

响应面法优化解脂亚罗酵母产菜油甾醇培养基组成

谭思远^{1,2}, 陈月星^{1,2}, 雷秋燕¹, 余佳怡¹, 孟永宏³

(1. 商洛学院 生物医药与食品工程学院, 陕西 商洛 726000; 2. 陕西秦岭特色生物资源产业技术研究院, 陕西 商洛 726000; 3. 陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 西安 710119)

摘要:为提高解脂亚罗酵母 PMEDD 菌株菜油甾醇的产量, 对此菌株发酵培养基组成进行了优化。采用单因素实验探究碳源种类、氮源种类、碳源质量浓度、氮源质量浓度、 KH_2PO_4 质量浓度对菜油甾醇产量的影响。在此基础上, 采用响应面实验对发酵培养基组成进行了优化。结果表明: 培养基组成为葡萄糖 3.17 g/100 mL, 蛋白胨 1.44 g/100 mL, KH_2PO_4 0.65 g/100 mL, Uracil 0.1 g/100 mL, YNB 0.42 g/100 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/100 mL 时, 菜油甾醇的产量达到最大, 为 16.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 优化后菜油甾醇的产量为优化前的 2.10 倍。采用优化后的培养基, 可有效提高解脂亚罗酵母 PMEDD 菌株菜油甾醇的产量。

关键词:解脂亚罗酵母; 菜油甾醇; 响应面法; 培养基优化

中图分类号: TQ645.98; TQ920.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)02-0085-06

Optimization of medium composition for campesterol production in *Yarrowia lipolytica* by response surface methodology

TAN Siyuan^{1,2}, CHEN Yuexing^{1,2}, LEI Qiuyan¹, SHE Jiayi¹, MENG Yonghong³

(1. School of Biomedicine and Food Engineering, Shangluo University, Shangluo 726000, Shaanxi, China; 2. Shaanxi Qinling Industrial Technology Research Institute of Special Biological Resources, Shangluo 726000, Shaanxi, China; 3. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract: In order to increase the yield of campesterol in *Yarrowia lipolytica* PMEDD, the fermentation medium composition was optimized. The influences of carbon source type, nitrogen source type, carbon source mass concentration, nitrogen source mass concentration, and KH_2PO_4 mass concentration on the yield of campesterol were explored by single factor experiment. Then the fermentation medium composition was optimized by response surface methodology. The results showed that the optimal medium composition was obtained as follows: glucose 3.17 g/100 mL, peptone 1.44 g/100 mL, KH_2PO_4 0.65 g/100 mL, Uracil 0.1 g/100 mL, YNB 0.42 g/100 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/100 mL. Under these conditions, the maximal campesterol production of 16.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was obtained, which was 2.10 times of the initial fermentation medium. The optimized medium can effectively increase the yield of campesterol in *Yarrowia lipolytica* PMEDD.

Key words: *Yarrowia lipolytica*; campesterol; response surface methodology; medium optimization

植物甾醇是一类广泛存在于植物体中且具有多

种生物活性的化合物, 具有降低人体胆固醇、抗氧化、抗炎、免疫调节、促进生长等方面的作用^[1-2], 植物甾醇及其衍生物已被广泛应用于食品、药品、化妆品和饲料等领域。目前, 已报道的天然植物甾醇有 250 多种^[3], 其中 β -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、谷甾醇等是较为常见的游离甾醇。菜油甾醇是孕酮、雄烯二酮、氢化可的松等甾体激素类药

收稿日期: 2021-11-02; 修回日期: 2022-08-19

基金项目: 中央引导地方科技发展专项(2019ZY-FP-02); 商洛学院校级项目(19SKY014)

作者简介: 谭思远(1993), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为食品生物技术(E-mail)469789413@qq.com。

物合成的起始物质,也是重要的植物甾醇之一^[4]。

目前,植物甾醇的来源主要有植物提取法和生物合成法。植物提取法是指从植物油及植物油精炼过程中产生的脱胶废水、脱臭馏出物等废液和副产物中提取植物甾醇,得到的是植物甾醇混合物^[5]。随着食品、医药领域的发展,对植物甾醇单体的纯度提出了进一步要求,目前从植物甾醇混合物中分离单体的方法有分子蒸馏法、液相色谱法、溶剂结晶法等^[6-7]。相较于植物提取法,生物合成法有明显的优势,微生物生长周期短,生长繁殖不易受到产地、气候、季节等环境因素的影响,可获得单体产物且纯度较高。目前已有通过生物合成法得到孕烯醇酮、7-脱氢胆固醇、氢化可的松、菜油甾醇等化合物的报道^[8-12]。

