



## 研究报告

## 解脂亚罗酵母 P12 单倍体的制备

屈亦潇<sup>Δ1</sup> 张雅欣<sup>Δ1</sup> 张天<sup>1</sup> 郝顺水<sup>1</sup> 张昕炜<sup>1</sup> 郭蓓<sup>\*1,2</sup>

1 北京农学院生物与资源环境学院 北京 102206

2 农业农村部华北都市农业重点实验室 北京 102206

**摘要:**【背景】目前解脂亚罗酵母在实验研究和工业生产方面的应用越来越广泛,但相较于常规酵母而言,解脂亚罗酵母缺乏简便有效的遗传转化体系,致使其在基因表达调控方面存在较大困难。同时,酵母的染色体倍性也会对基因敲除效果产生影响,选择单倍体细胞作为功能基因改造的受体可以避免等位基因之间相互作用的影响,解决多倍体细胞基因敲除不完全的问题。【目的】以解脂亚罗酵母诱变菌株 P12 为研究对象,以不同方法分离得到单倍体菌株,建立解脂亚罗酵母单倍体的制备方法。【方法】分别采用固体和液体 McClary 产孢培养基诱导解脂亚罗酵母菌株产生子囊孢子,培养条件为 30 °C,固体 7–14 d;液体 200 r/min, 2–4 d。以 2%浓度的蜗牛酶 33 °C 水浴裂解子囊孢子细胞壁 3 h,通过染色镜检和 PCR 鉴定筛选单倍体细胞。【结果】镜检结果表明,解脂亚罗酵母在液体产孢培养基中产孢速度较快,相同视野下孢子数约为固体产孢培养基的 3.7 倍,在固体产孢培养基中产孢质量较好。初步探索并筛选得到 6 株解脂亚罗酵母 P12 B 型单倍体菌株。【结论】解脂亚罗酵母 P12 B 型单倍体菌株的获得可为后续继续开展基因工程操作奠定基础。

关键词: 解脂亚罗酵母 P12, 子囊孢子, 单倍体, MATA/MATB

Preparation of *Yarrowia lipolytica* P12 haploidQU Yixiao<sup>Δ1</sup> ZHANG Yaxin<sup>Δ1</sup> ZHANG Tian<sup>1</sup> HAO Shunshui<sup>1</sup> ZHANG Xinwei<sup>1</sup>  
GUO Bei<sup>\*1,2</sup>

1 College of Bioscience and Resources Environment, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

2 Key Laboratory of Urban Agriculture in North China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 102206, China

**Abstract:** [Background] Currently, with the in-depth study of the yeast and the completion of the whole genome and mitochondrial gene sequence determination, *Yarrowia lipolytica* is popular for using in experimental research and industrial production. However, compared with conventional yeasts, the lack of effective genetic transformation system is also difficulties in gene regulation for *Y. lipolytica*. At the same time, the chromosome ploidy of yeast will also affect the transformation. When the haploid cells are as

Foundation item: Major Scientific and Technological Innovation Project in Shandong Province (2019JZZY011005)

ΔThese authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: E-mail: guobeibac@sohu.com

Received: 22-07-2020; Accepted: 27-09-2020; Published online: 29-10-2020

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY011005)

Δ对本文贡献相同

\*通信作者: E-mail: guobeibac@sohu.com

收稿日期: 2020-07-22; 接受日期: 2020-09-27; 网络首发日期: 2020-10-29

receptors for functional gene modification, it can avoid the effect of interaction between alleles. Solve the problem of incomplete gene knockout in polyploid cells. **[Objective]** The mutant strain P12 of *Y. lipolytica* was used as the research object. The haploid protease was isolated by different methods, with the aim of establishing a method of preparing haploid strains of *Y. lipolytica*. **[Methods]** *Y. lipolytica* strain was induced to produce ascospores by solid McClary sporulation medium with the culture condition at 30 °C for 7–14 d and liquid McClary sporulation medium with the culture condition at 200 r/min for 2–4 d, respectively. Then the ascospore cell wall was lysed with 2% snail enzyme at 33 °C for 3 h. Finally, the haploid cells were screened and identified by staining microscopy and PCR. **[Results]** The growth rate of *Y. lipolytica* was faster in liquid sporulation medium, and the quality of sporulation was better in solid sporulation medium. In the same field of view, the number of spores in the liquid sporulation medium was about 3.7 times higher than in the solid sporulation medium. Moreover, six strains of *Y. lipolytica* P12 type B haploid were obtained through preliminary exploration and screening. **[Conclusion]** This research laid the foundation for the subsequent continued operations of genetic engineering.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica* P12, ascospores, haploid, MATA/MATB

