

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-041

纪念王义翘教授：解脂耶氏酵母替代植物油脂的技术瓶颈及展望

徐鹏^{1, 2}

(¹广东以色列理工学院化学工程系, 广东 汕头 515063; ²马里兰州巴尔的摩分校化学、生化与环境工程系, 马里兰州 巴尔的摩 21250, 美国)

摘要: 构建细胞农业经济是解决资源短缺、降低温室气体排放、延缓全球变暖和实现可持续性经济发展的重要手段之一。微生物细胞工厂具有易于遗传改造、便于工程放大和高效利用可再生资源的优势, 成为了现代生物制造的重要组成部分。王义翘教授是现代生化工程技术的开创者和奠基人, 本人及同事(乔康健博士、胡鹏博士、周康博士等人)在Stephanopoulos实验室所从事的构建油脂细胞工厂的工作, 受益于王先生在MIT所创建的生物工程技术中心。植物油脂具有2000多亿美元的年均市场需求, 本文从植物油脂需求激增所造成的负面环境效应出发, 分析了目前植物油脂的市场供应现状。产油酵母细胞工厂具有替代植物源油脂的巨大潜能。本文围绕产油酵母的代谢工程遗传改造策略, 总结了如何提高碳源转化率、油脂产量、油脂生产速率和菌体生长适用性; 进一步归纳了构建高效解脂耶氏酵母细胞工厂的主要技术瓶颈, 其中包括产油菌株的高通量筛选和表型鉴定技术、产油酵母的代谢调控机制和发酵动力学模型等。作者进一步探讨了以蔗糖作为原材料, 生产植物源功能性油脂的经济可行性和技术可行性。作者预测解脂耶氏酵母具有极大的潜力, 可以解决当前高附加值油脂(比如用于巧克力生产的可可脂, 潜在市场为500亿美元)的市场需求。开发产油酵母微生物资源, 提供健康的功能性油脂, 将会解决一系列能源、健康食品和环境资源等问题, 促进我们迈向低碳性和可持续性的经济运转模式。

关键词: 细胞工厂; 代谢工程; 产油酵母; 植物源可替代油脂; 细胞农业经济; 可持续性发展

中图分类号: Q81 文献标志码: A

In memory of Prof. Daniel I.C. Wang: Engineering *Yarrowia lipolytica* for the production of plant-based lipids: technical constraints and perspectives for a sustainable cellular agriculture economy

XU Peng^{1, 2}

(¹Department of Chemical Engineering, Guangdong-Technion, Israel Institute of Technology, Shantou 515063, Guangdong, China; ²Department of Chemical, Biochemical and Environmental Engineering, University of Maryland, Baltimore County, Baltimore, MD 21250, USA)

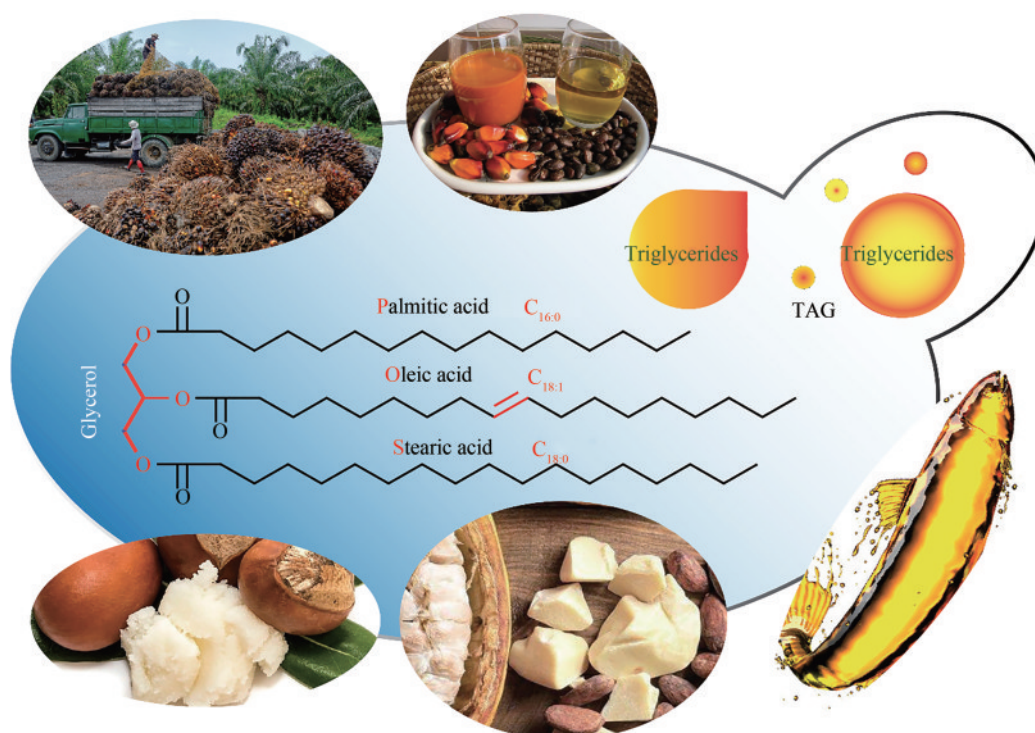
Abstract: Developing cellular agriculture economy is one of the solutions to mitigate resource limitation, reduce

收稿日期: 2021-04-03 修回日期: 2021-05-12

引用本文: 徐鹏. 纪念王义翘教授: 解脂耶氏酵母替代植物油脂的技术瓶颈及展望[J]. 合成生物学, 2021, 2(4): 509-527

Citation: XU Peng. In memory of Prof. Daniel I.C. Wang: Engineering *Yarrowia lipolytica* for the production of plant-based lipids: technical constraints and perspectives for a sustainable cellular agriculture economy[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(4): 509-527

greenhouse gas emission, slow down global warming as well as achieve true sustainability. Microbial cell factory has become a critical component to advance biomanufacturing due to the availability of versatile genetic tools, ease scale-up and the high conversion efficiency of low-cost renewable feedstocks. Prof. Daniel I. C. Wang was one of the trailblazers and founders of biochemical engineering, who built and led the Biotechnology Process Engineering Center (BPEC) at MIT. When I and my colleagues worked as postdoc associates and research scientists in Prof. Stephanopoulos' lab, part of our work on engineering oleaginous yeast cell factory was a direct result of the analytical, imaging and cell culture facility at BPEC. Plant-based oil and fats have an overall market value about \$200 billion. Recently, the world has seen a craving for plant oil products, which negatively impacted our environment due to massive-scale deforestation and loss of ecological diversity in tropical regions. We thought oleaginous yeast could be a solution to this problem. Centering around the important genetic targets of the oleaginous species *Yarrowia lipolytica*, we summarized the essential metabolic engineering strategies for improving the carbon conversion efficiency (yield), lipid titer, lipid production rate (productivity) and cell growth fitness. We further analyzed technical constraints that limit our ability to build high oil-yielding yeast cell factory, including high throughput strain screening or phenotyping techniques, the incomplete understanding of the lipogenesis and underlying regulatory mechanism, as well as the lack of well-defined biochemical models to guide bioprocess optimization and scale-up. Further we discussed the technical and economic feasibility of converting sugarcane feedstock to high value plant-based lipids with metabolically engineered *Y. lipolytica*. Our analysis indicates that *Y. lipolytica* has a great potential to address the current market gap of high value plant-based fats (*i.e.* cocoa butter equivalent to make chocolate with a potential market of \$50 billions). Engineering oleaginous yeast to provide plant-based healthy fats will help us address energy, foods, environment and resource challenges, which will surely move us one step closer to a society of low-carbon footprint and sustainable economy.



Graphic Table of Content

Keywords: microbial cell factory; metabolic engineering; oleaginous yeast; plant-based alternative fats; cellular agriculture economy; sustainable development

1 追忆王义翘教授

王义翘先生出生于1936年的南京，正值日军全面侵华前夕，风雨飘摇的故国六朝之都也给先生少年阶段的成长烙下了家国的印记。他的父亲王守竞先生（1904—1984）早年留学美国，是近代史上最早从事量子物理研究的中国人，1926年在哥伦比亚大学取得理论物理博士学位。1929年夏，王守竞先生学成归国，担任国立浙江大学教授、物理系主任，随后组建中国物理学会。1936年，王守竞先生被国民政府任命为少将专员，负责筹建中央机器厂，主要研发大型发电机和大型汽轮机军事装备。抗战胜利后，少年的王义翘也随家人侨居美国马塞诸塞州的波士顿，其父亲加入了美国国防部与麻省理工学院共建的林肯国家实验室，任职科学家。随后王先生入读MIT，1959年和1961年分别取得化学工程的学士学位和硕士学位。1963年在宾夕法尼亚大学取得化学工程博士学位，师从生化工程先驱 Arthur Humphrey 教授。王先生早期著述集中于抗生素通风发酵过程的物质传递、过程放大及生化动力学等工程学领域，为 Merck 制药早期抗生素工艺的开发奠定了基础。1965年起，王先生开始在麻省理工学院化学工程系和生物工程系任教，于1985年创建了生物工程技术中心（Biotechnology Process Engineering Center, BPEC），担任中心主任。1986年当选美国国家工程院院士，1996年成为麻省理工学院资深学院教授（MIT Institute Professor）之一（麻省理工学院最高荣誉）。

王先生一生在MIT从教、授业55余年，兢兢业业，几乎从未退休。我2013年开始在MIT的化工系从事博士后课题研究，经常与王先生课题组的博士后研究员交流。我的课题研究也受益于王先生早年创建的生物工程技术中心。我有幸担任过MIT暑期课程“发酵工程”的助教（当时王先生年事已高，由MIT其他老师授课），王先生的“发酵工程”开课50余年来，其学术思想也浸润了几千位生物制药领域的前沿科学家和精英工程师。在MIT 56号楼和一些校内报告厅，以及美国化学工程师学会（AIChE）年会期间，我有幸与

王先生有过几次偶遇，王先生讲话幽默风趣，热爱中华传统文化和中式美食，对晚辈后生爱护有加。犹记得，2015年夏天，“发酵工程”课程结业时，王先生坐着轮椅，与来自世界各地的50多位毕业学员亲切交谈，对晚辈后生爱护之情溢于言表。傍晚的查尔斯河畔凉风习习，杨柳依依，毕业晚宴上大家畅谈学术理想，共享中式美食和波士顿龙虾……

