

• 宿主篇 •

戴宗杰 博士, 中国科学院天津工业生物技术研究所副研究员、博士生导师, 现兼任国家合成生物技术创新中心TIB-VIB合成生物学联合中心副主任。主要从事Crabtree阴性酵母合成进化生物学研究。利用理性设计与基因组编辑进化, 结合系统生物学解析, 以设计-构建-测试-学习 (DBTL) 的方式循环迭代提升酵母底盘的代谢效能, 构筑高效化学品细胞工厂。主持国家自然科学基金面上项目, 中国科学院人才计划项目、天津市合成生物技术创新能力提升行动项目。在*Nat Commun*、*Curr Opin Biotechnol*、*Biotechnol Biofuels*等期刊发表多篇论文, 获国内外授权专利3项。



非传统酵母代谢工程研究进展

苏立秋^{1,2}, 张歌^{1,2}, 姚震^{1,2}, 梁配新^{1,2}, 戴宗杰^{1,2}, 王钦宏^{1,2}

1 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

苏立秋, 张歌, 姚震, 等. 非传统酵母代谢工程研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1659-1676.

Su LQ, Zhang G, Yao Z, et al. Advances in metabolic engineering of non-conventional yeasts. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1659-1676.

摘要: 近 30 年来解脂耶氏酵母、克鲁维酵母、毕赤酵母、假丝酵母、汉逊酵母等非传统酵母因其具有天然的生理代谢优势, 如快速生长、多底物利用、胁迫耐受性等, 在代谢工程领域得到了广泛关注, 多种基因工程改造工具正逐渐被开发用于非传统酵母的特性拓展, 使其成为合成重组蛋白、生物可再生化学物质的高效细胞工厂。文中总结了非传统酵母中基因编辑工具的发展, 并从代谢工程改造策略角度概括了利用非传统酵母进行产品合成的研究进展。最后, 讨论了非传统酵母在产品生产应用方面遇到的挑战和未来的研究方向。

关键词: 非传统酵母, 代谢工程, 基因编辑, 生物制造

Received: November 3, 2020; **Accepted:** February 14, 2021

Supported by: Hundreds of Talents Program of the Chinese Academy of Sciences (No. Y0J51009), Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (No. TSBICIP-CXRS-002).

Corresponding author: Zongjie Dai. Tel: +86-22-24828709; Fax: +86-228486-1950; E-mail: daizj@tib.cas.cn

中国科学院率先行动“百人计划”青年俊才 (No. Y0J51009), 天津市合成生物技术创新能力提升行动 (No. TSBICIP-CXRS-002) 资助。

网络出版时间: 2021-03-08

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210305.1525.001.html>

Advances in metabolic engineering of non-conventional yeasts

Liqu Su^{1,2}, Ge Zhang^{1,2}, Zhen Yao^{1,2}, Peixin Liang^{1,2}, Zongjie Dai^{1,2}, and Qinhong Wang^{1,2}

¹ Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

² National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

Abstract: Over the past 30 years, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* and other non-conventional yeasts have attracted wide attention because of their desirable phenotypes, such as rapid growth, capability of utilizing multiple substrates, and stress tolerance. A variety of synthetic biology tools are being developed for exploitation of their unique phenotypes, making them potential cell factories for the production of recombinant proteins and renewable bio-based chemicals. This review summarizes the gene editing tools and the metabolic engineering strategies recently developed for non-conventional yeasts. Moreover, the challenges and future perspectives for developing non-conventional yeasts into efficient cell factories for the production of useful products through metabolic engineering are discussed.

Keywords: non-conventional yeasts, metabolic engineering, gene editing, bio-based manufacturing

酵母在人类发展(游牧到农耕)、日常生活(面包、酒类饮品)和科学研究(模式生物)中扮演了不可或缺的角色,其中以酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 最为人熟知。这两种酵母被称为传统酵母(Conventional yeast),其他的酵母统称为非传统酵母(Non-conventional yeast)。

比较有代表性的非传统酵母有解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica*、克鲁维酵母 *Kluyveromyces*、毕赤酵母 *Pichia*、假丝酵母 *Candida*、汉逊酵母 *Hansenula* 等。与 Crabtree 阳性的酿酒酵母相比,这些酵母也被称为 Crabtree 阴性酵母,主要通过呼吸作用促进细胞生长,且具有许多优异的生理代谢性能^[1]。其中,解脂耶氏酵母因乙酰-CoA 和 NADPH 供应充足、蛋白糖基化水平低,主要用于生产蛋白、油脂、萜烯类、有机酸以及糖醇等^[2];乳酸克鲁维酵母因具有代谢废乳清的能力,被广泛应用于食品和药物生产中蛋白质的合成^[3];马克斯克鲁维酵母因具有广泛底物利用、快速生长、高温耐受等特点已成功用于生产乙醇及芳香化合物等^[4];毕赤酵母和汉逊酵母具有高蛋白分泌能力和低糖基化水平,被广泛用于异源蛋白质的生产,同时因其天然的甲基营养型特点亦被用作一碳碳源利用底盘^[5-6];假丝酵母因其具有高胁迫耐

受性以及广底物利用谱也被大量研究和应用^[7]。

随着系统生物学和合成生物学的发展,围绕这些非传统酵母的代谢工程研究取得了十分显著的进展。本文首先对上述非传统酵母中 CRISPR-Cas 基因编辑技术的进展进行归纳;然后从不同代谢工程改造策略角度总结了利用非传统酵母进行产品(非蛋白产品)合成的研究进展;最后结合当前非传统酵母代谢工程改造过程中存在的问题对其未来可能的发展方向进行展望。

1 CRISPR-Cas 基因编辑技术在非传统酵母中的应用进展

高效精确的遗传改造工具和方法对于快速工程化重塑细胞代谢和实现目标产物的高效合成至关重要。目标 DNA 的编辑改造(基因敲除、基因整合)都依赖于宿主细胞的 DNA 修复机制。在酿酒酵母中,同源重组(Homologous recombination, HR)在双链断裂(Double-stranded break, DSB)修复过程中起主要作用^[8],然而大多数非传统酵母主要利用非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)的方式进行 DNA 修复^[9](图 1),因此增强同源重组效率是实现在非传统酵母中基因精确改造和组装的必要条件。

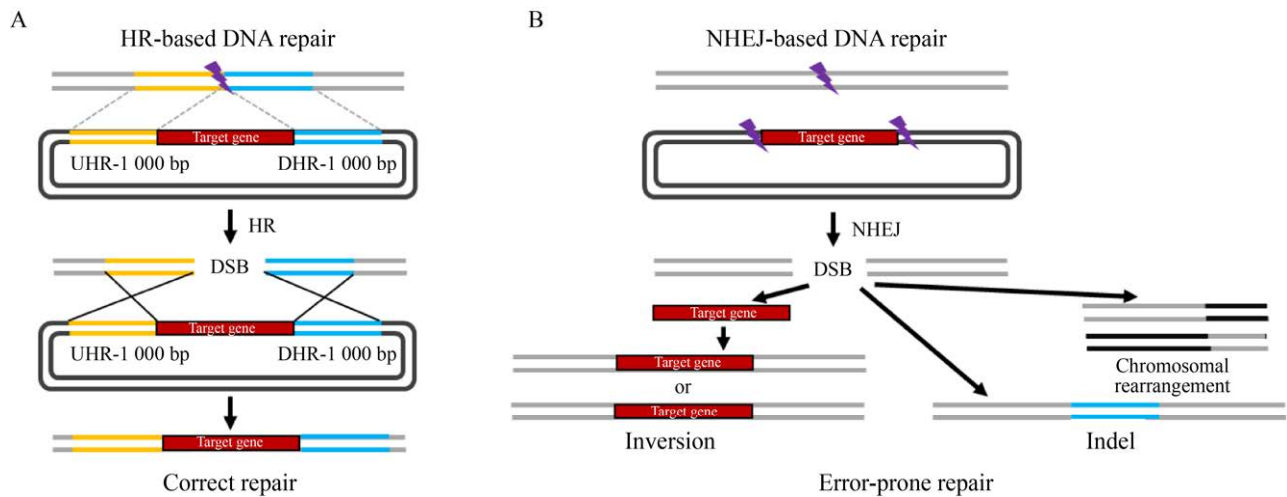


图1 微生物细胞中主要的DNA修复方式

Fig. 1 Methods of DNA repair in microbial cells.

