

瀋陽農業大學

碩士學位論文

白霉奶酪次級發酵劑在高糖胁迫下代谢分
工合成 UFAs 的研究

研 究 生: 袁智佳

指 导 教 师: 史海粟 副教授

专 业 名 称: 食品科学

研 究 方 向: 食品生物技术

所 在 学 院: 食品学院

2024 年 6 月 20 日

Dissertation for Master

Study on the Metabolic Division and Synthesis of UFAs by
Secondary Fermentation Agents of White Mold Cheese under
High Sugar Stress

Candidate: Yuan Zhijia

Supervisor: Haisu Shi

Speciality: Food Science

Research Field: Food Biotechnology

Shenyang Agricultural University

June, 2024

目 录

第一章 前言.....	5
1.1 白霉奶酪概述.....	5
1.1.1 白霉奶酪种类及发酵菌种.....	5
1.1.2 白霉奶酪生产工艺及特点.....	5
1.1.3 白霉奶酪脂肪酸组成及其转化.....	6
1.2 微生物共培养研究进展.....	7
1.2.1 微生物共培养的相互作用关系.....	7
1.2.2 共培养代谢分工研究进展.....	8
1.2.3 微生物共培养生产脂肪酸研究进展.....	9
1.3 高糖胁迫对酿酒酵母中脂质代谢的影响	10
1.3.1 酵母脂质代谢概述.....	10
1.3.2 高糖胁迫对酿酒酵母的影响.....	10
1.3.3 酿酒酵母脂肪酸胞外分泌.....	11
1.4 研究目的及意义.....	12
1.5 本课题解决的科学问题.....	13
1.6 研究主要内容.....	13
1.7 技术路线图.....	14
第二章 酿酒酵母-白地霉共培养体系构建与强化 UFAs 生产	15
2.1 前言.....	15
2.2 材料与设备.....	15
2.2.1 供试菌株.....	15
2.2.2 试验培养基.....	15
2.2.3 主要试剂.....	15
2.2.4 主要仪器设备.....	15
2.3 试验方法.....	16
2.3.1 菌株的培养与保存.....	16
2.3.2 微生物生物量的测定.....	16
2.3.3 微生物拮抗作用.....	16
2.3.4 酿酒酵母白地霉共培养.....	16
2.3.5 共培养细胞总脂质的提取.....	17
2.3.6 共培养细胞脂肪酸含量测定.....	17
2.3.7 不同葡萄糖添加量试验.....	18
2.3.8 不同时间发酵试验.....	18
2.3.9 不同温度发酵试验.....	18

2.3.10 Box-Behnken 试验设计	18
2.4 结果与讨论	18
2.4.1 发酵剂生长特性分析	18
2.4.2 微生物间拮抗关系	19
2.4.3 菌种对比对共培养菌株合成 UFAs 的影响	20
2.4.4 葡萄糖添加量对共培养菌株合成 UFAs 的影响	21
2.4.5 培养时间对共培养菌株合成 UFAs 的影响	22
2.4.6 培养温度对共培养菌株合成 UFAs 的影响	23
2.4.7 Box-Behnken 试验结果与分析	24
2.4.8 验证试验分析	28
2.5 本章小结	28
第三章 高糖胁迫调控酿酒酵母脂肪酸代谢的机制研究	29
3.1 前言	29
3.2 材料与设备	29
3.2.1 所用菌株与引物	29
3.2.2 主要试剂	30
3.2.3 试验培养基	30
3.2.4 主要仪器和设备	30
3.3 试验方法	31
3.3.1 高糖胁迫生长适应性	31
3.3.2 生物量的测定	31
3.3.3 菌种甘油三酯的提取	31
3.3.4 菌种脂肪酸测定	31
3.3.5 胞外脂肪酸的提取	31
3.3.6 胞外脂肪酸的检测	31
3.3.7 酿酒酵母总 RNA 提取及 cDNA 合成	32
3.3.8 反转录	32
3.3.9 实时荧光定量 PCR 测定	32
3.4 结果与讨论	33
3.4.1 高糖胁迫对酿酒酵母生长和脂质合成的影响	33
3.4.2 高糖胁迫调控酿酒酵母脂肪酸合成	34
3.4.3 高糖胁迫对酿酒酵母脂肪酸合成的影响	35
3.4.4 高糖胁迫调控酿酒酵母脂肪酸转化	37
3.4.5 高糖胁迫对酿酒酵母胞外分泌脂肪酸的影响	38
3.4.6 高糖胁迫调控酿酒酵母脂肪酸分泌	39
3.5 本章小结	40
第四章 酿酒酵母细胞膜组分的高糖胁迫应答	42
4.1 前言	42

4.2 材料与设备.....	42
4.2.1 主要试剂.....	42
4.2.2 试验培养基.....	42
4.2.3 主要仪器设备.....	42
4.3 试验方法.....	43
4.3.1 细胞膜流动性的测定.....	43
4.3.2 细胞膜通透性的测定.....	44
4.3.3 麦角固醇含量的测定.....	44
4.3.4 神经酰胺含量的测定.....	44
4.4 结果与讨论.....	44
4.4.1 高糖胁迫对酿酒酵母细胞膜流动性的影响	44
4.4.2 高糖胁迫对酿酒酵母细胞膜通透性的影响	45
4.4.3 高糖胁迫对酿酒酵母细胞膜麦角固醇的影响	46
4.4.4 高糖胁迫对酿酒酵母细胞膜神经酰胺的影响	47
4.5 本章小结.....	48
第五章 共培养菌株发酵白霉奶酪的品质特性及其脂肪酸组成分析	49
5.1 前言.....	49
5.2 材料与设备.....	49
5.2.1 实验材料.....	49
5.2.2 主要试剂.....	49
5.2.3 主要仪器与设备.....	49
5.3 实验方法.....	50
5.3.1 白霉奶酪样品的制备.....	50
5.3.2 感官评定.....	50
5.3.3 pH 值测定.....	50
5.3.4 水分含量测定.....	50
5.3.5 蛋白质含量测定.....	51
5.3.6 脂肪含量测定.....	51
5.3.7 质构分析.....	51
5.3.8 滋味分析.....	51
5.3.9 脂肪酸含量测定.....	51
5.4 结果与讨论.....	51
5.4.1 白霉奶酪成熟期间的感官评价.....	51
5.4.2 pH 值变化.....	52
5.4.3 水分含量变化.....	53
5.4.4 蛋白质含量变化.....	53
5.4.5 脂肪含量变化.....	54
5.4.6 质构的变化.....	55

5.4.7 滋味的变化.....	56
5.4.8 脂肪酸含量的变化.....	57
5.5 本章小结.....	59
第六章 主要结论与展望	61
6.1 结论.....	61
6.2 展望.....	62
创新点.....	63
参考文献.....	64

摘 要

白霉奶酪富含饱和脂肪酸（SFA，约 60-70%）但缺少不饱和脂肪酸（UFA，约 30-40%）。提高白霉奶酪发酵剂的 UFAs 转化能力可以实现提升其 UFAs 含量。前期研究表明，单一发酵剂转化 UFAs 的能力有限。微生物代谢分工可以利用互利的种间交互作用，达到提高 UFAs 产量的目的。白霉奶酪次级发酵剂酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和白地霉（*Geotrichum candidum*）共培养使脂肪酸合成途径分工到两种菌株中，从而提高 UFAs 合成能力。在 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 合成 UFAs 的代谢分工过程中，产生的脂肪酸多以甘油三酯（TAG）形式储存在 *S. cerevisiae* 细胞内，无法以游离形式分泌到胞外从而被 *G. candidum* 利用。前期研究表明高糖胁迫可以提高 *S. cerevisiae* UFAs 合成和分泌，但高糖胁迫如何影响 *S. cerevisiae* 脂质代谢的机制尚不清楚。本研究首先构建 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 共培养体系并确定培养条件对 UFAs 生产的影响顺序；探索高糖胁迫对 *S. cerevisiae* UFAs 合成与分泌的调控机制；分析高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 细胞膜的影响；将 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 共培养菌株作为发酵剂应用于霉菌奶酪制作，考察奶酪中 UFAs 含量变化。主要研究结果如下：

（1）优化发酵条件提高了 *S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 共培养菌株中的 UFAs 产量：共培养菌株（*S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 配比为 2:1）在葡萄糖添加量为 10%（v/v）的培养基中 30℃恒温培养 3 天，UFAs 产量可达到 $(165.73 \pm 2.7 \text{ mg/L})$ ，与单菌 UFAs 相比提高了 2.39 倍。利用回归模型方差分析确定培养条件对共培养菌株中 UFAs 含量影响顺序为：葡萄糖添加量>培养时间>培养温度。

（2）解析了高糖胁迫对 UFAs 合成的调控过程：考察高糖胁迫后，*S. cerevisiae* 中 TAG，胞内脂肪酸和胞外脂肪酸含量，并检测脂质代谢相关基因转录水平变化。结果表明，*S. cerevisiae* 中脂肪酸合成的关键酶乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC1 的转录水平提高了 1.42 倍，TAG 含量提高了 2.30 倍，高糖胁迫参与调控 ACC1 主导的脂质合成系统；*S. cerevisiae* 在葡萄糖添加量为 14%（v/v）的条件下总脂肪酸含量增加了 2.16 倍，油酸含量提高至 $80.04 \pm 0.74 \text{ mg/L}$ ，提高了 3.20 倍。脂肪酸转化相关 FAA1 酶基因表达量仅为 0.35 倍，高糖胁迫参与调控 FAA1 主导的脂肪酸转化系统；*S. cerevisiae* 胞外脂肪酸均有提高，当葡萄糖添加量为 14%（v/v）时胞外脂肪酸总量 $54.63 \pm 3.62 \text{ mg/L}$ ，提高了 2.22 倍，且催化水解脂酰 CoA 释放 FFA 的硫酯酶 TES1 的转录水平提高了约 2.15 倍。*S. cerevisiae* 通过提高脂肪酸合成和分泌相关基因转录水平并降低脂肪酸转化相关基因转录水平来实现脂肪酸含量增加并分泌到胞外。

（3）分析了 *S. cerevisiae* 细胞膜的高糖胁迫应答：考察高糖胁迫对细胞膜中

的麦角固醇、神经酰胺、细胞膜流动性和通透性的影响。结果表明, *S. cerevisiae* 细胞膜发生一系列生理应答以适应高糖环境。细胞膜中的麦角固醇含量由 4.58 ± 0.12 mg/g 降低到 2.51 ± 0.13 mg/g, 神经酰胺含量由 1258.58 ± 15.66 mg/g 降低到 1031.63 ± 20.27 mg/g。细胞膜的流动性提高了 1.17 倍, 通透性先增大后趋于稳定。

(4) 添加共培养菌株提高了白霉奶酪中 UFAs 含量: 评价成熟期间白霉奶酪的品质特性与 UFAs 的组成与含量。结果表明随着成熟时间的延长, 白霉奶酪的水分含量、pH 值、蛋白质含量和脂肪含量呈下降趋势; 奶酪的硬度和咀嚼性提升, 粘性波动较为明显; 共培养发酵奶酪中 UFAs 的含量显著提升, 成熟第 15 天, UFAs 含量达到 15.4 ± 1.49 g/100 g, UFAs 占总脂肪酸的比例从 38.54% 升至 47.29%。

以上研究结果揭示了基于高糖胁迫的 UFAs 合成与分泌的调控机制, 促进白霉奶酪中优势菌对 UFAs 的高效转化, 对提高白霉奶酪 UFAs 含量和提升奶酪产品附加值具有重要意义。

关键词: 白霉奶酪; 不饱和脂肪酸; 共培养; 高糖胁迫

Abstract

White mold cheese is rich in saturated fatty acids (SFA, about 60-70%) but lacks unsaturated fatty acids (UFA, about 30-40%). Improving the UFAs conversion ability of the white mold cheese starter can increase its UFAs content. Previous studies have shown that the ability of a single fermentation agent to convert UFAs is limited. The division of microbial metabolism can use mutually beneficial interspecific interactions to achieve the purpose of increasing UFAs production. The co-culture of cheese starter *Saccharomyces cerevisiae* and *Geotrichum candidum* divided the fatty acid synthesis pathway into two strains, thereby improving the UFAs synthesis ability. During the metabolic division of *S. cerevisiae* and *G. candidum* to synthesize UFAs, the fatty acids produced are mostly stored in *S. cerevisiae* cells in the form of triglycerides, and cannot be secreted into the extracellular in a free form to be utilized by *G. candidum*. Previous studies have shown that high glucose stress can increase the synthesis and secretion of *S. cerevisiae* UFAs, but the mechanism of how high glucose stress affects *S. cerevisiae* lipid metabolism is unclear. In this study, the co-culture system of *S. cerevisiae* and *G. candidum* was constructed, and the order of influence of culture conditions on UFAs production was determined. To explore the regulation mechanism of high glucose stress on the synthesis and secretion of *S. cerevisiae* UFAs ; the effect of high glucose stress on the cell membrane of *S. cerevisiae* was analyzed. The co-culture strains of *S. cerevisiae* and *G. candidum* were applied to the production of mold cheese to increase the content of UFAs in cheese. The main results are as follows:

(1)The optimized fermentation conditions improved the yield of UFAs in the co-culture strains of *S. cerevisiae* and *G. candidum*: The co-culture strain (the ratio of *S. cerevisiae* to *G. candidum* was 2:1) was cultured in a medium with a glucose addition of 10% (v/v) at 30°C for 3 days. The yield of UFAs reached 165.73 ± 2.7 mg/L, which was 2.39 times higher than that of single-strain UFAs. The regression model analysis of variance was used to determine the order of the influence of culture conditions on the content of UFAs in co-cultured strains: glucose addition > culture time > culture temperature.

(2)The regulation process of high glucose stress on UFAs synthesis was analyzed. The contents of triglycerides, intracellular fatty acids, and extracellular fatty acids in *S. cerevisiae* were investigated after high glucose stress, and the transcription levels of lipid metabolism-related genes were detected. The results showed that the transcription level of acetyl-CoA carboxylase ACC1, a key enzyme for fatty acid synthesis in *S. cerevisiae*, increased by 1.42 times, and the triglyceride content increased by 2.30 times. High glucose stress was involved in the regulation of the ACC1-dominated lipid synthesis system. The total fatty acid content of *S. cerevisiae* increased by 2.16 times, and the oleic acid content increased to 80.04 ± 0.74 mg/L under the condition of 14% (v/v) glucose addition, which increased by 3.20 times. The expression level of the fatty acid conversion-related gene FAA1 enzyme gene was only 0.35 times, and high glucose stress was involved in the regulation of the FAA1-dominated fatty acid conversion system. The extracellular fatty acids of *S. cerevisiae* increased. When the amount of

glucose was 14% (v/v), the total amount of extracellular fatty acids was 54.63 ± 3.62 mg/L, which was increased by 2.22 times, and the transcription level of thioesterase Tes1, which catalyzes the hydrolysis of acyl-CoA to release FFA, was increased by about 2.15 times. *S. cerevisiae* increases fatty acid content and secretion to the extracellular level by increasing the transcription level of fatty acid synthesis and secretion-related genes and reducing the transcription level of fatty acid oxidation-related genes.

(3) The high glucose stress response of *S. cerevisiae* cell membrane was analyzed: The effects of high glucose stress on ergosterol, ceramide, cell membrane fluidity, and permeability in the cell membrane were investigated. The results showed that the cell membrane of *S. cerevisiae* underwent a series of physiological responses to adapt to the high glucose environment. The ergosterol content in the cell membrane decreased from 4.58 ± 0.12 mg/g to 2.51 ± 0.13 mg/g. The ceramide content decreased from 1258.58 ± 15.66 mg/g to 1031.63 ± 20.27 mg/g. The fluidity of the cell membrane increased by 1.17 times, and the permeability increased first and then stabilized.

(4) The addition of co-cultured strains increased the content of UFAs in white mold cheese: The quality characteristics of white mold cheese during ripening and the composition and content of UFAs were evaluated. The results showed that the moisture content, pH value, protein content, and fat content of white mold cheese decreased with the prolongation of ripening time. The hardness and chewiness of the cheese were improved, and the viscosity fluctuation was more obvious. The content of UFAs in co-cultured fermented cheese increased significantly. On the 15th day of maturation, the content of UFAs reached 15.4 ± 1.49 g/100 g, and the proportion of UFAs in total fatty acids increased from 38.54% to 47.29%.

The above research results reveal the regulatory mechanism of UFA synthesis and secretion based on high sugar stress, promoting the efficient transformation of UFAs by dominant bacteria in white mold cheese, which is of great significance for increasing the content of UFAs in white mold cheese and enhancing the added value of cheese products.

Key words: white mold cheese; unsaturated fatty acids; co-culture; high glucose stress

第一章 前言

1.1 白霉奶酪概述

1.1.1 白霉奶酪种类及发酵菌种

白霉奶酪是在牛奶中加入乳酸菌(LAB)发酵剂、凝乳酶和霉菌发酵制成的,这一过程的特点是接种霉菌(Suzuki-Iwashima et al., 2020),使奶酪的表面存在由霉菌产生的白色菌丝体,形成独特的白色外皮(Adamska et al., 2017)。依据发酵菌种的不同分为白地霉奶酪(*Geotrichum cheese*)、布里奶酪(Brie)、卡门贝尔奶酪(Camembert)(Judacewski et al., 2019)。奶酪的质地、风味和香气是由成熟过程中发生的生化 and 微生物变化决定的。微生物发酵剂在奶酪的成熟过程中发挥着重要作用(Sacristán et al., 2012)。

G. candidum 作为霉菌奶酪成熟过程中的优势菌株,通常用作奶酪制作的发酵剂(Luo et al., 2019)。*G. candidum* 在奶酪成熟过程中主要生长在奶酪皮表面,使奶酪具有均匀、白色和天鹅绒般的外观(Li et al., 2020b; Vong and Liu, 2017)。*G. candidum* 具有典型的强烈的脂解和蛋白解活性,从而形成大量挥发性化合物,进一步带来丰富、芳香、独特的风味(Monnet et al., 2015)。*G. candidum* 脂肪酶也是许多奶酪中脂肪酸含量高的原因,其能产生一系列对长链 UFAs 具有特异性的脂肪酶。一种同型脂肪酶在 TAG 中表现出对顺式(Δ -9)不饱和脂肪酸的偏好,这些脂肪酸如油酸或亚油酸在第 9 个碳位置有双键。

1.1.2 白霉奶酪生产工艺及特点

白霉奶酪的生产的一般工艺流程为:1)原料乳预处理;2)巴氏杀菌;3)冷却至室温后添加乳酸菌发酵剂进行预酸化;4)添加氯化钙溶液;5)添加凝乳酶进行凝乳,排乳清;6)喷洒霉菌孢子液,发酵;7)盐渍,切块;8)后熟并进行贮存。白霉奶酪的风味和品质特征不仅受微生物群落的变化影响,还会受加工方式的影响,从而赋予白霉奶酪的典型特征。白霉奶酪加工工艺流程和工艺特点如表 1-1(Jaster et al., 2019; Zeng et al., 2022)和表 1-2(Bintsis and Thomas, 2021; Zeng et al., 2022)所示。

表 1-1 白霉奶酪加工工艺流程

Table 1-1 Flow chart of the production process of white mold cheese

奶酪	生产工艺工艺流程
布里奶酪	原料乳→标准化→巴氏杀菌→冷却→添加发酵剂→添加凝乳酶凝乳→切割，保温搅拌→排乳清→装模→盐渍→喷洒霉菌发酵剂→成熟→贮存
卡门贝尔奶酪	生牛乳→预处理→嗜温乳酸菌，凝乳酶凝乳→切块→排乳清→盐渍→喷涂霉菌孢子液→表面成熟→贮存
白地霉奶酪	新鲜牛乳→预处理→乳酸菌预酸化→氯化钙溶液→凝乳酶凝乳→切割，搅拌→排乳清→盐渍→喷涂霉菌孢子液→后熟→贮存

表 1-2 白霉奶酪加工工艺特点

Table 1-2 Processing characteristics of white mold cheese

奶酪	布里奶酪	卡门贝尔奶酪	白地霉奶酪
奶酪分类	软质奶酪	软质奶酪	软质奶酪
原料乳类型	新鲜牛乳	生牛乳	生牛乳
凝乳方式	凝乳酶凝乳	30℃凝乳 10~20 min	凝乳酶凝乳
排乳清	放入模具，分段翻转排乳清	放入特定容器，挤压排乳清	放入模具，上下翻转排乳清
盐渍	20%~26%盐水浸泡 1~2 h	干盐腌制	20%盐水浸泡 1 h
发酵剂种类	白青霉、嗜温乳酸菌	娄地青霉、白地霉、嗜温乳酸菌	白地霉、嗜温乳酸菌
成熟条件	12℃~15℃、相对湿度>90%	10℃~13℃、相对湿度>95%	12℃、相对湿度>95%

1.1.3 白霉奶酪脂肪酸组成及其转化

白霉奶酪营养成分丰富，脂质占干重的 20-35%，由 SFAs 和 UFAs 组成 (Luo et al., 2019; Santiago-López et al., 2018)。然而，白霉奶酪中缺乏 UFAs (栾滨羽等, 2020)。这是造成奶酪中 SFAs 与 UFAs 比例失衡的主要原因。长期食用含有大量 SFAs 而缺乏 UFAs 的奶酪，可能会导致高脂血症、高血压、动脉粥样硬化等各种心脑血管疾病 (Calder et al., 2016; Ramsden et al., 2021)。为了健康饮食，平衡奶酪中 SFAs 与 UFAs 比例是非常必要的 (Appukutty et al., 2023; Wang et al., 2023)。利用白霉奶酪发酵剂对脂肪酸的转化可以实现提升其 UFAs 含量。

白霉奶酪成熟过程中，常见的 UFAs 合成途径是脂肪酸脱饱和酶和延伸酶参与的以硬脂酸为底物的长链 UFAs 合成途径。团队前期阐明了高山被孢霉和 *G. candidum* 中 $\Delta 12$ 脂肪酸脱饱和酶 (FADS12) 催化特性的分子机理。并且利用同源建模和分子对接技术进一步揭示了酶口袋结构域及与底物结合的关键氨基酸

位点对 FADS 活性和底物选择性的重要性 (史海粟, 2017)。在此基础上, 通过基因工程技术在 *G. candidum* 中过表达了编码高活性的卷枝毛霉的 $\Delta 12$ 脂肪酸脱饱和酶的基因, 提高 *G. candidum* 工程菌生产 UFAs 能力, 在单一发酵剂层面提高了白霉奶酪 UFAs 含量 (吴琛, 2023)。因此, 选用优良的 UFAs 合成微生物用于霉菌奶酪制作, 对于霉菌奶酪中 UFAs 含量的提高是至关重要的。*G. candidum* 是白霉奶酪中优势微生物菌种, 可以通过增强 *G. candidum* 的 UFAs 转化能力, 增加奶酪 UFAs 的含量。已有研究通过在缺氮培养基中添加微量激活剂来激发脂肪生成途径 ACL、ACC 和 ME 的一种或多种关键酶, 从而促进微生物的整体脂肪生成或脂质积累。通过调节培养基的碳源种类、碳氮比来优化 *G. candidum* 的脂肪酸组成, 提高脂肪酸的营养价值 (Diwan and Gupta, 2020)。为通过优化 *G. candidum* 脂肪酸合成促进奶酪中 UFAs 转化提供了研究基础。

1.2 微生物共培养研究进展

1.2.1 微生物共培养的相互作用关系

微生物群落在自然界中无处不在, 在生物经济的许多领域都很有用 (McCarty and Ledesma-Amaro, 2019), 在食品生产、微量营养素的循环利用以及维持人类、动物和植物的健康方面具有重要意义。共培养是两种或两种以上不同生物体共存的生物系统, 它们在明确定义的自然或人工培养基中以一定程度的接触生长 (Goers et al., 2014; Padmaperuma et al., 2017; Rosero-Chasoy et al., 2021), 其中不同菌株可以相互作用。共培养系统中的微生物可能是协同的, 包括互惠和共生, 这种协同作用通常涉及释放用于营养目的分子, 如植物激素和生长促进剂 (Magdouli et al., 2016)。另一方面, 共培养系统也可能是胁迫的, 包括寄生或掠夺, 如释放抑制微生物生长的毒素、抗生素和生物碱 (Padmaperuma et al., 2017)。

种间群体感应 (Quorum Sensing, QS) 作为微生物群落相互作用的方式普遍存在自然界中, 在生长过程中根据种群的密度变化来调控微生物的基因表达 (Ledesma-Amaro and Nicaud, 2016a)。通过适应现有的生物通信系统, 可以构建合成微生物联合体 (Yin and Keller, 2011)。基因转移也是微生物群落相互作用的一种方式, 某些基因在特定条件下可以在不同细胞之间发生横向转移 (黄兵等, 2009)。由于基因转移这种现象, 在微生物群落中, 某些微生物可能同时获得多种优势, 例如在生长方面存在优势的同时, 产生代谢产物的能力也有所提升 (王儒红, 2023)。基于天然微生物群落内部的相互作用关系, 采用合理的策略对多个细胞群体进行共培养, 为合成微生物群落的成功获得提供了理论和实验支持, 促进了其在众多领域的工业应用研究和对天然微生物群落的深入了解 (Jia et al., 2016)。

1.2.2 共培养代谢分工研究进展

与纯培养相比,由多个物种组成的共培养具有更广泛的基因和代谢能力,因为它们能够以各种方式相互作用(Espinosa-Ortiz et al., 2021)。当目标产物的生物合成途径漫长而复杂时,大量基因会在单个菌株中异源表达。一般来说,引入的酶的生化特性和表达水平有很大的差异。单个宿主细胞无法为所有酶提供最佳的功能环境,而微生物群落可以为不同的酶提供多样化的细胞环境。共培养群落中不同微生物物种之间的相互作用可导致新出现的共同特性的发展,例如:稳定性、稳健性(生存压力的能力)和劳动分工(Division of Labor, DOL)(菌株在微生物群落中执行不同任务的专业化)(Rice et al., 2014; West and Cooper, 2016)。不同的种群执行不同的任务,可以使微生物联合体以比单一培养更高的效率完成任务。如果构建得当,代谢分工可以以多种方式促进群落功能(Tsoi et al., 2019)。

