

γ -癸内酯的生物合成途径及产量提升策略研究进展

胡均鹏¹, 陈荣桥¹, 梁明¹, 洗燕萍¹, 吴玉奎^{1*}, 白卫东², 侯向昶¹

(1. 广州质量监督检测研究院, 广州市食品安全风险动态监测与预警研究中心, 广州市食品安全检测技术重点实验室, 广州市NQI-质量安全科技协同创新中心, 广东广州 511447)

(2. 仲恺农业工程学院, 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广东广州 510225)

摘要: γ -癸内酯 (γ -Decalactone, GDL), 是一种含有椰子、奶油和桃子风味的内酯类化合物, 天然存在于水果及发酵产品中, 广泛应用在食用香料、化妆品和化工等行业。自然界中 γ -癸内酯的存量已经不能满足消费者日益增长的需求, 化学合成的 γ -癸内酯是没有光学活性的消旋体, 安全性低, 对环境不友好, 而通过微生物合成的 γ -癸内酯, 与从植物、水果中提取获得的天然 γ -癸内酯相比, 结构相似, 具有天然等同性, 深受消费者喜爱。因此, 微生物合成 γ -癸内酯具有广阔的研究前景。该文综述了 γ -癸内酯的生物合成途径, 并对目前的产量提升策略如基因工程、菌株诱变、增加底物分散度、优化发酵条件、细胞固定化和原位分离技术等进行了总结, 并在最后讨论了生物合成 γ -癸内酯存在的问题和未来的展望。

关键词: γ -癸内酯; 生物合成途径; 产量提升策略; β -氧化

文章编号: 1673-9078(2024)09-379-387

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.1059

Research Progress on Biosynthesis Pathway and Yproduction Enhancement Strategies of γ -decalactone

HU Junpeng¹, CHEN Rongqiao¹, LIANG Ming¹, XIAN Yanping¹, WU Yuluan^{1*},
BAI Weidong², HOU Xiangchang¹

(1. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou City Research Center of Risk Dynamic Detection and Early Warning for Food Safety, Guangzhou City Key Laboratory of Detection Technology for Food Safety, Collaborative Innovation Center for NQI-Quality Safety of Guangzhou, Guangzhou 511447, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: γ -Decalactone (GDL), a lactone compound, contains flavors reminiscent of coconut, cream, and peach. It naturally occurs in fruits and fermented products and is widely used in edible flavors, cosmetics, and chemical industries. Natural γ -decalactone supply is insufficient to meet the increasing demand of consumers. γ -decalactone obtained by chemical synthesizing are racemes with no optical activity, low safety, and are harmful to the environment. However, γ -decalactone synthesized using biological fermentation has a similar structure and is naturally equivalent to that of naturally

引文格式:

胡均鹏,陈荣桥,梁明,等. γ -癸内酯的生物合成途径及产量提升策略研究进展[J].现代食品科技,2024,40(9):379-387.

HU Junpeng, CHEN Rongqiao, LIANG Ming, et al. Research progress on biosynthesis pathway and yproduction enhancement strategies of γ -decalactone [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 379-387.

收稿日期: 2023-09-06

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2022B0202050003)

作者简介: 胡均鹏 (1994-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品安全, E-mail: 572215329@qq.com

通讯作者: 吴玉奎 (1965-), 女, 博士, 教授级高工, 研究方向: 食品安全及风险预警的研究, E-mail: iyanfa@163.com

extracted γ -decalactone obtained from plants and fruits; presenting high popularity among consumers. Hence, the microbial biosynthesis of γ -decalactone presents a vast research prospect. This article reviews the biosynthesis pathways of γ -decalactone and summarizes production enhancement strategies, such as genetic engineering, strain mutagenesis, increasing substrate dispersion, optimizing fermentation conditions, cell immobilization, and in situ product removal. Finally, the current challenges and future prospects of the biosynthesis of γ -decalactone are discussed.

Key words: γ -decalactone (GDL), biosynthesis pathway, production enhancement strategies, β -oxidation

γ -癸内酯 (γ -Decalactone, GDL) 天然存在于椰子、桃子等水果和一些发酵食品中, 由于其独特的奶香和水果香气, 广泛应用于香精香料行业中^[1]。早在 1969 年, γ -癸内酯被美国食品药品监督管理局 (FDA) 认证为安全食品和药品添加剂^[2]。 γ -癸内酯的制备方法有化学合成法、植物提取法和微生物法^[3]。化学合成法生产工艺复杂, 条件苛刻, 会产生有毒的废弃物, 对环境不友好, 并且不能等同于天然化合物。随着全球生活水平的提高, 消费者越来越关注香精香料的来源、种类和质量, 并且更加倾向于天然化合物^[4]。因此, 从植物中提取天然的 γ -癸内酯由于其安全性而受到消费者的青睐。然而, 从植物中提取 γ -癸内酯仍然存在许多缺点, 如产量低、价格昂贵、季节性环境影响以及植物中存在毒素^[5]。相比之下, 利用微生物合成的 γ -癸内酯被认为是天然产物, 而且生产方法更加经济和环保^[6]。目前, 国内外用来合成 γ -癸内酯的菌株有: 解脂耶氏酵母 (*Yarrowia sp.*)^[7,8]、假丝酵母 (*Candida sp.*)^[9]、毕赤酵母 (*Pichia sp.*)^[10]、锁掷胞酵母 (*Sporidiobolus sp.*)^[11]、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等^[12,13]。其中, 解脂耶氏酵母可以有效的利用疏水底物作为碳源进行生长和产物合成, 具有较强的甘油和烷烃代谢能力。此外, 这类酵母对 pH 值、渗透压和发酵抑制剂有很高的耐受性。基于这些优点, 解脂耶氏酵母已经成为合成各种天然化合物的细胞工厂^[14,15]。因此, 相比于其他微生物, 解脂耶氏酵母具有更高的 γ -癸内酯合成能力。本文综述了 γ -癸内酯的生物合成途径, 并对目前的产量提升策略进行了总结, 最后讨论了生物合成 γ -癸内酯目前所面临的挑战和未来的展望。

