

产甘油假丝酵母及其研究进展

诸葛健^{1,2}, 诸葛斌^{*1,2}, 姜东琪^{1,2}, 王专^{1,2}, 陆信曜^{1,2}, 宗红^{1,2}

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院 工业微生物研究中心, 江苏 无锡 214122

诸葛健, 诸葛斌, 姜东琪, 王专, 陆信曜, 宗红. 产甘油假丝酵母及其研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 4899-4908.

ZHUGE Jian, ZHUGE Bin, JIANG Dongqi, WANG Zhuan, LU Xinyao, ZONG Hong. Research progress in *Candida glycerinogenes*[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 4899-4908.

摘要: 产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)是一株具有 50 多年研究史的自主知识产权菌株, 本课题组利用该菌建立了全球最高产量的甘油好氧发酵工业化技术。随着近年来对该菌研究的不断深入, 发现其具有很强的抗逆性和高效的糖代谢能力, 是非常有潜力的合成生物学工业底盘细胞。本文通过对 *C. glycerinogenes* 的发现过程、特点、国内外发酵甘油技术工业化, 以及其在分子操作系统、信号应答和代谢工程等方面的研究进展进行论述和回顾, 并对未来的发展方向进行展望, 为建立起自主知识产权和创新的合成生物学体系提供借鉴和参考。

关键词: 产甘油假丝酵母; 研究进展; 工业微生物; 代谢工程

Research progress in *Candida glycerinogenes*

ZHUGE Jian^{1,2}, ZHUGE Bin^{*1,2}, JIANG Dongqi^{1,2}, WANG Zhuan^{1,2}, LU Xinyao^{1,2}, ZONG Hong^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Industrial Microbiology Research Center, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: *Candida glycerinogenes* is a strain with independent intellectual property right and more than 50 years of research history. Our research group has established the aerobic fermentation technology with this strain for glycerol production and achieved the world's highest yield. As the research on this yeast is deepening in recent years, researchers have discovered that *C. glycerinogenes* has strong resistance and high efficiency of sugar

资助项目: 国家自然科学基金(22278187)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22278187).

*Corresponding author. E-mail: bzhuge@163.com

Received: 2024-06-17; Accepted: 2024-08-02; Published online: 2024-08-27

metabolism, demonstrating the potential of serving as an industrial chassis cell for synthetic biology. This paper reviews the discovery process and characteristics of *C. glycerinogenes*, the industrialization of fermentation technology for glycerol production, and the research progress in the molecular operating system, signaling responses, and metabolic engineering of this yeast, and makes an outlook on the future direction of development, aiming to provide reference for establishing an innovative synthetic biology system with independent property right.

Keywords: *Candida glycerinogenes*; research progress; industrial microorganism; metabolic engineering

工业底盘细胞是发酵工业和合成生物学发展的核心问题之一。然而,在当前的研究中,大多数重要的工业菌株,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)等,多是由国外专家学者发现并命名,并且申请了相应的知识产权^[1-2],这暴露了我国在微生物领域的不足。加强对本土微生物资源的深入挖掘和利用,建立起自主知识产权和创新的合成生物学体系是当前工业微生物学研究亟待解决的重要问题之一。产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)由我国鉴定命名,研究了50多年且具有自主知识产权的一株多重抗逆工业酵母,因其强大的甘油产生能力而闻名^[3-4]。研究表明该菌株在高糖、高盐、低pH、高温、有毒化合物等条件下均具有很强的生长优势,培养基配方简单,容易控制,有广阔的工业用途,是非常有潜力的合成生物学工业应用底盘细胞。

目前,关于 *C. glycerinogenes* 的科学研究和工业化方面已经取得了不少进展。本文主要阐述 *C. glycerinogenes* 的发现过程、特点、国内外产甘油工业化,以及其在分子操作、信号应答及代谢工程等方面的研究进展,并对未来的发展方向进行展望,旨在为工业微生物和合成生物学的发展提供一定的理论借鉴和参考。

1 *C. glycerinogenes* 的发现及其应用于发酵生产甘油的工业化

1.1 *C. glycerinogenes* 的发现

自1969年中苏珍宝岛冲突后,甘油作为军民两用品的生产备受关注^[5]。1970年7月,无锡轻工业学院(江南大学)承担了轻工业部下达的“淀粉质原料发酵法生产甘油”科研项目^[6]。项目启动后,立即形成了老中青三代教师的合作团队,并基于耐高渗透压酵母好氧发酵法生产甘油的技术路线展开研究,放弃亚硫酸盐厌氧发酵法^[7]。这一技术路线的确立是基于新生物技术的考量,经历了从菌种采样、分离、筛选、选育等全方位的系列研究,达到国际上目前发酵法甘油工业生产的领先水平。