(1) 通过专门化改进功能。代谢分工可以通过将不同步骤划分给微生物群落的不同成员来实现途径的合理组织,从而提供有利于每个过程的自然或工程环境。当多个步骤不能在同一菌株中共存时,这种分工是必要的。例如,像木质纤维素生物质含有许多单糖和其他碳源的原料,已经成为可再生微生物生物合成的研究热点(Isikgor and Remzibecer, 2015)。然而,由于分解代谢抑制,单个种群通常不能同时利用多种糖,而是按偏好顺序一次消耗一种糖。相比之下,群落可以通过每个种群代谢一个碳源来更快、更有效地利用这些混合物。

(2) 减轻代谢负担。维持异源成分如酶和质粒会给宿主带来显著的代谢负担。基因表达会流失宿主资源,包括核苷酸、氨基酸和 ATP,这些资源随后无法用于细胞生长或维持(Wu et al., 2016)。这种负担降低了培养的适应度,从而导致培养的生产力低下或促进功能丧失突变。对于特别复杂的系统,由于过重的代谢负担,包含所有途径的单个菌株可能根本无法生长。通过 DOL 将执行工程功能的任务分散到不同的菌种中,可以减少每个菌种的负担。该策略可以通过提高个体种群的适应度来提高系统性能,从而提高单个种群的产品产量(Tsoi et al., 2018)。这种增加是因为代谢负担的减少超过了代谢物运输导致的生产力下降。因此, DOL 可以使更复杂的途径在联合体中被设计出来,而这些途径在单个群体中可能不是最优的或不起作用的。与单一培养相比,许多共培养的例子具有更长的途径,更少的酶,和更高的性能(Zhang et al., 2015)。

(3) 降低工程复杂性。将细胞过程划分为不同的种群可以增加系统的模块性。可以在不影响其他功能的情况下,以即插即用的方式独立地调整、修改或替换各个模块。因此,根据其复杂程度,利用分工的联合体可能比单个细胞更容易操作,因为每个菌株只包含总体途径的其中一段。

DOL 可以简化这些代谢途径的优化(Roell et al., 2019)。对于单一培养,构

建高效的异源途径通常涉及途径组分的调整,如启动子、核糖体结合位点、终止子和载体,然后是设计-构建-测试周期(Chen et al., 2018),这是劳动密集型和成本效益低的。相比之下,微生物群落的优化更容易,只需改变组成菌株的比例即可实现(Jones et al., 2016)。从理论上讲,培养物成分的改变可以在发酵过程的任何阶段通过补充所需的次培养物来进行。

将微生物作为一个群体进行培养面临着几个关键的限制。如果一个途径被分配到不同菌种,代谢物转运可能是一个问题,因此第一个产物必须转运到第二个宿主中进行进一步转化。如果第一个产物(例如磷酸化分子)不稳定或不能穿过细胞膜,或者第二个宿主缺乏从第一个宿主摄取前体的转运蛋白,DOL将失败。设计有效的转运蛋白和外排系统并不容易,还可能增加代谢负担(Zhou et al., 2012)。此外,长步骤生物合成途径通常需要接近通道来克服体内扩散限制、代谢产物损失和热力学障碍。两个不同物种之间生物合成途径的DOL可能会破坏固有通道并稀释中间浓度,这不可避免地阻碍生物合成效率。

1.2.3 微生物共培养生产脂肪酸研究进展

现有提高油脂产率的方法包括基因敲除(Courchesne et al., 2009)、添加诱导剂(Huang et al., 2017a)、非生物胁迫、添加金属离子(Yeesang and Cheirsilp, 2011)和发酵罐培养等。但是这些方法存在着能耗高、效率低、需增加额外的设备、前期投入较大、成本高等缺陷。共培养是一种有效地提高生物量和油脂产量的方法。共培养中氮的消耗比单独培养更快,这将提高微生物生产油脂的效率(刘鹭, 2020)。将短链脂肪酸代谢能力存在种间特异性的互营球菌和梭菌属共培养,与单培养相比生物量和短链脂肪酸的积累都明显提高(孙红, 2023)。通过将给定的微藻与生产性微生物(如酵母)和生物转化的碳底物混合培养成有价值的生物活性脂肪酸,可以增加生物量和功能性代谢物的产量。酵母和微藻共培养可以提高脂质产量,因为酵母利用微藻通过光合作用产生的 O_2 ,并通过酵母的呼吸作用为微藻提供 CO_2 ,达到气体互换的目的,从而提高生物量和油脂产量(Ashtiani et al., 2021; 刘方舟等, 2020)。

菌株间相互作用和外部条件对共培养菌株中脂肪酸的组成产生影响(Marileo et al., 2023)。共培养蓝藻和曲霉导致脂肪酸含量发生了从C18:0和C18:1到C18:2和C18:3的变化,这表明蓝藻和曲霉之间可能发生代谢相互作用,并导致有利于脂肪酸去饱和的途径的调整(Li et al., 2020a)。此外,通过添加氮限制培养条件,小球藻和大肠杆菌共培养菌株中的TAG和油酸含量明显提升,亚油酸含量变化不大,表现出三烯脂肪酸向单烯脂肪酸的显著转变(Higgins et al., 2015)。

1.3 高糖胁迫对酿酒酵母中脂质代谢的影响

1.3.1 酵母脂质代谢概述

TAG 和甾醇酯作为酵母细胞中的重要中性脂组成成分，在氮缺乏的情况下大量积累 (Probst et al., 2016)。单细胞油的生物合成有两种生物化学途径：细胞脂质在含有非脂质碳源的培养基中的从头合成和从环境中摄取脂肪酸的合成微生物油脂 (Fabiszewska et al., 2022)。从头合成包含脂肪酸前体的合成及其储存油脂的合成途径，并且它在含有非脂质碳源的介质中进行。脂肪酸在脂溶性酵母细胞的细胞质中由乙酰 CoA 生成，乙酰 CoA 可来自 ATP 柠檬酸裂解酶的作用。脂肪酸合成酶 (FAS) 是新生成途径中的第二个关键酶，可产生作为起始分子的酰基 CoA 和作为延伸单元的丙二酰 CoA。活化的 16:0 和 18:0 分子是延伸酶和脱饱和酶的底物，通过肯尼迪途径产生长链脂肪酸和 UFAs (Ledesma-Amaro and Nicaud, 2016b)。不同酵母种类的脂肪酸种类不同。例如，在 *S. cerevisiae* 中，主要的脂肪酸种类包括具有 16 个碳原子和 18 个碳原子的单不饱和脂肪酸。*S. cerevisiae* 不具有 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶，也不产生亚油酸 (Takaku et al., 2020)。

酵母菌大多将脂质储存为 TAG (占中性脂质部分的 80-90%)；小部分则以固醇酯 (SE) 的形式储存在脂质体 (LB) 中 (Park and Nicaud, 2020)。在营养有限的环境中，储存的脂质通过再活化、运输和降解被用作额外的碳源。TAG 通过两种脂肪酶水解为游离脂肪酸 (FFA)：Tgl4p 和 Tgl3p。然后，脂肪酸通过 β -氧化途径在过氧化物酶体中降解，将脂肪酸主链缩短两个碳，并释放乙酰 CoA。脂肪酸可以被细胞质中的脂肪酰基辅酶 A 合成酶激活，已经鉴定出六个编码脂肪酰基辅酶 A 合成酶的基因 (*FAA1*、*FAA2*、*FAA3*、*FAA4*、*FAT1*、*FAT2*)，根据 FFA 链长的不同，这些酶表现出不同的活性模式 (Fang et al., 2016)。然后被转运蛋白 Pxa1p/Pxa2p 转运到过氧化物酶体进行降解 (Dulermo et al., 2015)。

1.3.2 高糖胁迫对酿酒酵母的影响

生长需要低碳，而脂质合成需要高碳。葡萄糖浓度的增加会影响脂质的组成 (Chandra et al., 2014)。在这种条件下，由于氮源的缺乏，细胞的生长趋于稳定，达到固定阶段。在这个阶段，储存的碳水化合物转变为脂质转化的途径。脂质积累的增强可能发生在氮耗竭和过量有机碳的可用性下。因此，脂质积累可归因于糖的消耗速度高于细胞分裂的速度，这将促进多余的碳转化为脂质。较高的脂质合成还与参与细胞生长和增殖的主要酶的停止以及与脂质积累特异性相关的酶的过度表达有关 (Mohan and Devi, 2014)。储存脂质生物合成的必要条件是三羧酸循环 (TCA) 受到干扰，乙酰 CoA 被引导到脂肪酸生物合成而不是氧化 (Bellou et al., 2016)。在这些条件下，细胞质中的柠檬酸被 TP-柠檬酸裂解酶裂解成乙酰 CoA 和草酰乙酸 (Dourou et al., 2017)。高糖环境抑制酵母的有氧呼吸作用，即

Crabtree 效应, 从而改变酵母生理代谢途径, 当糖浓度持续增加时 Crabtree 效应增大, 使酵母的 TCA 循环断裂, 因此导致大量的柠檬酸、 α -酮戊二酸和苹果酸积累 (雷梦琳等, 2020)。

高糖可以提高乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC1 水平, 从而提高脂肪酸产量。ACC1 是脂肪酸合成的关键酶, 其活性受到多层次调控 (Zhu et al., 2020)。因此, 可通过增加 ACC1 水平提高脂肪酸的合成 (Fernandez-Moya and Da Silva, 2017)。在 Shin 等 (2012) 的研究中, *S. cerevisiae* ACC1 基因的过表达使脂肪酸和胆固醇水平分别增加了 4.0 和 1.7 倍。在另一种提高 ACC1 活性的方法中, 拟南芥乙酰辅酶 A 羧化酶基因在 *S. cerevisiae* 中过表达, 导致脂质含量增加 1.6 倍 (Wang et al., 2014)。*S. cerevisiae* 的 ACC1 蛋白受 Snf1 负调控。Snf1 对 ACC1 进行磷酸化后, ACC1 的活性会降低高达 90%, 其假定机制是位于中心结构域调节环中的磷酸化 Ser1157 残基干扰了 ACC1 酶活性所必需的二聚化。Snf1 的激活是由葡萄糖消耗引发的, 通过一个或多个丝氨酸残基的磷酸化导致 ACC1 部分失活 (Woods et al., 1994)。当葡萄糖被消耗时, 活性 ACC1 的减少从而导致胞质丙二酰 CoA 池的下降。以前曾尝试用丙氨酸取代该丝氨酸残基以取消磷酸化调节, 结果导致脂肪酸产量显著增加 (Choi and Da Silva, 2014; Hofbauer et al., 2014; Shi et al., 2014)。此外, 这种操作导致酵母细胞中长链脂肪酸的比例增加。研究表明, 当酵母细胞在高糖环境下, Snf1 被灭活 (Carlson, 1999), 因此高糖情况下, Snf1 对 ACC1 的负调控被解除, 在一定程度上提高 ACC1 水平, 从而提高脂肪酸产量。

1.3.3 酿酒酵母脂肪酸胞外分泌

许多酵母已被改造以积累细胞内脂质, 但脂肪酸分泌尚未得到深入研究, 仅在少数情况下在 *S. cerevisiae* 中被报道 (Ledesma-Amaro et al., 2016)。早期研究人员认为, 脂肪酸转运只是一种简单的扩散, 不存在能量消耗。然而随着分子生物学的深入, 已经发现了一些与脂肪酸转运和分泌相关的功能蛋白和基因, 然而到目前为止, 其分泌的相关机制尚不清楚 (He, 2023; Jindra et al., 2023)。

阻止 FFA 被催化成酰基 CoA 的途径, 既可以增加 FFA 的数量, 又可以将 FFA 从细胞内转运到培养基中。相关的活化酶是酰基辅酶 A 合成酶。*S. cerevisiae* 具有 5 种酰基辅酶 A 合成酶, 它们参与不同的过程, 并表现出不同的脂肪酸特异性。酰基辅酶 A 合成酶的活性与脂肪酸的摄取以及细胞内脂质储存的动员有关 (López et al., 2023)。FAA1 和 FAA4 是激活长链 FFAs 的主要酶。FAA1 对 12-16 碳链具有很高的活性, 但也可以激活己酸和硬脂酸; FAA4 显示了与 FAA1 重叠的功能。酵母中的中链 FFA 被过氧化物酶体 FAA2 催化, 对 C8-C14 具有底物特异性。FAA3 的活性明显低于 FAA2 和 FAA1, 并不是外源性脂肪酸激活所

必需的。FAT1 是一种多功能酶，参与长链和超长链脂肪酸的转运和活化。FAA1 的破坏使分泌到培养基中的脂肪酸量增加了 2 倍，也增加了细胞内脂肪酸水平。当 FAA1 和 FAA4 均被破坏时，脂肪酸分泌增加(Li et al., 2014)。Leber 等(2015)敲除了 *FAT1*，与敲除 *FAA1 FAA4* 菌株相比，敲除 *FAT1* 菌株分泌的长链 FFA 增加了 60%。阻止 FFA 活化和 β -氧化可进一步提高细胞外 FA 水平。联合缺失 *FAA4* 和 *POXI* 会使分泌到培养基中的 FFA 比单独缺失 *FAA4* 增加 54%(Runguphan and Keasling, 2014)。Li 等(2014)发现相对于 *FAA1* 和 *FAA4* 的缺失，*FAA1*、*FAA4* 和 *POXI* 的缺失使 FFA 增加了 31%。

除了防止降解和激活外，还可以侧重于增加 FFA 的合成。硫酯酶普遍存在于微生物体中，它催化水解脂酰 CoA 或脂酰基 ACP 形成 CoASH 或 ACP，释放 FFA，是脂肪酸合成、降解、转运的关键酶。酰基 CoA 硫酯酶可以表达以从酰基 CoA 形式获得 FFA。微生物产生的脂肪酸是以胞内脂形式还是以 FFA 形式存在，在细胞内是由硫酯酶的活性决定的 (Voelker et al., 1997)。在敲除 *FAA1* 的大肠杆菌中，表达硫酯酶 *TesA* 能将 FFA 含量从 5 mg/L 提高到 164 mg/L，并且在敲除 *FAA1 FAA4* 菌株后，提高到 207 mg/L (Runguphan and Keasling, 2014)。大肠杆菌的 *TesA* 硫酯酶或小鼠 *ACOT5* 硫酯酶的截断版本的过表达进一步增加了 FFA 产量，分别达到 207 mg/L (Chen et al., 2014) 和 520 mg/L (Runguphan and Keasling, 2014)。这种方法最近已与其他几种提高 FFA 的方法结合使用 (Zhou et al., 2016)。在工程改造大肠杆菌过量生产 FFA 的工作中 *ACC1* 和 *TesA* 在同时表达后，脂肪酸的合成有非常明显的增加。*S. cerevisiae* 只有一种已知的酰基辅酶 A 硫酯酶 *Tes1* (李晓伟, 2017)。这种 TE 靶向酵母过氧化物酶体，具有广泛的底物特异性。天然 *Tes1* 在敲除 *FAA1 FAA4* 的菌株中将 FFA 的总产量从 77 mg/L 增加到 115 mg/L (Li et al., 2014)。在聚藻球菌中，几个硫酯酶和乙酰辅酶 A 羧化酶基因同时过表达使 FFA 分泌，在高含量乙酸中预培养和测序分批培养可以提高产油酵母细胞外脂质产量 (Huang et al., 2018)。

虽然传统上脂肪酸分泌是被动地通过膜扩散，但现在人们认为这些过程是由细胞中的特定蛋白质控制的 (Claus et al., 2019)。例如，在 *S. cerevisiae* 中，Pry 蛋白对脂肪酸输出有影响。*S. cerevisiae* 的 Pry 蛋白已被实验鉴定参与脂肪酸输出，其中 ScPry1 是最重要的一个。ScPry1 的结构包含棕榈酸的结合袋。这些是来自 CAP 超家族的细胞外脂肪酸结合蛋白，也与固醇输出有关 (Darwiche et al., 2018)。在缺乏两种酰基辅酶 A 合成酶 *FAA1* 和 *FAA4* 的双突变体中，Pry1 结合和输出 FFA 对于细胞内积累高水平 FFA 的细胞的存活是重要的。

1.4 研究目的及意义

以 *S. cerevisiae* 为研究对象，分析高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 脂质合成、转化、

胞外分泌和组成，并验证在这个过程中相关基因的表达，探究高糖胁迫对 *S. cerevisiae* UFAs 合成的影响以及脂肪酸胞外分泌的作用机制。通过高糖胁迫增强 *S. cerevisiae* 脂肪酸合成和分泌能力，应用于 *S. cerevisiae*-*G. candidum* 共培养，促进白霉奶酪中 UFAs 的转化，平衡霉菌奶酪 SFAs 与 UFAs 比例，提高白霉奶酪附加值。

深入探究基于高糖胁迫的 UFAs 合成与分泌的调控机制，将有助于增强 *S. cerevisiae* 脂肪酸合成和分泌能力，应用于 *S. cerevisiae*-*G. candidum* 共培养，提高菌株 UFAs 转化能力，将其应用于奶酪制作，增强对奶酪中 SFAs 的转化，对于提高白霉奶酪 UFAs 含量，促进奶酪行业发展具有重要意义。

1.5 本课题解决的科学问题

研究通过高糖胁迫提高白霉奶酪微生物合成 UFAs 与分泌量，并应用于白霉奶酪发酵，课题拟解决高糖胁迫作用如何将 TAG 转化成 FFA 而实现脂质分泌，进而解决在利用 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 进行代谢分工过程中由于 *S. cerevisiae* 中 TAG 不能分泌到胞外被 *G. candidum* 而利用的问题。

1.6 研究主要内容

（1）酿酒酵母与白地霉共培养体系构建与强化 UFAs 生产

首先制备共培养发酵剂孢子悬液确定共培养菌株生长情况，随后进行微生物拮抗实验测 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 是否存在抑制作用。其次分别接种不同菌种配比的菌液，通过鉴定菌液中 UFAs 产量，确定最佳的混合菌液发酵配比，并考察优化发酵条件（葡萄糖添加量、发酵时间、发酵温度）对共培养菌株合成 UFAs 的影响。

（2）高糖胁迫调控酿酒酵母脂肪酸代谢的机制研究

通过响应面法证明葡萄糖添加量对共培养菌株中 UFAs 的合成具有显著影响，因此将 *S. cerevisiae* 在不同葡萄糖添加量下进行培养，探究其生长量及脂质和脂肪酸组成，其次通过检测 *S. cerevisiae* 中 UFAs 含量和脂肪酸合成、转化和分泌相关基因转录水平来分析 *S. cerevisiae* 在高葡萄糖胁迫下对 UFAs 的合成和胞外分泌的影响机制。

（3）高糖胁迫对酿酒酵母细胞膜的影响

考察高糖胁迫对细胞膜中的麦角固醇和神经酰胺含量变化情况，研究高糖胁迫对细胞膜流动性和通透性的影响，探索高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 细胞膜的影响，进而深入分析高糖胁迫下脂肪酸分泌的调控机制。

（4）共培养菌株发酵白霉奶酪的品质特性及其脂肪酸组成分析

共培养菌株作为优势真菌发酵白霉奶酪，测定白霉奶酪感官评分、基础理化

指标, 结合滋味和质构分析来评估白霉奶酪的品质特性。白霉奶酪成熟期间, 测定其脂肪酸含量变化, 分析白霉奶酪的脂肪酸组成及 UFAs 含量的动态变化规律以提高白霉奶酪中 UFAs 含量。

1.7 技术路线图

本实验的技术路线图如下:

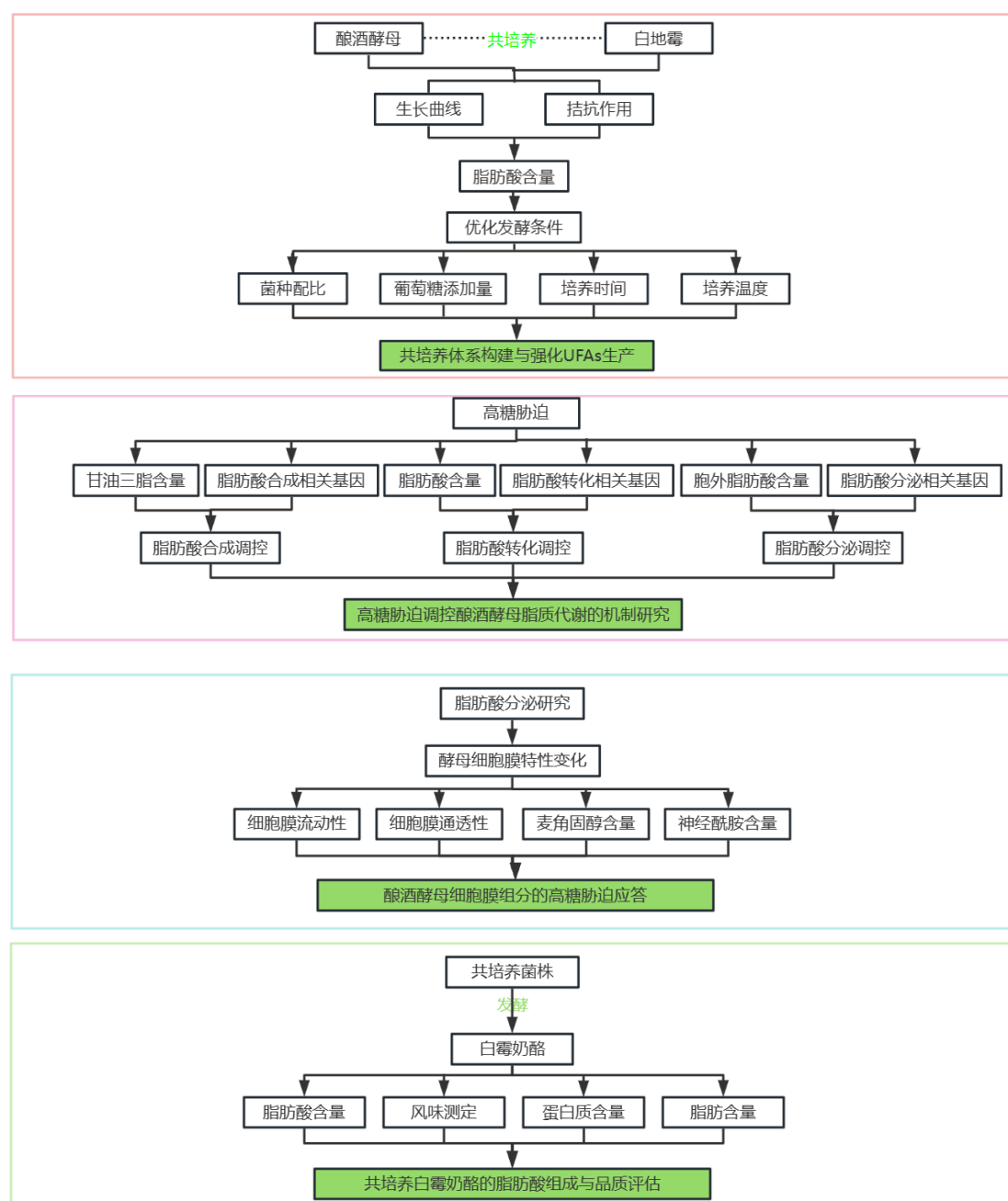


图 1-1 技术路线图

Fig. 1-1 Technology roadmap

第二章 酿酒酵母-白地霉共培养体系构建与强化 UFAs 生产

2.1 前言

G. candidum 是霉菌奶酪中优势微生物菌种，但其 UFAs 合成能力不足。微生物中的 UFAs 是通过脂肪酸合成途径逐步生成的（史海粟等，2016），每个酶的活性直接决定微生物脂肪酸的产量。将 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 共培养，利用代谢分工将 UFAs 合成途径分配到不同菌种中，消除脱饱和酶活性不同带来的限制，提高 UFAs 产量。共培养可以利用两种或更多微生物群落来重新构建目标生物合成途径。这很大程度上减少了每株菌株的生物合成工作量，并降低了相关的代谢负担。本文利用 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 共培养合成 UFAs，探究不同菌株配比、培养时间、培养温度和葡萄糖添加量对共培养菌株合成 UFAs 的影响，并结合响应面优化发酵条件，进一步提高共培养菌株 UFAs 含量。

2.2 材料与设备

2.2.1 供试菌株

本实验中用到的菌株有两种，*S. cerevisiae* 和 *G. candidum*，具体如下表：

表 2-1 本实验中试验菌株

Table 2-1 Test strains in this experiment

菌株	用途	来源
<i>S. cerevisiae</i>	共培养发酵	本实验室保藏
<i>G. candidum</i>	共培养发酵	本实验室保藏

2.2.2 试验培养基

YPD 培养基：2%蛋白胨，2%葡萄糖，1%酵母浸粉，无菌水配平（固体培养基加入 2%琼脂粉），于 121℃高压蒸汽灭菌锅灭菌 20 min。用于 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 活化及培养。

2.2.3 主要试剂

氯化钠、无水硫酸钠、甘油、葡萄糖均为分析纯，天津大茂化学试剂有限公司；盐酸、乙醇、正己烷、硫酸、甲醇、三氯甲烷均为分析纯，西陇科学股份有限公司；蛋白胨为分析纯，沈阳佰境化玻仪器有限公司；酵母提取物，生工生物工程（上海）股份有限公司，正十七烷酸标品，NU-CHEK，PREP 公司。

2.2.4 主要仪器设备

表 2-2 主要仪器设备

Table 2-2 Main instruments and equipment

名称	仪器型号	生产厂家
气相质谱联用仪	7890A-5975c	美国Agilent科技有限公司
超净工作台	HCB-1300V	青岛海尔特种电器有限公司
全自动摇床培养箱	KYC-100C	海福玛实验设备有限公司
电热恒温培养箱	HN-50S	邦西仪器科技上海有限公司
电子天平	EL3002	梅特勒-托利多仪器有限公司
电热恒温水浴锅	DK-98-IIA	天津泰丝仪器有限公司
漩涡振荡器	XFF-C	常州荣化仪器制造有限公司
自动电热压力蒸汽灭菌锅	LX-B50	合肥华泰医疗设备有限公司
高速离心机	AG 22331	艾本德中国（北京）有限公司