1 生物合成途径

利用微生物转化合成 γ -癸内酯, 首先以羟基脂肪酸、非羟基脂肪酸和脂肪酸酯为底物, 然后通过 β -氧化反应生成前体物质 4-羟基癸酸, 最后 4-羟基癸酸经羟基和羧基脱水内酯化后形成 γ -癸内酯^[16]。

目前研究大多数使用解脂耶氏酵母代谢蓖麻油生成 γ -癸内酯, 蓖麻油酸到 γ -癸内酯的代谢途径如图 1 所示^[17], 蓖麻油在脂肪酶的作用下转化为蓖麻油酸, 蓖麻油酸经过 4 次 β -氧化反应, 使脂肪酸长链切下 8 个碳原子单元, 生成前体物质 4-羟基癸酸, 最后在酸性条件下内酯化形成 γ -癸内酯。

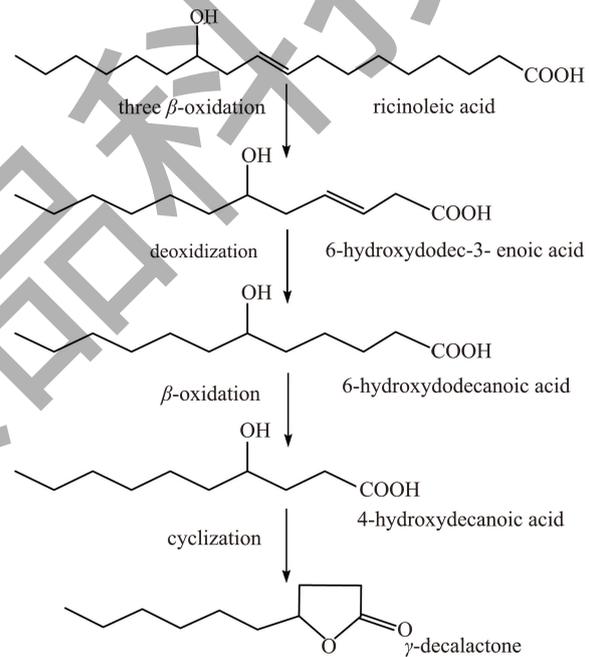


图 1 蓖麻油酸转化生成 γ -癸内酯的代谢途径

Fig.1 Metabolic pathway of ricinoleic acid to γ -decalactone

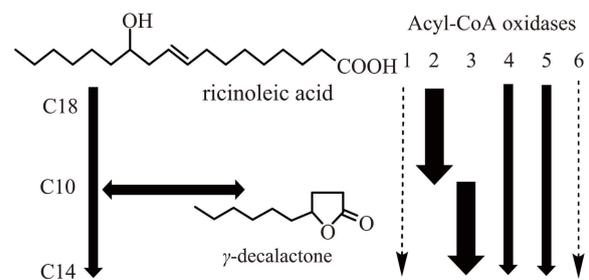


图 2 不同酰基 CoA 氧化酶在 β -氧化过程中的底物特异性

Fig.2 Substrate specificity of acyl-CoA oxidases in β -oxidation

β -氧化反应包括四步反应: 酰基辅酶 A 氧化酶催化的氧化反应、烯酰辅酶 A 氧化酶催化的水合反应、3-羟基辅酶 A 脱氢酶催化的脱氢反应和 3-酮

酰-CoA 硫解酶催化的硫解反应^[18]。其中 β -氧化的首步反应是决定 γ -癸内酯最终产量的关键步骤,催化此反应步骤的酰基辅酶 A 氧化酶,具有 6 个同工酶, Aox1-Aox6, 由 *POX1-POX6* 等基因进行编码表达^[19], 如图 2 所示, 不同酰基 CoA 氧化酶在 β -氧化过程展出不同的底物特异性。Aox2 酶对 C10-C18 的长链脂肪酸有很强的特异性^[20], Aox3 酶对 C4-C10 的短链脂肪酸有很强的特异性^[21,22]。由于 Aox3 酶对短链脂肪酸存较强的特异性, 因此会参与到 γ -癸内酯的降解反应中, 从而降低 γ -癸内酯的最终产量。Aox1 酶和 Aox6 酶对直链酰基 CoA 无活性, Aox4 酶和 Aox5 酶虽然没有 Aox2 酶和 Aox3 酶的高氧化活性, 但对 C4-C18 的非支链脂肪酸中仍具有一定的活性^[23]。生物转化合成 γ -癸内酯的过程中, 由于存在多种代谢途径, 产物产量达到峰值后, 然后逐渐降低, 这与参与 β -氧化反应的关键酶有关, 特别是酰基辅酶 A 氧化酶。如上所述, Aox3 酶对短链脂肪酸存较强的特异性, 可以将 γ -癸内酯降解为乙酰辅酶 A, 因而, 增强 Aox2 酶的活性并降低 Aox3 酶的活性是提高 γ -癸内酯产量的有效手段。此外, γ -内酯酶可以打开 γ -癸内酯的环, 酵母细胞通过 β -氧化降解相应的开环产物。因此, 深入研究 β -氧化途径和不同酰基辅酶 A 氧化酶的活性是构建不同 γ -癸内酯高产菌株的首要条件。

