



代谢工程改造热带假丝酵母高效合成中链 ω -羟基脂肪酸

王世杰, 张海冰, 沈微, 杨海泉, 夏媛媛, 曹钰*, 陈献忠*

江南大学生物工程学院, 微生物合成生物制造重点实验室, 江苏 无锡 214122

王世杰, 张海冰, 沈微, 杨海泉, 夏媛媛, 曹钰, 陈献忠. 代谢工程改造热带假丝酵母高效合成中链 ω -羟基脂肪酸. 微生物学报, 2022, 62(1): 77–89.

Wang Shijie, Zhang Haibing, Shen Wei, Yang Haiquan, Xia Yuanyuan, Cao Yu, Chen Xianzhong. Efficient synthesis of medium-chain ω -hydroxy fatty acids by metabolic engineering in *Candida tropicalis*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(1): 77–89.

摘要:【目的】 ω -羟基脂肪酸(ω -hydroxyfatty acid, ω -HFAs)是一种绿色安全无毒, 具有良好生物相容性的理想生物降解材料, 广泛应用于化工、食品、药学等方面, 微生物发酵法生产 ω -羟基脂肪酸具有重要的研究意义和应用前景。【方法】为了得到高产 ω -羟基脂肪酸的代谢工程菌株, 通过同源重组技术, 连续敲除二倍体热带假丝酵母 β -氧化途径中酰基辅酶 A 氧化酶基因(*ACO*)的同工酶 *POX* 基因, 考察基因缺失对细胞生长以及合成 ω -羟基脂肪酸能力的影响。【结果】基于脂肪醇氧化酶(*FAO*)基因缺陷菌株, 成功构建了重组菌株 F4PT(Δ *POX4*, Δ *POX5*), 在碳源为葡萄糖的培养基中, 重组菌株出现生长减缓, 但在碳源为脂肪酸甲酯(C_{12} – C_{14})的培养基中生长明显减缓, 说明删除 *POX4*、*POX5* 基因使脂肪酸甲酯的代谢能力降低, 其次通过摇瓶发酵实验, 12-羟基十二酸和 14-羟基十四酸的产量分别为 3.01 g/L 和 8.69 g/L, 转化率分别为 11.44%和 33.14%, 达到积累 ω -羟基脂肪酸的目的, 并且代谢十四酸甲酯的能力是明显强于代谢十二酸甲酯。【结论】*FAO*、*POX* 基因双缺失的热带假丝酵母可以明显积累 ω -羟基脂肪酸, 不同碳链的积累效率有差异, 其中 14-羟基十四酸的产量及转化率更高, 重组菌株有定向转化十四酸甲酯为 14-羟基十四酸的潜能。

关键词: 热带假丝酵母; β -氧化; ω -氧化; ω -羟基脂肪酸; 精细化工品

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20171138); 国家自然科学基金(32001064)

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20171138) and by the National Natural Science Foundation of China (32001064)

*Corresponding authors. Tel/Fax: +86-510-85918122; E-mail: CAO Yu, tsaoy5@jiangnan.edu.cn, CHEN Xianzhong, xzchen@jiangnan.edu.cn

Received: 22 February 2021; Revised: 10 April 2021; Published online: 19 April 2021

Efficient synthesis of medium-chain ω -hydroxy fatty acids by metabolic engineering in *Candida tropicalis*

WANG Shijie, ZHANG Haibing, SHEN Wei, YANG Haiquan, XIA Yuanyuan, CAO Yu*, CHEN Xianzhong*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] ω -hydroxy fatty acid (ω -HFAs) is a green, safe, non-toxic, ideal biodegradable material with good biocompatibility. It is widely used in chemical industry, food, pharmacy. Microbial fermentation, the method for producing ω -HFAs has important research significance and application prospects. [Methods] In order to obtain high-yield metabolically engineered strains of ω -hydroxy fatty acids, the *POX* gene in the β -oxidation of *Candida tropicalis* was continuously knocked out through homologous recombination technology. The effect of gene deletion on cell growth and the ability to synthesize ω -hydroxy fatty acids was investigated. [Results] The recombinant strain F4PT (Δ *POX4*, Δ *POX5*) was successfully constructed. Growth in the medium with fatty acid methyl esters ($C_{12}\sim C_{14}$) as the carbon source was significantly slower than that in glucose, indicating that the deletion of the *POX4* and *POX5* genes reduced the metabolic ability of fatty acid methyl esters. Secondly, through the fermentation experiment, the concentration of 12-hydroxydodecanoic acid and 14-hydroxytetradecanoic acid were 3.01 g/L and 8.69 g/L, the conversion rates were 11.44% and 33.14%, respectively. The ability to metabolize fourteen-carbon fatty acids is significantly stronger than that of twelve-carbon fatty acids. [Conclusion] *Candida tropicalis* with double deletion of *FAO* and *POX* genes can obviously accumulate ω -hydroxy fatty acids, but the accumulation efficiency of different carbon chains is different. The production and conversion rate of 14-hydroxytetradecanoic acid are higher, and the recombinant strain has the potential to convert methyl tetradecanoate to 14-hydroxytetradecanoic acid.

Keywords: *Candida tropicalis*; β -oxidation; ω -oxidation; ω -hydroxy fatty acids; fine chemical products

ω -羟基脂肪酸的碳骨架中含有羟基，是生物体内三酰基甘油、蜡、脑苷脂和其他必需脂质的组成部分^[1]。羟基团位于末端碳位的脂肪酸成为 ω -羟基脂肪酸，与非极性脂肪酸相对比，具有熔点高、沸点高、粘度高的特点，并更易形成二聚物，但是在水中难溶^[2-3]。 ω -羟基脂肪酸是现今最理想的合成生物降解材料的化合物之一，合成的聚合物不仅对高温、化学试剂和撞击耐受性更高，而且绿色安全无毒，具有良好的生物相容性^[4]。所以， ω -羟基脂肪酸这种精细化工品具有其他材料所没有的优势与发展

潜力。

目前，获得 ω -羟基脂肪酸的途径主要是化学合成法和微生物发酵法，化学合成反应路线复杂且分离困难，而微生物发酵法绿色环保，发酵周期短、能有效节约成本^[5]。微生物有芽孢菌属、假单胞菌属和微菌属等都可以生产羟基脂肪酸，但是生产的羟基脂肪酸类型差异较大^[6]，其中对 ω -羟基脂肪酸的研究主要集中在细胞色素 P450 单氧合酶的研究。迄今为止，国内外定向转化 ω -羟基脂肪酸的报道很少，因而限制了对 ω -羟基脂肪酸的研究开发，从而影响

其应用的发展和新型产品的研制。

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)是一种具有重要工业应用生产战略意义的菌株, 拥有十分强大的 ω -氧化酶系, 该酵母最显著的特征是可以代谢烷烃或脂肪酸进行生长增殖^[7]。鉴于不同的培养因素, 热带假丝酵母会呈现出适应环境的形态^[8], 相较于酿酒酵母, 有着耐高温、适应性强和利用多种有机物等优势, 作为基因工程改造菌更有前景^[9-10]。热带假丝酵母氧化烷烃或脂肪酸, 转化成为二元酸的途径是 α -氧化和 ω -氧化, 如图 1 代谢途径所示。脂肪醇氧化酶(FAO)、脂肪醇脱氢酶(ADH)、细胞色素 P450 单加氧酶(CYP)和脂肪醛脱氢酶(FALDH)参与了相关反应^[11-12], 烷烃进行的是 α -氧化, 经过 6 步氧化反应生成二元酸; 脂肪

