

解脂耶氏酵母生物合成芳香族氨基酸衍生物的合成生物学策略

陈茁^{#1}, 朱源^{#1}, 李伟国², 闫晓光², 颜丙扬¹, 乔建军^{1,2}, 赵广荣^{*1,2}

1 天津大学 化工学院 教育部合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300350

2 天津大学浙江研究院(绍兴), 浙江 绍兴 312300

陈茁, 朱源, 李伟国, 闫晓光, 颜丙扬, 乔建军, 赵广荣. 解脂耶氏酵母生物合成芳香族氨基酸衍生物的合成生物学策略[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 33-45.

CHEN Zhuo, ZHU Yuan, LI Weiguo, YAN Xiaoguang, YAN Bingyang, QIAO Jianjun, ZHAO Guangrong. Strategy for the biosynthesis of aromatic amino acid derivatives by *Yarrowia lipolytica*[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 33-45.

摘要: 芳香族氨基酸衍生物广泛存在于自然界中, 具有多种生物活性, 包括抗氧化、抗炎、神经保护和抗癌特性。在食品、化妆品、营养保健品、化学等领域, 尤其在制药工业中发挥着重要作用。近年来, 解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)作为一种非常规模式生物, 因其独特的生理生化特性在生物合成领域展现出独特的潜力, 特别是在芳香族氨基酸衍生物的合成上, 包括白藜芦醇和柚皮素等。由于其独特的胞质环境和高通量的乙酰辅酶 A, 解脂耶氏酵母成为合成芳香族氨基酸衍生物的理想宿主。本文总结了解脂耶氏酵母在生产芳香族氨基酸衍生物方面的合成生物学策略, 并汇总目前解脂耶氏酵母合成芳香族氨基酸衍生物的进展, 对解脂耶氏酵母底盘细胞在合成生物学未来的发展和挑战进行了展望。

关键词: 解脂耶氏酵母; 芳香族氨基酸衍生物; 合成生物学; 代谢工程

资助项目: 天津大学浙江研究院(绍兴)自主基金(2023X2-0013)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Independent Fund of Zhejiang Institute of Tianjin University, Shaoxing (2023X2-0013).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: grzhao@tju.edu.cn

Received: 2024-04-30; Accepted: 2024-05-17; Published online: 2024-06-25

Strategy for the biosynthesis of aromatic amino acid derivatives by *Yarrowia lipolytica*

CHEN Zhuo^{#1}, ZHU Yuan^{#1}, LI Weiguo², YAN Xiaoguang², YAN Bingyang¹, QIAO Jianjun^{1,2}, ZHAO Guangrong^{*1,2}

1 Frontiers Science Center for Synthetic Biology, Key Laboratory of Bioengineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China

2 Zhejiang Institute of Tianjin University, Shaoxing 312300, Zhejiang, China

Abstract: Aromatic amino acid derivatives are widely distributed in the nature and possess antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, and anticancer activities. They play important roles in various fields such as food, cosmetics, nutritional supplements, and chemistry, particularly in the pharmaceutical industry. In recent years, the unconventional model organism *Yarrowia lipolytica* has emerged as a promising candidate in biosynthesis due to its unique physiological and biochemical characteristics. Specifically, it has shown significant potential in the synthesis of aromatic amino acid derivatives, including resveratrol and naringenin. With a distinctive cytosolic environment and high flux of acetyl-CoA, *Y. lipolytica* stands out as an ideal host for the synthesis of aromatic amino acid derivatives. This review summarizes the biosynthesis strategies of *Y. lipolytica* in the production of aromatic amino acid derivatives and reviews the current progress in this field. Furthermore, it discusses the future prospects and challenges of applying *Y. lipolytica* as a chassis cell in Synthetic Biology.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*; aromatic amino acid derivatives; Synthetic Biology; metabolic engineering

随着合成生物学的迅速发展,利用微生物细胞工厂生产天然产物成为了研究的热点^[1]。在众多微生物宿主中,解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)因其胞质丰富的乙酰辅酶 A、广泛的底物适应性和独特的生理特性^[2-3],显示出其在合成天然产物方面的巨大潜力^[4]。芳香族氨基酸衍生物,如白藜芦醇和柚皮素等,由于其在食品、药品和化妆品行业中具有潜在高附加价值,正逐渐成为合成生物学领域研究的重点。这些化合物的生物合成不仅具有重要的经济价值,而且在生物医药领域展现出重要的生物活性。

解脂耶氏酵母是一种克勒勃屈利效应阴性子囊菌酵母,具有广泛的 pH 适应性,能在 pH 3.5-8.0 的环境中生长^[5]。该酵母具备广泛的底

物利用能力,不受葡萄糖效应的影响,所以更适合于工业化发酵和过程控制^[6]。目前已获得美国食品和药物监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的 Generally Recognized as Safe (GRAS)认证,可用于食品添加剂和膳食补充剂的生产,显示其在工业应用中的安全性与潜力^[7]。随着传统模式生物如大肠杆菌(*Escherichia coli*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在合成天然产物应用上的局限性凸显,利用非传统酵母进行代谢工程改造以生产高价值天然产物的需求愈发迫切^[8]。

芳香族氨基酸衍生物是由芳香族氨基酸酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸衍生的多种具有生理生化活性的高价值天然产物(图 1)。这些化合物