2.3 试验方法

2.3.1 菌株的培养与保存

在超净台无菌环境下，分别吸取 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 菌液至 50 mL YPD 培养基的无菌摇瓶中，于 28℃，200 rpm 过夜培养。将 YPD 培养基与 50% 甘油按 1:1 混合后移至冷冻管中，将培养好的菌液悬浮（浓度不低于 10⁶ 个/mL）后置于-80℃冰箱中保存。

2.3.2 微生物生物量的测定

将已称重的滤纸放入布氏漏斗，分别抽取锥形瓶中的菌液 100 mL 进行过滤，并用 0.9%生理盐水洗涤 2 次，将第三次菌体放进 50 mL 的含有 0.9%生理盐水的离心管中，转速为 6000 r/min 离心 2-4 min，将洗涤后的菌体放入 55℃烘箱中干燥至恒重，利用差重法得到细胞生物量。

2.3.3 微生物拮抗作用

根据余友恒等（2018）方法进行测定 *S. cerevisiae* 对 *G. candidum* 的抑菌圈大小。制备固体 PDA 培养基并倒板待其凝固，表面涂布 100 μL *S. cerevisiae* 后备用。在 PDA 固体培养用 1 mL 的枪头打孔，用移液枪吸取 *G. candidum* 共 50 μL 到琼脂孔内，盖好培养皿，放入培养箱中，培养 28℃，24 h。培养后利用游标卡尺测算各处抑菌圈直径大小。

2.3.4 酿酒酵母白地霉共培养

在无菌环境下，按照下列表 2-3 中不同配比的混合发酵剂以接种量为 2% 添加到装有 50 mL 液体 PDA 培养基的三角瓶中，在培养温度为 28℃恒温培养箱培

养。

表 2-3 菌种组合及配比设置表
Table 2-3 Bacteria combination and ratio setting

分组	接种菌株组合
A-1	单独接种 <i>S. cerevisiae</i>
A-2	<i>S. cerevisiae</i> : <i>G. candidum</i> (3:1)
A-3	<i>S. cerevisiae</i> : <i>G. candidum</i> (2:1)
A-4	<i>S. cerevisiae</i> : <i>G. candidum</i> (1:1)
A-5	<i>S. cerevisiae</i> : <i>G. candidum</i> (1:2)
A-6	<i>S. cerevisiae</i> : <i>G. candidum</i> (1:3)
A-7	单独接种 <i>G. candidum</i>

2.3.5 共培养细胞总脂质的提取

根据 Marileo (2023) 的方法并精选改良提取总脂质，培养足量多的 *S. cerevisiae* 细胞，常温下 7000 rpm，离心 2 min，使用灭菌后的生理盐水冲洗三次，水洗完成后，放置到 60℃ 烘箱中进行烘干至重量不再发生变化。取出后，用液氮研磨法把干燥的菌体研磨成细致均匀的粉末状。用电子分析天平准确称取 100 mg，使用氯仿:甲醇 (2:1 和 0.01% BHT) 溶液作为提取剂，并进行振荡，此外还使用 1.5 mL 0.1 N HCl 和 1 mL 0.5% MgCl₂。然后将溶液涡旋，在 3500 rpm 下离心，继续使用氯仿相，在氮气流下将有机相吹干至恒重。获得的值表示为总脂质的百分比。

2.3.6 共培养细胞脂肪酸含量测定

2.3.6.1 脂肪酸甲酯化

将共培养细胞脂质溶解于 2 mL 三氯甲烷/甲醇 (2:1) 溶液中，通过氮吹去除有机溶剂。加入 0.5 mL 甲苯，3 mL 盐酸/甲醇 (1:49) 溶液，4000 rpm 离心 1 min 后 98℃ 水浴 1 h，冰上冷却后加入 1 mL 去离子水，2 mL 乙烷/三氯甲烷 (4:1) 溶液，迅速涡旋，于摇床中 10 min，3000 rpm 离心 5 min，小心吸取有机相至新的玻璃管中，加入内标物，氮气吹干后留用。

2.3.6.2 GC-MS 分析

色谱条件设置：载气为氦气，进样口温度为 280℃，载气流速为 1.0 mL/min。程序初始温度为 80℃ 保持 1 min，20℃/min 升至 280℃，并保持 5 min，分流比为 20:1，进样量为 2 μL。

质谱条件参数：离子源温度为 220℃，传输线温度为 280℃，EI 电子能为 70 Ev，扫描范围为 50~500 amu，全扫描。

2.3.7 不同葡萄糖添加量试验

不同葡萄糖添加量会对菌株合成脂肪酸产生影响,因此选用(2%、6%、10%、14%、18%(v/v))葡萄糖添加量进行试验。选取最佳配比的混合菌液以 2%(v/v)的接种量,接种于含有 50 mL 液体培养基的锥形瓶中,设置转速为 180 rpm、温度为 28°C,培养 72 h。培养结束后,测定其脂肪酸组成及含量,探究不同葡萄糖添加量对共培养菌株中脂肪酸生产的影响,实验重复 3 次。

2.3.8 不同时间发酵试验

选取最佳配比的混合菌液以接种量 2%(v/v)的接种量,在装液量为 50 mL 的摇瓶液体培养基中接种后,温度设定为 28°C,转速为 180 rpm,分别培养 12、24、36、48 和 72 h。培养完成后,测定其脂肪酸组成及含量,探究不同培养时间对共培养菌株中脂肪酸生产的影响,实验重复 3 次。

2.3.9 不同温度发酵试验

选取最佳配比的混合菌液以 2%(v/v)的接种量,在装液量为 50 mL 的摇瓶液体培养基中进行菌体接种,温度分别设置为 26°C, 28°C, 30°C, 32°C 和 34°C,将转速设置为 180 rpm,培养 72 h 后。测定其脂肪酸组成及含量,探究不同培养温度对共培养菌株中脂肪酸生产的影响,实验重复 3 次。

2.3.10 Box-Behnken 试验设计

根据单因素实验结果,我们利用响应面优化的方法探究共培养菌株的最佳发酵条件,选取葡萄糖添加量、培养温度及培养时间设计 3 因素 3 水平试验,以共培养菌株中 UFAs 产量为响应值,用 Box-Behnken 进行试验设计,试验各因素水平如表 2-4 所示。

表 2-4 响应面实验因素及水平

Table 2-4 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	因素		
	A 葡萄糖添加量 (%)	B 发酵温度 (°C)	C 发酵时间 (h)
-1	10	28	36
0	15	30	48
1	20	32	72

2.4 结果与讨论

2.4.1 发酵剂生长特性分析

周期性地从发酵培养液中提取样品并进行生物量的测定。图 2-1 表示 *S. cerevisiae*、*G. candidum* 和两者共培养组合在培养过程中生长情况。如图所示 *S.*

cerevisiae 的菌体密度低于 *G. candidum*。共培养的生物量明显高于单独培养，说明 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 可以共处并积累生物量，这有利于整个体系的长期稳定（刘鹭，2020）。微生物经过短期的滞停期后快速的汲取培养基中营养成分进行自身生长代谢（樊明明，2016），随着培养时间的增加，微生物生长趋势平缓，这可能是由于自身产生的代谢物质累计过多和底物中营养物质的消耗，所处的生长环境限制菌体的生长（张玉，2022）。

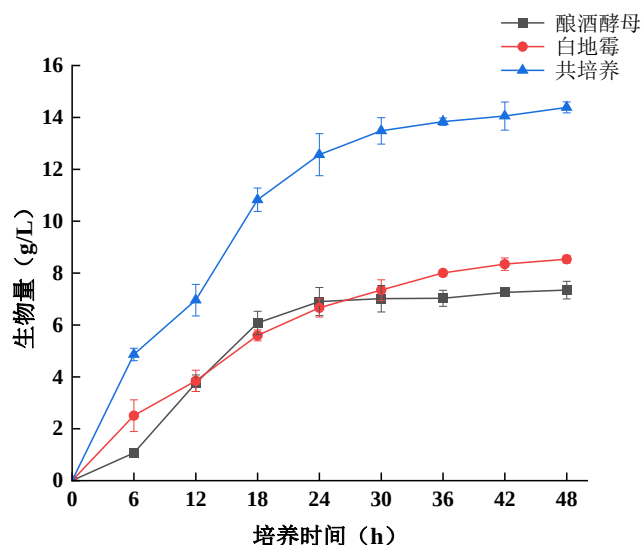
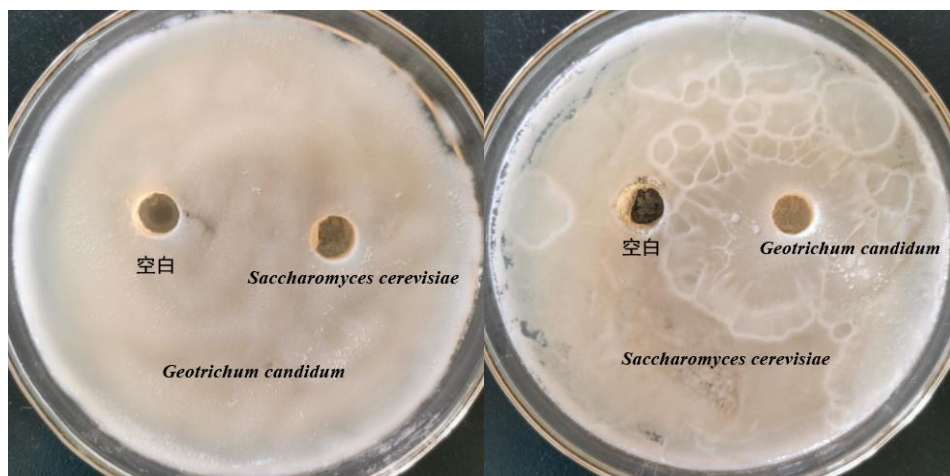


图 2-1 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 的生长情况

Fig. 2-1 Growth of *S. cerevisiae* and *G. candidum*

2.4.2 微生物间拮抗关系

共培养系统菌株之间可能是协同的，包括互惠和共生；也可能是胁迫的，包括寄生或掠夺。互利的种间交互作用会改善底物感官属性，微生物对营养物质的利用程度也会提高，使发酵食品产生独特的品质和风味（Cotarlet et al., 2020）。因此在共培养菌株发酵奶酪之前，应考虑微生物之间是否有明显的抑制作用。前期实验得出酵母和 *G. candidum* 最佳培养条件相似，所以共培养培养条件与单独培养条件相同。如图 2-2 所示，无论是将 *S. cerevisiae* 接种到 *G. candidum* 中，还是将 *G. candidum* 接种到 *S. cerevisiae*，没有出现明显的抑菌圈。初步表明 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 之间没有拮抗关系，可以用作 *S. cerevisiae*-*G. candidum* 共培养发酵剂。

图 2-2 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 对彼此生长的影响Fig. 2-2 Effects of *S. cerevisiae* and *G. candidum* on each other's growth

注：左是 *S. cerevisiae* 对 *G. candidum* 生长的影响；右是 *G. candidum* 对 *S. cerevisiae* 生长的影响。

2.4.3 菌种对比对共培养菌株合成 UFAs 的影响

表 2-5 和图 2-3 表示不同的菌种对比对共培养菌株合成 UFAs 的影响。*S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 共培养能充分利用培养基中的营养物质，将其转化生产 UFAs，总脂肪酸产量和 UFAs 产量都有所提升。单独培养时，*S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 总脂肪酸产量分别为 69.38 ± 0.93 mg/L 和 84.24 ± 0.88 mg/L，当 *S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 比例为 2:1 时，总脂肪酸产量为 120.41 ± 0.96 mg/L，分别提高了 1.74 倍和 1.43 倍。UFAs 占比也在 *S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 比例为 2:1 时最高，达到 $57.32 \pm 0.09\%$ 。从图 2-3 得知，与单独培养 *S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 相比，其 UFAs 含量分别从 25.71 ± 0.41 mg/L、 46.51 ± 0.52 mg/L 增加到 70.97 ± 0.45 mg/L；UFAs 与 SFAs 的比例分别从 0.59、1.23 增加到 1.43。

共培养 *S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 不仅提高了菌株合成脂肪酸的能力，而且对 UFAs 的合成影响较大，与单独培养 *G. candidum* 相比，共培养菌株能更好的利用培养基中的营养物质并转化成脂肪酸，脂肪酸产量和 UFAs 含量都明显提高，通常，微生物在缺氮和充足碳源条件下积累脂质，与单独培养相比，共培养中的氮源消耗更快，有利于更快达到氮胁迫状态的油脂积累，缩短培养时间。另一方面，共培养的 UFAs 占总脂肪酸的比例更高。酵母分泌的脂肪酸可作为外源脂肪酸对 *G. candidum* 的多不饱和脂肪酸合成起到促进作用。OA 的添加对于 *G. candidum* 的 LA 积累具有显著作用，这是由于 OA 作为 FADS12 的底物，促进 FADS12 活性的提高。此外，*G. candidum* 通过 FADS12 催化产生的 LA，进一步作为 FADS15 的底物，促进 FADS15 活性提高，提高 ALA 含量，使 *G. candidum* 具有更高的 LA 水平从而使共培养菌株中 UFAs 比例提高。

表 2-5 菌种对比对共培养菌株相对脂肪酸组成的影响

Table 2-5 Effect of fermentation agent ratios on relative fatty acid composition in co-culture

配比	脂肪酸 (%)					
	C16:0	C18:0	C18:1 (n=9)	C18:2 (n=6)	C18:3 (n=6)	其他
A-1	36.92±0.05	9.71±0.01	27.46±0.03	0	0	25.91±0.02
A-2	37.58±0.01	5.17±0.04	31.80±0.02	15.54±0.01	6.48±0.03	3.42±0.02
A-3	35.40±0.02	4.52±0.01	31.95±0.03	16.27±0.04	9.10±0.02	2.75±0.03
A-4	40.50±0.03	6.04±0.01	28.61±0.02	16.33±0.04	6.41±0.03	2.11±0.01
A-5	34.21±0.01	6.81±0.01	29.59±0.03	16.91±0.02	6.42±0.01	6.07±0.03
A-6	37.91±0.01	5.48±0.04	30.76±0.05	16.00±0.01	6.22±0.04	3.62±0.02
A-7	30.02±0.02	7.71±0.01	32.40±0.02	10.51±0.02	3.60±0.03	15.76±0.01

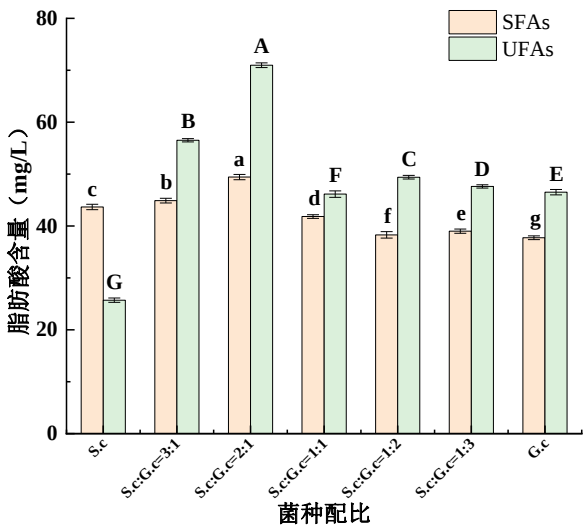


图 2-3 菌种对比对共培养菌株 UFAs 含量的影响

Fig. 2-3 Effect of fermentation agent ratios on UFAs contents in co-culture

注：不同字母代表数据之间存在显著性差异（P<0.05），下同

2.4.4 葡萄糖添加量对共培养菌株合成 UFAs 的影响

为了定量评价葡萄糖添加量对共培养菌株合成脂肪酸产生的影响，选择不同的葡萄糖添加量进行培养。葡萄糖添加量的增加使培养基中碳源增加，从而影响菌株脂肪酸的合成。从表 2-6 中得知当葡萄糖添加量为 10%（v/v）时 UFAs 占比达到最高，为 64.25 ± 0.12%。同时，与正常葡萄糖添加量 2%（v/v）相比，当葡萄糖添加量为 10%（v/v）时 UFAs 含量从 78.53 ± 0.67 mg/L 提高到了 175.40 ± 0.68 mg/L，UFAs 与 SFAs 的比例从 1.44 增加到 1.99（图 2-4）。其中油酸的含量

呈上升趋势，而亚油酸和亚麻酸的含量呈现先上升后下降趋势，这一现象的出现可能是由于处于高糖环境时，酵母细胞会将碳源以油酸的形式积累（Chenah et al., 2022）。产生这种现象的原因可能是由于葡萄糖含量增加，导致代谢过程中乙酰 CoA 增加，从而使生成的油酸含量提高，而油酸是脂肪酸代谢过程中的重要中间产物，可以延伸成多种不同的长链脂肪酸。当葡萄糖添加量大于正常葡萄糖添加量 2%（v/v）时，共培养菌株中 SFAs 和 UFAs 产量均有提高，说明葡萄糖添加量的提高对共培养菌株的脂肪酸合成能力有促进作用。

表 2-6 葡萄糖添加量对共培养菌株相对脂肪酸组成的影响

Table 2-6 Effect of glucose addition amount on relative fatty acid composition in co-culture

葡萄糖浓度	脂肪酸（%）					
	C16:0	C18:0	C18:1 (n=9)	C18:2 (n=6)	C18:3 (n=6)	其他
2%	35.40±0.02	4.52±0.01	31.95±0.03	16.27±0.04	9.10±0.02	2.75±0.03
6%	33.28±0.01	4.82±0.04	33.88±0.02	17.60±0.01	9.19±0.03	1.23±0.02
10%	28.84±0.02	3.45±0.01	35.61±0.03	17.75±0.04	10.89±0.05	1.01±0.03
14%	33.35±0.03	5.33±0.01	36.08±0.02	14.41±0.04	9.18±0.03	1.65±0.01
18%	29.91±0.02	3.59±0.01	38.76±0.02	14.02±0.02	10.19±0.03	3.53±0.01

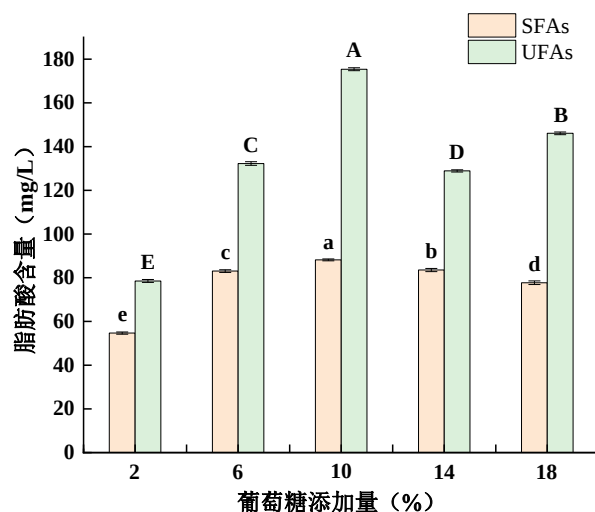


图 2-4 葡萄糖添加量对共培养菌株 UFAs 含量的影响

Fig. 2-4 Effect of glucose addition amount on UFAs contents in co-culture

2.4.5 培养时间对共培养菌株合成 UFAs 的影响

表 2-7 和图 2-5 表示培养时间对共培养菌株 UFAs 合成的影响。共培养菌株的总脂肪酸含量和 UFAs 含量随着培养时间的增加逐渐上升，在培养时间为 48 h 时达到最高，UFAs 含量从 42.16 ± 0.41 mg/L 升至 78.09 ± 0.36 mg/L，共培养菌

株中 UFAs 占比从 $52.70 \pm 0.09\%$ 增加至 $56.68 \pm 0.07\%$ ，但随着培养时间的延长，UFAs 含量呈平稳的趋势，可能是由于培养后期营养物质缺乏，抑制了共培养菌株的脂肪酸合成，且由于菌株的生长代谢活动导致脂肪酸的消耗（吴琛，2023）。以上结果说明培养时间在 48 h 内，共培养菌株合成 UFAs 的能力更强，对于共培养菌株的 UFAs 合成至关重要。

表 2-7 发酵时间对共培养菌株相对脂肪酸组成的影响

Table 2-7 Effect of fermentation time on relative fatty acid composition in co-culture

发酵时间	脂肪酸 (%)					其他
	C16:0	C18:0	C18:1 (n=9)	C18:2 (n=6)	C18:3 (n=6)	
12 h	40.60±0.05	5.64±0.01	32.70±0.03	14.93±0.02	5.07±0.04	1.06±0.02
24 h	36.53±0.01	2.42±0.04	36.99±0.02	15.26±0.01	7.26±0.03	1.53±0.02
36 h	36.59±0.02	1.36±0.01	37.44±0.03	17.62±0.04	5.68±0.02	1.32±0.03
48 h	36.98±0.02	2.71±0.01	33.54±0.02	18.44±0.02	4.70±0.03	3.63±0.01
72 h	35.26±0.03	2.54±0.01	32.30±0.02	17.19±0.04	7.17±0.03	5.53±0.01

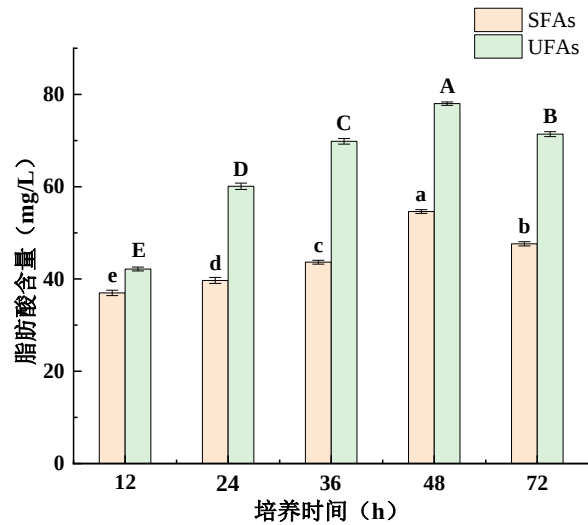


图 2-5 发酵时间对共培养菌株 UFAs 含量的影响

Fig. 2-5 Effect of fermentation time on UFAs contents in co-culture

2.4.6 培养温度对共培养菌株合成 UFAs 的影响

考察共培养菌株的合成脂肪酸能力与培养温度的关系，结果如表 2-8 和图 2-6 所示。共培养菌株的合成脂肪酸能力和转化成 UFAs 都随着培养温度的增加呈先上升后下降趋势。培养温度通过改变细胞膜的流动性和酶的活性来影响酵母菌株的生长代谢，进而调控菌株对 UFAs 的转化（王儒红，2023）。在培养温度为 30℃ 时，共培养菌株脂肪酸产量最高，UFAs 与 SFAs 之和达到 131.92 ± 1.74

mg/L。但 UFAs 占比和产量最高是在培养温度为 28℃ 时, 占比为 $56.60 \pm 0.09\%$, 产量达到 77.76 ± 0.68 mg/L。说明培养温度可能对不同的酶造成不同的活性影响, 从而影响共培养菌株的脂肪酸合成, 导致合成总脂肪酸产量与 UFAs 产量在不同的温度下达到最大值。

表 2-8 发酵温度对共培养菌株相对脂肪酸组成的影响

Table 2-8 Effect of fermentation temperature on relative fatty acid composition in co-culture

发酵温度	脂肪酸 (%)					其他
	C16:0	C18:0	C18:1 (n=9)	C18:2 (n=6)	C18:3 (n=6)	
26℃	38.35±0.05	5.59±0.01	29.67±0.03	15.35±0.02	6.28±0.01	4.76±0.02
28℃	33.40±0.01	5.09±0.04	32.14±0.02	18.56±0.04	5.81±0.03	5.00±0.02
30℃	37.04±0.02	4.61±0.01	31.22±0.03	17.55±0.04	5.18±0.02	4.41±0.03
32℃	36.97±0.03	6.15±0.01	32.08±0.02	17.29±0.04	5.94±0.03	1.57±0.01
34℃	40.25±0.02	1.00±0.01	31.14±0.02	16.11±0.02	6.59±0.03	4.92±0.01

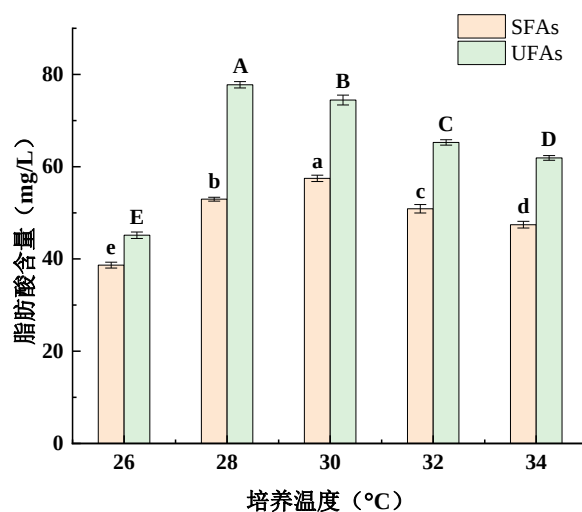


图 2-6 发酵温度对共培养菌株 UFAs 含量的影响

Fig. 2-6 Effect of fermentation temperature on UFAs contents in co-culture

2.4.7 Box-Behnken 试验结果与分析

根据表 2-4 中的三因素三水平进行 Box-Behnken 试验, 得到共培养菌株合成 UFAs 最佳条件参数的响应面试验结果如表 2-9。根据表 2-10 得出的 17 组试验结果由 Design-Expert 13.0 软件进行数据分析, 得到回归方程模型、响应面和等高线, 以及二次多项式模型的显著性分析和回归拟合的程度分析。该试验得到的数学模型 $P < 0.0001$, 因此得出的该数学模型具有高度的显著性, 失拟性 P 为 0.0809, 表明该模型对于绝对误差不显著, 具有很好的预测响应值。模型确定系数