酸进行的是 ω -氧化, 经过 3 步氧化反应生成二元酸, 代谢烷烃与脂肪酸主要区别就是多了 3 步氧化反应。热带假丝酵母中还有强大的 β -氧化途径, 烷烃代谢能产生大量二元酸但不能累积或分泌, 二元酸和一元酸多数会在过氧化物酶体中, 发生 β -氧化反应^[13], *POX* 基因是酰基辅酶 A 氧化酶(ACO)的同工酶基因。研究发现, 在以烷烃为唯一碳源的诱导培养基中, *POX5* 的诱导表达水平较 *POX4* 低, 通过对酰基辅酶 A 氧化酶 *POX4* 和 *POX5* 这 2 对等位基因进行敲除, 发现菌株不能代谢烷烃, 且二元酸的积累量明显增加^[14-15], 说明 *POX4* 和 *POX5* 基因的缺失就能阻断 β -氧化途径。本实验通过对 *FAO* 基因缺失的菌株, 进一步删除 *POX* 基因, 达到能够阻断 β -氧化并且局部限速 ω -氧化, 展示 *FAO*、*POX* 基因双缺失对热带假丝酵母菌体的影响。

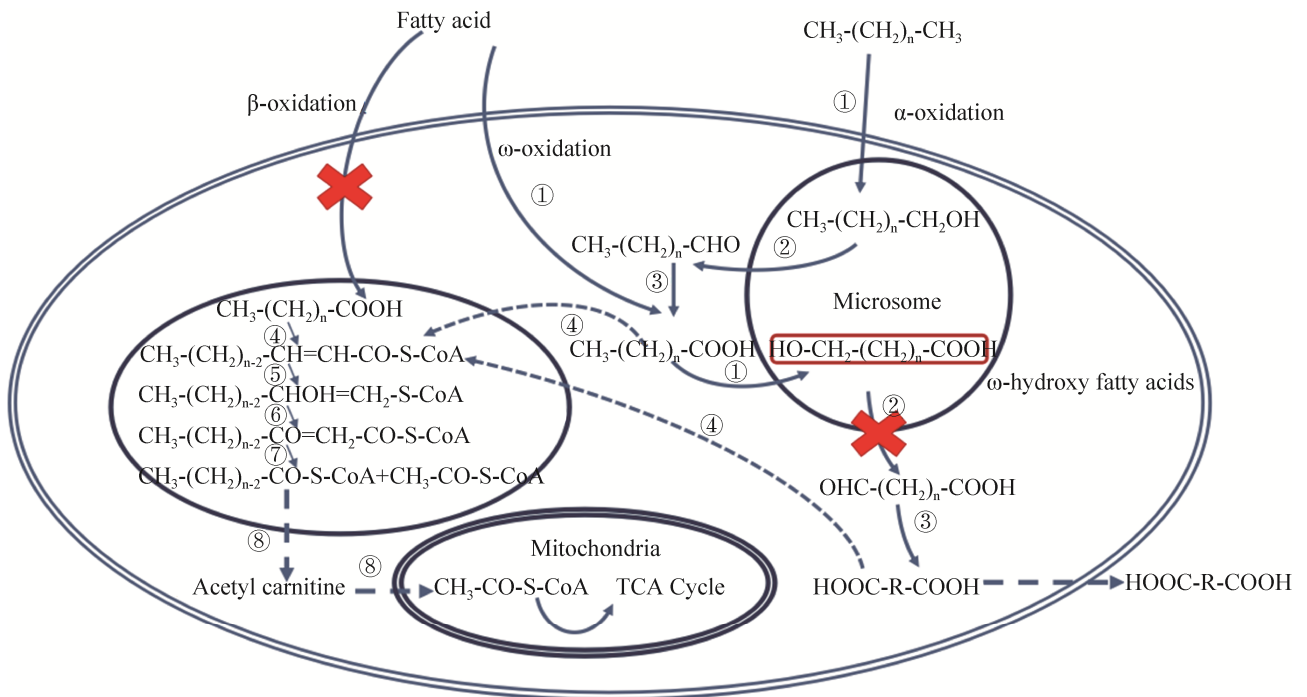


图 1 热带假丝酵母中代谢烷烃或脂肪酸的途径^[16]

Figure 1 Metabolic pathway of alkane or fatty acid in *Candida tropicalis*^[16]. ①: cytochrome P450 and NADPH-Cytochrome P450 reductase; ②: fatty-alcohol oxidase and Fatty alcohol dehydrogenase; ③: fatty-aldehyde dehydrogenase; ④: fatty acyl-CoA synthetase; ⑤: acyl-CoA oxidase; ⑥: enoyl-CoA hydratase; ⑦: β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; ⑧: carnitine acetyltransferase.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和引物

实验所用菌株见表 1，U-204 是通过 *C. tropicalis* ATCC 20336 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑系统构建出的菌株；质粒 Tm-*gda324-URA3*、Ts-*POX41-gda324-URA3*、Ts-*POX42-gda324-URA3* 和 Ts-*POX5-gda324-URA3* 均由本实验室保藏，相对应的引物均参考文献[12]，*gda324* 为 *URA3* 基因序列通过引物 U*gda324* 和 D*gda* 扩增得到的 324 bp 片段，主要作用是 *URA3* 基因弹出的辅助序列；PCR 引物如表 2，都由苏

州金唯智股份有限公司合成。

1.1.2 主要培养基

(1) LB 培养基(g/L)：酵母提取物 5，蛋白胨 10，氯化钠 10；(2) MM 培养基(g/L)：YNB 6.7，葡萄糖 20，硫酸铵 10；(3) SM 培养基：MM 培养基中添加 0.006% (W/V) 尿嘧啶；(4) 5-氟乳清酸培养基：SM 培养基中添加 0.2% (W/V) 5-氟乳清酸；(5) 单一碳源培养基(g/L)：YNB 6.7，硫酸铵 10，尿嘧啶 0.06，液体培养基碳源为下列 1 种：2% 葡萄糖、2% (V/V) 正十二烷、2% (V/V) 正十四烷、0.1% (V/V) 月桂酸甲酯、0.1% (V/V) 肉豆蔻酸甲酯。固体培养基在液体培养基的基础上，加入

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>C. tropicalis</i> ATCC20336	<i>URA3/URA3 FAO/FAO POX4/POX4 POX5/POX5</i>	ATCC
<i>C. tropicalis</i> U-204	<i>ura3/ura3</i>	This lab
<i>C. tropicalis</i> F3YT	<i>ura3/ura3 fao11::gda324/fao12::gda324 fao2a::gda324 fao2b::gda324</i>	This lab
<i>C. tropicalis</i> F1PT	<i>ura3/ura3 fao1/fao1 fao2/fao2 pox41::gda324/POX42</i>	This study
<i>C. tropicalis</i> F2PT	<i>ura3/ura3 fao1/fao1 fao2/fao2 pox41::gda324/pox42::gda324</i>	This study
<i>C. tropicalis</i> F3PT	<i>ura3/ura3 fao1/fao1 fao2/fao2 pox41::gda324/pox42::gda324 pox5::gda324/POX5</i>	This study
<i>C. tropicalis</i> F4PT	<i>ura3/ura3 fao1/fao1 fao2/fao2 pox41::gda324/pox42::gda324 pox5::gda324/pox5::gda324</i>	This study