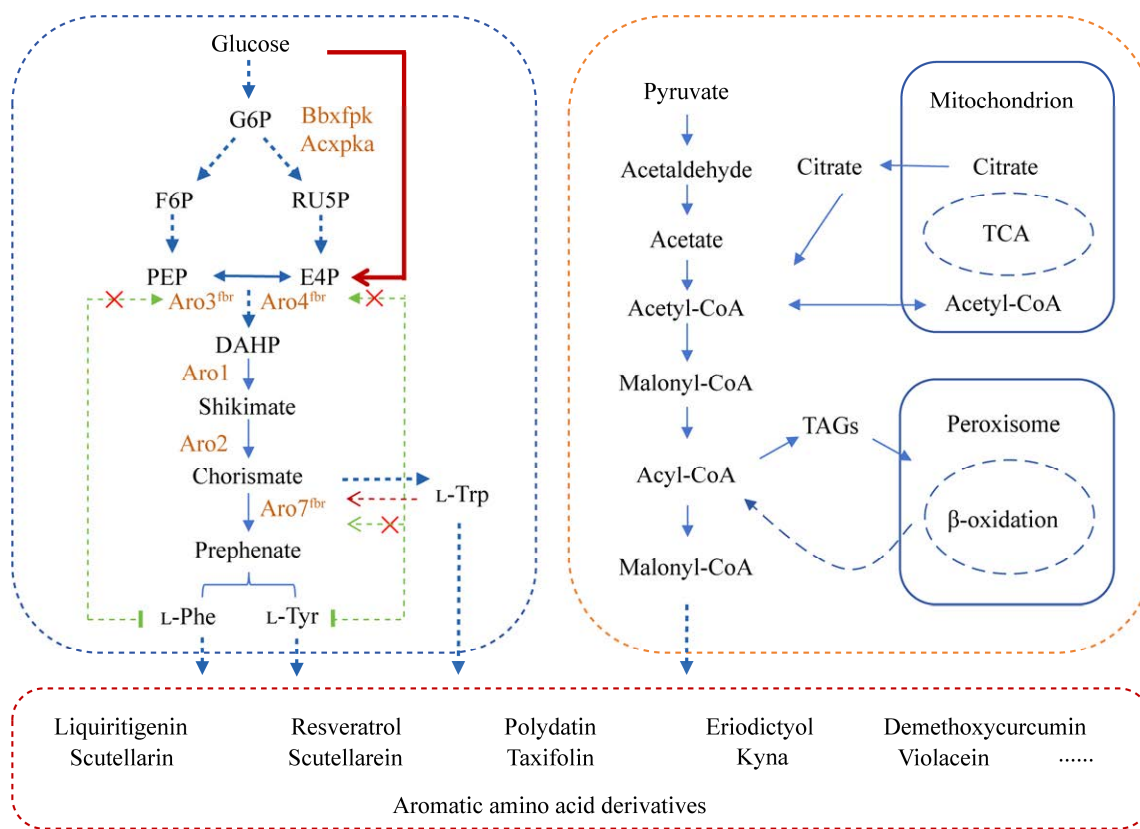


图 1 芳香族氨基酸衍生物的生物合成 G6P: 葡萄糖-6-磷酸; F6P: D-果糖-6-磷酸; RU5P: 核酮糖-5-磷酸; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; E4P: 赤藓糖-4-磷酸; DAHP: 3-脱氧-D-阿拉伯糖庚醛酸-7-磷酸; ARO3、ARO4: 3-脱氧-D-阿拉伯糖庚醛酸 7-磷酸合成酶; ARO1: 五功能芳香化酶; ARO2: 分支酸合酶; ARO7: 分支酸变位酶; TAGs: 三酰基甘油; Bbxfpk: 短双歧杆菌来源的磷酸转酮酶; Acxpka: 衣壳酸杆菌来源的磷酸转酮酶。虚线代表多步反应, 实线代表一步反应, 加粗线条代表异源途径, 绿色虚线部分代表反馈抑制的解除。

Figure 1 Biosynthesis of aromatic amino acid derivatives. G6P: Glucose 6-phosphate; F6P: D-fructose 6-phosphate; RU5P: D-ribulose 5-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; E4P: Erythritol 4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; ARO3, ARO4: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase; ARO1: Pentafunctional Arom protein; ARO2: Chorismate synthase; ARO7: Chorismate mutase; TAGs: Triglycerides; Bbxfpk: Phosphoketolase from *Bifidobacterium breve*; Acxpka: Phosphoketolase from *Acidobacterium capsulatum*. Dashed lines represent multi-step reactions, solid lines represent single-step reactions, bold lines represent heterologous pathways, and the green dotted line part represents the relief of feedback inhibition.

具有抗炎、抗癌和保护心血管等作用。随着合成生物学技术的发展, 越来越多的研究专注于利用微生物细胞工厂合成芳香族氨基酸衍生物。本文旨在综述解脂耶氏酵母在生产芳香族氨基酸衍生物方面的最新进展, 探讨利用代谢

工程策略改造解脂耶氏酵母底盘细胞, 获得高产芳香族氨基酸衍生物的工业菌株, 并展望未来的研究方向。通过这一综述, 我们旨在为利用解脂耶氏酵母开发高效、可持续的生物合成途径提供参考, 并为进一步的工业应用奠定坚实基础。

1 代谢工程改造策略

1.1 基因组规模代谢模型网络构建

解脂耶氏酵母作为一种具有巨大潜力的底盘菌株,对其复杂代谢的研究极其有限,这严重阻碍这种高价值细胞工厂的应用。近年来随着基因组学、蛋白质组学等技术的不断进步,结合日益发达的生物信息学技术,可以实现基因组规模代谢模型网络(genome-scale metabolic model, GEM)的构建。通过将1个甚至多个物种基因组数据、蛋白质数据等组装成复杂的代谢模型,借助深度学习和神经网络计算预测细胞的生长和生产性能。2012年,首次构建解脂耶氏酵母 GEM 模型 iNL895,解析出解脂耶氏酵母全局代谢的网络图^[9]。以此为起点,在之后又发布6个解脂耶氏酵母代谢模型^[10];其中 iMK735 和 iYali4 两种代谢模型可以更准确地描述解脂耶氏酵母的脂质合成和代谢; iYLI647 则被用于长链羧酸的生产。目前最新的模型是 iYli21,基于 W29 菌株构建,在预测代谢利用率方面显示出 85.7% 的高精度,同时也是目前数据量最大的解脂耶氏酵母 GEM 模型^[11]。随着模型不断完善和精细,借助 GEM 模型可以对解脂耶氏酵母的代谢进行全局复杂精细化的调控、挖掘潜在的代谢基因和构建更高效的细胞工厂。

1.2 莽草酸途径的改造策略

合成芳香族氨基酸衍生物的生物合成途径从莽草酸途径开始,葡萄糖首先被转化为磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)和赤藓糖4-磷酸(erythritol 4-phosphate, E4P),经脱醛缩合为3-脱氧-D-阿拉伯庚糖酮酸-7-磷酸(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP),五功能芳香化酶 ARO1 直接催化 DAHP 合成莽草酸,在分支酸合成酶 ARO2 的作用下合成分支酸。分支酸变位酶 ARO7 催化分支酸合成预苯

酸,再经过一系列反应合成芳香族氨基酸 L-苯丙氨酸、L-酪氨酸及其衍生物^[12]。莽草酸途径的代谢改造是解脂耶氏酵母生产芳香族氨基酸衍生物的第一步,在酵母中 PEP 和 E4P 的代谢通量相差一个数量级以上,E4P 是芳香族氨基酸衍生物合成的第一个限速步骤^[12]。为了解决 E4P 供应不足的问题,引入来自短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)的异源磷酸糖酶(phosphoketolase),将果糖6-磷酸(F6P)裂解为 E4P,从而提高 E4P 的浓度^[13]。在解脂耶氏酵母中引入异源磷酸糖酶 Bbxfpk 和 AcxpkA 有效地调控 PEP 和 E4P 的通量平衡,最终获得 593 mg/L 对香豆酸、12 mg/L 白藜芦醇、366 mg/L 紫色杆菌素和 55 mg/L 脱氧紫色杆菌素^[14]。

莽草酸途径的第一步由 DAHP 合酶催化,由 ARO3 和 ARO4 基因编码,负责缩合 PEP 和 E4P 转化为 DAHP,然而,ARO3 和 ARO4 分别受到苯丙氨酸和酪氨酸的抑制,第2个反馈抑制酶是由 ARO7 基因编码的分支酸变位酶,受到酪氨酸和色氨酸的反馈调控。消除反馈抑制已被证明是提高细胞工厂中异源合成芳香族氨基酸衍生物产量的有效策略。过表达 ARO4 和 ARO7 的反馈抑制突变体可以有效地解除反馈抑制,增加前体代谢流,实现产物的高产^[15]。在解脂耶氏酵母中过表达 ARO4^{K221L} 和 ARO7^{G139S} 基因解除莽草酸途径的反馈抑制作用,使白藜芦醇产量提升 2.2 倍^[15]。2023 年对酵母内源的 ARO3 基因进行研究,发现过表达解脂耶氏酵母内源 ARO3^{D154N} 也可以有效解除苯丙氨酸的反馈抑制,这对于进一步提高芳香族氨基酸衍生物的产量提供了改进空间^[16]。