$R^2=0.9854$, 模型调整确定系数 $R_{Adj}^2=0.9665$, 表明回归方程回归效果良好。

UFAs 含量 (R)、葡萄糖添加量 (A)、培养温度 (B)、培养时间 (C) 的三元二次回归方程为:

$$R=174.79-5.14A-1.22B+3.29C+1.97AB-1.56AC-3.33BC-30.71A^2-7.91B^2-19.06C^2$$

表 2-9 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2-9 Design and results of response surface experiment

试验号	A	B	C	R UFAs 含量 (mg/L)
1	0	0	0	171.65
2	-1	0	-1	135.86
3	0	0	0	174.92
4	-1	1	0	135.48
5	1	-1	0	132.92
6	0	0	0	173.58
7	-1	0	1	135.86
8	1	0	-1	117.31
9	0	-1	-1	140.62
10	0	0	0	176.14
11	-1	-1	0	147.65
12	1	0	1	122.97
13	0	1	1	148.37
14	1	1	0	128.64
15	0	-1	1	151.67
16	0	1	-1	150.64
17	0	0	0	177.64

响应值二次模型的方差分析及显著性如表 2-10 所示。可知葡萄糖添加量对共培养菌株中 UFAs 产量具有显著性影响, 培养时间和培养温度对共培养菌株中 UFAs 产量影响不明显。从三个因素单独比较分析可知, 三个因素对共培养菌株中 UFAs 含量影响顺序为葡萄糖添加量>培养时间>培养温度。为了得到影响共培养菌株中 UFAs 含量的各因素之间的交互性, 采用 Design-Expert 处理实验数据, 获得回归方程的响应面图和等高线图, 如 2-7 所示。保持其它因素不变, 分析不同的两个因素之间对共培养菌株中 UFAs 含量的影响。

表 2-10 回归模型方差分析

Table 2-10 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P	显著性
模型	6636.34	9	737.37	52.36	< 0.0001	极显著
A	211.15	1	211.15	15.00	0.0061	极显著
B	11.83	1	11.83	0.8404	0.3898	
C	86.79	1	86.79	6.16	0.0420	显著
AB	15.56	1	15.56	1.11	0.3281	
AC	9.77	1	9.77	0.6935	0.4325	
BC	44.36	1	44.36	3.15	0.1192	
A ²	3970.45	1	3970.45	281.96	< 0.0001	极显著
B ²	263.14	1	263.14	18.69	0.0035	极显著
C ²	1528.89	1	1528.89	108.58	< 0.0001	极显著
残项	98.57	7	14.08			
失拟性	77.28	3	25.76	4.84	0.0809	不显著
纯误差	21.29	4	5.32			
总差	6734.91	16				
R ²	0.9854					
RAdj ²	0.9665					

注：P<0.01，表示极显著；P<0.05，表示显著；P>0.05，表示不显著。

图 2-7 可直观地反映出葡萄糖添加量、培养温度和培养时间之间的相互作用对共培养菌株中 UFAs 含量的影响。由图看出葡萄糖添加量与培养温度、葡萄糖添加量和培养时间的交互作用对共培养菌株中 UFAs 含量的影响显著，而培养温度和培养时间的交互作用对共培养菌株中 UFAs 含量的影响不显著，与方差分析结果相同。

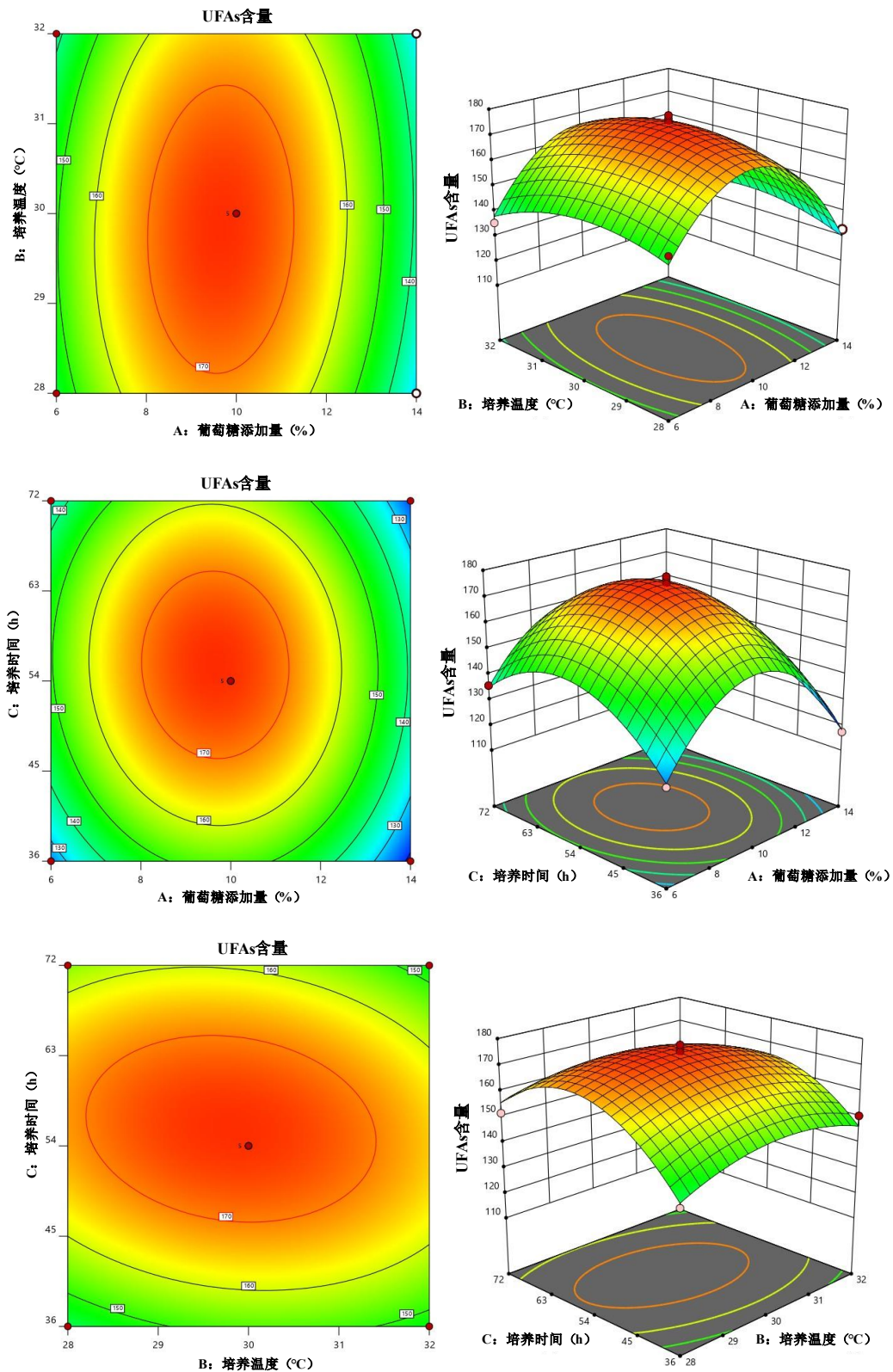


图 2-7 两因素交互作用对共培养菌株中 UFAs 含量影响的响应面和等高线

Fig. 2-7 Response surface and contour lines of the interaction of two factors on UFAs content in co-culture

2.4.8 验证试验分析

通过数据处理软件分析所建立的模型,获得共培养菌株生产 UFAs 的培养参数为葡萄糖添加量 11.83%,培养时间 55.26 h,培养温度为 29.93℃,该条件下共培养菌株中 UFAs 含量可高达 166.07 mg/L。为了后续实验便于实际操作,将培养条件最佳参数值调整为:葡萄糖添加量为 10%,培养时间为 72 h,培养温度为 30℃,共培养菌株生产 UFAs 在该条件下进行验证试验,以检验回归模型的可靠性。经三组平行试验后,共培养菌株中 UFAs 产量为 165.73 ± 2.7 mg/L,与模型的预测值相比相差 0.34,相对误差为 0.20%,说明该模型优化工艺条件可靠性、实用性强。

2.5 本章小结

本章研究中利用 *S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 共培养合成脂肪酸并通过优化发酵条件提高共培养菌株 UFAs 产量,研究结论如下:

- (1) 两种菌没有明显的拮抗作用,可作用共培养菌株合成脂肪酸。
- (2) *S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 菌种比例为 2:1 时,共培养菌株合成 UFAs 效果较好,显著高于 *S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 的单培养和其他菌种比例共培养组合。
- (3) 通过响应面法优化发酵工艺,并利用方差分析确定培养条件葡萄糖添加量、发酵温度和发酵时间对共培养菌株中 UFAs 含量的影响。通过方差分析,说明该模型具有显著性 ($P > F$ 值 < 0.05)。通过软件预测共培养菌株的最佳培养条件为:葡萄糖添加量为 10%,培养时间为 72 h,培养温度为 30℃,此时 UFAs 含量为 165.73 ± 2.7 mg/L。

第三章 高糖胁迫调控酿酒酵母脂肪酸代谢的机制研究

3.1 前言

通过响应面法证实在发酵期间，葡萄糖添加量对菌株 UFAs 的产量具有显著影响。微生物次生代谢物的生物合成是由应激诱导的（Fordjour et al., 2023）。可以通过改变生长环境使微生物应激产生目标产物，高糖胁迫作为一种应激作用，通过提高细胞膜通透性、调节关键代谢酶活性等作用，不仅可以促进微生物生产，还能提高微生物代谢产物合成和分泌能力（Huang et al., 2017b; 郭红等, 2020; 李翠丽, 2019）。前期预实验结果表明高糖胁迫可以提高 *S. cerevisiae* UFAs 合成和分泌,但高糖胁迫如何影响 *S. cerevisiae* 脂肪酸分泌的机制尚不清楚(He, 2023; Jindra et al., 2023)。因此，本章通过测定高糖胁迫处理的 *S. cerevisiae* 脂肪酸含量，结合脂肪酸合成、转化和分泌相关基因分析高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 中脂质代谢的调控机制。

3.2 材料与设备

3.2.1 所用菌株与引物

酿酒酵母筛选自本实验室，保存于本实验室-80℃冰箱，本章所用引物如下：

表 3-1 本章所用引物

Table 3-1 Primers used in this chapter

引物名称	引物序列（5' → 3'）	功能
OLE1-F	GCTATCTTCGGTTGTGCTTC	脂肪酸合成
OLE1-R	ATAGACCTCTACGAGCGTCA	
MG42-F	TTGAAGGAGGAAGAAGAGGAC	
MG42-R	AATGGAATCGCTAGGCAAGT	
FAS1-F	ATATTCGGTTCTGGTTTCGG	
FAS1-R	CCCTCGAACCAAATAGGAAA	
ACC1-F	GGGTTACTTCTCCGTGGGTA	脂肪酸转化
ACC1-R	AATTCCTTCAGGGCAACAAC	
FAA1-F	AACATGCAACGTCTCCACAT	
FAA1-R	TGGAGAACCACCGTTTAACA	
FAA4-F	TGCTCATTGGATATGGGCTA	
FAA4-R	TAGTTCCGACAAGGTCACCA	

表 3-1 本章所用引物 (续表)

Table 3-1 Primers used in this chapter

引物名称	引物序列 (5' → 3')	功能
FAT1-F	TGTCGGAGAAGTCTGTAGATACCTG	脂肪酸转化
FAT1-R	TCCTGAAGTCCTGCCAGATGTC	
POX1-F	CACCGTCAAACTGAGCCAC	
POX1-R	ATGTCCTCCGCAAGTCTGTC	
PXA2-F	ATTTCTGATTCTAGGCGGGCTTTG	
PXA2-R	CGCAATCTCTATCCACAGTTCTACG	
FAA2-F	GTCGGACTTGAGCCTTTAACTCTC	脂肪酸分泌
FAA2-R	CCTTCGGCGTATAGTTGGTCTAATG	
TES1-F	GCGACGAGTCTTCTTTACACAAGC	
TES1-R	TGAGTAGGAGGTAGGAATCGGACAG	
PRY1-F	ATGAGGCTGCAGTCGTTACT	
PRY1-R	TAGAAGTTGGAGTGGCAGTG	
18SrRNA-F	CGGCTACCACATCCAAGGAAG	18SrRNA
18SrRNA-R	AGCTGGAATTACCGCGGCT	

3.2.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒, 常州百代生物科技有限公司; 反转录试剂盒, 苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

3.2.3 试验培养基

酿酒酵母活化及培养培养基成分详见 2.2.2。

3.2.4 主要仪器和设备

表 3-2 主要仪器设备

Table 3-2 Main instruments and equipment

设备名称	规格及型号	生产单位
气相质谱联用仪	7890A-5975c	美国Agilent科技有限公司
超净工作台	HCB-1300V	青岛海尔特种电器有限公司
电热恒温培养箱	HN-50S	邦西仪器科技上海有限公司
电子天平	EL3002	梅特勒-托利多仪器有限公司
电热恒温水浴锅	DK-98-IIA	天津泰丝仪器有限公司
漩涡振荡器	XFF-C	常州荣化仪器制造有限公司

表 3-2 主要仪器设备（续表）

Table 3-2 Main instruments and equipment

设备名称	规格及型号	生产单位
微型离心机	5418	Eppendorf AG
制冰机	SIM-F140AD2	日本 Panasonic
荧光定量仪	Qubit	赛默飞世尔科技公司

3.3 试验方法

3.3.1 高糖胁迫生长适应性

将 *S. cerevisiae* 按照 2% (v/v) 分别接种于含 2%、6%、10%、14%、18% (v/v) 葡萄糖的 50 mL 的 YPD 液体培养基的 100 ml 锥形瓶中，置于 28℃ 温度条件下摇床培养 72 h。取样检测，确定其生长速率，分析高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 生长的影响。

3.3.2 生物量的测定

酿酒酵母生物量的测定方法详见 2.3.2。

3.3.3 菌种甘油三酯的提取

酿酒酵母甘油三酯的检测方法详见参考 Ploier 等（2013）的方法进行改进。

3.3.4 菌种脂肪酸测定

酿酒酵母脂肪酸的提取与检测方法详见 2.3.6。

3.3.5 胞外脂肪酸的提取

胞外游离脂肪酸检测参考 Stumpe 等（2001）的方法进行改进。每 100 mL 藻株的胞外油脂提取物中加入 400 μ L 甲醇和 10 μ L 0.1 mg/ μ L 1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropylcarbodiimide)，22℃ 反应 2 h。加入 200 μ L 1 M Tris-HCl 75℃ 水浴 5 min 中止反应，冷却后加入 1 mL 正己烷，5000 g 离心 5 min，萃取 2 次。将上层正己烷相转移至新试管中，用氮吹仪吹干。加入 500 μ L CH₂Cl₂ 溶解，并转移置色谱进样瓶中，在凹液面处划线标记，-20℃ 保存待检测。

3.3.6 胞外脂肪酸的检测

胞外游离脂肪酸含量测定 GC-MS 气相色谱柱型号为 HP-5 MS (5% 苯基-95% 的聚二甲基硅氧烷，30 m×0.25 mm；0.25 μ m 的涂层厚度；Agilent, Waldbronn, Germany)。载气为氦气 (40 cm/s)。电子能量 70 电子伏特，离子源温度 230℃，传输线的温度为 275℃。测定的样品在 EI 模式下进行，采用不分流进样模式。柱温箱升温程序如下：70℃ 保持 4 min，以 25℃/min 的速率升温至 195℃，然后以 3℃/min 的速率升温至 270℃，再以 8℃/min 的速率升温至 270℃（保持 1 min）。

3.3.7 酿酒酵母总 RNA 提取及 cDNA 合成

取酿酒酵母孢子悬液涂布于 YPD 固体培养基中，于 28℃ 培养 48 h 至长满菌丝。挑取一环菌丝接种到 YPD 液体培养基中，在 28℃，180 rpm 培养 48 h 后收集菌体，抽滤并收集菌体。酿酒酵母总 RNA 采用 BIOG RNA Fungi & Bacteria Kit 试剂盒提取，具体步骤如下：

- (1) 取出适量在超低温冰箱中冻存的菌体于无菌的研钵中利用液氮充分研磨；
- (2) 加入 200 μ L PBS，振荡混匀，5000 rpm 离心 3 min，弃上清；
- (3) 加入 100 μ L 裂解酶 I，强烈漩涡，直到沉淀悬浮，再加入裂解酶 10 μ L，充分混匀，室温放置 20 min；
- (4) 加入 200 μ L 裂解酶 II，20 μ L 复合消化液，充分混匀，在 65℃ 下孵育 30 min；
- (5) 在吸附柱中加入 450 μ L 异丙醇，并放入收集管中，12000 rpm 离心 1 min，弃收集管废液，按每份样品 40 μ L 取洗脱液，放置于灭菌 1.5 mL 的离心管，65℃ 预热。
- (6) 取出吸附柱，放入 1.5 mL 离心管中，加入上述预热的 40 μ L 取洗脱液，静置 2 min，12000 rpm 离心 2 min，收集 RNA 溶液。

3.3.8 反转录

酿酒酵母总 RNA 反转录得到 cDNA 采用 NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis Supersix 试剂盒，步骤与反应体系如下。

首先将引物、dNTP 与 RNA 模板预混（体系如下），置于 42℃ 水浴 5 min，之后立即放于冰上。

模板 RNA	10 pg
gDNA Purge	1 μ L
RNase Free Water	至 10 μ L
总体积	10 μ L

其次，准备反应体系（20 μ L）

第一步反应液	10 μ L
2×NovoScript® Plus 1st Strand cDNA Synthesis Supersix	10 μ L
总体积	20 μ L

轻轻混匀后，50℃ 孵育 15 min；75℃ 孵育 5 min 终止反应。

3.3.9 实时荧光定量 PCR 测定

根据 NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis Supersix 试剂盒的操作说明，以 cDNA 第一链为模板，体系如下：

2×Taq Master Mix*	25 μL
上游引物	1.0 μM
下游引物	1.0 μM
模板	1-2 μL
DdH ₂ O	至 50 μL
总体积	50 μL

RT-qPCR 条件为: 94°C 1.3 min; 94°C 20 s, 57°C 20 s, 72°C 1.0 min, 30 个循环; 72°C 5 min; 4°C 保存 10 min。以酿酒酵母的 *18S rRNA* 作为内参基因。根据 2-^{ΔΔ}Ct 法计算基因的相对转录水平和倍数变化, 其中所有样品测三个重复。

3.4 结果与讨论

3.4.1 高糖胁迫对酿酒酵母生长和脂质合成的影响

培养基葡萄糖添加量分别为 2%、6%、10%、14%、18% (v/v) 条件下, 检测 *S. cerevisiae* 生长情况, 结果如图 3-1 所示。培养基葡萄糖添加量分别为 2%、6%、10%、14% 和 18% (v/v) 时生物量呈先上升后下降的趋势, 与葡萄糖添加量为 2% (v/v) 的正常培养基相比, *S. cerevisiae* 生物量均有提高。*S. cerevisiae* 最适生长在葡萄糖添加量为 14% (v/v) 的环境下, 达到 4.64 ± 0.18 g/L。此外, 酵母的 TAG 积累量随着培养基中葡萄糖含量的升高呈先上升后降低的趋势, 但与正常培养基相比都有提高 (图 3-2); 葡萄糖添加量的增加使培养基中碳源增加, 从而影响菌株脂肪酸的合成。从图中得知当葡萄糖添加量为 14% (v/v) 时 TAG 含量达到最高, 与正常葡萄糖添加量 2% (v/v) 相比, TAG 含量提高了 2.3 倍。

高糖胁迫的作用可能与它们的浓度和所研究的微生物种类有关。Huang 等 (2017) 证明随着初始葡萄糖浓度 (initial glucose concentration, IGC) 的增加, 红曲霉 CGMCC 10910 干细胞重量逐渐增加, 当 IGC 达到 200 g/L 时, 干细胞重可达 28.18 g/L。Ge 等 (2011) 证明在葡萄糖为 120 g/L 的培养基中, 干酪乳杆菌的生物量最大。由于酵母渗透压调节系统的表达方式和强弱程度不同, 对外界环境表现出的耐渗性也有明显差异。我们发现高糖胁迫可以使 *S. cerevisiae* 在生物量积累的早期阶段停滞不前, 推测酵母对高糖的环境进行了自我调节, 自身存在一套对渗透压的调节系统。酵母在高渗胁迫下存在多种信号传导途径和分子应答机制。

储存脂质生物合成的必要条件是 TCA 受到干扰, 乙酰 CoA 被引导到脂肪酸生物合成而不是氧化 (Bellou et al., 2016; Dourou et al., 2017)。高糖环境抑制酵母的有氧呼吸作用, 即 Crabtree 效应, 从而改变酵母生理代谢途径, 当糖浓度持续增加时 Crabtree 效应增大, 使酵母的 TCA 循环断裂。在这种条件下, 由于氮源的缺乏, 细胞的生长趋于稳定, 达到固定阶段。在这个阶段, 储存的碳水化

合物转变为脂质转化的途径。脂质积累的增强可能发生在氮耗竭和过量有机碳的可用性下。因此,脂质积累可归因于糖的消耗速度高于细胞分裂的速度,这将促进多余的碳转化为脂质。较高的脂质合成还与参与细胞生长和增殖的主要酶的停止以及与脂质积累特异性相关的酶的过度表达有关 (Mohan and Devi, 2014)。

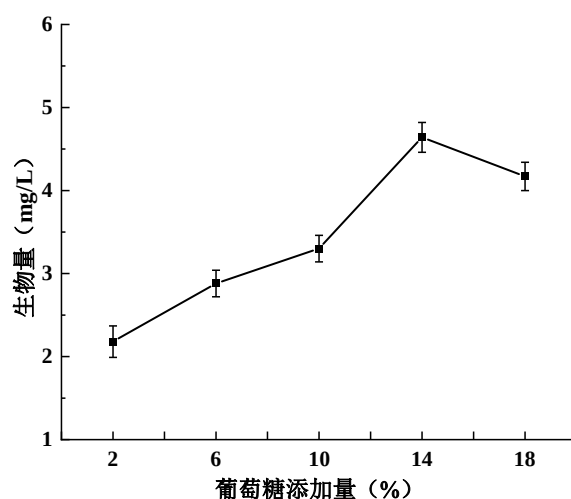


图 3-1 不同葡萄糖添加量对 *S. cerevisiae* 生长情况的影响

Fig. 3-1 Effects of glucose addition on the growth of *S. cerevisiae*

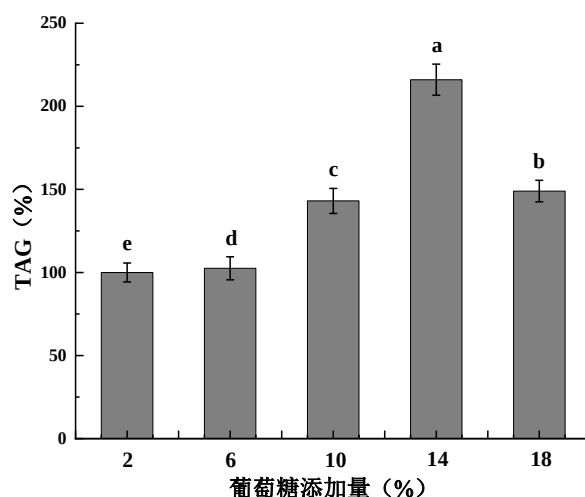


图 3-2 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 中 TAG 含量的影响

Fig. 3-2 Effect of high glucose stress on TAG contents in *S. cerevisiae*

3.4.2 高糖胁迫调控酿酒酵母脂肪酸合成

上述的研究结果表明,高糖胁迫会影响 *S. cerevisiae* 中脂肪酸的组成与含量,为进一步研究高糖胁迫对酵母细胞脂质合成的调控机制,分析了高糖胁迫对脂肪酸合成相关基因 mRNA 水平的影响。OLE1 是脂肪酸脱饱和酶,参与 *S. cerevisiae*

UFAs 的合成, 而 *MGA2* 是转录调控因子, 可激活其自身的 mRNA 转录水平, 且 *MGA2* 上调有助于增加 *OLE1* 的表达 (张玥, 2023)。我们选取了脂肪酸合成相关基因 *OLE1*、*MGA2*、*ACC1* 和 *FAS1*。

结果如图 3-3 所示, 与对照组相比, 高糖胁迫后促进转录因子 *MGA2* 的转录, 其相对表达水平提高了约 1.66 倍, *ACC1* 的相对转录水平在高糖胁迫下提高了约 1.42 倍, 结果表明高糖胁迫确实可以提高 *ACC1* 基因的表达水平, 促进酵母生产脂肪酸。同时促进了编码 $\Delta 9$ 脂肪酸脱饱和酶 *OLE1* 的转录水平, 提高了约 1.35 倍, 从而提高 *S. cerevisiae* 中 UFAs 的含量。*S. cerevisiae* 细胞中脂肪酸合成过程中 *FAS1* 基因的转录水平也发生变化。进一步说明高糖胁迫通过调控 *S. cerevisiae* 中脂肪酸合成相关基因的表达来调节 UFAs 的合成。

Paredes 等 (2020) 认为微生物处在等极端环境时, 细胞发出特定信号引起细胞膜中某些特定结构蛋白或蛋白激酶等组成的信号转导器的感应, 进而调控合成 UFAs 的相关酶表达。乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC1 是脂肪酸合成的关键酶, 可通过增加 ACC1 水平提高脂肪酸的合成。*S. cerevisiae* 的 ACC1 蛋白受 Snf1 负调控, Snf1 对 ACC1 进行磷酸化后, ACC1 的活性会降低高达 90%。Snf1 的激活是由葡萄糖消耗引发的, 通过一个或多个丝氨酸残基的磷酸化导致 ACC1 部分失活。ACC1 转录水平的提高可能是因为当酵母细胞在高糖环境下, Snf1 被灭活, Snf1 对 ACC1 的负调控被解除, 在一定程度上提高 ACC1 水平, 从而提高脂肪酸产量。