在利用生物合成法合成目标产物的过程中,目标产物的产量与培养基组成紧密相关。在培养基组成中,碳源作为培养基必不可少的基本成分,可以为微生物的生长及代谢提供必要的能量^[13]。氮是微生物生长需求量非常大的元素,氮源又可以分为速效氮源(无机氮源)和迟效氮源(有机氮源)两类,速效氮源容易被菌体生长所利用,迟效氮源可被菌体缓慢利用,有利于代谢产物的合成^[14]。选择适宜的碳源、氮源及其浓度有助于促进某些酶的合成,增强微生物的生物活性,有利于目标产物的积累。磷是核酸、蛋白质和辅酶的主要成分,是许多辅酶和高能磷酸键的组成元素,又是氧化磷酸化反应的必需元素,适当的磷酸盐既能促进菌体的基础代谢,又能影响许多代谢产物的生物合成,在培养基中亦可作为缓冲盐使培养基中 pH 不会随菌体产酸而引起剧烈变化^[15]。因此,对培养基进行优化可最大程度地满足微生物生长的最佳条件,不仅能提高微生物的生物量及代谢产物的积累^[16],也是降低生产成本的重要途径^[17]。

解脂亚罗酵母(*Yarrowia lipolytica*)作为一种研究最为广泛的产油酵母,在胞内能从头合成脂肪酸并积累大量的脂类^[18],而脂质的积累能为菜油甾醇等化合物提供存储空间,进而提高菜油甾醇的产量^[19]。本研究选用的解脂亚罗酵母 PMEDD 菌株经敲除多功能酶基因(*MFE*),能阻止脂肪酸的降解,有利于胞内脂质积累;敲除 C-22 去饱和酶(*ERG5*)和表达多拷贝的 7-脱氢胆固醇还原酶(*DHCR7*),可生物合成菜油甾醇^[20]。培养基组成及配比对目标产物产量有重要影响,目前优化可生物合成菜油甾醇菌株培养基条件的研究较少。本文在可生物合成菜油甾醇的 PMEDD 菌株基础上,对

其发酵培养基中碳源种类、氮源种类及其质量浓度以及磷酸盐质量浓度进行单因素实验和响应面实验优化,提高菜油甾醇的产量,以期为生物合成菜油甾醇的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

菌株 *Y. lipolytica* - *MFE*⁻ - *ERG5*⁻ - *DHCR7*⁺ - *DHCR7*⁺ (PMEDD) (*MatA*, *leucine*⁻, *uracil*⁻, *xpr2* - 322, *axp1* - 2, *MFE*⁻, *ERG5*⁻, *DHCR7*⁺, *DHCR7*⁺), 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

正己烷(色谱纯)、蛋白胨、葡萄糖,天津市大茂化学试剂厂;麦芽糖,国药集团化学试剂有限公司;蔗糖、可溶性淀粉、乳糖、酵母浸粉、尿素、硫酸铵[(NH₄)₂SO₄]、氢氧化钾、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)等,天津市科密欧化学试剂有限公司;玉米浆干粉,北京鸿润宝顺科技有限公司;植物甾醇混合标准品(纯度 97.1%,其中菜籽甾醇 4.48%,菜油甾醇 27.07%,豆甾醇 22.12%,β-谷甾醇 40.57%,谷甾醇 1.89%,其他甾醇 0.97%),西安海斯夫生物有限公司。

1.1.3 主要仪器

GCMS-QP 2010 Ultra 气相色谱/质谱联用仪,岛津(中国)有限公司;PYX-DHS-500BS-II 型隔水式电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械有限公司;ZWY-2102C 型振荡培养箱,盐城海联机械设备有限公司;TDL-40B 型低速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;MS-X 型旋涡混合器,美国 Scilogex 公司;UV756 型紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司。

1.1.4 培养基

SD-Leu⁻液/固体培养基:液体培养基组成为葡萄糖 2 g/100 mL, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g/100 mL, YNB (Yeast nitrogen base, without amino acids & ammonium sulfate) 0.17 g/100 mL, SD-Leu⁻ (Drop-out mix synthetic minus leucil w/o yeast nitrogen base) 0.2 g/100 mL;固体培养基组成为液体培养基中添加 2.5 g/100 mL 琼脂粉;121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