1.3 酰基辅酶 A 的改造策略

乙酰辅酶 A 作为合成芳香族氨基酸衍生物的关键前体,在解脂耶氏酵母主要依赖于 ATP 柠檬酸裂解酶(ATP citrate lyase, ACL)生成(图 2)。通

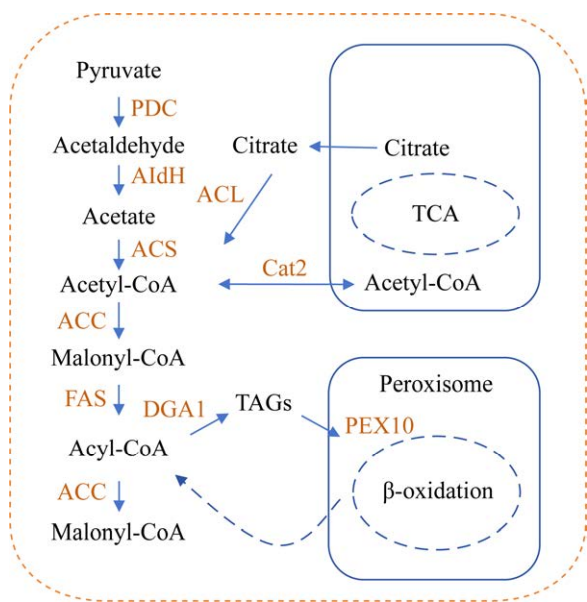


图 2 酰基辅酶 A 改造策略 PDC: 丙酮酸脱羧酶; AldH: 乙醛脱氢酶; ACS: 乙酰辅酶 A 合成酶; ACC: 乙酰辅酶 A 羧化酶; PFL: 丙酮酸甲酸裂解酶; AAD: CoA 酰化乙醛脱氢酶; Cat2: 肉碱乙酰转移酶; ACL: ATP 柠檬酸裂解酶; FAS: 脂肪酸合成酶; DGA1: 二酰甘油转移酶; PEX10: 过氧化物酶体基质蛋白。虚线代表多步反应, 实线代表一步反应。

Figure 2 Metabolic engineering strategies for the Acyl CoA. PDC: Pyruvate decarboxylase; AldH: Aldehyde dehydrogenase; ACS: Acetyl-CoA synthase; ACC: Acetyl-CoA carboxylase; PFL: Pyruvate formate lyase; AAD: CoA-acylating aldehyde dehydrogenase; Cat2: Carnitine acetyltransferase; ACL: ATP citrate lyase; FAS: Fatty acid synthase; DGA1: Diacylglycerol transferase; PEX10: Peroxisome matrix protein. Dashed lines represent multi-step reactions, solid lines represent single-step reactions.

过裂解 TCA 循环中的柠檬酸提供乙酰辅酶 A。在工业化发酵过程中, 通常先在含氮的生长期增加生物量, 再在氮耗尽条件下进行生产。为简化这一过程, 研究者提出通过工程化改造建立独立于 ACL 的胞质乙酰辅酶 A 生成途径, 解耦氮饥饿和乙酰辅酶 A 合成, 从而缩短发酵时间, 构建高效的微生物细胞工厂^[7]。

丙二酰辅酶 A 作为合成芳香族氨基酸衍生物重要的前体, 在解脂耶氏酵母中主要是由乙酰辅酶 A 通过乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC 进行合成(图 2)。通过过表达 ACC 或 ACC 的突变体可以显著增强丙二酰辅酶 A 的合成。在解脂耶氏酵母基因组中整合圣草酚生物合成关键基因 *TAL*、*4CL*、*CHS*、*CHI*、*F3'H* 和 *CPR*, 过表达乙酰辅酶 A 合成酶 ACS2 和乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC, 增强丙二酰辅酶 A 的供给; 通过优化代谢工程策略, 摇瓶发酵实现 54 mg/L 的圣草酚产量^[17]。在此基础上, 将 659 位和 1 157 位的丝氨酸突变为丙氨酸, 可以解除 ACC 的反馈抑制, 增加 ACC 的酶活, 进一步提高丙二酰辅酶 A 的通量^[18]。

过表达过氧化物酶体基质蛋白基因 *PEX10*, 改造 β -氧化途径同样可以增强丙二酰辅酶 A 的合成。利用该策略引入西班牙糖丝菌 (*Saccharothrix espanaensis*) 来源的 *SeSam8*, 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 来源的基因 *Nt4CL* 和水稻 (*Oryza sativa*) 来源的姜黄素合酶基因 *OsCUS* 合成了双去甲氧基姜黄素, 解脂耶氏酵母中过表达过氧化物酶体基质蛋白基因 *PEX10*, 最终合成 0.2 mg/L 的双去甲氧基姜黄素^[19]。

通过降低丙二酰辅酶 A 的消耗同样可以有效增加通量。解脂耶氏酵母作为天然的产油酵母, 主要以三酰基甘油(triglycerides, TAGs)的形式积累脂质, TAGs 通过肯尼迪途径进行合成, 二酰甘油(diacylglycerol, DAG)通过 DAG1 二酰甘油转移酶和乙酰辅酶 A 酰化以产生 TAGs。通过敲除解脂耶氏酵母的 *DAG1* 基因可以有效提高丙二酰辅酶 A 的通量, 将白藜芦醇的产量从 632 mg/L 提高到 819 mg/L^[20]。

1.4 代谢竞争途径的阻断策略

对于芳香族氨基酸衍生物而言, 通过阻断莽草酸途径中竞争途径可以有效提高目标产物的产量。针对莽草酸途径中的竞争基因, 包括

预苯酸脱氢酶基因 *TYR1*、邻氨基苯甲酸合成酶基因 *TRP2*、邻氨基苯甲酸合成酶基因 *TRP3*、芳香族氨基酸转氨酶基因 *ARO8* 和芳香族氨基酸转氨酶基因 *ARO9*，分别通过敲除构建了 3 株不同的芳香族氨基酸缺陷菌株，实验证明对苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸分别进行敲除，其他的芳香族氨基酸产量均有了明显的提高，同时还进一步缓解了 L-苯丙氨酸、L-酪氨酸和 L-色氨酸对 DAHP 合酶的变构调节，减轻了前体的竞争^[14]。

肉桂酸和对香豆酸作为合成芳香族氨基酸衍生物的重要前体，在解脂耶氏酵母中表现出较高耐受性，不会对其生长产生明显的抑制作用^[21]。然而，这 2 种化合物在解脂耶氏酵母中容易被降解，通过对解脂耶氏酵母内源基因的挖掘，确定了编码反式肉桂酸 4-单加氧酶活性的 *TCM1* 基因，其能够将肉桂酸降解为对香豆酸，随后进一步转化为 4-羟基苯甲酸^[21]。进一步探索解脂耶氏酵母内源降解肉桂酸和对香豆酸的途径可提高芳香族氨基酸衍生物的生产量。