1985年后，王先生的主要研究方向由微生物研究转入了动物细胞培养，成为了最早研究动物细胞培养和生物大分子制药（抗体蛋白等）的先驱科学家之一。王先生一生桃李满天下，其弟子门生遍布美国和东亚地区，很多人都成为业界翘楚，创建了各种类型的生物科技公司，比如 Biogen、Moderna、义翘神州科技、Genentech 的创立都与王先生及其弟子的指导密切相关，王先生也受聘于50多家生物制药公司担任科技咨询顾问。王先生的学生 Noubar B. Afeyan 博士目前担任旗舰先锋创投（Flagship Pioneering Venture）公司的总裁，是生物制药新锐 Moderna 及其他38家生物科技公司的创始人；Johnathan Dordick 博士是伦斯勒理工学院的讲席教授（美国工程院院士），创立了三家生物科技公司（ZenyMed、Solidus Biosciences Inc、Redpin Therapeutics）；陈超群博士（Chen Chau-Chyun）目前担任得州理工大学的讲席教授（美国工程院院士），是 Aspen 公司的创始人及副总裁；谢良志博士是义翘神州科技的创始人及总裁。

王先生一生著述丰厚，发表了230余篇科技论文^[1]，每一篇论文都脚踏实地，注重工程实践与基础理论的结合，为我们后世生物工程学者之楷模。鉴于王先生对生物工程技术的开创性工作，美国化学工程师学会（AIChE）、美国化学学会（ACS）以及MIT都设立了以王义翘先生名字命名的生化工程论坛，用以纪念王先生的卓越贡献。本人有幸蒙先生教诲，被提名并获取了2020年“生物工程与生物技术王义翘奖”（Biotechnology & Bioengineering Daniel IC Wang Award），于8月初在ACS年会发表获奖报告感言并回顾先生贡献，不想先生8月29日仙逝，心中无限悲戚，生化工程

领域陨落了一位世界级的学者和先驱，我们也痛失了一位学贯中西、德高望重的师长。王先生高风亮节，治学严谨，心怀家国，提携后进，为我辈楷模。此文总结的工作，很大程度上受益于王先生在MIT创建的生物工程技术中心；谨以此文，总结并展望我和同事在MIT所从事的主要工作，以寄托对先生的哀思，纪念先生的贡献。愿我们传承先生遗风，肩负先生的治学理念，解决关系国计民生的实际问题，为国为民，脚踏实地地推进生化工程领域的工作，不负先生的教诲。缪改前人诗作一首，以作对先生家世的感怀，与读者共勉：

不堪风雨乱红尘，
入山何处白云深。
故园咫尺千山路，
天涯犹有未归人。

（作者注：前两句出自国学大师南怀瑾的诗集，第三句源于清代词人郑板桥的《酷相思》，第四句出自明代文人徐燧的《寄弟》。）

2 引言

功能性油脂化合物与我们的日常生活息息相关。常见的功能性油脂化合物包括脂肪酸、羟基脂肪酸、脂肪醇、甘油三酯和磷酸甘油酯等（图1）。其结构共性为含有一个长链的脂肪酸骨架，由于碳链长度、不饱和度以及所携带的功能基团的差异，进而产生了油脂化合物独特的双亲特性（amphiphilic）、凝固点（freezing point）和热力学自组装（thermodynamic self-assembly）特性。众所周知，生物膜磷脂双分子层提供了生命存在的原始屏障和生物膜的流体动力学特性，使得细胞个体能够在不同环境条件下，与外界保持动态的物质交换平衡；不同温度和培养环境下，生物膜磷脂中脂肪酸的组分也迥异（在古菌等极端微生物中，细胞膜脂肪链以甘油醚的形式存在）。

功能性油脂广泛应用于食品营养、医药保健、美容护肤、动物饲料以及农业环保等诸多领域。 ω -3和 ω -6多不饱和脂肪酸，主要应用于婴幼儿奶粉，并有抗衰老、促进心血管健康等保健功效^[2]；

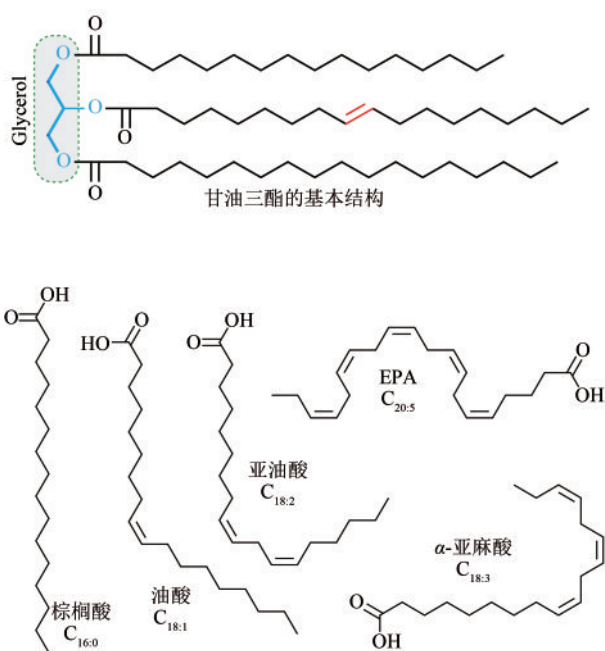


图1 油脂的分子结构及重要脂肪酸分子

Fig. 1 The basic structure of triglyceride and the four important fatty acids: palmitic acid (C_{16:0}), oleic acid (C_{18:1}), linoleic acid (C_{18:2}), eicosapentaenoic acid (EPA, C_{20:5}) and α -linolenic acid (ALA, C_{18:3}).

羟基脂肪酸可以用于药物传递载体以及聚合物单体；脂肪醇可用于保护涂层、润滑剂、乳化剂和化妆洗护用品领域。各种植物果实中的油脂（主要以甘油三酯的形式存在，比如棕榈油、大豆油、可可脂、橄榄油、葵花籽油和花生油等），由于其独特的结晶温度和凝固点，赋予了其独特的质地（texture）和口感（mouthful feeling），广泛用于食品、糖果、巧克力点心和美容护肤等领域。动物的结构性油脂（structuring fat）决定了大多数美食细腻丰富的口感，比如西班牙火腿、北京烤鸭、神户牛排和法国鹅肝等（图2），被视为肉类中的珍品，油脂对这些美食的风味及口感起到了不可替代的作用。黄油（butter）主要提炼自奶油，含有较多的短链脂肪酸，成为人们日常饮食中必备的材料。临床测试及运动医学表明，健康的脂肪酸饮食，尤其是多不饱和脂肪酸中 ω -3与 ω -6脂肪酸的比例，与抗炎、皮肤健康、增肌减肥和免疫等机体功能有直接的关联^[3]。

植物油脂的大量需求造成了热带雨林破坏，气候变迁、生态多样性的流失以及其他诸多环境



图2 油脂决定了一些肉类食物的口感

Fig. 2 Lipids determine the mouthful feeling of major meat products: Iberico ham, Peking roasted duck, Kobe beef and Foie gras.

和社会问题^[4-5]。微生物发酵不依赖于耕地和环境气候，能够高效转化农业废弃可再生资源（比如生物质纤维素等原材料），因此构建可持续性油脂微生物发酵平台是目前亟待解决的关键技术^[6-7]。产油解脂耶氏酵母近来备受代谢工程领域的青睐，其原因如下：培养条件简单，能够利用多种底物（包括挥发性有机酸及脂肪烃和石蜡等化合物）快速生长^[8-9]，无Crabtree效应（不产乙醇）^[10]，基因组中内含子密度低，便于遗传操作，遗传工具特别是近年来基于Cas9^[11]或者Cpf1^[12-15]的基因编辑工具以及Golden-gate^[16-19]和YaliBrick^[20-21]克隆方法的开发，众多分子转录元件的鉴定^[22-23]，以及基于Cre-LoxP位点的多轮基因整合技术的实现^[24]，使得解脂耶氏酵母成为了微生物油脂积累研究工作的新宠，解脂耶氏酵母也成为了生产单细胞油脂及衍生物的首选底盘宿主^[25-26]。本文将从植物油脂的市场近况出发，引导读者认识到目前油脂供应链所面临的可持续发展等严峻问题，以及发展微生物油脂转化平台的严重性和迫切性；围绕产油酵母的高通量筛选及表型鉴定、碳源转化率（yield）、发酵滴度（titer）、生产速率（productivity）、菌体生长适用性（fitness）、代谢调控和生化动力学模型等方面，作者将阐述关键的代谢工程及合成生物学策略，并对利用解脂耶氏酵母生产高附加值植物油脂的经济可行性与技术可行性进行展望。

3 棕榈油和可可脂需求激增所带来的负面环境效应及可持续发展问题

根据美国农业部的报道，全球每年的植物油需求量达到了2亿吨，并且每年以3%~4.5%的比例增长。棕榈油占据了全球植物油脂总量的40%，2020年全球棕榈油的需求量为8000万吨，主要用于食品饮料、能源、个人护理、化工原料以及医药等领域。棕榈油原材料的年销售额达到了800亿美元（棕榈油的价格大致为1000美元/吨）。其他大宗植物油包括菜籽油、花生油、玉米油和葵花籽油等。全球3/4的棕榈油产自东南亚地区的马来西亚以及印度尼西亚，棕榈油及棕榈园的开发成为当地的主要经济来源。自1985年以来，全球棕榈油的需求每年以6%~7%的比例增长，棕榈园的过分开发造成了热带雨林的破坏（deforestation）^[4-5]，例如加里曼丹岛（马来西亚称为婆罗洲岛，面积为75万平方公里，亚洲第一大岛，世界第三大岛）65%的热带雨林已经消失，进而导致当地气候变化和降雨减少，生态多样性的丧失、气候的变迁以及棕榈油产业带来的环境污染进而恶化当地的棕榈园经济，目前的农耕和育种技术仅能保证2%~3%的棕榈油产量增长，现实中一个严峻的问题是，全球每年仍有4%的棕榈油缺口（市值大概32亿美元）亟需用可替代的生物技术加以解决。

与棕榈油经济极为相似，全球可可脂的供应链也受到了极大的影响。全球80%的可可脂产自非洲中西部国家，包括科特迪瓦、加纳、喀麦隆和尼日利亚等。可可果（coconuts）中提取的可可脂是制造巧克力的主要成分，全球可可果（cocoa beans）目前年均采集量为500万吨，每吨可可果的价值在3300美元，可可果原材料市场价值为165亿美元，而成品巧克力销售额已经达到1310亿美元，到2025年，成品巧克力的市场预期在1800亿美元左右，目前可可果原材料的供应远不能达到市场的增量需求，造成了大约500亿美元成品巧克力的市场缺口。经营可可园也成为非洲中西部地区农民的主要经济来源，同样由于气候的变迁、降雨的减少，农耕技术的停滞不前，造成当地热带雨林的过量砍伐^[27-28]，进而导致当地经济与环境的恶化以及诸多社会伦理问题（比如因贫