核酸内切酶 Cas 蛋白可以在基因组中精确高效地产生 DSB，目前基于此发展的 CRISPR-Cas 基因编辑技术已被成功应用于解脂耶氏酵母、克鲁维酵母、毕赤酵母、假丝酵母、汉逊酵母等非传统酵母的遗传改造中，极大提高了非传统酵母的代谢工程改造进程^[10]。以下将从表达 gRNA 启动子的选择和利用改造修饰 Cas 蛋白进行表达调控的两个角度对近些年 CRISPR-Cas 基因编辑技术在非传统酵母的研究进展进行综述。

gRNA 的有效表达是利用 CRISPR-Cas 进行基因编辑的必要条件。在酿酒酵母中，依赖于 III 型 RNA 聚合酶的 P_{snr52} 是最常用的 gRNA 表达启动子^[11]。同样的，该启动子也可以在乳酸克鲁维酵母、白色假丝酵母和树干毕赤酵母中有效启动 gRNA 的表达^[12-14]。在 *ku80* 敲除的乳酸克鲁维酵母中，基于 P_{snr52} 的 CRISPR-Cas9 系统成功地将具有 1 kb 同源臂的供体 DNA 整合到 *dit1*、*adh1* 和 *ndt80* 基因座，尽管三重整合效率仅为 2%^[12]。在白色假丝酵母中，Vyas 等发现利用 P_{snr52} 基因组整合表达 gRNA 的基因编辑整合效率可达

60%–80%^[13]。在树干毕赤酵母中，利用该启动子的 CRISPR-Cas9 系统可以实现 80% 的插入缺失突变，在 *ku70/ku80* 双敲除菌株中，同源修复效率可达 70% 以上^[14]。但在解脂耶氏酵母中利用 *snr52* 启动子表达 gRNA 的基因编辑效率偏低 (13%)，通过融合 III 型 RNA 聚合酶启动子 *scr1* 与甘氨酸 tRNA 发现 *scr1-tRNA^{Gly}* 启动子启动表达 gRNA 的 CRISPR-Cas9 基因编辑系统基于 HR 修复的阳性率达 64%，基于 NHEJ 修复的编辑效率达 100%^[15-16]。在马克斯克鲁维酵母中采用了类似的策略，通过融合 III 型 RNA 聚合酶启动子 *rpr1* 与甘氨酸 tRNA 表达 gRNA，可以实现 *XYL2* 的最高靶向效率达 66%。利用该系统进行 7 个乙醇脱氢酶基因 (*adh1-7*) 和 *atf* 的敲除，靶向效率为 10%–67%^[17]。在汉逊酵母中，采用融合 *snr6-tRNA^{Leu}* 启动子表达 gRNA，将相关基因 (*pho1*、*pho11*、*pho84*) 的插入缺失效率提高至 17%–71%^[18]。

依赖于 II 型 RNA 聚合酶的启动子也被成功地用于非传统酵母中 gRNA 的表达，实现有效的基因编辑。Gao 等在解脂耶氏酵母采用 *tefin* 启动子构建单一质粒来表达 Cas9 和多个 gRNA，

双基因敲除和三基因敲除的效率分别为 36.7% 和 19.3%^[19]。Weninger 等在巴斯德毕赤酵母中利用 II 型 RNA 聚合酶启动子 *P_{hxt1}* 进行 gRNA 表达, 基于 NHEJ 修复引入插入缺失突变的效率接近 100%, 在同源重组的片段上加入自主复制 DNA 序列, 并将供体质粒线性化, 在 *ku70* 敲除菌株中可以达到 100% 的同源重组效率^[20]。在热带假丝酵母中利用 *P_{fbal}* 启动 gRNA 的表达, *ura3* 单基因的同源修复率可达 100%, 利用 *P_{gap1}* 启动靶向 *ura3* 和 *ade2* 双 gRNA 的表达, 在共同转化两个供体 DNA 的条件下, 双基因的编辑效率为 32%^[21]。

除了利用 CRISPR-Cas 系统进行基因的插入缺失突变、基因敲除和基因整合表达外, 近年来基于 CRISPR-Cas 系统的基因表达调控也在非传统酵母中得到了应用, 主要是通过改造修饰相应 Cas 蛋白的表达来实现基因的表达调控。Yang 等通过在巴斯德毕赤酵母中引入核酸内切酶失活的 dCas9, 将 Aox1 酶活水平降低了 70% 左右^[22]; 类似地, Cao 等利用 dCas9 将树干毕赤酵母中增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescence protein, eGfp) 的表达量降低了 17%^[14]; 在马克斯克鲁维酵母中, 采用 dCas9 的 CRISPR 技术同时下调 4 个基因 (*aco2b*、*sdh2*、*rip1*、*mss51*) 的表达, 将乙酸乙酯的生产强度提高了 3.8 倍^[23]; 基于 dCas9 的 CRISPR 也被用于下调解脂耶氏酵母 NHEJ 相关基因的表达来提高 HR 的效率, 其中下调 *ku70* 的表达可使 HR 效率达到 56%, 下调 *ku80* 后 HR 效率可达 73%^[24]。

通过融合 dCas9 和转录抑制因子 Mix1 可以进一步加强基因下调表达的程度, 该技术被称为 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi)。利用该策略, 树干毕赤酵母中 eGfp 的表达量相比没有融合 Mix1 的酵母可被进一步下调近 1 倍; 相比未融合 Mix1 的酵母, 融合表达 dCas9 和 Mix1

后解脂耶氏酵母 Ku80 的表达量也可被进一步下调约 1.3 倍^[14]。另一方面通过融合表达 dCas9 与转录激活因子, 可以实现目标基因的上调表达, 该技术被称为 CRISPR 激活 (CRISPR activation, CRISPRa)。融合表达 dCas9 与转录激活结构域 VPR 激活 β -葡萄糖苷酶的表达可以使解脂耶氏酵母在纤维二糖为唯一碳源的条件下生长^[25]。另外通过控制 gRNA 的长度, 表达未失活的 Cas 蛋白也可以实现目标基因的上调或下调。Ian 研究团队通过截断表达 16 nt 的 gRNA 和融合表达 Cas12a-Mix1、Cas12a-Vpr, 可以将解脂耶氏酵母中 *can1* 的 mRNA 水平降低 7 倍, 外源 Gfp 表达量提高 10 倍^[26]。

2 非传统酵母代谢工程改造研究进展

相比酿酒酵母, 非传统酵母具有许多工业生产相关的生理代谢优势和特性, 比如底物利用多样性、环境耐受性强、蛋白合成分泌能力强、生长速度快、适合高密度发酵等, 这些特点吸引众多研究者通过各种代谢工程策略进一步提高非传统酵母的代谢性能, 进行各类化学品的合成测试 (表 1, 图 2)。以下将从各类代谢工程改造策略的角度综述以非传统酵母为底盘的化学合成的研究进展。

2.1 拓宽底物利用谱

原料成本是决定生物合成化学品工业应用可行性的的重要因素。为了降低生产成本, 提高工业发酵可行性, 研究者们基于非传统酵母的各自优势, 利用代谢工程手段, 拓宽生产菌株底物谱, 使其可利用不同原料为碳源进行各类化学品的合成 (图 2)。

解脂耶氏酵母因其降解疏水性碳源的能力而闻名。目前开发的解脂耶氏酵母疏水性碳源的来源包括纯油、食用废油和含油废水。解脂耶氏酵母 UOFSY-1701 菌株以葵花籽油为主要碳源生产柠檬酸, 在添加乙酸盐的条件下, 柠檬酸产量达

表 1 代谢工程在非传统酵母化学品生产中的代表性应用实例

Table 1 Representative examples of chemicals produced by non-conventional yeasts through metabolic engineering

Product category	Product	Engineering strategies	Carbons source	Fermentation condition	Yield/productivity	Strain	References
Lipid	Fatty acid methyl ester (FAME)	$\Delta pox1-6$, $\Delta tgl4$, $gdp1$, $dga2$, vr , xdh , xk , $AnxpkA$, $Anack$	Lignocellulose hydrolysate	Fed-batch	16.5 g/L; 3.44 g/g; 1.85 g/(L·h)	<i>Y. lipolytica</i> Po1d	[27]
	FAME	$\Delta pox1-6$, $\Delta tgl4$, $dga1$, $gpd1$, $hxk1$, $gal1$, $gal7$, $gal10E$, $gal10M$, $Scsuc2$, $kminul$ $acc1$, $dga1$, $Mcmce2$, $Cagapc$	Fructose Inulin Glucose	Fed-batch Fed-batch Fed-batch	23.8 g/L; 0.16 g/g 98.9 g/L; 0.27 g/g; 1.2 g/(L·h)	<i>Y. lipolytica</i> Po1d <i>Y. lipolytica</i> Po1g	[28] [29]
FAME	FAME	$acc1$, $dga1$, $\Delta I2d$, $\Delta I5d$, $\Delta pex10$, $\Delta mfe1$	Glucose	Batch	50 g/L; 0.778 g lipid/g DCW	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	[30]
Free fatty acid	Free fatty acid	$\Delta gpd1$, $\Delta gut2$, $\Delta pex10$, $acc1$ Mutant	Glucose Glycerol	Batch	2.0 g/L	<i>Y. lipolytica</i> W29	[31]
Methyl ketone	Methyl ketone	$\Delta pot1$, $fadM$ - skl , $fadB$ - skl , aco - skl	Glucose	Fed-batch	0.3 g/L	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	[32]
	Alkane	$\Delta mfe1$, $\Delta faa1$, $dga2$, $tgl4$, $Kltg3$, $Cyfpap(S121F)$	Glycerol	Fed-batch	0.06 g/L	<i>Y. lipolytica</i> W29	[33]
Fatty alcohol	Fatty alcohol	$\Delta mga2$, $mga2$ -G643R, $dga1$, $Mhfar\times 2$	Glucose	Fed-batch	5.8 g/L; 36 mg/g; 39 mg/(L·h)	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	[34]
Fatty acid ester	Fatty acid ethyl ester	$\Delta pex10$, $\Delta dga1$, $acs2$	Glucose	Batch	1.2 g/L	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	[35]
Lipid	Lipid	$Ctrap1$	Ethanol	Batch	0.37 g/g DCW	<i>C. tropicalis</i> SY005	[36]
	Citric acid	$Kminul$	Glucose Inulin	Repeated-batch	203 g/L; 0.85 g/g; 0.51 g/(L·h)	<i>Y. lipolytica</i> AWG7	[37]
Organic acid	Succinic acid	$\Delta sdh5$	Crude glycerol	Fed-batch	160.2 g/L	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	[38]
	Itaconic acid	$Atcad$, $Atmitt$, $Ataco$, $Amfs$ cad , $PkmttA$, Δicd	Glucose	Fed-batch	22.0 g/L	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	[39]
Itaconic acid	Itaconic acid		Glucose	Fed-batch	1.2 g/L	<i>P. kudriavzevii</i> YB4010	[40]
Fumarate	Fumarate	$Aspck$, $Ropyc$, $Romdh$, $Rofum$, $Spmae1$, $Scfdh1$	Glucose	Batch	21.6 g/L	<i>C. glabrata</i>	[41]
Malic acid	Malic acid	$Ropyc$, $Romdh$, $Spmae$, $\Delta ig6pi$	Glucose	Batch	8.5 g/L (glucose)	<i>P.pastoris</i>	[42]
	Adipic acid	Δaox	Methanol	Fed-batch (pH 5.0)	2.8 g/L (methanol)	PP-CM301	[7]
Xylonic acid	Xylonic acid	xdh	Glucose	Batch	12.1 g/L; 0.1 g/(L·h)	<i>C. tropicalis</i> KCTC 7212	[43]
	Long-chain dicarboxylic acids	$\Delta cart$, $P450$, $P450n$	Lignocellulose hydrolysate Glucose	Batch Fed-batch	9.0 g/L 32.8 g/L	<i>C. glycerinogenes</i> <i>C. tropicalis</i>	[44]
Alcohols	Erythritol	$YAL10F18590g$, $YAL10D07634g$, $YAL10C13508g$, $zwf1$, $gnd1$	Glucose	Batch	190 g/L; 0.63 g/g; 2.4 g/(L·h)	<i>Y. lipolytica</i> CGMCC7326	[45]
	Threitol	$Sxxdh$	Glucose	Batch	112 g/L	<i>Y. lipolytica</i> CGMCC7326	[46]
Xylitol	Xylitol	$\Delta hxk1$, $gkl1$, $Ncxy11(4copies)$, $Scgal2N376F(2copies)$	Xylose Glucose	Batch (42 °C)	118.6 g/L; 0.75 g/g; 1.98 g/(L·h)	<i>K. marxianus</i> YHY013	[47]

