

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

生質沼氣發電聯網應用模式及模組化設計研究-
建構一株可生產中碳鏈脂肪酸之 *Yarrowia lipolytica*
Research on Biomass Power Generation Networking-
Engineering *Yarrowia lipolytica* for the Synthesis of Medium-Chain
Fatty Acids

計畫編號：109A014

受委託機關(構)：國立台灣科技大學

計畫主持人：蔡仲隆 副教授

聯絡電話：02-2737-6628

E-mail address：stsai@mail.ntust.edu.tw

協同主持人：

研究期程：中華民國 109 年 3 月至 109 年 12 月

研究經費：新臺幣伍拾伍萬元

核研所聯絡人員：陳佳欣/黃瓊芳

報告日期：109 年 月 日

目 錄

目錄.....	I
摘要.....	錯誤! 尚未定義書籤。
第一章、計畫目的.....	3
第二章、研究方法與過程.....	4
2.1 研究方法	4
2.2 研究過程.....	6
2.2.1 菌株培養.....	6
2.2.2 菌株培養條件.....	7
2.2.3 基因的設計與合成方式.....	7
第三章、實驗結果.....	15
3.1 建構含有 LOXP 序列的白胺酸營養性缺陷之植體.....	15
3.2 含有 MFE1、YAL1、GUT2 植體建構結果.....	16
3.3 建構利用帶有 LOXP 序列的白胺酸基因破壞 MFE1、YAL1、 GUT2	18
3.4 雜合啟動子與硫酯酶(碳 8-CHFATB2、碳 10-CpFATB1)的植體建 構.....	20
3.5 將建構之植體線性化後轉形至 Y. LIPOLYTICA 之中	21
3.6 發酵測試	25
3.6.1 批式發酵法饋料批式發酵法發酵法之比較.....	25
3.6.2 以葡萄糖為底物(substrate)進行發酵	25
3.6.3 癸酸的回收率.....	26
3.6.4 以辛酸作為底物進行發酵.....	27
第四章、結論.....	29
第五章、參考資料.....	30

中文摘要

脂質是天然來源的產品，對石化原料而言，為一非常具有吸引力的可再生替代品。雖然天然產生的長鏈脂肪酸可以代替某些石油類似物；然而，中鏈脂肪酸則可以更貼近目前使用的石油產品所需的物理和化學性質。在這個研究中，我們利用基因轉殖技術設計一株解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)，從而產生中鏈脂肪酸。解脂耶氏酵母是一種油質酵母，其可在高滴度下自然產生脂質，我們在解脂耶氏酵母中表達對中鏈酰基-ACP 分子具有特異性的 ChFatB2 與 CpFatB1 硫酯酶，並將 *gut2*、*faa1*、*mfe1* 等三個基因從其染色體中剔除，使其具有可以累積生產中碳鏈脂肪酸的能力。結果顯示，當以葡萄糖當做底物時，所建構之菌株並不會累積 C10 脂肪酸。然而，在以辛酸做為底物之條件下，所建構之菌株就可以累積 C10 脂肪酸。未來將再繼續強化相關代謝路徑的改質，以提升最終改質菌株對葡萄糖轉化為 C10 的累積能力。

Abstract

Lipids are products of natural origin and are very attractive renewable alternatives to petrochemical raw materials. Although naturally occurring long-chain fatty acids can replace certain petroleum-based chemicals, medium-chain fatty acids possess the physical and chemical properties that are closer to currently used petroleum-based products. In this research project, we will use gene cloning technology to design an engineered *Yarrowia lipolytica* which is an oleaginous yeast that naturally produces lipids at high titers. Therefore, it is a good candidate for producing medium chain fatty acid. We will express ChFatB2 and CpFatB1 genes that encoding thioesterases for the catalytic conversion of medium-chain acyl-ACP molecules in *Y. lipolytica*. In addition, we will delete the three genes *gut2*, *faa1*, and *mfe1* from its chromosome to prevent byproduct formation. Results indicated that the created strain have only poor ability to accumulatively produce medium-chain fatty acids when using glucose as the substrate. However, when using octanoic acid as the substrate, the engineered strain is able to accumulate C10 medium-chain fatty acid. Future work will be continued on optimizing the pathway for medium-chain fatty acids production, especially when using glucose as the substrate.

第一章、計畫目的

使用酵母作為微生物細胞工廠來生產有價值的可再生燃料和化學品已經成為對抗全球暖化與能源危機等各種問題的重要解決方案[1]。脂肪酸是具有長烷基鏈的分子，末端帶有羧酸，與石油中發現的化學物質非常相似[2]。它們可以作為在細胞內儲存能量和碳的分子。脂肪酸可以進一步轉化為其他衍生物，包括(1)可用作生物柴油的甲酯和乙酯；(2) 可用於化妝品、食品和造紙行業的脂肪蠟；(3) 可用作表面活性劑和工業溶劑的脂肪醇；以及(4)可直接用作燃料的烷烴。解脂酵母菌具有可大量產生脂質的特性，使其成為工業化生產脂肪酸衍生產品的最佳微生物平台；而其中又以解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是研究最多的酵母[3]。研究人員除已通過多種合理的進化方法對其進行了改造，以增加脂質的產生外，許多研究人員已經成功地在解脂耶氏酵母中生產了新型脂肪酸產品，包括omega-3-脂肪酸，亞油酸衍生的不飽和和多不飽和脂肪酸以及烷烴[4]。儘管它已可以被改造來產生大量的脂質和相關產品，但相關的烷基鏈比典型的石油衍生產品中的烷基鍊長得多，因而使其物理性質對工業和商業應用的吸引力下降[5]。因此；利用基因轉殖技術建構生產中鏈脂肪酸的油質酵母將可使生產的可再生分子更適合用作石化產品之替代品。

第二章、研究方法與過程

2.1 研究方法

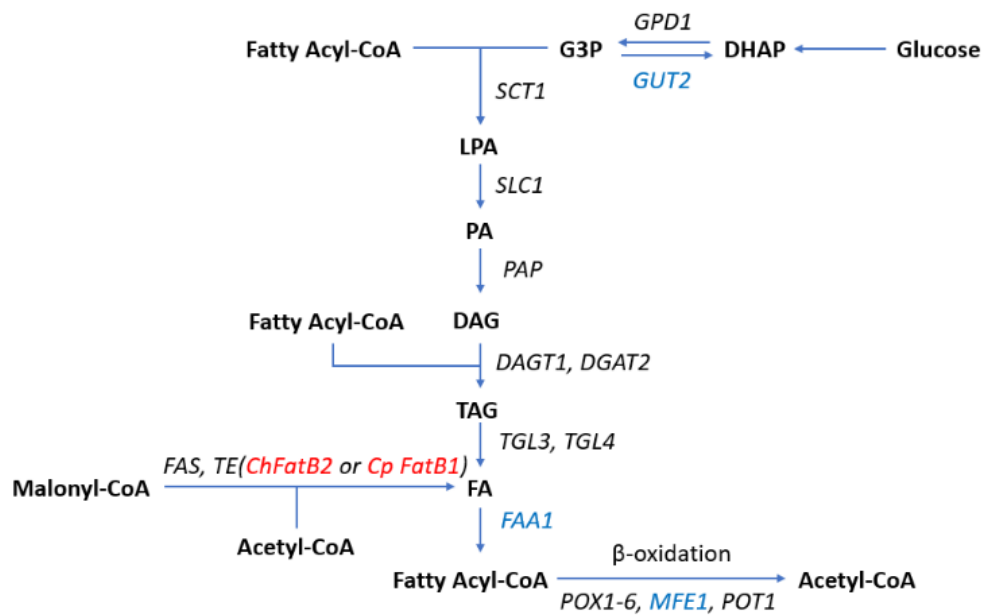
在解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)，脂肪酸的代謝路徑有兩條路徑如下：

其一：葡萄糖首先會糖解成 Dihydroxyacetone phosphate (DHAP)，DHAP 被異構化(*GPD1*)成 glycerol-3-phosphate (G3P)，接下來 G3P 與脂肪醯基輔酶 A(Fatty acyl-Co A)被醯化(*SCT1*)成 lysophosphatidic acid (LPA)，LPA 被醯化(*SLC1*)成 phosphatidic acid(PA)，PA 被去磷酸化(*PAP*)成 diacylglycerol(DAG)，DAG 與脂肪醯基輔酶 A 透過 DGA 醯基轉移酶(*DAG1*, *DAG2*)形成 Triglyceride (TAG)，最後 TAG 被 TGA 脂肪酶(*TGL3*, *TGL4*)水解後便可以得到脂肪酸(FA)，脂肪酸進入 β -氧化循環並且分解為乙醯輔酶 A[6]。

其二：丙二醯輔酶 A 與乙醯輔酶 A 透過脂肪酸合成酶合成長鏈脂肪酸，最後同樣進入 β -氧化循環並且分解為乙醯輔酶 A[7]。

為了提高 8 碳脂肪酸與 10 碳脂肪酸的產量，本研究將對解脂耶氏酵母做以下的修飾：*Cp FatB1*(對 8 碳脂肪酸高度專一性的硫酯酶，來源為 *C. palustris*)[8]與增加 *Ch FatB2*(對 10 碳脂肪酸高度專一性的硫酯酶，來源為 *C. hookeriana*)[9]，以增加目標碳數的脂肪酸產量。另外再中斷 *GUT2*(G3P 脫氫酶，防止 G3P 脫氫成 DHAP)、*FAA1*(脂