C. glycerinogenes 是根据生产多元醇的微生物具有耐高渗透压的特性,主要由诸葛健在我国广泛采样近千种,按预定生产环境进行筛选,并结合遗传学方法选育,分离十余万个菌落,筛选2万余株菌。采样初筛获得产甘油酵母菌61-4,经多次复筛,获得菌株61-4-A8,经初步鉴定为假丝酵母,1972年通过轻工业部技术鉴定菌株61-4-A8为中试菌种^[8-9]。1975年采用 γ 射线诱变获得867号菌,经过进一步复筛获得高产73号诱变株,并用于工业化试验和生产,育种过程中菌株除甘油产量提高、杂质减少外,

形态无明显变化^[8]。2001年,经菌种鉴定发现,其菌落为白色粗糙型,以芽殖方式进行无性繁殖,易形成假菌丝,不进行有性生殖,线粒体DNA分子量为20 kb左右,符合假丝酵母属典型特征,结合生理生化研究认为该菌是假丝酵母属的一个新种,将其定名为产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)^[8]。2001年,该菌株被保藏于江南大学发酵甘油研究设计中心。近年来有报道将产甘油假丝酵母与库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*) [前命名为东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)]^[10-11]混为一谈,而其产甘油能力强及基因上的差异等表明 *C. glycerinogenes* 明显区别于 *P. kudriavzevii*。例如:*C. glycerinogenes* 中 3-磷酸甘油脱氢酶(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPD)蛋白与NCBI数据库中公布的 *P. kudriavzevii* 的 GPD 序列存在明显差异^[12]。*C. glycerinogenes* 生产甘油能力居于世界较高水平,而少见 *P. kudriavzevii* 高产甘油的报道。

1.2 国内外甘油生产工业化

20世纪70年代,无锡轻工业学院诸葛健、金岑南、徐呈祥和蒋征林组成的团队从菌种、分析、工艺和设备4个方面进行攻关,筛选获得了一株具有高产甘油能力的耐渗酵母,与无锡市酶制剂厂密切合作进行中试,并于1972年进行了部级鉴定,鉴定结果表明,选育的新菌种具备了可产甘油、耐高渗的优良特性^[9]。1972-1986年,在国家科委下达的“七五”国家重点科技攻关项目中,课题组进行持续攻关,诸葛健、方慧英等克服了国际上尚未解决的高沸点、高黏度、易焦化等提取难题^[13],于1990年底按时完成了国家“九五”攻关任务。90年代,以诸葛健为核心的方慧英、顾海伦、陈德兆、诸葛斌等人分别在以昌邑市化肥厂、濮阳市发酵甘油厂等为代表的15个甘油厂实现了甘油的工业化生产。由于技术居于世界领先水平,1996年应美国

ADM公司的技术转让要求,本团队提供菌种、培养基配方和操作工艺条件,由公司技术人员独立操作并进行分析,经过一个月的技术验证,成功实现了技术转让。因此团队的“微生物好氧发酵法工业化生产丙三醇(甘油)”获得1999年国家技术发明二等奖[诸葛健(无锡轻工大学)、方慧英(无锡轻工大学)、陈德兆(无锡轻工大学)、顾海伦(无锡轻工大学)、邵明才(昌邑市化肥厂)、俞剑(遂昌甘油厂)](当年共设四等奖项,一等奖空缺)。

2 *C. glycerinogenes* 的发酵性能和特点

2.1 产甘油能力强

C. glycerinogenes 长期以来产甘油能力居于世界最高水平,高产甘油菌株WL2002-5是用于发酵甘油工业化生产的优良菌株。该菌株甘油产率高,实验室规模可达110-130 g/L,工业化生产也已达到100-110 g/L,是目前报道的最高水平^[8],而其他酵母产甘油产量仅为30-40 g/L^[14]。

2.2 抗逆性强

C. glycerinogenes 在高糖环境下仍能够生存和繁殖,这是在甘油生产中至关重要的特性。高糖环境对微生物的生长和代谢有抑制作用,但 *C. glycerinogenes* 能够有效应对这种环境压力,可在500 g/L葡萄糖中生长良好^[8],因而发酵过程很少出现染菌。工业生产中常常会遇到高盐环境,而 *C. glycerinogenes* 表现出较强的高盐耐受性,能够在15% NaCl中稳定生长^[15],保证了甘油生产过程的顺利进行。*C. glycerinogenes* 具有较强的糠醛耐受性,在3.5 g/L糠醛下其生物量无明显减少,而 *S. cerevisiae* 的生长则被完全抑制^[16]。此外, *C. glycerinogenes* 还是一株2-苯乙醇高耐受菌株,其耐受性是大多数原核

菌株和真菌的 2 倍以上^[17], 因而是潜在的具有目标产物高浓度合成能力的工业底盘细胞。

2.3 耗糖速度快

C. glycerinogenes 耗糖速度快, 可在 24 h 消耗 160 g 葡萄糖, 而 *S. cerevisiae* ZWA46 和安琪酵母分别需要 48 h 和 36 h^[18]。*C. glycerinogenes* 菌体生长迅速、发酵速度快, 是其作为工业酵母的重要特征之一, 其高转化率和快速的糖代谢速度为甘油生产提供了可靠的技术基础, 有助于降低生产成本、提高生产效率, 是一株可高强度发酵的工业化底盘细胞。