解脂亚罗酵母, 又称解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*), 属于半子囊菌纲的一种非常规酵母<sup>[1]</sup>。“非常规”是指该酵母与应用广泛的酿酒酵母和粟酒裂殖酵母在分子生物学、生理学、遗传学等方面都有着较大的区别<sup>[2]</sup>, 例如: 解脂亚罗酵母通常利用有机酸作为碳源, 有着特殊的 rDNA 结构, 缺乏 RNA 聚合酶 I 等<sup>[3]</sup>。解脂亚罗酵母与子囊菌属酵母在 RNA 聚合酶 II 的启动子及转录相关因子上发生巨大分化, 因此, 解脂亚罗酵母中的大部分基因很难在酿酒酵母中直接表达; 另外, 解脂亚罗酵母的基因组大小为 20.5 Mb, 远小于酿酒酵母基因组, 其基因组中 GC 含量约为 51%, 而且密码子的偏好性也与曲霉更为相似<sup>[3]</sup>。解脂亚罗酵母在自然界中分布广泛, 由于该酵母分解疏水性底物的能力较强<sup>[4]</sup>, 因此在奶酪、地沟油等富含脂类和蛋白质的环境中分布更为集中。

解脂亚罗酵母是非致病性酵母, 该酵母大多数不能在超过 32 °C 以上的温度生长, 而且属于严格需氧型微生物, 目前欧洲食品安全局就解脂耶氏酵母生物物质作为新型食品的安全性发布意见中也对其安全性进行了认证<sup>[5]</sup>。自 1942 年首次发现解脂亚罗酵母后, 其不同寻常的生理特性受到了越来越多的关注与研究。随着对该酵母的深入研究以及全基因组和线粒体基因序列测定的完成,

解脂亚罗酵母在实验研究和工业生产方面的应用越来越广泛。例如, 解脂亚罗酵母对多种有机化合物、盐浓度以及 pH 的变化范围具有很强的耐受性, 使其生产工艺得到了优化并促进了非糖原料的应用<sup>[6]</sup>。研究者们发现解脂亚罗酵母可以通过代谢烷烃生产多种不同类别的代谢产物, 如类胡萝卜素、聚酮化合物、纳米颗粒<sup>[6]</sup>、各种蛋白质<sup>[7]</sup>、赤藓糖醇和  $\gamma$ -癸内酯<sup>[8]</sup>等。但是目前已有的研究结果表明, 相较于常规酵母如酿酒酵母而言, 解脂亚罗酵母在基因调控方面依旧存在较大困难, 缺乏有效的基因调控工具也是阻碍该菌株进一步应用的主要问题<sup>[9]</sup>。

解脂亚罗酵母是工业常用赤藓糖醇生产菌株之一, 而提高赤藓糖醇的产量一直是研究的热点问题。由于传统的菌种改良技术难以使赤藓糖醇产量得到进一步提高, 因此基因工程技术是进行菌种改良的有效手段之一。本研究团队采用同源重组的方法对 E4-2 菌株的 *EYK1* 基因进行了敲除, 但实验结果表明 *EYK1* 基因未能被完全敲除, 只是表达量降低, 推断可能存在等位基因间的干扰, 选择单倍体细胞作为功能基因改造的受体可以避免等位基因之间相互作用的影响, 因此, 诱导解脂亚罗酵母产孢并获得其单倍体成为关键的一步。解脂亚罗酵母是严格异源的物种, 具有 2 种交配类

型(MATA 和 MATB)<sup>[10]</sup>, *MATA* 基因座是通过互补作用克隆而来的, 因此具有将 MATB 型子囊孢子恢复为 MATB/MATB 二倍体的能力<sup>[11]</sup>。单倍体细胞的交配型由 MATA 和 MATB 决定, 因此可以采用 PCR 的方式进行倍型鉴定。

目前, 针对赤藓糖醇生产菌株解脂亚罗酵母的单倍体制备分离及基因工程育种的研究鲜见报道。因此, 本试验以解脂亚罗酵母诱变菌株 P12 为研究对象, 分别采用液体和固体产孢培养基进行产孢试验, 并对分离得到的单倍体菌株的接合型进行 PCR 鉴定, 以期建立解脂亚罗酵母单倍体的制备方法, 为后续基因工程育种和提高赤藓糖醇产量提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器及培养基