2 产量提升策略

基于 γ -癸内酯的微生物转化合成机理, 目前的产量提升策略主要包括: 基因工程、菌株诱变、增加底物分散度、优化发酵条件、细胞固定化和原位分离技术等, 最终达到提高 γ -癸内酯产量的目的。

2.1 基因工程

基因工程是在分子水平上对基因进行操作的复杂技术, 通过敲除、扩增或新增某个基因片段, 对菌株进行改造, 从而获得新品种。如前所述, 解脂耶氏酵母中的 β -氧化由 4 种酶催化, 酰基辅酶 A 氧化酶、烯酰辅酶 A 氧化酶、3-羟基辅酶 A 脱氢酶和 3-酮酰-CoA 硫解酶。其中酰基辅酶 A 氧化酶作为催化 β -氧化第一步反应的限速酶, 其酶活力的高低与 γ -癸内酯的最终产量有直接关系。

为了验证 6 个酰基辅酶 A 氧化酶 *POX1-POX6* 基因对解脂耶氏酵母产 γ -癸内酯的影响, 研究学者构建了单基因或多基因缺失的解脂耶氏酵母菌

株, 并检测了这些菌株产 γ -癸内酯的能力。Zhang 等^[24]通过敲除 *POX1*、*POX3*、*POX4*、*POX5*、*POX6* 基因后, 内酯产量有所减少, 仅为 0.27 g/L, 比原始菌株降低 26%。Malajowicz 等^[25]通过敲除 *POX3*、*POX4*、*POX5* 等基因, 构建工程菌株, γ -癸内酯产量提高了 2.53 倍, 达到了 5.50 g/L, 产率为 0.032 g/(L·h)。Silva 等^[26]以棉囊阿舒氏酵母 (*Ashbya gossypii*) 为出发菌株, 在过表达 *AgDES589* 基因和敲除 *AgELO624* 基因的基础上异源表达了 *YIPOX2* 基因构成新的菌株, γ -癸内酯的产量提高到 5.00 g/L。Braga 等^[27]通过敲除 *POX2-POX5* 基因和异位过表达 *POX2* 基因, 构建解脂耶氏酵母 MTLY40-2p 工程菌株, 最大程度上减少了 γ -癸内酯的降解, 并在此基础上, 过表达 *Lip2* 基因, 并采用渐进式加料策略, 最终 γ -癸内酯产量达到 7.00 g/L, 产率为 0.145 g/(L·h)。Guo 等^[28]通过同源重组技术, 通过在解脂耶氏酵母基因组中整合铜抗性基因 *CRF1*, 并敲除了 *POX3* 基因, 使 γ -癸内酯的产量提高了 2.8 倍, 从 0.19 g/L 增加到 0.53 g/L。在此基础上, 进一步对菌株进行改造重组, 获得了重组菌株 Tpp-11, 在该菌株的染色体过表达 *POX2* 基因, 并同时敲除 *POX3* 基因, 最终, γ -癸内酯的产量从 0.90 g/L 上升到 3.30 g/L^[29]。

在微生物体内, 脂肪酸不是以游离形式代谢, 而是经酰基辅酶 A 合成酶催化下转化为酰基辅酶 A, 随后参与到 β -氧化中。在解脂耶氏酵母中, *FAA1*、*FAA2*、*FAA3* 和 *FAT1* 基因负责游离脂肪酸的转化^[30]。Zhang 等^[24]研究表明, 过表达 *FAA1*、*FAA2* 和 *FAA3* 基因, 都可以提高解脂耶氏酵母利用蓖麻油转化合成 γ -癸内酯的能力, 其中上调 *FAA1* 基因, 内酯产量得到了显著提升, 可达到 1.70 g/L, 是原始菌株的 2.37 倍。另外还在奉化玉露桃品中分离出了 *AAT1* 基因, 并在解脂耶氏酵母中表达, γ -癸内酯产量提高了 32%, 达到 2.20 g/L。

2.2 菌株诱变

为了选育高产的 γ -癸内酯菌株, 一般采用诱变育种后再筛选的方式, 诱变育种可以分为化学诱变和物理诱变, 多种诱变因素结合在一起诱变又被称为复合诱变。另外, 运用物理或化学的手段促进菌株原生质体融合, 也是一种常用的诱变育种方法。苏畅等^[31]以解脂耶氏酵母 As 2.1405 为出发菌株, 经过复合诱变后, 筛选出一株高产菌株, 通过摇瓶发酵后, γ -癸内酯产量可达到 1.44 g/L, 产率为

0.030 g/(L·h)。徐勤等^[32]以毕赤酵母 TT009 为出发菌株, 对其进行原生质体紫外诱变后, 经过初筛和复筛后, 获得高产菌株 M6, 通过摇瓶发酵后, γ - 癸内酯的最大产量可以达到 1.25 g/L, 比原始菌株提高了 28.8%。

此外, 通过对菌株中参与羟基化反应的醇酰基转移酶 (*PpAAT1*) 进行定点突变, 可以提高 4-羟基癸酰 CoA 向 γ - 癸内酯的转化能力^[33]。Peng 等^[34]比较了高、低香气桃品种 (*Prunus persica*) 中醇酰基转移酶 (*PpAAT1*) 的活性, 并评估了它们对 γ - 癸内酯生成的影响。研究表明从高芳香桃子中提取的 *PpAAT1* 可以有效地催化 4-羟基癸酰 CoA 转化为 γ - 癸内酯。在此基础上, 进一步从桃子基因组中分离出五个 *AAT* 基因, 并在解脂耶氏酵母中表达, 结果发现只有表达了 *PpAAT1* 的菌株能产生 γ - 癸内酯, 其 γ - 癸内酯产量为 2.20 g/L, 是野生型菌株的 8 倍。