基础发酵培养基:葡萄糖 2 g/100 mL, (NH₄)₂SO₄ 0.75 g/100 mL, KH₂PO₄ 0.15 g/100 mL, YNB 0.42 g/100 mL, 尿嘧啶(Uracil) 0.1 g/100 mL, MgSO₄ · 7H₂O 0.15 g/100 mL。配制方法为称量葡

葡萄糖 2 g, KH_2PO_4 0.15 g, Uracil 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, 加入 50 mL 蒸馏水, 称量 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75 g, YNB 0.42 g, 加入 50 mL 蒸馏水, 分别于 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min, 接种时将两者混合后使用, 自然 pH。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化

挑取一环 PMEDD 菌种, 在 SD - Leu⁻ 固体培养基表面划线, 并于 28℃ 恒温培养箱中培养 2 d 至长出单菌落。

1.2.2 菌株发酵及生长曲线的绘制

挑取 PMEDD 单菌落接种于 SD - Leu⁻ 液体培养基中, 置于 28℃、180 r/min 摇床扩大培养 24 h, 将扩大培养后的种子液按照 0.4% 的接种量, 接入 100 mL 基础发酵培养基中, 于 28℃、180 r/min 摇床中培养。间隔取样测定 OD_{600} (当 OD_{600} 超过 0.8 时, 选择合适的稀释倍数进行稀释), 以培养时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标, 绘制 PMEDD 菌株生长曲线。

1.2.3 菜油甾醇的测定

1.2.3.1 菜油甾醇的提取

平行取 1 mL 发酵液分别于 3 个厌氧管 (16 mm × 125 mm) 中, 分别加入 3 mol/L 的氢氧化钾甲醇溶液 7 mL, 于 90℃ 水浴皂化, 每 20 min 取出厌氧管振荡数秒混匀, 100 min 后取出试管冷却, 分别加入 2 mL 蒸馏水、2 mL 正己烷, 在旋涡振荡器上振荡 5 min, 待反应液分层后, 吸取上清, 经 0.45 μm 有机滤膜过滤后, 置于进样瓶中待 GC - MS 分析。

1.2.3.2 GC - MS 分析条件

GC 条件: Rxi - 5sil MS 色谱柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 进样口温度 300℃; 分流比 30:1; 柱流速 1.5 mL/min; 初始柱温为 200℃, 保持 0.5 min, 然后以 10℃/min 升温至 300℃, 保持 20.5 min; 进样量 1 μL。

MS 条件: EI 离子源, 离子源温度 280℃; 电离能 70 eV; 接口温度 250℃; 溶剂延迟时间 2.5 min; 数据采集方式为 SIM 模式, 选择 m/z 43、145、213、255、315、400 作为辅助定性离子, m/z 367 作为定量离子。

1.2.4 数据处理

数据处理及作图分别采用 Design - Expert 8.0.6 和 OriginPro 2019b 软件完成。

2 结果与分析

2.1 PMEDD 菌株生长曲线

根据 1.2.2 方法, 对 PMEDD 菌株进行培养发酵, 绘制的生长曲线如图 1 所示。

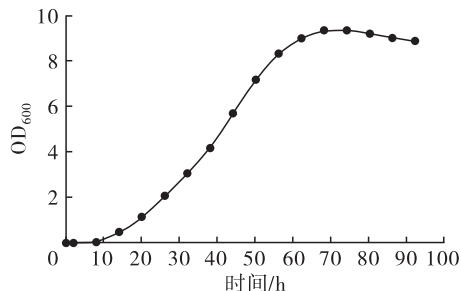


图1 PMEDD 菌株生长曲线

由图 1 可知: 0 ~ 10 h 为 PMEDD 菌株生长延滞期, 培养液的 OD_{600} 增长缓慢; 10 ~ 60 h 为其对数生长期, 培养液的 OD_{600} 增长迅速; 60 ~ 80 h 进入平稳期; 80 h 以后, 由于培养时间的延长, 培养基内的营养成分逐渐减少, 菌体可能出现死亡, OD_{600} 呈现逐渐下降趋势, PMEDD 菌株生长进入衰退期。为使菌体生长量和活性达到最大, 选择发酵 72 h 作为发酵液收集点。