7.5%孔雀石绿, 西陇化工股份有限公司; 0.5%番红, 北京东胜泰博科技公司; 2%蜗牛酶, Biodee 公司; 酵母基因组提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; DNA Marker, TaKaRa 公司。恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司。

McClary 产孢培养基参照文献[12]配制; YPD 培养基参照文献[13]配制。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 子囊孢子的诱导

将解脂亚罗酵母 P12 菌株接种至 YPD 液体培养基中, 30 °C 进行初始培养, 将活化后的菌液分别接种于液体和固体产孢培养基, 置于 30 °C 恒温培养, 摇床转速为 200 r/min。固体培养基培养 7–14 d, 液体培养基培养 2–4 d。在显微镜下观察子囊孢子的形成情况, 并计算产孢率:

$$\text{产孢率} = \frac{\text{子囊孢子数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%。$$

#### 1.2.2 子囊孢子的染色

从解脂亚罗酵母 P12 菌株的固体产孢培养基上

蘸取适量菌体(或从液体产孢培养基中吸取 10 μL 菌液), 均匀涂抹在载玻片上固定菌体; 采用 7.5% 的孔雀石绿染液染色 1 min; 用蒸馏水冲洗孔雀石绿染液后, 用 95% 的酒精脱色 20 s, 再次进行水洗; 采用 0.5% 的番红染液染色 30 s, 蒸馏水清洗后室温下自然干燥; 用显微镜观察染色后的解脂亚罗酵母子囊孢子体。

#### 1.2.3 子囊孢子的分离及单倍体的获得

向解脂亚罗酵母 P12 菌株的固体产孢培养基中加入无菌生理盐水, 制成孢子悬液, 同时吸取 1 mL  $OD_{600}$  为 1.0 的液体产孢培养基中的菌液, 分别于 10 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体沉淀; 用浓度为 2% 的蜗牛酶处理菌体, 33 °C 水解 3 h, 再 58 °C 水浴 8 min 以终止酶解反应, 之后将离心管移入冰中至完全冷却; 向离心管中加入无菌小磁珠、液体石蜡和生理盐水, 于 30 °C、200 r/min 条件下培养 45 min, 将菌液涂布于 YPD 固体培养基上, 继续培养至产生单克隆, 挑取单克隆至固体产孢培养基中再次培养后, 通过显微镜观察子囊孢子的形成情况, 将能够确定为单倍体的菌株用甘油保存。

#### 1.2.4 酵母基因组的提取

采用酵母基因组提取试剂盒提取解脂亚罗酵母基因组, 步骤按说明书操作。回收 DNA 后采用 PCR 和琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 的检测。

#### 1.2.5 单倍体倍型的 PCR 检测

设计引物 MATA-F、MATA-R、MATB-F、MATB-R (表 1), PCR 反应体系(20 μL): DNA 模板 1 μL, 2×*Taq* PCR Master Mix 10 μL, MATA-F 或 MATB-F (5 μmol/L) 1 μL, MATA-R 或 MATB-R (5 μmol/L) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。PCR 反应条件: 98 °C 5 min; 95 °C 30 s, 47 °C 30 s, 72 °C 1 min, 34 个循环; 72 °C 10 min。A 倍型菌株预计产生 534 bp 大小的条带, B 倍型菌株预计产生 100 bp 大小的条带, 二倍体菌株预计在 534 bp 和 100 bp 处均有扩增条带产生。

表 1 解脂亚罗酵母 P12 单倍体倍型验证引物

Table 1 *Yarrowia lipolytica* P12 haplotype verification primer

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
MATA-F	GTCATCCATTTCGTTCTGTTTAA
MATA-R	TGTCTTTGTTCCAGAACCATAT
MATB-F	CACAATTGCCTAAACTAGAGAT
MATB-R	GTGCATGAATAATATCGGGGTA

将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。以 90 V 恒定电压进行电泳约 40 min, 将琼脂糖凝胶在 EB 染料中染色后用清水洗涤, 在凝胶成像仪中成像, 参照 DNA Marker 确定单克隆的倍型。

