *Yarrowia lipolytica* strain with reduced foaming ability. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(11): 4165–4175.

摘要: 微生物发酵过程中泡沫的产生是发酵领域遇到的共性问题。在不影响发酵性能的前提下抑制菌株的产泡, 对简化操作以及降低发酵成本具有较为重要的意义。解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*, 之前称为 *Candida lipolytica*)是一种常用的合成生物学底盘, 也是合成赤藓糖醇等功能糖醇的生产菌株。但在发酵合成赤藓糖醇的过程中会产生大量的泡沫, 需要添加消泡剂以消除泡沫。【目的】本研究旨在开发一种产泡能力显著降低的解脂耶氏酵母新菌株, 以减少赤藓糖醇发酵过程中消泡剂的添加。【方法】本研究利用解脂耶氏酵母中非同源靶向重组占支配地位的原理, 采用一段外源 DNA 随机插入基因组的手段, 随机突变基因组, 改变菌株的发酵产泡性能, 使突变株在发酵过程中不产泡或者降低其产泡的能力。【结果】通过筛选, 获得一株在发酵过程中产泡性能显著降低的工程菌株, 该菌株在保留高效合成赤藓糖醇性能的同时, 显著降低了泡沫的产生。【结论】所获得的菌株对工业发酵合成赤藓糖醇具有较为重要的意义, 也为控制其他微生物发酵过程中泡沫的生成提供了思路。

关键词: 解脂耶氏酵母; 赤藓糖醇; 发酵产泡; 基因组突变

基金项目: 国家重点研究计划(2018YFA0900700)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900700)

*Corresponding author. E-mail: chrq@sjtu.edu.cn

Received: 19 July 2022; Revised: 26 September 2022; Published online: 10 October 2022

Construction and characterization of *Yarrowia lipolytica* strain with reduced foaming ability

ZHANG Yue, XU Shuo, WANG Nan, CHI Ping, ZHANG Xinyue, CHENG Hairong*

School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Foaming is a common problem during fermentation. Inhibiting foaming is of great significance for simplifying operation and reducing fermentation cost. *Yarrowia lipolytica* is a commonly used starting yeast in synthetic biology and for the synthesis of erythritol and other functional sugar alcohols. However, massive foam is produced in the fermentation for the production of erythritol, which needs to be eliminated by defoamers. **[Objective]** To develop a *Y. lipolytica* strain with significantly reduced foaming ability, so as to reduce the addition of defoamer in erythritol production. **[Methods]** According to the principle that non-homologous end joining (NHEJ) is dominant in *Y. lipolytica* genome recombination, we randomly inserted an artificial DNA fragment into the genome to produce the mutants with reduced or no foaming ability in the fermentation for erythritol production. **[Results]** After screening, we obtained a mutant without foaming during the fermentation in flask, 50 L pilot reactor, and industrial 75 m³ fermentor. **[Conclusion]** This mutant obtained can efficiently synthesize erythritol from high-concentration glucose as does the parental strain while producing less foam. The method to obtain defoaming mutant can provide valuable reference for the engineering of other microorganisms.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*; erythritol; foaming during fermentation; genome mutation

解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是一种非常规酵母(non-conventional yeast),其遗传背景清楚,是合成生物学常用的真核生物底盘^[1-2]。由于该菌为食品安全微生物,在食品发酵领域已经得到广泛的应用^[3],同时也是国际上工业生产赤藓糖醇(erythritol)的常用菌株之一,是我国相关企业生产赤藓糖醇唯一使用的菌株。赤藓糖醇是一种新型甜味剂,因其具有热量低、甜味特性好、非致龋齿性等特殊的生理功效,被认为是蔗糖的优良替代品,应用前景十分广泛,使用赤藓糖醇作为代糖的无糖饮料种类日益增多。赤藓糖醇的合成方法大多采用解脂耶氏酵母发酵高浓度葡萄糖^[4]。但是目前国内外使用的解脂耶氏酵母菌株在发酵过程中会产生大量

的泡沫,需要添加消泡剂来抑制泡沫产生。发酵产生泡沫不但会降低发酵罐的有效利用率,而且容易溢罐导致染菌的现象发生,给企业带来损失。为了减少泡沫的形成,就需要向发酵液中添加消泡剂,但使用消泡剂不但会增加成本,而且还会增加产物的分离提取难度,并抑制细胞的生长^[5-6]。因此,研究开发无泡或者低泡发酵的解脂耶氏酵母新菌株对于提高赤藓糖醇的发酵效率与降低发酵成本具有一定的意义。

微生物发酵产泡是一个复杂的过程,与培养基的种类、菌种的性能、发酵工艺条件都有很大的关系^[7-8],其中菌种的性能是关键因素。而决定菌种在发酵过程中是否产泡受多基因控制。微生物在发酵过程中会向发酵液中分泌多

种蛋白质、多糖、脂类等物质, 当积累到一定程度时可能会导致产生泡沫^[9-10]。这些物质中有可能其中一种为决定性因素, 若破坏该决定性物质的合成途径, 即有可能显著减少泡沫或者消除泡沫的产生; 或者通过增强宿主合成表面活性剂的能力来消除泡沫。

由于解脂耶氏酵母发酵合成赤藓糖醇的过程中产泡机理尚不明确, 因此通过定向阻断促进产泡物质的合成途径或者增强具有消泡功能的表面活性剂的合成途径尚难以实现。本研究通过人工合成的外源 DNA 随机插入基因组的手段, 随机突变基因组, 来筛选产泡显著降低或者不产泡的解脂耶氏酵母工程菌株。

1 材料与方法

1.1 实验使用的菌株

本研究使用的菌株为解脂耶氏酵母菌株 (*Y. lipolytica*) CGMCC7326^[11], 该酵母能发酵葡萄糖合成赤藓糖醇, 产量达到 160 g/L 以上。