2.2 培养基组成优化单因素实验

2.2.1 碳源种类对菜油甾醇产量的影响

参考柳相鹤^[21]、姚博^[22]等的研究, 分别选择麦芽糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉代替基础发酵培养基中的葡萄糖作为碳源, 并与以等量葡萄糖为碳源的发酵培养基做对比, 按 1.2.2 方法培养发酵 72 h, 测定菜油甾醇产量, 结果见图 2。

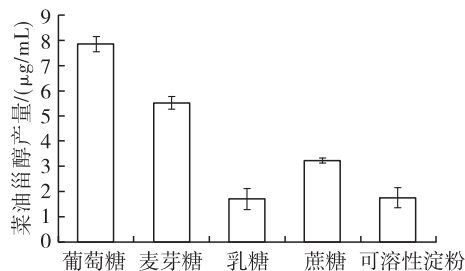


图2 碳源种类对菜油甾醇产量的影响

由图 2 可知: 以葡萄糖为碳源时, 菜油甾醇产量最高, 为 7.86 μg/mL; 以麦芽糖为碳源时, 菜油甾醇产量为 5.52 μg/mL; 以乳糖、可溶性淀粉为碳源时, 菜油甾醇的产量最低。这可能是由于葡萄糖为单糖, 便于解脂亚罗酵母的利用^[21]。因此, 选择葡萄糖作为最适碳源。

2.2.2 葡萄糖质量浓度对菜油甾醇产量的影响

分别将葡萄糖以 1、2、3、4、5 g/100 mL 的质量浓度添加至基础发酵培养基中, 按 1.2.2 方法培养发酵 72 h, 测定菜油甾醇产量, 结果见图 3。

由图 3 可知, 随着葡萄糖质量浓度的增加, 菜油甾醇产量不断增加, 当葡萄糖质量浓度为 3 g/100 mL 时, 菜油甾醇产量达到 9.15 μg/mL。当葡萄糖质量

浓度继续增加时,菜油甾醇产量增加幅度变小,这可能是由于此时发酵液中菌体生长已经达到极限,能利用的葡萄糖数量已接近最大^[22]。因此,综合考虑选择葡萄糖质量浓度为 3 g/100 mL 用于后续研究。

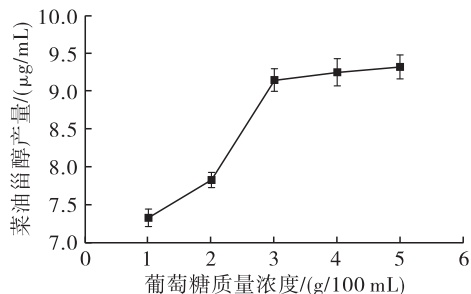


图3 葡萄糖质量浓度对菜油甾醇产量的影响

2.2.3 氮源种类对菜油甾醇产量的影响

参考姚博等^[22]的研究,分别选择无机氮源尿素,有机氮源蛋白胨、酵母浸粉、玉米浆干粉,代替基础发酵培养基中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 并与以等量 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为主要氮源的发酵培养基做对比,葡萄糖按 3 g/100 mL 添加,按 1.2.2 方法培养发酵 72 h,测定菜油甾醇产量,结果见图 4。

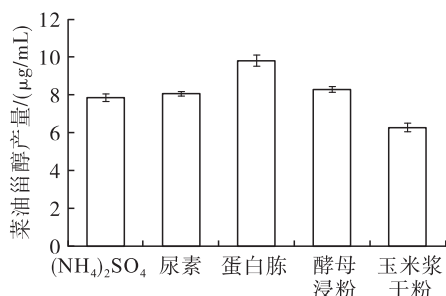


图4 氮源种类对菜油甾醇产量的影响

由图 4 可知:有机氮源和无机氮源均可被解脂亚罗酵母用来生长,其中无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和尿素的菜油甾醇产量分别为 7.89、8.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,无机氮源容易被微生物吸收利用,但其成分较单一,并且随着无机氮源的消耗会改变培养基 pH,对菌体生长产生影响^[15,17];3 种有机氮源中,以蛋白胨作为氮源时,菜油甾醇产量最高,达到 9.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$,有机氮源在发酵过程中能被菌体缓慢分解利用,有利于延长代谢产物的合成时间,在发酵中后期对维持菌体代谢具有重要作用^[23]。综上,选择蛋白胨作为最适氮源。