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction sites
U <i>gda324</i>	<u>AACTGCAG</u> ACTAAGCTTCTAGGACGTCAT	<i>Pst</i> I
D <i>gda</i>	GCGT <u>CGAC</u> ACCCGATTTCAAAGTGCAGA	<i>Sal</i> I
UPOX4	TCTGGCAATGTCTGTAGCTC	
DPOX4	ACAATCTGATGATGGCAAC	
U2POX4	ACGGCTCCTACTACGACT	
D2POX4	CTTAAAGATAGCCTTGGTGT	
UPOX5	TTTGGCCTCGGTTCCAC	
DPOX5	GTAATGATACCGTACTGCAAG	
rUPOX4	<u>AACTGCAG</u> AGGACCTTGTGATACACT	<i>Pst</i> I
rDPOX4	GCTCTAGATGCTGAAGCCATTGACC	<i>Xba</i> I
rUPOX5	<u>AACTGCAG</u> ACTCCTTTGGGTTGAACTTG	<i>Pst</i> I
rDPOX5	GCTCTAGAGGTAAGCCTACTCCGACT	<i>Xba</i> I

The underlined are restriction enzyme cutting sites.

2% (W/V)琼脂粉; (6) YPD 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10; (7) 发酵培养基(g/L): 蛋白胨 3, 酵母粉 6, YNB 6.7, K_2HPO_4 7.2, KH_2PO_4 9.4, 葡萄糖 20, 尿嘧啶 0.06。

1.1.3 主要试剂与仪器

正十二烷、正十四烷、月桂酸甲酯(C_{12})、肉豆蔻酸甲酯(C_{14})等购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 5-氟乳清酸(5-FOA)、酵母氨基(YNB)购自上海麦克林生化科技有限公司; 氯化锂、山梨醇、EDTA-2Na、乙醇(色谱级)、二氯甲烷、甲醇购自国药集团化学试剂有限公司; 一步克隆试剂盒购自上海联迈生物工程有限公司。高速台式离心机、TSQ quantum Ultra EMR 三重四级杆液质联用仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司; UV2000 紫外可见分光光度计购自上海舜宇恒平科学仪器有限公司; PCR 扩增仪购自杭州米欧仪器有限公司。

1.2 敲除盒的使用

引物和敲除盒的使用及构建方法参考文献[17], 已经通过对热带假丝酵母 ATCC 20336 基因组进行分析, 获得 3 个 *POX* 基因, 分别为 *POX41*、*POX42*、*POX5* 基因, *POX41* 和 *POX42* 为 *POX4* 的 1 对等位基因, *POX5* 里有 1 对相同的等位基因, 根据基因序列构建敲除盒。最后通过 PCR 扩增获得敲除盒 *POX42-gda324-URA3-POX42* 和 *POX5-gda324-URA3-POX5* 片段, 上述所用引物见表 2。

1.3 β -氧化限速酶基因敲除过程

采用酵母氯化锂转化法^[18], 将敲除盒转入热带假丝酵母。本研究以 F3YT 为出发菌株, 筛选标记基因是 *URA3* 基因, 将 *URA3* 基因构建入敲除盒, 转化后转化子将在 MM 固体培养基上生长, 培养时间为 3 d, 需要提取基因组, 通过 PCR 验证鉴定出正确转化子; 正确转化子在 5-氟乳清酸培养基上弹出标记基因, 培养时间为 4 d, 生长出的转化子, 通过 PCR 验证基因组,

确保菌株弹出 *URA3* 后, PCR 产物进行测序, 保证序列比对无误, 然后保藏为正确的菌株; 本研究重复利用筛选标记 *URA3*^[19]。具体敲除过程以 *POX4* 基因敲除过程为例如图 2, *POX5* 基因敲除过程是 *POX5* 基因敲除盒连续敲除 2 次。

1.4 酵母细胞在单一碳源培养基上的点滴生长情况

生长平板点滴实验参照文献[20]。生长平板点滴实验: 野生型 U-204、F3YT、F4PT 菌株进行划线活化, 接单菌落到 SM 培养基, 菌浓度控制 $OD_{600}=10$, 用 0.9% 生理盐水清洗菌体 2 次, 分别稀释 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 倍, 点滴 10 μ L 在单一碳源固体培养基上。在 30 $^{\circ}$ C, 菌株以葡萄糖为碳源培养基上生长 2 d, 或以正十二烷、正十四烷、月桂酸甲酯、肉豆蔻酸甲酯为碳源的培养基上生长 3 d。热带假丝酵母菌体呈现白色, 通过菌苔进行分辨并且记录菌体的生长情况。

生长曲线实验: 野生型 U-204、F3YT 和 F4PT 接种在 SM 培养基中培养过夜, 控制种子液 $OD_{600}=10$ 时, 接种量为 0.5%, 接入 50 mL SM 培养基中。在 30 $^{\circ}$ C, 每隔 4 h 测定一次 OD_{600} , 制成相应的生长曲线。

1.5 摇瓶发酵实验

摇瓶发酵方法参照文献[3], 将菌株 U-204、F3YT、F4PT 划线活化, 接单菌落到 20 mL YPD 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 2 d; 接着以 2% (V/V)接种量转接到 30 mL YPD 培养基在 500 mL 锥形瓶中培养, 同时加入 2% (V/V)正十二烷或 2% (V/V)月桂酸甲酯培养 2 d; 然后以 10% (V/V)接种量转接至发酵培养基中, 接种 12 h 后开始生物转化阶段, 加入 3% (V/V)正十二烷或 2% (V/V)月桂酸甲酯, 30 $^{\circ}$ C 培养 4 d, 每株菌 3 个生物学平行; 发酵开始后, 整个过程用 2 mol/L NaOH 和 2 mol/L H_2SO_4 将 pH 调至 7.0, 每隔 24 h 补加 2.5% (V/V)甘油(50% (V/V))。

1.6 发酵产物中羟基脂肪酸的检测

混标配制方法：准确称取 12-羟基十二酸、十二烷二酸、14-羟基十四酸、十四烷二酸各 10 mg，都溶解在 1 mL 色谱级乙醇中，配制成终浓度为 10 mg/L 的标准品。

样品配制方法^[4]：30 mL 发酵液中加入 2 mol/L H_2SO_4 ，酸化至 pH 1.0，与 60 mL 萃取液[二氯甲烷：甲醇=2:1(V/V)]混匀于锥形瓶中，通过 8 000 r/min 冷冻离心，吸取 10 mL 下层萃取液加入旋蒸瓶中，在 40 °C 下旋蒸 10 min，使用