2.3 增加底物分散度

解脂耶氏酵母可以利用多种底物合成 γ - 癸内酯, 蓖麻油是最合适的底物, 其含有 86% 的蓖麻油酸, 很容易通过 β - 氧化途径转化为 γ - 癸内酯^[35]。由于蓖麻油来源于有毒植物, Soares 等^[36]尝试用粗甘油作为 γ - 癸内酯的生产底物。粗甘油是生物柴油生产过程中的副产物, 来源广泛且价格低廉。当培养基中添加 10% 的粗甘油时, 解脂耶氏酵母 CCMA0357 发酵 120 h 后, γ - 癸内酯的产量可达到 5.80 g/L。尽管用粗甘油为底物合成 γ - 癸内酯的产量低于蓖麻油, 但提供了一种底物选择思路^[37]。

蓖麻油、蓖麻油酸和蓖麻油酸甲酯作为底物时都具有共同的缺点, 这三种底物都难溶于水, 在培养基中容易聚集成团, 分散性很差, 酵母与底物的接触少, 从而降低了 γ - 癸内酯的产量。研究表明, 在培养基加入少量的表面活性剂, 可以增加底物的溶解度, 有利于酵母与底物的接触, 提高底物的利用率^[38]。因此, 选择一种菌体耐受性强且能有效增强底物溶解度的材料, 对提高菌体转化效率尤为重要。Chen 等^[13]采用了四种吸附材料 (SUNSIL-130NP 多孔二氧化硅、SUNSIL-130H 多孔二氧化硅、埃洛石和黏土) 来增强蓖麻油酸在介质中的分散度, 从而提高酵母菌株对底物的利用率, 结果表明, SUNSIL-130H 多孔二氧化硅具有最佳的分散效果, 转化合成的 γ - 癸内酯产量可达到 2.79 g/L, 转化过程的产率为 0.046 g/(L·h)。Guan 等^[39]研究了膨

胀蛭石作为蓖麻油酸载体时, 酵母菌株转化 γ - 癸内酯的效率, 结果表明, 膨胀蛭石对 γ - 癸内酯的生物转化具有更好的效果。在整个生物转化过程中, 膨胀蛭石作为一种受控递送剂不断释放蓖麻油酸, 从而提高了其利用效率。在含有膨胀蛭石的培养基中, γ - 癸内酯在 60 h 达到最高产量为 6.20 g/L, 比对照组高 50%。Rong 等^[40]用多孔淀粉对底物蓖麻油酸进行包埋预处理, 然后进行 γ - 癸内酯的生物转化, 结果显示, 包埋体系中 γ - 癸内酯的产量达到了 3.36 g/L, 比对照组增加了 17.5%。利用多孔淀粉对蓖麻油酸进行包埋处理, 一方面可以提高蓖麻油酸在整个体系中的分散度, 提高酵母细胞与底物的接触率。另一方面, 多孔淀粉的特定结构, 可以有效提高转化体系中溶氧传质速率, 增强酵母的 β - 氧化能力, 最终提高 γ - 癸内酯的产量。

2.4 优化发酵条件

通过优化发酵过程提高 γ - 癸内酯的产量, 主要包括以下几个方面, 控制发酵过程中的氧气传质速率, 从而提高酵母细胞的 β - 氧化能力^[41]; 采用分批补料发酵降低底物对酵母的毒害^[42]和添加脂肪酶加快蓖麻油的水解^[43]。

Try 等^[8]为了研究氧气浓度对解脂耶氏酵母 W29 在固态发酵中合成 γ - 内酯的影响, 使用具有不同初始氧气浓度的富氧空气进行了实验, 发现使用 30% 氧气浓度的生长动力学比其他条件更早达到稳定期, γ - 癸内酯产量可达到 0.27 g/L。此外, 该研究表明氧气可能优先用于长链脂肪酸氧化, 可以通过优化生长条件以达到非常高的生长速率来提高 γ - 癸内酯的产量, 然后在稳定生长期降低氧气浓度来抑制 γ - 癸内酯降解。Kothari 等^[41]利用连续搅拌反应器系统来合成 γ - 癸内酯, 通过优化发酵参数, γ - 癸内酯的产量可提高到 2.00 g/L。Malajowicz 等^[42]解脂耶氏酵母 KKP 379 为出发菌株, 运用田口方法优化了底物浓度、pH 和搅拌速度等因素, 在最优发酵条件下, 转化合成的 γ - 癸内酯最终产量可达到 2.93 g/L, 整个发酵生产过程的产率为 0.042 g/(L·h)。Gomes 等^[43]加入商业脂肪酶 Lipozyme TL IM 后, 可以有效促进蓖麻油的水解, 发酵 137 h 后 γ - 癸内酯的最大产量可达到 1.00 g/L。Braga 等^[44]研究了氧气传质速率对解脂耶氏酵母 W29 合成 γ - 癸内酯的影响, 结果表明, 较低的氧气传质速率可以提高最终产物的产量, 而较高的氧气传质速率可以缩短 γ - 癸内酯达到最大产量的时间, 提高合成

效率,使 γ -癸内酯的最大产量达到5.40 g/L。且后续研究发现,使用搅拌功率更大的反应器,氧气传质速率更高,进一步提高了 γ -癸内酯的产率,可达到0.075 g/(L·h)^[45]。