2.2.4 蛋白胨质量浓度对菜油甾醇产量的影响

分别将蛋白胨以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/100 mL 的质量浓度添加至基础发酵培养基中替换其中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,葡萄糖以 3 g/100 mL 添加,按 1.2.2 方法培养发酵 72 h,测定菜油甾醇产量,结果见图 5。

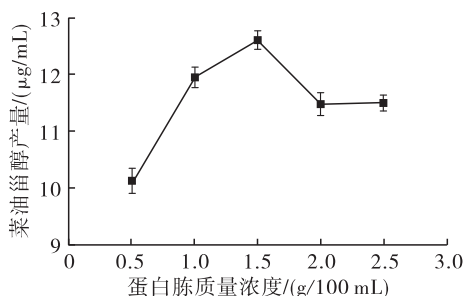


图5 蛋白胨质量浓度对菜油甾醇产量的影响

由图 5 可知,随着蛋白胨质量浓度的增加,菜油甾醇产量也逐渐增加,在蛋白胨质量浓度为 1.5 g/100 mL 时,菜油甾醇的产量达到最大,为 12.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$,之后随蛋白胨质量浓度的增加,菜油甾醇产量呈现下降趋势。因此,选择蛋白胨质量浓度为 1.5 g/100 mL 用于后续研究。

2.2.5 KH_2PO_4 质量浓度对菜油甾醇产量的影响

将 KH_2PO_4 分别以 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 g/100 mL 的质量浓度添加至基础发酵培养基中,葡萄糖按 3 g/100 mL 添加,并用 1.5 g/100 mL 的蛋白胨替换基础发酵培养基中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,按 1.2.2 方法培养发酵 72 h,测定菜油甾醇产量,结果见图 6。

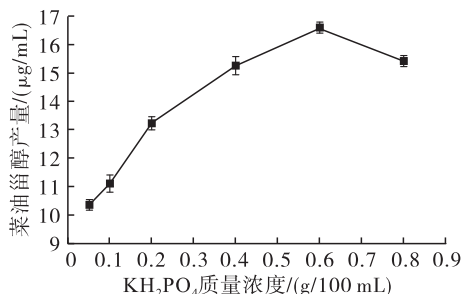


图6 KH_2PO_4 质量浓度对菜油甾醇产量的影响

由图 6 可知:随着 KH_2PO_4 质量浓度的增加,菜油甾醇产量逐渐增加,当 KH_2PO_4 质量浓度为 0.6 g/100 mL 时,菜油甾醇产量达到最大,为 16.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$;之后随 KH_2PO_4 质量浓度的增加,菜油甾醇产量略有下降。磷酸盐对酵母的生长及代谢均极为重要,且能维持培养基 pH 的稳定^[13]。因此,选择 KH_2PO_4 质量浓度为 0.6 g/100 mL 用于后续研究。

2.3 培养基组成优化响应面实验

2.3.1 响应面优化实验设计及结果

在单因素实验基础上,采用响应面实验对 PMEDD 发酵培养基组成进行优化。依据 Design - Expert 8.0.6 软件,采用三因素三水平的 Box - Behnken 实验设计,以葡萄糖质量浓度(A)、蛋白胨质量浓度(B)、 KH_2PO_4 质量浓度(C)为自变量,菜油

甾醇产量(Y)为响应值进行响应面实验。响应面实验因素与水平见表1,响应面实验设计与结果见表2。

表1 响应面实验因素与水平

水平	葡萄糖 质量浓度/ (g/100 mL)	蛋白胨 质量浓度/ (g/100 mL)	KH ₂ PO ₄ 质量浓度/ (g/100 mL)
-1	2	1.0	0.4
0	3	1.5	0.6
1	4	2.0	0.8

表2 响应面实验设计与结果

实验号	A	B	C	Y/($\mu\text{g/mL}$)
1	-1	-1	0	15.453
2	1	-1	0	15.634
3	-1	1	0	14.514
4	1	1	0	15.675
5	-1	0	-1	14.972
6	1	0	-1	15.714
7	-1	0	1	15.654
8	1	0	1	15.897
9	0	-1	-1	15.695
10	0	1	-1	15.212
11	0	-1	1	15.983
12	0	1	1	15.685
13	0	0	0	16.657
14	0	0	0	16.603
15	0	0	0	16.607
16	0	0	0	16.655
17	0	0	0	16.587