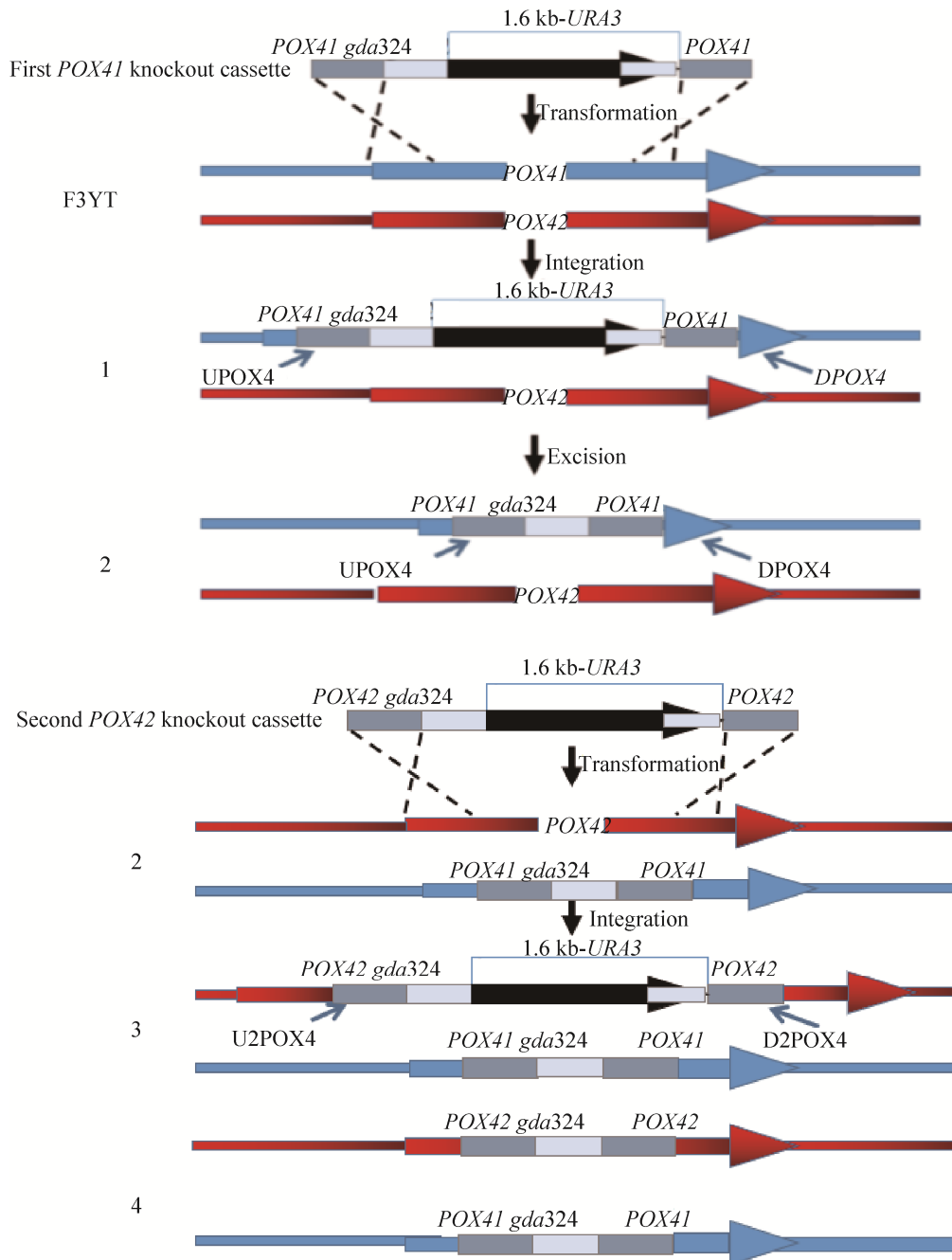


图 2 热带假丝酵母的 *POX4* 基因敲除流程图

Figure 2 Sequential gene disruption of *POX4* in *C. tropicalis*.

2 mL 色谱级乙醇复溶, 统一稀释 10^4 制成样品。

最后通过液质联用仪检测发酵产物, 液质联用检测采用文献[21]方法。

产物转化率按照公式(1)计算:

$$n_1/n_2=(m_1/M_1)/(m_2/M_2) \quad \text{式(1)}$$

其中, n_1 : 产物的摩尔量, n_2 : 底物的摩尔量, m_1 : 产物的质量, M_1 : 产物的摩尔质量, m_2 : 底物的质量, M_2 : 底物的摩尔质量。

2 结果与分析

2.1 *POX* 基因突变株的构建

采用来自实验室 *POX4*、*POX5* 基因敲除盒质粒 Ts-*POX41-gda324-URA3*、Ts-*POX42-gda324-URA3* 和 Ts-*POX5-gda324-URA3*^[17]。参考上述重组质粒为模板, 通过 PCR 扩增相应的敲除盒片段, 如图 3A 泳道 1, 将纯化后的删除盒片段转入目标菌株 F3YT 中, 生长出的菌株使用上下游引物 *UPOX4* 和 *DPOX4* 进行基因组验证, 如

图 3B, 初步验证泳道 1 为正确转化子菌株 F1PT(*URA3*⁺), 通过 PCR 产物测序验证为正确的转化子, 将转化子接种于 SM 培养基中, 再涂布于 5-氟乳清酸固体培养基上, 长出的转化子, 再使用上下游引物 *UPOX4* 和 *DPOX4* 进行基因组 PCR, 验证泳道 2 为菌株 F1PT(*URA3*⁻), 通过 PCR 产物测序验证为 *URA3* 标记弹出菌株, 泳道 A₁ 为 U-204 出发菌株; 反复经过上述的过程, 分别再构建出菌株 F2PT、菌株 F3PT、菌株 F4PT。

2.2 *FAO* 和 *POX* 基因敲除对细胞的生长影响

U-204 为本实验的对照菌株(*URA3* 基因缺陷型菌株), F3YT 为本实验出发菌株(*URA3* 和 *FAO* 基因缺陷型菌株), 通过同源重组的方法构建菌株, 得到菌株 F4PT 为本实验目的菌株(*URA3*、*FAO*、*POX* 基因缺陷型菌株)。分析这 3 株菌体在葡萄糖、正十二烷、正十四烷、月桂酸甲酯、肉豆蔻酸甲酯 5 种单一碳源下的生长情况。

