

同行专家业内评价意见书编号：20250856129

附件1

浙江工程师学院（浙江大学工程师学院） 同行专家业内评价意见书

姓名：刘淑贤

学号：22260436

申报工程师职称专业类别（领域）：材料与化工

浙江工程师学院（浙江大学工程师学院）制

2025年05月29日

填表说明

一、本报告中相关的技术或数据如涉及知识产权保护、军工项目保密等内容，请作脱密处理。

二、请用宋体小四字号撰写本报告，可另行附页或增加页数，A4纸双面打印。

三、表中所涉及的签名都必须用蓝、黑色墨水笔，亲笔签名或签字章，不可以打印代替。

四、同行专家业内评价意见书编号由工程师学院填写，编号规则为：年份4位+申报工程师职称专业类别(领域)4位+流水号3位，共11位。

一、个人申报

(一) 基本情况【围绕《浙江工程师学院(浙江大学工程师学院)工程类专业学位研究生工程师职称评审参考指标》，结合该专业类别(领域)工程师职称评审相关标准，举例说明】

1. 对本专业基础理论知识和专业技术知识掌握情况(不少于200字)

通过课程学习，系统掌握了以分子生物学、生物化学、反应工程和工程数值分析等为核心的专业基础知识，具备了解析基因调控网络、构建代谢动力学模型以及利用合成生物学原理设计工程菌株的能力。通过专业实践及科研项目的训练，熟练掌握了序列比对、定向进化和理性设计、高通量筛选、基因编辑、发酵过程控制等技术手段，独立完成了从代谢途径设计、酶分子改造、质粒与菌株构建、代谢产物分析和发酵过程优化到产物分离纯化的微生物细胞工厂生产天然产物的全流程工艺开发。

2. 工程实践的经历(不少于200字)

项目名称：重组酿酒酵母合成菜油甾醇。

项目目标：菜油甾醇是一种重要的植物甾醇，具有多种生理功能和活性，还可转化为许多重要的甾体化合物，如黄体酮、雄烯二酮和氢化可的松。菜油甾醇及其衍生物被广泛应用于功能性食品和药物。目前菜油甾醇的制备方法主要是从植物油中提取出混合植物甾醇，再进一步分离纯化。但是，混合植物甾醇成分复杂，且菜油甾醇在其中的占比很低，导致分离纯化成本高。本项目拟在微生物中构建天然菜油甾醇合成途径，并通过菌株改造和发酵优化来提高菜油甾醇产量，以实现菜油甾醇的规模化生产。

项目内容：1) 天然菜油甾醇在酿酒酵母中的人工合成途径构建：在酿酒酵母麦角甾醇生物合成途径的基础上，敲除内源的C24(28)-甾醇还原酶ERG4，同时引入动物来源的C7-甾醇还原酶DHCR7和植物来源的C24(28)甾醇还原酶DWF1，将麦角甾醇的合成途径改造为菜油甾醇的合成途径；2) 人工合成途径的优化和强化：通过敲除竞争途径中的C22-甾醇还原酶ERG5，减少碳代谢分流，通过密码子优化以及启动子替换等方法优化酶的表达，提升菜油甾醇的代谢合成通量；3) 甾醇稳态调控：通过调控甾醇储存相关的基因，增加下游甾醇的代谢通量，从而进一步提高菜油甾醇产量。4) 关键酶的区室化多拷贝过表达：通过将多个关键酶拷贝分别定位到过氧化物酶体和脂滴等亚细胞器，增强酶与各区室中底物的有效接触以提高菜油甾醇产量；5) 重组菌株的高密度发酵：在5 L发酵罐中，采用基于拟指数补料的补料分批发酵策略，优化重组菌的细胞生长和合成代谢行为，实现菜油甾醇的高效生产。

3. 在实际工作中综合运用所学知识解决复杂工程问题的案例(不少于1000字)

近年来，合成生物学技术的快速发展使得利用微生物细胞工厂大量合成稀有天然产物或其半合成前体成为可能。相对于传统的植物提取法和化学全合成法，利用微生物合成稀有天然产物或其半合成前体具有原料易得、合成效率高、废弃物排放少、原料多源于可再生生物质资源等显著优点，符合可持续发展理念。特别是，生物合成可以专一性地精准合成具有多个不对称碳原子的复杂分子，在医药、材料等领域展现出巨大的潜力。本工程实践项目在酿酒酵母的麦角甾醇合成途径的基础上，用合成生物学手段重构其甾醇合成代谢网络，以构建能够合成菜油甾醇的重组酿酒酵母菌株，实现天然菜油甾醇的生物合成。