3 *C. glycerinogenes* 抗性机制

3.1 高渗甘油信号(high osmolarity glycerol, HOG)及抗性应答

C. glycerinogenes 信号应答方面的研究主要针对其优秀的耐受性信号应答。由 HOG1 介导的高渗甘油信号(HOG)途径是酵母细胞抵御环境胁迫的重要途径, 它在细胞耐受渗透压、有机酸和低 pH 等过程中都发挥了极其重要的作用。HOG1 的缺失导致细胞对渗透压、乙酸、H₂O₂ 等外界压力均表现出极度的敏感。相较于 *S. cerevisiae*, *C. glycerinogenes* 对渗透压的耐受更加强烈地依赖于 HOG1^[19]。对甘油转运蛋白 STL1 和 STL2 的研究发现, 甘油的摄取及其在胞内的积累对 HOG1 的缺失具有补救作用^[20]。此外, *C. glycerinogenes* 通过 HOG 途径调节氨基酸合成与转运来响应外界渗透压胁迫^[21], 这些结果为高糖、高渗透压下发酵菌株的改造提供了理论借鉴。

3.2 糠醛耐受机制

C. glycerinogenes 有很强的糠醛耐受性。糠醛可诱导该菌乙醇脱氢酶基因 *CgADH1* 表达上调, 加速糠醛降解、明显减缓糠醛对细胞的抑制。此外, *C. glycerinogenes* 胞内还存在包括

CgNuo1、*CgAdh7* 在内的其他氧化还原酶作用于糠醛降解, 进一步转录组学分析研究表明, 泛素-蛋白酶体系统加速降解损伤蛋白、核糖体功能相关基因及半胱氨酸合成基因应激表达是 *C. glycerinogenes* 糠醛应答的主要机制^[16,22]。

3.3 2-苯乙醇耐受机制

C. glycerinogenes 有较强的 2-苯乙醇耐受性。其耐受机制主要包括以下 3 个方面。(1) 在 *C. glycerinogenes* 中过表达 *slc1* 基因, 可显著提高菌株对 2-苯乙醇的耐受性。(2) 在 2-苯乙醇压力下, 调控因子 Hap5 通过激活 *gsh2* 的转录表达, 可缓解 2-苯乙醇压力造成活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累, 脂质过氧化和细胞膜损伤。(3) 应答调控过程主要由转录因子 HOG1 和 Swi5 介导, 增加细胞膜刚性抵御外界 2-苯乙醇损伤^[17]。

3.4 *C. glycerinogenes* 高浓度糖转运应答渗透压机制

高浓度糖快速转运是 *C. glycerinogenes* 应对渗透压胁迫的重要方式。研究发现, *C. glycerinogenes* 具有结构特殊的糖转运蛋白, 可实现高浓度糖的快速转运。其基因组中有 5 个葡萄糖转运功能的糖转运蛋白(*CgHxt1-2* 和 *CgHxt4-6*), 其中 *CgHxt4* 的高浓度糖转运性能最佳^[23]。高糖或高渗透压均会诱导 *CgHxt4* 的转录。转录组分析表明, *C. glycerinogenes* 在高浓度葡萄糖下主要依赖于 HOG 途径中的 *Sln1* 分支途径、糖信号途径等对糖转运蛋白进行转录调控^[24]。

4 *C. glycerinogenes* 合成生物学与代谢工程

4.1 *C. glycerinogenes* 分子操作体系的建立

4.1.1 重组表达体系

目前, 根据 *C. glycerinogenes* 分子生物学特点建立了一套独特的操作系统弥补了该菌

株分子操作的空白。PCgGAP 启动子是一种可以受渗透压调控并可调节外源基因表达强度的启动子,在此基础上以 *C. glycerinogenes* 5.8S rDNA 为同源重组整合位点,构建了适用于 *C. glycerinogenes* 的重组整合表达载体 pUR-GAP 和 pUR-GPD^[25]。此外,以 pUC19 质粒为基本骨架,以 *C. glycerinogenes* 的 18S rRNA 基因为整合位点,利用其 3-磷酸甘油脱氢酶基因启动子 PCgGPD 启动外源基因表达,腐草霉素抗性基因 *ble* 作为筛选标记,以 18S rDNA 下游终止子终止转录,构建适用于 *C. glycerinogenes* 的低分子量穿梭型整合载体 pUSGZ;以绿色荧光蛋白 GFP 为指示表征了该质粒受渗透压调控的基因表达效果^[26-27]。由于 *C. glycerinogenes* 没有天然游离质粒,为完善基因操作工具,构建了含不同自主复制序列(autonomously replicating sequence, ARS)的游离质粒表达系统 pTGAPU-CA-AOX1t-KLARS,在 *C. glycerinogenes* 中能自我复制并表达,通过游离表达合成咖啡酸的基因^[28]及香叶醇合成相关基因^[29],证实了该系统的有效性。基于 pGAPZB 构建了整合载体 pGAPZU,利用酿酒酵母 *CUP1* 基因建立了 *C. glycerinogenes* 的铜抗性标记,从而将研究成本 114.0 \$/L 大幅降低到 0.1 \$/L^[30]。