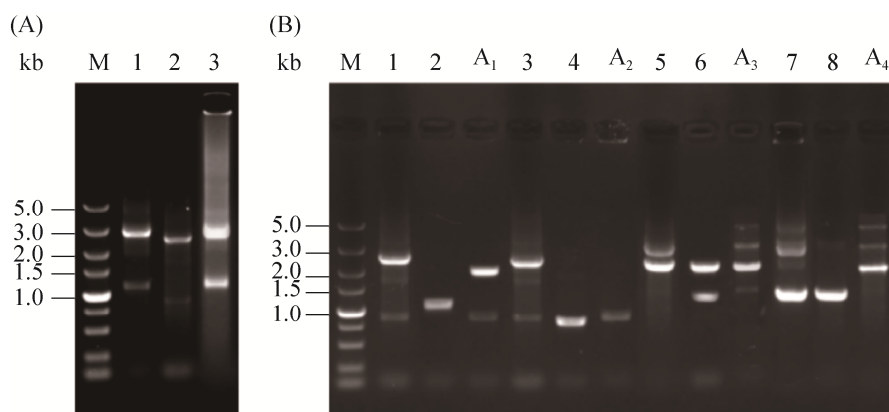


图 3 *POX* 基因缺失菌株的构建

Figure 3 Construction of a gene deletion strain of *POX* gene. A: knockout cassettes. M: DL 5kb DNA Maker; 1: plasmid Ts-*POX41-gda324-URA3* PCR products; 2: plasmid Ts-*POX42-gda324-URA3* PCR products; 3: plasmid Ts-*POX5-gda324-URA3* PCR products. B: *POX4* gene disruption, M: DL 5kb DNA Maker. 1–A₁ are PCR products of primers *UPOX4* and primers *DPOX4*, the templates are F1PT(*URA3*⁺), F1PT(*URA3*⁻), U-204, respectively; 3–A₂ are the PCR products of primers *U2POX4* and primers *D2POX4*, the templates are F2PT(*URA3*⁺), F2PT(*URA3*⁻), U-204, respectively; 5–A₃ are PCR products of primers *UPOX5* and primers *DPOX5*, the templates are F3PT(*URA3*⁺), F3PT(*URA3*⁻), U-204, respectively; 7–A₄ are PCR products of primers *UPOX5* and primers *DPOX5*, and the templates are F4PT(*URA3*⁺), F4PT(*URA3*⁻), U-204, respectively.

平板稀释培养结果如图 4 所示。以葡萄糖为碳源时，U-204、F3YT、F4PT 的生长依次递减，说明基因的缺失会使重组菌株生长变缓；F3YT 以十四烷和肉豆蔻酸甲酯为碳源的生长好于以十二烷和月桂酸甲酯为碳源的生长，说明十四碳

底物更利于菌株的生长；F4PT 菌株在十四碳底物中的生长明显好于十二碳底物中的生长，说明在缺失 *FAO* 和 *POX* 基因的同时，不同碳链长度的底物会影响菌株的生长。

不同重组菌的液体培养生长性能如图 5 所

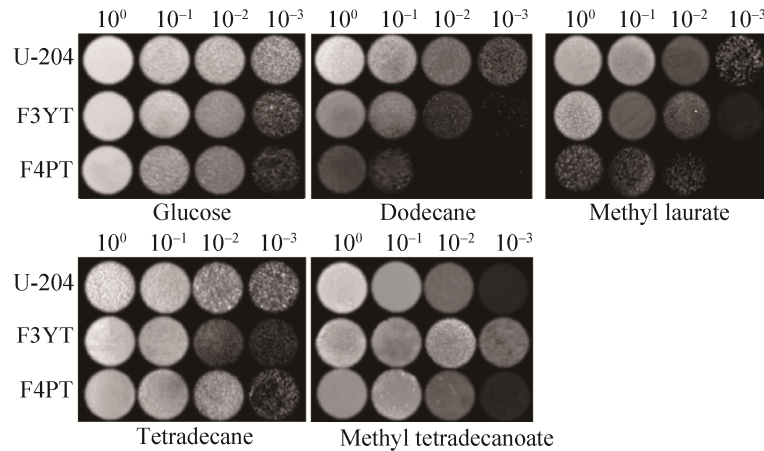


图 4 对照菌株与基因缺失突变体在不同碳源固体培养基上的生长

Figure 4 Growth of control strain and mutants on solid medium with different carbon sources.

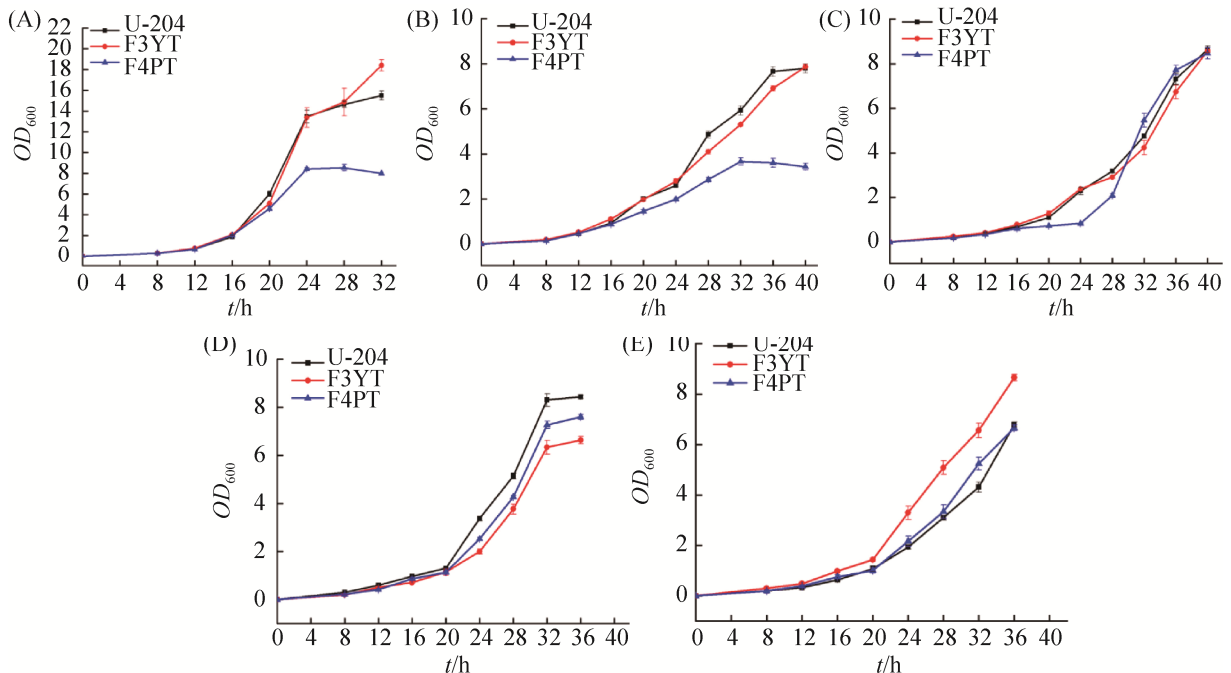


图 5 对照菌株与基因缺失突变体在不同碳源液体培养基上的生长

Figure 5 Growth of control strain and mutants on liquid medium with different carbon sources. A: Glucose as a single carbon source; B: Dodecane as a single carbon source; C: Methyl laurate as a single carbon source; D: Tetradecane as a single carbon source; D: Methyl myristate as a single carbon source; error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

示。在不同碳源培养基上如图 5A, 敲除多个基因的 F4PT 菌株的生长速率明显低于其他菌株, 说明基因累积敲除会影响重组菌株的生长。F4PT 以十二烷与月桂酸甲酯为唯一碳源的生长速率差距较大(图5B、C), 而以十四烷与肉豆蔻酸甲酯为唯一碳源的生长速率差距较小(图 5D、E), 反映出重组菌株对十四碳底物的耐受性较强。图 5E 中 F3YT 的生长速率明显快于图 5D 中 F3YT 生长速率, 由图 1 可知, 脂肪酸甲酯代谢比烷烃代谢少 3 步氧化反应, 因此证明以烷烃或脂肪酸为碳源时的生长情况不同。U-204、F3YT、F4PT 在不同碳源的液体培养生长性能与平板稀释培养实验(图 4)的结果相一致。