1.2 基因组随机插入外源 DNA 获得突变体

由于解脂耶氏酵母的非同源重组在 DNA 重组中占支配地位, 外源 DNA 可以整合到基因组的任何区域, 产生随机多样性的突变^[12-13]。利用这一特性, 我们构建了一段人工 DNA 序列, 其中含有筛选标记潮霉素抗性基因(*hph*), 采用全基因合成的方法合成(图 1)。

```

1 GTGAGAAAT AAAGTGCTTT GTGCGTACCA GGGATAGGGT AGGTAGTGAA ATCTGAGTTA
61 GTACATCAAC TCTAGACGAT GGGCGTCGCT GTGTAGAAGA ACAATAACTC ACCCGGTAAC
121 TAACACTATT TCTCGGTGGT CAATGCGTCA GAAGATATCA AGACGGTCCG TTTTGCCTTT
181 AAGCCGAGTG AATGTTGCCT GCCGTTAGTA AATTTATAT GAAAAACCCC ACTATGAATA
241 CATCAGCCTA TACTGATATA CCAAGAAGTG CAAGGAGAGT GGTCTGTTC CACCTGAACG
301 CGGTTCCCGA CAGGCGGCGG TACTGAAGGG CTTTGTGAGA GAGGTAACGC CGATTCTCTC
361 CTGAGGTGTC TCACAAGTGC CGTGCCAGTCC CGCCCCACT TGCTTCTCTT TGTGTGTAGT
421 GTACGTACAT TATCGAGACC GTTGTTCOCG CCCACCTCGA TCCGGCTGAG GTGTCTCACA
481 AGTGCCGTGC AGTCCCGCCC CCACTTGCTT CTCTTTGTGT GTAGTGTACG TACATTATCG
541 AGACCGTGTG TCCCGCCCCA CTCGATCCGG CTGAGGTGTC TCACAAGTGC CGTGCCAGTCC
601 CGCCCCACT TGCTTCTCTT TGTGTGTAGT GTACGTACAT TATCGAGACC GTTGTTCOCG
661 CCCACCTCGA TCCGGCTGAG GTGTCTCACA AGTGCCTGTC AGTCCCGCCC CCACTTGCTT
721 CTCTTTGTGT GTAGTGTACG TACATTATCG AGACCGTGTG TCCCGCCCCA CTCGATCCGG
781 CACGGGCAAA AGTGCCTATA TATACAAGAG CGTTTGCOCG CCACAGATTT TCACTCCACA
841 CACCACATCA CACATACAAC CACACACATC CACAATGGAA CCCGAAACTA AGATGAAAAA
901 GCCTGAACTC ACCGCGACGT CTGTCGAGAA GTTCTGTGAT GAAAAGTTCG ACAGCGTCTC
961 CGACTCGATG CAGCTCTCGG AGGGCGAAGA ATCTCGTGTG TTCAGCTTCG ATGTAGGAGG
1 021 GCGTGGATAT GTCCCTGCGGG TAAATAGCTG CGCCGATGGT TTCACAAAG ATCGTTATGT
1 081 TTATCGGCAC TTTGCATCGG CCGCGCTCCC GATTCGCGAA GTGCTTGACA TTGGGGAATT
1 141 CAGCGAGAGC CTGACCTATT GCATCTCCCG CCGTGCACAG GGTGTACAGT TGCAAGACCT
1 201 GCCTGAAACC GAACTGCCCG CTGTCTGCA GCGCGTCCGG GAGGCCATGG ATCGGATCGC
1 261 TGGCGCCGAT CTTAGCCAGA CGAGCGGGTT CGGCCATTC GGACCGCAAG GAATCGGTCA
1 321 ATACACTACA TGGCGTGATT TCATATGCGC GATTGCTGAT CCCCATGTGT ATCACTGGCA
1 381 AACTGTGATG GACGACACCG TCAGTGCCTG CGTCCGCGAG GCTCTCGATG AGCTGATGCT
1 441 TTGGGCCGAG GACTGCCOCG AAGTCCGGCA CCTCGTGCAC GCGGATTTCC GCTCCAACAA
1 501 TGTCTTGACG GACAATGGCC GCATAACAGC GGTTCATGAC TGGAGCGAGG CGATGTTCCG
1 561 GGATTCCCAA TACGAGGTCG CCAACATCTT CTCTCGGAGG CCGTGGTTGG CTTGTATGGA
1 621 GCAGCAGACG CGCTACTTCG AGCGGAGGCA TCCGGAGCTT GCAGGATCCG CGCGGCTCCG
1 681 GCGGTATATG CTCCGCATTC GTCTTGACCA ACTCTATCAG AGCTTGGTTG ACGGCATTTT
1 741 CGATGATGCA GCTTGGGCGC AGGGTCGATG CGACGCAATC GTCGATCCG GAGCCGGGAG
1 801 TGTCCGGCGT ACACAAATCG CCCGCAGAAG CGCGGCCGTC TGGACCGATG GCTGTGTAGA
1 861 AGTACTCGCC GATAGTGGAA ACCGACGCC CAGCACTCGT CCGAGGGCAA AGGAATAGGC
1 921 AATTAACAGA TAGTTTGGCG GTGATAATTC TCTTAACCTC CCACACTCCT TTGACATAAC
1 981 GATTTATGTA ACGAAACTGA AATTTGACCA GATATTGTTG TAAATAGAAA ATCTGGCTTG
2 041 TAGGTGGCAA AATCCCGTCT TTGTTCTGTC GTTCCCTCTG TGACTGCTCG TCGTCCCTTT
2 101 GTGTTFCGACT GTCGTGTTTT GTTTCCTGTC GGTGCGCAAG TGAGATGCCG GTGTGCAAT
2 161 TCGGTAGTTC CACGGATGCA GTCGTAAGAC CCAGGTGGTG TGTCCGAGGC AGTATCGCTT
2 221 TCCCAACTCT AGTAACTTCG GTAGTGTGAG ACACACTACC CCTAACGGTA GGACAGCCGG
2 281 ACGACGATGG CGCAGCAATT TGGCGAACGC TGTATATAAAA CAATTCACCT ACGTGCATFG
2 341 AAAGTTGTTT GGGCAATAAA CAATAAATGT ATTAGAGCCA GACGATAGAC AACAAATCCAG
2 401 CAGATGATGA GCAGGAAAAA TGAGTAAGAT CGACGTGGCA AGAAGAGTTA CAGTTACGCA
2 461 GAGTTAATAA GGTGTTGGGA GATTAGAGTT ACCCTGTCGG ATGACTAACT CTCAGAGGCG
2 521 AGTGTACAC