## 2 结果与分析

### 2.1 产孢试验

染色后, 解脂亚罗酵母 P12 菌株的二倍体呈红色, 子囊孢子体呈绿色, 因此可以采用染色的方法进行区分。

为了比较二倍体解脂亚罗酵母 P12 菌株在固体和液体培养基的产孢效果, 挑取产孢培养基中长出的单菌落进行染色镜检, 结果如图 1 所示, 图 1A 为 YPD 液体培养基中生长的二倍体镜检图, 菌体形态为酵母型(圆形); 图 1B 为液体产孢培养基中生长的菌体镜检图, 菌体较小, 虽然有子囊孢子体(染色呈绿色)但数目较少; 图 1C 为固体产孢培养基上生长的菌体镜检图, 菌体呈现出酵母型、菌丝型和假菌丝型 3 种形态, 能观察到较为明显的呈绿色的子囊孢子体。

### 2.2 单倍体的获得

将产孢培养后的解脂亚罗酵母培养液用蜗牛酶处理 3 h, 加入小磁珠、液体石蜡和生理盐水, 30 °C、200 r/min 培养 45 min, 再次染色镜检。结果如图 2 所示, 呈红色的为解脂亚罗酵母二倍体, 呈绿色的为解脂亚罗酵母孢子体。与图 1C 相比, 孢子的数量明显增多, 说明蜗牛酶处理后可以明显增加单倍体的数量, 但二倍体未能完全去除。

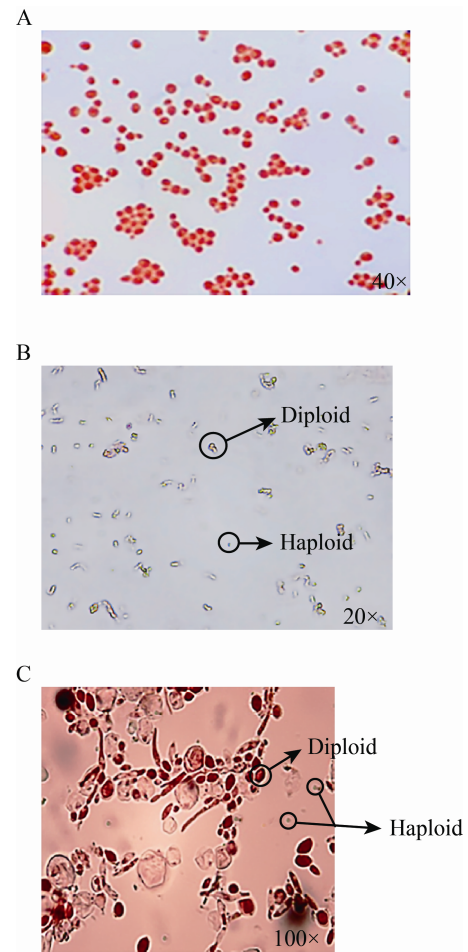


图 1 不同培养基中的酵母细胞

Figure 1 Yeast cells in different media

注: A: 培养于液体 YPD 培养基; B: 培养于液体产孢培养基; C: 培养于固体产孢培养基

Note: A: Cultivated in liquid YPD medium; B: Cultivated in liquid McClary medium; C: Cultivated in McClary sporulation medium

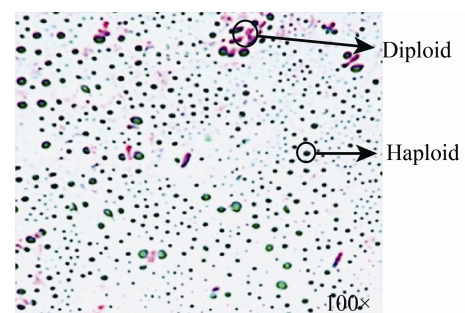


图 2 蜗牛酶处理后的解脂亚罗酵母镜检图

Figure 2 Microscopic examination of *Yarrowia lipolytica* after snail enzyme treatment

## 2.3 单倍体的分离

经过一系列的培养筛选后,挑取形状规则、表面光滑的解脂亚罗酵母单菌落再次接种于液体产孢培养基中,染色镜检,结果如图3所示。图3A为YPD固体培养基培养得到的单菌落,图3B为单倍体细胞,其不能再形成孢子,菌体染色结果呈红色。

## 2.4 酵母基因组的提取

提取的解脂亚罗酵母 P12 菌株的基因组 DNA (图4),以此为模板 PCR 扩增得到解脂亚罗酵母

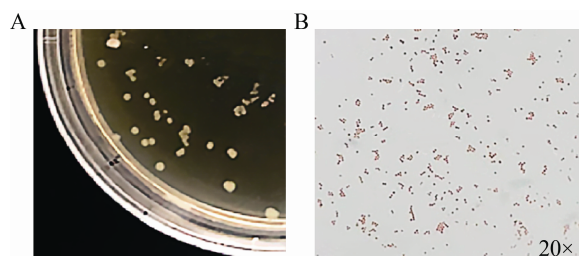


图3 解脂亚罗酵母 P12 单倍体

Figure 3 Haploids of *Yarrowia lipolytica* P12

注: A: YPD 固体培养基中培养得到的单菌落; B: 单菌落的染色镜检

Note: A: Single colony cultured in YPD solid medium; B: Staining microscopic examination of single colonies