困导致的儿童失学以及雇佣童工、奴工与男权盛行等社会问题)。为达成可持续性发展目标,世界主要巧克力生产商,包括玛氏(Mars)、雀巢(Nestlé)、德芙(Dove)、费列罗(Ferrero Rocher)、好时(Hersey's)、歌帝梵(Godiva)等公司均提出了未来5~10年用可持续性的可可脂完全替代传统可可脂的发展蓝图。

从上述棕榈油和可可脂的产量及未来市场预期,我们可以得出如下结论:植物油脂的供应已经成为了全球经济可持续发展的瓶颈之一。为了保证经济的可持续性发展及解决当地的环境资源问题,解脂耶氏酵母优良的产油性能,将为我们实现高效细胞农业经济(cellular agriculture economy)提供可能。因此,揭示产油酵母油脂合成的生化过程及代谢调控机制,构建可持续的微生物油脂平台,将能使我们较少依赖棕榈园与可可园农业经济,进一步遏制热带雨林的滥伐以及降低温室气体的排放,由此将会带来巨大的环境和生态效益,促进可持续性的细胞农业经济的发展,也能够促进当地民生繁荣和早日实现全球碳达峰以及碳中和(carbon-neutrality)的目标。

4 构建解脂耶氏酵母油脂细胞工厂的代谢工程与生化工程策略

由于解脂耶氏酵母独特的乙酰辅酶A供应模式和不同代谢途径的精细分区,其合成malonyl-CoA和HMG-CoA的效率很高。以解脂耶氏酵母为平台,经代谢工程改造后,该酵母已经被用来生产一系列化合物,包括三乙酸内酯(triacetic acid lactone)^[29-30]、赤藓糖醇^[31]、脂肪醇^[32-33]、脂肪烃^[34]、 ω -3和 ω -6多不饱和脂肪酸^[35]、黄酮^[36-38]、角鲨烯(squalene)^[39-41]、青蒿二烯(amorphadiene)^[42]、白藜芦醇(resveratrol)^[43-44]、对香豆酸(*p*-coumaric acid)^[44]以及具有玫瑰香味的2-苯乙醇^[44-45]、具有桃子香味的丁位癸内酯(δ -decalactone或 γ -decalactone)^[46-48]、具有抗肿瘤化疗价值的紫杆菌素(violacein)^[21, 44]、具有抗病毒作用的天然产物^[49]等高附加值化合物。由于细胞内

独特的油脂疏水环境和代谢途径的分区定位,解脂耶氏酵母尤其适合表达植物次级代谢产物的代谢途径^[10, 50],例如萜烯类化合物的合成需要特异性的细胞色素P450氧化还原酶,解脂耶氏酵母内质网和脂质体为P450的区位选择性和立体选择性以及高效电子传递提供了独特的微环境^[10, 50]。南京师范大学的黄和课题组^[51]、马里兰大学徐鹏课题组^[10]和清华大学的李春课题组^[52]已经对此内容进行了详细的总结,在此不做赘述。本文将对碳源与油脂转化率的关键因素,以及涉及解脂耶氏酵母代谢分区特异性的代谢工程策略进行讨论,阐明高产油脂解脂耶氏酵母的科学问题所在,以期广大代谢工程学者一起突破这一技术瓶颈,实现微生物油脂的可持续化生产。

4.1 胞质NADPH的供应决定了碳源转化率与油脂的产量

不同于酿酒酵母,解脂耶氏酵母细胞质中乙酰辅酶A主要来源于ATP:柠檬酸裂解酶。在碳源充足氮源饥饿状态下,细胞为了充分回收利用氮源,AMP脱氨酶活性增强,将细胞内AMP转化为肌苷单磷酸(IMP)。AMP为三羧酸循环中异柠檬酸脱氢酶(IDH)的天然变构激活因子,由于AMP水平的降低,IDH的活性降低,将使得线粒体内积累异柠檬酸。异柠檬酸经顺乌头酸酶逆向反应,转变为柠檬酸,过量的柠檬酸将被排出线粒体,经ATP柠檬酸裂解酶,转化为乙酰辅酶A和草酰乙酸。乙酰辅酶A经羧化后形成malonyl-CoA,转酰化反应后,malonyl-CoA主要以malonyl-ACP的形式存在(图3)。 β -酮酰-ACP(*n*)合成酶(β -ketoacyl-ACP synthase)将把malonyl-ACP装载到延伸的碳链上,依次形成 β -酮酰-ACP(*n*+2)、 β -羟酰-ACP(*n*+2)、 β -烯酰-ACP(*n*+2)和 β -脂酰-ACP(*n*+2)^[7]。每两个碳原子的添加,需要2个分子的还原性辅因子NADPH,依次参与 β -酮酰-ACP还原酶与 β -烯酰-ACP还原酶所催化的反应(图3)。比如硬脂酸的合成需要8轮malonyl-ACP的缩合反应,共计需要16分子的NADPH来完成还原反应。由于解脂耶氏酵母细胞质中不具有NADH激酶或者NADH-NADPH转氢

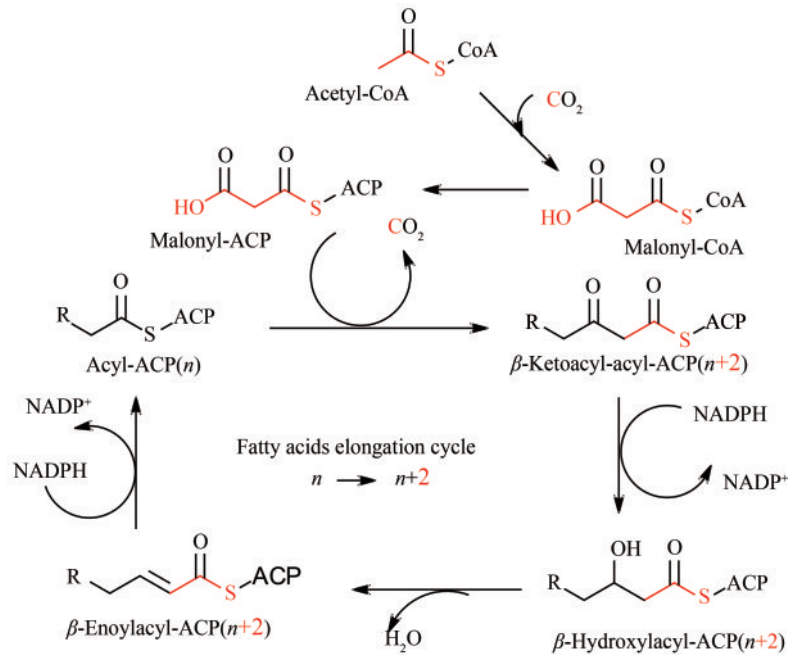


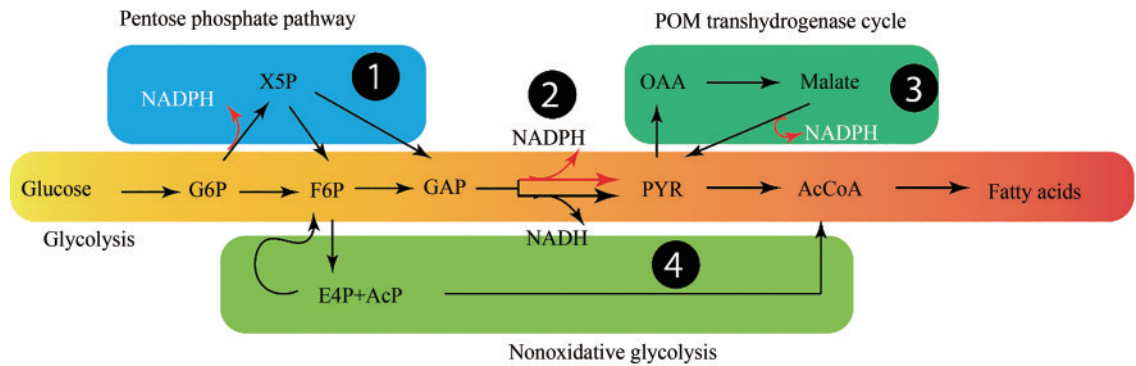
图3 脂肪酸碳链延伸过程需要还原性辅因子NADPH
(n 表示碳链长度)

Fig. 3 The enzymatic elongation cycle of fatty acids needs reducing equivalents NADPH
(n is the chain-length of carbon backbones)

酶，NADH并不能自由转换为NADPH，在葡萄糖作为碳源情况下，解脂耶氏酵母主要的NADPH来源为磷酸戊糖途径（pentose phosphate pathway）^[53]。在磷酸戊糖途径中，葡萄糖被磷酸化后，分别经由6-磷酸葡萄糖脱氢酶和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶，就会产生2分子的NADPH。这一获取还原力的途径并非最佳选择，原因在于6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶具有脱羧功能并产生CO₂，解脂耶氏酵母每产生2分子NADPH以消耗1分子CO₂为代价。因此每合成1分子硬脂酸（C_{18:0}），细胞需要16分子的NADPH，需要额外消耗4/3分子的葡萄糖（C₆H₁₂O₆）来提供这些还原力^[54-55]。硬脂酸骨架中18个碳原子，来源于9个乙酰辅酶A分子，相对应于4.5分子的葡萄糖（1/3的碳原子经过丙酮酸脱氢酶复合体脱羧后丢失）。因此，每合成1分子硬脂酸（C_{18:0}），需要4.5分子葡萄糖提供碳原子骨架，另外需要4/3分子葡萄糖提供NADPH还原力，对应的化学计量关系为，对应于每消耗5.83（4.5 + 4/3）分子葡萄糖，产生1分子硬脂酸。理论硬脂酸的得率为0.271 g 硬脂酸/g 葡萄糖^[54, 56]。理论得率越高，消耗的起始碳源越少；

原材料通常占据生产成本的50%，选取高效的NADPH替代途径，将对提高碳源转化率、降低碳源消耗和压缩生产成本，起到至关重要的作用。

从以上分析可知，辅酶NADPH的供应效率，决定了脂肪酸的理论得率。产油酵母细胞中存在着诸多NADPH的替代途径，作者在此已将可能的替代途径及其对应的化学计量关系归纳，并计算了各自替代途径的脂肪酸得率。为了提高解脂耶氏酵母产油的得率，Stephanopoulous课题组系统地测试了不同还原型辅酶（NADPH）替代途径对解脂耶氏酵母合成甘油三酯的影响，通过NADPH的化学计量关系的理论计算并探索最佳的NADPH替换途径^[56]。作者系统性地分析比较了磷酸戊糖途径，NADPH-特异性的3-磷酸甘油醛脱氢酶（NADPH-specific 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase），丙酮酸-草酰乙酸-苹果酸转氢反应（pyruvate-oxaloacetate-malate transhydrogenase cycle），以及非氧化性糖酵解途径（non-oxidative glycolysis pathway）产生还原性辅因子NADPH效率的差异（图4），构建了一系列重组解脂耶氏酵母，发现