4.1.2 CRISPR 基因编辑系统

为提高 *C. glycerinogenes* 基因操作效率,构建了基于 GAP 组合型启动子配合 HH 和 HDV 核糖酶识别位点相结合的 CRISPR-Cas9 基因编辑系统^[31],发现 50 bp 同源臂的修复模板即有较高编辑效率。通过敲除 *TRP1* 基因并回补 *GFP* 序列,实现了外源基因 *GFP* 的敲入和表达。此外,在 *TRP1* 位点表达木糖脱氢酶基因 *xy1B*,获得了木糖酸生产菌株。上述结果表明,构建的 CRISPR-Cas9 系统在 *C. glycerinogenes* 基因编辑上具有良好的实际应用效果^[32]。以 CRISPR/Cas9

为工具进行 *C. glycerinogenes* 基因组非必需 DNA 大片段删除,实现了 7.8、25、50 kb 大片段的敲除,为推进该非模式工业菌株底盘化进程和应用提供了方法和工具^[33-34]。最近,利用大肠杆菌 II 型毒素-抗毒素系统中的毒素-抗毒素对 *relBE* 作为筛选标记,在 *C. glycerinogenes* 中构建基因编辑系统,实现了 *C. glycerinogenes* 的精确缺失、替换、插入及基因的表达;相较于传统的氨基酸缺陷互补编辑系统,该编辑系统减小了基因编辑对生物量的影响,基因敲除效率提高了 3.5 倍^[35]。

4.2 *C. glycerinogenes* 代谢工程

4.2.1 2-苯乙醇

2-苯乙醇是一种芳香性醇类化合物,具有清香的芳香气味,作为一种多功能化合物,在香料、化妆品到医药、生物技术等领域都有着重要的作用^[36]。研究发现,*C. glycerinogenes* 对 2-苯乙醇具有很强的耐受性^[17],是生物合成 2-苯乙醇的理想宿主。通过生物信息学及基因突变、RT-qPCR 及亚细胞定位等研究发现,上游调控因子 Hap5 调控 *gsh2* 基因表达响应 2-苯乙醇压力,改造后 *C. glycerinogenes* 的 2-苯乙醇产量达到 6.2 g/L^[37-39] (图 1)。

4.2.2 α -蒎烯

α -蒎烯是一种植物来源的单萜,在香料、调味品、医药及精细化工等方面应用广泛,尤其在国防上有重要应用^[40],但 α -蒎烯对微生物有强烈毒害作用,限制了其生物合成的研究。基于 *C. glycerinogenes* α -蒎烯高耐受和转录组学探究其机制及耐受改造,过表达 *Tip* 和 *ERG6* 基因,工程菌株 Cg-ERG6 在蒎烯胁迫下的菌体量提高了 11%^[41]。通过加强上游甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径和抑制下游途径副产物 (图 1),蒎烯产量提高近 16 倍,达到 6.0 mg/L^[42],进一步过表达磷酸酶,并引入橙花基焦磷酸