```

图 1 用于基因组随机插入突变的人工 DNA 序列

Figure 1 DNA sequence used for genome insertion mutation. 1–360 bp: upstream non-homologous DNA sequence; 361–892 bp: *hp4d* promoter sequence; 893–1 918 bp: *hph* resistance gene sequence; 1 919–2 176 bp: *xrp* gene terminator sequence; 2 177–2 530 bp: downstream non-homologous DNA sequence.

全长 DNA 合成后,直接用于转化感受态解脂耶氏酵母,转化方法采用醋酸锂热激的方法^[11]。转化后涂布在含潮霉素的 YPD 平板上(固体 YPD 培养基成分为:葡萄糖 20 g/L,酵母粉 10 g/L,蛋白胨 5 g/L,琼脂粉 15 g/L,121 °C 灭菌 20 min),潮霉素浓度为 400 µg/mL。放置于 30 °C 培养箱培养 3–5 d。然后将转化子转接到含同样浓度潮霉素的 YPD 平板上,继续培养 3–5 d 以纯化转化子。

1.3 突变株初步筛选方法

将在潮霉素抗性平板上长出的单菌落逐一转接到 2 mL 的离心管中,每个 2 mL 离心管含 0.5 mL 液体培养基(成分为:200 g/L 葡萄糖,10 g/L 酵母粉,3.5 g/L 柠檬酸铵,3 g/L 蛋白胨,起始 pH 6.0),放置在离心管架上于 30 °C、800 r/min 摇床(TAITEC 公司 MBR-420FL)振荡培养。对突变株转化子的产泡性能进行初步筛选。将不产泡的突变株再进行 250 mL 摇瓶试验。

1.4 突变株的摇瓶产泡试验

将初步筛选获得的不产泡的突变株分别接种到含 30 mL 液体培养基的 250 mL 摇瓶以及含 150 mL 液体培养基的 2 000 mL 的摇瓶中,培养基成分同 1.3 所述。同时用未突变的野生菌株做对比试验。30 °C、230 r/min 摇床培养 2–3 d,观察产泡情况。其中,250 mL 摇瓶在旋转式摇床中培养,2 000 mL 摇瓶在回往复式摇床中培养。

1.5 50 L 发酵罐发酵

将在 250 mL 摇瓶中不产泡的突变株进一步在 50 L 发酵罐中进行试验。50 L 发酵罐含培养基 30 L,培养基成分为:300 g/L 葡萄糖,12 g/L 酵母浸膏,3.5 g/L 柠檬酸铵,3 g/L 蛋白胨,起始 pH 5.9–6.0。115 °C 灭菌 30 min,冷却后接入 500 mL 突变株摇瓶种子液。搅拌转速 450 r/min,通气率为 0.6 vvm,发酵温度 30 °C。同时用没有突变的对照菌(*Y. lipolytica*

CGMCC7326)做对比试验。发酵过程中观察产泡情况。

1.6 75 m³ 发酵罐发酵

构建的工程菌株最终需要进行工业规模化试验,以确定放大后是否仍能保持良好的性能。在 50 L 发酵罐进行试验后,为了进一步确认在生产发酵罐中是否仍然不能产泡,我们在 75 m³ 的发酵罐中进行了放大试验。同时用对照菌(*Y. lipolytica* CGMCC7326)做对比试验。

1.6.1 摇瓶一级种子的制备

在 1 000 mL 的摇瓶中装入 100 mL 培养基(成分同 1.3),共 10 个 1 000 mL 的摇瓶,121 °C 灭菌 20 min。冷却后将在 50 L 发酵罐中不产泡的突变株接入 5 个 1 000 mL 的摇瓶中,对照菌接入另外 5 个 1 000 mL 的摇瓶中,30 °C、250 r/min 培养 20 h。

1.6.2 30 L 发酵罐二级种子的制备

将上述 5 个摇瓶种子液合并于一个摇瓶中(500 mL),分别接入 2 台 30 L 的发酵罐中,一台接不产泡的突变株,另一台接对照菌。30 L 发酵罐含 20 L 培养液(成分同 1.3)。培养温度为 30 °C,搅拌转速 500 r/min,通气量 0.6 vvm,起始 pH 6.0,培养 15 h。

1.6.3 1 000 L 发酵罐三级种子的制备

将上述 2 台 30 L 二级发酵罐中的种子液分别接入 2 台 1 000 L 的发酵罐中,一台接不产泡的突变株,另一台接对照菌。1 000 L 发酵罐含 650 L 培养液(成分同 1.3)。培养温度为 30 °C,搅拌转速 300 r/min,通气量 0.6 vvm,起始 pH 6.0,培养 15 h。

1.6.4 7 000 L 发酵罐四级种子的制备

将上述 2 台 1 000 L 三级发酵罐中的种子液分别接入 2 台 7 000 L 的发酵罐中,一台接不产泡的突变株,另一台接对照菌。7 000 L 发酵罐含 5 000 L 培养液(成分同 1.3)。培养温度为