Pathway	Stoichiometric relationship	Theoretical fatty acids yield/(g/g)
OxPP	5.83 Glu \rightarrow 1 stearic acid	0.271
GAPDH	5.08 Glu \rightarrow 1 stearic acid	0.310
POM cycle	4.81 Glu \rightarrow 1 stearic acid	0.328
NOG pathway	4.72 Glu \rightarrow 1 stearic acid	0.334

图4 不同还原性辅因子替代途径对脂肪酸合成效率的影响^[56]

(图示中包含了以下四种途径：①磷酸戊糖途径；②NADPH-特异性的3-磷酸甘油醛脱氢酶；
③丙酮酸-草酰乙酸-苹果酸转氢反应；④非氧化性糖酵解途径)

Fig. 4 Carbon conversion efficiency from NADPH for fatty acids synthesis pathways^[56]

(OxPP—oxidative pentose phosphate pathway; GAPDH—NADPH-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;
POM cycle—pyruvate-oxaloacetate-malate transhydrogenase cycle; NOG—non-oxidative glycolytic pathway)

NADPH-特异性的3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-specific GAPDH)与异源表达的苹果酸酶(malic enzyme),能够高效地弥补磷酸戊糖途径NADPH还原力的不足,改造后的解脂耶氏酵母能够高效地整合乙酰辅酶A(acetyl-CoA)和NADPH,其产油量高达99.7 g/L,油脂的过程得率达到了0.27 g脂肪酸甲酯/g葡萄糖,油脂积累速度达到了1.2 g/(L·h)^[56]。这一结果使我们朝向构建可持续性的微生物油脂平台迈进了一大步。

基于解脂耶氏酵母的氧化应激防御机制(oxidative stress defense pathway),Jayakody等发现该酵母积累过多的亲核的负电自由基,包括脂质过氧化物、超氧化物和自由醛基等,这些负电阴离子损伤蛋白质催化功能,影响DNA复制的保真性^[57],并促使细胞凋零,菌体呈现假菌丝状(hyphae)。为克服这一缺陷,该课题组加强了氧化还原的保护力,过表达了NADPH途径以及谷胱甘肽还原酶和过氧化酶,改造后的解脂耶氏酵母能够更好地抵抗氧化压力,细胞形态呈现单细胞、圆球形,细胞的甘油三酯含量显著提高至81.4%,甘油三酯的生产速率提高至0.97 g/(L·h)^[58]。

4.2 解脂耶氏酵母脂肪酸合成酶的改造以及基于酶活分区的代谢工程策略

解脂耶氏酵母能够高效合成油脂的生物基础在于其胞内高度特异性的功能化分区^[59],其中脂肪酸的合成效率高度依赖于脂肪酸合成酶、乙酰辅酶A羧化酶以及苹果酸酶所形成的超酶复合体(lipid metabolon)^[60-61],甘油三酯的合成与组装需要内质网与脂质体的协同作用。酶分子的空间定位及细胞内生化反应的分区,能够大大增加中间底物传递和转化的效率,同时能够有效地降低不稳定底物的流失,自然界广泛存在的亚细胞水平超酶复合体,包括糖酵解途径、三羧酸循环以及脂肪酸合成等,均已被细胞成像技术证实。为了充分配置并利用亚细胞水平的不同功能分区,Stephanopoulos课题组首次在建脂耶氏酵母中,将具有脂酰辅酶A(acyl-CoA)和脂酰ACP(acyl-ACP)还原以及水解功能等特异性的酶定位表达于线粒体、脂质过氧化物体(peroxisome)和内质网(ER)等亚细胞器中,改造了产油酵母的生产性状,并配合脂肪醛脱羧酶(aldehyde

decarbonylase) 或者脂酰辅酶 A 还原酶 (fatty acyl-CoA reductase), 使得遗传改造后的酵母产生成了具有生物燃料特征的烷烃类、烯烃类和脂肪醇等化合物^[32]。酿酒酵母, 经代谢工程改造后, 能够生成 10.4 g/L 的游离脂肪酸和 1.5 g/L 的脂肪醇^[62]。另外通过表达异源脂肪酸合成酶, 于涛等在酿酒酵母中成功表达了分枝杆菌的脂肪酸合成体系, 结合 acyl-CoA 还原酶, 生成了 24 个碳原子的脂肪醇^[63]。通过表达脂酰辅酶 A 光脱羧酶 (fatty acyl-CoA photodecarboxylase), 改造后的解脂耶氏酵母能够利用葡萄糖合成将近 1.5 g/L 的脂肪烷(烯)烃^[34]。

脂肪酸碳链长度, 决定了生物柴油的理化性质和燃烧性能, 比如凝固点和挥发性等; 短链功能性油脂分子, 易于被动物和人体吸收, 通常营养价值也高。因此, 控制脂肪酸碳链长度, 成为代谢工程研究的热点之一。细菌的脂肪酸合成酶由 5 个单体亚基构成, 每个蛋白亚基负责不同的催化功能, 其不同亚基间结合松散, 易于工程改造; 与细菌不同, 真菌中脂肪酸合成酶由两条肽链编码, 每条肽链大概有 2000 个氨基酸, 分别编码脂肪酸合成酶的不同功能域。蛋白晶体结构分析表明, 真菌脂肪酸合成酶两条肽链组成一个多聚体的分子笼状结构, 不同碳链长度的脂酰-ACP (四碳到十四碳) 中间体被包裹在脂肪酸合成酶分子笼内部^[64], 直至棕榈酰-ACP, 碳链增加到 16

才能被脂肪酸合成酶释放, 并经过 MPT 结构域 (malonyl/palmitoyl transacylase) 将棕榈酰-ACP 转变为棕榈酰-CoA ($C_{16:0}$), 所生成的棕榈酰-CoA 通过脂肪酸延长酶 (elongase) 和去饱和酶 (desaturase) 依次生成硬脂酰-CoA ($C_{18:0}$) 和油酰-CoA ($C_{18:1}$), 并依次加载到 3-磷酸甘油骨架上, 合成各种脂类化合物 (图 5)。在真菌中, 通过直接表达脂酰-ACP 硫解酶 (fatty acyl-ACP thioesterase) 来生产短链脂肪酸的效率低。通过蛋白质的理性设计, Xu 等^[32] 将解脂耶氏酵母中脂肪酸合成酶的 MPT (malonyl/palmitoyl transacylase) 结构域替换为具有 acyl-CoA 水解功能的结构域, 改造后的酵母能够生产具有不同碳链长度的脂肪酸分子 (C_{12} 、 C_{14} 和 C_{16} 等), 提高了解脂耶氏酵母的工业利用价值。另外通过蛋白工程手段, 定向改造 ACP 结构域^[65]、酮脂酰 ACP 合成酶结构域和 MPT 转酰基结构域, 能够使酿酒酵母生产短链的脂肪酸, C_6 和 C_8 脂肪酸的产量达到了 100~250 mg/L^[66]。由此看出, 蛋白理性改造能够有效控制脂肪酸合成过程碳链的延伸, 德国 Max Planck Institute 的 Ashwin Chari 课题组以及法兰克福大学 Eckhard Boles 课题组对此进行了详细的结构生物分析^[66-67], 进一步阐释了脂肪酸的碳链长度调控机制, 为定向改造产油酵母生产短链和中等碳链长度脂肪酸和油脂化合物提供了理论基础。

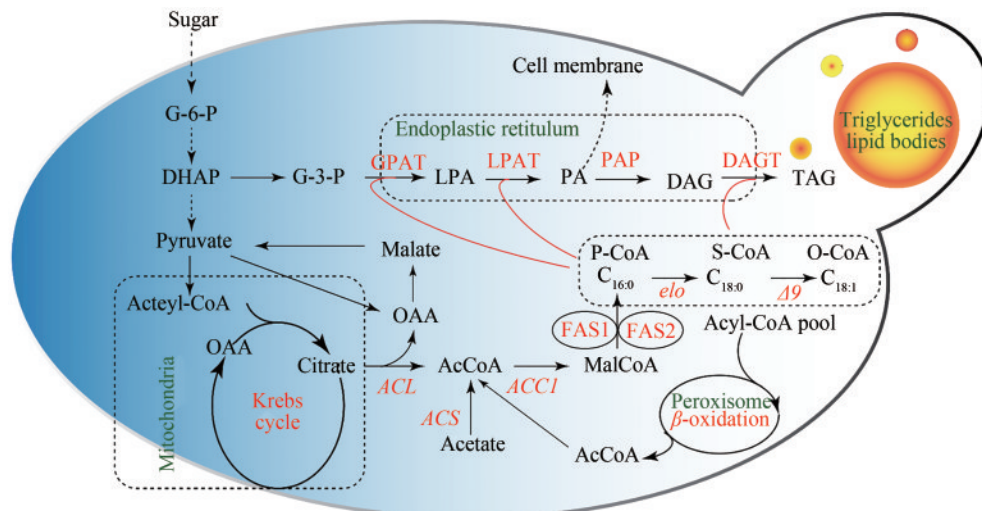


图5 解脂耶氏酵母合成功能性油脂的生化过程

Fig. 5 The biochemical scheme of synthesizing triglycerides in *Y. lipolytica*

4.3 解脂耶氏酵母油脂合成的分子调控机制

氮源饥饿 (nitrogen starvation) 所造成的异柠檬酸脱氢酶活性减弱和 ATP: 柠檬酸裂解酶活性增强是产油酵母开启油脂合成的重要生化特征。其中一个重要前提是, AMP 脱氢酶活性增强, 从而导致细胞内 AMP 水平下降, 进而导致异柠檬酸脱氢酶活性减弱^[68]。虽然目前学术界缺乏氮源饥饿导致 AMP 脱氢酶活性增强的直接生化证据, 过量表达 AMP 脱氢酶后能够使细胞内产生更多的乙酰辅酶 A, 进而使得解脂耶氏酵母积累较多番茄红素 (lycopene)^[69]。然而直接过表达 AMP 脱氢酶, 似乎并不能显著提高产油酵母油脂的积累, 表明产油酵母油脂的积累存在其他关键调控位点, 或者 AMP 脱氢酶的调控有可能发生在蛋白翻译后修饰 (post-translational modification) 水平上^[70]。最近也有其他报道, 比如过表达 AMP 脱氢酶后能够使产油真菌 *Mortierella alpina* 中油脂含量提高 15%~34%^[71]。