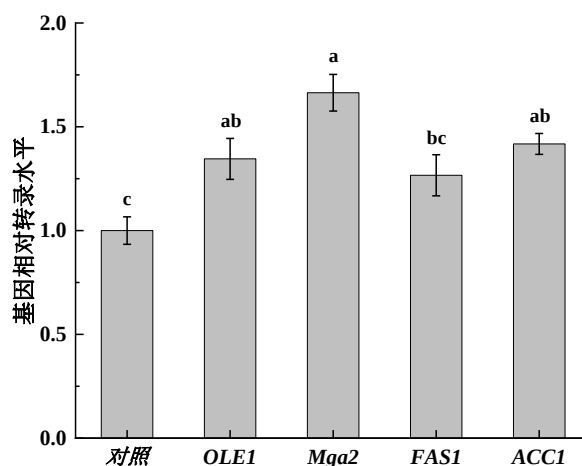


图 3-3 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 脂质合成相关基因的表达水平影响

Fig. 3-3 Effects of overexpression of high glucose stress of lipid synthesis related genes in *S. cerevisiae*

3.4.3 高糖胁迫对酿酒酵母脂肪酸合成的影响

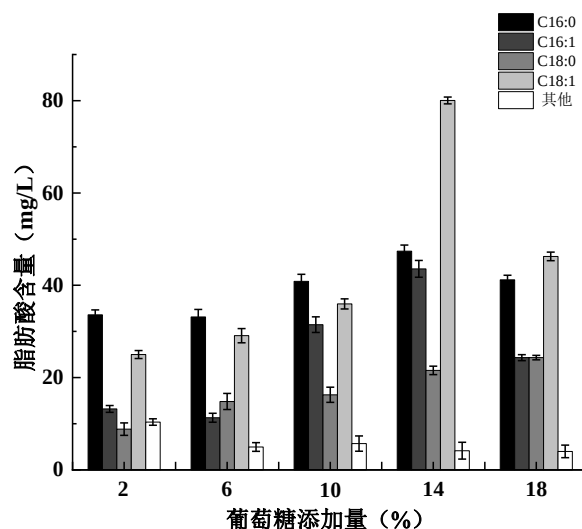
培养基葡萄糖添加量分别为 2%、6%、10%、14%、18% (v/v) 条件下, 检

测脂肪酸合成情况,结果如图 3-4 所示。葡萄糖添加量会对酵母脂肪酸合成有重要影响,酵母的脂肪酸积累量随着葡萄糖添加量的升高呈先上升后降低的趋势,但与正常培养基相比都有提高;葡萄糖添加量的增加使培养基中碳源增加,从而影响菌株脂肪酸的合成。当葡萄糖添加量为 14% (v/v) 时脂肪酸总量达到最高,为 196.68 ± 6.63 mg/L。与正常葡萄糖添加量 2% (v/v) 相比,脂肪酸总量提高了 2.16 倍。同时,油酸的含量呈上升趋势,与正常葡萄糖添加量 2% (v/v) 相比,油酸含量由 25.00 ± 0.86 mg/L 提高至 80.04 ± 0.74 mg/L,提高了 3.20 倍。当葡萄糖添加量大于正常葡萄糖添加量 2% (v/v) 时, *S. cerevisiae* 中油酸产量均有提高,说明葡萄糖添加量的提高对 *S. cerevisiae* 的油酸合成能力有促进作用。

单细胞油的生物合成有两种生物化学途径,细胞脂质在含有非脂质碳源的培养基中的从头合成和从环境中摄取脂肪酸的合成微生物油脂 (Fabiszewska et al., 2022)。从头合成包含脂肪酸前体的合成及其储存油脂的合成途径,并且它在含有非脂质碳源的介质中进行。高糖胁迫为酵母提供了充足的非脂质碳源,使酵母脂肪酸的从头合成途径大幅提高。此外高糖胁迫使酵母中油酸含量显著提高可能是由于高糖胁迫使 OLE1 的转录水平提高了约 1.35 倍,脂肪酸的脱饱和反应提高,从而提高了酵母的 UFAs 含量。

表 3-3 *S. cerevisiae* 在高糖胁迫下相对脂肪酸含量Table 3-3 Relative fatty acid content of *S. cerevisiae* at high glucose stress

葡萄糖浓度	脂肪酸 (%)				
	C16:0	C16:1 (n=7)	C18:0	C18:1 (n=9)	其他
2%	36.92±1.06	14.52±0.73	9.71±1.35	27.46±0.86	11.39±0.69
6%	31.36±1.63	24.16±0.97	12.49±1.75	27.61±1.54	4.38±0.94
10%	35.52±1.52	12.12±1.69	15.88±1.64	31.17±1.09	5.31±1.65
14%	30.37±1.34	17.93±1.82	14.65±0.91	34.10±0.74	2.95±1.82
18%	24.09±0.98	22.14±0.65	10.96±0.48	40.69±0.93	2.11±1.36

图 3-4 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 中脂肪酸含量的影响Fig. 3-4 Effect of high glucose stress on fatty acid contents in *S. cerevisiae*

3.4.4 高糖胁迫调控酿酒酵母脂肪酸转化

脂肪酸转化成酰基 CoA 途径的降低，既可以增加 FFA 的数量，又可以促进脂肪酸从细胞转运到培养基中。相关的酶是酰基辅酶 A 合成酶 FAA1、FAA4 和 FAT1 和与 β -氧化相关的 POX1、FAA2 和 PXA2 (Fernandez-Moya and Da Silva, 2017)。 β -氧化是脂肪酸在过氧化物酶体中代谢分解生成乙酰 CoA 的过程。在酵母中，当脂肪酸不被用作碳源时， β -氧化活性对于酵母细胞的正常生长不是必须的 (Wang et al., 2024b)。我们选取了脂肪酸转化相关基因 *FAA1*、*FAA4*、*FAT1*、*POX1*、*FAA2* 和 *PXA2*。

结果如图 3-5 所示，与对照组相比，高糖胁迫后降低酰基辅酶 A 合成酶 FAA1、FAA2 和 FAA4 的转录，其相对表达水平分别为 0.35、0.53 和 0.61，表明高糖胁迫确实可以降低酰基辅酶 A 合成酶的表达，减少酵母脂肪酸转化从而提高胞内脂肪酸含量，并与脂肪酸的分泌有关 (López et al., 2023)。同时与 β -氧化相关的 POX1、FAA2 和 PXA2 的相对转录水平分别为 2.07、0.53 和 0.59。

酰基辅酶 A 合成酶的活性与脂肪酸的摄取以及细胞内脂质储存的动员有关 (López et al., 2023)。酵母菌大多将脂质储存为 TAG；小部分则以 SE 的形式储存在 LB 中 (Park and Nicaud, 2020)。TAG 通过脂肪酶水解为 FFA，然后，脂肪酸通过 β -氧化途径在过氧化物酶体中降解，释放乙酰 CoA。阻止 FFA 被催化成酰基 CoA 的途径，既可以增加 FFA 的数量，又可以将 FFA 从细胞内转运到培养基中。相关的活化酶是酰基辅酶 A 合成酶，*S. cerevisiae* 具有 5 种酰基辅酶 A 合成酶，它们参与不同的过程，并表现出不同的脂肪酸特异性。阻止 FFA 活化和 β -氧化可进一步提高细胞外脂肪酸水平。当主要负责转化脂肪酸的酶基因转录水

平降低时,胞质溶胶中的大部分脂肪酸不能被转化成脂肪酰基 CoA,即不能被转运到过氧化物酶体中进行 β -氧化降解,胞质溶胶中的 FFA 积累 (Leber et al., 2015)。结果表明,高糖胁迫可以减少脂肪酸向酰基 CoA 的转化,从而提高脂肪酸含量。

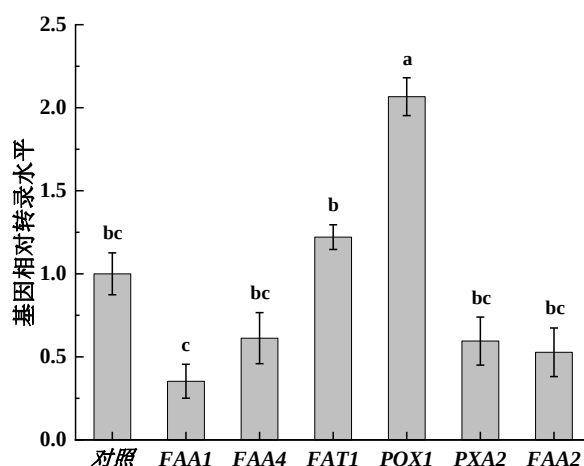


图 3-5 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 脂质转化相关基因的表达水平影响

Fig. 3-5 Effects of overexpression of high glucose stress of lipid transformation related genes in *S. cerevisiae*

3.4.5 高糖胁迫对酿酒酵母胞外分泌脂肪酸的影响

培养基葡萄糖添加量分别为 2%、6%、10%、14%、18% (v/v) 条件下,分别检测培养基中胞外脂肪酸含量,分析 *S. cerevisiae* 在不同葡萄糖添加量情况下脂肪酸分泌情况。培养基葡萄糖添加量分别为 2%、6%、10%、14%和 18% (v/v) 时胞外脂肪酸含量呈先上升后下降的趋势,与葡萄糖添加量为 2%的正常培养基相比, *S. cerevisiae* 胞外脂肪酸均有提高。当葡萄糖添加量为 14% (v/v) 时胞外脂肪酸总量达到最高,为 54.63 ± 3.62 mg/L。与正常葡萄糖添加量 2% (v/v) 相比,胞外脂肪酸总量提高了 2.22 倍。当葡萄糖添加量大于正常葡萄糖添加量 2% (v/v) 时,胞外油酸产量均有提高,说明葡萄糖添加量的提高对胞外油酸分泌能力有促进作用。

阻止 FFA 被催化成酰基 CoA 的途径,既可以增加 FFA 的数量,又可以将 FFA 从细胞内转运到培养基中。高糖胁迫使 FFA 氧化途径中相关基因转录水平降低,减少 FFA 向酰基 CoA 的转化,从而增加 FFA 含量并促进 FFA 的分泌。随着葡萄糖浓度的升高,培养基中 UFAs 的积累增多,这可能是由于一方面胞内脂肪酸含量提高较为明显,另一方面 UFAs 更容易分泌到细胞外导致 (吴敏, 2017)。

表 3-4 *S. cerevisiae* 在高糖胁迫下胞外分泌脂肪酸相对含量

Table 3-4 The secretion of relative fatty acid content of *S. cerevisiae* at high glucose stress

葡萄糖浓度	脂肪酸 (%)				
	C16:0	C16:1 (n=7)	C18:0	C18:1 (n=9)	其他
2%	38.62±1.35	12.65±0.93	21.62±1.93	16.94±1.79	10.17±0.62
6%	37.63±1.41	12.92±0.82	20.81±1.58	19.41±1.61	9.23±1.83
10%	30.32±0.95	4.86±0.91	14.66±1.73	38.56±1.43	11.60±0.69
14%	34.93±0.67	4.74±1.39	31.63±0.96	26.27±0.84	2.42±1.22
18%	40.93±1.91	6.65±1.02	33.46±1.40	9.38±0.67	9.58±1.60

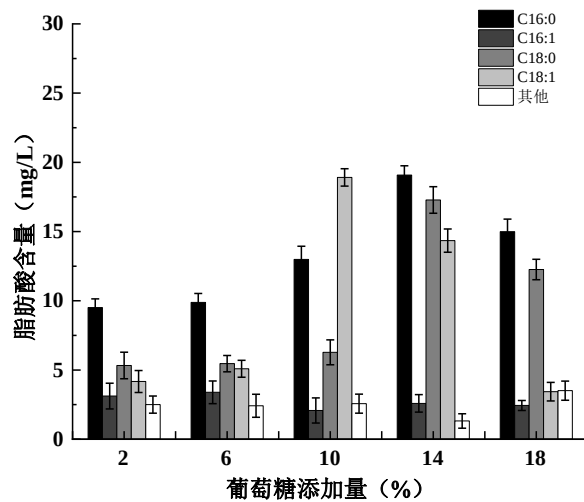


图 3-6 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 胞外分泌脂肪酸含量的影响

Fig. 3-6 Effect of high glucose stress on extracellular secreted fatty acid contents in *S. cerevisiae*

3.4.6 高糖胁迫调控酿酒酵母脂肪酸分泌

S. cerevisiae 的 PRY 蛋白已被实验鉴定参与脂肪酸输出，PRY1 的结构包含 FFA 的结合位点。酰基 CoA 硫酯酶可以将酰基 CoA 水解获得 FFA (Wang et al., 2024b)。 *S. cerevisiae* 只有一种已知的酰基 CoA 硫酯酶 TES1。我们选取了脂肪酸分泌相关基因 *PRY* 和 *TES1* 进行验证。结果如图 3-7 所示，与对照组相比，高糖胁迫后 PRY1 的转录水平提高了约 1.29 倍，表明高糖胁迫确实可以提高 *PRY1* 基因的表达水平，促进酵母脂肪酸分泌。同时促进了 *S. cerevisiae* 酰基 CoA 硫酯酶 TES 1 的转录水平，提高了约 2.15 倍，从而促进酰基 CoA 水解获得 FFA，提高 *S. cerevisiae* 中 FFA 的含量，为酵母胞内脂肪酸以 FFA 形式分泌到胞外提供物质基础，进一步说明高糖胁迫通过调控 *S. cerevisiae* 中脂肪酸分泌相关基因的表达来调节 UFAs 的分泌。

S. cerevisiae 脂肪酸的分泌的增加不仅与 *TES 1* 和 *PRY1* 这些分泌相关的基因表达有关, 还与脂肪酸的合成和转化有关。天然 *TES 1* 在敲除 *FAA1 FAA4* 的菌株中将 FFA 的总产量从 77 mg/L 增加到 115 mg/L (Li et al., 2014)。在聚藻球菌中, 硫酯酶和 *ACC1* 基因同时过表达使 FFA 分泌 (Huang et al., 2018)。此外, 在缺乏两种酰基辅酶 A 合成酶 *FAA1* 和 *FAA4* 的双突变体中, *PRY1* 结合和输出 FFA 对于细胞内积累高水平 FFA 的细胞的存活是重要的。实验结果表明高糖胁迫不仅提高了 *TES 1* 和 *PRY1* 的转录水平, 同时降低了 *FAA1* 和 *FAA4* 的转录水平, 在一定程度上提高了 *TES 1* 水解酰基 CoA 获得 FFA 和 *PRY1* 蛋白输出 FFA 的能力, 增加 *S. cerevisiae* FFA 的分泌。

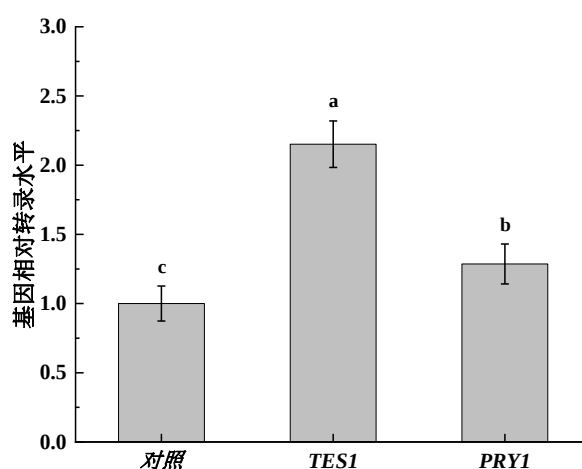


图 3-7 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 脂质分泌相关基因的表达水平影响

Fig. 3-7 Effects of overexpression of high glucose stress of lipid secretion related genes in *S. cerevisiae*

3.5 本章小结

本章研究中 UFAs 含量和脂肪酸合成、转化和分泌相关基因转录水平探究高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 中 UFAs 合成的作用机制。主要结论如下:

(1) 培养基中葡萄糖含量对酵母脂质合成有重要影响, 酵母的 TAG 积累量随着培养基中葡萄糖含量的升高呈先上升后降低的趋势, 葡萄糖添加量为 14% (v/v) 时 TAG 含量达到最高, TAG 含量提高了 2.3 倍。高糖胁迫通过影响 *S. cerevisiae* 中脂肪酸合成相关基因转录水平来调控脂质合成, 进而来提高脂质含量。高糖胁迫下酵母中 *ACC1* 及关键转录因子 *MGA2* 的转录水平分别提高了 1.42 倍和 1.66 倍, 表明 *S. cerevisiae* 在高糖胁迫环境下, 细胞提高了脂肪酸合成相关基因转录水平, 调控合成脂质的 *ACC1*、*OLE1* 和 *FAS1* 表达。

(2) 在不同葡萄糖添加量培养下, 对 *S. cerevisiae* 中 UFAs 合成有影响。在

葡萄糖添加量为 14% (v/v) 时, 脂肪酸总量达到最高, 为 196.68 ± 6.63 mg/L, 脂肪酸总量提高了 2.16 倍。同时 *S. cerevisiae* 的 UFAs 相对含量最高, 为 52.03%, 此时油酸含量为 34.1%。表明适当浓度的葡萄糖的添加会促进 *S. cerevisiae* 中 UFAs 合成的转化能力。高糖胁迫后降低酰基辅酶 A 合成酶 FAA1、FAA2 和 FAA4 的转录, 其相对表达水平分别为 0.35、0.53 和 0.61。同时与 β -氧化相关的 POX1、FAA2 和 PXA2 的相对转录水平分别为 2.07、0.53 和 0.59。当主要负责转化脂肪酸的酶基因转录水平降低时, 胞质溶胶中的大部分脂肪酸不能被转化成脂肪酰基辅酶 A, 即不能被转运到过氧化物酶体中进行 β -氧化降解, 胞质溶胶中的 FFA 积累。结果表明, 高糖胁迫可以减少脂肪酸向酰基辅酶 A 的转化, 从而提高脂肪酸含量。

(3) 与葡萄糖添加量为 2% (v/v) 的正常培养基相比, 高糖胁迫下 *S. cerevisiae* 胞外脂肪酸均有提高。当葡萄糖添加量为 14% (v/v) 时胞外脂肪酸总量达到最高, 为 54.63 ± 3.62 mg/L, 提高了 2.22 倍。高糖胁迫后脂肪酸转运蛋白 PRY1 的转录水平提高了约 1.29 倍, 表明高糖胁迫确实可以提高 *PRY1* 基因的表达水平, 促进酵母脂肪酸分泌。同时促进了 *S. cerevisiae* 酰基 CoA 硫酯酶 TES1 的转录水平, 提高了约 2.15 倍, 从而促进酰基 CoA 水解获得 FFA, 调节酰基 CoA 代谢可以增加酵母细胞中 FFA 的积累。

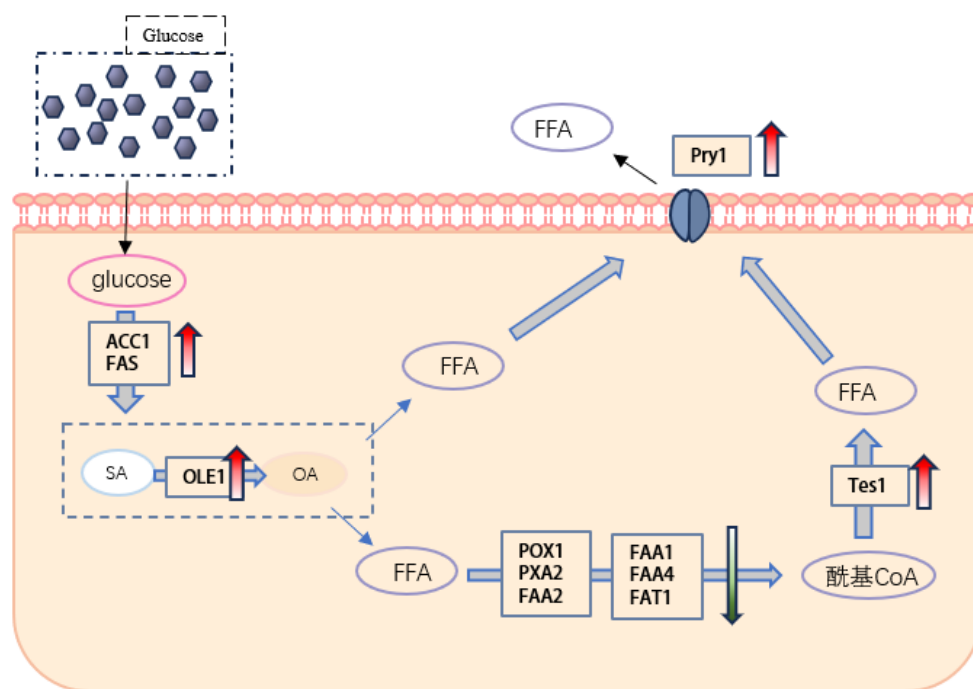


图 3-8 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* UFAs 合成的调控机制

Fig. 3-8 Regulatory mechanism of high glucose stress on the synthesis of UFAs in *S. cerevisiae*

第四章 酿酒酵母细胞膜组分的高糖胁迫应答

4.1 前言

前一章实验结果表明高糖胁迫提高了脂肪酸的合成并减少脂肪酸转化成乙酰 CoA，导致脂肪酸在细胞内的含量增加，由于脂肪酸在胞内的积累对于微生物是有毒的，微生物会通过改变细胞膜的结构和成分的策略来减弱这些有毒物质的影响。另一方面，高渗胁迫对 *S. cerevisiae* 细胞壁和细胞膜影响研究表明，高糖胁迫改变了 *S. cerevisiae* 细胞壁和细胞膜的特性，还通过下调 *S. cerevisiae* 与细胞膜成分相关的基因造成了细胞膜损伤。*S. cerevisiae* 通过改变膜的流动性或渗透性来参与对外部应激的反应（郭红等，2020）。细胞膜的渗透能力和脂肪酸的分泌会受到细胞膜中麦角固醇和神经酰胺含量变化的影响。麦角固醇在通过细胞膜的物质运输，维持膜结合酶的活性和细胞活力发挥着重要作用。质膜中的神经酰胺会在各种应激刺激下发生快速变化（Ventura et al., 2020）。从而调节影响生物反应的膜特性，引起生物膜组织和流动性的大量变化。因此，本章考察高糖胁迫对细胞膜中的神经酰胺和麦角固醇含量变化情况，并研究高糖胁迫对细胞膜流动性和通透性的影响，进而深入分析高糖胁迫对 *S. cerevisiae* UFAs 胞外分泌及细胞膜的影响。

4.2 材料与设备

4.2.1 主要试剂

碘化丙啶（PI）、1,6-二苯基-1,3,5-己三烯（DPH）、磷酸盐缓冲盐水（PBS），生工生物工程（上海）股份有限公司；麦角固醇等标准品购于美国 Sigma 公司；无水硫酸钠、三氟化硼、乙醇（HPLC 级）、甲醇（HPLC 级），上海国药集团；其余试剂见 2.2.3。

4.2.2 试验培养基

YPD 培养基：用于酿酒酵母活化及培养，培养基成分见 2.2.2。

4.2.3 主要仪器设备

表 4-1 主要仪器设备

Table 4-1 Main instruments and equipment

设备名称	规格及型号	生产单位
气相质谱联用仪	7890A-5975c	美国Agilent科技有限公司
超净工作台	HCB-1300V	青岛海尔特种电器有限公司

表 4-1 主要仪器设备（续表）

Table 4-1 Main instruments and equipment

设备名称	规格及型号	生产单位
电子天平	EL3002	梅特勒-托利多仪器有限公司
电热恒温水浴锅	DK-98-IIA	天津泰丝仪器有限公司
漩涡振荡器	XFF-C	常州荣化仪器制造有限公司
自动电热压力蒸汽灭菌锅	LX-B50	合肥华泰医疗设备有限公司
紫外可见分光光度计	UV-2700	日本SHIMADZU岛津公司
光学显微镜	N-117M	沈阳和君生物科技有限公司
单四级杆气相色谱质谱联用仪	LCMS-8050	日本岛津公司
高效液相色谱仪	H-Class	美国waters公司
电导率仪	DDSJ-319 L	中国上海科学仪器有限公司
高速离心机	AG 22331	艾本德中国（北京）有限公司

4.3 试验方法

4.3.1 细胞膜流动性的测定

采用带有荧光偏振装置的荧光分光光度计检测细胞膜的流动性：将 4.65 mg DPH 溶于 10 mL 丙酮中，得到可在-20℃下保存 1 个月的 DPH 原液（2 mm），保存于棕色瓶中，避光保存。为了方便使用，使用 PBS 将 DPH 原液稀释至 2 μM，称为 DPH 工作液。

为了测试细胞膜的通透性，收集酵母细胞，离心（13400×g，4℃，10 min），PBS 洗涤 3 次，PBS 重悬，生成 OD₆₀₀=0.2 的细胞悬液。在 650 μL 细胞悬液中加入 650 μL DPH 工作液，室温下于旋转摇床（500 rpm）黑暗培养 30 min。培养结束后，提取 300 μL 混合液，用微孔板分光光度计测定荧光强度、偏振度和各向异性。微孔板分光光度计的参数为：以 PBS 和 PBS + DPH 的荧光强度为基线；采用中等灵敏度的高能氙灯作为光源；激发 360 nm，发射 430 nm。荧光强度(F)、极化度(mP)、各向异性(r)、细胞膜平均粘度(η)、膜脂流动性(LFU)按式计算。

$$F = I_{\parallel} + 2 I_{\perp}$$

$$mp = 1000 \times \frac{(I_{\parallel} - I_{\parallel blank}) - G \times (I_{\perp} - I_{\perp blank})}{(I_{\parallel} - I_{\parallel blank}) + G \times (I_{\perp} - I_{\perp blank})}$$

$$r = \frac{(I_{\parallel} - I_{\parallel blank}) - G \times (I_{\perp} - I_{\perp blank})}{(I_{\parallel} - I_{\parallel blank}) + 2 \times G \times (I_{\perp} - I_{\perp blank})} = \frac{2P}{3 - P}$$

$$\eta = \frac{2P}{0.46 - P}$$

$$LFU = \frac{(P_{max} - P_r) - 1}{P_r}$$

$I_{\parallel}$:平行滤光片的荧光强度; $I_{\perp}$:垂直滤光片的荧光强度; G :校正因子, 1; P_{max} 为 0.5; P_r 是 P 的测量值。