在利用解脂耶氏酵母合成芳香族氨基酸衍生物中的糖苷类化合物时，发现内源的葡萄糖苷酶可以降解虎杖苷、灯盏乙素等糖苷类化合物，在发酵后期产物迅速被降解，这不利于解脂耶氏酵母生产糖苷类化合物。进一步的基因挖掘显示，解脂耶氏酵母已知存在 4 种内源葡萄糖苷酶基因 *BGL1*、*BGL2*、*EXG1* 和 *EXG2*，均具有代谢糖苷类化合物的活性^[22-23]。当分别敲除 *BGL2* 和 *EXG1* 基因时，48 h 后的发酵液中虎杖甙保留率分别为 26.7% 和 56.0%；随后，在工程菌株中同时敲除 *BGL2* 和 *EXG1*，虎杖甙的产量达到 1 736 mg/L^[24]。而这 4 种基因的敲除对灯盏乙素的降解均无影响^[25]，因此，进一步挖掘内源的糖苷酶，防止糖苷类化合物的降解，是构建解脂耶氏酵母生产糖苷类化合物细胞工厂的关键问题之一。

1.5 动态调控策略

由于细胞代谢网络本身的复杂性，通过过表达关键基因、抑制和敲除降解途径或旁路途径往往会扰乱细胞本身的代谢流，造成细胞的生长负担乃至细胞毒性。通过在解脂耶氏酵母中构建动态调控系统，实时响应细胞内代谢，协调细胞生长和产物合成可以克服这一问题。

首先在解脂耶氏酵母中成功构建的是脂肪酸诱导系统^[26]，通过筛选脂肪酸诱导性启动子 *POX2*，能在油酸诱导下显著增强基因表达，表达水平比葡萄糖诱导高出 48 倍，可以实现比天然 *POX2* 启动子高出 10 倍以上的表达水平。通过在解脂耶氏酵母中构建双向的铜离子诱导启动子^[27]，最强的启动子强度与天然强启动子 *TEF* 强度一致，诱导范围可达 30 倍。

通过融合大肠杆菌激活因子 *XylR*、激活结构域(AD)VPRH 和木糖操纵子组成的木糖诱导生物传感器，在解脂耶氏酵母中构建木糖诱导的表达系统 *VPRHX*，能有效利用木糖并转化为多种中间代谢产物，如 E4P 等，木糖诱导生物传感器的引入实现柚皮素的产量达到 715 mg/L^[28]。

利用细菌来源的绿光诱导因子 *CarH* 在解脂耶氏酵母中构建光控表达系统^[29]；利用光控诱导系统在解脂耶氏酵母中合成对香豆酸，阶段性切换光照条件下对香豆酸的产量明显增加，比持续无光对照组高出 1.2 倍。光调节生物传感器的优点是它们可以在不改变细胞代谢条件的情况下调节基因表达水平，在时间和空间上更易于操纵。

迄今为止，在解脂耶氏酵母中已经构建 4 种不同的动态调控系统，通过精确调整基因表达水平和代谢途径的活性，可以实现对细胞内代谢流的有效控制；还有助于解决诸如代谢瓶颈、产物毒性和能量分配不平衡等挑战，使其成为一种更为高效和可靠的生物生产平台。

1.6 代谢途径平衡策略

合成芳香族氨基酸衍生物的关键酶往往来自不同的植物或真菌，在解脂耶氏酵母中共表达构建细胞工厂时会表现出不同强度的催化活性，外源基因的表达强度和适配度对产物合成至关重要。但在异源途径较长时，对每一步进行测试和优化工程量较大，通过模块化工程将一条途径分解为生物合成模块，每个模块可以在异源宿主中独立测试和优化。在解脂耶氏酵母中利用模块化工程合成黄酮和羟基化黄酮，构建柚皮素合成模块和二氢槲皮素合成模块，在柚皮素合成模块中，通过拷贝数的组合确定查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)作为柚皮素模块的限速步骤；在二氢槲皮素合成模块中，筛选组合 2 种植物来源的黄烷酮羟化酶(flavanone-3-hydroxylase, F3H)和 3 种细胞色素 P450 还原酶(cytochrome P450 reductase, CPR)进行羟基化反应，最终在摇瓶中获得 110 mg/L 的产量^[30]。在解脂耶氏酵母中引入矮牵牛(*Petunia hybrid*)来源的 PhCHS，紫苜蓿(*Medicago sativa*)来源的查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)构建从头合成圣草酚菌株；将圣草酚合成模块 CHS、CHI、F3H 和 CPR 整合在 ZETA 多拷贝位点上，通过 5 L 发酵罐获得 6 800 mg/L 的圣草酚^[31]。

为了提高代谢流的利用效率，尽可能地降低副产品的积累对于提高目标产物的纯度、降低后续分离纯化的成本有着重要的价值。甘草素的合成过程中，对香豆酸底物经 4CL 和 CHS 催化作用形成的聚酮中间体在水溶液中很容易自发生成柚皮素。在解脂耶氏酵母中采用去除终止子、融合 CHS 和 CHR、调整启动子序列长度 3 种策略可将甘草素的产量从 8 mg/L 提高到 62 mg/L^[32]。在解脂耶氏酵母中合成的抗癌药物紫色杆菌素和脱氧紫色杆菌素互为副产

物，将 *vioABCDE* 通过强、中、弱 3 种不同的启动子串联表达，当所有 5 个基因都由最强的 TEF 启动子进行调控时，紫色杆菌素的产量最高，达到 35 mg/L，是最低产量菌株的 51 倍；当 *vioB*、*vioD* 和 *vioE* 基因由最弱的 *ZWF1* 启动子控制时，脱氧紫色杆菌素产量最高，也达到 35 mg/L，在总产物中的比例高达 91%^[33]。

代谢途径平衡工程提高了碳利用率，有效平衡了细胞内代谢通量，实现底盘细胞和异源途径的适配，对于提高产物产量和纯度、实现微生物细胞工厂的高效合成有着重要的意义。

1.7 辅因子工程

辅因子为生物体内的合成和反应提供氧化还原的能量，生物体内依赖辅因子的依赖型代谢反应超过 1 000 种^[34]。而在芳香族氨基酸衍生物合成过程中需要消耗辅因子如 NADH/NAD⁺、NADPH/NADP⁺等，一方面维持细胞内正常的代谢反应，另一方面为产物合成提供电子供体。代谢工程改造会破坏胞内原有的辅因子平衡，严重影响细胞生长和产物合成。因此，通过辅因子工程调控胞内 NADH/NAD⁺、NADPH/NADP⁺氧化和还原速率平衡可以有效提高细胞代谢^[35]。