Snf1/AMPK 是真核生物中高度保守的碳源与能量调控蛋白。有关真菌中碳源代谢, 主要涉及 Snf1/AMPK 相关的应激活化蛋白激酶, 近来成为了研究解脂耶氏酵母油脂积累机理的调控热点^[72]。SNF1/AMPKs 通常以异三聚体复合物 (heterotrimeric complex) 的形式存在, 主要由具催化功能的 α -亚基 (Snf1) 和两个调控亚基组成, 调控亚基包含了 β -亚基 (Sip1、Sip2 或 Gal83) 和 γ -亚基 (Snf4), 解脂耶氏酵母中含有高度保守的 Snf1/AMPK 系统, 经过 Blast 分析, Snf1、Snf4、Gal83 和 Sip2 分别对应于解脂耶氏酵母的 YALI0D02101g、YALI0C03421g、YALI0E13926p 和 YALI0C00429p 等编码序列^[72]。杜邦的科学发现 Snf1 缺失的解脂耶氏酵母能够高效积累油脂, 包括 EPA 等不饱和脂肪酸, 进一步经过基因芯片和实时定量 PCR 分析, 他们发现 Snf1 活性缺失, 能够激活油脂积累代谢途径^[72]。

近年来, 系统水平的多组学分析手段, 包括蛋白质组、磷酸蛋白组和代谢组学分析, 已经被广泛用于研究解脂耶氏酵母的碳源、能量代谢以及油脂积累的积累。其中, 美国西北太平洋国家实验室的 Scott Baker 课题组发现氮源氨基酸代谢, 与

解脂耶氏酵母脂肪酸的积累息息相关。比如, 在氮源饥饿状态下, 核糖体结构相关基因的表达高度下调, 预示油脂积累阶段蛋白表达的减弱^[73]; 细胞为了回收利用含氮化合物, 包括丙氨酸、腐胺 (putrescine)、亚精胺 (spermidine) 和尿素 (urea) 等化合物将会被分解, 进而导致细胞内产生糖醇和三羧酸循环代谢相关的溢出代谢物, 包括甘露醇、赤藓糖醇以及柠檬酸、富马酸和苹果酸等副产物。在氮源限制情况下, 该课题组通过磷酸蛋白组学分析, 发现了 1219 个新的磷酸化位点, 其中 133 个磷酸化位点与氮源饥饿显著关联^[73], 这些磷酸化位点主要集中于蛋白激酶和具 DNA 结合活性的转录因子。在酶学水平, 磷酸化主要修饰脂肪合成途径的 ATP: 柠檬酸裂解酶和乙酰辅酶 A 羧化酶, 同时磷酸化导致了脂肪酸氧化降解途径的减弱, 这一研究表明磷酸化调控是油脂积累的关键成因。

通过不同碳氮比条件下的恒化器培养, Nielsen 课题组对解脂耶氏酵母积累油脂的调控机理进行了研究。通过全基因组规模的 RNAseq 测序, 该课题组发现油脂的积累, 不依赖于转录水平的调控; 脂肪酸碳流的代谢调控主要发生在氨基酸代谢途径^[74], 由此发现脂肪酸合成前体 acetyl-CoA, 很大一部分来源于氨基酸的代谢氧化, 这一结论与 Alper 课题组发现的亮氨酸/异亮氨酸代谢参与解脂耶氏酵母脂肪酸合成相互佐证^[75]。有关解脂耶氏酵母中氮源代谢调控, Pomraning 等^[76]最近揭示了氮源代谢阻遏 (nitrogen catabolite repression) 与 GATA 家族锌指蛋白转录因子 (GATA zinc finger transcription factors) 之间的关联。比如删除锌指转录因子 *gzf3* 和 *gzf2*, 会造成细胞氮源特异性的生长缺陷和油脂的大量积累。另外碳源代谢阻遏因子 *mig1* 也与锌指蛋白转录因子的活性相关^[76]。揭示碳源与氮源代谢调控因子将会加深我们对解脂耶氏酵母积累油脂的分子机理的认识。未来 5~10 年, 我们期望解脂耶氏酵母领域的科学工作者, 将会描绘一幅更加清晰的碳源/氮源调控网络, 为我们构建可持续性的细胞油脂工厂奠定基础。

4.4 产油酵母合成油脂的生化过程动力学建模

在生物加工制造过程中，生化过程动力学建模能够给我们提供最优化的发酵控制参数。对生物过程的动态分析，有助于我们根据细胞的生理状态，制定最优化的细胞生长和控制参数，从而最大限度地提高碳源的利用率，增加细胞强度，降低生产成本与提高经济可行性^[77]。油脂分子属于胞内积累的代谢产物，油脂的过量积累会对细胞生长的适应性（growth fitness）产生负面影响，目前常用的动力学模型主要考虑胞外产物、酶蛋白活性、或者次级代谢产物的积累，比如柠檬酸^[78]、纳豆激酶^[79]和灵芝酸^[80]等的动力学，此类生化过程建模相对简单。有关油脂化合物积累的动力学模型已经扩展到微藻^[81]和解脂耶氏酵母^[82]，所构建的模型并没有考虑油脂合成对细胞生长的影响、过程得率等经济指标。为了进一步加深对解脂耶氏酵母积累油脂发酵过程的认识，作者将细胞总生物量（ X_{total} ）分为油脂（ P ）和非油脂生物量（oil-free biomass, X ），并引入一个负担系数（ γ ）来描述油脂积累对细胞生长的影响。根据生化反应动力学原则，分批培养条件下，油脂积累的非结构动力学模型可以归纳如表1。

方程（1）描述细胞的生长适应性受到油脂积累的影响，负担系数（ $0 < \gamma < 1$ ）越大，油脂积累（ P ）越多，细胞比生长速率越小。负担系数取决于菌株表达的基因多少。方程（2）描述细胞的生长取决于比生长速率和比死亡速率。方程（3）描述胞内产物油脂的积累取决于生长相关的因子（ α ）和非生长相关的因子（ β ）。方程（4）则描述底物的消耗取决于细胞的生长与油脂的积累，其中细胞得率系数由 $Y_{X/S}$ 给出，油脂得率系数由 $Y_{P/S}$ 给出。方程（5）描述总的生物量（ X_{total} ）由油脂（ P ）和非油脂生物量（oil-free biomass, X ）构成。方程（6）给出了细胞的动态含油量。方程（7）描述了动态过程得率（ Y_{process} ），由初始和终态的底物浓度（ S_0, S_f ）和产物浓度（ P_f, P_0 ）决定。方程（8）描述了细胞发酵过程的生产强度。通常过程得率（ Y_{process} ）、生产强度（ r ）和产量（ P ）具有复杂的关联，细胞内油脂含量越高，对细胞的负荷也越重，但产物的分离提取也越容易；生产强度越高，设备的利用率就越大，越容易降低生产成本；过程得率越高，单位糖耗产生的油脂越高，原材料成本就越低。在分批发酵下，发酵时间的优化取决于最优的含油量和含油组分，这种多产物多组分系统将会动态影响终端产物的成本。获

表1 产油酵母胞内积累油脂的分批发酵动力学描述

Tab. 1 Fermentation kinetics of the oil accumulation process in oleaginous yeast in batch culture

方程编号 Equation No.	方程 Equations	描述 Description
(1)	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \left(1 - \frac{\gamma P}{SY_{P/S}} \right)$	细胞比生长速率 Specific growth rate
(2)	$\frac{d}{dt} X(t) = \mu X(t) - k_d X(t)$	非油脂生物量积累 Oil-free cell growth
(3)	$\frac{d}{dt} P(t) = (\alpha\mu + \beta) X(t)$	油脂积累 Lipid accumulation
(4)	$\frac{d}{dt} S(t) = -\frac{\mu X(t)}{Y_{X/S}} - \frac{(\alpha\mu + \beta) X(t)}{Y_{P/S}}$	底物消耗 Substrate consumption
(5)	$X_{\text{total}}(t) = P(t) + X(t)$	总生物量 Total biomass
(6)	$\theta(t) = \frac{P(t)}{P(t) + X(t)}$	动态含油量 Oil content
(7)	$Y_{\text{process}}(t) = \frac{P_f(t) - P_0}{S_0 - S_f(t)}$	动态过程得率 Process yield
(8)	$r(t) = \frac{P_f(t) - P_0}{t_f - t_0}$	总的生产强度 Overall productivity

取实罐动态发酵数据,包括菌体浓度、含油量、底物消耗和油脂产量,进一步可以通过最小二乘非线性回归(least square nonlinear regression)求得各个发酵参数,进而可以模拟不同碳源流加速率情况下,探索最优化的发酵控制策略。在连续培养的恒化器中,上述动力学模型可能存在解析解,获取解析解,将会为我们优化脂类化合物生产和控制发酵过程产生有益的指导。

5 产油酵母的高通量筛选及表型鉴定技术

发展微生物单细胞油脂,构建高效的底盘微生物转化平台,需要与之相匹配的油脂化合物高通量筛选及微生物表型鉴定技术。传统的油脂分析和微生物代谢物筛选平台,很大程度上依赖于有机溶剂萃取(比如经典的Folch方法),转酯化反应,最终油脂以脂肪酸甲酯的形式存在,须经气相色谱-质谱(GC-MS)联用,借此分析脂肪酸的组分(碳链长度和不饱和键等位置)。此方法需要去除水分,机械振荡破裂细胞,在碱性溶液中利用皂化反应水解细胞内的甘油三酯,去除细胞膜和杂蛋白等干扰,进一步以无水硫酸为催化剂,催化游离脂肪酸与甲醇缩合,产生脂肪酸甲酯,脂肪酸甲酯经疏水溶剂萃取后(一般用正己烷),经过气质联用分析。此法样品回收率低,准确度依赖于皂化反应、转酯化反应和萃取效率,反应时间过长,不足以满足产油酵母高通量筛选的要求。

高通量筛选及表型鉴定是构建微生物油脂平台的核心技术。基于油脂的特异性荧光染色剂、近红外光谱、拉曼光谱,结合流式细胞仪与微流体技术,将会为构建高效的油脂细胞工厂提供一把利刃。所谓“工欲善其事,必先利其器”。近年来,一些学者开发了油脂分子探针(Bodipy, Invitrogen公司),能够在活体细胞内特异性地与长链油脂分子结合,受到480 nm激发,进而释放510 nm波段特异性的荧光。与传统的尼罗河红染色剂(Nile red)相比,Bodipy具有灵敏度高、样品处理简单等优点。另外,Bodipy可用于解脂耶