这些结果表明, 连续敲除基因确实能对重组菌株有一定的生长影响; 另一方面证实了 *FAO* 限速酶基因在 ω -氧化中参与了烷烃或脂肪酸的氧化, 但是还有其他限速酶基因也对烷烃或脂肪酸代谢有影响; 以葡萄糖为唯一碳源时, 菌株有明显的生长差距, 以烷烃或者脂肪酸甲酯(C_{12} 、 C_{14})为唯一碳源时, 十二碳底物和十四碳底物的生长速率各不相同, 说明菌株对不同碳链长度的底物有一定的适应差异。

2.3 *FAO* 基因和 *POX* 基因缺失对生产中链 ω -羟基脂肪酸的影响

经过 4 d 发酵, 通过对发酵液的萃取旋蒸处理, 将混标与待测样品同时采用液质联用仪进行检测, 结果如图 6 所示, 图 6A 中混标含有 12-羟基十二酸和十二烷二酸, 出峰时间分别为 5.02 min、4.68 min; 图 6C 中混标含有 14-羟基十四酸和十四烷二酸, 出峰时间分别为 5.61 min、5.81 min。

如图 1 所示, 热带假丝酵母中有强大的 β -氧化体系, 通过对其 β -氧化途径的阻断, 再敲除 ω -氧化中限速酶基因 *FAO*, 可以达到累积产物 ω -

羟基脂肪酸的目的。热带假丝酵母代谢烷烃或脂肪酸途径中所有代谢产物最后都进入 TCA 循环, 产生菌体所需的能量, 当敲除 *POX* 基因阻断了 β -氧化时, 会积累二元酸, 同时再累积敲除 ω -氧化中的 *FAO* 基因, 获得重组菌株 F4PT 进行发酵实验, 可以验证是否产生 ω -羟基脂肪酸。

由图 7A、B 可知, 以月桂酸甲酯为底物时, 重组菌株 F4PT 有无挡板都能产生大量次要产物十二烷二酸, 无挡板和有挡板摇瓶的十二烷二酸产量分别为 16.53 g/L、19.67 g/L, 转化率分别为 67.78%、80.23%, 而 12-羟基十二酸的产量最高达到 3.01 g/L, 转化率为 11.44%, F4PT 并不能很大程度提升 12-羟基十二酸的产量, 说明 *FAO* 基因代谢十二碳底物的能力不强。

由图 7C、D 可知, 以肉豆蔻酸甲酯为底物时, F4PT 无挡板产生较少次要产物十四烷二酸, 产量为 3.67 g/L, 转化率为 12.25%, 但是 14-羟基十四酸的产量也很低, 只有 0.87 g/L, 然而当 F4PT 有挡板发酵时, 十四烷二酸和 14-羟基十四酸产量都明显提升, 十四烷二酸产量为 11.4 g/L, 相较于十二烷二酸产量, 14-羟基十四酸最高产量达到 8.69 g/L, 转化率为 33.14%, 说明重组菌株 F4PT 代谢底物时需要大量的氧气, 同时产物 14-羟基十四酸也达到了快速积累, 并且菌株在氧化十四碳底物时的效率明显高于十二碳底物。

发酵实验表明, *POX* 基因的敲除确实能大量累积二元酸, *FAO* 基因的限速作用在不同碳链长度的底物中各有差异; ω -羟基脂肪酸在有挡板摇瓶培养时的产量明显高于无挡板摇瓶的产量, 并且会呈现较大的底物差异, 说明热带假丝酵母在发酵过程中溶氧要求较高; 有挡板条件下, F4PT 的 14-羟基十四酸的产量明显高于 12-羟基十二酸, 产量分别为 3.01 g/L 和 8.69 g/L, 转化率分别为 33.14%和 11.44%, 14-羟基十四

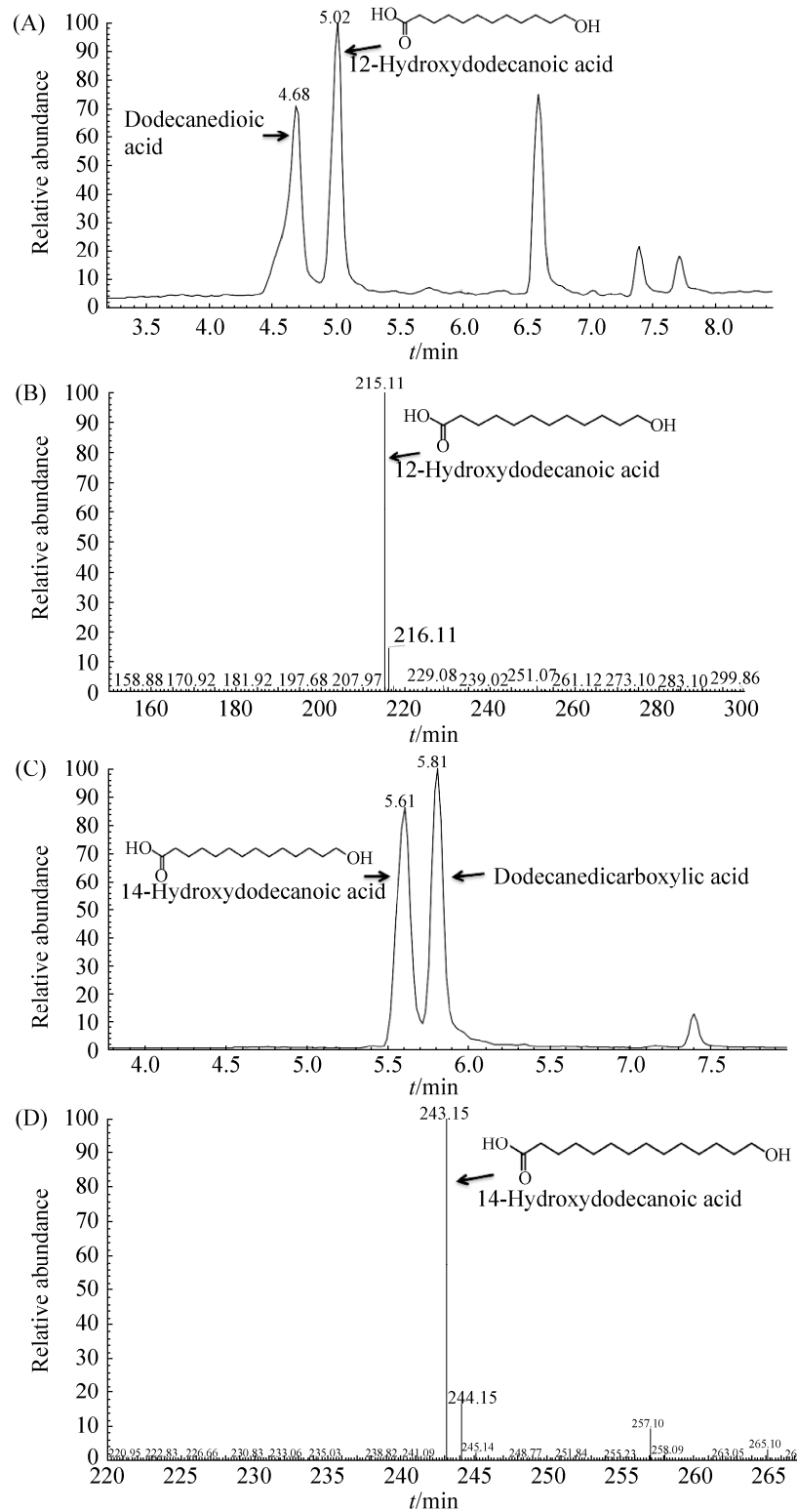


图 6 液质联用分析发酵产物

Figure 6 LC-MS analysis of fermentation products. A: LC of 12-hydroxydodecanoic acid and dodecanedioic acid; B: MS of 12-hydroxydodecanoic acid; C: LC of 14-hydroxytetradecanoic acid and dodecanedicarboxylic acid; D: MS of 14-hydroxytetradecanoic acid.