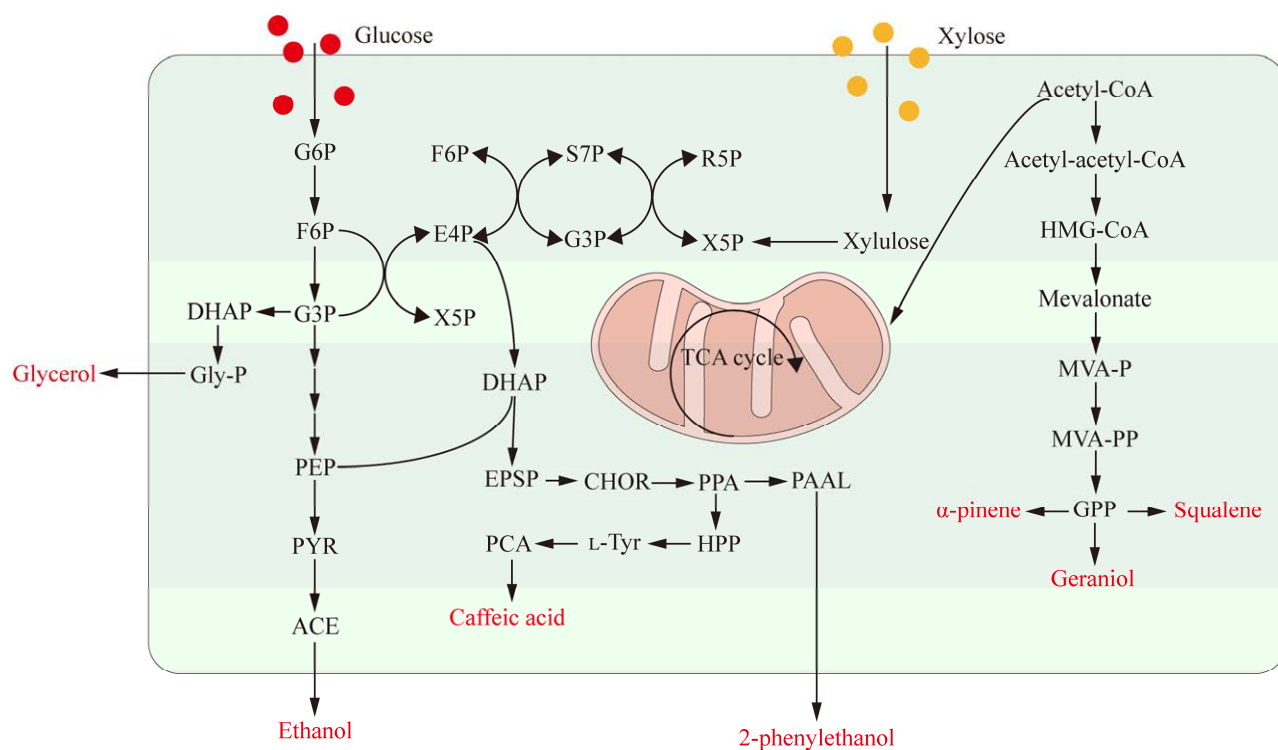


图1 产甘油假丝酵母代谢调控图

Figure 1 Metabolic regulation map of *Candida glycerinogenes*.

(neryl diphosphate, NPP)作为底物合成 α -蒎烯,产量达到12.8 mg/L^[43]。

4.2.3 角鲨烯

角鲨烯是细胞内具有抗氧化活性的三萜化合物,广泛应用于食品、医药等行业。*C. glycerinogenes*在胁迫下会合成角鲨烯保护细胞。通过对MVA途径基因*ERG10*、*ERG13*、*tHMG1*、*ID11*进行强化促进角鲨烯的积累,过表达*ACS1*、*ACS2*促进MVA途径前体物质乙酰辅酶A的生成,过表达转录因子UPC2促进碳流更多地流向MVA途径(图1),最终在5 L发酵罐中角鲨烯产量达2.65 g/L,甘油产量达103.67 g/L,实现了角鲨烯与甘油的联产及菌体、发酵液的双重利用,进一步降低了角鲨烯的生产成本^[44]。

4.2.4 香叶醇

香叶醇是一种在香水、药品和护肤品等行

业中广泛应用的化合物,具有独特的香气和多种生物活性^[45-46],但香叶醇对细胞有毒害作用。*C. glycerinogenes*在合成香叶醇方面具有优势,在*C. glycerinogenes*中引入异戊烯醇,利用异戊烯醇利用途径(isopentenol utilization pathway, IUP)及MVA双途径^[47],构建转录因子介导的麦角甾醇反馈系统^[48](图1),利用质膜锚定结合时空调控策略,使香叶醇含量提高了2.4倍,5 L发酵罐中产量达到1 835.2 mg/L^[49]。

4.2.5 咖啡酸

咖啡酸(caffeic acid, CA)是一种天然的酚类化合物,具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎等多种生物学活性,在医药、食品和化妆品等行业具有较大的应用价值^[50-51]。在*C. glycerinogenes*中构建了一条利用木糖和葡萄糖生物合成咖啡酸的代谢途径(图1)。通过优化莽草酸盐(shikimic acid, SA)途径和芳香族氨基酸途径,提高了前

体的积累, 获得了高产咖啡酸菌株^[52]。同时, 开发了一个生长耦合的双层动态调节系统, 自主协调通路基因^[53], 增加细胞质辅助因子 FAD(H₂)的供应, 最终在 5 L 发酵罐中的产量达 1 943.2 mg/L, 提高了 14.6 倍^[54](图 1)。

4.3 *C. glycerinogenes* 未脱毒纤维素水解液发酵应用

C. glycerinogenes 是一株具有多重抗逆性的工业酵母, 具有在未脱毒纤维素水解液中发酵产乙醇、甘油等的潜力。利用 *C. glycerinogenes* 的多重抗性, 在未脱毒纤维素水解液简易制备的基础上, 通过筛选抗逆基因获得抗毒重组菌株, 可直接利用未脱毒纤维素水解液(商品酵母不生长)产乙醇达 60 g/L 以上, 通过敲除副产物合成基因 *GPD* 及培养条件优化, 最终摇瓶发酵乙醇产量可达 76.3 g/L^[18,22]。同时, 为了降低耗氧发酵中的 ATP 含量, 提高未脱毒纤维素水解液发酵速率和乙醇产量, 在 *C. glycerinogenes* 中过表达 *PHYA*、*ATPase* 和 *PHO8* 这 3 种 ATP 去磷酸化相关基因后, NADH、NADH/NAD⁺ 比值提高, 促进了糖酵解和乙醇合成^[55]。此外, 以 *C. glycerinogenes* 为宿主菌株, 强化木糖代谢途径生产甘油, 最终工程菌株 CgS45 发酵未脱毒的甘蔗渣水解液生产甘油, 产量为 40.3 g/L, 产率为 40.4%, 每千克甘蔗渣甘油得率达到 93.5 g^[56]。*C. glycerinogenes* 是一株可以发酵未脱毒水解液生产化学品的工业酵母, 为木质纤维素的利用提供了新的方向。