4.3.2 细胞膜通透性的测定

采用电导率仪检测细胞膜的通透性: 微生物细胞膜通透性的检测采用 Wang 等 (2024a) 的方法进行改进, 在 4°C 条件下, 使用 4000 r/min 的转速离心 5 min 收集酵母细胞, 用 0.9% 的生理盐水 (w/v) 洗涤, 直到酵母混悬液的电导率与生理盐水近似相等。将酵母细胞接种于不同葡萄糖浓度 (2%、6%、10%、14% 和 18% (v/v)) 的培养基后, 立即用电导率仪测定酵母悬浮液 (R_1) 的电导率。然后, 将所有酵母悬浮液置于 30°C, 分别于 8、16、24 h 后测量电导率 (R_t)。最后, 将所有酵母悬浮液在沸水中水浴 5 min, 冷却至室温后测定其电导率 (R_0)。相对电导率按下式计算。

$$\text{相对电导率}(\%) = 100 \times \frac{R_t - R_1}{R_0}$$

4.3.3 麦角固醇含量的测定

麦角固醇含量检测参考李翠丽 (2019) 的方法进行改进。

4.3.4 神经酰胺含量的测定

神经酰胺检测参考山格依里·巴依尔 (2021) 的方法进行改进。

4.4 结果与讨论

4.4.1 高糖胁迫对酿酒酵母细胞膜流动性的影响

通过细胞膜的各向异性值表征不同葡萄糖添加量对 *S. cerevisiae* 膜流动性的影响。各向异性值越大, 细胞膜的流动性就越强 (Huang et al., 2019)。结果表明, 葡萄糖的添加增加了细胞膜的各向异性值, 并且随着浓度的增加细胞膜的各向异性呈上升趋势。与对照组相比, 在葡萄糖添加量为 18% (v/v) 条件下, 各向异性值提高了 1.17 倍。在高糖培养基发酵过程中, 由于底物浓度高, 外界渗透压力大, 会加快磷脂分子在膜内的侧向扩散或侧向运动, 增加膜的流动性。

细胞膜流动性对细胞功能至关重要, 它是细胞对环境应激反应的重要调节因子, 以维持细胞膜的生物活性状态 (Los et al., 2013)。细胞膜流动性增加, 由此推断质膜组分发生了改变, 以维持高糖胁迫下细胞膜的正常流动, 保证细胞维持正常的生理功能, 这与 UFAs 含量提高的结果相吻合。在高渗透压下, 大多数细胞通过改变膜组分来维持其生化功能。高糖胁迫导致膜内脂肪酸的不饱和程度增加。细胞膜流动性的程度也受细胞膜内脂肪酸组成变化的影响。天然膜的流动性

变化与化学动力学有关。U/S 比和平均链长的增加可能有助于维持细胞膜的流动性，因为由长链脂肪酸组成的膜排列紧密，而由 UFA 组成的膜排列松散，流动性更强。总之，葡萄糖的添加能增强细胞膜的流动性，提高其转运物质的能力。

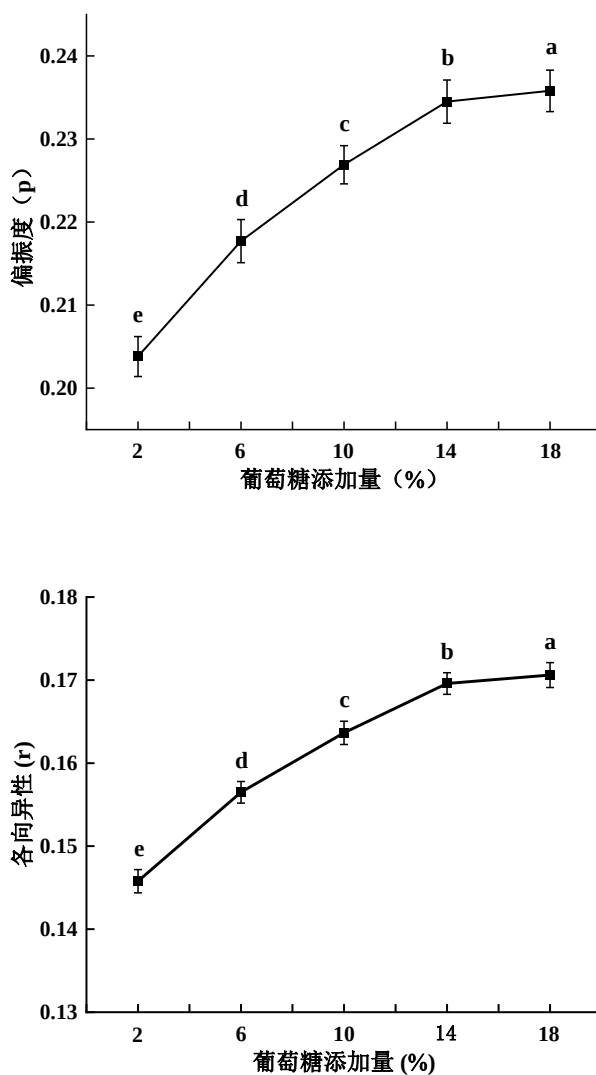


图 4-1 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 细胞质膜流动性的影响

Fig. 4-1 Effects of high glucose stress on the plasma membrane fluidity of *S. cerevisiae*

4.4.2 高糖胁迫对酿酒酵母细胞膜通透性的影响

微生物悬浮液的相对电导率变化是评价微生物细胞膜通透性的重要指标 (Cai et al., 2019)，从图中可以看出，在高糖的情况下，*S. cerevisiae* 悬浮液的相对电导率随着时间的推移增加，并最终变得稳定。细胞质膜通透性的大小与细胞对环境胁迫耐受性的强弱成反比。质膜通透性升高，则细胞渗透性屏障降低，难以维持细胞质膜的完整性，降低细胞对环境胁迫的耐受能力 (李翠丽, 2019; 周柳, 2023)。

S. cerevisiae 细胞膜的通透性与膜脂的组成有关。*S. cerevisiae* 在环境胁迫下调节脂肪酸饱和度和酰基长度,以及细胞膜中的脂肪酸异构化,以逐渐恢复细胞膜的通透性 (Pei et al., 2022; Wang et al., 2020)。此外,麦角固醇通过形成屏障阻断细胞内和细胞外物质的自由流动,在恢复 *S. cerevisiae* 细胞膜的渗透性方面发挥着重要作用 (Jordá and Puig, 2020)。*S. cerevisiae* 需要时间才能对高糖应激做出完全反应,在此期间 *S. cerevisiae* 还不能适应应激。高糖应激导致细胞膜通透性升高,细胞内电解质渗漏,从而增加 *S. cerevisiae* 悬浮液的相对电导率。随着高糖应激持续时间的延长, *S. cerevisiae* 完成细胞应答,适应高糖应激。通过调节细胞膜脂质组成逐渐恢复细胞膜通透性,胞内电解质停止渗漏。因此, *S. cerevisiae* 悬浮液的相对电导率趋于稳定 (Wang et al., 2024a)。

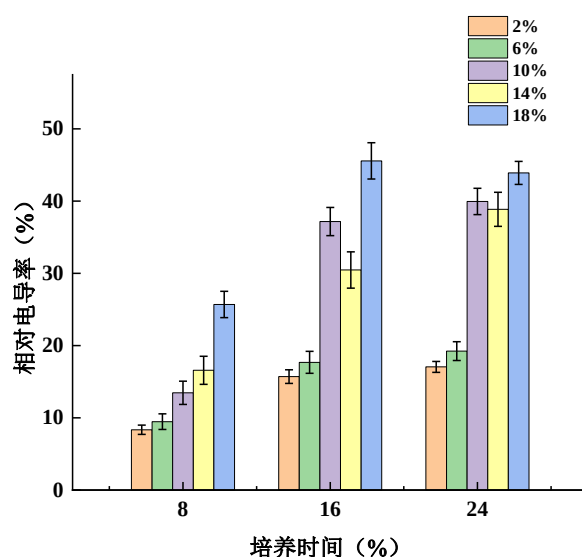


图 4-2 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 细胞质膜通透性的影响

Fig. 4-2 Effects of high glucose stress on the plasma membrane permeability of *S. cerevisiae*

4.4.3 高糖胁迫对酿酒酵母细胞膜麦角固醇的影响

培养基葡萄糖添加量分别为 2%、6%、10%、14%、18% (v/v) 条件下,检测 *S. cerevisiae* 麦角固醇含量,结果如图 4-3 所示。培养基葡萄糖添加量分别为 2%、6%、10%、14%和 18% (v/v) 时麦角固醇呈下降的趋势,与葡萄糖添加量为 2%的正常培养基中 *S. cerevisiae* 细胞膜麦角固醇含量为 4.58 ± 0.12 mg/g 相比,培养基中葡萄糖的增加使 *S. cerevisiae* 细胞膜麦角固醇含量降低。*S. cerevisiae* 在葡萄糖添加量为 18% (v/v) 的环境下达到最低,麦角固醇含量为 2.51 ± 0.13 mg/g。

麦角固醇作为酵母细胞类固醇的主要成分,通过与磷脂结合调节细胞膜的流动性和通透性、膜结合酶活性和跨膜运输,对稳定细胞膜结构和功能起重要作用 (Jordá and Puig, 2020; Liu et al., 2019; Wang et al., 2024a)。上述结果表明,

麦角固醇含量降低对 *S. cerevisiae* 细胞膜结构和成分产生影响，并促进脂肪酸的分泌作用，从而提高培养基中胞外脂肪酸的产生。

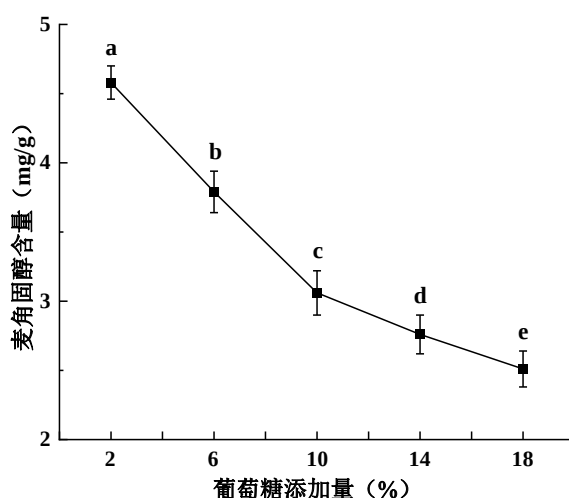


图 4-3 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 细胞膜麦角固醇含量的影响

Fig. 4-3 Effects of high glucose stress on the ergosterol content of plasma membrane of *S. cerevisiae*

4.4.4 高糖胁迫对酿酒酵母细胞膜神经酰胺的影响

培养基葡萄糖添加量分别为 2%、6%、10%、14%、18% (v/v) 条件下，检测 *S. cerevisiae* 神经酰胺含量，结果如图 4-4 所示。培养基葡萄糖添加量分别为 2%、6%、10%、14% 和 18% (v/v) 时神经酰胺呈下降的趋势，与葡萄糖添加量为 2% (v/v) 的正常培养基中 *S. cerevisiae* 细胞膜神经酰胺含量为 1258.58 ± 15.66 mg/g 相比，培养基中葡萄糖的增加使 *S. cerevisiae* 细胞膜神经酰胺含量降低。*S. cerevisiae* 在葡萄糖添加量为 18% (v/v) 的环境下达到最低，神经酰胺含量为 1031.63 ± 20.27 mg/g。

神经酰胺是一类重要的神经脂类，可调节多种细胞活动。神经酰胺可以通过调节膜的生物物理特性来起作用 (Ventura et al., 2020)。神经酰胺浓度的变化会影响细胞膜特性，如局部流动性和膜完整性，引起囊泡或细胞外排，并在调节细胞迁移中发挥作用。细胞膜中麦角固醇和神经酰胺含量的降低能提高膜的渗透能力和脂肪酸的分泌 (Fang et al., 2016)。上述结果表明，培养基中葡萄糖含量的增加使神经酰胺含量降低从而对 *S. cerevisiae* 细胞膜结构和成分产生影响，使脂肪酸的分泌发生改变，从而提高培养基中胞外脂肪酸的含量。

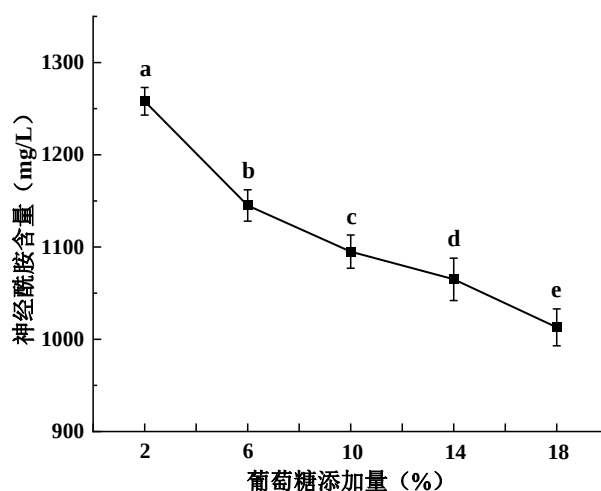
图 4-4 高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 细胞膜神经酰胺含量的影响

Fig. 4-4 Effects of high glucose stress on the ceramide content of plasma membrane of *S. cerevisiae*

4.5 本章小结

本章考察了高糖胁迫对细胞膜中的麦角固醇和神经酰胺含量变化情况,并研究高糖胁迫对细胞膜流动性和通透性的影响,进而深入分析高糖胁迫对 *S. cerevisiae* UFAs 胞外分泌及细胞膜的影响。

(1)培养基中葡萄糖的增加使 *S. cerevisiae* 细胞膜麦角固醇和神经酰胺含量降低,在葡萄糖添加量为 18% (v/v) 下达到最低,含量分别为 2.51 ± 0.13 mg/g 和 1031.63 ± 20.27 mg/g。麦角固醇和神经酰胺含量降低对 *S. cerevisiae* 细胞膜结构和成分产生影响,提高膜的渗透能力和脂肪酸的分泌,从而提高培养基中胞外脂肪酸含量。

(2)细胞膜的流动性和通透性出现不同程度的升高。因此高糖胁迫能增强细胞膜的流动性,提高其转运物质的能力。细胞膜通透性随着时间的推移增加,并最终变得稳定。随着高糖应激持续时间的延长, *S. cerevisiae* 完成细胞应答,通过调节细胞膜脂质组成逐渐恢复细胞膜通透性并趋于稳定。

第五章 共培养菌株发酵白霉奶酪的品质特性及其脂肪酸组成分析

5.1 前言

白霉奶酪营养成分丰富，但 SFA 和 UFA 比例失衡。长期食用含有大量 SFA 而缺乏 UFA 的奶酪，可能会导致高脂血症、高血压、动脉粥样硬化等各种心脑血管疾病。利用白霉奶酪发酵剂对脂肪酸的转化可以实现提升其 UFAs 含量。*G. candidum* 是白霉奶酪中优势微生物菌种，但其 UFAs 合成能力不足。利用 *S. cerevisiae*-*G. candidum* 共培养使脂肪酸合成途径分工到两种菌株中，利用代谢分工消除由于脱饱和酶活性不同而带来的限制，可提高 *G. candidum* 合成 UFAs 能力。

基于此，本章实验利用 *S. cerevisiae*-*G. candidum* 共培养菌株发酵白霉奶酪，检测白霉奶酪中不饱和优质脂肪酸组成与含量、评估白霉奶酪的质地和感官特性等理化指标，分析共培养发酵剂对白霉奶酪 UFAs 含量及品质特性的影响，为基于优化发酵剂来提高奶酪中 UFAs 的含量提供了理论基础。

5.2 材料与设备

5.2.1 实验材料

巴氏杀菌乳，辽宁辉山乳业集团；乳酸菌（食品级），河北一然生物科技有限公司；氯化钙（食品级），天津化工公司；凝乳酶（食品级），河南万邦化工科技有限公司；食盐（食品级），中国盐业有限公司。

5.2.2 主要试剂

正己烷、无水硫酸钠、盐酸、甲醇、乙醚、石油醚均为分析纯，西陇科学股份有限公司；其余试剂见 2.2.3。

5.2.3 主要仪器与设备

电子舌，日本 Insent 公司；紫外可见分光光度计，日本 SHIMADZU 岛津公司；质构仪，丹麦公司；半自动凯氏定氮仪，美国马英文股份有限公司；pH 计，上海佑科仪器有限公司；奶酪排乳清模具，实验室自制；其他仪器设备详见与 2.2.4。

5.3 实验方法

5.3.1 白霉奶酪样品的制备

共培养发酵剂白霉奶酪制作工艺：新鲜牛乳→巴氏杀菌后冷却至室温→添加1%的乳酸菌和共培养发酵剂→37℃恒温培养 1.5 h→添加 0.05%氯化钙溶液，搅拌均匀→添加 0.3%凝乳酶→37℃恒温凝乳 1 h→切割、搅拌→排乳清→盐渍（1%~2%）→切块→后熟。

5.3.2 感官评定

以风味、组织状态和色泽指标为依据对共培养发酵剂白霉奶酪样品进行感官评价，评分标准如表 5-1 所示。

表 5-1 感官评价表

Table 5-1 Sensory evaluation scale

评分项目	特征描述	感官评分
整体风味	有牛乳特有的滋味与风味，香味浓郁	34~40
	有牛乳特有的滋味与香气，风味较好	25~33
	滋味与气味相对较好	16~24
	滋味与气味一般，风味合格	9~15
	滋味与气味异常	0~8
组织形态	奶酪质地紧密，外表光滑，硬度适中	34~40
	质地较为紧密，外表较为光滑，组织细腻	25~33
	质地疏松，硬度较软	16~24
	组织状态易碎，呈断层状	9~15
	组织状态分层，表面菌斑分布异常	0~8
色泽	呈白色或淡黄色，色泽均匀且有光泽	16~20
	色泽较为均匀，无明显光泽感	9~15
	色泽分布不均匀	0~8

5.3.3 pH 值测定

将共培养发酵剂发酵白霉奶酪样品充分研碎，准确称取 1 g 加入 10 mL 蒸馏水，混合均匀，均质后使用校准好的 pH 计进行测定，三次平行后计算平均值。

5.3.4 水分含量测定

共培养发酵剂发酵白霉奶酪样品的水分含量测定参照 GB5009.3-2016 第一法直接干燥法。

5.3.5 蛋白质含量测定

共培养发酵剂发酵白霉奶酪样品中蛋白质含量测定参照 GB 5009.5-2016 第一法凯氏定氮法。

5.3.6 脂肪含量测定

共培养发酵剂发酵白霉奶酪样品中脂肪含量测定参照 GB 5009.6-2016 第三法碱水解法。

5.3.7 质构分析

将共培养发酵剂发酵白霉奶酪样品切割成 4 cm×2 cm×2 cm 方块状置于质构仪 (Texture profile analysis, TPA) 台面测定。

参数设置: 距离为 10.0 mm, 测试速度为 1.00 mm/s, 探头为 TA3/100, 目标类型和目标值分别为距离和 10.0 mm, 触发点负载 0.15 牛顿, 循环次数 2 次。

第一循环计算勾选硬度、粘力、粘性; 第二循环计算勾选内聚性、弹力、弹性、咀嚼性。

5.3.8 滋味分析

共培养发酵剂发酵白霉奶酪样品准确称取 25.0 g, 研磨后置于 500 mL 蒸馏水中溶解, 均质后得到奶酪浆, 5000 rpm, 离心 20 min, 将奶酪上清液精密过滤 2 次得到清澈滤液, 小心倒入电子舌专用杯中进行检测。

5.3.9 脂肪酸含量测定

奶酪样品脂肪酸含量测定参考李宇辉等 (2022) 的方法。

5.4 结果与讨论

5.4.1 白霉奶酪成熟期间的感官评价

共培养发酵剂发酵白霉奶酪在成熟中期具有较高的感官接受度。奶酪在成熟期间的感官评价如图 5-1 所示。在白霉奶酪成熟 30 d 期间奶酪评分随时间变化呈先上升后下降趋势, 在成熟第 1 d 到第 20 d, 奶酪感官评分由 73.5 ± 1.9 分增加至 93.6 ± 1.6 分, 但从 20 d 后, 奶酪的感官评分开始逐渐降低, 说明奶酪样品在成熟中期总体风味更好。在奶酪成熟初期 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 迅速生长, 并参与了发酵过程, 赋予奶酪更加复杂的物质代谢途径的同时, 产生的风味相关代谢产物, 增加了奶酪的受欢迎程度。然而, 随着成熟时间的延长, 感官评分降低, 可能是由于霉菌会在成熟过程中产生强烈的霉菌气味, 在 28 天气味达到最大。白霉奶酪特有风味的显现不利于消费者的口味风格, 不利于接受, 致使感官评分略低。

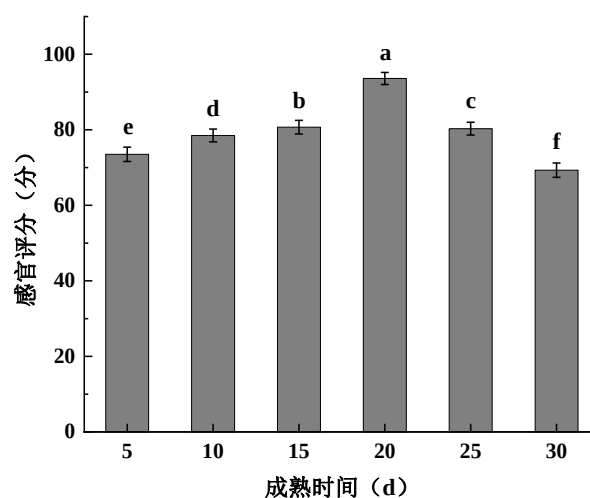


图 5-1 奶酪成熟期间感官评分变化

Fig. 5-1 Changes of sensory scores during cheese ripening

5.4.2 pH 值变化

共培养发酵剂发酵白霉奶酪的 pH 值在成熟期间的变化如图 5-2 所示。随着成熟时间的延长白霉奶酪的 pH 值整体呈下降趋势，成熟初期奶酪的 pH 值变化显著，由成熟第 5 d 的 5.86 ± 0.04 下降至第 20 d 的 5.18 ± 0.08 ，在第 20 d 后奶酪的 pH 值波动无明显变化，可能是由于 *G. candidum* 分泌的脂肪酶分解脂肪产生脂肪酸导致的，而在成熟后期，可能由于蛋白质分解产生碱性小分子物质，奶酪 pH 值趋于稳定。此外，白霉奶酪中乳酸菌发酵剂对乳糖产生乳酸也会调节其中 pH 值的变化。这种酸度可以防止许多细菌在表面生长。

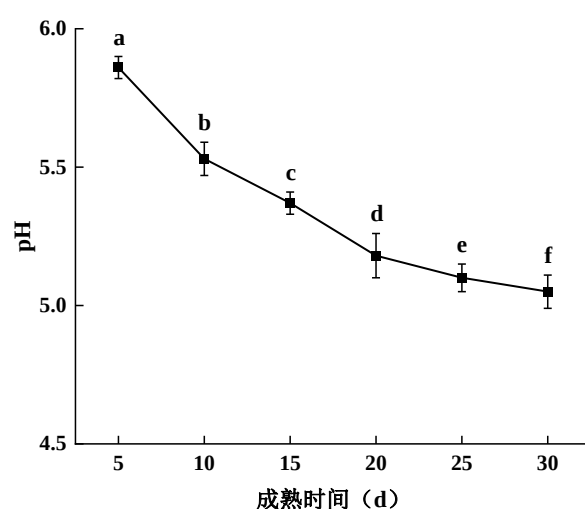


图 5-2 奶酪成熟期间 pH 值变化

Fig. 5-2 Changes of pH values during cheese ripening

5.4.3 水分含量变化

在共培养发酵剂发酵白霉奶酪成熟过程中水分含量逐渐降低, 结果如图 5-3 所示。在奶酪成熟初期和中期水分含量下降明显, 在成熟后期水分含量趋于稳定。奶酪水分含量由最初的 64.3 ± 2.6 g/100 g, 逐渐下降为 46.9 ± 3.1 g/100 g, 说明奶酪的成熟会促进水分的流失, 这与张荣荣 (2022) 的研究结果一致。此外, 成熟初期高水分含量有利于共培养菌株的生长与繁殖, 且成熟后期由于 *G. candidum* 在奶酪表面形成的较为坚硬的“白色外壳”能有效阻止水分的流失, 从而保证软质白霉奶酪后期水分含量的恒定。

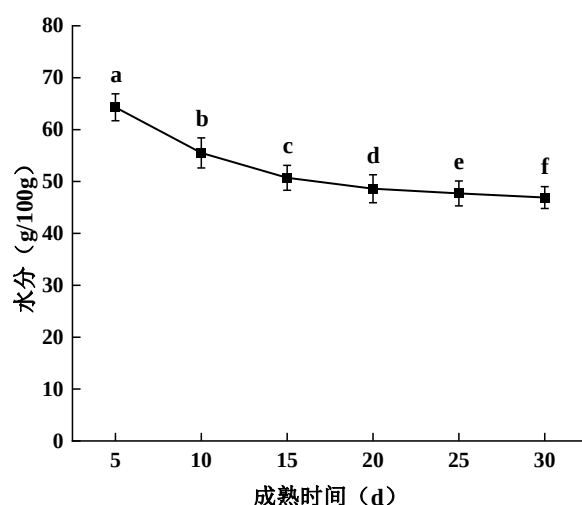


图 5-3 奶酪成熟期间水分含量变化

Fig. 5-3 Changes of moisture contents during cheese ripening

5.4.4 蛋白质含量变化

共培养发酵剂发酵白霉奶酪中蛋白质含量随成熟时间的延长呈现逐渐下降的趋势, 且成熟初期的下降趋势更为显著, 蛋白质含量由最初的 24.57 ± 0.55 g/100g 减少至 19.69 ± 0.62 g/100g (图 5-4)。奶酪中的蛋白质主要来自于原料乳和微生物菌丝体。在奶酪成熟初期, *G. candidum* 的生长促使奶酪中蛋白质含量较高, 随着发酵的进行, 菌株生长稳定, 因共培养发酵剂的接种对蛋白质的水解作用分解奶酪中蛋白质产生小分子物质, 致使奶酪的蛋白质含量降低。在奶酪成熟后期, 蛋白质变化平缓, 可能是由于酶扩散困难, 奶酪中心的蛋白质水解率较低。奶酪中蛋白质不仅能提高其营养价值, 且真菌菌丝体中的蛋白能赋予奶酪功能性, 对人体的营养健康有重要的作用。