30 °C, 搅拌转速 200 r/min, 通气量 0.4 vvm, 起始 pH 6.0, 培养 20 h。

1.6.5 75 000 L (75 m³) 发酵罐五级种子的制备

将上述 2 台 7 000 L 四级发酵罐中的种子液分别接入 2 台 75 m³ 的发酵罐中, 一台接不产泡的突变株, 另一台接对照菌。75 m³ 发酵罐含 50 000 L 培养液(成分同 1.5)。培养温度为 30 °C, 搅拌转速 120 r/min, 通气量 0.3 vvm, 起始 pH 6.0, 当葡萄糖含量降到 1 g/L 以下时停止发酵。定时观察发酵罐产泡情况。

1.7 合成赤藓糖醇的性能与表面张力的测定

为了检测突变株合成赤藓糖醇的性能是否受到影响, 我们在 75 m³ 发酵罐水平上测定了突变株与对照菌株合成赤藓糖醇的产量。发酵结束后取样 10 mL, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用蒸馏水稀释 20 倍, 进行 HPLC 测定。所用分析柱为 Shodex SP0810 糖柱(铅离子结合型), 示差折光检测器 RI201 (Shodex), 流速 1 mL/min, 流动相为超纯水, 进样 40 μL, 柱温 70 °C, 浙大 N2000 色谱工作站。表面张力测定仪为上海衡平 BZY-1 全自动表面/界面张力仪, 采用铂金环法, 按照产品说明书操作。

1.8 培养液的乳化性能比较

在 2 个 2 L 的摇瓶中分别装入 300 毫升灭茵处理的 YPD 液体培养基(含 300 g/L 葡萄糖), 分别接入 YALI-nfm 突变株与对比菌株, 30 °C、220 r/min 培养 72 h, 离心去除细胞, 得到澄清培养液。分别取 5 mL 澄清培养液于洁净试管中, 加入 500 μL 十六烷(hexadecane), 于振荡器上剧烈振荡 30 s, 静置 5–10 min, 观察其乳化性能。

2 结果与分析

2.1 基因组突变株的获得

采用材料与方法中人工设计合成的 DNA

片段转化解脂耶氏酵母(*Y. lipolytica*) CGMCC7326^[1], 在潮霉素抗性平板上获得约 300 余个单菌落。将在抗性平板上长出的单菌落再转接到新鲜的抗性平板上进行纯化。随机挑取 24 个转化子提取基因组, 通过 PCR 检测其中的潮霉素抗性基因, 结果显示均能扩出特异的潮霉素抗性基因片段, 说明在抗性平板上长出的转化子含有潮霉素抗性基因。再随机选取 50 个抗性转化子在 2 mL 离心管中进行产泡培养试验的初步筛选。

2.2 发酵过程中产泡沫性能比较

为了检测上述获得的转化子中是否含有产泡性能降低的菌株, 我们首先在 2 mL 离心管中进行了产泡培养试验。根据产泡液面(forming phase)的高低不同, 可以将突变株的产泡性能分为 3 类。第一类产泡液面在 3–5 mm, 第二类产泡液面在 2–3 mm, 第三类产泡液面在 2 mm 以内。研究结果表明, 95% 的转化子的产泡性能与对照菌株(*Y. lipolytica* CGMCC7326)基本一致, 产泡液面在 3–5 mm, 即产泡顶端距离液面 3–5 mm。图 2A 显示其中 3 种突变株(1–3)与对照菌株(4)在 2 mL 离心管中的产泡性能。由图可以看出, 2 号突变株基本没有泡沫产生, 将该突变菌株重新命名为 YALI-nfm (non-foaming, nfm)。

由于上述 YALI-nfm 突变株的产泡性能显著降低, 因此选取该菌株进行摇瓶验证试验。分别在 250 mL 与 2 000 mL 的摇瓶中对上述 YALI-nfm 突变株与对照菌株的产泡性能进行了比较, 结果如图 2B–2E 所示。在 250 mL 摇瓶中 YALI-nfm 突变株经过 40 h 的培养, 没有产生泡沫(图 2B), 而对照菌株产生较多泡沫(图 2C); 在 2 000 mL 摇瓶中, YALI-nfm 突变株在往复摇床培养 40 h 只产生少量泡沫(图 2D), 而对照菌株则产生大量泡沫(图 2E)。

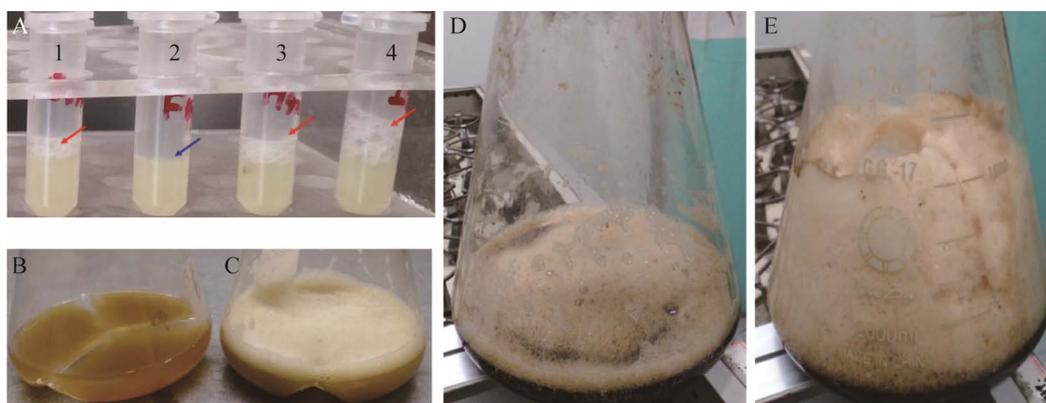


图 2 对照菌株与突变菌株产泡性能的比较

Figure 2 Comparisons of foam formation of parental and mutant strains. 1–3: foam formation by selected 3 mutants; 4: foam formation by parental strain; B and C: cultivation for 40 h in 250 mL flask for mutant strain and parental strain; D and E: cultivation for 40 h in 2 000 mL flask for mutant and parental strains.