肪酸醯基輔酶 A 連接酶，防止脂肪酸進入 β -氧化循環)[10]、*MFE1*(β -氧化的主要基因，防止在脂肪醯基輔酶直接進入 β -氧化循環而不是與 G3P、DAG 作用)，以提高總脂肪酸的產量。



圖一、*Y. lipolytica* 的代謝路徑

2.2 研究過程

2.2.1 菌株培養

(一)YPD 培養液

對於酵母菌而言，YPD 是最為營養的培養介質，在本研究中會用來培養確認改植成功之菌株。

(成分：Yeast extract 10 g/L, Peptone 20 g/L, Glucose 20g/L)

(二)YNB 培養液

YNB 培養基為酵母菌的一種 Minimal Medium，相對於 YPD，YNB 是較為不營養的培養液，原因是 YNB 並未含有幫助生長的胺基酸，若菌株含有營養性缺陷(無法生產特定的胺基酸)，便無法生長。因此本研究將利用這點篩選出成功改植之菌株。

(成分：Yeast Nitrogen base w/o amino acids 6.7 g/L, Glucose 20 g/L、Ammonium Sulfate 5 g/L)

(三)YPD 培養基

為酵母菌最營養的介質，與培養液不同之處為培養基主要用於轉形作用(Transformation)時的勝任細胞(Component cell)之培養。

(成分：Yeast extract 10 g/L, Peptone 20 g/L, Glucose 20g/L, Agar 15 g/L)

(四) YNB 培養基

YNB 培養基為酵母菌的一種 Minimal Medium，與培養液不同之處為主要用於初步篩選進行轉形作用後的菌株，並針對成功生長的酵母菌做後續的篩選。

(成分： Yeast Nitrogen base w/o amino acids 6.7 g/L, Glucose 20 g/L、 Ammonium Sulfate 5 g/L, Agar 15 g/L)

2.2.2 菌株培養條件

(一) 液態培養

本研究的液態培養條件為 30 °C，轉速為 150-250 rpm，培養時間根據培養液的不同而有所改變(YPD 培養液為 24-36 hr；YNB 培養液為 36-48 hr)。

(二) 固態培養

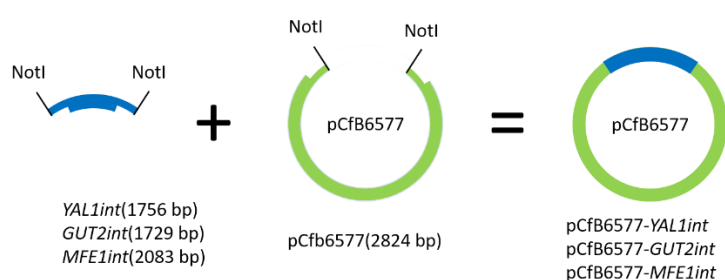
本研究的固態培養條件為 30 °C，培養時間根據培養基的不同而有所改變(YPD 培養液為 24-48 hr；YNB 培養液為 36-60 hr)。

2.2.3 基因的設計與合成方式

(一) 建構可破壞 *Y. lipolytica* 基因組內的基因 *GUT2*、*MFE1*、*YAL1* 之植體

在建構植體之前，本研究先使用 ZYMO RESEARCH 公司的產品 YeasStar Genomic DNA Kit™ 純化及提取 *Y.*

lipolytica 的基因組(Genome)，增加聚合類鏈鎖反應的成功機率以及擴增後的目標基因數量。接著再以植體 pCFB6577(Leu^r)為骨架，將先前提取的基因組作為骨架，利用引子進行聚合酶鏈鎖反應擴增出 *Y. lipolytica* 三段欲破壞的基因(*GUT2*、*FAA1*、*MFE1*)並透過轉形作用整合至骨架植體中。

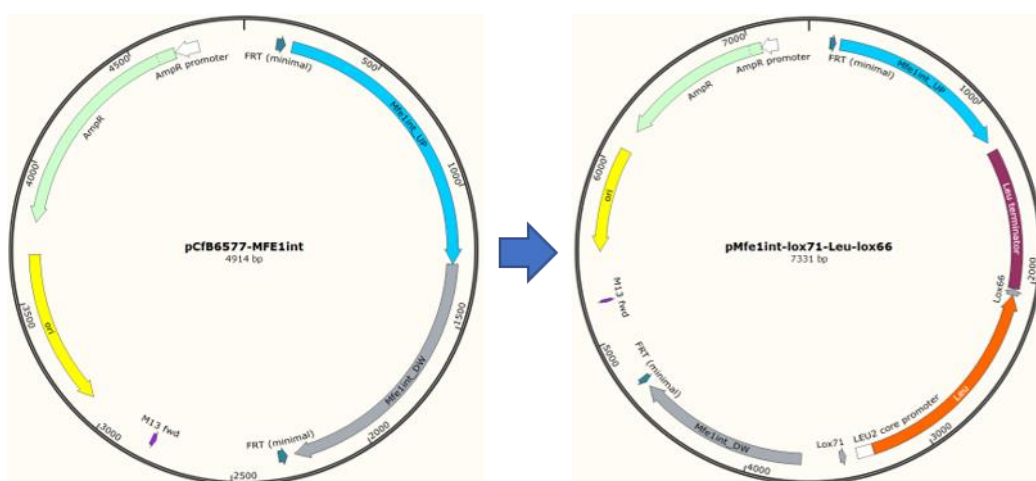


圖二、植體建構示意圖—以 pCFB6577 為骨架加入三段基因

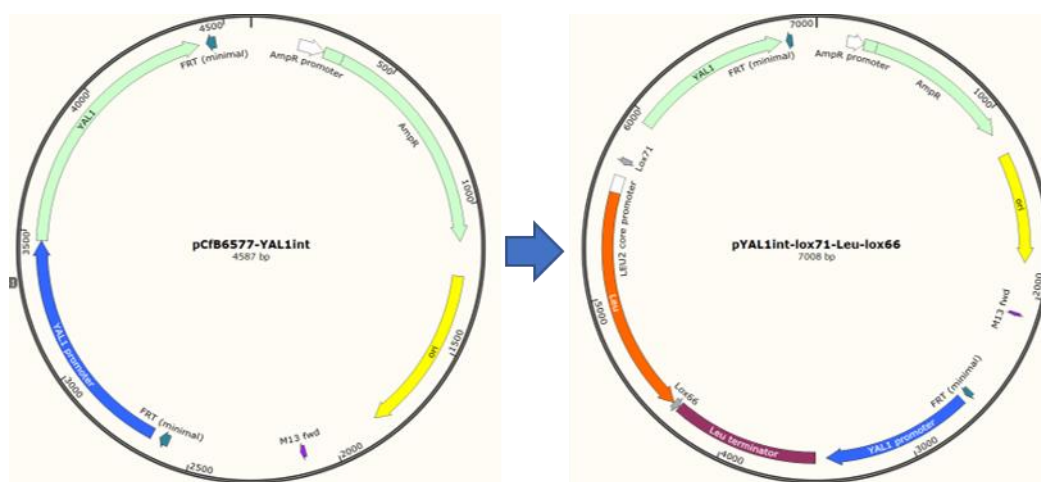
根據上述步驟可以建構帶有三段完整基因的植體，接下來就是建構出破壞基因的植體。首先設計引子於三段基因的中央，透過聚合酶鏈鎖反應獲得從中段開的基因，最後再將具有篩選功能的營養性缺陷白胺酸(Leucine)作為阻隔基因，破壞三段基因的完整性，也破壞這三段基因在酵母菌之中的表達。