微生物转化合成 γ -癸内酯最直接的底物是蓖麻油酸,蓖麻油酸可以通过脂肪酶水解蓖麻油或蓖麻油酸甲酯获得,许多研究表明,添加脂肪酶来诱导底物的预水解,可以缩短 γ -癸内酯达到最大产量的时间。Braga等^[46]报道解脂耶氏酵母W29是生产脂肪酶的最佳菌株,预先诱导脂肪酶的表达可有效缩短 γ -癸内酯的合成时间。在此基础上,Braga等^[27]采用过表达*Lip2*基因策略构建解脂耶氏酵母JMY3010,使菌株能够产生更多的脂肪酶,更快地水解蓖麻油,从而加速 γ -癸内酯的合成。虽然细胞外脂肪酶可以对外源底物有很好的作用,但是需要细胞内脂肪酶来构建 γ -癸内酯合成途径,Dulermo等^[47]报道了解脂耶氏酵母的两种细胞内脂肪酶*TGL3*和*TGL4*可以有效地从甘油三酯中释放蓖麻油酸,其中*TGL4*是负责甘油三酯降解的主要脂肪酶,*TGL3*是*TGL4*的正调控因子。

2.5 细胞固定化

采用细胞固定化技术转化合成 γ -癸内酯能有效保护细胞,并在生物转化过程中保持细胞活性,降低底物和产物对酵母菌株的毒害作用以及产物的降解,加快发酵生产速率,提高底物利用率,从而提高生化转化体系中 γ -癸内酯的产量^[48]。

为了降低底物和产物对细胞的毒害作用, Lee等^[49]尝试用4种天然材料对鲑色锁掷酵母(*Sporidiobolus salmonicolor*)进行固定化合成 γ -癸内酯,研究结果表明,选用海藻酸盐固定化细胞进行合成 γ -癸内酯的效果最好,经过5 d转化后, γ -癸内酯的最大产量可达到131.80 mg/L。Zhang等^[50]使用细菌纤维素/海藻酸盐固定解脂耶氏酵母CGMCC 2.2087菌株合成 γ -癸内酯,结果表明,细菌纤维素/海藻酸盐载体的机械强度明显优于海藻酸盐载体,其内部嵌入的细胞模式变为相互连接的多孔结构,使得 γ -癸内酯的最终产量达到8.37 g/L,产率为0.348 g/(L·h)。Zhao等^[51]将解脂耶氏酵母G3-3.21菌株固定在凹凸棒石上合成 γ -癸内酯,优化发酵条件后, γ -癸内酯的最大产量可达到8.05 g/L,经过10次重复利用后, γ -癸内酯的产量还能达到

7.51 g/L。王梦泽^[52]采用凹凸棒石和海藻酸钠的混合物来固定酿酒酵母,在培养基中加入氯化钙重复循环5次,经过240 h转化后, γ -癸内酯的最高产量可达到5.44 g/L。Braga等^[53]将解脂耶氏酵母菌株固定在聚甲酸丙烯酸酯(DupUM)上合成 γ -癸内酯,使得 γ -癸内酯的产量从0.95 g/L增加到1.59 g/L。

2.6 原位分离技术

原位分离技术(In Situ Product Removal, ISPR)是降低产物对酵母菌株毒害的另一种有效方案,原位分离常用的介质分别为树脂和有机溶剂。原位分离技术是指在不伤害细胞的前提下将其代谢产物快速移走,以防止代谢产物抑制细胞生长的提取方法,又被称为“萃取发酵”或者“萃取转化”。

Zhao等^[51]使用了新型离子液来降低产物对解脂耶氏酵母G3-3.21菌株的毒害,可以使 γ -癸内酯的产量提高到8.05 g/L。王梦泽^[52]以解脂耶氏酵母MF-Y11为出发菌株,通过添加合适的有机溶剂,对生物转化过程中生成的 γ -癸内酯进行转相,解除产物对酵母菌株的抑制效应,从而提高 γ -癸内酯的产量。结果表明,环硅氧烷混合物(DC345)、聚丙二醇1000、聚丙二醇2000和正庚烷对 γ -癸内酯的生物转化均有正向作用,且添加DC345的实验组 γ -癸内酯产量最高,可以达到3.85 g/L,并进一步优化DC345的添加量,当添加量为30% (V/V)时, γ -癸内酯的最大产量可达到5.35 g/L,此时的产率为0.111 g/(L·h)。Malajowicz等^[54]比较了液-液萃取、蒸馏和吸附等三种技术在 γ -癸内酯回收中的有效性,考虑到工艺的选择性和回收效率,最终选择Amberlite XAD-4树脂来吸附 γ -癸内酯实现产物分离。在该树脂上吸附6 h后,生物转化介质中残留的内酯不足1%。 γ -癸内酯在树脂上的吸附尤其基于范德华力的作用,使得 γ -癸内酯能够快速吸附和轻松解吸,最终 γ -癸内酯的产量提高到2.45 g/L。Alchihab等^[55]以橙黄红酵母(*R.aurantiaca*)为出发菌株,考察了三种大孔树脂(MN-202, MN-102和MN-100)在转化体系中对 γ -癸内酯的吸附效果,三种树脂的吸附效率分别为85%、75%、81%,最大产量可以达到6.50 g/L。6种产量提升策略及对应 γ -癸内酯产量情况如表1所示。