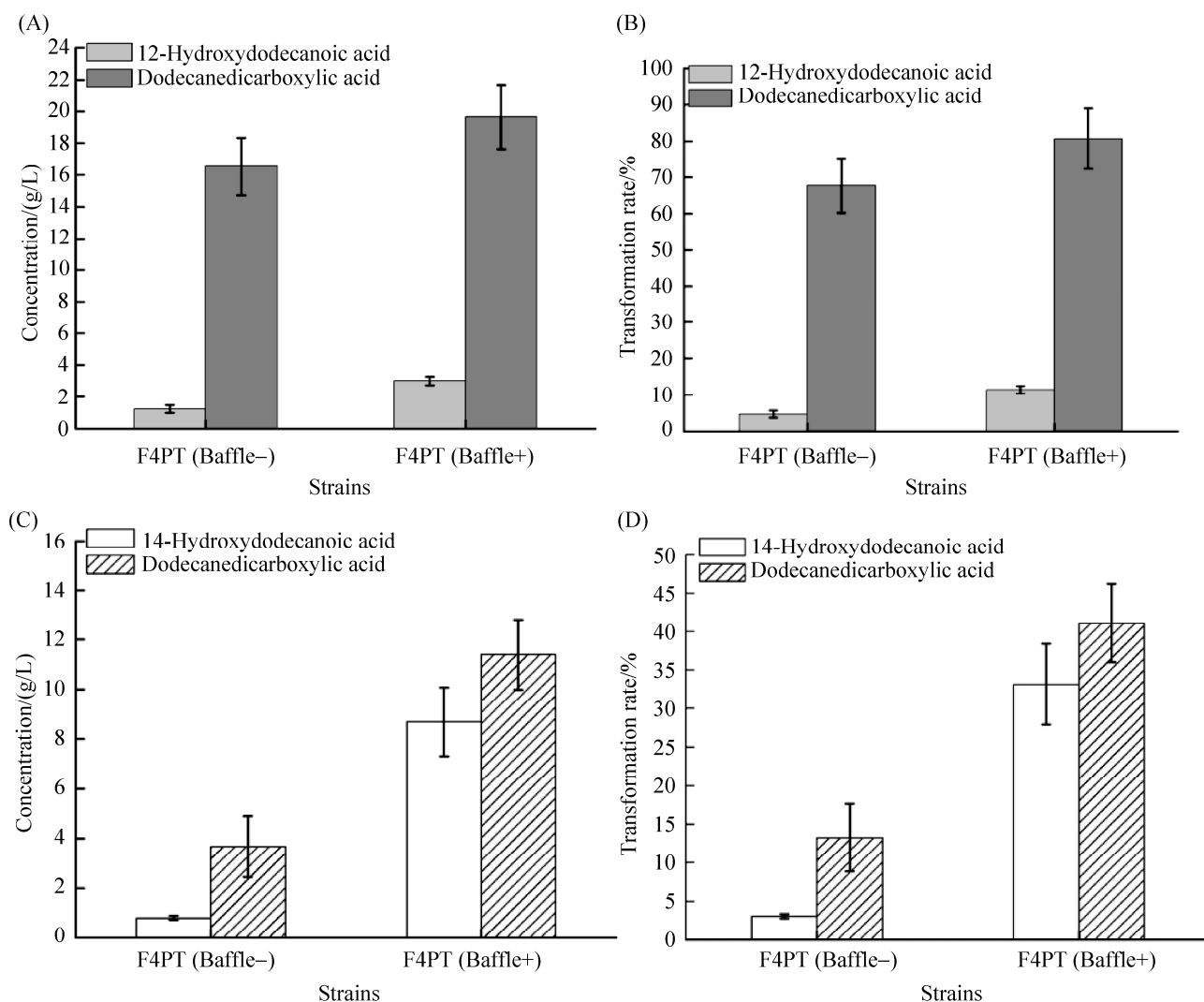


图 7 F4PT 在月桂酸甲酯和肉豆蔻酸甲酯为底物的发酵培养基中的产量及转化率

Figure 7 The yield and conversion rate of F4PT in fermentation medium with methyl laurate and methyl myristic acid ester as substrates. A: concentration of 12-hydroxydodecanoic acid under the substrate of methyl laurate; B: transformation rate of 12-hydroxydodecanoic acid under the substrate of methyl laurate; C: concentration of 14-hydroxytetradecanoic acid under the substrate of methyl myristate; D: transformation rate of 14-hydroxytetradecanoic acid under the substrate of methyl myristate; baffle- represents shake flask without baffle; baffle+ represents shake flask with baffle; error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

酸的转化率是 12-羟基十二酸的将近 3 倍,说明构建的菌株 F4PT 代谢十四酸甲酯的能力相对于十二酸甲酯更为快速。

3 讨论

长链二元酸是热带假丝酵母代谢烷烃或脂

肪酸的最终产物,具有良好的市场前景,而 ω -羟基脂肪酸是其代谢中间产物,但在生物医药领域应用前景更为广泛,物化性能更占优势^[22],因此定向将脂肪酸甲酯转化成 ω -羟基脂肪酸,具有重要的研究意义。目前,国内外研究主要集中在产羟基脂肪酸的菌种筛选或代谢工程改

造方面,工业化生物技术路线生产羟基脂肪酸的报道较少。最近的研究主要通过成功表达细胞色素 P450 单加氧酶基因,从葡萄糖为碳源出发,直接生成 ω -羟基脂肪酸和二元酸,但是产量较低^[23]。本研究通过对热带假丝酵母菌株的限速酶基因改造,以脂肪酸甲酯(C₁₂、C₁₄)为碳源,高效合成 ω -羟基脂肪酸。

热带假丝酵母可以利用烷烃和脂肪酸通过生物氧化来合成从 C₁₁ 到 C₁₈ 的长链二元酸, α,ω -氧化形成的脂肪酸都会进入 β -氧化途径^[24]。Picataggio 等研究发现在以烷烃为碳源的培养基中,对 *POX4* 和 *POX5* 这两对等位基因进行敲除,构建的突变株产生的二元酸的积累量明显增加^[14]。刘树臣等用十二烷发酵,十二烷对二元酸的分子转化率为 100%,说明 *POX4*、*POX5* 基因的缺失必然会积累二元酸^[11]。因此本研究在敲除 *FAO* 基因的基础上,敲除 *POX4*、*POX5* 基因,就能阻断 β -氧化的进行,另一方面 *FAO* 基因的限速能使 ω -羟基脂肪酸积累。