(待续)

(续表 1)

Product category	Product	Engineering strategies	Carbons source	Fermentation condition	Titer/ Yield/productivity	Strain	References
	Ethanol	<i>xr, xdh, xk</i>	Glucose	Batch (40 °C)	24.1 g/L; 0.402 g/g	<i>K. marxianus</i> DMB1	[48]
	Ethanol	<i>Ncxy11, Ssxy12-ars (3copies), xy13 (2copies), adh2, pdc1, tal1, tk11, rpe1, rki1, glm1, Δgpd1 xy12</i>	Xylose Xylose Glucose	Batch (42 °C) Batch	51.4 g/L; 2.14 g/(L·h) 63.3 g/L	<i>K. marxianus</i> YZJ088 <i>C. glycerinogenes</i>	[49] [50]
	Glycerol		Glucose	Fed-batch	27.2 g/L;	<i>C. utilis NRRL</i> B593	[51]
	Isopropanol	<i>acs2, erg10</i>	Glucose	cultivation	0.415 mol/mol	<i>P. pastoris</i> PP304	[52]
	Isobutanol	<i>LlkivD, Scadh7, Ppilv5, Ppilv3, Ppilv6, Ppilv2, Scdf1</i>	Glucose Glycerol	Batch	2.2 g/L; 22.2 mg/g; 153 mg/(L OD)		[53]
	2,3-butanediol	<i>alsS, alsD, bdh1</i>	Glucose	Fed-batch	74.5 g/L; 0.3 g/g	<i>P. pastoris</i>	[54]
	2-phenylethano-1	<i>aro10, adh6, arog^{br}, phed^{br}, aro8</i>	Glucose	Batch	1.2 g/L	<i>P. pastoris</i> SK004	[55]
Natural product	Limonene	<i>tls, indps1, hmgl, erg12</i>	Glycerol	Fed-batch	0.16 g/L	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	[56]
	Linalool	<i>Aa lis, thmg1, idi1, erg20^{F88W-N119W}</i>	Citrate	Batch	7.0 mg/L	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	[57]
	α-farnesene	<i>atoB, hmgl, hmgs, fs-erg20(two copies), idi1, erg12, gpps, erg8, erg19</i>	Pyruvate PM	Fed-batch	25.6 g/L	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	[58]
	Lycopene	<i>crtE, crtI, crtB, hmgl, hmgs, ggppS</i>	Glycerol Methanol	Fed-batch	0.7 g/L	<i>P. pastoris</i> GGHHL	[59]
	β-carotene	<i>Δku70, thmgR, carRP, carB, erg10, ggS1, erg13, erg19, erg12, erg8, idi, erg20</i>	Glucose	Fed-batch	4.0 g/L	<i>Y. lipolytica</i> ATCC MYA 2613	[60]
	β-carotene	<i>crtE, crtI, crtB, tley-b</i>	Glucose	Batch	339 μg/g DCW	<i>P. pastoris</i> Pp-EBIL	[61]
	Astaxanthin	<i>ggppS7, hpbkt, hpcrtZ</i>	Glucose	Batch	285 mg/L; 6 mg/g DCW	<i>Y. lipolytica</i> ST6899	[62]
	Astaxanthin	<i>crtYB, crtI, crtE, P_{SGS1-50bp}::sqS1, hmgl, crtW, crtZ</i>	Glucose	Batch	54.6 mg/L	<i>Y. lipolytica</i> GB20	[63]
	Astaxanthin	<i>crtW, crtZ</i>	Glucose	Batch	3.7 μg/g DCW	<i>P. pastoris</i> Pp-EBILWZ	[64]
	(+)-nootkatone	<i>thmgR, erg20</i>	Glucose	Batch	978.2 μg/L	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 201249	[65]
	(+)-nootkatone	<i>hpo, cpr, vals, adh, thmg1</i>	Glucose Methanol	Fed-batch	208 mg/L	<i>P. pastoris</i> Pp	[66]
	Betulinic acid	<i>cyp, cpr, erg1, erg9, hmgl, Rclus, bplo, ntr</i>	Glucose	Batch	51.9 mg/L	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 201249	[67]
	β-ionone	<i>carb, Mccarp, Phcd1, pkpta, erg10, erg13 hmgl, erg8, erg12, erg19, idi1, erg20, ggs1</i>	Glucose	Fed-batch	1.0 g/L	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	[68]
	Amorphadiene	<i>ads, pot1, pat1, hmgl, erg10, erg12, erg8, erg20</i>	Glucose	Batch	171.5 mg/L	<i>Y. lipolytica</i> Po1g	[69]
	Protopanaxadi-ol	<i>Δku70, xy11, xy12, Ylxks, ds, pps-ar1, thmg1, erg9, erg20, tkl, tal, tx</i>	Xylose	Fed-batch	300.6 mg/L; 2.5 mg/g; 2.5 mg/(L·h)	<i>Y. lipolytica</i> Y14	[70]
	Ginsenoside compound K	<i>thmg1, erg9, erg20, Opds, pps-ar1, ugt1</i>	Glucose	Fed-batch	161.8 mg/L	<i>Y. lipolytica</i> YL-MVA-CK	[70]

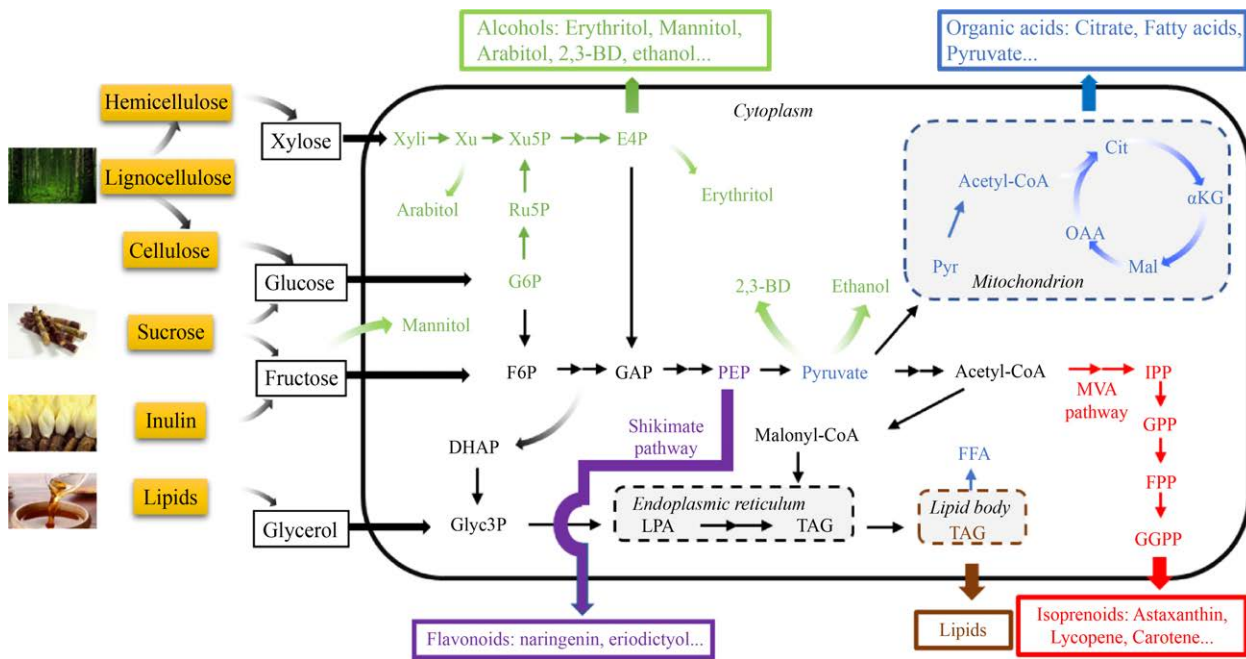


图 2 非传统酵母中底物利用和产物合成代谢途径概览

Fig. 2 Overview of pathways for substrate utilization and product synthesis in non-conventional yeast.