利用 Design - Expert 8.0.6 软件对表2的实验结果进行回归分析,回归方程为 $Y = 16.62 + 0.29A - 0.21B + 0.20C + 0.24AB - 0.12AC + 0.046BC - 0.69A^2 - 0.61B^2 - 0.37C^2$ 。

利用 Design - Expert 8.0.6 软件对实验结果进行方差分析,结果见表3。

回归方程决定系数(R^2)为0.9963,表示相关性较好,有99.63%的实验数据可以用该模型来解释,调整决定系数(R_{Adj}^2)为0.9916,表明该方程的拟合性较好,实验误差小,可以利用该模型对影响菜油甾醇产量的因素水平进行优化分析与预测。模型的变异系数为0.36%,小于10%,说明本实验的可信度与精确度高^[15,17-19]。由表3可知:该模型的 p 小于0.0001,说明该模型极显著;失拟项 p 为0.0560,大于0.05,说明该模型失拟项不显著,即不存在失拟的情况;一次项 p 均小于0.0001,为极显著水平,表明在实验范围内3个因素对菜油甾醇产量均有极显著影响;交互项中葡萄糖质量浓度与蛋白胨质量

浓度间的交互作用(AB)、葡萄糖质量浓度与KH₂PO₄质量浓度间的交互作用(AC)对菜油甾醇产量有极显著影响;二次项中3个因素对菜油甾醇产量的影响均为极显著水平;3个因素对菜油甾醇产量的影响大小顺序为 $A > B > C$,即葡萄糖质量浓度 > 蛋白胨质量浓度 > KH₂PO₄质量浓度。

表3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	6.28	9	0.70	211.32	<0.0001**
A	0.68	1	0.68	204.94	<0.0001**
B	0.35	1	0.35	106.69	<0.0001**
C	0.33	1	0.33	100.06	<0.0001**
AB	0.24	1	0.24	72.70	<0.0001**
AC	0.06	1	0.06	18.85	0.0034**
BC	0.01	1	0.01	2.59	0.1515
A ²	2.03	1	2.03	613.40	<0.0001**
B ²	1.56	1	1.56	473.06	<0.0001**
C ²	0.57	1	0.57	173.49	<0.0001**
残差	0.02	7	0.00		
失拟项	0.02	3	0.01	6.14	0.0560
净误差	0.00	4	0.00		
总离差	6.30	16			

注:* 差异显著($p < 0.05$); ** 差异极显著($p < 0.01$)

2.3.2 验证实验

根据回归方程得出 PMEDD 产菜油甾醇发酵培养基的最优方案为葡萄糖质量浓度3.17 g/100 mL、蛋白胨质量浓度1.44 g/100 mL、KH₂PO₄质量浓度0.65 g/100 mL,由此确定发酵培养基的组成为葡萄糖3.17 g/100 mL,蛋白胨1.44 g/100 mL, KH₂PO₄0.65 g/100 mL, Uracil 0.1 g/100 mL, YNB 0.42 g/100 mL, MgSO₄ · 7H₂O 0.15 g/100 mL。采用此培养基,按1.2.2方法培养发酵72 h,同时再做2个平行,分析菜油甾醇产量。结果表明,优化后菜油甾醇产量分别为16.31、16.55、16.61 $\mu\text{g/mL}$,平均为16.49 $\mu\text{g/mL}$,与预测值(16.68 $\mu\text{g/mL}$)相对误差为1.14%,理论与实际值偏差较小,优化后菜油甾醇的产量是优化前的2.10倍。

3 结论

本研究以可生物合成菜油甾醇的菌株 PMEDD 为基础,以提高菜油甾醇产量为目标,通过单因素实验及响应面实验对其发酵培养基组成进行了优化,建立了菜油甾醇产量与葡萄糖质量浓度、蛋白胨质量浓度、KH₂PO₄质量浓度3个因素间的数学模型,分析结果表明该模型的拟合效果良好,经优化后的培养基组成为葡萄糖3.17 g/100 mL,蛋白胨1.44 g/100 mL, Uracil 0.1 g/100 mL, YNB 0.42 g/100 mL,