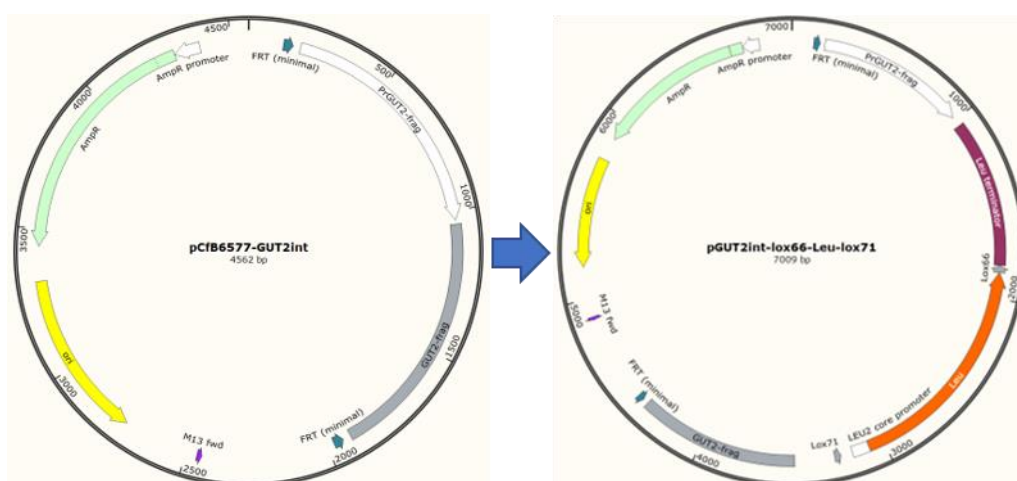
圖三、植體建構示意圖—加入營養性缺陷基因 Leucine



圖四、pCfB6577-MFE1int 與 pCfB6577-MFE1::Leu 植體圖



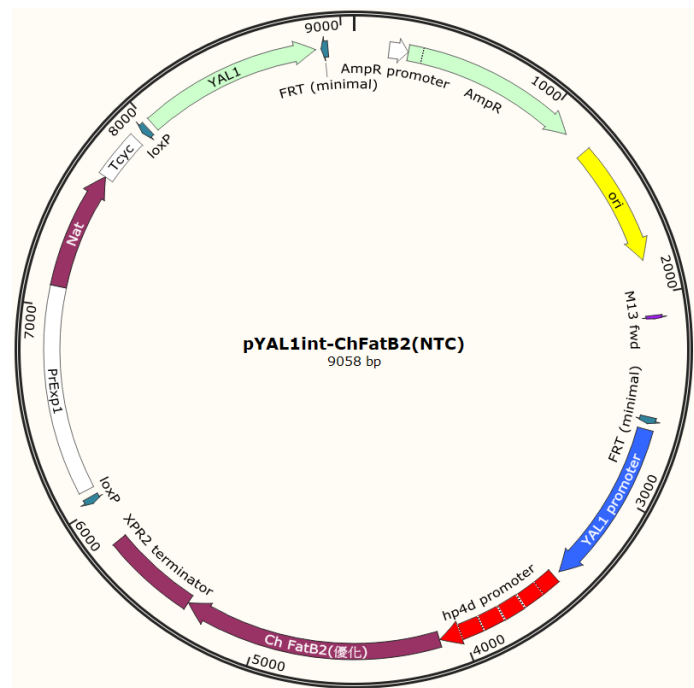
圖五、pCfB6577-YAL1intm 與 pCfB6577-YAL1::Leu 植體圖



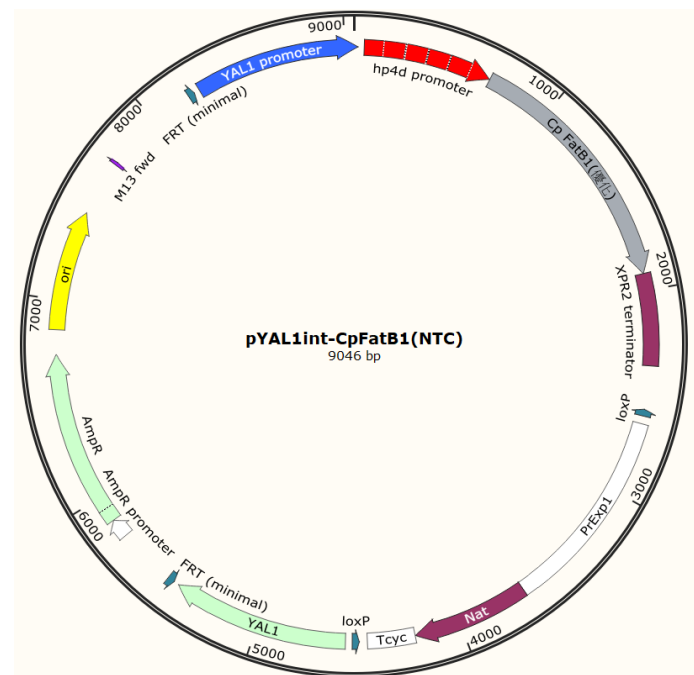
圖六、pCfB6577-GUT2int 與 pCfB6577-GUT2::Leu 植體圖

(二) Ch-FatB2 與 Cp-FatB1 基因表達植體的建構

本研究透過全基因合成的方式合成兩硫酯酶 (Thioesterase)-Ch-FatB2 與 Cp-FatB1，並利用透過 4 個重複 UAS1B 片段強化表達的啟動子 Hp4d 來當作硫酯酶的啟動子[11]。由於本研究所使用之菌株只具單一營養性缺陷(白胺酸營養性缺陷)，因此額外尋找其他方式來篩選菌株。諾爾絲菌素(Nourseothricin)是一種特別的抗生素，不僅對葛蘭氏陰性菌(如大腸桿菌)有抑制效果，還能對諸多酵母菌產生同樣的效果，因次將帶有抗諾爾絲菌素的基因連同強啟動子 Hp4d 與欲表達的硫酯酶整合於一個植體當中。

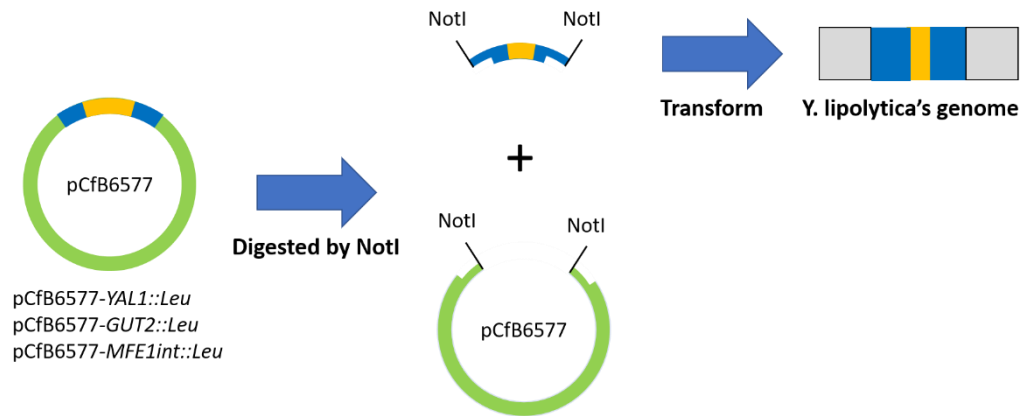


圖七、pYAL1iny-ChFatB2(NTC)植體示意圖



圖八、pYAL1int-CpFatB1(NTC)植體示意圖

以上的植體建構完後，皆以酵素 NotI 將欲轉形至 *Y. lipolytica* 的 DNA 片段進行線性化，根據 D. C. Chen 等人的轉形作用的步驟，將線性化的 DNA 送入 *Y. lipolytica* 基因組之中[12]。



圖九、線性化 DNA 與 *Y. lipolytica* 轉形作用示意圖

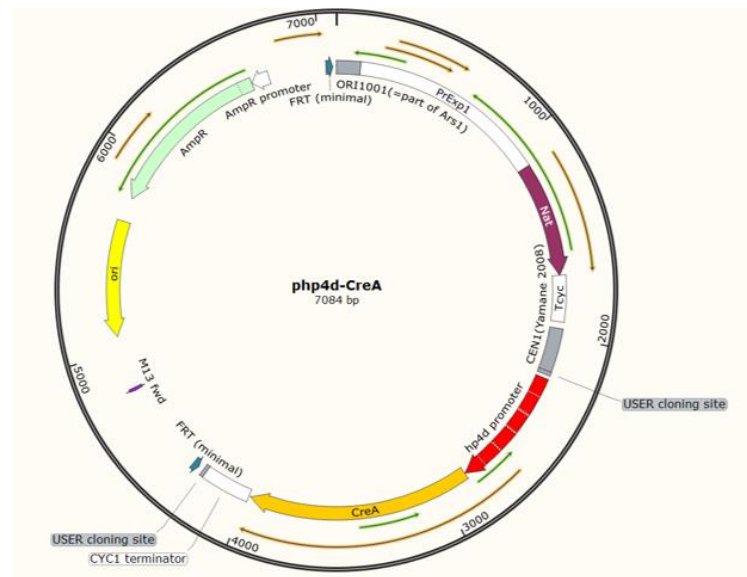
四、Cre-Loxp 系統剔除營養性缺陷的篩選基因

本研究所使用的 *Y. lipolytica* 菌株為 Po1g，由於此菌株只帶有一個白胺酸營養性缺陷，而每做一次轉形作用都需要篩選基因來判別成功與否，因此勢必要重複利用篩選基因才能夠實現本研究的目標——建構破壞三個基因的菌株。

Cre-Loxp 系統的運作方法與酵素進行酶切反應類似，特殊蛋白 CreA 會尋找 Loxp 序列並加以切開，而如果將此 Loxp 序列建立在白胺酸表達基因的上游與下游，便可將其剔除，使菌株回到具有白胺酸營養性缺陷的狀態，又可以以此進行下一個轉形作用去破壞其他的基因。

在 建 構 pCfB6577-GUT2::Leu 、 pCfB6577-MFE1::Leu 、

pCfB6577-YAL1::Leu 三個植體時，已經將 Loxp 序列建立在白胺酸表達基因的上游與下游，因此只需再建構能表達 CreA 蛋白的植體即可。由於先前的轉形作用已經使用白胺酸基因進行篩選，所以本研究將 CreA 蛋白基因建構於含有抗諾爾絲菌素的基因上，用於篩選是否成功將 CreA 蛋白轉入菌株當中。



圖十、CreA 蛋白表達質體

五、活性測試

欲測試之菌株首先於 YNB 培養液進行預培養(28 °C,220ppm, 24hr)，之後將預培養之菌液以起始 OD₆₀₀(Optical density)1-1.5 加入 125 ml 的玻璃搖瓶之中進行發酵(28 °C,220ppm)，發酵過程中每 24 hr 補充葡萄糖與取樣品進行分析，且發酵時程共為 168 小時。

本研究分析脂肪酸的方式為 GC-MS，利用其精準的定性與定量分析來分析原始菌株(Po1g)與改殖後的菌株其代謝的脂肪酸，藉此比較菌株改殖前後的差別。

GC 的烘箱溫度設定如下表，表格中的前三項為分峰的主要溫度設定，而 Post run 的設定為破壞仍與管柱交互作用的脂肪酸，達到清理管柱的目的。

表一、GC 烘箱溫度表

升溫速率(°C/min)	溫度(°C)	恆定時間(min)
	80	5
40	200	1
4	245	1
Post run: 290 °C for 10min.		