5 总结与展望

C. glycerinogenes 是一株重要的工业菌株, 相较于模式菌酿酒酵母, 具有抗逆性强、转化率高、耗糖速度快等特点, 在未脱毒水解液中可以稳定生长。*C. glycerinogenes* 基因组信息较完整且建立了分子操作体系, 以该菌株为底盘细

胞已成功用于甘油、乙醇、2-苯乙醇、 α -蒎烯、角鲨烯、咖啡酸、香叶醇等产品的生产, 其中甘油生产已成功工业化。

目前, 关于 *C. glycerinogenes* 的研究已经取得了显著的成果, 但其仍有更广的研究前景。*C. glycerinogenes* 在底盘细胞构建方面需要投入更多的研究, 分子操作体系也有待进一步完善, 以提高 *C. glycerinogenes* 基因精准编辑的效率。*C. glycerinogenes* 具有抗逆性强的特点, 其抗逆相关的活性基因有待进一步挖掘, 并进一步解析其抗逆机制。

综上所述, *C. glycerinogenes* 作为我国拥有自主知识产权的多重抗逆工业酵母, 是发酵工业和合成生物学领域重要的微生物资源, 是非常有潜力的合成生物学工业底盘细胞和抗性基因的来源。

REFERENCES

- [1] HACKER J, BLUM-OEHLER G. In appreciation of Theodor Escherich[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5: 902.
- [2] RAINIERI S, ZAMBONELLI C, KANEKO Y. *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96(1): 1-9.
- [3] 赵美琳, 诸葛斌, 陆信曜, 宗红, 施丁昌. 工业酵母抗逆机理研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1155-1164.
ZHAO ML, ZHUGE B, LU XY, ZONG H, SHI DC. Research progress in stress tolerance of industrial yeasts[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1155-1164 (in Chinese).
- [4] 诸葛健, 方慧英. 好氧发酵法生产甘油: CN1110321A[P]. 1995-10-18.
- [5] 诸葛健, 方慧英. 发酵法生产甘油的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 1994, 20(4): 65-70.
ZHUGE J, FANG HY. Research progress of glycerol production by fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 1994, 20(4): 65-70 (in Chinese).
- [6] 诸葛健, 方慧英. 微生物好氧发酵法生产甘油[J]. *精细与专用化学品*, 2001, 9(20): 22-23.
ZHUGE J, FANG HY. Manufacture of glycerin via

- microbe aerobic fermentation method[J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2001, 9(20): 22-23 (in Chinese).
- [7] 诸葛健, 方慧英. 发酵法生产甘油的发展趋势[J]. *精细与专用化学品*, 2002, 10(3): 3-5.
ZHUGE J, FANG HY. Manufacture of glycerin via microbe aerobic fermentation method[J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2002, 10(3): 3-5 (in Chinese).
- [8] 王正祥, 诸葛健, 方慧英. 耐高渗透压高产甘油的一个假丝酵母新种: 产甘油假丝酵母[J]. *微生物学报*, 1999, 39(1): 68-74.
WANG ZX, ZHUGE J, FANG HY. A new osmotolerant and glycerol highly producing species: *Candida glycerolgenesis* Zhuge sp. nov.[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(1): 68-74 (in Chinese).
- [9] 诸葛健. 耐高渗透压酵母发酵法生产甘油的研究[J]. *科学通报*, 1973(4): 188-190.
ZHUGE J. Study on glycerol production by hyperosmotic pressure resistant yeast fermentation[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1973(4): 188-190.
- [10] CHU YF, LI MM, JIN JH, DONG XM, XU K, JIN LB, QIAO YM, JI H. Advances in the application of the non-conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(2): 170.
- [11] DOUGLASS AP, OFFEI B, BRAUN-GALLEANI S, COUGHLAN AY, MARTOS AAR, ORTIZ-MERINO RA, BYRNE KP, WOLFE KH. Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: one species, four names[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(7): e1007138.
- [12] 陈献忠. 产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因的克隆、表达与功能鉴定[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2008.
CHEN XZ. Cloning, expression and characterization of glycerol 3-phosphate dehydrogenase from *Candida glycerinogenes*[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2008 (in Chinese).
- [13] 方慧英, 刘小震, 陈德兆, 顾海伦, 诸葛健. 用于高粘度易焦化基质高沸点蒸馏的新技术[J]. *工业微生物*, 1998, 28(3): 8-11.
FANG HY, LIU XZ, CHEN DZ, GU HL, ZHUGE J. A novel distillation procedure for isolating organic compound of high boiling point from viscous and coking liable broth[J]. *Industrial Microbiology*, 1998, 28(3): 8-11 (in Chinese).
- [14] WANG ZX, ZHUGE J, FANG HY, PRIOR BA. Glycerol production by microbial fermentation: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2001, 19(3): 201-223.
- [15] ZHUGE J, FANG HY, WANG ZX, CHEN DZ, JIN HR, GU HL. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55(6): 686-692.
- [16] 赵美琳. *Candida glycerinogenes* 高浓度糠醛耐受机制及纤维素乙醇发酵应用[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2019.
ZHAO ML. High concentration furfural tolerance mechanism of *Candida glycerinogenes* and application of cellulose ethanol fermentation[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [17] 王玉芹. 基于 *Candida glycerinogenes* 耐受性的 2-苯乙醇强化合成研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2021.
WANG YQ. Genetic engineering improves 2-phenylethanol production in *Candida glycerinogenes* base on its tolerance mechanism[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [18] ZHAO ML, SHI DC, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Co-production of 1,2,4-butanetriol and ethanol from lignocellulose hydrolysates[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 282: 433-438.
- [19] JI H, LU XY, WANG CY, ZONG H, FANG HY, SUN J, ZHUGE J, ZHUGE B. Identification of a novel HOG1 homologue from an industrial glycerol producer *Candida glycerinogenes*[J]. *Current Microbiology*, 2014, 69(6): 909-914.
- [20] JI H, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Functional and expression studies of two novel *STL1* genes of the osmotolerant and glycerol utilization yeast *Candida glycerinogenes*[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2018, 64(3): 121-126.
- [21] JI H, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. γ -aminobutyric acid accumulation enhances the cell growth of *Candida glycerinogenes* under hyperosmotic conditions[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2018, 64(2): 84-89.
- [22] ZHAO ML, SHI DC, LU XY, ZONG H, ZHUGE B, JI H. Ethanol fermentation from non-detoxified lignocellulose hydrolysate by a multi-stress tolerant yeast *Candida glycerinogenes* mutant[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 273: 634-640.
- [23] 乔艳明. *Candida glycerinogenes* 高浓度糖转运机制及其应用研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2021.
QIAO YM. Mechanism of sugar transport in *Candida glycerinogenes* at high concentrations and its