到 18.7 g/L^[71]。由于食用废油的主要成分是甘油三酸酯，因此可以用作解脂耶氏酵母的原料，在 10 L 生物反应器中培养，解脂耶氏酵母 SWJ-1b 菌株从 80 g/L 食用废油中产生了 31.7 g/L 柠檬酸和 6.5 g/L 异柠檬酸^[72]。含油废水中的脂质也被用作解脂耶氏酵母的原料，使用解脂耶氏酵母 ACA-DC 50109 菌株，将葡萄糖 (65 g/L) 与含油废水结合使用可以产生效价为 28.9 g/L 的柠檬酸^[73]。当含油废水与粗甘油混合时，柠檬酸产量和产率分别为 37 g/L 和 0.55 g/g^[74]。通过对脂耶氏酵母碳源的开发，促进了环境废弃资源的有效利用。

木糖是木质纤维素水解液中的主要成分，高效代谢木糖对于纤维素等低廉可再生原料的利用至关重要。非传统酵母利用木糖为碳源的研究非常广泛。在解脂耶氏酵母中通过表达来源于树干毕赤酵母的木糖还原酶和木糖醇脱氢酶以及内源木酮糖激酶，可以使解脂耶氏酵母以木糖为碳源生产柠檬酸，产量达 80 g/L^[75]。因为马克斯克鲁维酵母能够比大多数酵母在更高的温度下生长，所以其能

在高温下有效地以木糖为碳源生产乙醇及木糖醇。通过在马克斯克鲁维酵母 DMB1 菌株中表达木糖还原酶，蛋白工程改造后的 NADP⁺ 依赖的木糖醇脱氢酶及木酮糖激酶，可以利用葡萄糖和木糖在 40 °C 条件下生产合成 24.1 g/L 乙醇，转化率达 0.402 g/g^[48]。在木糖醇生产中，马克斯克鲁维酵母 YZJ074 以木糖及甘油为碳源，在 42 °C 生物反应器中产量可达 312.05 g/L^[76]。热带假丝酵母 JA2 以 177 g/L 木糖为碳源生产 109.5 g/L 木糖醇，生产效率 and 产率分别达 2.8 g/(L·h) 和 0.86 g/g^[77]。在木糖醇脱氢酶基因敲除的热带假丝酵母中过表达来源于粗糙脉孢菌的木糖还原酶，以木糖为碳源，木糖醇的生产效率和产率分别为 1.44 g/(L·h) 和 96%，相比对照菌株分别提高 73% 和 62%^[78]。

甘油是生物柴油生产和工业皂化过程的主要副产品^[79]。解脂耶氏酵母可利用甘油为天然碳源进行生长，过表达甘油激酶和甘油-3-磷酸脱氢酶，可使解脂耶氏酵母菌株 A101 的甘油利用率提高 25%^[80]，柠檬酸产量仍可达 34.1 g/L^[81]。Gao

等在解脂耶氏酵母菌株 Po1f 中敲除琥珀酸脱氢酶编码基因 *sdh5*, 并使用粗甘油为碳源, 通过分批补料发酵, 琥珀酸产量可达 160 g/L^[38]。Carly 等通过在解脂耶氏酵母中过表达 *gut1* (甘油激酶编码基因) 和 *tkl1* (转酮酶编码基因), 敲除 *eyk1* (赤藓酮糖激酶编码基因), 使得以甘油为碳源的赤藓糖醇生产强度提高 75%, 发酵周期缩短 40%^[82]。在嗜热多形汉逊酵母中表达 *pdcl1* (丙酮酸脱羧酶编码基因) 和 *adh1* (乙醇脱氢酶编码基因), 在 45 °C 发酵条件以甘油为碳源的乙醇产量为 5.0 g/L, 与野生型菌株相比提高 5.4 倍^[83]。

糖蜜是制糖工业的主要副产品, 其中含有大量可发酵糖 (主要含有蔗糖、果糖等), 因而是非常经济的发酵原料。解脂耶氏酵母由于缺乏蔗糖酶 (Suc2) 而无法利用蔗糖。通过异源表达菊粉酶及来自酿酒酵母的 *suc2* 基因, 解脂耶氏酵母的脂肪酸产量可达 23.82 g/L, 产率为 0.16 g/g^[28]。同样通过表达来自酿酒酵母的 *suc2* 基因, 解脂耶氏酵母柠檬酸的产量和转化率可达 45.02 g/L 和 0.643 g/g^[84]。同时过表达己糖激酶 (Hxk1) 及 Suc2 后, 96 h 发酵解脂耶氏酵母脂质含量达到 9.15 g/L, 生物量转化率为 0.262 g/g, 该菌株从甜菜糖蜜和

甘油为碳源获得的最高脂质含量为 0.31 g/g DCW, 恒化发酵时脂质生产强度为 0.43 g/(L·h)^[85]。

菊粉是在不同植物中发现的果糖聚合物, 已被用作生产乙醇和柠檬酸的廉价碳源。菊粉分解代谢的第一步是将其水解成可发酵的单糖。大多数非传统酵母无法自然代谢菊粉, 据报道, 在马克斯克鲁维酵母和木霉毕赤酵母中具有一定的菊粉酶活性。利用马克斯克鲁维酵母 NRRL Y-50798 自身菊粉酶活性, 通过高温驯化, 使其在 46 °C 利用菊粉生产乙醇^[86]。Liu 等通过表达来源于马克斯克鲁维酵母 CBS6556 编码菊粉酶的 *inu1* 基因, 获得了具有菊粉酶活性的解脂耶氏酵母重组菌株, 在含有纯菊粉的生物反应器中柠檬酸浓度为 68.9 g/L^[87], 通过重复分批培养, 可使柠檬酸产量达 203 g/L, 产率及生产效率分别达 0.85 g/g、0.51 g/(L·h)^[37]。

2.2 增强乙酰辅酶 A 前体供应

前体物质供给充足是保证目标产品高产的必要条件。在众多代谢物中, 乙酰辅酶 A 是生物体合成代谢和分解代谢的中心枢纽, 也是众多化学品合成的必需前体。因此为了提高目标产物合成, 研究者们围绕非传统酵母中乙酰辅酶 A 的供给进行了大量研究 (图 3)。

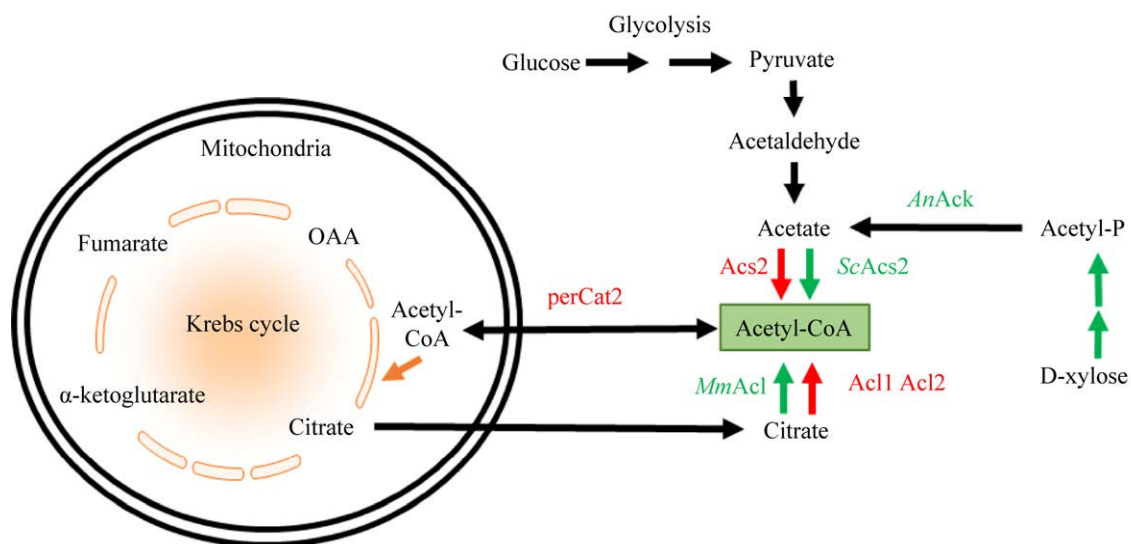


图 3 解脂耶氏酵母中胞质乙酰-CoA 调控常用策略

Fig. 3 Common strategies for the regulation of cytoplasmic acetyl-CoA in *Yarrowia lipolytica*.

解脂耶氏酵母利用 ATP 柠檬酸裂解酶(Acl)提供乙酰辅酶 A。为了提高胞质乙酰辅酶 A 的合成,将小家鼠 *Mus musculus* 来源的 *acl* 基因导入多拷贝整合型质粒并在解脂耶氏酵母中进行表达,使脂质含量由 7.3% 提高到 23%^[88]。Xu 等在解脂耶氏酵母中分别设计并比较了 5 种不同胞质乙酰辅酶 A 替代途径^[89],发现这些途径在过表达乙酰辅酶 A 羧化酶和二酰基甘油转移酶的工程菌株中表达时,均能够提高脂质的效价和含油量,其中肉碱乙酰转移酶 Cat2 过表达菌株的脂质产量可达 66.4 g/L,相比对照提高约 3 倍。另一研究中,在改变菌株的底物利用谱后,基于构建的木糖利用途径,即过表达磷酸酮醇酶 (XpkA)、乙酸激酶 (Ack) 和乙酰辅酶 A 合成酶 (Acs),进一步增强了乙酰 CoA 供给;在木质纤维素水解液为原料的分批补料生物反应器中,脂质产量为 16.5 g/L,与野生菌株相比提高 8.3 倍^[27]。在脂肪酸乙酯 (Fatty acid ethyl esters, FAEE) 生产中, Gao 等通过过表达自身柠檬酸裂解酶编码基因 *acl1*、*acl2*,酿酒酵母的乙酰辅酶 A 合成酶基因 *acs2*,使 FAEE 的产量提高 40%^[35]。