第三章、實驗結果

Digestion check 為主要測試質體是否成功建構，利用三種方式進行測試：

(1) 未切：不使用限制酶以測試質體是否為圓的。

電泳膠圖目標：亮帶有拖尾(線性化的DNA並不會拖尾)。

(2) 一刀：使用只有單一限制位點的限制酶使質體線性化。

電泳膠圖目標：亮帶不拖尾且大小需正確。

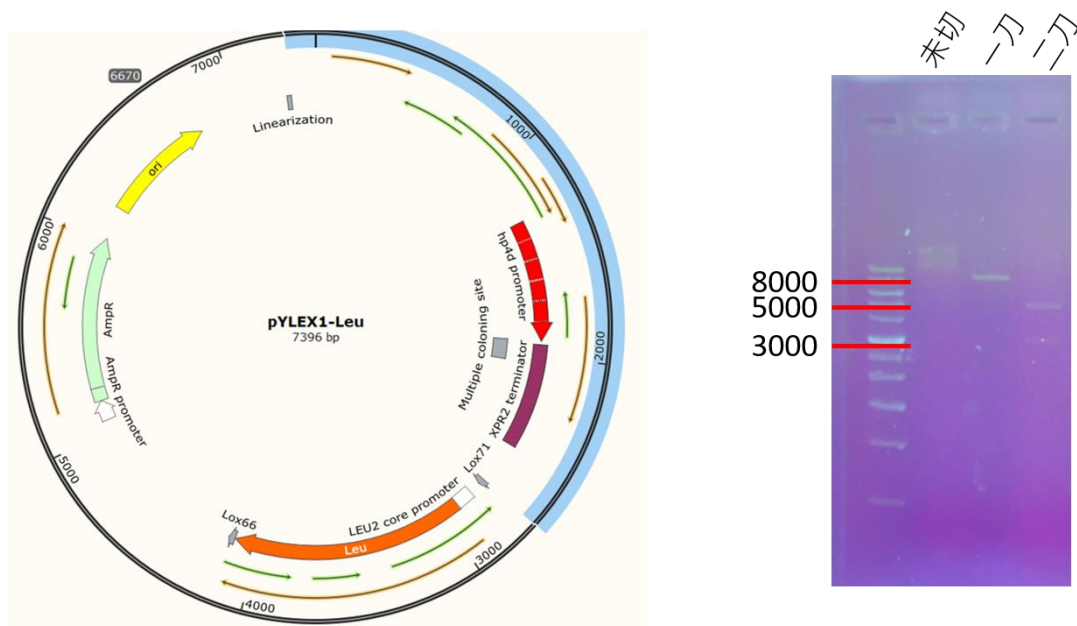
(3) 二刀：使用有兩處限制位點的限制酶將質體分成兩部分。

電泳膠圖目標：兩亮帶大小需正確。

若測試之質體皆達到上述電泳膠圖目標，則代表質體建構成功。

3.1 建構含有 Loxp 序列的白胺酸營養性缺陷之植體

pYLEX1-Leu(一刀：NotI-7396 bp、二刀：NotI+XbaI：2839+4557 bp)

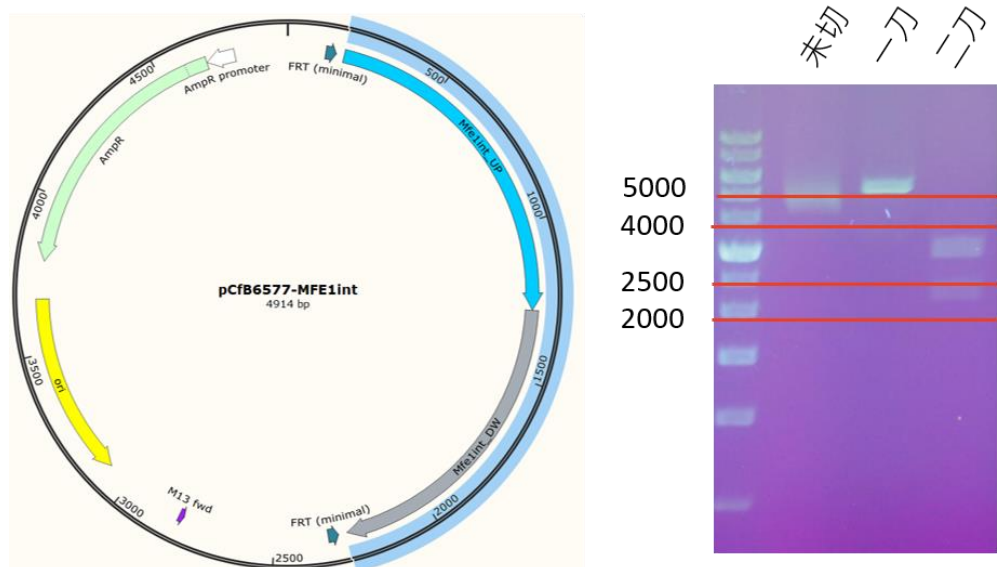


圖十一、pYLEX1 植體與 Digestion check 之電泳圖

(反藍部分為二刀酶切之結果圖)

3.2 含有 MFE1、YAL1、GUT2 植體建構結果

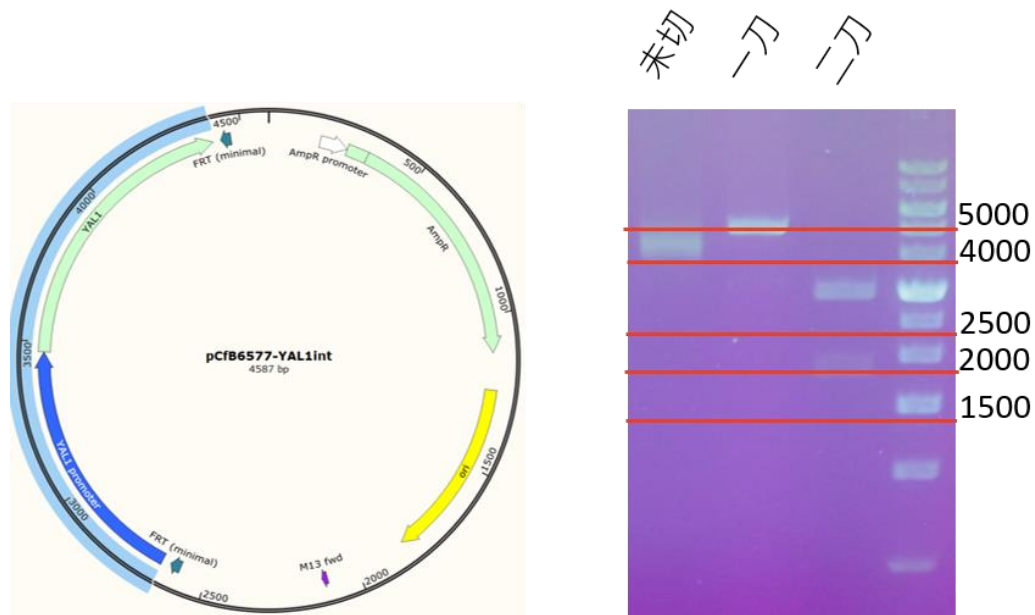
(A)pCfB6577- MFE1int(一刀：PvuI-4914bp、二刀：NotI-2090+2824bp)



圖十二、pCfB6577-GUT2int植體與Digestion check之電泳圖

未切有拖尾，一刀與二刀的亮帶位置正確，質體建構成功！

(B)pCfB6577 -YAL1int(一刀 : HindIII-4587bp 、 二刀 :

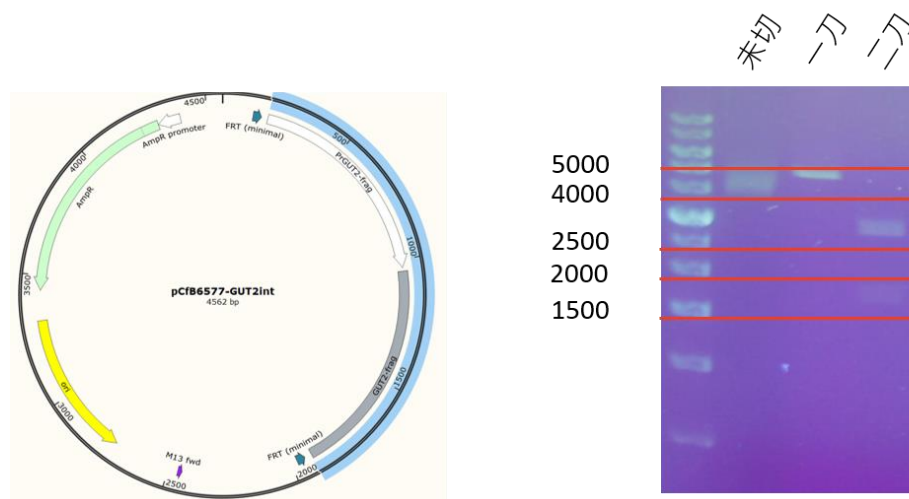


NotI-1763+2824bp)