不同产物的生产适合利用不同的底盘细胞。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是公认安全的微生物；易于培养，遗传操作手段成熟，CRISPR技术可精准操控代谢通路；耐高糖、乙醇和酸性环境，适配高密度发酵，兼具好氧和兼性厌氧代谢灵活性。此外，酿酒酵母细胞体内存在着天然的麦角甾醇合成途径，而菜油甾醇和麦角甾醇结构高度相似，可通过引入动物来源的DHCR7和植物来源的DWF1，同时敲除内源基因ERG4，实现天然

菜油甾醇在酿酒酵母中生物合成。对于两个关键的外源酶，选择了文献报道的具有较高催化活性的来源于*Danio rerio*的DrDHC7，以及作者所在实验室前期研究中来源于*Ajuga reptans*的ArDWF1的三点突变体（Ar207）。本项目利用CRISPR/Cas9基因编辑方法进行上述基因的敲除和引入，成功合成天然构型的菜油甾醇。副产物会分流碳代谢流，影响产物产量，为此，本研究还敲除了竞争途径基因ERG5（编码C22-甾醇还原酶），菌株生长不受影响，菜油甾醇产量提高了1.96倍。

在实际应用中，由于引入的酶并不属于酵母本身，其表达会受到一定程度的限制，因此外源酶在酿酒酵母中的表达十分重要。针对两个外源酶，分别筛选了不同类型的启动子来优化表达，包括组成型启动子和诱导型启动子，最优组合下，菜油甾醇产量提升了2.52倍。

在酿酒酵母中，生成的甾醇会先和脂肪酸结合，再储存脂滴中。脂滴的组成主要为中性脂质（甘油三酯和甾醇酯）构成的疏水核心。通过激活脂肪酸合成途径限速酶——乙酰-CoA羧化酶（ACC1），可以提升胞内脂质前体容量，进而实现甾醇酯在脂滴中的稳定积累。

过量游离甾醇的积累对酵母细胞有毒性，通过调控酰基转移酶和甾醇酯水解酶，使得上游甾醇尽可能以游离的形式存在从而参与反应，而下游甾醇则更多地以甾醇酯的形式存在。通过这种调控甾醇稳态的技术手段，菜油甾醇产量提升了16.5%。

通过分析代谢产物，发现细胞中Ar207的前体底物含量仍然较高，说明Ar207是该合成途径的关键限速酶。为了进一步提高产量，选择增加一个定位到过氧化物酶体或脂滴的Ar207的拷贝，在提高酶表达量的同时改善酶的分布。定位到过氧化物酶体的菌株菜油甾醇产量提升了31.5%，定位到脂滴提升了23.5%，两者前体含量都明显下降。通过高密度发酵，两个改造菌株菜油甾醇产量都达到3 g/l以上，远高于此前国际上文献报道的最高产量。研究成果已经申请发明专利并撰写论文待发表。

在本次专业实践中，我深刻意识到，一个工程项目的顺利完成除了需要灵活掌握和应用基础理论知识，还需要不断实践、不断尝试、不断反思，对失败保持良好心态，并从中总结经验教训。

(三) 在校期间课程、专业实践训练及学位论文相关情况	
课程成绩情况	按课程学分核算的平均成绩： 86 分
专业实践训练时间及考核情况(具有三年及以上工作经历的不作要求)	累计时间： 1 年(要求1年及以上) 考核成绩： 83 分
本人承诺	
个人声明：本人上述所填资料均为真实有效，如有虚假，愿承担一切责任，特此声明！ 申报人签名： 刘叔贤	

二、日常表现考核评价及申报材料审核公示结果

日常表现 考核评价	非定向生由德育导师考核评价、定向生由所在工作单位考核评价： ☒ 优秀 ☐ 良好 ☐ 合格 ☐ 不合格 德育导师/定向生所在工作单位分管领导签字（公章）：wfb 2025.5.29 年 月 日
申报材料 审核公示	根据评审条件，工程师学院已对申报人员进行材料审核（学位课程成绩、专业实践训练时间及考核、学位论文、代表作等情况），并将符合要求的申报材料在学院网站公示不少于5个工作日，具体公示结果如下： ☐ 通过 ☐ 不通过（具体原因： 工程师学院教学管理办公室审核签字（公章）： 年 月 日