表 1 产量提升策略与对应 γ -癸内酯产量

Table 1 Yield enhancement strategies and corresponding γ -decalactone production

产量提升策略	菌株	实验方法	产量 / (g/L)	产率 / [g/(L·h)]	参考文献
基因工程	解脂耶氏酵母 Polg	敲除 <i>POX1</i> 、 <i>POX3</i> 、 <i>POX4</i> 、 <i>POX5</i> 、 <i>POX6</i> 基因	0.27	0.004	[24]
	解脂耶氏酵母 YL013-250	过表达脂肪酰基辅酶 A 的 <i>FAA1</i> 基因	1.70	0.023	[24]
	解脂耶氏酵母 YL022	过表达醇酰基转移酶的 <i>AAT1</i> 基因	2.20	0.031	[24]
	解脂耶氏酵母 MTLY40-2p	敲除 <i>POX3</i> 、 <i>POX4</i> 、 <i>POX5</i> 基因	5.50	0.032	[25]
	棉囊阿舒氏酵母	过表达 <i>AgDES589</i> 和敲除 <i>AgELO624</i> 基因，异位表达 <i>YIPOX2</i> 基因	5.00	0.104	[26]
	解脂耶氏酵母 MTLY40-2p	敲除 <i>POX2-POX5</i> 基因和异位过表达 <i>POX2</i> 基因	7.00	0.145	[27]
	解脂耶氏酵母 As2.1045	整合铜抗性基因 <i>CRF1</i> ，敲除 <i>POX3</i> 基因	0.53	0.011	[28]
菌株诱变	解脂耶氏酵母 Tpp-11	过表达 <i>POX2</i> 基因，敲除 <i>POX3</i> 基因	3.30	0.027	[29]
	解脂耶氏酵母 As2.1045	复合诱变	1.44	0.030	[31]
	毕赤酵母 M6	紫外诱变	1.25	0.016	[32]
增加底物分散度	农杆菌菌株 GV3101	定点突变 <i>PpAAT1</i>	/	/	[33]
	酿酒酵母 MF-Y11	添加多孔二氧化硅，提高底物在介质中的分散度	2.79	0.046	[13]
	解脂耶氏酵母 CGMCC 2.2087	添加膨胀蛭石，增加底物在培养基中的分散和控制释放	6.20	0.103	[39]
优化发酵条件	解脂耶氏酵母 CGMCC 2.2087	多孔淀粉来吸附包埋蓖麻油酸	3.36	0.140	[40]
	解脂耶氏酵母 W29	固态发酵系统溶解氧浓度 30%	0.27	0.004	[8]
	解脂耶氏酵母 NCIM 3590	持续搅拌通气	2.00	0.200	[41]
	解脂耶氏酵母 KKP 379	分批发酵	2.93	0.042	[42]
	解脂耶氏酵母 W29	添加脂肪酶	1.00	0.007	[43]
	解脂耶氏酵母 W29	提高氧气传质速率，底物分批培养	5.40	0.225	[44]
	解脂耶氏酵母 W29	提高氧气传质速率	/	0.075	[45]
细胞固定化	解脂耶氏酵母 W29	诱导脂肪酶的表达	1.60	0.033	[46]
	鲑色锁椰酵母 CCRC 21975	海藻酸盐固定酵母细胞	0.13	0.001	[49]
	解脂耶氏酵母 CGMCC 2.2087	细菌纤维素 / 海藻酸盐固定酵母细胞	8.37	0.348	[50]
	解脂耶氏酵母 G3-3.21	凹凸棒石固定酵母细胞	8.05	0.168	[51]
原位分离技术	酿酒酵母 MF-Y11	凹凸棒石和海藻酸钠的混合物固定酵母细胞	5.44	0.113	[52]
	解脂耶氏酵母 ATCC20460	聚甲酸丙烯酸酯 (DupUM) 固定酵母细胞	1.59	0.033	[53]
	解脂耶氏酵母 G3-3.21	新型离子液体四氟硼酸正丁基吡啶盐	8.05	0.168	[51]
	酿酒酵母 MF-Y11	添加环戊硅氧烷和环己硅氧烷	5.35	0.111	[52]
	解脂耶氏酵母 KKP 379	添加 Amberlite XAD-4 树脂	2.45	0.102	[54]
	橙黄红酵母	加入大孔树脂	6.50	/	[55]

3 总结与展望

目前,大多数香料化合物是化学合成或从动植物天然来源中提取的。但近年来生物技术的发展极大推进了香料产业的进步,不断寻求新的方法来获得天然的香料。基于微生物转化合成香料化合物提供了一个很好的思路。本文综述 γ -癸内酯的生物合成途径,并对目前的产量提升策略如基因工程、菌株诱变、增加底物分散度、优化发酵条件、细胞固定化和原位分离技术等进行了总结,展望了 γ -癸内酯微生物转化合成的研究方向。

解脂耶氏酵母转化合成 γ -癸内酯的底物多为蓖麻油、蓖麻油酸和蓖麻油酸甲酯,然而,在解脂耶氏酵母能够大规模合成这种香料化合物的过程中,仍有许多问题需要解决。首先,蓖麻油是从蓖麻籽中提取出来的,蓖麻籽是植物蓖麻的种子,虽然蓖麻油作为一种重要的工业原料有着广泛的应用,但是蓖麻中含有剧毒的蓖麻毒蛋白和蓖麻碱。因此,寻找新的底物是工业上大规模合成 γ -癸内酯的重要策略。油酸作为一种单不饱和脂肪酸,占野生型解脂耶氏酵母总脂肪酸的37.23%,油酸除了在工业、医药等领域具有很高的价值外,还可以作为平台化合物用于其他脂肪酸的生产。此外,棉病囊菌(*Ashbya gossypii*)能以葡萄糖为碳源从头合成 γ -癸内酯,虽然目前没有关于解脂耶氏酵母从头合成 γ -癸内酯的报道,但已有关于解脂耶氏酵母高产油酸,从头合成蓖麻油酸的研究,利用代谢工程策略,通过组合脂肪酸合成途径和 β -氧化途径,尝试在解脂耶氏酵母中实现 γ -癸内酯的从头合成。还可以尝试筛选新型吸附包埋材料来解除产物的抑制作用,缩短生物转化时间,提高合成效率。另外,有机溶剂的毒性也不可忽视,需要进一步筛选适合转化体系的有机溶剂。与此同时,随着代谢工程技术的发展,可以结合转录组学分析酵母菌的分子机制,深入研究菌株细胞控制 β -氧化过程的基因片段,提高酵母菌株的底物耐受性,进一步提高合成 γ -癸内酯的效率。