2.3 在发酵罐中产泡性能的比较

在 50 L 发酵罐中对上述 YALI-nfm 突变株与对照菌进行发酵产泡性能的比较, 发现经过 40 h 发酵培养 YALI-nfm 突变株产泡性能显著降低(图 3A), 而对照菌株产泡很多并达到发酵罐上部(图 3B)。说明 YALI-nfm 突变株产泡性能的降低可能是因为外源 DNA 插入到基因组中, 使得其产泡途径被抑制, 或者是外源 DNA 的插入增强了具有消泡功能的表面活性剂的合成能力。

由于获得的工程菌株最终要在工业规模的发酵罐上进行放大试验, 因此很有必要在 75 m³ 体积容量的发酵罐上进行放大试验, 验证获得的突变株是否仍然保持低产泡性能, 结果如图 3 所示。由图 3 可以看出, 发酵到 60 h 时 YALI-nfm 突变菌株泡沫并未触碰到罐顶, 透过视镜观察发酵罐内部, 其泡沫液位仍然很低, 距离发酵罐顶部约有 2 m 距离(图 3C、3D); 而对照菌株在 45 h 时即产生大量的泡沫, 泡沫液位已经触碰到发酵罐视镜(图 3E、3F)。

2.4 YALI-nfm 突变菌株与对照菌株合成赤藓糖醇性能的比较

低泡沫发酵在赤藓糖醇发酵技术上是一项

改进, 但是不能影响产物赤藓糖醇的合成。为了验证 YALI-nfm 突变菌株合成赤藓糖醇的性能是否有显著的改变, 在 75 m³ 发酵罐进行了 3 批发酵试验, 并测定了放罐时发酵液的赤藓糖醇含量。测定结果显示, 以(310±15) g/L 一水葡萄糖为碳源, 经过 78–85 h 的发酵, 赤藓糖醇的产量均在(190±5) g/L, 对比菌株与突变菌株二者在赤藓糖醇的合成性能上无显著差异。

2.5 葡萄糖浓度与培养时间对 YALI-nfm 突变株产泡性能的影响

以上消泡性能的研究均在高浓度葡萄糖(300 g/L 无水葡萄糖, 对应 330 g/L 一水葡萄糖, 以下均对应无水葡萄糖浓度)的条件下进行培养, 为了研究消泡性能的高低是否与培养基中葡萄糖浓度以及培养时间具有一定的关系, 在含不同浓度葡萄糖的培养基中培养 YALI-nfm 突变株(30 °C、220 r/min), 观察其在不同时间产泡与消泡的情况, 结果如图 4 所示。在葡萄糖浓度为 100 g/L 的条件下分别培养 24 h (图 4, A-1)、48 h (图 4, A-2)与 72 h (图 4, A-3), 均产生大量的泡沫。在葡萄糖浓度为 200 g/L 的条件下分别培养 24 h (图 4, B-1)、48 h (图 4, B-2)

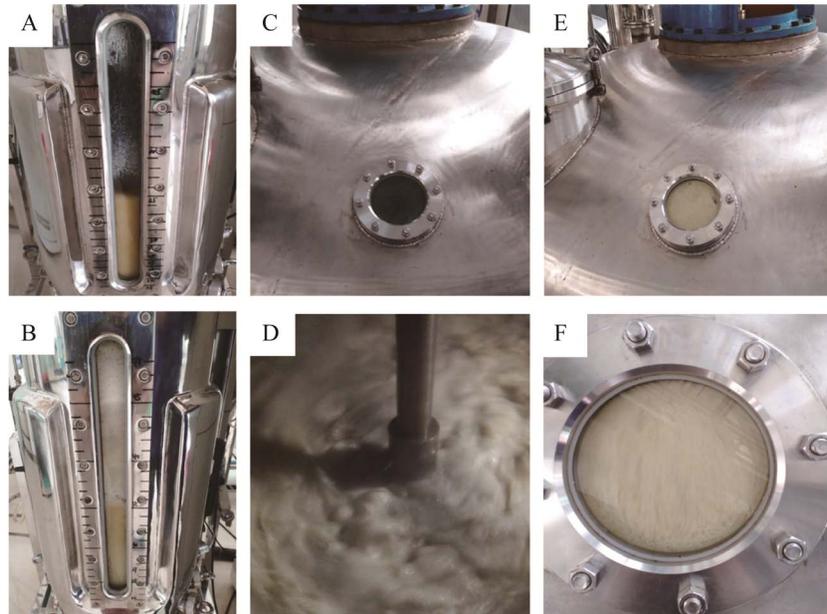


图 3 YALI-nfm 突变株与对照菌株在 50 L 与 75 m³ 发酵罐中发酵的产泡性能比较

Figure 3 Foam formation in 50 L and 75 m³ fermentors for mutant and parental strains. A, B: foam formation for mutant strain in 50 L reactors; C, D: fermentation for 60 h for mutant strain, no foam was observed; E, F: fermentation for 60 h for parental strain, rich foam was observed.