浙江大学研究生院
攻读硕士学位研究生成绩表

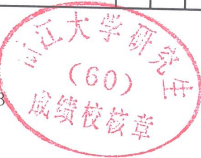
学号：22260436		姓名：刘淑贤		性别：女		学院：工程师学院				专业：材料与化工				学制：2.5年	
毕业时最低应获：29.0学分				已获得：31.0学分				入学年月：2022-09				毕业年月：			
学位证书号：						毕业证书号：						授予学位：			
学习时间		课程名称		备注	学分	成绩	课程性质	学习时间		课程名称		备注	学分	成绩	课程性质
2022-2023学年秋季学期		创新设计方法			2.0	通过	专业选修课	2022-2023学年秋冬学期		研究生英语			2.0	93	公共学位课
2022-2023学年秋季学期		高等反应工程			4.0	85	专业选修课	2022-2023学年春季学期		绿色化工与生物催化前沿			2.0	92	专业学位课
2022-2023学年秋季学期		工程技术创新前沿			1.5	83	专业学位课	2022-2023学年春季学期		新时代中国特色社会主义思想理论与实践			2.0	90	公共学位课
2022-2023学年秋季学期		工程数值分析			2.0	79	专业选修课	2022-2023学年春季学期		研究生论文写作指导			1.0	94	专业学位课
2022-2023学年秋季学期		工程伦理			2.0	91	公共学位课	2022-2023学年春季学期		研究生英语基础技能			1.0	84	公共学位课
2022-2023学年冬季学期		膜技术与工程			2.0	70	专业学位课	2022-2023学年夏季学期		自然辩证法概论			1.0	88	公共学位课
2022-2023学年冬季学期		智慧能源系统工程			2.0	90	专业学位课	2022-2023学年春夏学期		高阶工程认知实践			3.0	80	专业学位课
2022-2023学年冬季学期		产业技术发展前沿			1.5	89	专业学位课			硕士生读书报告			2.0	通过	

说明：1. 研究生课程按三种方法计分，百分制、两级制（通过、不通过）、两级制（优秀、良好、及格、不及格）。

说明：1. 研究生课程按三种方法计分：百分制，两级制（通过、不通过），五级制（优、良、中、及格、不及格）。

2. 备注中“*”表示重修课程。

学院成绩校核章：
成绩校核人：张梦依
打印日期：2025-06-03





310013

浙江省杭州市西湖区古墩路 701 号紫金广场 B 座 1103 室 杭州求是
专利事务所有限公司
郑海峰(0571-87911726-813)

发文日:

2025 年 05 月 16 日



申请号或专利号: 202510291707.0

发文序号: 2025051302180660

申请人或专利权人: 浙江大学

发明创造名称: 一种高产菜油甾醇的酿酒酵母菌株及其构建方法 and 应用

发明专利申请初步审查合格通知书

上述专利申请, 经初步审查, 符合专利法实施细则第 50 条的规定。

申请人于 2025 年 03 月 12 日提出提前公布声明, 经审查, 符合专利法实施细则第 52 条的规定, 专利申请进入公布准备程序。

初步审查合格的上述发明专利申请是以:

2025 年 3 月 12 日提交的说明书摘要

2025 年 3 月 12 日提交的权利要求书

2025 年 3 月 12 日提交的说明书: 第 1 段至第 21 段、第 24 段至第 57 段

2025 年 4 月 23 日提交的说明书: 第 22 段至第 23 段

2025 年 3 月 12 日提交的说明书: 序列表

2025 年 3 月 12 日提交的说明书附图

为基础的。

提示:

1. 发明专利申请人可以自申请日起 3 年内提交实质审查请求书、缴纳实质审查费, 申请人期满未提交实质审查请求书或者期满未缴纳或未缴足实质审查费的, 该申请被视为撤回。

2. 专利费用可以通过网上缴费、银行/邮局汇款、直接向代办处或国家知识产权局专利局缴纳。缴费时应当写明正确的申请号/专利号、费用名称及分项金额, 未提供上述信息的视为未办理缴费手续。了解缴费更多详细信息及办理缴费业务, 请登录国家知识产权局官方网站。

审查员: 郑凯奇

联系电话: 010-53966217

审查部门: 专利审查协作北京中心