乙酰辅酶 A 的供给在有机酸及醇类物质生产中也发挥重要作用。丙酮酸是发酵生产 α -酮戊二酸过程中主要副产物。Zhou 等在高产 α -酮戊二酸的解脂耶氏酵母菌株 WSH-Z06 中,分别过表达了来自酿酒酵母的 Acs 和来源于小鼠的 ATP 柠檬酸裂合酶 Acl1,以提高乙酰辅酶 A 的转化率,降低丙酮酸积累,所获重组菌株的 α -酮戊二酸产量均有提高,发酵过表达 *acl* 基因的重组菌株, α -酮戊二酸产量可达 56.5 g/L,丙酮酸产量从 35.1 g/L 降低至 20.2 g/L^[90]。在产假丝酵母生产异丙醇过程中,为了增加乙酰辅酶 A 的供应, Tamakawa 等着重研究了与乙酰辅酶 A 产生有关的乙醇同化途径 (乙醇通过乙醇脱氢酶 (Adh1、Adh2),乙醛脱氢酶(Ald6) 和乙酰辅酶 A 合酶 (Acs1、Acs2) 的作用转化为乙酰辅酶 A) 和乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 (Erg10) 对异丙醇合成的

影响。通过表达 *acs1*、*acs2* 及 *erg10* 基因分别使异丙醇产量提高 2.5 倍、2.7 倍及 2.2 倍。通过将三拷贝 *acs2* 与六拷贝 *erg10* 在宿主菌中共表达,与原始菌株相比,产量提高 11.9 倍,经分批补料发酵,异丙醇产量达到 27.2 g/L^[51]。

2.3 强化目标产物合成途径代谢通量

增强产物合成途径中酶的表达,减少分支代谢途径的竞争是提高目标产物合成效率的基本代谢工程策略。该策略被广泛应用于各类底盘微生物高效合成众多产品的代谢工程改造中,其中萜烯类产品的微生物合成就是典型示例。

萜烯类物质是一类重要的天然香料和前体物质,是化妆品、食品和工业制造的关键原料,同时也发现许多萜烯化合物为中草药的有效组成成分^[91]。在酵母中萜烯类化合物的前体物质异戊烯基二磷酸酯 (Isopentenyl diphosphate ester, IPP) 和二甲基烯丙基二磷酸酯 (Dimethylallyl diphosphate ester, DMAPP) 主要通过甲羟戊酸 (Mevalonic acid, MVA) 途径生成,进一步通过异戊二烯基二磷酸合酶 (Idi1) 等合酶作用生成单萜前体香叶基二磷酸 (Geranyl diphosphate, GPP, C10)、倍半萜前体法呢基二磷酸 (Farnesyl diphosphate, FPP, C15)、二萜前体香叶基香叶基二磷酸 (Geranyl geranyl diphosphate, GGPP, C20),两个 FPP 或 GGPP 分子缩合生成三萜烯 (C30) 或四萜烯 (C40) 合成前体。所得的链状类异戊二烯物质在萜类合酶催化下进一步修饰,从而产生大量结构复杂的天然产物 (图 4)。以下将以萜烯类产品的合成为代表,从内源关键基因的表达与调控、旁路途径的弱化、外源关键酶的筛选与表达 3 个方面来阐述非传统酵母萜类化合物的合成进展。

2.3.1 内源关键基因的表达与调控

HMG-CoA 还原酶 (HmgR)、异戊二烯基二磷酸合酶 (Idi1) 被认为是甲羟戊酸途径关键限速酶。截短 HmgR (tHmgR) 的 N 末端氨基酸可以使

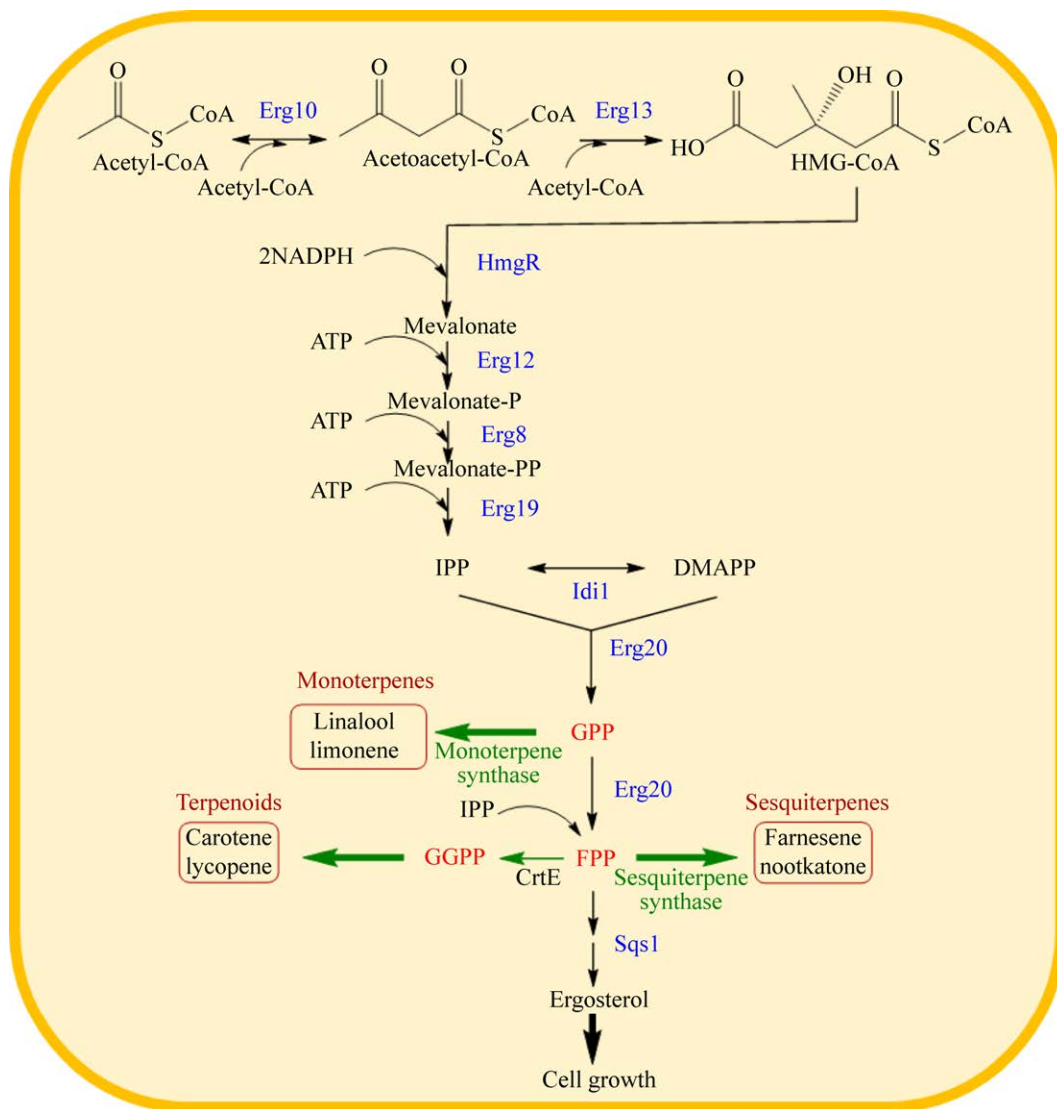


图 4 非传统酵母中萜类化合物合成途径

Fig. 4 Terpenoids synthesis pathway in non-conventional yeast.

其在解脂耶氏酵母细胞质中稳定存在。Idi1 催化 IPP 生成 DMAPP，此酶的过表达可以平衡 IPP 和 DMAPP 含量，在 GPP 和 FPP 的分布中起重要作用。tHmgR 及 Idi1 的过表达是加强萜类物质合成的常用策略。过表达 tHmgR 使得解脂酵母中芳樟醇的产量提高了 4.7 倍，在此基础上对 Idi1 进行表达强化使芳樟醇产量提高 2.8 倍^[56]。Yang 等通过在解脂酵母中过表达 tHmgR 编码基因 *thmg1*，使法尼烯产量提高 12%，同时比较了在含有及不

含有 *thmg1* 过表达情况下，*idi1* 过表达对产量的影响，发现当 *thmg1* 过表达时，*idi1* 过表达使法尼烯产量提高两倍^[92]。此外，MVA 代谢途径其他关键酶 Erg8、Erg10、Erg12 和 Erg19 也被认为可以增强萜类化合物的前体供应。Liu 等通过将 *erg8*、*erg12*、*erg19*、*idi1* 基因在解脂酵母中进行过表达，最终使法尼烯产量提高 72%^[57]。

2.3.2 旁路途径的弱化

Erg20 既是 GPP 合酶，又是 FPP 合酶，该双

功能特性导致以 GPP 为前体的单萜合成效率较低。Ignea 等报道, Erg20 的突变 (即 F96W 和 N127W) 可以使酿酒酵母中的碳通量从 FPP 转移到 GPP, 显著影响酿酒酵母单萜物质的生产^[93]。在解脂耶氏酵母生产芳樟醇过程中, 为了确保 GPP 的足够可用性, Cao 等采用了类似的策略来修饰解脂耶氏酵母中的 Erg20, 基于与酿酒酵母 Erg20 的氨基酸序列比对分析, 确定了解脂耶氏酵母 Erg20 的氨基残基为 F88 和 N119, 向解脂耶氏酵母菌株 CXY01 中引入突变体 *erg20*^{F88W-N119W}, 所得菌株 CXY36 的芳樟醇产量为 5.34 mg/L, 比亲本菌株高 3.7 倍^[56]。