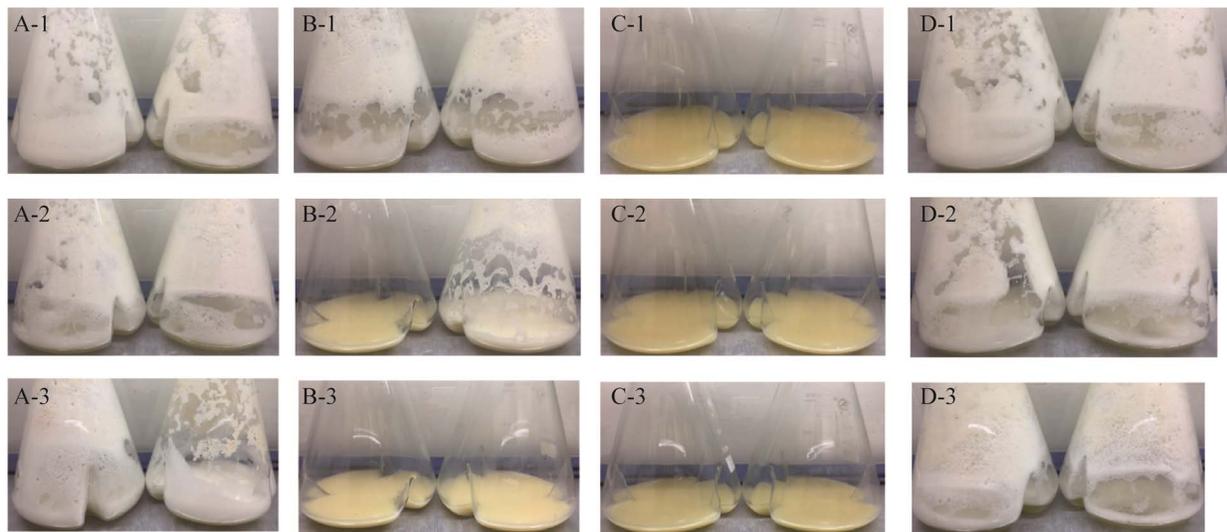


图 4 YALI-nfm 突变株在不同葡萄糖浓度下产泡性能的比较

Figure 4 Comparison of foaming ability of mutant strain under different glucose concentrations. A: foam did not disappear with the prolongation of the culture time after 24, 48 and 72 h with 100 g/L glucose as the carbon source; B: foam disappeared gradually with the prolongation of the culture time after being cultured for 24, 48 and 72 h with 200 g/L glucose as the carbon source; C: no foam was observed when the cells were cultured for 24, 48 and 72 h with 300 g/L glucose as carbon source; D: the control strain was cultured for 24, 48 and 72 h with 300 g/L glucose as carbon source, and produced a large amount of foam.

与 72 h (图 4, B-3), 发现在 24 h 时泡沫很多, 到 48 h 时泡沫明显减少, 其中有一摇瓶中的泡沫已经消失(B-2 中左边摇瓶), 到 72 h 时泡沫均消失(B-3)。在葡萄糖浓度为 300 g/L 的条件下分别培养 24 h (图 4, C-1)、48 h (图 4, C-2)与 72 h (图 4, C-3), 均未见泡沫产生, 而对照菌株在 300 g/L 葡萄糖条件下培养 24 h (图 4, D-1)、48 h (图 4, D-2)与 72 h (图 4, D-3), 均有大量的泡沫产生。

以上结果表明, YALI-nfm 突变株的消泡性能与葡萄糖的浓度以及培养时间均有密切的关系, 高浓度葡萄糖培养条件下的消泡性能明显高于低浓度葡萄糖培养条件下的消泡性能。在 300 g/L 葡萄糖的浓度下, 整个培养过程未见有泡沫产生(图 4, C-1-C-3)。在 200 g/L 葡萄糖的浓度下, 随着培养时间的增加, 消泡性能逐渐增强, 到 72 h 时泡沫完全消失(图 4, B-1-B-3)。而在低浓度葡萄糖条件下(如 100 g/L)泡沫始终不能消失(图 4, A-1-A-3)。说明 YALI-nfm 突变株的消泡性能受葡萄糖浓度的调控。

2.6 发酵培养液的十六烷乳化试验

为了研究 YALI-nfm 突变株消泡性能的获得是否是其向培养基中分泌了具有消泡能力的

物质(如表面活性剂), 将在 300 g/L 葡萄糖浓度条件下培养 72 h 的 YALI-nfm 突变株的培养液(图 4, C-3)与对照菌株的培养液(图 4, D-3)分别离心去除细胞, 得到澄清培养液。分别取 5 mL 澄清培养液于洁净试管中, 加入 500 μ L 十六烷(hexadecane), 剧烈振荡 30 s, 静置 5–10 min, 观察其乳化性能。若培养液中含有较多的表面活性剂, 则能将十六烷进行乳化成为浑浊的悬浮液, 均匀悬浮于培养液中。若培养液中不含表面活性剂, 十六烷不能被乳化, 会分层并上浮于培养液的上层, 下层水相会逐渐恢复为澄清透明。

对比菌株上清与 YALI-nfm 突变株培养上清离心去除细胞后, 对比菌株上清清澈透明(图 5, A-1), 而突变株上清呈现明显的乳清状(图 5, B-1)。当加入十六烷后, 十六烷位于培养液上层(图 5, A-2 和 B-2 黄色箭头所示)。剧烈振荡 30 s 后再静置 5 min, 对比菌株已经可见明显的分层, 十六烷位于上层(图 5, A-3 红色箭头所示), 而 YALI-nfm 突变株原本乳清状的培养液变为浑浊的悬浮液, 十六烷没有分层(图 5, B-3)。当静置 10 min 时, YALI-nfm 突变株的培养液仍为浑浊的悬浮液(图 5, B-4), 而对比菌株的培养液较 5 min 时更清澈透明(图 5, A-4)。

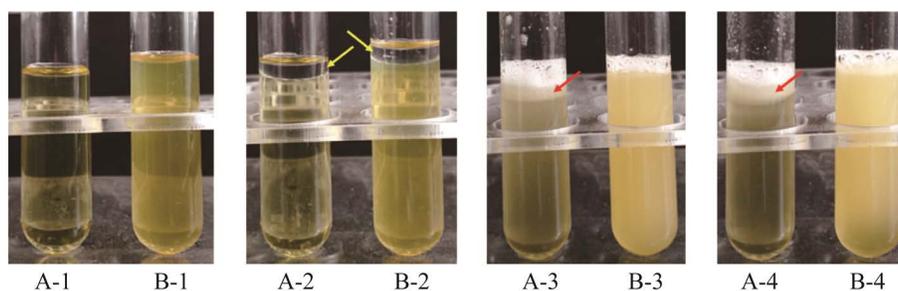


图 5 对照菌株培养上清与 YALI-nfm 突变株培养上清的十六烷乳化试验效果对比

Figure 5 Comparison of hexadecane emulsification between the culture supernatants of control strain and the mutant strain. A-1, B-1: comparison of the supernatant transparency after centrifugation of the fermentation broth of the control strain and the mutant strain; A-2, B-2: add 500 μ L hexadecane to A-1 and B-1, respectively; A-3, B-3: A-2, B-2 were shaken for 30 s and then stood for 5 minutes; A-4 and B-4: A-2 and B-2 were shaken for 30 s and then stood for 10 minutes.