- application[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [24] QIAO YM, LI CL, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Identification of key residues for efficient glucose transport by the hexose transporter CgHxt4 in high sugar fermentation yeast *Candida glycerinogenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(19): 7295-7307.
- [25] 张成. *Candida glycerinogenes* 渗透压调控型整合表达体系的研究及其应用[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2015.
- ZHANG C. Research and application of integrative expression vectors for osmoregulation in *Candida glycerinogenes*[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2015 (in Chinese).
- [26] ZHANG C, ZONG H, ZHUGE B, LU XY, FANG HY, ZHU JL, ZHUGE J. Protoplast preparation and polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation of *Candida glycerinogenes*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2016, 21(1): 95-102.
- [27] 徐丹, 陆信曜, 诸葛斌, 张成, 宗红. 高渗工业菌株 *Candida glycerinogenes* 整合型表达载体的构建及验证[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(8): 842-848.
- XU D, LU XY, ZHUGE B, ZHANG C, ZONG H. Development and verification of an integrative vector for the industrial osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(8): 842-848 (in Chinese).
- [28] 董德金, 王心仪, 宗红, 陆信曜, 诸葛斌. 在无天然游离质粒产甘油假丝酵母中非整合表达合成咖啡酸[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4104-4117.
- DONG DJ, WANG XY, ZONG H, LU XY, ZHUGE B. Synthesis of caffeic acid by episomal expression in *Candida glycerinogenes* without natural episomal plasmids[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4104-4117 (in Chinese).
- [29] DONG DJ, WANG XY, ZONG H, LU XY, ZHUGE B. Construction of a novel plasmid for an industrial yeast *Candida glycerinogenes* by dual-autonomously replicating sequence strategy[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2023, 135(1): 10-16.
- [30] GAO XN, ZHUGE B, FANG HY, ZHUGE J. The construction of a new integrative vector with a new selective marker of copper resistance for glycerol producer *Candida glycerinogenes*[J]. Current Microbiology, 2012, 64(4): 357-364.
- [31] 朱敏阳. 产甘油假丝酵母 CRISPR-Cas9 基因编辑系统的构建[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2019.
- ZHU MY. Establishment of CRISPR-Cas9 genome editing system in *Candida glycerinogenes*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [32] ZHU MY, SUN L, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Establishment of a transient CRISPR-Cas9 genome editing system in *Candida glycerinogenes* for co-production of ethanol and xylonic acid[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(3): 283-289.
- [33] 李沁. 产甘油假丝酵母基因组大片段编辑系统的构建及基因挖掘[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2022.
- LI Q. Construction and gene mining of genomic large fragment editing system in *Candida glycerinogenes*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2022 (in Chinese).
- [34] 李沁, 李海铭, 陆信曜, 宗红, 诸葛斌. *Candida glycerinogenes* 基因组大片段缺失菌的构建及表征[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(3): 1-8.
- LI Q, LI HM, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Deletion of large genomic DNA in *Candida glycerinogenes* by CRISPR/Cas9 system[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(3): 1-8 (in Chinese).
- [35] LV W, LU XY, ZHUGE B, ZONG H. Gene editing of *Candida glycerinogenes* by designed toxin-antitoxin cassette[J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(3): 816-824.
- [36] 李园子, 高靖怡, 王凤寰, 廖永红. 2-苯乙醇合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1694-1710.
- LI YZ, GAO JY, WANG FH, LIAO YH. Advances in synthesis of 2-phenylethanol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1694-1710 (in Chinese).
- [37] WANG YQ, ZHANG H, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Advances in 2-phenylethanol production from engineered microorganisms[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(3): 403-409.
- [38] WANG YQ, ZHANG ZY, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Genetic engineering of an industrial yeast *Candida glycerinogenes* for efficient production of 2-phenylethanol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(24): 10481-10491.
- [39] WANG YQ, ZHANG ZY, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Transcription factor Hap5 induces gsh2 expression to enhance 2-phenylethanol tolerance and production in an industrial yeast *Candida glycerinogenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(9): 4093-4107.
- [40] 马腾飞. 微生物合成蒎烯的研究进展[J]. 中国酿造,