KH_2PO_4 0.65 g/100 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/100 mL。在优化条件下,菜油甾醇的产量为 16.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$,是优化前的 2.10 倍。本研究为菜油甾醇发酵生产提供了一定的理论参考,为利用生物合成法得到较高纯度菜油甾醇单体奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王恬. 植物甾醇的性质、功能及其在动物生产上的应用[J]. 饲料工业, 2018, 39(20): 1-10.
- [2] 郭盼盼, 韩婷. 植物甾醇与心血管疾病关系的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(9): 5-8.
- [3] FENG S M, BELWAL T, LI L, et al. Phytosterols and their derivatives: potential health - romoting uses against lipid metabolism and associated diseases, mechanism, and safety issues[J]. Compr Rev Food Sci F, 2020, 19(4): 1243-1267.
- [4] 张羽. 菜油甾醇和孕烯醇酮在耶氏解脂酵母中的合成与优化[D]. 天津: 天津大学, 2017.
- [5] PANPIPAT W, XU X B, GUO Z. Towards a commercially potential process: enzymatic recovery of phytosterols from plant oil deodoriser distillates mixture [J]. Process Biochem, 2012, 47(8): 1256-1262.
- [6] 万建春, 姜波. 结晶法分离纯化大豆甾醇中 β -谷甾醇和豆甾醇单体[J]. 食品科技, 2008(8): 127-131.
- [7] 许文林, 黄一波, 钱俊红, 等. 结晶法分离精制混合植物甾醇中 β -谷甾醇和豆甾醇[J]. 过程工程学报, 2003(1): 73-79.
- [8] ZHANG R S, ZHANG Y, WANG Y, et al. Pregnenolone overproduction in *Yarrowia lipolytica* by integrative components pairing of the cytochrome P450scc system[J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(12): 2666-2678.
- [9] XU S H, LI Y R. Yeast as a promising heterologous host for steroid bioproduction [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2020, 47(9/10): 829-843.
- [10] CHEN J, FAN F Y, QU G, et al. Identification of *Absidia orchidis* steroid 11 β -hydroxylation system and its application in engineering *Saccharomyces cerevisiae* for one - step biotransformation to produce hydrocortisone [J]. Metab Eng, 2020, 57: 31-42.
- [11] TSUKAGOSHI Y, SUZUKI H, SEKI H, et al. Ajuga $\Delta 24$ -sterol reductase catalyzes the direct reductive conversion of 24 - methylenecholesterol to campesterol [J]. J Biol Chem, 2016, 291(15): 8189-8198.
- [12] 谭思远, 董桂茹, 苏安平, 等. 重组解脂亚罗酵母合成菜油甾醇[J]. 中国油脂, 2018, 43(8): 109-114.
- [13] 刘相岑, 郝晓蔚, 张瑞婕, 等. 降解植物甾醇产雄甾 1,4-二烯-3,17-二酮工程菌株的构建及转化培养基优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(18): 110-116.
- [14] 李朝波, 翟秀超, 温琦, 等. 添加不同有机氮源对 *L*-赖氨酸发酵的作用[J]. 粮食与食品工业, 2021, 28(3): 44-47.
- [15] 杨英. 微生物转化植物甾醇制备甾体药物关键中间体研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.
- [16] 李勤, 余彩霞, 邓林, 等. 微生物培养基的设计优化探讨[J]. 轻工科技, 2020, 36(4): 5-6.
- [17] 夏焕章. 发酵工艺学[M]. 3版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [18] YAN F X, DONG G R, QIANG S, et al. Overexpression of $\Delta 12$, $\Delta 15$ -desaturases for enhanced lipids synthesis in *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. Front Microbiol, 2020, 11: 289[2021-10-20]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00289>. eCollection 2020.
- [19] LEDESMA - AMARO R, NICAUD J M. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids[J]. Prog Lipid Res, 2016, 61: 40-50.
- [20] QIAN Y D, TAN S Y, DONG G R, et al. Increased campesterol synthesis by improving lipid content in engineered *Yarrowia lipolytica* [J]. Appl Microbiol Biot, 2020, 104(16): 7165-7175.
- [21] 柳相鹤, 张瑞婕, 赵树欣, 等. *Mycobacterium* sp. BFZ304 转化植物甾醇产 9 α -羟基雄烯二酮培养基的响应面优化[J]. 食品工业科技, 2016, 37(16): 172-177.
- [22] 姚博, 贡建民, 艾对元, 等. 浆水中产香酵母菌株的筛选及其增殖培养基优化[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 107-115.
- [23] 周丽. 米尔贝霉素单组分高产菌株选育及发酵放大研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.