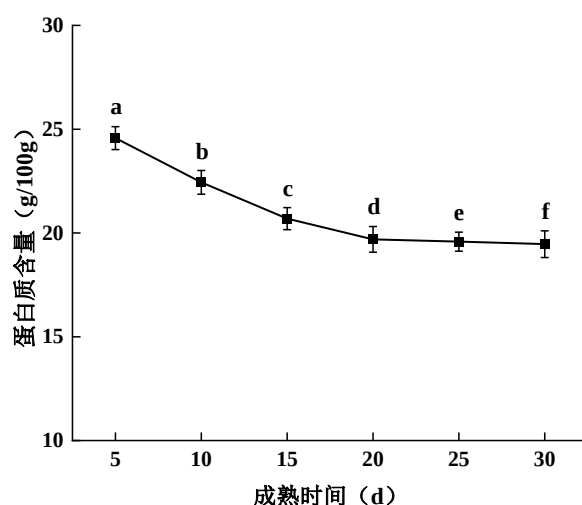


图 5-4 奶酪成熟期间蛋白质含量变化

Fig. 5-4 Changes of protein contents during cheese ripening

5.4.5 脂肪含量变化

共培养发酵剂奶酪中脂肪含量随着成熟时间的延长呈现逐渐下降的趋势,且在成熟后期脂肪含量趋于平稳,结果如图 5-5 所示。共培养发酵剂发酵白霉奶酪成熟初期的脂肪含量较高,由于奶酪中的脂肪在成熟初期未被微生物分解利用,但随着成熟时间的延长,脂肪逐渐被微生物分泌的脂肪酶分解成为脂肪酸,且随着共培养菌株的生长繁殖也会降解脂类,从而致使奶酪中的脂肪含量逐步下降,由最初的 31.75 ± 0.59 g/100 g 下降至 26.51 ± 0.63 g/100 g。共培养发酵剂发酵白霉奶酪中微生物脂肪的分解对于挥发性风味物质的形成具有重要作用,因其产生的醇类、醛类、酯类和游离脂肪酸等物质对奶酪风味形成具有重要贡献(李宇辉等, 2022)。脂肪在质地上的作用是作为润滑剂,使奶酪在口中有一种柔软的感觉。此外,优势微生物中不同脂肪分解程度对白霉奶酪的风味形成也有巨大贡献,共培养发酵剂的添加促进了白霉奶酪中脂肪分解,从而提高风味物质的形成,使白霉奶酪具有独特的风味。

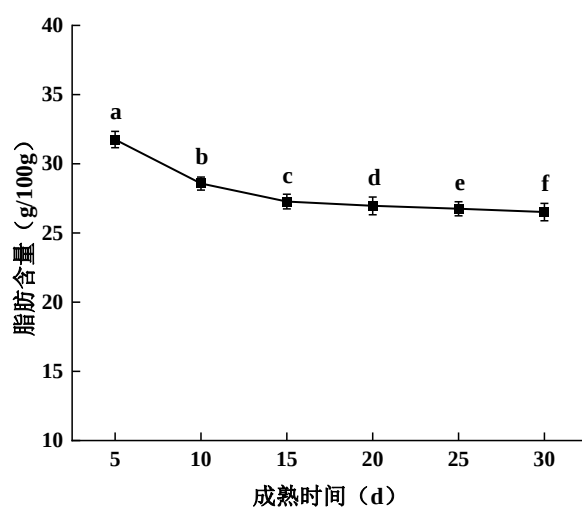
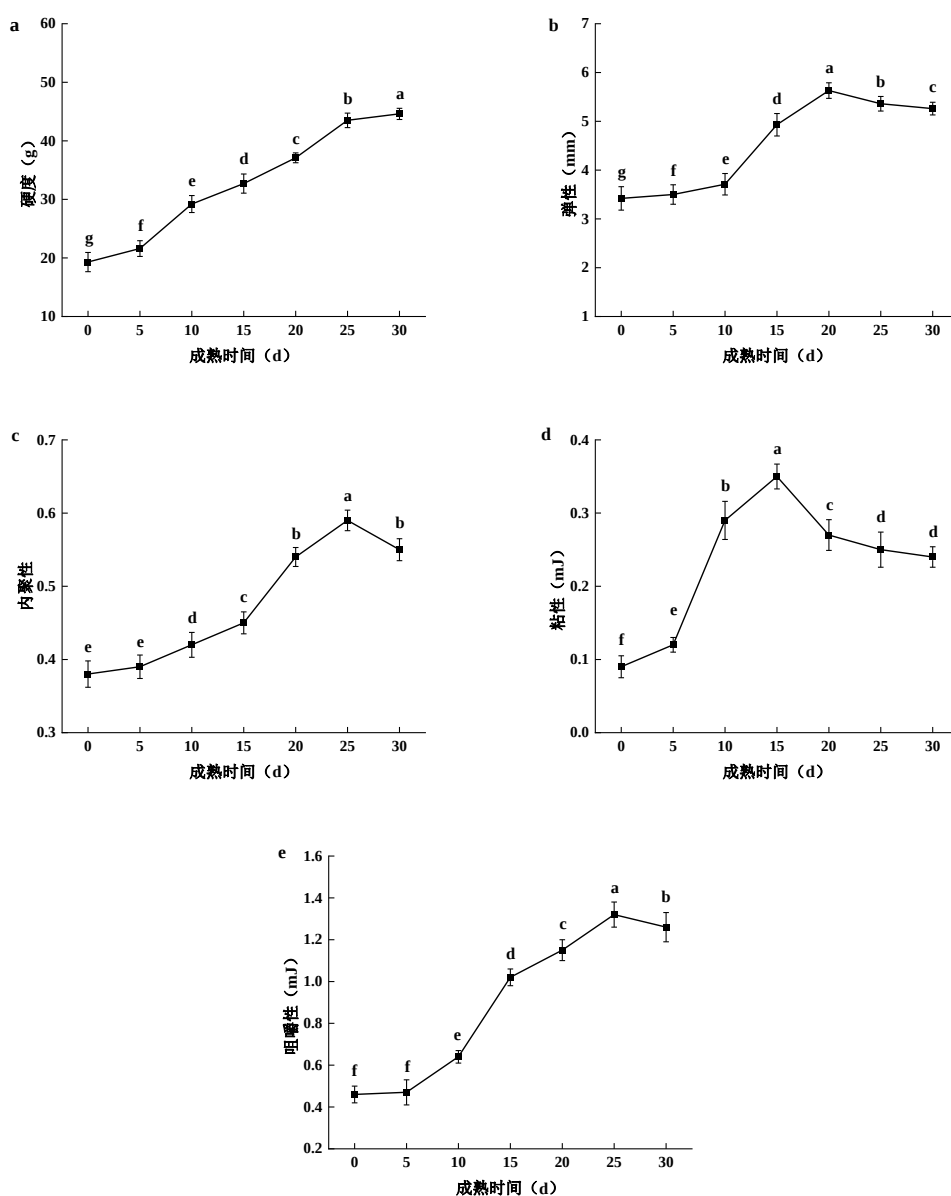


图 5-5 奶酪成熟期间脂肪含量变化

Fig. 5-5 Changes of fat contents during cheese ripening

5.4.6 质构的变化

共培养发酵剂发酵白霉奶酪成熟过程中,硬度和咀嚼性都逐步上升,而内聚性和弹性变化较为迟缓。工程菌奶酪在成熟期间的质构变化如图 5-6 所示,奶酪的硬度由初始的 19.3 ± 1.64 g 增加至 44.6 ± 0.95 g; 奶酪咀嚼性也逐步上升,由初始的 0.46 ± 0.04 mJ 上升至 1.32 ± 0.06 mJ; 此外,在成熟期间奶酪的粘性明显提高,且在第 5~10 天变化比较显著,由 0.11 ± 0.01 mJ 上升至 0.29 ± 0.03 mJ (图 5-6),但在成熟后期粘性呈先上升后下降的趋势,说明其变化与发酵时间具有高度相关性。上述变化的原因可能是随着成熟时间的延长,奶酪中微生物菌群的自身生长及其物质代谢的共同效应,且 *G. candidum* 在奶酪表皮形成的“白色外壳”也影响质构的各项指标。尽管共培养发酵剂奶酪内聚性和弹性变化较小,但也整体呈现上升趋势。其中奶酪内聚性和弹性都在成熟中期发生较为明显的变化,说明在成熟中期共培养发酵剂奶酪的内部结构变化较为显著。



a-硬度；b-弹性；c-内聚性；d-粘性；e-咀嚼性

图 5-6 30 天成熟期内奶酪质地剖面分析结果

Fig. 5-6 The results of TPA of cheese during 30 days of ripening

注：a：共培养发酵剂发酵白霉奶酪的硬度；b：共培养发酵剂发酵白霉奶酪的弹性；c：共培养发酵剂发酵白霉奶酪的内聚性；

d：共培养发酵剂发酵白霉奶酪的粘性；e：共培养发酵剂发酵白霉奶酪的咀嚼性

5.4.7 滋味的变化

共培养发酵剂奶酪的微生物群落随着发酵时间的延长而交替更迭，微生物自身生长和代谢产物影响着奶酪滋味的变化。奶酪的电子舌分析结果如图 5-7 所示，随着成熟时间的延长，奶酪的咸味逐渐升高，可能是成熟初期奶酪表面的盐分由于水分含量的流失而浓度变高。而奶酪的甜味和酸味逐渐降低，苦味、涩味和丰富度并无明显变化，奶酪的鲜味随着成熟时间的延长呈现先上升后下降的趋势，

可能是由于成熟初期共培养菌株的生长及其代谢产物对奶酪的贡献。总体而言，共培养发酵剂发酵白霉奶酪的咸味、甜味、苦味、涩味、鲜味的变化并不显著，而酸味的显著变化可能是由于共培养发酵剂的添加对柠檬酸和乳酸的同化作用。并且，由图 5-7 可以得知，奶酪在成熟第 15 d 时，雷达图的面积和周长最大，说明此阶段共培养发酵剂发酵白霉奶酪的风味质量最佳。

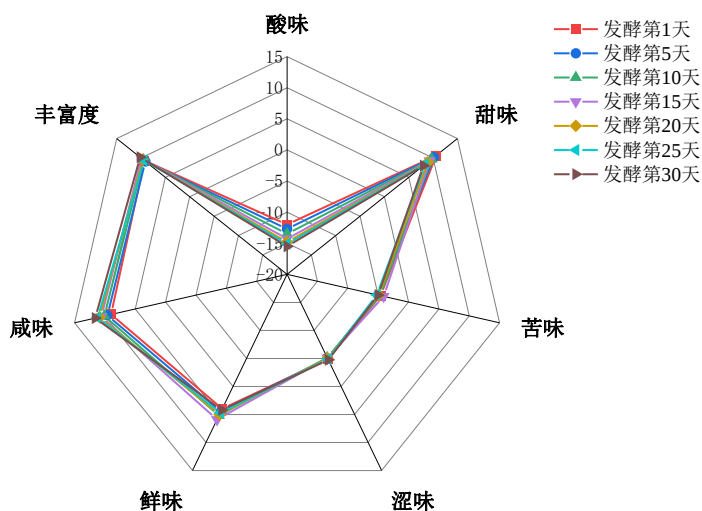


图 5-7 奶酪成熟期间风味雷达图

Fig. 5-7 Flavor radar charts during cheese ripening

5.4.8 脂肪酸含量的变化

G. candidum 单菌发酵白霉奶酪中微生物随成熟时间的延长而不断变化，微生物的代谢活动与脂质代谢息息相关，进而影响奶酪中 UFAs 含量。在成熟过程中，单菌白霉奶酪中脂肪酸组成无明显变化，但 UFAs 含量缓慢增加。在成熟期，单菌白霉奶酪的 SFAs 为 $59.45 \pm 1.97\%$ ，UFAs 含量为 $38.54 \pm 1.53\%$ 。单菌白霉奶酪 UFAs 含量在成熟前期变化不显著，在成熟后期 UFAs 的含量有所上升。在 15~30 d，LA 含量增多约成熟初期的 2~3 倍，ALA 含量增多约成熟初期的 2~4 倍，此期间 UFAs 与 SFAs 的比例接近于 0.65:1。

共培养发酵剂发酵白霉奶酪成熟期间 UFAs 含量明显提升（图 5-11），其中 LA 含量在成熟中后期增多，LA 含量和 UFAs 含量在成熟第 30 d 天分别达到 7.58 ± 0.45 g/100 g 和 15.4 ± 1.49 g/100 g。此外，随着成熟时间的延长，奶酪中 LA 含量显著增加，而 OA 含量水平先上升后下降，推测共培养菌株前期合成大量 OA，随着成熟时间的延长，共培养菌株胞内的 UFAs 出现外泌。且 *G. candidum* 出现生长优势，利用菌株外泌的 OA 作为底物来合成 LA。与 *G. candidum* 奶酪相比，共培养发酵剂白霉奶酪的 SFAs 水平降低了 10.98%，而 LA 和 UFAs 水平分别提高了 13.73%和 11.33%。此外，共培养发酵剂白霉奶酪中的 UFAs 百分比

(47.29%) 高于传统的 *G. candidum* 奶酪，这表明共培养菌株能有效提高奶酪中 UFAs 的含量。

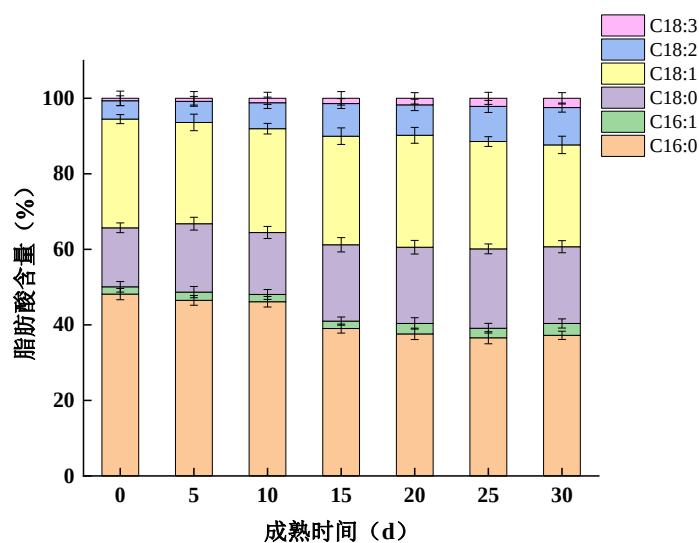


图 5-8 白地霉单菌发酵白霉奶酪成熟期间脂肪酸组成

Fig. 5-8 Fatty acid profile *G. candidum*-ripened cheese of during ripening

注：图中所示，饱和脂肪酸（C16:0，C18:0）；不饱和脂肪酸（C16:1，C18:1，C18:2，C18:3）；下同。

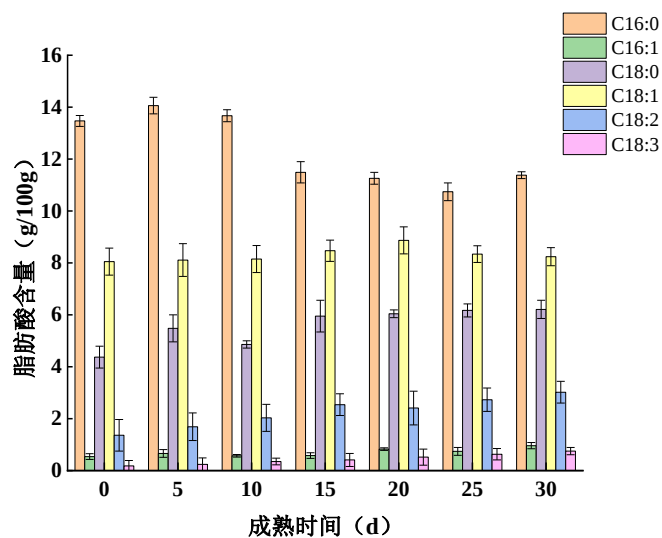


图 5-9 白地霉单菌发酵白霉奶酪成熟期间 UFAs 组成

Fig. 5-9 Fatty acids composition of *G. candidum*-ripened cheese of during ripening

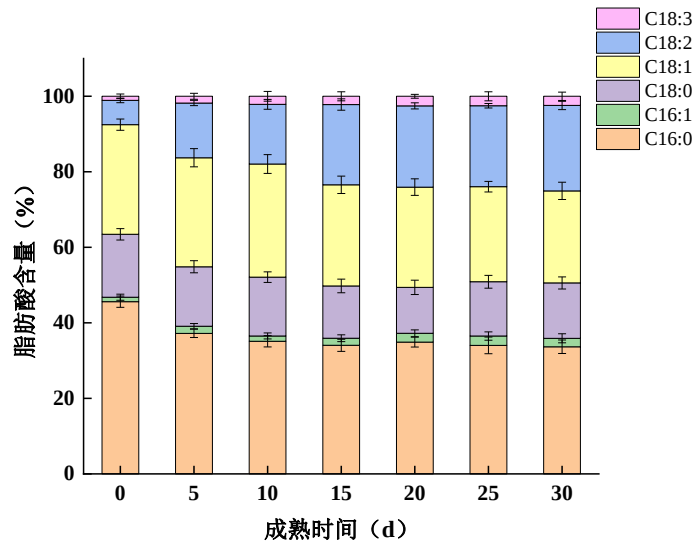


图 5-10 共培养发酵剂发酵白霉奶酪成熟期间脂肪酸组成

Fig. 5-10 Fatty acids composition of co-culture bacteria-ripened cheese of during ripening

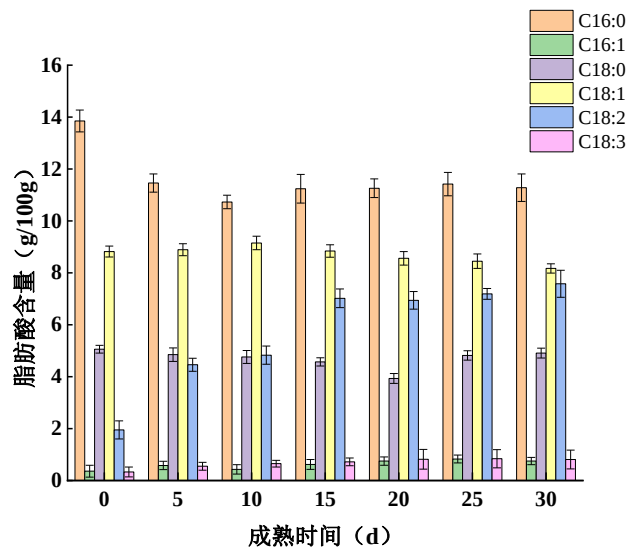


图 5-11 共培养发酵剂发酵白霉奶酪成熟期间脂肪酸组成及含量

Fig. 5-11 Fatty acids composition and contents of co-culture bacteria-ripened cheese of during ripening

5.5 本章小结

在本研究中应用共培养发酵剂作为优势真菌发酵白霉奶酪，评价成熟期间内白霉奶酪的品质特性与 UFAs 的组成与含量，明确了共培养发酵剂发酵白霉奶酪的品质与风味，提高其 UFAs 的含量，主要结论如下：

（1）共培养发酵剂发酵白霉奶酪在成熟期间具有较好的感官评价；且随着成熟时间的延长，白霉奶酪的水分含量、pH 值、蛋白质含量和脂肪含量逐渐降

低。

(2) 成熟过程中共培养发酵剂发酵白霉奶酪的硬度和咀嚼性逐步提升，其中白霉奶酪的粘性波动较为明显，而奶酪的弹性和内聚性的变化较弱。

(3) 随着成熟时间的延长，共培养发酵剂发酵白霉奶酪的咸味逐渐增加，其中苦味、涩味和丰富度变化较弱，而奶酪的甜味和酸味逐渐变弱，鲜味则出现先上升后下降的趋势。

(4) 在共培养发酵剂发酵白霉奶酪成熟过程中，UFAs 的含量显著提升，成熟第 15 天，OA 含量达到 8.84 ± 0.3 g/100 g，LA 含量达到 7.02 ± 0.4 g/100 g，UFAs 占总脂肪酸的 47.29%。

第六章 主要结论与展望

6.1 结论

S. cerevisiae-*G. candidum* 共培养使脂肪酸合成途径分工到两种菌株中, 利用代谢分工消除由于脱饱和酶活性不同而带来的限制, 提高 *G. candidum* 合成 UFAs 能力。以 *S. cerevisiae* 为研究对象, 分析高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 生长、脂质积累合成、转化、细胞外脂肪酸分泌和组成, 并通过验证脂肪酸合成、转化和分泌在这个过程中相关基因的表达, 探究高糖胁迫对 *S. cerevisiae* UFAs 合成的影响以及脂肪酸胞外分泌的作用机制。通过高糖胁迫增强 *S. cerevisiae* 脂肪酸合成和分泌能力, 应用于 *S. cerevisiae*-*G. candidum* 共培养, 并应用于白霉奶酪发酵, 促进白霉奶酪中 UFAs 的转化, 平衡白霉奶酪 SFAs 与 UFAs 比例。主要结论如下:

(1) 通过试验证明 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 共培养未出现抑制作用, 且 *S. cerevisiae* 与 *G. candidum* 菌种比例为 2: 1 时, 共培养菌株合成 UFAs 效果较好。通过单因素试验及响应面法优化, 检测共培养菌株生长情况及生产 UFAs 的能力, 确定了共培养发酵的条件参数, 从而实现提高共培养菌株中 UFAs 产量的目的。

(2) 探究高糖胁迫对 *S. cerevisiae* UFAs 合成的影响以及胞外分泌的作用机制。高糖胁迫下检测酵母细胞中脂肪酸含量, 验证脂肪酸合成、转化和转运过程中相关基因的转录水平, 结果发现高糖胁迫提高了酵母细胞中 UFAs 的含量, 且酵母中 *ACC1* 及关键转录因子 *MGA2* 的转录水平分别提高了 1.42 倍和 1.66 倍; 降低了酰基辅酶 A 合成酶 *FAA1*、*FAA2* 和 *FAA4* 的转录水平, 同时降低了与 β -氧化相关的 *POX1*、*FAA2* 和 *PXA2* 的相对转录水平; 高糖胁迫时胞外脂肪酸总量提高了 2.22 倍, 脂肪酸转运蛋白 *PRY1* 的转录水平提高了约 1.29 倍, 促进了 *S. cerevisiae* 酰基 CoA 硫酯酶 *TES1* 的转录水平, 提高了约 2.15 倍, 从而促进酰基 CoA 水解获得 FFA, 为酵母胞内脂肪酸以 FFA 形式分泌到胞外提供物质基础。高糖胁迫通过提高 *S. cerevisiae* 脂肪酸合成和分泌相关基因转录水平并降低脂肪酸转化相关基因转录水平来实现脂肪酸含量增加并分泌到胞外。

(3) 探索高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 细胞膜的影响。*S. cerevisiae* 细胞膜麦角固醇和神经酰胺含量降低。细胞膜中麦角固醇和神经酰胺含量的降低能提高膜的渗透能力和脂肪酸的分泌, 从而提高培养基中胞外脂肪酸的含量。并且细胞质膜的流动性和通透性出现不同程度的升高。高糖胁迫通过改变细胞质膜稳态, 促进胞外脂肪酸分泌。

(4) 共培养菌株在高糖条件下培养, 作为优势真菌发酵白霉奶酪, 并评估共培养菌株奶酪中脂肪酸组成及其品质特性, 进而明确奶酪成熟期间感官接受程

度、pH 值、水分含量、蛋白质含量、脂肪含量、质构特性、滋味指标以及脂肪酸组成和含量变化，最终得到品质优良且高含 UFAs 的奶酪，此时奶酪中 UFAs 含量为 15.4 ± 1.49 g/100 g，LA 含量为 7.58 ± 0.43 g/100 g，UFAs 与 SFAs 的比例约为 9.5:10。

6.2 展望

本文利用 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 共培养提高 UFAs 合成。通过高糖胁迫 *S. cerevisiae* 调控脂肪酸合成、转化与分泌相关基因的转录水平，提高合成 UFAs 能力，同时考察高糖胁迫对细胞膜中的神经酰胺和麦角固醇含量变化情况，研究高糖胁迫对细胞膜流动性和通透性的影响，最后应用共培养菌株制作白霉奶酪，从而提高奶酪中 UFAs 的含量，优化白霉奶酪中优质脂肪酸的比例。建议今后的研究重点如下：

高糖胁迫对脂肪酸生物合成的作用机制研究中，有大量基因发生了上调或下调的表达，且这些基因富集在生物学功能、细胞组分、分子功能等方面，在本课题中，只对部分基因做了研究，并未对这些基因涉及的代谢路径充分了解，因此后续我们可以继续对转录组数据进行深入挖掘，探究基因的调控作用，从而可以从代谢路径方面入手，通过阻碍竞争途径、加强产物途径或基因敲除等手段提高脂肪酸产量。