本研究重复使用 *URA3* 基因作为选择标记^[17],成功构建出的菌株 F4PT 为 *FAO* 基因、*POX* 基因双缺失,并对基因功能进行相应验证。根据发酵结果显示,达到了阻断 β -氧化,限速 ω -氧化的目的,重组菌株能够累积目标产物 ω -羟基脂肪酸,但也大量积累了二元酸;其中 14-羟基十四酸的产量明显高于 12-羟基十二酸的产量,说明 ω -氧化途径中,存在其他限速酶控制氧化不同碳链脂肪酸的能力。

本研究提供了从脂肪酸甲酯直接氧化到 ω -羟基脂肪酸高转化率的可能,也说明了重组菌株对不同碳链脂肪酸甲酯的代谢能力差异,为代谢途径中改造其他限速酶基因,以达到定向转化特定目标产物提供了相应的依据与可能性。

参考文献

[1] Kim SK, Park YC. Biosynthesis of ω -hydroxy fatty

acids and related chemicals from natural fatty acids by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(1): 191–199.

- [2] Burgal J, Shockey J, Lu CF, Dyer J, Larson T, Graham I, Browse J. Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6(8): 819–831.
- [3] Craft DL, Madduri KM, Eshoo M, Wilson CR. Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to α,ω -dicarboxylic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 5983–5991.
- [4] Lu W. Biosynthesis of monomers for plastics from renewable oils. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(43): 15451.
- [5] Kuo TM, Nakamura LK, Lanser AC. Conversion of fatty acids by *Bacillus sphaericus*-like organisms. *Current Microbiology*, 2002, 45: 265–271.
- [6] 李玲玲. 工程大肠杆菌制备 C16、C18 高级脂肪醇的研究. 四川农业大学学位论文, 2012.
- [7] Hara A, Arie M, Kanai T, Matsui T, Matsuda H, Furuhashi K, Ueda M, Tanaka A. Novel and convenient methods for *Candida tropicalis* gene disruption using a mutated hygromycin B resistance gene. *Archives of Microbiology*, 2001, 176(5): 364–369.
- [8] 程树培, 崔益斌, 童中华, 马文漪, 丁树荣. 酿酒酵母与热带假丝酵母融合子多功能性研究. 环境污染与防治, 1995, 17(1): 9–12.
Cheng SP, Cui YB, Tong ZH, Ma WY, Ding SR. Study on the versatility of the fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis*. *Environmental Pollution & Control*, 1995, 17(1): 9–12. (in Chinese)
- [9] Shen W, Wang ZX, Rao ZM, Zhuge J, Zhuge B. A genetic transformation system based on *trp1* complementation in *Candida glycerinogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(4): 1005–1008.
- [10] Zhang FW, Qiao D, Xu H, Liao C, Li SL, Cao Y. Cloning, expression, and characterization of xylose reductase with higher activity from *Candida tropicalis*. *Journal of Microbiology*, 2009, 47(3): 351–357.
- [11] 刘树臣, 焦鹏, 曹竹安. 热带假丝酵母代谢烷烃过程中的 β -氧化和代谢调控. 微生物学报, 2002, 42(1): 125–128.
Liu SC, Jiao P, Cao ZA. Metabolism and β -oxidation of alkane-utilizing *Candida tropicalis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(1): 125–128. (in Chinese)

- [12] 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. 江南大学学位论文, 2016.
- [13] 何峰, 陈远童. 热带假丝酵母正烷烃代谢研究及代谢工程方法进展. 微生物学通报, 2006, 33(2): 109–113.
He F, Chen YT. Advance in metabolism of n-alkane and metabolic engineering of *Candida tropicalis*. *Microbiology China*, 2006, 33(2): 109–113. (in Chinese)
- [14] Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, Lanning D, Reynolds R, Mielenz J, Dudley Eirich L. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. *Bio/Technology*, 1992, 10(8): 894–898.
- [15] Hara A, Ueda M, Matsui T, Arie M, Saeki H, Matsuda H, Furuhashi K, Kanai T, Tanaka A. Repression of fatty-acyl-CoA oxidase-encoding gene expression is not necessarily a determinant of high-level production of dicarboxylic acids in industrial dicarboxylic-acid-producing *Candida tropicalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(3/4): 478–485.
- [16] 张海冰, 张利华, 陈献忠, 沈微, 樊游. 脂肪醇氧化酶基因缺失对热带假丝酵母生理功能的影响. 生物加工过程, 2021, 19(1): 23–31.
Zhang HB, Zhang LH, Chen XZ, Shen W, Fan Y. Effect of fatty alcohol oxidase genes disruption on physiological function of *Candida tropicalis*. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2021, 19(1): 23–31. (in Chinese)
- [17] 张利华, 陈献忠, 陈振, 沈微, 樊游. 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. 食品与生物技术学报, 2018, 37(8): 880–887.
Zhang LH, Chen XZ, Chen Z, Shen W, Fan Y. Carnitine acetyltransferase gene disruption and function analysis in *Candida tropicalis*. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2018, 37(8): 880–887. (in Chinese)
- [18] 项崢, 陈献忠, 张利华, 沈微, 樊游, 陆茂林. 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. 遗传, 2014, 36(10): 1053–1061.
Xiang Z, Chen XZ, Zhang LH, Shen W, Fan Y, Lu ML. Development of a genetic transformation system for *Candida tropicalis* based on a reusable selection marker of *URA3* gene. *Hereditas*, 2014, 36(10): 1053–1061. (in Chinese)
- [19] Bryce Wilson R, Davis D, Enloe BM, Mitchell AP. A recyclable *Candida albicans URA3* cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast*, 2000, 16(1): 65–70.
- [20] Iwama R, Kobayashi S, Ohta A, Horiuchi H, Fukuda R. Alcohol dehydrogenases and an alcohol oxidase involved in the assimilation of exogenous fatty alcohols in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, 2015, 15(3): 1.
- [21] Binding N, Jaschinski S, Werlich S, Bletz S, Witting U. Quantification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxin) by GC-MS determination of 3-hydroxy fatty acids. *Journal of Environmental Monitoring*, 2004, 6(1): 65–70.
- [22] Bowen CH, Bonin J, Kogler A, Barba-Ostria C, Zhang FZ. Engineering *Escherichia coli* for conversion of glucose to medium-chain ω -hydroxy fatty acids and α , ω -dicarboxylic acids. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(3): 200–206.
- [23] Cheng Q, Sanglard D, Vanhanen S, Liu HT, Bombelli P, Smith A, Slabas AR. *Candida* yeast long chain fatty alcohol oxidase is a c-type haemoprotein and plays an important role in long chain fatty acid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2005, 1735(3): 192–203.
- [24] 高弘. 生物催化生产十三碳二元酸中 β -氧化途径的代谢调控. 清华大学学位论文, 2005.

(本文责编 张晓丽)