以葡萄糖为碳源时，磷酸戊糖(PPP)途径是细胞内 NADPH 的主要来源，在 PPP 途径中 G6P 在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(ZWF1)和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(GND1)的作用下脱 H⁺转移合成 NADPH。此外，细胞质 NADPH 生成途径包括 NADP 特异性异柠檬酸脱氢酶(IDP2)、苹果酸脱氢酶(MAE)和山梨醇脱氢酶(MnDH2)介导的酶反应^[35]。在解脂耶氏酵母中过表达欧芹(*Petroselinum crispum*)来源的黄酮合酶(flavone synthase I, FNS I)、黄芩(*Scutellaria baicalensis*)来源的 SbF6H、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)来源的 ATR2、灯盏花(*Erigeron breviscapus*)来源的 F7GAT 和 UDPGDH 合成灯盏乙素，通过强化 NADPH 的供给，过

表达 ZWF1 和 GND1 增强 NADPH 生成, 灯盏乙素产量增加到 110 mg/L^[36]。同样, 在圣草酚合成菌株中过表达 ZWF1 和 GND1, 将圣草酚的产量从 172 mg/L 提高到 219 mg/L^[31]。

除了通过过表达 NADPH 相关合成酶来增强胞内辅因子的供给, 还可以采取敲除竞争途径、引入外源的代谢途径、通过定点诱变改善酶对 NADPH 的偏好性或利用新材料进行辅因子的再生^[37]。在解脂耶氏酵母中开发更多的辅因子工程策略, 有助于代谢工程在生物合成中的进一步应用。

1.8 酶工程

在自然界中, 绝大多数芳香族氨基酸衍生物由植物产生, 利用解脂耶氏酵母进行微生物细胞工厂的构建时, 异源酶的适配非常关键。对不同来源的异源酶进行组合筛选, 可以有效地提升芳香族氨基酸衍生物的产量。筛选拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)和桃(*Prunus persica*)来源的苯丙氨酸解氨酶(PAL), 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)以及 CHS 和 CHI, 引入来自苜蓿(*Medicago sativa*)的 CHR, 首次在解脂耶氏酵母中实现甘草素的从头合成, 产量为 62 mg/L^[32]。

尽管可以通过筛选天然来源的酶进行异源途径的构建, 但是天然酶具有许多局限性, 在多步反应的时候还存在中间产物泄漏的情况, 极大地影响微生物细胞工厂的构建。利用融合蛋白可以改善中间产物的泄漏情况, 避免中间产物的积累对细胞生长产生影响。通过组合 6 个基因 *FjTAL*、*RgTAL*、*TcTAL*、*Pc4CL1*、*At4CL1*、*VvSTS*, 实现白藜芦醇的异源表达, 使用刚性 linker 连接 *At4CL* 和 *VvSTS* 构建融合蛋白, 缓解中间产物对香豆酸的积累; 最终, 白藜芦醇产量在 5 L 发酵罐中达到 22.5 g/L^[20]。

1.9 发酵工程改造策略

解脂耶氏酵母作为一种二型性模式生物,

当暴露在各种应激环境如温度、pH 值、渗透压等情况下, 甚至异源通路的强烈表达也会产生代谢应激, 从酵母形态转换为菌丝形态以提高生存适应性^[38]。菌丝形态下很难通过离心收集到发酵产物, 同时代谢降低和发酵液流变性质的改变对发酵过程控制极为不利^[39]。在解脂耶氏酵母中, 丝裂原蛋白激酶信号通路 MAPK 和 cAMP 依赖的蛋白激酶 A 信号通路 PKA 是控制二型性的主要信号通路^[40-41]。RAS 蛋白是介导这 2 条信号通路的核心蛋白, 研究表明, RAS 蛋白对菌丝形成具有显著的促进作用^[42]。解脂耶氏酵母的二型性调控还涉及一些特有的调控蛋白, Hurtado 等^[43]通过 EMS 诱变筛选得到菌丝促进转录因子 *MHY1*, 其缺失导致细胞丧失菌丝形成能力。*CLA4* 编码 PAK 通路中的蛋白激酶, 通过删除解脂耶氏酵母中的 *CLA4* 和 *MHY1* 基因, 能够有效地将细胞从菌丝形态转变回酵母形态; 菌体形态的改变显著提高 β -胡萝卜素的产量, 达到 7 600 mg/L, 将产量提高了 139%^[44]。解脂耶氏酵母能在酵母形态和菌丝形态之间进行转换, 这种形态变化对其在工业发酵和生物工程应用中的表现有着重要的影响。

在微生物发酵过程中, 由于遗传和非遗传变异, 导致原本表型一致的细胞群体发生分化, 出现生产性能高低不同的突变体, 导致整体生产能力的下降甚至完全丧失。为了解决这种现象, LV 等^[45]提出将化学成瘾与负反馈调控相结合的策略, 以提高解脂耶氏酵母柚皮素发酵菌株代谢稳定性和产量; 通过脂肪酸诱导型启动子结合 CRISPRi 对脂肪酸生成途径进行负反馈调控, 重新分配丙二酰辅酶 A 的代谢流以促进黄酮合成, 使柚皮素产量增加 75%。利用生物传感器调控亮氨酸的合成, 使细胞的生长和生产解偶联, 经过连续传代培养工业菌株的柚皮素产量在 324 代中仍保持 91% 的稳定性^[45]。

发酵过程中,氧气的供给对于细胞生长也非常重要,在解脂耶氏酵母合成灯盏乙素的工程菌中,提高菌株对氧气的捕获能力能够促进灯盏乙素的生物合成。通过引入粪透明颤菌(*Vitreoscilla stercoraria*)来源的透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla hemoglobin*, VHb),提高菌株氧气的吸收能力,促进细胞生长,实现 703 mg/L 的灯盏乙素产量^[36]。

2 总结与展望

近年来,合成生物学和代谢工程技术的进步极大地推动了解脂耶氏酵母在天然产物合成

领域的应用。作为非常规模式生物之一,解脂耶氏酵母已成功合成多种芳香族氨基酸衍生物(图 3,表 1),展现出合成高附加值活性物质的潜力。通过对中心碳代谢的重构、代谢途径的强化、动态调控系统的构建,极大地提升了解脂耶氏酵母合成芳香族氨基酸衍生物的能力。基因组模型的构建和发酵工程的研究使得改造解脂耶氏酵母以使其更加适合工业化生产成为可能。