氏酵母脂质体(lipid droplet 或者 lipid body)的染色,用于细胞生物学和油脂积累的研究^[83]。基于尼罗河红和Bodipy,近来学者开发了快速、简易的微藻中油脂定量方法,作者总结了两种染色剂的应用范围,特别提到了各自染色剂的准确性受到光谱特性、荧光染色剂浓度、有机溶剂、细胞浓度、温度以及反应时间的影响^[84]。需要特别指出的是,经过优化后的Bodipy方法,可以准确快速地用来筛选高产油脂的解脂耶氏酵母^[85],筛选出的解脂耶氏酵母,产油量高达85 g/L,细胞含油量达到了77%,产油速率达到了0.73 g/(L·h)。

除了荧光剂以外,一些在线油脂检测手段,比如近红外光谱(infrared spectra)和拉曼光谱(Raman spectra),成为了研究胞内油脂积累的新型分析工具。脂类分子中的酯键含有甲氧基和羰基,脂分子中交替的亚甲基以及不饱和双键,以及稀有的羟基都会产生特征性的红外光谱吸收。基于此,可以采用傅里叶变换近红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy)来检测细胞组分的动态变化,特别是胞内油脂含量、胞内碳源与氮源变化的比例,基于脂质/氮氮和碳源/氮氮的比例,作者进而确定了利用红外光谱进行精确油脂定量和微藻细胞筛选的方法^[86]。为了精确确定产油酵母胞内油脂积累的动力学,近来一些学者建立了基于傅里叶变换近红外光谱的脂类定量模型^[87]。作者选取了3种产油酵母(*Rhodotorula toruloides* CBS 14, *Lipomyces starkeyi* CBS 1807和*Yarrowia lipolytica* CBS 6114),利用偏最小二乘回归(partial least squares regression),进而确定了对应3种酵母的油脂含量定量模型,经过试验验证,混合样品油脂含量与模型预测达到了高达90.5%的相关性,单一产油酵母模型预测的相关性高达96%~98%,这一方法的建立,将会极大简化产油酵母高通量筛选。

拉曼光谱主要来研究晶格中分子的振动频率或者转动频率,其发射光源可以为可见光、近红外光和近紫外光等。拉曼光谱,已经用来定量检测脂质分子的脂肪酸组成,包括碳链长度以及不饱和度等关键数据^[88],其精度也达到了传统的气质联用方法。此外,拉曼光谱具有不破坏细胞体、样品处理简单等优势。根据激发态拉曼散射光谱

技术 (stimulated Raman scattering microscopy), 哈佛大学谢晓亮课题组在单细胞水平对3种产油酵母积累油脂的过程进行了分子表征 (美国能源部报告 <https://doi.org/10.2172/1418344>), 结合微流体技术, 该课题组能够分离出高产油脂的酵母菌株, 进一步通过单细胞转录组分析, 确定了产油基因调控的关键位点, 该研究为产油酵母的油脂积累机理、表型及基因型高通量鉴定提供了基础。另外, 最新发展的微流体微滴技术^[89]也为产油酵母的表型快速鉴定与细胞分离提供了可能。通过光化学和级联质谱 (photochemistry and tandem MS), 最近学者也可以精确测定 C=C 双键的位置以及甘油三酯 *sn1*、*sn2* 和 *sn3* 位置的脂肪酸类型^[90]。

6 解脂耶氏酵母生产棕榈油脂和可可脂的经济与技术可行性分析

以下我们将对解脂耶氏酵母生产植物油脂的经济可行性进行分析。世界主要油料作物包括黄豆、葵花籽、油菜、可可果和棕榈果等 (表2)。根据主要油料作物每公顷的产出及其含油量, 我们大致可以推算出每公顷油料作物每年的产油得率 [$t/(hm^2 \cdot a)$]。依据单位面积的产油得率 (表2), 棕榈树拔得头筹, 具有最高的产油率, $1 hm^2$ 的棕榈树每年可以产出 3.69 t 棕榈油; 相比而言, $1 hm^2$ 油菜和葵花每年的产油得率分别为 0.9 t 和 0.85 t; 其中可可树的产油得率最低, $1 hm^2$ 的可可树每年可以产约 0.4 t 可可脂。单位面积可可树的产油脂率低, 造成了可可脂的高价 (6000~

8000 美元/t, 干燥可可果的价格在 3000 美元/t), 相比而言, 棕榈油的价格仅为 900 美元/t。从这些数据, 我们大致可以看出这些油料作物的产率及相对经济价值。更为重要的是, 棕榈树和可可树主要种植在热带雨林气候 (东南亚、拉丁美洲和非洲西部), 中国的气候不适宜种植热带雨林作物, 这种结构性的短缺, 也会因为地域及政治的影响加剧此类油料作物价格的波动, 因此, 我们亟需找到可替代的生物制造途径, 以弥补国内原材料供应的短缺。

假定可以用产油酵母转化淀粉质或者蔗糖类作物生产功能性油脂, 解脂耶氏酵母生产油脂的极限得率为 0.271 g 油脂/g 葡萄糖, 根据主要糖料作物单位面积的产量和含糖量, 我们可以大致推算出, $1 hm^2$ 糖料作物经酵母转化后的最大产油得率 (表3)。在常用的糖料作物中, 种植 $1 hm^2$ 甘蔗, 其中蔗糖经解脂耶氏酵母转化后, 最大产油得率可以达到 $3.07 t/(hm^2 \cdot a)$, 接近于 $1 hm^2$ 棕榈树的产油率 [$3.69 t/(hm^2 \cdot a)$] (表2); 而种植 $1 hm^2$ 玉米, 其中淀粉经解脂耶氏酵母转化后, 最大产油得率可以达到 $2.15 t/(hm^2 \cdot a)$ (表3); 甘蔗和玉米作为原材料的产油得率远远大于红薯 [$1.36 t/(hm^2 \cdot a)$]。巴西的甘蔗年产量已达 6.7 亿吨 (670 000 000 t, 湿重), 为产油酵母的工业化生产提供了极为廉价的原料底物。考虑到生物转化和发酵中其他成本 (比如淀粉水解, 原材料预处理, 氮源消耗, 水电, 人工以及油脂的提取分离) 占理论转化成本的 50%, 利用甘蔗作为原材料的油脂得率为 $1.54 t/(hm^2 \cdot a)$, 假定碳源转化率占理论转化率 (0.271 g/g) 的 75%, 实际的功能性油脂的真

表2 世界主要油料作物的单位面积产量及产油得率

Tab. 2 The unit area output and maximal oil yield from major oil crops.

油料作物 Oil crop	产量/[$t/(hm^2 \cdot a)$] Production	含油量/% Oil content	最大产油得率/[$t/(hm^2 \cdot a)$] Maximal oil yield
黄豆 Soybean	3.1	20	0.62
葵花籽 Sunflower seed	1.7	50	0.85
油菜籽 Canola	2.0	45	0.90
可可果 Cocoa bean	0.8	50	0.40
棕榈果 Oil palm	9.1	41	3.69

表3 以糖料作物为原料经解脂耶氏酵母转化后的产油得率

Tab. 3 The maximal oil yield from *Y. lipolytica* converting sugar feedstock from corn, sweet potato or sugarcane.

糖料作物 Sugar crop	产量/[t/(hm ² ·a)] Production	含糖量/% Sugar content	最大产油得率 ^① /[t/(hm ² ·a)] Maximal oil yield
玉米 Corn	10.7 (dry, 干重)	74 (dry, 干重)	2.15
红薯 Sweet potato	25 (wet, 湿重)	20 (wet, 湿重)	1.36
甘蔗 Sugarcane	80.9 (wet, 湿重)	14 (wet, 湿重)	3.07

①最大产油得率的计算, 假定葡萄糖到油脂的转化系数为0.271 g 油脂/g 葡萄糖。

实得率为 1.16 t/(hm²·a)。考虑到终端产物的价值链, 棕榈油主要用于工业加工, 其他植物油(玉米油、花生油和菜籽油等)主要用于食品烹炸, 可可脂的主要用途是制作巧克力, 以可可脂的售价为 7000 美元/t 计, 种植 1 hm² 甘蔗, 所产蔗糖作为底物经产油解脂耶氏酵母转化后的毛利润可以达到 8120 美元/(hm²·a); 玉米等主要粮食作物的价格在 210 美元/t, 种植 1 hm² 玉米的毛利润在 2247 美元/(hm²·a), 与 1 hm² 甘蔗的毛收益 [2100 美元/(hm²·a)] 相近, 就价值而言, 利用解脂耶氏酵母生产可可脂, 可以将原材料(甘蔗)的经济价值提高 2.86 倍, 将玉米的经济价值提高 2.6 倍。目前 Nielsen 课题组已经在酿酒酵母中尝试表达可可脂合成的关键化学步骤, 所产的油脂成分接近于可可脂, 但产量与工业化大规模化生产还有一定差距^[91-93]。宋元达课题组利用了解脂耶氏酵母中的 *sn2* 特异性的脂肪酶, 将羊油脂中 *sn2* 位置的饱和脂肪酸替换为油酸, 得到了更加健康且脂肪酸组成接近可可脂的组分^[94]; 另外该课题组也优化了解脂耶氏酵母生产可可脂的发酵条件, 确定了以甘油和酒石酸氨为发酵原料, 并发现升高发酵温度有助于促进可可脂的生成^[95]。

更为有利的是, 相比于棕榈树, 解脂耶氏酵母所产油脂的结构和功能更加多样化, 例如解脂耶氏酵母的油脂, 含有高达 55% 的油酸 (C_{18:1}), 20% 左右的棕榈酸 (C_{16:0}), 13% 的硬脂酸 (C_{18:0}), 7% 的棕榈油酸 (C_{16:1}) 以及 5% 左右的多不饱和脂肪酸 (主要为亚麻酸 C_{18:3}), 其营养和经济价值远高于单一的棕榈油 (C_{16:0})。可可脂的主要组分为: 油酸 (C_{18:1}) 和硬脂酸 (C_{18:0}) 各占 35%, 棕榈酸 23% (C_{16:0}), 其他不饱和脂肪酸 (棕榈油酸和亚麻酸) 占 7%, 这一组分与解脂耶氏酵母的油脂组