由上述乳化试验结果可知, YALI-nfm 突变株在高浓度葡萄糖的培养条件下具有消泡的特性, 可能是由于其向培养液中分泌了具有乳化作用的表面活性剂产生的, 该表面活性剂可能降低液面表面张力, 从而具有消泡功能。进一步测定了对比菌株与 YALI-nfm 突变株在 300 g/L 葡萄糖培养条件下培养液的液面表面张力。测定结果表明, 对比菌株培养液的液面表面张力为 68.3 mN/m, 而 YALI-nfm 突变株培养液的表面张力为 41.6 mN/m。突变菌株的表面张力显著降低, 泡沫更容易破裂, 从而能产生较为显著的消泡功能。

综合上述结果可知, YALI-nfm 突变株获得发酵消泡的能力可能是其产生了具有降低表面张力的表面活性剂, 而且该表面活性剂的产生可能受高浓度葡萄糖的诱导。在相对较低浓度的葡萄糖培养条件下(如 200 g/L), 随着培养时间的增加, 其亦可能分泌降低表面张力的表面活性剂, 从而达到消泡的目的。但是在更低浓度葡萄糖的培养条件下(如 100 g/L), 即使随着培养时间的延长, 也不能产生具有消泡作用表面活性剂。

3 讨论与结论

发酵产泡是微生物发酵领域普遍遇到的共性问题, 贯穿发酵的全部过程, 如前期发酵过程、菌液分离过程和产品分离提取过程。发酵产泡降低了发酵罐的有效使用体积, 增加了发酵成本。因此如何尽最大可能降低产泡是发酵领域迫切需要解决的问题。微生物发酵产泡的因素主要有以下几种^[8-14]: (1) 发酵过程中向培养基分泌蛋白, 这些蛋白由于具有两性结构可以作为表面活性剂吸附在界面上, 并形成强的分子间相互作用对泡沫起到稳定作用, 从而使产生泡沫不易破裂。(2) 发酵过程中产生多糖类

化合物, 使溶液黏度增加, 增加液面表面张力, 稳定气泡。(3) 通气率, 随着通气率增加, 产泡会更严重。(4) 发酵温度, 发酵温度越高, 溶液的黏度越低, 表面张力越小, 泡沫越容易破裂。但是解脂耶氏酵母是温度敏感性微生物, 一般耐受温度为 33 °C^[15]。(5) 培养基的组成, 含有有机氮越多越容易起泡。通过控制上述因素能够有效地降低泡沫的产生。

由于解脂耶氏酵母具有多种蛋白分泌途径, 能向胞外分泌多种蛋白^[16-17], 同时该酵母也是严格的好氧微生物, 需要维持充足的通气才能良好地合成赤藓糖醇^[18], 从而在发酵过程中产生大量的泡沫(图 2E; 图 3B, 3E)。虽然通过控制通气率、发酵温度以及培养基组成能降低泡沫的形成, 但是这些因素并不是解脂耶氏酵母发酵产泡的关键因素。工业上利用解脂耶氏酵母发酵合成赤藓糖醇, 发酵产泡一般是从对数生长期开始(约 40 h), 此时细胞开始向胞外分泌多种蛋白以及其他大分子化合物^[17]。为了防止从排气管溢料, 需要添加消泡剂才能抑制泡沫的形成。因此, 通过改良菌株的基因组, 阻断促进产泡的化合物的合成途径, 或者促进具有降低表面张力作用的表面活性剂的合成, 可能是抑制其产泡的关键因素。而解脂耶氏酵母分泌到胞外的大分子化合物种类仍未能全部了解, 因此通过定向改组基因组消除泡沫的产生, 目前较难实现, 而通过外源 DNA 片段随机插入基因组中造成随机突变再筛选的方法仍然是一种可行的方法。

因此, 本研究首先通过体外合成一段带潮霉素筛选标记的 DNA, 并随机插入到基因组中, 以获得多种突变株, 然后对其进行定向筛选, 获得一株产泡性能显著降低的突变株。经过摇瓶、50 L 发酵罐和 75 m³ 生产发酵罐的试验, 初步证明该突变株产泡性能显著降低, 并

且合成赤藓糖醇的产量并没有显著变化。由于该突变菌株基因组含有抗性潮霉素标记,通过基因编辑技术将该抗性标记去除后该菌株即具备工业化规模化发酵合成赤藓糖醇的使用潜力。通过十六烷乳化试验,初步证明该突变株不产泡的原因可能为该菌株能在高浓度葡萄糖存在的条件下产生能降低表面张力的表面活性剂,表面张力由对比菌株的 68.3 mN/m 降低到 41.6 mN/m。表面张力的降低使得泡沫不稳定,从而容易破裂,达到消泡的效果。