圖十三、pCFB6577-GUT2int植體與Digestion check之電泳圖

未切有拖尾，一刀與二刀的亮帶位置正確，質體建構成功！

(C)pCfB6577-GUT2int(一刀 : PvuI-4562bp、二刀 : NotI-1738+2824bp)

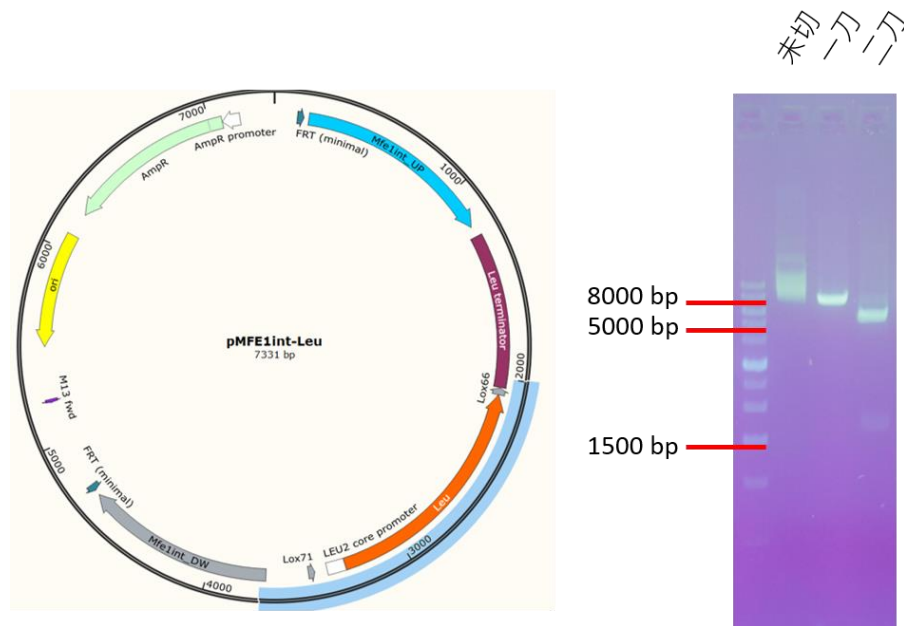


圖十四、pCFB6577-GUT2int植體與Digestion check之電泳圖

未切有拖尾，一刀與二刀亮帶位置正確，質體建構成功！

3.3 建構利用帶有 Loxp 序列的白胺酸基因破壞 MFE1、YAL1、GUT2

(A)pMFE1int-Leu(一刀：PvuI-7331 bp、二刀：AgeI-5689 & 1742 bp)

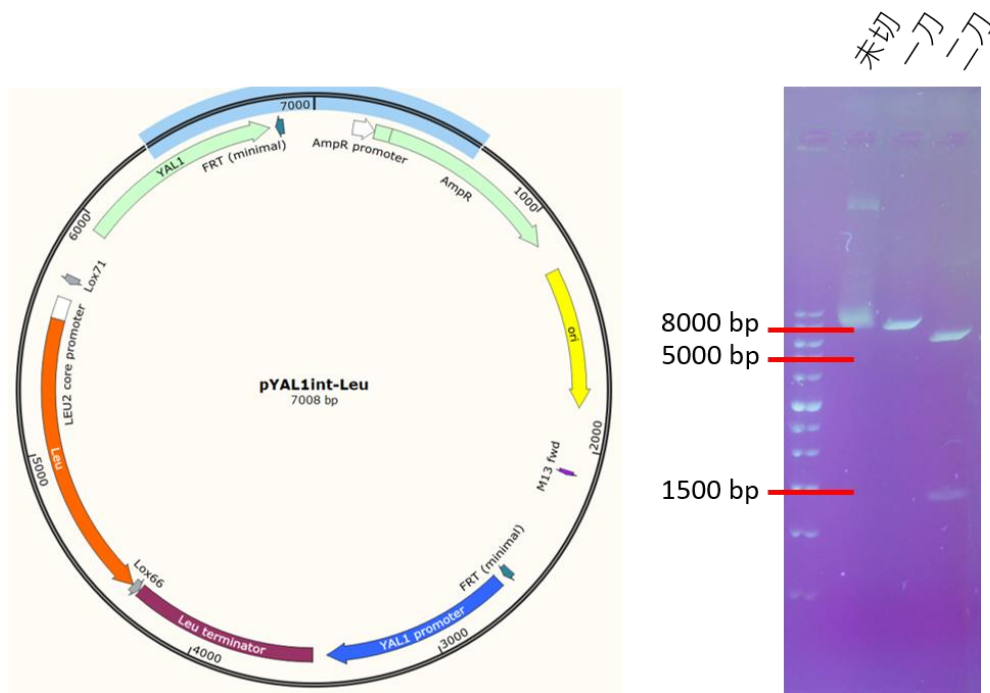


圖十五、pMFE1int-Leu植體與Digestion check之電泳圖

未切有拖尾，一刀與二刀亮帶位置正確，質體建構成功！

(B)pYAL1int-Leu(一刀：Kpn1-7008 bp、二刀：Pvu1-5660 & 1348

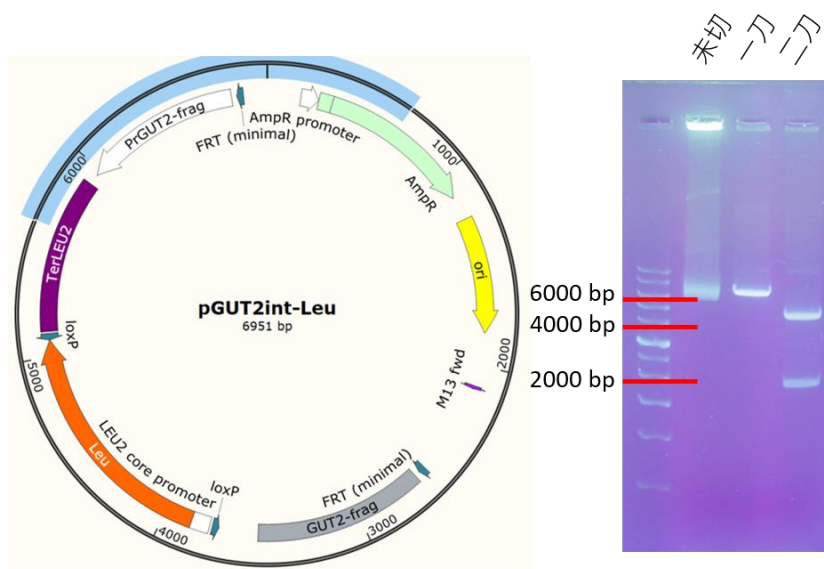
bp)



圖十六、pYAL1int-Leu植體與Digestion check之電泳圖

未切有拖尾，一刀與二刀亮帶位置正確，質體建構成功！

(C)pGUT2int-Leu(一刀：PvuI-6951 bp、二刀：PvuI & NcoI-2000 & 4951 bp)



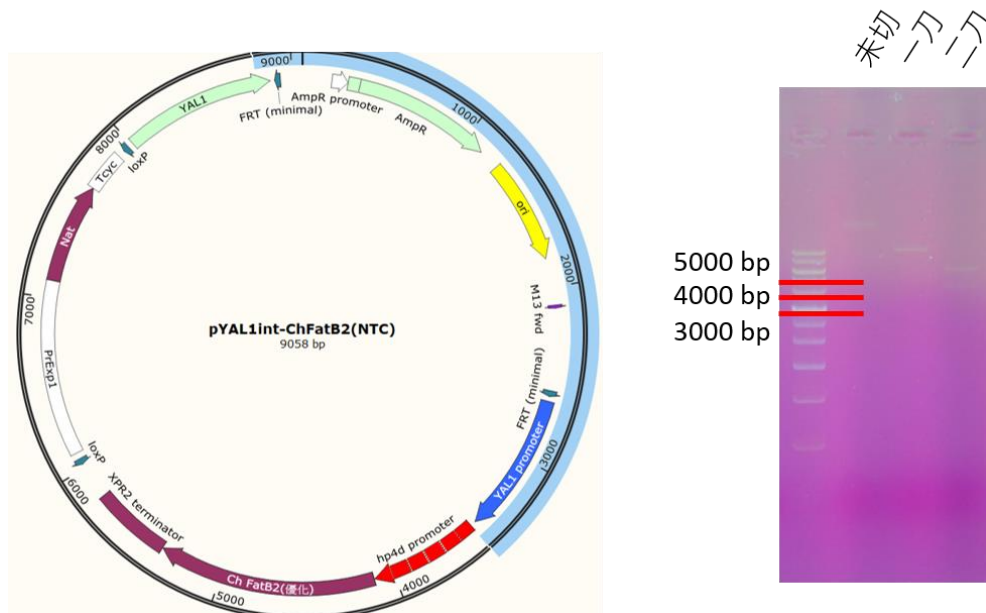
圖十七、pGUT2int-Leu植體與Digestion check之電泳圖

未切有拖尾，一刀與二刀亮帶位置正確，質體建構成功！

3.4 雜合啟動子與硫酯酶(碳 8-ChFatB2、碳 10-CpFatB1)的植體建構

雜合啟動子Hp4d從商業植體pYLEX1中獲得，兩硫酯酶的基因透過全基因合成的方式獲得，兩段基因分別透過聚合酶鏈所反應擴增獲得並建構於pYAL1int之中，最後以諾爾絲菌素作為篩選標記。