FPP 是细胞自身组分 (包括泛醌、角鲨烯、胆固醇、GGPP 和其他必需固醇) 的重要前体。角鲨烯合酶 Sqs1 催化两个 FPP 分子缩合为角鲨烯, 完全抑制 Sqs1 活性会严重影响细胞生长, 因此将 *sqs1* 表达下调是促进萜类生产的常用策略。Kildegaard 等通过截短 *sqs1* 启动子, 或者将其启动子替换为 *P_{erg1}* 或 *P_{erg11}*, 下调解脂耶氏酵母中类胡萝卜素高产菌株的角鲨烯通量, 与带有自身 *sqs1* 启动子的对照菌株相比, 所得菌株的 β -胡萝卜素产量提高了 2.0–2.5 倍, 其中 *sqs1* 启动子截短到 50 bp 菌株的 β -胡萝卜素产量接近 800 mg/L^[62]。在类胡萝卜素相关物质生产中, 除了代谢下游途径需要弱化, 干扰负责胞内脂质代谢的 β 氧化途径也可以促进解脂酵母中番茄红素的合成。Matthäus 等在解脂耶氏酵母中将 β 氧化途径的 *pox1-6* 基因及甘油三磷酸脱氢酶 *gut2* 基因敲除, 阻断脂肪酸 β 氧化, 减少甘油三酯的形成, 从而促进了脂质体的生成, 通过补料发酵每克细胞干重番茄红素产量可以达到 16 mg^[94]。

2.3.3 外源关键酶的筛选与表达

在天然产物合成中, 需要外源引入将 MVA 途径链状化合物转化为多环骨架的萜烯合酶及对萜烯合酶进行氧化修饰的细胞色素 P450 酶。萜烯合酶及 P450 酶的高活性对萜类物质的生物合

成十分重要。圆柚酮属于倍半萜类物质, 广泛用于香料和化妆品行业。通过将来源于黄金柏的朱栾倍半萜合酶 CnVS、P450 酶 Cyp706M1 和来源于拟南芥的 P450 还原酶 AtCpr1 共表达于解脂耶氏酵母中, 可使解脂耶氏酵母获得圆柚酮生产能力。为了提高圆柚酮产量, 进一步将 *cyp706m1* 及 *Atcpr1* 融合表达, 促进 P450 酶之间的电子传递, 最终使产量提高 6 倍^[64]。同样在毕赤酵母中异源表达钝萆苳的加氧酶和拟南芥的细胞色素 P450 还原酶, 可以有效地将外源添加的朱栾倍半萜合成圆柚酮, 通过外源表达朱栾倍半萜合酶, 可以解除对朱栾倍半萜的依赖。通过过表达醇脱氢酶和 tHmg1, 增加前体供应, 再通过两相发酵, 最终将圆柚酮的产量提高到 208 mg/L。如 P450 酶及 P450 还原酶融合表达的蛋白工程手段已在非传统酵母中广泛应用, 尤其将外源萜类合酶与内源 GPP/FPP 合酶的融合表达^[65]。Yang 等通过将来源于苹果的法尼烯合酶在解脂耶氏酵母中表达, 使菌株具有合成法尼烯的能力, 为了促进 FPP 向法尼烯的转化, 将 FPP 合酶及法尼烯合酶进行融合表达, 使法尼烯的产量与单独过表达法尼烯合酶相比提高 4 倍^[92]。

2.4 细胞生理代谢的全局优化

2.4.1 辅因子调控

平衡产物合成和细胞生理代谢所需的氧化还原状态是实现代谢流高效导向目标代谢产物的必要手段。由于氧受限条件易引起细胞氧化还原失衡, 酵母将木糖高效转化为乙醇存在一定的挑战。例如: 耐热马克斯克鲁维酵母可以以木糖为碳源在高温下生长良好, 但其木糖发酵能力较弱。Zhang 等通过外源引入来自粗糙脉孢菌的 NADPH 依赖的木糖还原酶 (Xr) 和来自树干毕赤酵母的 NADPH⁺ 依赖的木糖醇脱氢酶 (Xdh) 突变体, 结合下游基因的过表达, 最终使重组菌株的木糖发酵能力和氧化还原平衡均得到了显著提高。所得工程菌株 YZJ088 在 42 °C 条件下利用 118.4 g/L 木糖产生

44.9 g/L 乙醇, 生产强度达 2.49 g/(L·h)^[49]。

NADPH 供给是脂肪酸和脂质合成中的主要限速因素。在脂质生产中, 为了高效利用物质代谢还原力以提高脂质产量, Qiao 等在解脂耶氏酵母中将糖酵解途径产生的 NADH 转化为脂质生物合成需要的 NADPH 合成途径。在过表达 *acc1* 和 *dgal* 的菌株中进一步过表达丙酮丁醇梭菌来源的 *gapC* 和卷枝毛霉来源的 *mce2*, 使胞内 NADH 有效转化为 NADPH, 最终使工程菌株的产率达 0.231 g/g, 与对照相比提高了 25%^[29]。为了循环使用胞质中 NADPH 提高解脂耶氏酵母三乙酸内酯 (Triacetate lactone, TAL) 的合成, Liu 等测试了一系列胞质 NADPH 合成途径 (苹果酸酶、甘露醇脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、琥珀酸半醛脱氢酶) 是否会改善 TAL 的合成和细胞适应性。其中内源 NADP⁺ 依赖型苹果酸酶 (Mae) 的过表达可显著提高 TAL 产量。当 *ylMae* 与 TAL 合成关键酶 *Gh2ps* 及 *ylAcc1* 共同过表达时, 使菌株 TAL 增产 60%^[95]。NADPH 的循环利用还可有效促进萜类物质的生产。HMG-CoA 还原酶 (HmgR) 是甲羟戊酸途径中的第一个限速酶, 在调节角鲨烯的生物合成中起关键作用, HMG-CoA 通过以 NADPH 作为还原力释放辅酶 A 后被还原水解为甲羟戊酸。Liu 等通过将甘露醇脱氢酶 (通过甘露醇循环调控胞质 NADPH 含量) 引入解脂耶氏酵母代谢系统, 使鲨烯产量提高 11%^[96]。在三萜类物质生产中, NADPH 是内源甲羟戊酸途径和异源萜类合酶 P450 氧化还原系统的直接氧化还原供应物质。Jin 等通过在解脂耶氏酵母中过表达苹果酸脱氢酶编码基因 (*emt* 及 *rtme*) 使胞内 NADPH 供给提高, 最终促进了三萜类物质桉木酸的生产^[66]。

2.4.2 转录因子调控

转录因子作为信号分子参与细胞生理代谢调控的众多方面。通过改变控制特定代谢途径转录因子的表达, 可以避免对合成途径相关酶的表达

进行个体调谐, 从而在高层级上对目标产物合成途径进行全局优化, 有效提高目标途径代谢通量及产物合成效率。研究表明来自汉逊德巴利酵母的转录因子 *Sef1* 对核黄素生物合成途径的表达进行正向调节。Dmytruk 等在假丝酵母突变株 AF-4 中通过引入来自汉逊德巴利酵母的 *sef1*, 使核黄素产量提高 87.2%^[97]。在解脂耶氏酵母中, 研究表明参与葡萄糖阻遏作用的转录因子 *Snf1* 及 *Mig1* 对胞内脂质合成具有调节作用。*Snf1* 参与解脂耶氏酵母由生长阶段向产脂阶段的转变, 该转录因子的敲除使得菌体脂肪酸产量提高 2.6 倍, 经转录分析发现 *Snf1* 敲除菌中脂质合成相关基因明显上调^[98]。类似的研究发现敲除 *Mig1* 会导致解脂耶氏酵母脂肪酸 β -氧化途径 *mfe1* 的转录下调和与脂质合成相关的基因上调, 敲除该基因的菌株胞内油脂含量提高到细胞干重的 48.7%, 相比对照菌株提高 1.3 倍^[99]。

2.4.3 适应性进化

胞内代谢途径的加强和胞外环境的胁迫都会增加细胞的代谢负担, 适应性进化是提高并稳定菌株生产性状的重要策略。这种策略目前已在非传统酵母的碳源利用及环境耐受的研究中广泛应用。Sharma 等在 45 °C 以木糖为碳源条件下, 对耐热酵母马克斯克鲁维酵母进行多达 60 批次的适应进化, 以提高其木糖利用能力。与天然菌株相比, 进化菌株显示出更高的比生长速率和更快的木糖摄取速率以及更短的生长延滞期。厌氧发酵时, 进化菌株在 72 h 内消耗约 91% 的木糖, 分别产生了 2.88 g/L 和 18.75 g/L 的乙醇和木糖醇, 相比未进化菌株提高约 5 倍, 乙醇和木糖醇的得率也提高约 1.5 倍^[100]。在高浓度葡萄糖环境中, 对可以从葡萄糖合成 D-阿拉伯醇的巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株进行驯化, 得到驯化菌株 GS225, 其 D-阿拉伯醇的产量相比未驯化菌株 GS115 提高近一倍, 达到 12.5 g/L^[101]。同样通过对可利用 CO₂ 的巴斯德毕赤酵母适应性进化, 使

其以 CO₂ 为唯一碳源时比生长速率由 0.008 /h 提高到 0.018/h^[102]。Daskalaki 等采用适应性实验室进化策略对解脂耶氏酵母进行驯化, 通过交替改变培养基成分并连续筛选高脂细胞, 最终将细胞生长与脂质积累相偶联。通过 77 代筛选后, 菌株的脂质含量达到细胞干重的 44%, 比原始菌株提高 30%^[103]。