利用生物转化的方式可以提供稳定和可持续的 γ -癸内酯,其质量稳定、反应条件温和,底物来源广泛、产物可降解,符合当下的绿色化学合成理念,随着合成生物学和相关生物技术的不断突破发展,以及相应提取分离技术的革新,微生物合成 γ -癸内酯将更具有发展前景。

参考文献

- [1] SINGH S, SHARMA S, SARMA S J, et al. A comprehensive review of castor oil-derived renewable and sustainable industrial products [J]. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 2023, 42(2): 14008-14021.
- [2] CAO C, GAO J, ZHU B, et al. Engineering yeast for bio-production of food ingredients [J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2023, 3(1): 2-11.
- [3] SYED N, SINGH S, CHATURVEDI S, et al. Production of lactones for flavoring and pharmacological purposes from unsaturated lipids: an industrial perspective [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022: 15(2): 1-32.
- [4] SARTORI S K, DIAZ M A N, DIAZ M G. Lactones: classification, synthesis, biological activities, and industrial applications [J]. *Tetrahedron*, 2021, 84(9): 132001-132040.
- [5] SILVA R, COELHO E, AGUIAR T Q, et al. Microbial biosynthesis of lactones: gaps and opportunities towards sustainable production [J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(18): 8500-8522.
- [6] JI X J, LEDESMA R. Microbial lipid biotechnology to produce polyunsaturated fatty acids [J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(8): 832-834.
- [7] LIU H, SONG Y, FAN X, et al. *Yarrowia lipolytica* as an oleaginous platform for the production of value-added fatty acid-based bioproducts [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11(6): 1-13.
- [8] TRY S, VOILLEY A, CHUNHIENG T, et al. Effect of elevated oxygen concentration on the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of gamma-decalactones in solid state fermentation [J]. *Fermentation Basel*, 2023, 9(6): 532-546.
- [9] ENDRIZZI A, BELIN J. Bioconversion of methyl ricinoleate to 4-hydroxy-decanoic acid and to gamma-decalactone by yeasts of the *Genus candida* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1995, 35(5): 285-292.
- [10] IACAZIO G, MARTINI D, FAURE B, et al. Isolation and characterisation of 8-hydroxy-3z,5z-tetradecadienoic acid, a putative intermediate in *Pichia guilliermondii* gamma-decalactone biosynthesis from ricinoleic acid [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2002, 209(1): 57-62.
- [11] KOT A, KIELISZEK M, PIWOWAREK K, et al. *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus*-non-conventional yeasts for use in industries [J]. *Fungal Biology Reviews*, 2021, 37(3): 41-58.
- [12] RONG S, YANG S, LI Q, et al. Improvement of γ -decalactone production by stimulating the import of ricinoleic acid and suppressing the degradation of γ -decalactone in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2017, 35(2): 96-102.
- [13] CHEN J, TANG Y, ZHANG S. Comparison of production of

- gamma-decalactone via microbial biotransformation based on different adsorption-embedding systems [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2023, 70(3): 1245-1257.
- [14] WANG K, SHI TQ, LIN L, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce tailored chain-length fatty acids and their derivatives [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(8): 2564-2577.
- [15] PAULINO B N, SALES A, FELIPE L, et al. Recent advances in the microbial and enzymatic production of aroma compounds [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2021, 37: 98-106.
- [16] 田怀香,杨睿,荣绍丰,等.内酯类香料的微生物法转化制备及其调控研究进展[J].食品工业科技,2022,43(13):9-16.
- [17] 张俊杰.初探酵母MF-Y11转化 γ -癸内酯的环化机制[D].上海:上海应用技术大学,2019.
- [18] BRAGA A, GUERREIRO C, BELO I. Generation of flavors and fragrances through biotransformation and de novo synthesis [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2018, 11(12): 2217-2228.
- [19] PARK G, KIM Y C, JANG M, et al. Biosynthesis of aliphatic plastic monomers with amino residues in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 10(2): 168-178.
- [20] FABISZEWSKA A, PAPLIŃSKAG M, MISIUKIEWICZS P, et al. Expression profile of selected genes involved in storage lipid synthesis in a model oleaginous yeast species *Yarrowia lipolytica* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1041-1052.
- [21] BANKAR A, JADHAV L, PHALKE V. Metagenomic insights of *Yarrowia lipolytica* in food industry [J]. *Metagenomic Systems Biology: Integrative Analysis of the Microbiome*, 2020: 16(3): 159-183.
- [22] MALAJOWICZ J, KOZLOWSKA M. Factors affecting the yield in formation of fat-derived fragrance compounds by *Yarrowia lipolytica* yeast [J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(21): 148-161.
- [23] YU Y, ZHOU Y, WANG K, et al. Metabolic and process engineering for producing the peach-like aroma compound γ -decalactone in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(1): 110-120.
- [24] ZHANG M, LI Q, FAN F, et al. Combinatorial metabolic engineering and tolerance evolution of *Yarrowia lipolytica* for improved γ -decalactone synthesis [J]. *Process Biochemistry*, 2023, 132(15): 248-254.
- [25] MALAJOWICZ J, NOWAK D, FABISZEWSKA A, et al. Comparison of gamma-decalactone biosynthesis by yeast *Yarrowia lipolytica* Mtly40-2p and W29 in batchcultures [J]. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2020, 34(1): 330-340.
- [26] SILVA R, AGUIAR T Q, COELHO E, et al. Metabolic engineering of *Ashbya gossypii* for deciphering the de novo biosynthesis of gamma-lactones [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(5): 62-73.
- [27] BRAGA A, CRUTZLE A M, DULERMO R, et al. Effect of *Pox* genotype and *Lip2p* overexpression on lactone production and reconsumption by *Yarrowia lipolytica* using castor oil as substrate [J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(9): 1357-1362.
- [28] GUO Y, FENG C, SONG H, et al. Effect of *Pox3* gene disruption using self-cloning *Crfl* cassette in *Yarrowia lipolytica* on the γ -decalactone production [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(12): 2807-2812.
- [29] GUO Y, SONG H, WANG Z, et al. Expression of *Pox2* gene and disruption of *Pox3* genes in the industrial *Yarrowia lipolytica* on the γ -decalactone production [J]. *Microbiological Research*, 2012, 167(4): 246-252.
- [30] ZHANG G, ZHANG C, WANG Z, et al. Dual β -oxidation pathway and transcription factor engineering for methyl ketones production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73(12): 225-234.
- [31] 苏畅,陈洪,潘仙华.复合诱变选育 γ -癸内酯高产菌的研究[J].食品科技,2010,35(10):20-23.
- [32] 徐勤,王昌禄,李凤娟,等.原生质体紫外诱变选育 γ -癸内酯高产菌株[J].生物技术通报,2010,5:189-191.
- [33] SONG Z Z, PENG B, GU Z X, et al. Site-directed mutagenesis identified the key active site residues of alcohol acyltransferase *Ppaat1* responsible for aroma biosynthesis in peach fruits [J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 32-42.
- [34] PENG B, XU J, CAI Z, et al. Different roles of the five alcohol acyltransferases in peach fruit aroma development [J]. *Journal of The American Society for Horticultural Science*, 2020, 145(6): 374-381.
- [35] ABDEL A M, MARKHAM K A, PALMER C M, et al. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica* [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50(21): 192-208.
- [36] SOARES G P A, SOUZA K S T, VILELA L F, et al. γ -decalactone production by *Yarrowia lipolytica* and *Lindnera saturnus* in crude glycerol [J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 47(6): 633-637.
- [37] Andrade D P De, CARVALHO B F, SCHWAN R F, et al. Production of gamma-decalactone by yeast strains under different conditions [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2017, 55(2): 225-230.
- [38] AL Mualad W N A, BOUCHEDJA D N, SELMANIA A, et al. Yeast *Yarrowia lipolytica* as a biofactory for the production of lactone-type aroma gamma-decalactone using castor oil as substrate [J]. *Chemical Papers*, 2022, 76(12): 7715-7728.
- [39] GUAN S, RONG S, WANG M, et al. Enhanced biotransformation productivity of gamma-decalactone from ricinoleic acid based on the expanded vermiculite delivery