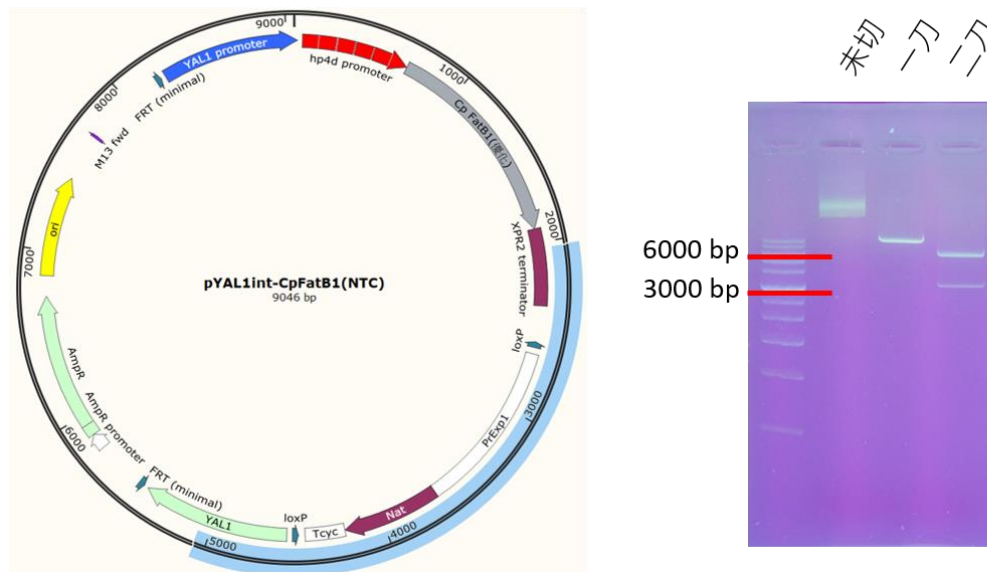
(A)pYAL1int-ChFatB2(NTC)(一刀：SbfI-9058 bp、二刀：SalI-3745 & 5313 bp)



圖十八、pYAL1int-ChFatB2(NTC)植體與Digestion check之電泳圖

未切有拖尾，一刀與二刀亮帶位置正確，質體建構成功！

(B)pYAL1int-CpFatB1(NTC)(一刀：KpnI-9046 bp、二刀：AgeI-3033 & 6013 bp)



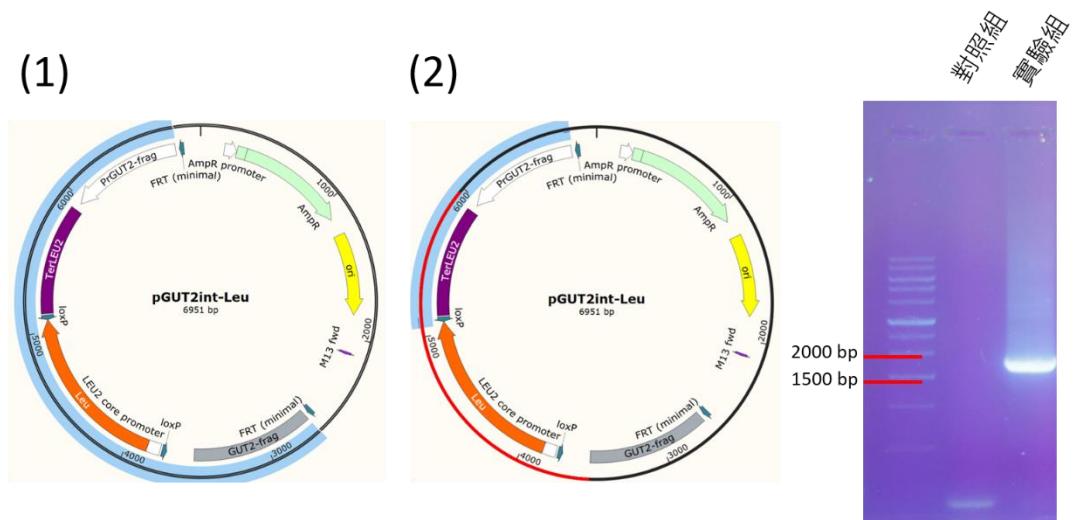
圖十九、pYAL1int-CpFatB1(NTC)植體與Digestion check之電泳圖

未切有拖尾，一刀與二刀亮帶位置正確，質體建構成功！

3.5 將建構之植體線性化後轉形至 *Y. lipolytica* 之中

*Y. lipolytica*的轉形作用是將上述建構之植體都以酵素NotI進行線性化，且將線性化的DNA送入菌內做同源置換，並透過白胺酸營養性缺陷或諾爾絲菌素進行篩選。另外，由於*Y. lipolytica*內含有數百萬的鹼基對，無法找到只作用於一處的酵素，也就是說無法藉由酶切作用來確認轉形作用是否成功。因此本研究將使用聚合酶鏈所反應來做確認，且引子的選擇為一條在*Y. lipolytica*的基因上，另一條則是線性化DNA上，反應時，除了實驗組，本研究也會使用原始菌株作陰性對照組(Negative control-Po1g)。反應結束後，會利用電泳來觀察是否有亮帶的出現，亮帶位置需出現在實驗組的正確位置，而對照組則不能有亮帶。

(A)pGUT2int-Leu轉形至*Y. lipolytica*之中(目標亮帶：1735 bp)

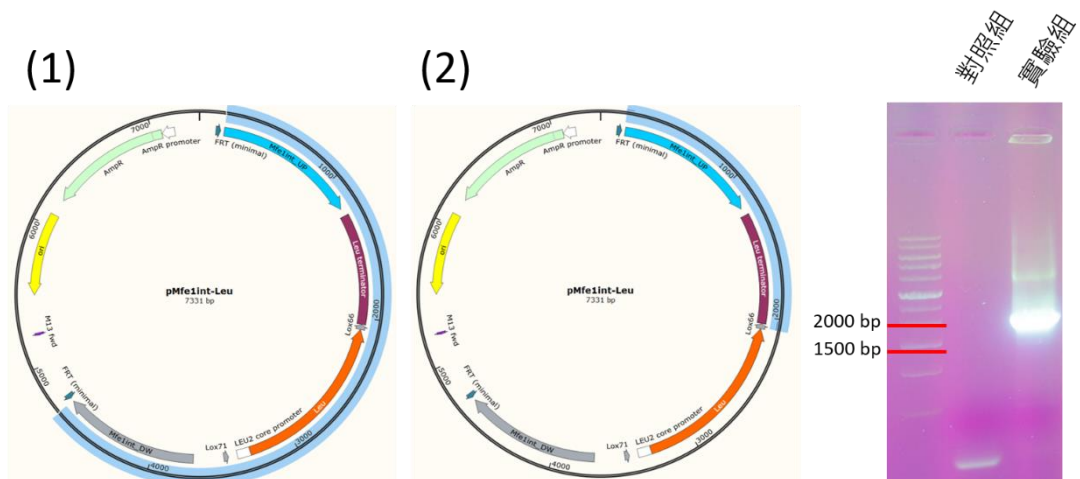


圖二十、(1)pGUT2int-Leu線性化區域(2)轉形作用後所選擇聚合酶鏈

所反應的目標片段與電泳膠圖

以白胺酸基因作為篩選標記，實驗組亮帶位置正確且對照組同一位置不無亮帶，轉形作用成功！

(B)pMFE1int-Leu轉形至*Y. lipolytica*之中(目標亮帶：1915 bp)

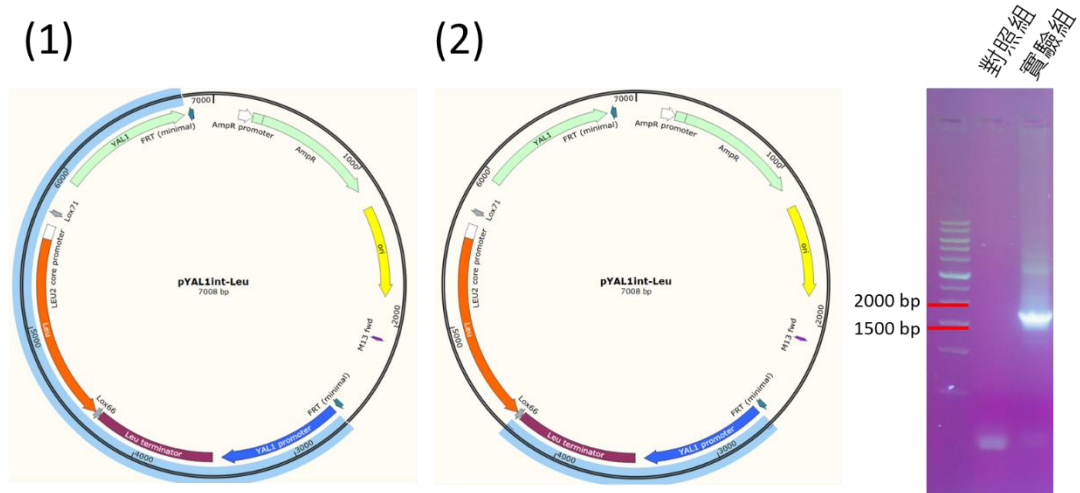


圖二十一、(1)pMFE1int-Leu線性化區域(2)轉形作用後所選擇聚合酶

鏈所反應的目標片段與電泳膠圖

以白胺酸基因作為篩選標記，實驗組亮帶位置正確且對照組同一位置不無亮帶，轉形作用成功！

(C)pYAL1int-Leu轉形至 *Y. lipolytica* 之中(目標亮帶：1719 bp)