分较为接近。在技术角度, 我们仅需将解脂耶氏酵母中一部分单不饱和脂肪酸转变为饱和脂肪酸, 比如将 20% 的油酸 (C_{18:1}) 转化为硬脂酸 (C_{18:0}), 并将 5% 的棕榈油酸 (C_{16:1}) 转变为棕榈酸 (C_{16:0}), 经改造后产油酵母的油脂组分将变为 35% 的油酸 (C_{18:1})、33% 的硬脂酸 (C_{18:0})、25% 的棕榈酸 (C_{16:0}) 以及 7% 左右的其他不饱和脂肪酸 (主要为棕榈油酸和亚油酸), 这一脂肪酸组分与可可脂的成分极为接近, 从生物技术而言, 仅需控制单不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸的相对比例, 利用 CRISPRi 介导的转录水平抑制 (transcriptional repression), 进而减弱去饱和酶 (desaturase) 的活性就可以实现这一技术指标。除了不饱和度决定熔点以外, 可可脂细腻丰富的质地和入口即化的口感也取决于甘油三酯 *sn1*、*sn2* 和 *sn3* 的三个酯键所连接的脂肪酸类型。脂酰辅酶 A 转移酶 (图 5, GPAT, LPAT 和 DAGT) 依次将 3 个脂酰辅酶 A 装载到甘油上, 因此, 如果我们对脂酰辅酶 A 转移酶的底物特异性和催化活性进行相应的工程改造, 比如大规模的酶学筛选, 或者直接从可可果中挖掘相应的酶, 将会使得改造后的解脂酵母产出类似于可可脂的甘油三酯。这一工程实践将能提供大约 100 万吨可可脂原材料, 进而填补大概 500 亿美元的巧克力市场缺口。

7 结论

利用解脂耶氏酵母生产高附加值功能性油脂具有巨大的经济效益。植物油脂和动物脂肪大体上有 4000 亿美元的年均市场需求。植物油脂的获取依赖于农业技术、育种、气候状况和病虫害等

因素, 热带雨林地域的棕榈园和可可园提供了大量的植物性油脂, 广泛用于食品、饮料、医药和化工等领域。棕榈油和可可脂也成为了东南亚、非洲西部和近赤道南美国家的主要经济作物。近年来, 由于植物油脂市场需求的激增, 造成了热带雨林过度砍伐、植被破坏以及环境气候的变迁和生态多样性的丧失。为了解决可持续发展的问题, 降低二氧化碳排放, 保护地球环境, 利用微生物细胞工厂生产功能性油脂为解决油脂的短缺提供了广阔的前景。

本文从植物油脂的市场需求出发, 分析了目前植物油脂的市场供应现状, 探讨了构建高效产油解脂耶氏酵母细胞工厂的主要技术瓶颈, 其中包括产油菌株的高通量筛选和表型鉴定技术、代谢工程遗传改造策略和产油酵母的发酵动力学模型等, 并进一步探讨了以主要糖料作物为原材料, 生产功能性油脂的经济可行性和技术可行性。高效的油脂转化率主要取决于解脂耶氏酵母内还原性辅酶NADPH的供应、碳代谢流和酶生化反应的细胞内分区、在磷酸激酶(snf1/MAPK)作用下的脂肪酸代谢调控, 利用分子遗传学或者合成生物学手段, 将会帮助我们进一步理解产油酵母积累油脂的分子机制, 促进我们构建高效可行的微生物细胞油脂工厂, 朝向工业应用迈出坚实的一步。经过经济和技术可行性分析, 利用蔗糖作为原材料, 可以预测, 解脂耶氏酵母具有极大的潜力, 能够解决当前高附加值油脂(比如可可脂)的市场缺口问题。

健康的功能性油脂主要是含有多不饱和键的亚麻酸(α -linolenic acid, $C_{18:3}$)和EPA(eicosapentaenoic acid, $C_{20:5}$)等, 主要有益智、降血脂、抗血栓和抗炎等功效, 是人类必需的营养素之一, 其中亚麻酸主要来源于植物提取, EPA主要源于深海藻类或者鱼类。其生物合成涉及多步去饱和酶, 在微生物中合成效率较低。研究发现, 一些微藻中多不饱和脂肪酸合成酶为一个复杂的聚酮酶复合物(polyketide synthase, PKS)结构^[96], 其合成过程不同于一般的脂肪酸合成酶。在解脂耶氏酵母中异源表达微藻类的PKS, 提高其功能活性, 利用产油酵母的产油特性, 将有利于我们构建高效合成EPA或者DHA的酵母。微藻与解脂耶氏

酵母共培养或许也能解决脂肪酸前体供应的难题, 从而提高多不饱和脂肪酸合成的效率。开发产油酵母微生物资源, 提供健康的功能性油脂, 将会解决一系列能源、健康食品和环境资源等问题, 促进我们向可持续性的低碳经济模式转变。

致谢:感谢美国得州理工大学陈超群教授(美国工程院院士)校读对王教授回忆部分的记述;感谢YaliBio总裁CEO陆玉麟博士关于功能油质化合物市场前景及应用的讨论。

参 考 文 献

- [1] AFEYAN N B, COONEY C L. Professor Daniel I C. Wang, a legacy of education, innovation, publication, and leadership [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(12): 3615-3627.
- [2] XUE Z, SHARPE P L, HONG S P, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 734-740.
- [3] SIMOPOULOS A P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2002, 56(8): 365-379.
- [4] VIJAY V, PIMM S L, JENKINS C N, et al. The impacts of oil palm on recent deforestation and biodiversity loss [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(7): e0159668.
- [5] CARLSON K M, HEILMAYR R, GIBBS H K, et al. Effect of oil palm sustainability certification on deforestation and fire in Indonesia [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, of the United States of America*, 2018, 115(1): 121.
- [6] LEDESMA-AMARO R, NICAUD J M. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids [J]. *Progress in Lipid Research*, 2016, 61: 40-50.
- [7] XU P, GU Q, WANG W, et al. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli* [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1409.
- [8] HU P, CHAKRABORTY S, KUMAR A, et al. Integrated bio-process for conversion of gaseous substrates to liquids [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(14): 3773-3778.
- [9] XU J, LIU N, QIAO K, et al. Application of metabolic controls for the maximization of lipid production in semicontinuous fermentation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(27): E5308-E5316.
- [10] MA J, GU Y, MARSAFARI M, et al. Synthetic biology, systems biology, and metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* toward a sustainable biorefinery platform [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2020, 47(9/10): 845-862.
- [11] SCHWARTZ C M, HUSSAIN M S, BLENNER M, et al. Syn-

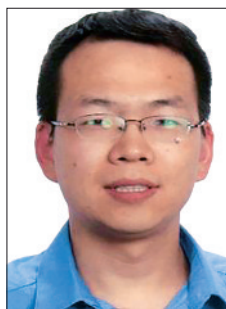
- thetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica* [J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(4): 356-359.
- [12] EDWARDS H, YANG Z, XU P. Characterization of Met25 as a color associated genetic marker in *Yarrowia lipolytica* [J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 11: e00147.
- [13] YANG Z, EDWARDS H, XU P. CRISPR-Cas12a/Cpf1-assisted precise, efficient and multiplexed genome-editing in *Yarrowia lipolytica* [J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 10: e00112.
- [14] YANG Z, BLENNER M. Genome editing systems across yeast species [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 66: 255-266.
- [15] YANG Z, XU P. Implementing CRISPR-Cas12a for efficient genome editing in *Yarrowia lipolytica*[M]// WHEELDON I, BLENNER M. *Yarrowia lipolytica*: methods and protocols. New York: Springer, 2021: 111-121.
- [16] CELIŃSKA E, LEDESMA-AMARO R, LARROUDE M, et al. Golden Gate Assembly system dedicated to complex pathway manipulation in *Yarrowia lipolytica* [J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(2): 450-455.
- [17] EGERMEIER M, SAUER M, MARX H. Golden Gate-based metabolic engineering strategy for wild-type strains of *Yarrowia lipolytica* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2019, 366(4): fnz022.
- [18] LARROUDE M, PARK Y K, SOUDIER P, et al. A modular Golden Gate toolkit for *Yarrowia lipolytica* synthetic biology [J]. Microbial Biotechnology, 2019, 12(6): 1249-1259.
- [19] TONG Y, ZHOU J, ZHANG L, et al. A golden-gate based cloning toolkit to build violacein pathway libraries in *Yarrowia lipolytica* [J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(1): 115-124.
- [20] WONG L, HOLDRIDGE B, ENGEL J, et al. Genetic tools for streamlined and accelerated pathway engineering in *Yarrowia Lipolytica*[M]// SANTOS C N S and AJIKUMAR P K. Microbial metabolic engineering: methods and protocols. New York: Springer, 2019, 155-177.
- [21] WONG L, ENGEL J, JIN E, et al. YaliBricks, a versatile genetic toolkit for streamlined and rapid pathway engineering in *Yarrowia lipolytica* [J]. Metabolic Engineering Communications, 2017, 5(Supplement C): 68-77.
- [22] LIU H, MARSAFARI M, DENG L, et al. Understanding lipogenesis by dynamically profiling transcriptional activity of lipogenic promoters in *Yarrowia lipolytica* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(7): 3167-3179.
- [23] GUO Z-P, BORSENERBERGER V, CROUX C, et al. An artificial chromosome yIAC enables efficient assembly of multiple genes in *Yarrowia lipolytica* for biomanufacturing [J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 199.
- [24] LV Y, EDWARDS H, ZHOU J, et al. Combining 26S rDNA and the Cre-loxP system for iterative gene integration and efficient marker curation in *Yarrowia lipolytica* [J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(3): 568-576.
- [25] LIU J, WU X, YAO M, et al. Chassis engineering for microbial production of chemicals: from natural microbes to synthetic organisms [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 66: 105-112.
- [26] LIU Y, SU A, LI J, et al. Towards next-generation model microorganism chassis for biomanufacturing [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(21): 9095-9108.
- [27] PENDRILL F, PERSSON U M, GODAR J, et al. Agricultural and forestry trade drives large share of tropical deforestation emissions [J]. Global Environmental Change, 2019, 56: 1-10.
- [28] SCHROTH G, LÄDERACH P, MARTINEZ-VALLE A I, et al. Vulnerability to climate change of cocoa in West Africa: patterns, opportunities and limits to adaptation [J]. Science of the Total Environment, 2016, 556: 231-241.
- [29] MARKHAM K A, PALMER C M, CHWATKO M, et al. Rewiring *Yarrowia lipolytica* toward triacetic acid lactone for materials generation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(9): 2096.
- [30] LIU H, MARSAFARI M, WANG F, et al. Engineering acetyl-CoA metabolic shortcut for eco-friendly production of polyketides triacetic acid lactone in *Yarrowia lipolytica* [J]. Metabolic Engineering, 2019, 56: 60-68.
- [31] QIU X, XU P, ZHAO X, et al. Combining genetically-encoded biosensors with high throughput strain screening to maximize erythritol production in *Yarrowia lipolytica* [J]. Metabolic Engineering, 2020, 60: 66-76.
- [32] XU P, QIAO K, AHN W S, 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.
- [33] SUN W, YANG Z, XU P. Engineering *Yarrowia lipolytica* for production of fatty alcohols with YaliBrick vectors[M]// WHEELDON I, BLENNER M. *Yarrowia lipolytica*: methods and protocols. New York: Springer, 2021: 159-173.
- [34] LI J, MA Y, LIU N, et al. Synthesis of high-titer alka(e)nes in *Yarrowia lipolytica* is enabled by a discovered mechanism [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 6198.
- [35] XUE Z, SHARPE P L, HONG S P, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31: 734-740.
- [36] LV Y, QIAN S, DU G, et al. Coupling feedback genetic circuits with growth phenotype for dynamic population control and intelligent bioproduction [J]. Metabolic Engineering, 2019, 54: 109-116.
- [37] LV Y, MARSAFARI M, KOFFAS M, et al. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(11):