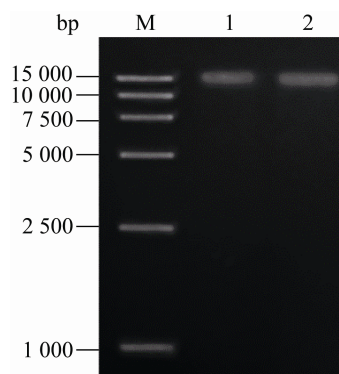


图4 解脂亚罗酵母基因组 DNA

Figure 4 *Yarrowia lipolytica* genomic DNA

注: M: DL15000 DNA Marker; 1, 2: 解脂亚罗酵母 P12 菌株基因组 DNA

Note: M: DL15000 DNA Marker; 1, 2: Genomic DNA of *Yarrowia lipolytica* P12 strain

MATA 和 MATB 基因的片段,用作后续单倍体倍型鉴定的阳性对照。

## 2.5 单倍体倍型鉴定

采用 PCR 扩增的方式验证单倍体的倍型,若 534 bp 处出现条带则为 A 倍型菌株,若 100 bp 处出现条带则为 B 倍型菌株,若 534 bp 和 100 bp 处均有扩增条带产生则为二倍体菌株。PCR 扩增结果如图5所示,其中,1、2号泳道分别为 A 型和

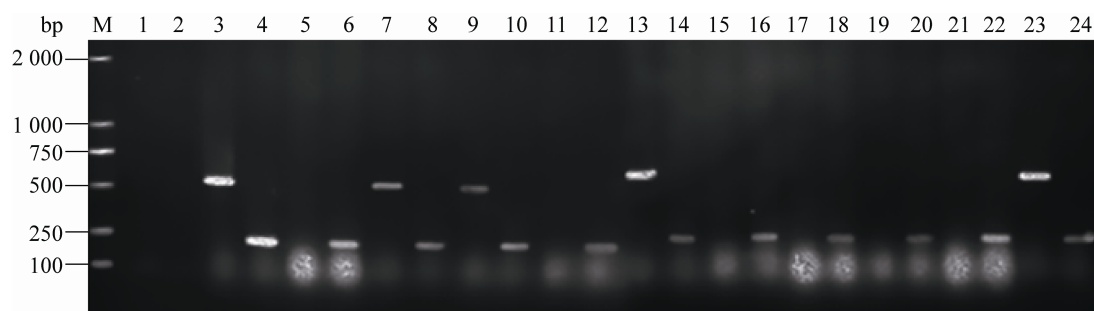


图5 单倍体 PCR 鉴定结果

Figure 5 The PCR results of haploid identification

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照(A型引物); 2: 阴性对照(B型引物); 3: 阳性对照(A型引物); 4: 阳性对照(B型引物); 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23: 单克隆样品(A型引物); 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24: 单克隆样品(B型引物)

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control (Primer A); 2: Negative control (Primer B); 3: Positive control (Primer A); 4: Positive control (Primer B); 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23: Monoclonal samples (Primer A); 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24: Monoclonal samples (Primer B)

B 型的阴性对照; 3、4 号分别为 A 型和 B 型的阳性对照; 5-24 号泳道每两条泳道为一组, 对应 1-10 组样品, 单号泳道加入 A 型引物, 双号泳道加入 B 型引物。从图 5 可见, 1、4、6、7、8、9 组仅扩增出 100 bp 的条带, 说明该 6 组样品为 B 型单倍体。

### 3 讨论与结论

解脂亚罗酵母独特的 rDNA 结构、多种转录因子、密码子结构以及自主复制序列(Autonomously Replicating Sequence, ARS)功能在实验研究和工业生产上都引起了巨大的关注<sup>[14]</sup>。与酿酒酵母不同的是, 解脂亚罗酵母通常利用有机酸作为碳源, 其 RNA 聚合酶 II 的启动子及转录相关因子与子囊菌属酵母发生了巨大分化, 其 7sRNA 和 snRNA<sup>[15]</sup>大小与真核生物接近, 但是在氨基酸水平上与酿酒酵母的一致性不足 60%<sup>[3]</sup>, 因此, 解脂亚罗酵母中的大部分基因很难在酿酒酵母中直接表达。单倍体解脂亚罗酵母细胞的交配型取决于 MAT 基因座上的交配基因 MATA 和 MATB<sup>[11]</sup>。酿酒酵母及一些传统酵母菌种可以在 Ho 核酸内切酶的介导下切换它们的交配类型, 但由于解脂亚罗酵母缺乏 Ho 核酸内切酶, 因此无法切换其交配类型<sup>[16]</sup>。