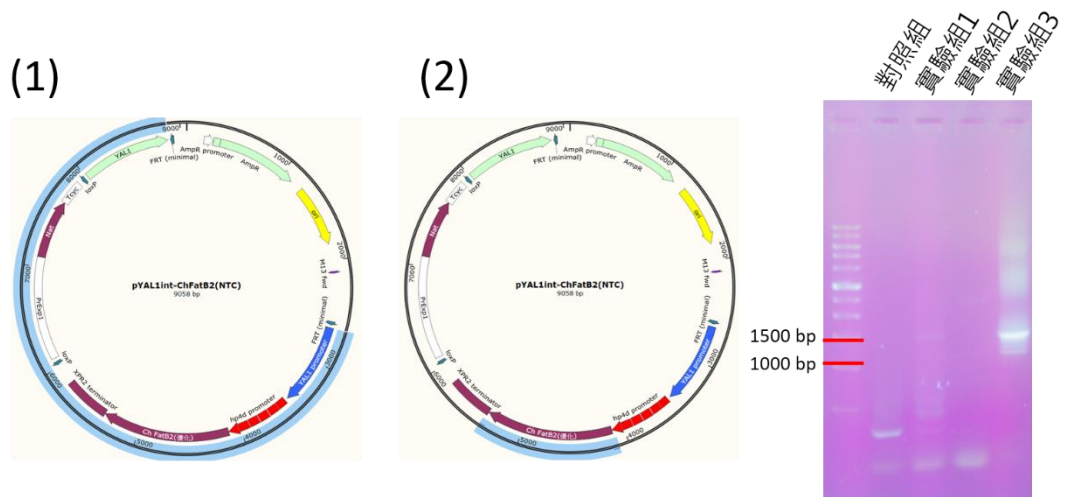


圖二十二、(1)pYAL1int-Leu線性化區域(2)轉形作用後所選擇聚合酶

鏈所反應的目標片段與電泳膠圖

以白胺酸基因作為篩選標記，實驗組亮帶位置正確且對照組同一位置不無亮帶，轉形作用成功！

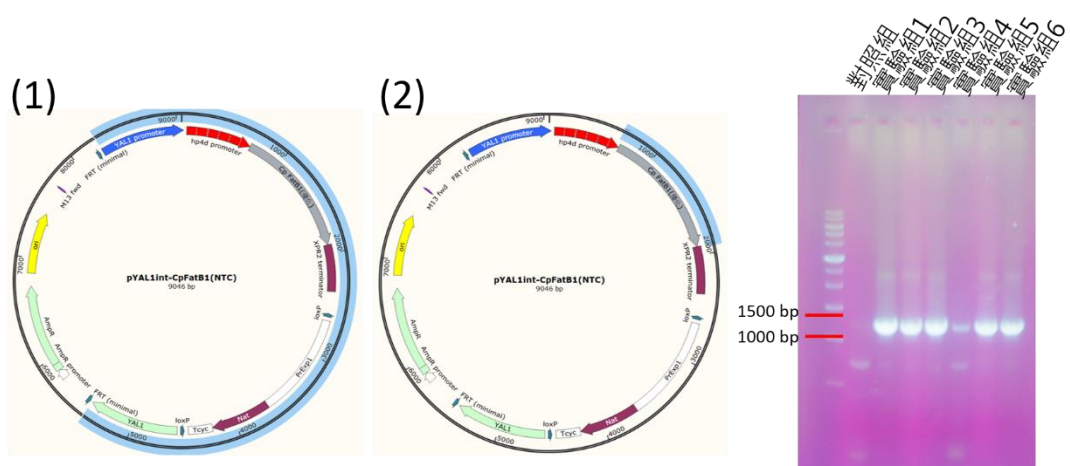
(D)將pYAL1int-ChFatB2(NTC)轉形至 *Y. lipolytica* MFE1::Leu(先前已將pMFE1int-Leu成功轉形的菌株)之中(目標亮帶：1296 bp)



圖二十三、(1)pYAL1int-ChFatB2(NTC)線性化區域(2)轉形作用後所
選擇聚合酶鏈所反應的目標片段與電泳膠圖

以諾爾絲菌素作為篩選標記，實驗組亮帶位置正確且對照組同一位置不無亮帶，轉形作用成功！

(E)將pYAL1int-CpFatB1(NTC)轉形至*Y. lipolytica* MFE1::Leu(先前已將pMFE1int-Leu成功轉形的菌株)之中(之後以pMFE1int-Leu & pYAL1int-CpFatB1(NTC)稱之，且目標亮帶：1279 bp)



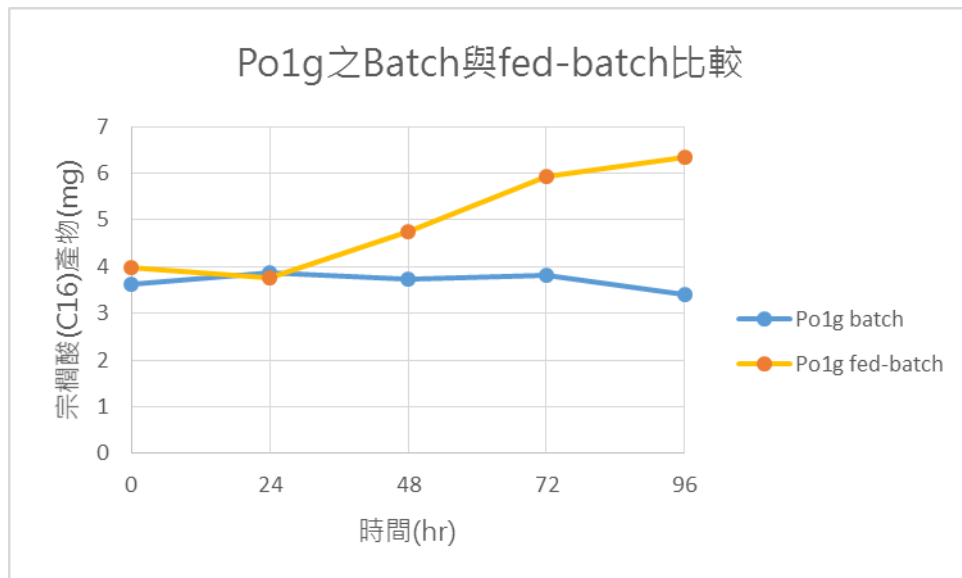
圖二十四、(1)pYAL1int-CpFatB1(NTC)線性化區域(2)轉形作用後所
選擇聚合酶鏈所反應的目標片段與電泳膠圖

以諾爾絲菌素作為篩選標記，實驗組亮帶位置正確且對照組同一位置不無亮帶，轉形作用成功！

3.6 發酵測試

3.6.1 批式發酵法(Batch fermentation)饋料批式發酵法(Fed-batch fermentation)發酵法之比較

以原始菌株進行不同發酵方式的比較，兩發酵方式之差異為是否每天補充葡萄糖，探討最終發酵結果之棕櫚酸的產量之差異。



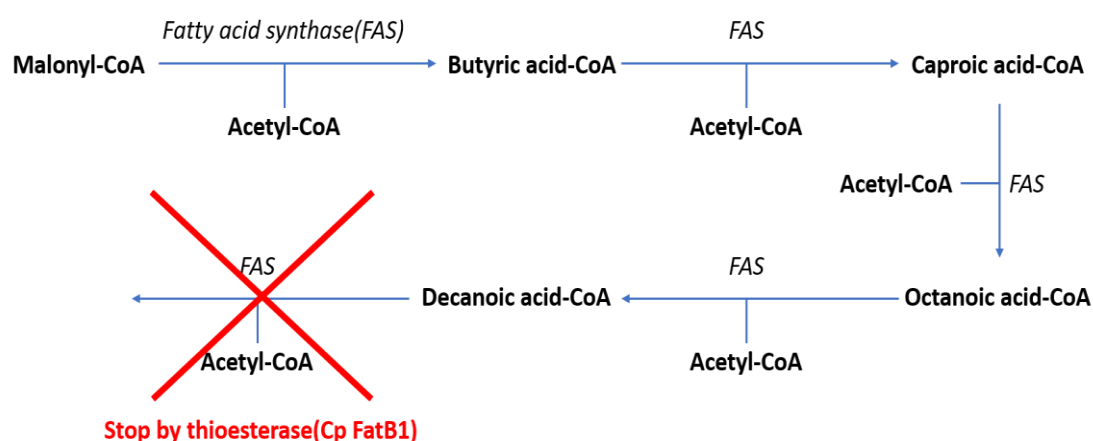
圖二十五、以Po1g作為發酵菌株，測試兩種發酵方式之差異

跟據上圖之結果，可以發現菌株若以饋料批式發酵法可以獲得更多的棕櫚酸，也就是說之後的改殖菌株以饋料批式發酵法進行發酵的話可以獲得更多的目標產物。

3.6.2 以葡萄糖為底物(substrate)進行發酵

本研究初期嘗試以葡萄糖做為唯一底物，並嘗試透過發酵葡萄糖以生產C10脂肪酸。然而結果發現，發酵結果完全不包含目標產物

癸酸，本研究根據結果作出兩個推論。其一，當*Y. lipolytica*合成出癸酸後馬上就會被代謝掉或是合成為更長的脂肪酸，因此本研究將作癸酸回收率的發酵實驗，測試若一開始加入癸酸，其他代謝的速度為何；其二，根據*Y. lipolytica*的脂肪酸合成路徑，若要從最原始底物葡萄糖合成目標產物癸酸，中間有非常多的反應會影響癸酸的合成，因此第二個測試為直接加入辛酸(8碳脂肪酸)作為合成癸酸的前驅物，測試是否能更功獲得癸酸。