解脂耶氏酵母能够利用脂类化合物为唯一碳源,并分泌表面活性剂(biosurfactant)或者乳化剂(bioemulsifier)以分散油脂,便于分解吸收利用^[19]。解脂耶氏酵母能合成多种不同种类的表面活性剂或乳化剂。Cirigliano 等研究了不同的碳氢化合物如十六烷、石蜡油、大豆油、橄榄油以及玉米油对解脂耶氏酵母合成生物表面活性剂的影响,认为十六烷对提高合成生物表面活性剂的产量效果最显著^[20]。随着研究的深入,还发现解脂耶氏酵母能够在以葡萄糖为唯一碳源的培养基中合成多种生物乳化剂或者生物表面活性剂,其化学成分主要包含蛋白、脂类以及碳水化合物,不同种类的表面活性剂其蛋白、脂类与碳水化合物的组成比例不同^[21-23]。虽然上述文献报道了解脂耶氏酵母能够合成多种表面活性剂或者乳化剂,但未见有将产生的表面活性剂与发酵消泡相结合的报道。本研究获得的突变株可能能够在高浓度葡萄糖的条件下产生某种表面活性剂,降低液面表面张力,抑制发酵过程中泡沫的产生。外源 DNA 的插入可能使某个基因失活或者表面活性剂合成基因的调控区域发生改变,从而使得合成具有消泡作用表面活性剂的能力增强,该表面活性剂的组成成分以及合成的机制本实验室正在研究中。

参考文献

- [1] Markham KA, Alper HS. Synthetic biology expands the industrial potential of *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(10): 1085–1095.
- [2] Abdel-Mawgoud AM, Markham KA, Palmer CM, Liu N, Stephanopoulos G, Alper HS. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 192–208.
- [3] Zinjarde SS. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry*, 2014, 152: 1–10.
- [4] Bilal M, Xu S, Iqbal HMN, Cheng HR. *Yarrowia lipolytica* as an emerging biotechnological chassis for functional sugars biosynthesis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(4): 535–552.
- [5] Pelton R. A review of antifoam mechanisms in fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 29(4): 149–154.
- [6] Nielsen JC, Lino F, Rasmussen TG, Thykær J, Workman CT, Basso TO. Industrial antifoam agents impair ethanol fermentation and induce stress responses in yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(22): 8237–8248.
- [7] Aydogan N, Aldis N. Tuning surface tension and aggregate shape via a novel redox active fluorocarbon-hydrocarbon hybrid surfactant. *Langmuir*, 2006, 22(5): 2028–2033.
- [8] Junker B. Foam and its mitigation in fermentation systems. *Biotechnology Progress*, 2007, 23(4): 767–784.
- [9] Prins A, Van't Riet K. Proteins and surface effects in fermentation: foam, antifoam and mass transfer. *Trends in Biotechnology*, 1987, 5(11): 296–301.
- [10] Xu ZH, Wu ZL, Zhao YL. Foam fractionation of protein with the presence of antifoam agent. *Separation Science and Technology*, 2010, 45(16): 2481–2488.
- [11] Cheng HL, Wang SQ, Bilal M, Ge XM, Zhang C, Fickers P, Cheng HR. Identification, characterization of two NADPH-dependent erythrose reductases in the yeast *Yarrowia lipolytica* and improvement of erythritol productivity using metabolic engineering. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 133.
- [12] Richard GF, Kerrest A, Lafontaine I, Dujon B. Comparative genomics of *Hemiascomycete* yeasts: genes involved in DNA replication, repair, and recombination. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22(4): 1011–1023.
- [13] Verbeke J, Beopoulos A, Nicaud JM. Efficient

- homologous recombination with short length flanking fragments in Ku70 deficient *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(4): 571–576.
- [14] Etoc A, Delvigne F, Lecomte JP, Thonart P. Foam control in fermentation bioprocess: from simple aeration tests to bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 129/130/131/132: 392–404.
- [15] Wang N, Chi P, Zou YW, Xu YR, Xu S, Bilal M, Fickers P, Cheng HR. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for thermoresistance and enhanced erythritol productivity. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 176.
- [16] Davidow LS, O'Donnell MM, Kaczmarek FS, Pereira DA, DeZeeuw JR, Franke AE. Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(10): 4621–4629.
- [17] Nicaud JM, Madzak C, Van Den Broek P, Gysler C, Duboc P, Niederberger P, Gaillardin C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, 2002, 2(3): 371–379.
- [18] Rywińska A, Tomaszewska-Hetman L, Rymowicz W. Erythritol biosynthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast under various culture conditions. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, 7: 3511–3516.
- [19] Gonçalves FAG, Colen G, Takahashi JA. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 476207.
- [20] Cirigliano MC, Carman GM. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48(4): 747–750.
- [21] Sarubbo LA, Marçal MDC, Neves MLC, Silva MDPC, Porto LF, Campos-Takaki GM. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, 95(1): 59–67.
- [22] Amaral PFF, Da Silva JM, Lehocky M, Barros-Timmons AMV, Coelho MAZ, Marrucho IM, Coutinho JAP. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 2006, 41(8): 1894–1898.
- [23] Trindade JR, Freire MG, Amaral PFF, Coelho MAZ, Coutinho JAP, Marrucho IM. Aging mechanisms of oil-in-water emulsions based on a bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, 324(1/2/3): 149–154.

程海荣，上海交通大学生命科学与技术学院研究员，目前聚焦于解脂耶氏酵母合成生物学的研究，以解脂耶氏酵母为合成底盘，开展功能糖醇，如赤藓糖醇、甘露醇、木糖醇等大宗糖醇以及其它稀有糖醇、功能营养化合物等的生物发酵合成的研究。采用工程化技术对底盘酵母细胞进行各种突变改造，获得性能各异的变异体，再利用这些变异体发酵基础碳源合成多种目标功能化合物。除了开展上述合成代谢研究外，对旁路途径进行了研究，使得底盘细胞合成的目标产物更纯，更有利于下游分离。总之，本研究室围绕合成代谢这一中心，对副产物合成途径、抗逆途径、发酵产泡沫途径等基本点分别开展研究，促使相关技术的落地。