尽管取得了许多进展,但解脂耶氏酵母的代谢工程改造仍然存在诸多挑战。在代谢工程改造手段方面,遗传操作的手段有限,基因编

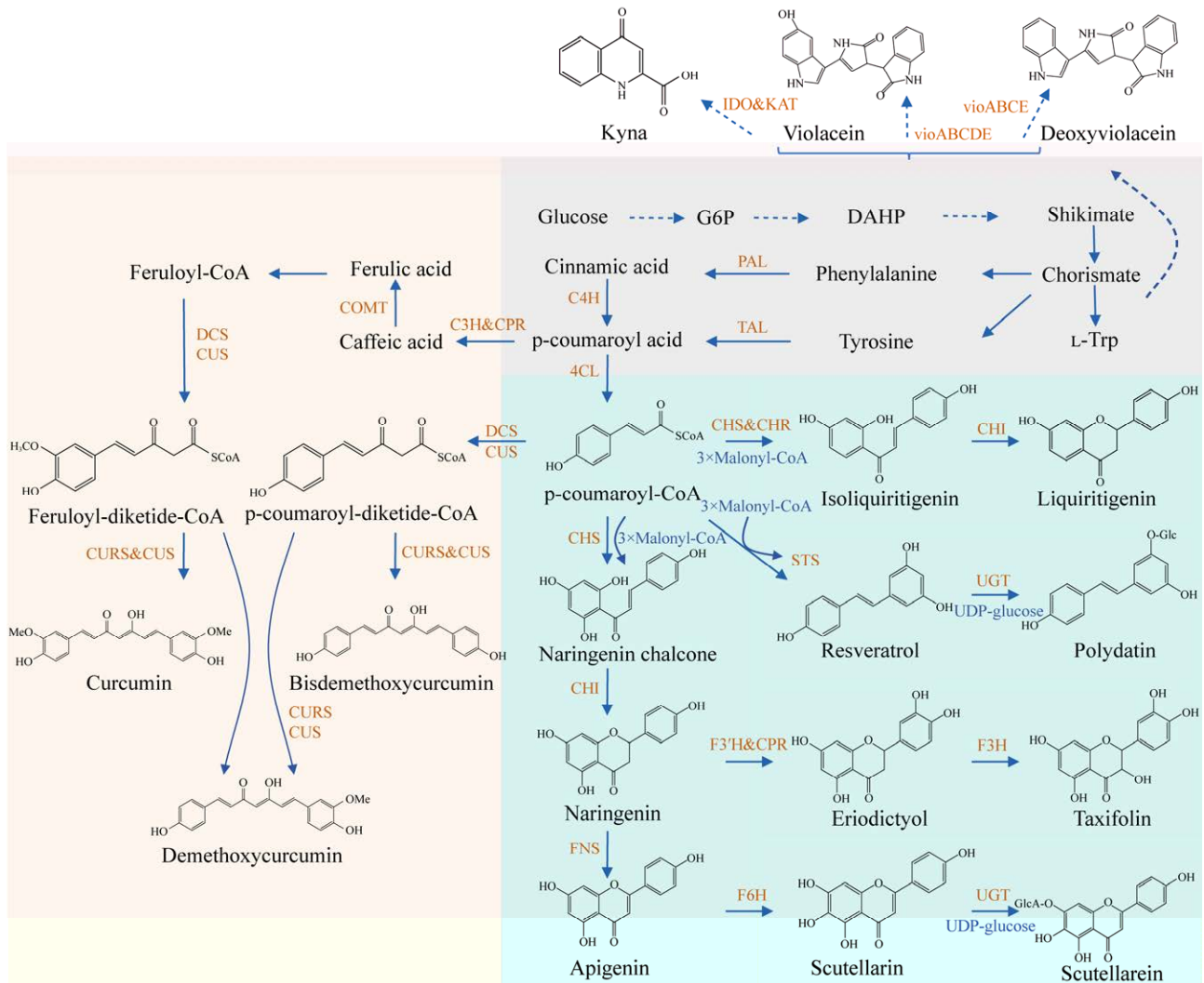


图 3 芳香族氨基酸衍生物生物合成途径 PAL: 苯丙氨酸解氨酶; C4H: 反式肉桂酸 4-单加氧酶;

CPR: 细胞色素 P450 还原酶; TAL: 酪氨酸氨裂解酶; 4CL: 对香豆酸 CoA 连接酶; CHI: 查尔酮异构酶; STS: 二苯乙烯合酶; UGT: UDP 葡萄糖基转移酶; CHS: 查尔酮合成酶; CHR: 查尔酮还原酶; F3'H: 类黄酮 3'-羟化酶; F3H: 黄酮-3-羟化酶; FNS: 黄酮合成酶; F6H: 黄酮-6-羟化酶; C3H: 香豆酸-3-羟化酶; COMT: 咖啡酰 CoA 3-O-甲基转移酶; CUS: 姜黄素合酶; DCS: 双酮 CoA 合酶; CURS: 姜黄素合成酶; IDO: 吲哚胺 2,3-二氧合酶; KAT: 犬尿氨酸氨基转移酶; VioABCDE: 紫色杆菌素合酶。图中虚线代表多步反应, 实线代表一步反应。

Figure 3 Biosynthetic pathways of aromatic amino acid derivatives. PAL: Phenylalanine ammonia lyase; C4H: Trans-cinnamate 4-monooxygenase; CPR: Cytochrome P450 reductase; TAL: Tyrosine ammonia lyase; 4CL: 4-coumarate-CoA ligase; CHI: Chalcone isomerase; STS: Stilbene synthase; UGT: UDP-glucosyltransferase; CHS: Chalcone synthase; CHR: Chalcone reductase; F3'H: Flavonoid 3'-hydroxylase; F3H: Flavanone-3-hydroxylase; FNS: Flavone synthase; F6H: Flavone-6-hydroxylase; C3H: p-coumarate 3-hydroxylase; COMT: Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase. CUS: Curcuminoid synthase; DCS: Diketone-CoA synthase; CURS: Curcumin synthase; IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase; KAT: Kynurenine aminotransferases; VioABCDE: Violacein synthase. Dashed lines represent multi-step reactions, solid lines represent single-step reactions.

表 1 解脂耶氏酵母合成芳香族氨基酸衍生物

Table 1 Production of aromatic compounds in *Yarrowia lipolytica*

化合物 Compound	合成生物学策略 Synthetic biology strategy	底物 Substrate	发酵条件 Fermentation condition	产量 Titer (mg/L)	参考文献 Reference
柚皮素 Naringenin	过表达 ACS, ACC 增强丙二酰辅酶 A	葡萄糖	摇瓶	252.0	[30]
	Overexpression of ACS, ACC enhances malonyl CoA	Glucose	Flask		
	解除 DAHP 反馈抑制, β 氧化途径	葡萄糖	3 L 发酵罐	898.0	[19]
圣草酚 Eriodictyol	Relieve DAHP feedback inhibition, β -oxidation pathway	葡萄糖	3 L		
	引入木糖生物传感器	木糖	fermentation		
	Introducing xylose biosensors	xylose	摇瓶	715.0	[28]
二氢槲皮素 Taxifolin	过表达 ACS, ACC 增强丙二酰辅酶 A	葡萄糖	摇瓶	54.0	[17]
	Overexpression of ACS, ACC enhances malonyl CoA	Glucose	Flask		
	模块化工程, 增加拷贝数	葡萄糖	摇瓶	134.0	[30]
甘草素 Liquiritigenin	Modular engineering, increase gene copy number	Glucose	Flask		
	解除 DAHP 反馈抑制, β 氧化途径, 增加关键酶拷贝数	葡萄糖	5 L 发酵罐	6 800.0	[31]
	Relieve DAHP feedback inhibition, β -oxidation pathway, increase gene copy number	Glucose	5 L fermentation		
二氢槲皮素 Taxifolin	过表达 ACS, ACC 增强丙二酰辅酶 A	葡萄糖	摇瓶	110.0	[30]
甘草素 Liquiritigenin	Overexpression of ACS, ACC enhances malonyl CoA	Glucose	Flask		
	模块化工程, 蛋白质融合	葡萄糖	摇瓶	62.0	[32]
	Modular engineering, protein fusion	Glucose	Flask		