创新点

1.首次基于共培养 *S. cerevisiae* 和 *G. candidum* 提高 UFAs 的合成，促进白霉奶酪中优势真菌中 UFAs 的高效转化。

2.探索高糖胁迫对 *S. cerevisiae* 脂肪酸的合成转化分泌的调控机制，达到通过高糖胁迫提高共培养菌株中 UFAs 含量的目的，提高白霉奶酪中 UFAs 含量，为奶酪中发酵剂的定向驯化及工业化生产提高了研究思路。

参考文献

1. 樊明明. 2016. 发酵工艺对猪肉脯食用品质影响研究[D]. 江南大学.
2. 方芳. 2021. 酿酒酵母菌脂肪酸胞外分泌机制研究[D]. 天津科技大学.
3. 郭红, 邱月, 魏建平, 张宇翔, 袁亚宏, 岳田利. 2020. 酿酒酵母细胞壁和细胞膜应对高渗胁迫机制研究[J]. 农业机械学报, 51(6):7.
4. 黄兵, 刘宁, 黄英, 陈劲春. 2009. 放线菌与枯草芽孢杆菌的共培养及其对活性次生代谢产物的影响[J]. 生物工程学报, 25(06):932-940.
5. 雷梦琳, 李湘奎, 白卫东, 赵文红, 刘功良, 郭波, 黄文彪. 2020. 酵母菌高糖胁迫机制的研究进展[J]. 中国酿造, 39(07):20-24.
6. 李翠丽. 2019. 高糖胁迫下产甘油假丝酵母细胞质膜抗逆应答机制的初步研究[D]. 陕西理工大学.
7. 李晓伟. 2017. 工程乙酰辅酶 A 通路构建酿酒酵母高效合成平台[D]. 武汉大学.
8. 李宇辉, 王俊钢, 刘成江, 许先猛, 李晓楠. 2022. 产脂肪酶乳酸菌对新疆传统奶酪脂肪酸及风味的影响[J]. 农业工程学报, 38(06):319-329.
9. 刘方舟, 任洪艳, 陈红芬, 邵勇, 阮文权. 2020. 不同碳源对普通小球藻和粘红酵母共培养产油脂的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 39(08):3612-3619.
10. 刘鹭. 2020. 微藻-酵母相互作用机制的多组学分析及强化单细胞油脂生产研究[D]. 华南理工大学.
11. 栾滨羽, 史海粟, 李彦博, 武俊瑞, 乌日娜, 陶冬冰, 吴琛, 岳喜庆. 2020. 霉菌奶酪中脂肪酸代谢及其对产品品质影响研究进展[J]. 食品科学, 41(9):11.
12. 孟鑫, 程涛, 李良智, 杨建明, 刘炜, 徐鑫, 咸漠. 2011. 工程大肠杆菌脂肪酸胞外分泌调控研究进展[J]. 食品科学, 32(5):5.
13. 山格依里·巴依尔. 2021. 克鲁弗酵母菌富集神经酰胺及其作用研究[D]. 新疆农业大学.
14. 史海粟. 2017. $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶底物选择性研究及其在高山被孢霉中的应用[D]. 江南大学.
15. 史海粟, 陈海琴, 顾震南, 张灏, 陈永泉, 陈卫. 2016. 高山被孢霉 $\Delta 6H$ -脱饱和酶的克隆、表达和功能鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 35(12): 37-44.
16. 史海粟, 吴琛, 陶冬冰, 洛雪, 岳婷婷, 乌日娜, 武俊瑞, 岳喜庆. 2019. 不同进口白霉奶酪中优势霉菌分离鉴定及其凝乳酶酶学特性研究[J]. 中国乳品工业, 47(07):8-13.
17. 孙红. 2023. 浓香型白酒窖泥中互营球菌与梭菌互作机制解析[D]. 江南大学.
18. 王儒红. 2023. 水平转移基因 FRE7 对 UFAs 合成的调控机制及在白霉奶酪中的应用[D]. 沈阳农业大学.
19. 吴琛. 2023. 白地霉中 $\Delta 12$ 脂肪酸脱饱和酶的异源表达及其在霉菌奶酪中的应用[D]. 沈阳农业大学.
20. 吴敏. 2017. 基于多基因调控的莱茵衣藻油脂代谢及分泌的研究[D]. 深圳大学.
21. 余友恒, 马堃, 王艳奇, 田宏友, 朱艳芳, 康颖超. 2018. 芦荟活性提取物对腐败希瓦氏菌的抑制机理研究[J]. 现代农业科技, (19):265-266+269.
22. 张荣荣, 白芳芳, 原倩倩, 于钰杰, 李坤学, 马玲. 2022. 乳清对马苏里拉奶酪成熟过程中蛋白质降解的影响[J]. 中国调味品, 47(01): 8-13+20.
23. 张玉. 2022. 发酵牛肉干发酵工艺优化及品质特性研究[D]. 吉林大学.
24. 张玥. 2023. 代谢工程改造酿酒酵母产神经酸[D]. 北京化工大学.
25. 周柳. 2023. *Candida glycerinogenes* 基因组文库的构建及应用[D]. 江南大学.
26. Adamska A., Rasinska E., Rutkowska J. 2017. Fatty acid profile of commercial Camembert-

- and Brie-type cheeses available on the Polish market[J]. *Cyta-Journak of Food*, 15(4):639-645.
27. Appukutty M., Shyam S., Choo Z.Y., Tan S.S., Chong H. Z. M., Choong A. 2023. Effects of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on the omega-3 index, and exercise performance among Malaysian football players: a randomised controlled trial[J]. *British food journal*, 125(6).
28. Ashtiani F. R., Jalili H., Rahaie M., Sedighi M., Amrane A. 2021. Effect of mixed culture of yeast and microalgae on acetyl-CoA carboxylase and Glycerol-3-phosphate acyltransferase expression[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 131(4):364-372.
29. Bellou S., Triantaphyllidou I. E., Aggeli D., Elazzazy A. M., Baeshen M. N., Aggelis G. 2016. Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 37:24-35.
30. Bintsis Thomas. 2021. Yeasts in different types of cheese. *AIMS microbiology*, 7(4):447-470.
31. Cai R., Hu M. M., Zhang Y. J., Niu C., Yue T. L., Yuan Y. H., Wang Z. L. 2019. Antifungal activity and mechanism of citral, limonene and eugenol against *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 106:50-56.
32. Calder P. C., Miles E. A., Baker E. J., Yaqoob P. 2016. Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans[J]. *Progress in Lipid Research: An International Journal*, 64:30-56.
33. Carlson M. 1999. Glucose repression in yeast[J]. *Current opinion in microbiology*, 2(2): 202–207.
34. Chandra R., Rohit M. V., Swamy Y. V., Mohan S. V. 2014. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation[J]. *Bioresource Technology*, 165:279-287.
35. Chen L. W., Zhang J. H., Lee J., Chen W. N. 2014. Enhancement of free fatty acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by control of fatty acyl-CoA metabolism[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15):6739-6750.
36. Chen X. L., Gao C., Guo L., Hu G. P., Luo Q. L., Liu J., Nielsen J., Chen J., Liu L. M. 2018. DCEO Biotechnology: Tools To Design, Construct, Evaluate, and Optimize the Metabolic Pathway for Biosynthesis of Chemicals[J]. *Chemical Reviews*, 118(1):4-72.
37. Chenah M., Amrani M., Belaloui D., Youyou S. 2022. Optimization of biolipids production from *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 cultivated on *Ampelodesmos mauritanicus* (Diss) hydrolysate[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*:1-9.
38. Choi J. W., Da Silva N. A. 2014. Improving polyketide and fatty acid synthesis by engineering of the yeast acetyl-CoA carboxylase[J]. *Journal of Biotechnology*, 187:56-59.
39. Claus S., Jezierska S., Van Bogaert I. N. A. 2019. Protein-facilitated transport of hydrophobic molecules across the yeast plasma membrane[J]. *Febs Letters*, 593(13):1508-1527.
40. Cotarlet M., Stanciuc N., Bahrim G. E. 2020. *Yarrowia lipolytica* and *Lactobacillus paracasei* Solid State Fermentation as a Valuable Biotechnological Tool for the Pork Lard and Okara's Biotransformation[J]. *Microorganisms*, 8(8).
41. Courchesne N. M. D., Parisien A., Wang B., Lan C. Q. 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches[J]. *Journal of Biotechnology*, 141(1-2):31-41.
42. Darwiche R., El Atab O., Cottier S., Schneiter R. 2018. The function of yeast CAP family proteins in lipid export, mating, and pathogen defense[J]. *Febs Letters*, 592(8):1304-1311.

43. Diwan B., Gupta P. 2020. A Deuteromycete Isolate *Geotrichum candidum* as Oleaginous Cell Factory for Medium-Chain Fatty Acid-Rich Oils[J]. *Current Microbiology*, 77(11):3738-3749.
44. Dourou M., Mizerakis P., Papanikolaou S., Aggelis G. 2017. Storage lipid and polysaccharide metabolism in *Yarrowia lipolytica* and *Umbelopsis isabellina*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(19):7213-7226.
45. Dulermo R., Gamboa-Meléndez H., Ledesma-Amaro R., Thévenieau F., Nicaud J. M. 2015. Unraveling fatty acid transport and activation mechanisms in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(9):1202-1217.
46. Espinosa-Ortiz E. J., Rene E. R., Gerlach R. 2021. Potential use of fungal-bacterial co-cultures for the removal of organic pollutants[J]. *Critical reviews in biotechnology*:1-23.
47. Fabiszewska A., Paplinska-Goryca M., Misiukiewicz-Stepien P., Woloszynowska M., Nowak D., Zieniuk B. 2022. Expression Profile of Selected Genes Involved in Storage Lipid Synthesis in a Model Oleaginous Yeast Species *Yarrowia lipolytica*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3).
48. Fang F., Dai B. Y., Zhao G., Zhao H., Sun C., Liu H., Xian M.. 2016. In depth understanding the molecular response to the enhanced secretion of fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae* due to one-step gene deletion of acyl-CoA synthetases[J]. *Process Biochemistry*, 51(9):1162-1174.
49. Fernandez-Moya R., Da Silva N. A. 2017. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for high-level synthesis of fatty acids and derived products[J]. *Fems Yeast Research*, 17(7).
50. Fordjour E., Bai Z. H., Li S. H., Li S. J., Sackey I., Yang Y. K., Liu C. L. 2023. Improved Membrane Permeability via Hypervesiculation for In Situ Recovery of Lycopene in *Escherichia coli*[J]. *Acs Synthetic Biology*, 12(9):2725-2739.
51. Goers L., Freemont P., Polizzi K. M. 2014. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 11(96):1058-1069.
52. Grygier A., Myszka K., Juzwa W., Bia W., Rudzinska M. 2020. *Galactomyces geotrichum* mold isolated from a traditional fried cottage cheese produced omega-3 fatty acids[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 319.
53. He W. 2023. DPH Probe Method for Liposome-Membrane Fluidity Determination[J]. *Methods in molecular biology*, 2622:241-244.
54. Higgins B. T., Labavitch J. M., VanderGheynst J. S. 2015. Co-culturing *Chlorella minutissima* with *Escherichia coli* can increase neutral lipid production and improve biodiesel quality[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(9):1801-1809.
55. Hofbauer H. F., Schopf F. H., Schleifer H., Knittelfelder O. L., Pieber B., Rechberger G. N., Wolinski H., Gaspar M. L., Kappe C. O., Stadlmann J. 2014. Regulation of gene expression through a transcriptional repressor that senses acyl-chain length in membrane phospholipids[J]. *Developmental cell*, 29(729-39).
56. Huang L., Zhao P., Che R.Q., Li T., Ma H.X., Xu, J.W. 2017a. Effect of fulvic acid induction on the physiology, metabolism, and lipid biosynthesis-related gene transcription of *Monoraphidium* sp FXY-10[J]. *Bioresource Technology*, 227:324-334.
57. Huang T., Wang M. H., Shi K., Chen G., Tian X. F., Wu Z. Q. 2017b. Metabolism and secretion of yellow pigment under high glucose stress with *Monascus ruber*[J]. *Amb Express*, 7.
58. Huang X. F., Wang Y. H., Shen Y., Peng K. M., Lu L. J., Liu J. 2019. Using non-ionic surfactant as an accelerator to increase extracellular lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus*

- curvatus MUCL 29819[J]. *Bioresource Technology*, 274:272-280.
59. Huang X.F., Shen Y., Luo H.J., Liu J.N., Liu J. 2018. Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid[J]. *Bioresource Technology*, 247:395-401.
60. Isikgor F. H., Becer C. R. 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers[J]. *Polymer Chemistry*, 6(25):4497-559.
61. Jaster H., Judacewski P., Ribeiro J. C. B., Zielinski A. A. F., Demiate I. M., Los P. R., Alberti A., Nogueira A. 2019. Quality assessment of the manufacture of new ripened soft cheese by *Geotrichum candidum*: physico-chemical and technological properties[J]. *Food Science and Technology*, 39(1):50-58.
62. Jia X.Q., Liu C., Song H., Ding M.Z., Du J., Ma Q., Yuan Y.J.. 2016. Design, analysis and application of synthetic microbial consortia[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, (002):001.
63. Jindra M. A., Choe K., Chowdhury R., Kong R., Ghaffari S., Sweedler J. V., Pfleger B. F. 2023. Evaluation of strategies to narrow the product chain-length distribution of microbially synthesized free fatty acids[J]. *Metabolic engineering*, 77:21-31.
64. Jones J. A., Vernacchio V. R., Sinkoe A. L., Collins S. M., Ibrahim M. H. A, Lachance D. M., Hahn J., Koffas M. A. G. 2016. Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids[J]. *Metabolic Engineering*, 35:55-63.
65. Jordá T., Puig S. 2020. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genes*, 11(7).
66. Judacewski P., Los P. R., Lima L. S., Alberti A., Zielinski A. A. F., Nogueira A. 2019. Perceptions of Brazilian consumers regarding white mould surface-ripened cheese using free word association[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 72(4): 585-590.
67. Leber C., Poison B., Fernandez-Moya R., Da Silva N. A.. 2015. Overproduction and secretion of free fatty acids through disrupted neutral lipid recycle in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 28:54-62.
68. Ledesma-Amaro, R., Dulerio R., Niehus X., Nicaud J. M. 2016. Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids[J]. *Metabolic Engineering*, 38:38-46.
69. Ledesma-Amaro R., Nicaud J. M. 2016a. Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Trends in Biotechnology*, 34(10):798-809.
70. Ledesma-Amaro R., Nicaud J. M. 2016b. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids[J]. *Progress in Lipid Research*, 61:40-50.
71. Li T. T., Jiang L. Q., Hu Y. F., Paul J. T., Zuniga C., Zengler K., Betenbaugh M. J. 2020a. Creating a synthetic lichen: Mutualistic co-culture of fungi and extracellular polysaccharide-secreting cyanobacterium *Nostoc PCC 7413*[J]. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 45.
72. Li X. W., Guo D. Y., Cheng Y. B., Zhu F. Y., Deng Z. X., Liu T. G. 2014. Overproduction of Fatty Acids in Engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(9):1841-1852.
73. Li Y., Zhang X., Yang J. J., Ma X. Y., Jia X. D., Du P., Li A. L. 2020b. Influence of the addition of *Geotrichum candidum* on the microbial, chemical, textural, and sensory features of soft soy

- cheese[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 44(11).
74. Liu J., Chai X. Y., Guo T., Wu J. Y., Yang P. P., Luo Y. C., Zhao H., Zhao W., Nkechi O., Dong J., Bai J., Ling Q. L. 2019. Disruption of the Ergosterol Biosynthetic Pathway Results in Increased Membrane Permeability, Causing Overproduction and Secretion of Extracellular Monascus Pigments in Submerged Fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(49):13673-13683.
 75. López J. M. S., Vidal L., Adiutama M. P., Van Nieuwerburgh F., Deforce D., Nicaud J. M., Van Bogaert I. N. A. 2023. How do engineered *Yarrowia lipolytica* strains secrete free fatty acids: hints from comparative transcriptomics[J]. Fems Yeast Research, 23.
 76. Luo, X., Shi H. S., Wu R. N., Wu J. R., Pi Y. Z., Zheng Y., Yue X. Q. 2019. $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene from *Geotrichum candidum* in cheese: molecular cloning and functional characterization[J]. Febs Open Bio, 9(1):18-25.
 77. Magdouli S., Brar K. S., Blais F. J. 2016. Co-culture for lipid production: Advances and challenges[J]. Biomass & Bioenergy.
 78. Marileo L., Acuña J., Rilling J., Díaz P., Langellotti A. L., Russo G. L., Barra P. J., Dantagnan P., Viscardi S. 2023. Protist-Lactic Acid Bacteria Co-Culture as a Strategy to Bioaccumulate Polyunsaturated Fatty Acids in the Protist *Aurantiochytrium* sp. T66[J]. Marine Drugs, 21(3).
 79. McCarty N. S., Ledesma-Amaro R. 2019. Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 37(2):181-197.
 80. Mohan S. V., Devi M. P. 2014. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae[J]. Bioresource Technology, 165:288-294.
 81. Monnet C., Landaud S., Bonnarme P., Swennen D. 2015. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface[J]. Fems Microbiology Letters, 362(1).
 82. Nielsen J., Keasling J. D. 2016. Engineering Cellular Metabolism[J]. Cell, 164(6):1185-1197.
 83. Ong L. D., Li X., Ong A., Gras S. L. 2022. New Insights into Cheese Microstructure[J]. Annual review of food science and technology, 13:89-115.
 84. Padmaperuma G., Kapoore R. V., Gilmour D. J., Vaidyanathan S. 2017. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing[J]. Critical Reviews in Biotechnology:1.
 85. Paredes P., Larama G., Flores L., Leyton A., Ili C. G., Asenjo J. A., Chisti Y., Shene C. 2020. Temperature Differentially Affects Gene Expression in Antarctic Thraustochytrid *Oblongichytrium* sp. RT2316-13[J]. Marine Drugs, 18(11).
 86. Park Y. K., Nicaud J. M. 2020. Metabolic Engineering for Unusual Lipid Production in *Yarrowia lipolytica*[J]. Microorganisms, 8(12).
 87. Pei R. Q., Lv G. B., Guo B. R., Li Y., Ai M. Q., He B., Wan R. L. 2022. Physiological and transcriptomic analyses revealed the change of main flavor substance of *Zygosaccharomyces rouxii* under salt treatment[J]. Frontiers in Nutrition, 9.
 88. Ploier B., Scharwey M., Koch B., Schmidt C., Schatte J., Rechberger G., Kollroser M., Hermetter A., Daum G. 2013. Screening for Hydrolytic Enzymes Reveals Ayr1p as a Novel Triacylglycerol Lipase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 288(50):36061-36072.
 89. Probst K. V., Schulte L. R., Durrett T. P., Rezac M. E., Vadlani P. V. 2016. Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 36(5):942-955.

90. Ramsden, C. E., Zamora D., Faurot K. R., Macintosh B., Horowitz M., Keyes G. S., Yuan Z. X., Miller V., Lynch C., Honvoh G. 2021. Dietary alteration of n-3 and n-6 fatty acids for headache reduction in adults with migraine: randomized controlled trial[J]. *BMJ*, 374:1-17.
91. Rice S. A., Xie C., Periasamy S., Lee K. W. K., Mukherjee M., Kjelleberg S. 2014. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm[J]. *The ISME journal emultidisciplinary journal of microbial ecology*.
92. Roell G. W., Zha J., Carr R. R., Koffas M. A., Fong S. S., Tang Y. J. J. 2019. Engineering microbial consortia by division of labor[J]. *Microbial Cell Factories*, 18(35).
93. Rosero-Chasoy G., Rodríguez-Jasso R. M., Aguilar C. N., Buitrón G., Chairez I., Ruiz H. A. 2021. Microbial co-culturing strategies for the production high value compounds, a reliable framework towards sustainable biorefinery implementation-an overview[J]. *Bioresource technology*, 321:124458.
94. Runguphan W., Keasling J. D. 2014. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals[J]. *Metabolic Engineering*, 21:103-113.
95. Sacristán N., González L., Castro J. M., Fresno J. M., Tornadijo M. E. 2012. Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese[J]. *Food Microbiology*, 30(1):260-266.
96. Santiago-López L., Aguilar-Toalá J. E., Hernández-Mendoza A., Vallejo-Cordoba B., Liceaga A. M., González-Córdova A. F. 2018. Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption[J]. *Journal of Dairy Science*, 101(5):3742-3757.
97. Shi S. B., Chen Y., Siewers V., Nielsen J. 2014. Improving Production of Malonyl Coenzyme A-Derived Metabolites by Abolishing Snf1-Dependent Regulation of Acc1[J]. *Mbio*, 5(3):e01130-14.
98. Shin G. H., Veen M., Stahl U., Lang C. 2012. Overexpression of genes of the fatty acid biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 29(9):371-83.
99. Stumpe M., Kandzia R., Gobel C., Rosahl S., Feussner I. 2001. A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells[J]. *FEBS letters*, 507(3):371-6.
100. Suzuki-Iwashima A., Matsuura H., Iwasawa A., Shiota M. 2020. Metabolomics analyses of the combined effects of lactic acid bacteria and *Penicillium camemberti* on the generation of volatile compounds in model mold-surface-ripened cheeses[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(3):333-347.
101. Takaku H., Matsuzawa T., Yaoi K., Yamazaki H. 2020. Lipid metabolism of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(8).
102. Tomita S., Nomura M., Arakawa Y., Miura T., Hayashida S., Hagi T., Kobayashi M., Suzuki S., Yamashita H., Sato K., Kusumoto K. I. 2022. Volatile and soluble metabolite profiles in surface-ripened cheeses with *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*[J]. *Food Research International*, 158.
103. Tsoi R., Dai Z. J., You L. C. 2019. Emerging strategies for engineering microbial communities[J]. *Biotechnology Advances*.
104. Tsoi R., Wu F. L., Zhang C., Bewick S., Karig D., You L. C. 2018. Metabolic division of labor

- in microbial systems[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115(10):2526.
105. Ventura A. E., Varela A. R. P., Dingjan T., Santos T. C. B., Fedorov A., Futerman A. H., Prieto M., Silva L. C. 2020. Lipid domain formation and membrane shaping by C24-ceramide[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1862(10).
 106. Voelker T. A., Jones A., Cranmer A. M., Davies H. M., Knutzon D. S. 1997. Broad-range and binary-range acyl-acyl-carrier protein thioesterases suggest an alternative mechanism for medium-chain production in seeds[J]. Plant physiology, 114(2):669-77.
 107. Vong W. C., Liu S. Q. 2017. Changes in volatile profile of soybean residue (okara) upon solid-state fermentation by yeasts[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 97(1):135-143.
 108. Wang C., Li Z. J., Wu W. 2023. Understanding fatty acid composition and lipid profile of rapeseed oil in response to nitrogen management strategies[J]. Food Research International, 165.
 109. Wang D. K., Zhang M., Huang J., Zhou R. Q., Jin Y., Wu C. D. 2020. Zygosaccharomyces rouxii Combats Salt Stress by Maintaining Cell Membrane Structure and Functionality[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 30(1):62-70.
 110. Wang H. X., Tang J. Q., Lv J. Y., Wang X. Z., Sun H. M. 2024a. Physiological and transcriptomic insights into sugar stress resistance in osmophilic yeast Zygosaccharomyces rouxii[J]. Food Microbiology, 117:104395.
 111. Wang Y. C., Chen H., Yu O. 2014. A plant malonyl-CoA synthetase enhances lipid content and polyketide yield in yeast cells[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 98(12):5435-5447.
 112. Wang Z. Y., Su C. L., Zhang Y. S., Shangguan S. F., Wang R. M., Su J. 2024b. Key enzymes involved in the utilization of fatty acids by Saccharomyces cerevisiae: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 14.
 113. West S. A., Cooper G. A. 2016. Division of labour in microorganisms: an evolutionary perspective[J]. Nature Reviews Microbiology, 14(11):716-723.
 114. Woods A., Munday M. R., Scott J., Yang X., Carlson M., Carling D. 1994. Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo[J]. The Journal of biological chemistry, 269(30):19509-15.
 115. Wu C., Jiang N., Wang R. H., Jiang S. S., Yuan Z. J., Luo X., Wu J. R., Shi H. S., Wu R. A. 2023. Linoleic acid enrichment of cheese by okara flour and Geotrichum candidum overexpressing $\Delta 12$ fatty acid desaturase[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 103(6):2960-2969.
 116. Wu G., Yan Q., Jones J. A., Tang Y. J. J., Fong S. S., Koffas M. A. G. 2016. Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications[J]. Trends in Biotechnology, 34(8):652-664.
 117. Yeesang C., Cheirsilp B. 2011. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand[J]. Bioresource Technology, 102(3):3034-3040.
 118. Yin W. B., Keller N. P. 2011. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism[J]. The Journal of Microbiology, 49(3):329-339.
 119. Zeng H., Wang Y. D., Han H. Y., Cao Y. P., Wang B. 2022. Changes in Key Aroma Compounds and Esterase Activity of Monascus-Fermented Cheese across a 30-Day Ripening Period[J]. Foods, 11(24).

120. Zhang H. R., Pereira B., Li Z. J., Stephanopoulos G. 2015. Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27):8266-71.
121. Zhou K., Zou R. Y., Stephanopoulos G., Too H. P. 2012. Metabolite Profiling Identified Methylerythritol Cyclodiphosphate Efflux as a Limiting Step in Microbial Isoprenoid Production[J]. *Plos One*, 7(11):e47513.
122. Zhou Y. J., Buijs N. A., Zhu Z. W., Gómez D. O., Boonsombuti A., Siewers V., Nielsen J. 2016. Harnessing Yeast Peroxisomes for Biosynthesis of Fatty-Acid-Derived Biofuels and Chemicals with Relieved Side-Pathway Competition[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 138(47):15368-15377.
123. Zhu Z. W., Hu Y. T., Teixeira P. G., Pereira R., Chen Y., Siewers V., Nielsen J. 2020. Multidimensional engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient synthesis of medium-chain fatty acids[J]. *Nature Catalysis*, 3(1):64-74.