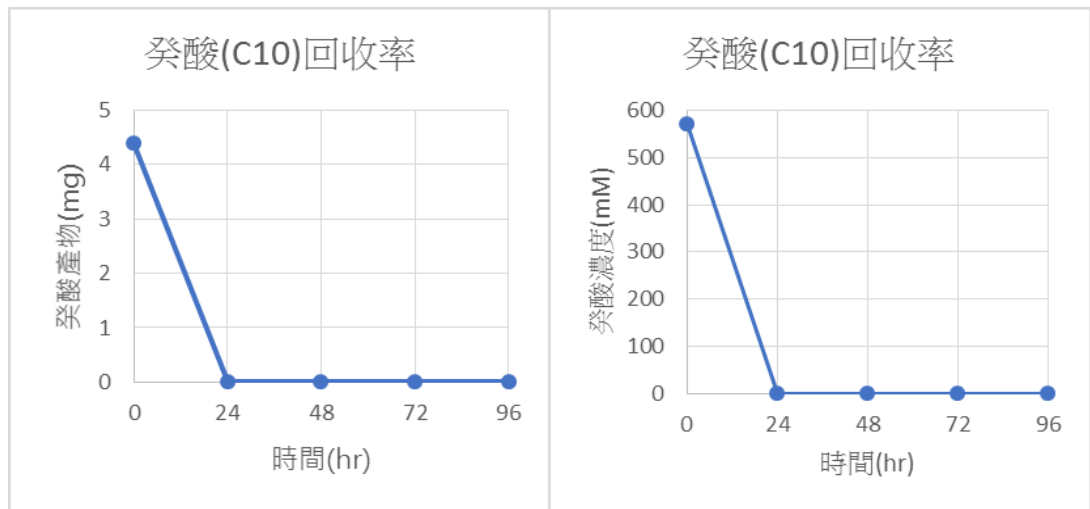


圖二十七、脂肪酸合成路徑圖，根據此路徑圖驗證推論二添加辛酸是否能夠提高癸酸的生產量

3.6.3 癸酸的回收率

回收率的測試方法為在一開始發酵時(0hr)便加入癸酸，每24小時取點一次觀察癸酸的消耗程度。根據結果可以發現，癸酸於第24

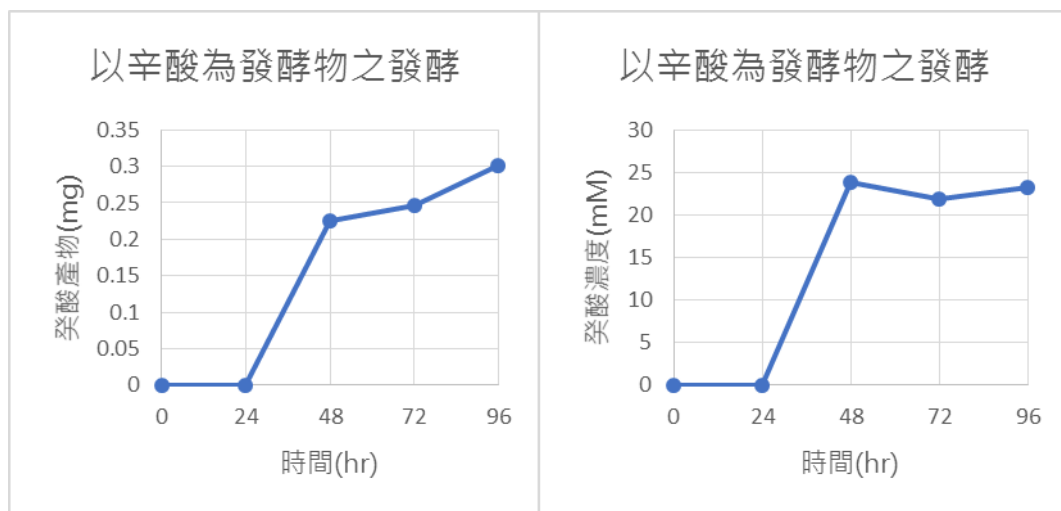
小時便完全消耗，代表以葡萄糖為底物進行發酵時，可能會產生癸酸，但是被快速的消耗而沒有保存於*Y. lipolytica*之中。



圖二十七、癸酸的回收率(以pMFE1-Leu & pYAL1int-CpFatB1(NTC)作為發酵菌株)

3.6.4 以辛酸作為底物進行發酵

與饋料批式發酵一樣每天都會加入葡萄糖，除此之外，本研究將在第 24 小時取點後與 72 小時取點後額外加入辛酸作為發酵底物，觀察改殖菌株是否能夠累積癸酸。其結果可發現，加入辛酸作為底物時能夠確實累積癸酸，因此這方法是可行的！



圖二十八、以辛酸作為發酵物之發酵(以pMFE1-Leu & pYAL1int-CpFatB1(NTC)作為發酵菌株)

第四章、結論

本研究建構許多植體以及將其線性化後成功轉形至 *V. lipolytica* 之中，並對成功改殖的菌株進行發酵測試，測試結果最好的組合為每天補充葡萄糖(饋料批示發酵法)以及補充辛酸作為發酵底物，能成功累積癸酸。未來，本研究將繼續尋找能累積更多癸酸的發酵方式，希望能超過現有合成脂肪酸的產量，達到綠色生產之目的。

第五章、參考資料

- [1] H. Liu, T. Cheng, M. Xian, Y. Cao, F. Fang, H.J.B.a. Zou, Fatty acid from the renewable sources: a promising feedstock for the production of biofuels and biobased chemicals, 32(2) (2014) 382-389.
- [2] W. Runguphan, J.D.J.M.e. Keasling, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals, 21 (2014) 103-113.
- [3] J.M. Ageitos, J.A. Vallejo, P. Veiga-Crespo, T.G.J.A.m. Villa, biotechnology, Oily yeasts as oleaginous cell factories, 90(4) (2011) 1219-1227.
- [4] L. Liu, A. Pan, C. Spofford, N. Zhou, H.S.J.M.e. Alper, An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*, 29 (2015) 36-45.
- [5] G. Dwivedi, M.J.R. Sharma, S.E. Reviews, Impact of cold flow properties of biodiesel on engine performance, 31 (2014) 650-656.
- [6] A. Beopoulos, Z. Mrozova, F. Thevenieau, M.-T. Le Dall, I. Hapala, S. Papanikolaou, T. Chardot, J.-M.J.A. Nicaud, e. microbiology, Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*,

74(24) (2008) 7779-7789.

- [7] C.D. Rutter, S. Zhang, C.V.J.A.m. Rao, *biotechnology, Engineering* *Yarrowia lipolytica* for production of medium-chain fatty acids, 99(17) (2015) 7359-7368.
- [8] K. Dehesh, P. Edwards, T. Hayes, A.M. Cranmer, J.J.P.P. Fillatti, Two novel thioesterases are key determinants of the bimodal distribution of acyl chain length of *Cuphea palustris* seed oil, 110(1) (1996) 203-210.
- [9] K. Dehesh, A. Jones, D.S. Knutzon, T.A.J.T.P.J. Voelker, Production of high levels of 8: 0 and 10: 0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of Ch FatB2, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana*, 9(2) (1996) 167-172.
- [10] M. Gatter, A. Förster, K. Bär, M. Winter, C. Otto, P. Petzsch, M. Ježková, K. Bahr, M. Pfeiffer, F.J.F.y.r. Matthäus, A newly identified fatty alcohol oxidase gene is mainly responsible for the oxidation of long-chain ω -hydroxy fatty acids in *Yarrowia lipolytica*, 14(6) (2014) 858-872.
- [11] S. Blanchin-Roland, R.C. Otero, C.J.M. Gaillardin, c. biology, Two upstream activation sequences control the expression of the XPR2 gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*, 14(1) (1994) 327-338.

- [12] D.-C. Chen, J.-M. Beckerich, C.J.A.m. Gaillardin, biotechnology,
One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*,
48(2) (1997) 232-235.