- system [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(7): 1071-1077.
- [40] RONG S, WANG M, YANG S, et al. Improvement in lactone production from biotransformation of ricinoleic acid based on the porous starch delivery system [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2018, 93(4): 1198-1205.
- [41] KOTHARI S D, VADGAMA R N, BHAT K H, et al. Process optimization for production and purification of γ -decalactone from ricinoleic acid using *Yarrowia lipolytica* Ncim 3590 [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2022, 39(8): 102285-102296.
- [42] MALAJOWICZ J, FABISZEWSKA A, NOWAK D, et al. Improved gamma-decalactone synthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast using taguchi robust design method [J]. *Applied Sciences* Basel, 2022, 12(20): 10231-10247.
- [43] GOMES N, BRAGA A, TEIXEIRA J A, et al. Impact of lipase-mediated hydrolysis of castor oil on γ -decalactone production by *Yarrowia lipolytica* [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2013, 90(8): 1131-1137.
- [44] BRAGA A, BELO I. Production of γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*: insights into experimental conditions and operating mode optimization [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2015, 90(3): 559-565.
- [45] BRAGA A, MESQUITA D P, AMARAL A L, et al. Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: differences in yeast metabolism and morphology [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 93(21): 55-62.
- [46] BRAGA A, GOMES N, BELO I. Lipase induction in *Yarrowia lipolytica* for castor oil hydrolysis and its effect on γ -decalactone production [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2012, 89(6): 1041-1047.
- [47] DULERMO T, TRÉTON B, BEOPOULOS A, et al. Characterization of the two intracellular lipases of *Y. lipolytica* encoded by *Tgl3* and *Tgl4* genes: new insights into the role of intracellular lipases and lipid body organization [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1831(9): 1486-1495.
- [48] 王晖, 薛庆节, 杨媛媛, 等. 解脂耶氏酵母在食品工业中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(8): 291-297.
- [49] LEE S L, CHENG H Y. Production of γ -decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor* [J]. *Process Biochemistry*, 1998, 33(4): 453-459.
- [50] ZHANG S, HE H, GUAN S, et al. Bacterial cellulosealginate composite beads as *Yarrowia lipolytica* cell carriers for lactone production [J]. *Molecules*, Basel, 2020, 25(4): 928-942.
- [51] ZHAO Y, XU Y, JIANG C. Efficient biosynthesis of γ -decalactone in ionic liquids by immobilized whole cells of *Yarrowia lipolytica* G3-3.21 on attapulgitite [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(10): 2045-2052.
- [52] 王梦泽. 酵母ME-Y11转化蓖麻油酸制备 γ -癸内酯的工艺研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2018.
- [53] BRAGA A, BELO I. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* for aroma production from castor oil [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(7): 2202-2211.
- [54] MALAJOWICZ J, GÓRSKA A, BRYŚ J, et al. Attempt to develop an effective method for the separation of gamma-decalactone from biotransformation medium [J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(4): 2084-2098.
- [55] ALCHIHAB M, ALDRIC JM, AGUEDO M, et al. The use of macronet resins to recover γ -decalactone produced by *Rhodotorula aurantiaca* from the culture broth [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2010, 37(2): 167-172.