3 总结与展望

由于具有优良的自然特性, 解脂耶氏酵母、克鲁维酵母、毕赤酵母、假丝酵母等非传统酵母在生物技术开发及工业应用中起着举足轻重的作用。随着高效基因操作工具的开发及代谢途径调控策略的完善使用, 将非传统酵母改造为脂质、天然产物、有机酸及醇类物质高效合成细胞工厂已成为可能。但目前大多数非传统酵母菌的目标物质产量较低, 远未使其优良自然特性得到充分发挥, 限制了其在工业生产中的应用。多种因素影响其生产性能(产量、产率、转化率)的改善, 包括高效基因编辑工具开发、胞内代谢网络的高清解析、胞外环境互作的应答机制等。

目前在产品生产性能优化中主要集中于有利表型直接代谢途径的优化改造, 缺乏关于代谢网络相互作用和代谢平衡调控与应答的关键基础信息, 阻碍了非传统酵母在产品应用中的发展。同时高效关键酶的挖掘及改造对产物生成起关键作用, 对非传统酵母的改造中针对目标途径优良酶的筛选主要基于文献报道或基因库中筛选, 而基于关键酶进行定向进化及理性设计以提高关键酶催化活性的策略应用较少, 阻碍了关键途径催化效率的最大化提升。这些领域的基本信息不全是建造产业化应用水平非传统酵母细胞工厂的主要障碍。相信多组学整合技术、高效基因编辑技术、多信号输入输出的动态调控技术以及高通量筛选技术等系统生物学与合成生物学的进步与发展, 将促进人们对非传统酵母的独特生理代谢特征的

深入了解, 在最大化改造利用非传统酵母优良表型、提高产品生产性能、达到规模化工业应用水平等方面将具有重大突破。

REFERENCES

- [1] Wagner JM, Alper HS. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: current tools and future advances. *Fungal Genet Biol*, 2016, 89: 126-136.
- [2] Ma JB, Gu Y, Marsafari M, et al. Synthetic biology, systems biology, and metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* toward a sustainable biorefinery platform. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2020, 47(9/10): 845-862, DOI: 10.1007/s10295-020-02290-8.
- [3] Spohner SC, Schaum V, Quitmann H, et al. *Kluyveromyces lactis*: an emerging tool in biotechnology. *J Biotechnol*, 2016, 222: 104-116.
- [4] Löbs AK, Lin JL, Cook M, et al. High throughput, colorimetric screening of microbial ester biosynthesis reveals high ethyl acetate production from *Kluyveromyces marxianus* on C5, C6, and C12 carbon sources. *Biotechnol J*, 2016, 11(10): 1274-1281.
- [5] Van Der Klei IJ, Yurimoto H, Sakai Y, et al. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(12): 1453-1462.
- [6] Nocon J, Steiger MG, Pfeffer M, et al. Model based engineering of *Pichia pastoris* central metabolism enhances recombinant protein production. *Metab Eng*, 2014, 24: 129-138.
- [7] Ju JH, Oh BR, Heo SY, et al. Production of adipic acid by short- and long-chain fatty acid acyl-CoA oxidase engineered in yeast *Candida tropicalis*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2020, 43(1): 33-43.
- [8] Fraczek MG, Naseeb S, Delneri D. History of genome editing in yeast. *Yeast*, 2018, 35(5): 361-368.
- [9] Löbs AK, Schwartz C, Wheeldon I. Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: current advances and applications. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(3): 198-207.
- [10] Raschmanová H, Weninger A, Glieder A, et al.

- Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: current state and future prospects. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(3): 641-665.
- [11] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): 4336-4343.
- [12] Horwitz AA, Walter JM, Schubert MG, et al. Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-Cas. *Cell Syst*, 2015, 1(1): 88-96.
- [13] Vyas VK, Barrasa MI, Fink GR. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Sci Adv*, 2015, 1(3): e1500248.
- [14] Cao MF, Gao MR, Ploessl D, et al. CRISPR-mediated genome editing and gene repression in *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnol J*, 2018, 13(9): 1700598.
- [15] Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, et al. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(4): 356-359.
- [16] Schwartz C, Shabbir-Hussain M, Frogue K, et al. Standardized markerless gene integration for pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(3): 402-409.
- [17] Löbs AK, Engel R, Schwartz C, et al. CRISPR-Cas9-enabled genetic disruptions for understanding ethanol and ethyl acetate biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 164.
- [18] Numamoto M, Maekawa H, Kaneko Y. Efficient genome editing by CRISPR/Cas9 with a tRNA-sgRNA fusion in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. *J Biosci Bioeng*, 2017, 124(5): 487-492.
- [19] Gao SL, Tong YY, Wen ZQ, et al. Multiplex gene editing of the *Yarrowia lipolytica* genome using the CRISPR-Cas9 system. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(8): 1085-1093.
- [20] Cao MF, Gao MR, Lopez-Garcia CL, et al. Centromeric DNA facilitates nonconventional yeast genetic engineering. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(8): 1545-1553.
- [21] Zhang LH, Zhang HB, Liu YF, et al. A CRISPR-Cas9 system for multiple genome editing and pathway assembly in *Candida tropicalis*. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(2): 531-542.
- [22] Yang YK, Liu GQ, Chen X, et al. High efficiency CRISPR/Cas9 genome editing system with an eliminable episomal sgRNA plasmid in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 138: 109556.
- [23] Löbs AK, Schwartz C, Thorwall S, et al. Highly multiplexed CRISPRi repression of respiratory functions enhances mitochondrial localized ethyl acetate biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(11): 2647-2655.
- [24] Schwartz C, Frogue K, Ramesh A, et al. CRISPRi repression of nonhomologous end-joining for enhanced genome engineering via homologous recombination in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(12): 2896-2906.
- [25] Schwartz C, Curtis N, Löbs AK, et al. Multiplexed CRISPR activation of cryptic sugar metabolism enables *Yarrowia Lipolytica* growth on cellobiose. *Biotechnol J*, 2018, 13(9): 1700584.
- [26] Yang ZJ, Edwards H, Xu P. CRISPR-Cas12a/Cpf1-assisted precise, efficient and multiplexed genome-editing in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng Commun*, 2019, 10: e00112.
- [27] Niehus X, Coq AMCL, Sandoval G, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to enhance lipid production from lignocellulosic materials. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 11.
- [28] Hapeta P, Rakicka M, Dulermo R, et al. Transforming sugars into fat-lipid biosynthesis using different sugars in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 2017, 34(7): 293-304.
- [29] Qiao KJ, Wasylenko TM, Zhou K, et al. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(2): 173-177.
- [30] Yan FX, Dong GR, Qiang S, et al. Overexpression of $\Delta 12, \Delta 15$ -desaturases for enhanced lipids synthesis in *Yarrowia lipolytica*. *Front Microbiol*, 2020, 11: 289.

- [31] Yuzbasheva EY, Mostova EB, Andreeva NI, et al. A metabolic engineering strategy for producing free fatty acids by the *Yarrowia lipolytica* yeast based on impairment of glycerol metabolism. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(2): 433-443.
- [32] Hanko EKR, Denby CM, I Nogué VS, et al. Engineering β -oxidation in *Yarrowia lipolytica* for methyl ketone production. *Metab Eng*, 2018, 48: 52-62.
- [33] Bruder S, Moldenhauer EJ, Lemke RD, et al. Drop-in biofuel production using fatty acid photodecarboxylase from *Chlorella variabilis* in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 202.
- [34] Cordova LT, Butler J, Alper HS. Direct production of fatty alcohols from glucose using engineered strains of *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng Commun*, 2020, 10: e00105.
- [35] Gao Q, Cao X, Huang YY, et al. Overproduction of fatty acid ethyl esters by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* through metabolic engineering and process optimization. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(5): 1371-1380.
- [36] Chattopadhyay A, Gupta A, Maiti MK. Engineering an oleaginous yeast *Candida tropicalis* SY005 for enhanced lipid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 4(19): 8399-8411.
- [37] Rakicka M, Wolniak J, Lazar Z, et al. Production of high titer of citric acid from inulin. *BMC Biotechnol*, 2019, 19: 11.
- [38] Gao CJ, Yang XF, Wang HM, et al. Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9(1): 179.
- [39] Zhao C, Cui ZY, Zhao XY, et al. Enhanced itaconic acid production in *Yarrowia lipolytica* via heterologous expression of a mitochondrial transporter MTT. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 3(5): 2181-2192.
- [40] Sun W, Vila-Santa A, Liu N, et al. Metabolic engineering of an acid-tolerant yeast strain *Pichia kudriavzevii* for itaconic acid production. *Metab Eng Commun*, 2020, 10: e00124.
- [41] Chen XL, Li Y, Tong T, et al. Spatial modulation and cofactor engineering of key pathway enzymes for fumarate production in *Candida glabrata*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(3): 622-630.
- [42] Guo F, Dai Z, Peng W, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for malic acid production from methanol. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 118(1): 357-371.
- [43] Zhu MY, Sun L, Lu XY, et al. Establishment of a transient CRISPR-Cas9 genome editing system in *Candida glycerinogenes* for co-production of ethanol and xylonic acid. *J Biosci Bioeng*, 2019, 128(3): 283-289.
- [44] Wang JQ, Peng J, Fan H, et al. Development of *mazF*-based markerless genome editing system and metabolic pathway engineering in *Candida tropicalis* for producing long-chain dicarboxylic acids. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45(11): 971-981.
- [45] Cheng HL, Wang SQ, Bilal M, et al. Identification, characterization of two NADPH-dependent erythrose reductases in the yeast *Yarrowia lipolytica* and improvement of erythritol productivity using metabolic engineering. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 133.
- [46] Chi P, Wang SQ, Ge XM, et al. Efficient D-threitol production by an engineered strain of *Yarrowia lipolytica* overexpressing xylitol dehydrogenase gene from *Scheffersomyces stipitis*. *Biochem Eng J*, 2019, 149: 107259.
- [47] Hua Y, Wang JC, Zhu YL, et al. Release of glucose repression on xylose utilization in *Kluyveromyces marxianus* to enhance glucose-xylose co-utilization and xylitol production from corn cob hydrolysate. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 24.
- [48] Suzuki T, Hoshino T, Matsushika A. High-temperature ethanol production by a series of recombinant xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* strains. *Enzyme Microb Technol*, 2019, 129: 109359.
- [49] Zhang J, Zhang B, Wang DM, et al. Rapid ethanol production at elevated temperatures by engineered thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* via the NADP(H)-preferring xylose reductase-xylitol dehydrogenase pathway. *Metab Eng*, 2015, 31: 140-152.
- [50] Zong H, Zhang C, Zhuge B, et al. Effects of xylitol