- 2022, 41(4): 20-26.
- MA TF. Research progress on microbial synthesis of pinenes[J]. China Brewing, 2022, 41(4): 20-26 (in Chinese).
- [41] MA TF, ZONG H, LU XY, ZHUGE B. Synthesis of pinene in the industrial strain *Candida glycerinogenes* by modification of its mevalonate pathway[J]. Journal of Microbiology, 2022, 60(12): 1191-1200.
- [42] MA TF, CAI HW, ZONG H, LU XY, ZHUGE B. Effects of trehalose and ergosterol on pinene stress of *Candida glycerinogenes*[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2023, 70(1): 403-414.
- [43] MA TF, ZONG H, LU XY, ZHUGE B. *Candida glycerinogenes*-promoted α -pinene and squalene co-production strategy based on α -pinene stress[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(13): 5250-5260.
- [44] 游振振, 宗红, 陆信曜, 诸葛斌. 代谢工程改造 *Candida glycerinogenes* 联产角鲨烯和甘油[EB/OL]. [2024-03-14] 北京: 中国科技论文在线.
YOU ZZ, ZONG H, LU XY, ZHEGE B. Metabolic engineering of *Candida glycerinogenes* for squalene and glycerol co-production[EB/OL]. [2024-03-14] Beijing: Sciencepaper Online (in Chinese).
- [45] ZHOU J, WANG CL, YOON SH, JANG HJ, CHOI ES, KIM SW. Engineering *Escherichia coli* for selective geraniol production with minimized endogenous dehydrogenation[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 169: 42-50.
- [46] 姜国珍. 高产香叶醇及其衍生物的酿酒酵母菌株设计与构建[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2020.
JIANG GZ. Design and construction of *Saccharomyces cerevisiae* for high production of geraniol and its derivatives[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2020 (in Chinese).
- [47] ZHAO C, WANG XH, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Tuning geraniol biosynthesis via a novel decane-responsive promoter in *Candida glycerinogenes*[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(5): 1835-1844.
- [48] ZHAO C, WANG XH, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Metabolic engineering of *Candida glycerinogenes* for sustainable production of geraniol[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(6): 1836-1844.
- [49] ZHAO C, WANG XH, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Spatiotemporal regulation and transport engineering for sustainable production of geraniol in *Candida glycerinogenes*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(9): 4825-4833.
- [50] ESPÍNDOLA KMM, FERREIRA RG, NARVAEZ LEM, ROSARIO ACRS, da SILVA AHM, SILVA AGB, VIEIRA APO, MONTEIRO MC. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma[J]. Frontiers in Oncology, 2019, 9: 541.
- [51] 袁豆豆, 周秀琪, 庞雪晴, 杜家艳, 周萍萍. 代谢工程改造酿酒酵母发酵生产咖啡酸[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(19): 17-24.
YUAN DD, ZHOU XQ, PANG XQ, DU JY, ZHOU PP. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for biosynthesis of caffeic acid[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(19): 17-24 (in Chinese).
- [52] WANG XH, ZHAO C, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Production of caffeic acid with co-fermentation of xylose and glucose by multi-modular engineering in *Candida glycerinogenes*[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(2): 900-908.
- [53] WANG XH, ZHAO C, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Balancing pyruvate node based on a dual-layered dynamic regulation system to improve the biosynthesis of caffeic acid in *Candida glycerinogenes*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(23): 8981-8990.
- [54] WANG XH, ZHAO C, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Development of a co-culture system for green production of caffeic acid from sugarcane bagasse hydrolysate[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1379688.
- [55] 王新珂, 陆信曜, 宗红, 诸葛斌. 基因工程改造促进产甘油假丝酵母发酵未脱毒纤维素水解液合成乙醇[EB/OL]. [2024-03-01] 北京: 中国科技论文在线.
WANG XK, ZONG H, LU XY, ZHEGE B. Genetic engineering modification to promote the synthesis of ethanol of *Candida glycerinogenes* from undetoxified cellulose hydrolysate[EB/OL]. [2024-03-01] Beijing: Sciencepaper Online (in Chinese).
- [56] JIANG DQ, WANG MY, ZHAO XH, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Glycerol production from undetoxified lignocellulose hydrolysate by a multiresistant engineered *Candida glycerinogenes*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(3): 1630-1639.