(待续)

(续表 1)

化合物 Compound	合成生物学策略 Synthetic biology strategy	底物 Substrate	发酵条件 Fermentation condition	产量 Titer (mg/L)	参考文献 Reference
白藜芦醇 Resveratrol	解除 DAHP 反馈抑制, 敲除旁路途径 Release DAHP feedback inhibition, knock out bypass pathways	葡萄糖 Glucose	摇瓶 Flask	12.0	[14]
	解除 DAHP 反馈抑制, β 氧化途径 Relieve DAHP feedback inhibition, β -oxidation pathway	对香豆酸 p-coumaric acid	摇瓶 Flask	48.0	[19]
	解除 DAHP 反馈抑制, 过表达 ACS, ACC 增强丙二酰辅酶 A Relieve DAHP feedback inhibition, overexpression of ACS, ACC enhances malonyl CoA	葡萄糖 Glucose	1 L 发酵罐 1 L fermentation	12 400.0	[15]
	解除 DAHP 反馈抑制, 引入苯丙氨酸和 酪氨酸双通路, 敲除 DAG 基因 Release DAHP feedback inhibition, introduce dual pathways of phenylalanine and tyrosine, and knock out DAG gene	葡萄糖 Glucose	5 L 发酵罐 5 L fermentation	22 500.0	[20]
灯盏乙素 Scutellarin	模块化工程, 增加拷贝数 Modular engineering, increase gene copy number	葡萄糖 Glucose	1.3 L 发酵罐 1.3 L fermentation	346.0	[36]
	辅因子工程 Cofactor engineering	葡萄糖 Glucose	摇瓶 Flask	703.0	[25]
虎杖苷 Polydatin	敲除糖苷水解酶 Knockout glycoside hydrolase	葡萄糖 Glucose	摇瓶 Flask	6 880.0	[24]
双去甲氧基姜黄素 Bisdemethoxycurcumin	β 氧化途径 β -oxidation pathway	葡萄糖 Glucose	摇瓶 Flask	0.2	[19]
紫色杆菌素 Violacein	异源途径整合 Integration of heterogeneous pathways	葡萄糖 Glucose	摇瓶 Flask	32.0	[46]
	重构中心碳代谢, 解除 DAHP 反馈抑制 Restructuring central carbon metabolism, relieving DAHP feedback inhibition	葡萄糖 Glucose	摇瓶 Flask	366.0	[14]
	启动子工程 Promoter engineering	葡萄糖 Glucose	摇瓶 Flask	70.0	[33]
脱氧紫色杆菌素 Deoxyviolacein	重构中心碳代谢, 解除 DAHP 反馈抑制 Restructuring central carbon metabolism, relieving DAHP feedback inhibition	葡萄糖 Glucose	摇瓶 Flask	55.0	[14]
	启动子工程 Promoter engineering	葡萄糖 Glucose	摇瓶 Flask	35.0	[33]
犬尿酸 Kynurenic acid	—	色氨酸 Tryptophan	摇瓶 Flask	21.0	[47]
	—	蜂蜜 Honey	摇瓶 Flask	67.0	[48]

辑工具效率低、操作烦琐。缺乏高效的整合位点, 稳定高拷贝的表达载体以及可用的启动子等问题亟须解决。在遗传改造方面, 不同菌株的筛选、内源代谢途径的优化、细胞器工程的深入研究、解决产物抑制问题及优化发酵控制条件都是实现工业化的关键。

解脂耶氏酵母在合成生物学领域仍有广阔的发展空间。未来的重点将是进一步进行遗传和代谢改造, 并探索其在生产更多类型天然产物中的潜力。同时, 如何将这些研究成果从实验室规模转化为工业生产, 解决规模化生产中可能遇到的技术和经济瓶颈, 这将是实现工业应用的关键。

REFERENCES

- [1] XU XH, LIU YF, DU GC, LEDESMA-AMARO R, LIU L. Microbial chassis development for natural product biosynthesis[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(7): 779-796.
- [2] MA YR, WANG KF, WANG WJ, DING Y, SHI TQ, HUANG H, JI XJ. Advances in the metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for the production of terpenoids[J]. Bioresource Technology, 2019, 281: 449-456.
- [3] MADZAK C. *Yarrowia lipolytica* strains and their biotechnological applications: how natural biodiversity and metabolic engineering could contribute to cell factories improvement[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(7): 548.
- [4] 孔婧, 朱坤, 刘士琦, 荣兰新, 肖冬光, 于爱群. 代谢工程改造解脂耶氏酵母合成植物萜类化合物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1302-1313.
KONG J, ZHU K, LIU SQ, RONG LX, XIAO DG, YU AQ. Advances in metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to synthesize plant-derived terpenoids[J]. Microbiology China, 2021, 48(4): 1302-1313 (in Chinese).
- [5] SEKOVA VY, ISAKOVA EP, DERYABINA YI. Biotechnological applications of the extremophilic yeast *Yarrowia lipolytica* (review)[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2015, 51(3): 278-291.
- [6] CUI ZY, GAO CJ, LI JJ, HOU J, LIN CSK, QI QS. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42: 126-133.
- [7] XU P, QIAO KJ, AHN WS, STEPHANOPOULOS G. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(39): 10848-10853.
- [8] GROENEWALD M, BOEKHOUT T, NEUVÉGLISE C, GAILLARDIN C, van DIJCK PWM, WYSS M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2014, 40(3): 187-206.
- [9] LOIRA N, DULERMO T, NICAUD JM, SHERMAN DJ. A genome-scale metabolic model of the lipid-accumulating yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. BMC Systems Biology, 2012, 6: 35.
- [10] PAN PC, HUA Q. Reconstruction and in silico analysis of metabolic network for an oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51535.
- [11] GUO YF, SU LQ, LIU Q, ZHU Y, DAI ZJ, WANG QH. Dissecting carbon metabolism of *Yarrowia lipolytica* type strain W29 using genome-scale metabolic modelling[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2022, 20: 2503-2511.
- [12] GUO XF, WU XX, MA H, LIU HY, LUO YZ. Yeast: a platform for the production of L-tyrosine derivatives[J]. Yeast, 2023, 40(5/6): 214-230.
- [13] LIU QL, YU T, LI XW, CHEN Y, CAMPBELL K, NIELSEN J, CHEN Y. Rewiring carbon metabolism in yeast for high level production of aromatic chemicals[J]. Nature Communications, 2019, 10: 4976.
- [14] GU Y, MA JB, ZHU YL, DING XY, XU P. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a chassis for *de novo* synthesis of five aromatic-derived natural products and chemicals[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(8): 2096-2106.
- [15] SÁEZ-SÁEZ J, WANG GK, MARELLA ER, SUDARSAN S, PASTOR MC, BORODINA I. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for high-level resveratrol production[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 51-61.
- [16] LIU HY, XIAO QJ, WU XX, MA H, LI J, GUO XF, LIU ZY, ZHANG Y, LUO YZ. Mechanistic investigation of a D to N mutation in DAHP synthase that dictates carbon flux into the shikimate pathway in yeast[J]. Communications Chemistry, 2023, 6: 152.
- [17] LV YK, EDWARDS H, ZHOU JW, XU P. Combining 26s rDNA and the cre-loxP system for iterative gene integration and efficient marker curation in *Yarrowia lipolytica*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(3): 568-576.
- [18] SHI SB, CHEN Y, SIEWERS V, NIELSEN J. Improving production of malonyl coenzyme A-derived metabolites by abolishing Snf1-dependent regulation of ACC[J]. mBio, 2014, 5(3): e01130-14.
- [19] PALMER CM, MILLER KK, NGUYEN A, ALPER HS. Engineering 4-coumaroyl-CoA derived polyketide production in *Yarrowia lipolytica* through a β -oxidation mediated strategy[J]. Metabolic Engineering, 2020, 57: 174-181.
- [20] LIU MS, WANG C, REN XF, GAO S, YU SQ, ZHOU JW. Remodelling metabolism for high-level resveratrol production in *Yarrowia lipolytica*[J]. Bioresource Technology, 2022, 365: 128178.
- [21] KONZOCK O, ZAGHEN S, NORBECK J. Tolerance of *Yarrowia lipolytica* to inhibitors commonly found in lignocellulosic hydrolysates[J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 77.
- [22] GUO ZP, DUQUESNE S, BOZONNET S, CIOCI G, NICAUD JM, MARTY A, O'DONOHUE MJ.