- 2514-2523.
- [38] PALMER C M, MILLER K K, NGUYEN A, et al. Engineering 4-coumaroyl-CoA derived polyketide production in *Yarrowia lipolytica* through a β -oxidation mediated strategy [J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 57: 174-181.
- [39] LIU H, WANG F, DENG L, et al. Genetic and bioprocess engineering to improve squalene production in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 317: 123991.
- [40] HUANG Y Y, JIAN X X, LV Y B, et al. Enhanced squalene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica* based on metabolically engineered acetyl-CoA metabolism [J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 281: 106-114.
- [41] TANG W-Y, WANG D-P, TIAN Y, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for improving squalene production [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 323: 124652.
- [42] MARSAFARI M, XU P. Debottlenecking mevalonate pathway for antimalarial drug precursor amorpha-4,11-diene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2020, 10: e00121.
- [43] SÁEZ-SÁEZ J, WANG G, MARELLA E R, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for high-level resveratrol production [J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 51-61.
- [44] GU Y, MA J, ZHU Y, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a chassis for *de novo* synthesis of five aromatic-derived natural products and chemicals [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(8): 2096-2106.
- [45] GU Y, MA J, ZHU Y, et al. Refactoring ehrlich pathway for high-yield 2-phenylethanol production in *Yarrowia lipolytica* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(3): 623-633.
- [46] SOARES G P A, SOUZA K S T, VILELA L F, et al. γ -Decalactone production by *Yarrowia lipolytica* and *Lindnera saturnus* in crude glycerol [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2017, 47(6): 633-637.
- [47] BRAGA A, BELO I. Biotechnological production of γ -decalactone, a peach like aroma, by *Yarrowia lipolytica* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(10): 169.
- [48] MARELLA E R, DAHLIN J, DAM M I, et al. A single-host fermentation process for the production of flavor lactones from non-hydroxylated fatty acids [J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 427-436.
- [49] MA J, GU Y, XU P. A roadmap to engineering antiviral natural products synthesis in microbes [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 66: 140-149.
- [50] MARSAFARI M, SAMIZADEH H, RABIEI B, et al. Biotechnological production of flavonoids: an update on plant metabolic engineering, microbial host selection, and genetically encoded biosensors [J]. *Biotechnology Journal*, 2020, 15(8): 1900432.
- [51] 汪庆卓, 黄和. 合成生物技术驱动天然的真核油脂细胞工厂开发 [J]. *合成生物学*, 2021, doi:10.12211/2096-8280.2020-090.
- WANG Q Z, HUANG H. Synthetic biotechnology drives the development of natural eukaryotic lipid cell factories [J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, doi: 10.12211/2096-8280.2020-090.
- [52] MUHAMMAD A, FENG X D, RASOOL A, et al. Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica* [J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 43: 107555.
- [53] WASYLENKO T M, AHN W S, STEPHANOPOULOS G. The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 27-39.
- [54] RATLEDGE C. The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems [J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(8): 1557-1568.
- [55] WYNN J P, HAMID A B A, RATLEDGE C. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi [J]. *Microbiology*, 1999, 145(8): 1911-1917.
- [56] QIAO K, WASYLENKO T M, ZHOU K, et al. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism [J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(2): 173-177.
- [57] JAYAKODY L N, JIN Y S. In-depth understanding of molecular mechanisms of aldehyde toxicity to engineer robust *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(7): 2675-2692.
- [58] XU P, QIAO K, STEPHANOPOULOS G. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(7): 1521-1530.
- [59] GU Y, XU P. Synthetic yeast brews neuroactive compounds [J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(1): 8-9.
- [60] SHUIB S, IBRAHIM I, MACKEN M M, et al. First evidence for a multienzyme complex of lipid biosynthesis pathway enzymes in *Cunninghamella bainieri* [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 3077.
- [61] RATLEDGE C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2002, 30(6): 1047.
- [62] ZHOU Y J, BUIJS N A, ZHU Z, et al. Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories [J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 11709.
- [63] YU T, ZHOU Y J, WENNING L, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of very long chain fatty acid-derived chemicals [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 15587.
- [64] BELD J, LEE D J, BURKART M D. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering [J]. *Molecular BioSystems*, 2015, 11(1): 38-59.
- [65] ZHU Z, HU Y, TEIXEIRA P G, et al. Multidimensional engi-

- neering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient synthesis of medium-chain fatty acids [J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(1): 64-74.
- [66] GAJEWSKI J, PAVLOVIC R, FISCHER M, et al. Engineering fungal *de novo* fatty acid synthesis for short chain fatty acid production [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 14650.
- [67] SINGH K, GRAF B, LINDEN A, et al. Discovery of a regulatory subunit of the yeast fatty acid synthase [J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1130-1143.
- [68] BLAZECK J, HILL A, LIU L, et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3131.
- [69] ZHANG X K, NIE M Y, CHEN J, et al. Multicopy integrants of *crt* genes and co-expression of AMP deaminase improve lycopene production in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 289: 46-54.
- [70] SILVERMAN A M, QIAO K, XU P, et al. Functional overexpression and characterization of lipogenesis-related genes in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(8): 3781-3798.
- [71] CHANG L, TANG X, LU H, et al. Role of adenosine monophosphate deaminase during fatty acid accumulation in oleaginous fungus *Mortierella alpina* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(34): 9551-9559.
- [72] SEIP J, JACKSON R, HE H, et al. *Snf1* is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(23): 7360-7370.
- [73] POMRANING K R, KIM Y M, NICORA C D, et al. Multi-omics analysis reveals regulators of the response to nitrogen limitation in *Yarrowia lipolytica* [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 138.
- [74] KERKHOVEN E J, POMRANING K R, BAKER S E, et al. Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* [J]. *npj Systems Biology and Applications*, 2016, 2: 16005.
- [75] BLAZECK J, HILL A, LIU L, et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3131.
- [76] POMRANING K R, BREDEWEG E L, BAKER S E. Regulation of nitrogen metabolism by GATA zinc finger transcription factors in *Yarrowia lipolytica* [J]. *mSphere*, 2017, 2(1): e00038-17.
- [77] XU P. Analytical solution for a hybrid Logistic-Monod cell growth model in batch and continuous stirred tank reactor culture [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(3): 873-878.
- [78] ROEHR M, ZEHENTGRUBER O, KUBICEK C P. Kinetics of biomass formation and citric acid production by *Aspergillus niger* on pilot plant scale [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1981, 23(11): 2433-2445.
- [79] CAI D, ZHU C, CHEN S. Microbial production of nattokinase: current progress, challenge and prospect [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33(5): p. 84.
- [80] XU P, DING Z, QIAN Z, et al. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42(4): 325-331.
- [81] SURENTHIRAN D, VIJAY M, SIVAPRAKASH B, et al. Kinetic modeling of microalgal growth and lipid synthesis for biodiesel production [J]. *3 Biotech*, 2015, 5(5): 663-669.
- [82] PAPANIKOLAOU S, AGGELIS G. Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats [J]. *Current Microbiology*, 2003, 46(6): 0398-0402.
- [83] DULERMO R, GAMBOA-MELÉNDEZ H, DULERMO T, et al. The fatty acid transport protein Fat1p is involved in the export of fatty acids from lipid bodies in *Yarrowia lipolytica* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(6): 883-896.
- [84] RUMIN J, BONNEFOND H, SAINT-JEAN B, et al. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 42.
- [85] FRIEDLANDER J, TSAKRACLIDES V, KAMINENI A, et al. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 77.
- [86] MENG Y, YAO C, XUE S, et al. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 151: 347-354.
- [87] CHMIELARZ M, SAMPELS S, BLOMQVIST J, et al. FT-NIR: a tool for rapid intracellular lipid quantification in oleaginous yeasts [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 169.
- [88] NĚMCOVÁ A, GONOVÁ D, SAMEK O, et al. The use of raman spectroscopy to monitor metabolic changes in stressed *Metschnikowia* sp. yeasts [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 277.
- [89] BOWMAN E K, ALPER H S. Microdroplet-assisted screening of biomolecule production for metabolic engineering applications [J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(7): 701-714.
- [90] CAO W, CHENG S, YANG J, et al. Large-scale lipid analysis with C=C location and *sn*-position isomer resolving power [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 375.
- [91] WANG M, WEI Y, JI B, et al. Advances in metabolic engineering of *saccharomyces cerevisiae* for cocoa butter equivalent production [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 1194.
- [92] WEI Y, SIEWERS V, NIELSEN J. Cocoa butter-like lipid production ability of non-oleaginous and oleaginous yeasts under nitrogen-limited culture conditions [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(9): 3577-3585.

- [93] WEI Y, BERGENHOLM D, GOSSING M, et al. Expression of cocoa genes in *Saccharomyces cerevisiae* improves cocoa butter production [J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 11.
- [94] XIONG D, ZHANG H Y, XIE Y F, et al. Conversion of mutton fat to cocoa butter equivalent by increasing the unsaturated fatty acids at the *sn*-2 position of triacylglycerol through fermentation by *Yarrowia Lipolytica* [J]. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 11(2): 57-65.
- [95] ZHAO L N, LI B, XIONG D, et al. Cocoa-butter-equivalent production from *Yarrowia lipolytica* by optimization of fermentation technology [J]. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 12(4): 196-205.

- [96] METZ J G, ROESSLER P, FACCIOTTI D, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes [J]. *Science*, 2001, 293(5528): 290.



作者简介：徐鹏(1980—)，男，工学博士，于2020年获得“生物技术与生物工程王义翘教授奖”(Biotechnology & Bioengineering Daniel I.C. Wang Award)。研究方向主要涉及代谢工程、合成生物学、生化工程、生物分子绿色制造、智能控制和生化反应网络建模等。
E-mail: peng.xu@gtit.edu.cn