- dehydrogenase (XYL2) on xylose fermentation by engineered *Candida glycerinogenes*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2017, 64(4): 590-599.
- [51] Tamakawa H, Mita T, Yokoyama A, et al. Metabolic engineering of *Candida utilis* for isopropanol production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(14): 6231-6239.
- [52] Siripong W, Wolf P, Kusumoputri TP, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isobutanol and isobutyl acetate. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 1.
- [53] Yang ZL, Zhang ZS. Production of (2R,3R)-2,3-butanediol using engineered *Pichia pastoris*: strain construction, characterization and fermentation. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 35.
- [54] Kong SJ, Pan H, Liu XY, et al. *De novo* biosynthesis of 2-phenylethanol in engineered *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 133: 109459.
- [55] Cheng BQ, Wei LJ, Lv YB, et al. Elevating limonene production in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* via genetic engineering of limonene biosynthesis pathway and optimization of medium composition. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2019, 24(3): 500-506.
- [56] Cao X, Wei LJ, Lin JY, et al. Enhancing linalool production by engineering oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 1641-1644.
- [57] Liu YH, Jiang X, Cui ZY, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for production of α -farnesene. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 296.
- [58] Zhang XY, Wang DG, Duan YH, et al. Production of lycopene by metabolically engineered *Pichia pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(3): 463-470.
- [59] Gao SL, Tong YY, Zhu L, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production. *Metab Eng*, 2017, 41: 192-201.
- [60] Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Rosa-dos-Santos F, et al. Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and β -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2483-2492.
- [61] Tramontin LRR, Kildegaard KR, Sudarsan S, et al. Enhancement of astaxanthin biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* via microalgal pathway. *Microorganisms*, 2019, 7(10): 472.
- [62] Kildegaard KR, Adiego-Pérez B, Belda DD, et al. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of astaxanthin. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(4): 287-294.
- [63] Araya-Garay JM, Ageitos JM, Vallejo JA, et al. Construction of a novel *Pichia pastoris* strain for production of xanthophylls. *AMB Expr*, 2012, 2: 24.
- [64] Guo XY, Sun J, Li DS, et al. Heterologous biosynthesis of (+)-nootkatone in unconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem Eng J*, 2018, 137: 125-131.
- [65] Wriessnegger T, Augustin P, Engleder M, et al. Production of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone by metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab Eng*, 2014, 24: 18-29.
- [66] Jin CC, Zhang JL, Song H, et al. Boosting the biosynthesis of betulinic acid and related triterpenoids in *Yarrowia lipolytica* via multimodular metabolic engineering. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 77.
- [67] Lu YP, Yang QY, Lin ZL, et al. A modular pathway engineering strategy for the high-level production of β -ionone in *Yarrowia lipolytica*. *Microb. Cell Fact*, 2020, 19: 49.
- [68] Marsafari M, Xu P. Debottlenecking mevalonate pathway for antimalarial drug precursor amorphadiene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng Commun*, 2020, 10: e00121.
- [69] Wu YF, Xu S, Gao X, et al. Enhanced protopanaxadiol production from xylose by engineered *Yarrowia lipolytica*. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 83.
- [70] Li DS, Wu YF, Zhang CB, et al. Production of triterpene ginsenoside compound K in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(9): 2581-2588.
- [71] Venter T, Kock JLF, Botes PJ, et al. Acetate enhances citric acid production by *Yarrowia lipolytica* when grown on sunflower oil. *Syst Appl Microbiol*, 2004, 27(2): 135-138.
- [72] Liu XY, Lv JS, Xu JX, et al. Citric acid production in *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b yeast when grown on

- waste cooking oil. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 175(5): 2347-2356.
- [73] Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, et al. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresour Technol*, 2008, 99(7): 2419-2428.
- [74] Sarris D, Rapti A, Papafotis N, et al. Production of added-value chemical compounds through bioconversions of olive-mill wastewaters blended with crude glycerol by a *Yarrowia lipolytica* strain. *Molecules*, 2019, 24(2): 222.
- [75] Ledesma-Amaro R, Lazar Z, Rakicka M, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to produce chemicals and fuels from xylose. *Metab Eng*, 2016, 38: 115-124.
- [76] Zhang J, Zhang B, Wang DM, et al. Improving xylitol production at elevated temperature with engineered *Kluyveromyces marxianus* through over-expressing transporters. *Bioresour Technol*, 2015, 175: 642-645.
- [77] Junior WGM, Pacheco TF, Trichez D, et al. Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. *Yeast*, 2019, 36(5): 349-361.
- [78] Jeon WY, Yoon BH, Ko BS, et al. Xylitol production is increased by expression of codon-optimized *Neurospora crassa* xylose reductase gene in *Candida tropicalis*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2012, 35(1/2): 191-198.
- [79] Veluturla S, Archana N, Rao DS, et al. Catalytic valorization of raw glycerol derived from biodiesel: a review. *Biofuels*, 2018, 9(3): 305-314.
- [80] Mirończuk AM, Rzechonek DA, Biegalska A, et al. A novel strain of *Yarrowia lipolytica* as a platform for value-added product synthesis from glycerol. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 180.
- [81] Rzechonek DA, Dobrowolski A, Rymowicz W, et al. Aseptic production of citric and isocitric acid from crude glycerol by genetically modified *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol*, 2019, 271: 340-344.
- [82] Carly F, Vandermies M, Telek S, et al. Enhancing erythritol productivity in *Yarrowia lipolytica* using metabolic engineering. *Metab Eng*, 2017, 42: 19-24.
- [83] Kata I, Semkiv MV, Ruchala J, et al. Overexpression of the genes *PDC1* and *ADH1* activates glycerol conversion to ethanol in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Yeast*, 2016, 33(8): 471-478.
- [84] Lazar Z, Walczak E, Robak M. Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* *SUC*⁺ transformants. *Bioresour Technol*, 2011, 102(13): 6982-6989.
- [85] Rakicka M, Lazar Z, Dulermo T, et al. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 104.
- [86] Galindo-Leva LÁ, Hughes SR, López-Núñez JC, et al. Growth, ethanol production, and inulinase activity on various inulin substrates by mutant *Kluyveromyces marxianus* strains NRRL Y-50798 and NRRL Y-50799. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(7): 927-939.
- [87] Liu XY, Chi Z, Liu GL, et al. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. *Metab Eng*, 2010, 12(5): 469-476.
- [88] Zhang HY, Zhang LN, Chen HQ, et al. Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP: citrate lyase from *Mus musculus*. *J Biotechnol*, 2014, 192: 78-84.
- [89] Xu P, Qiao KJ, Ahn WS, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(39): 10848-10853.
- [90] Zhou JW, Yin XX, Madzak C, et al. Enhanced α -ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by alteration of the acetyl-CoA metabolism. *J Biotechnol*, 2012, 161(3): 257-264.
- [91] Muhammad A, Feng XD, Rasool A, et al. Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Adv*, 2020, 43: 107555.
- [92] Yang X, Nambou K, Wei LJ, et al. Heterologous production of α -farnesene in metabolically engineered strains of *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol*, 2016, 216: 1040-1048.
- [93] Ignea C, Pontini M, Maffei ME, et al. Engineering monoterpene production in yeast using a synthetic dominant negative geranyl diphosphate synthase.

- ACS Synth Biol, 2014, 3(5): 298-306.
- [94] Matthäus F, Ketelhot M, Gatter M, et al. Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(5): 1660-1669.
- [95] Liu H, Marsafari M, Wang F, et al. Engineering acetyl-CoA metabolic shortcut for eco-friendly production of polyketides triacetic acid lactone in *Yarrowia lipolytica*. Metab Eng, 2019, 56: 60-68.
- [96] Liu H, Wang F, Deng L, et al. Genetic and bioprocess engineering to improve squalene production in *Yarrowia lipolytica*. Bioresour Technol, 2020, 317: 123991.
- [97] Dmytruk KV, Yatsyshyn VY, Sybirna NO, et al. Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) for construction of strains with enhanced riboflavin production. Metab Eng, 2011, 13(1): 82-88.
- [98] Seip J, Jackson R, He HX, et al. Snf1 is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(23): 7360-7370.
- [99] Wang ZP, Xu HM, Wang GY, et al. Disruption of the *MIG1* gene enhances lipid biosynthesis in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(4): 675-682.
- [100] Sharma NK, Behera S, Arora R, et al. Enhancement in xylose utilization using *Kluyveromyces marxianus* NIRE-K1 through evolutionary adaptation approach. Bioprocess Biosyst Eng, 2016, 39(5): 835-843.
- [101] Cheng HR, Lv JY, Wang HW, et al. Genetically engineered *Pichia pastoris* yeast for conversion of glucose to xylitol by a single-fermentation process. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(8): 3539-3552.
- [102] Gassler T, Sauer M, Gasser B, et al. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO₂. Nat Biotechnol, 2020, 38(2): 210-216.
- [103] Daskalaki A, Perdikouli N, Aggeli D, et al. Laboratory evolution strategies for improving lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(20): 8585-8596.

(本文责编 陈宏宇)