- Development of cellobiose-degrading ability in *Yarrowia lipolytica* strain by overexpression of endogenous genes[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 109.
- [23] WANG HM, YANG Y, LIN L, ZHOU WL, LIU MZ, CHENG KD, WANG W. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* with the deletion of endogenous glucosidases for the production of flavonoid glucosides[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 134.
- [24] SHANG YZ, ZHANG P, WEI WP, LI J, YE BC. Metabolic engineering for the high-yield production of polydatin in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 381: 129129.
- [25] ZHANG P, WEI WP, SHANG YZ, YE BC. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for high-level production of scutellarin[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 385: 129421.
- [26] SHABBIR HUSSAIN M, WHEELDON I, BLENNER MA. A strong hybrid fatty acid inducible transcriptional sensor built from *Yarrowia lipolytica* upstream activating and regulatory sequences[J]. *Biotechnology Journal*, 2017, 12(10): 1700248.
- [27] XIONG XC, CHEN SL. Expanding toolbox for genes expression of *Yarrowia lipolytica* to include novel inducible, repressible, and hybrid promoters[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(8): 2208-2213.
- [28] WEI WP, SHANG YZ, ZHANG P, LIU Y, YOU D, YIN BC, YE BC. Engineering prokaryotic transcriptional activator XylR as a xylose-inducible biosensor for transcription activation in yeast[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(5): 1022-1029.
- [29] 张萍, 魏文平, 周英, 叶邦策. 解脂耶氏酵母中光控表达系统的构建及其应用研究[J]. *合成生物学*, 2021, 2(5): 778-791.
- ZHANG P, WEI WP, ZHOU Y, YE BC. Construction of a light-controlled expression system and its application in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(5): 778-791 (in Chinese).
- [30] LV YK, MARSAFARI M, KOFFAS M, ZHOU JW, XU P. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(11): 2514-2523.
- [31] YUE MY, LIU MS, GAO S, REN XF, ZHOU SH, RAO YJ, ZHOU JW. High-level *de novo* production of (2S)-eriodictyol in *Yarrowia lipolytica* by metabolic pathway and NADPH regeneration engineering[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(8): 4292-4300.
- [32] AKRAM M, RASOOL A, AN T, FENG XD, LI C. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for liquiritigenin production[J]. *Chemical Engineering Science*, 2021, 230: 116177.
- [33] TONG YJ, ZHOU JW, ZHANG L, XU P. A golden-gate based cloning toolkit to build violacein pathway libraries in *Yarrowia lipolytica*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(1): 115-124.
- [34] 陈修来, 刘佳, 罗秋玲, 刘立明. 微生物辅因子平衡的代谢调控[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(1): 16-26.
- CHEN XL, LIU J, LUO QL, LIU LM. Manipulation of cofactor balance in microorganisms[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(1): 16-26 (in Chinese).
- [35] DENG C, LV XQ, LI JH, ZHANG HZ, LIU YF, DU GC, AMARO RL, LIU L. Synergistic improvement of N-acetylglucosamine production by engineering transcription factors and balancing redox cofactors[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67: 330-346.
- [36] WANG YN, LIU XN, CHEN BH, LIU W, GUO ZK, LIU XY, ZHU XX, LIU JY, ZHANG J, LI J, ZHANG L, GAO YD, ZHANG GH, WANG Y, CHOUDHARY MI, YANG SC, JIANG HF. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for scutellarin production[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 7(3): 958-964.
- [37] KADOWAKI JT, JONES TH, SENGUPTA A, GOPALAN V, SUBRAMANIAM VV. Copper oxide-based cathode for direct NADPH regeneration[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 180.
- [38] RUTHERFORD JC, BAHN YS, van den BERG B, HEITMAN J, XUE CY. Nutrient and stress sensing in pathogenic yeasts[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 442.
- [39] BELLOU S, MAKRI A, TRIANTAPHYLLOU IE, PAPANIKOLAOU S, AGGELIS G. Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment[J]. *Microbiology*, 2014, 160(Pt 4): 807-817.
- [40] CERVANTES-CHÁVEZ JA, KRONBERG F, PASSERON S, RUIZ-HERRERA J. Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(5): 390-399.
- [41] CERVANTES-CHÁVEZ JA, RUIZ-HERRERA J. STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2006, 6(5): 801-815.
- [42] LI M, LI YQ, ZHAO XF, GAO XD. Roles of the three Ras proteins in the regulation of dimorphic transition in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(3): 451-463.
- [43] HURTADO CA, RACHUBINSKI RA. MHY1 encodes a C₂H₂-type zinc finger protein that promotes dimorphic transition in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(10): 3051-3057.
- [44] LIU MM, ZHANG J, YE JR, QI QS, HOU J. Morphological and metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to increase β -carotene production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(12): 3551-3560.
- [45] LV YK, GU Y, XU JL, ZHOU JW, XU P. Coupling metabolic addiction with negative autoregulation to improve strain stability and pathway yield[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 79-88.
- [46] WONG L, ENGEL J, JIN EQ, HOLDRIDGE B, XU P. YaliBricks, a versatile genetic toolkit for streamlined and rapid pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2017, 5: 68-77.
- [47] WRÓBEL-KWIATKOWSKA M, TURSKI W, KOCKI T, RAKICKA-PUSTUŁKA M, RYMOWICZ W. An efficient method for production of kynurenic acid by *Yarrowia lipolytica*[J]. *Yeast*, 2020, 37(9/10): 541-547.
- [48] WRÓBEL-KWIATKOWSKA M, TURSKI W, JUSZCZYK P, KITA A, RYMOWICZ W. Improved production of kynurenic acid by *Yarrowia lipolytica* in media containing different honeys[J]. *Sustainability*, 2020, 12(22): 9424.