在制备解脂亚罗酵母 P12 单倍体时, PCR 鉴定结果显示只筛选出 6 株 B 型单倍体菌株, 未见有 A 型单倍体菌株, 通过查阅国内外相关资料发现, 解脂亚罗酵母有 MATA 和 MATB 这 2 种交配类型, 这与二倍体 PCR 鉴定结果一致; 然而筛选得到的均为 B 型单倍体菌株, 推测可能的原因是: 在通常情况下自然界筛选出的解脂亚罗酵母普遍为 B 型单倍体。由于解脂亚罗酵母中不存在交配型突变体, 同时该酵母的交配率极低<sup>[17]</sup> (通常<0.1%), 而 MATA 基因座最初是通过互补作用克隆而来的, 具有将 MATB 型子囊孢子恢复为 MATB/MATB 二倍体的能力, 因此, 最初筛选得到的是 B/B 纯合二倍体菌株, 而且纯合 B 型二倍体

具有非交配表型的特征。由于 B 型纯合二倍体菌株中存在 MATA 位点, 因此二倍体 PCR 鉴定能够扩增得到 A 基因, 而 B 型单倍体菌株没有产孢的能力则是由于丢失了 A 基因, 导致 PCR 鉴定时仅能扩增出 B 基因, 因此最终筛选得到的 6 株单倍体菌株均为 B 型单倍体。

解脂亚罗酵母作为一种严格需氧的非致病性酵母, 其在赤藓糖醇生产中得到了广泛的应用, 为了进一步提高赤藓糖醇的产率, 需要借助基因工程的手段。本研究以解脂亚罗酵母 P12 为研究对象, 选用 McClary 为产孢培养基, 培养条件为 30 °C, 固体 7-14 d, 液体(200 r/min) 2-4 d, 发现解脂亚罗酵母在液体产孢培养基中产孢速度较快, 在固体产孢培养基中产孢质量较好; 初步探索并筛选得到 6 株解脂亚罗酵母 P12 B 型单倍体菌株, 期望在后续的研究中以单倍体作为功能基因改造的受体, 从而避免等位基因之间的影响, 实现 EYK1 基因的彻底敲除, 使赤藓糖醇的产率有较为明显的提高。

### REFERENCES

- [1] Li YQ. Advances in studies of *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Jining Medical University, 2015, 38(1): 8-13 (in Chinese)  
李运清. 解脂耶氏酵母研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2015, 38(1): 8-13
- [2] 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
- [3] Peng YZ. Establishment and optimization of CRISPRi technology in *Yarrowia lipolytica*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2018 (in Chinese)  
彭洋子. CRISPRi 技术在解脂酵母中的建立与优化[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2018
- [4] Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica*[J]. Yeast, 2012, 29(10): 409-418
- [5] Anon. The EU recognizes the safety of *Yarrowia lipolytica* biomass[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019(2): 61 (in Chinese)  
佚名. 欧盟认定解脂耶氏酵母生物质安全性[J]. 中国食品学报, 2019(2): 61
- [6] Miller KK, Alper HS. *Yarrowia lipolytica*: more than an oleaginous workhorse[J]. Applied Microbiology and



- Biotechnology, 2019, 103(23/24): 9251-9262
- [7] Vandermies M, Fickers P. Bioreactor-scale strategies for the production of recombinant protein in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Microorganisms, 2019, 7(2): 40
- [8] Braga A, Belo I. Biotechnological production of  $\gamma$ -decalactone, a peach like aroma, by *Yarrowia lipolytica*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(10): 169
- [9] Fakas S. Lipid biosynthesis in yeasts: a comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Engineering in Life Sciences, 2017, 17(3): 292-302
- [10] Barth G. *Yarrowia Lipolytica*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013
- [11] Kurischko C, Fournier P, Chasles M, Weber H, Gaillardin C. Cloning of the mating-type gene *MAT* of the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Molecular and General Genetics, 1992, 232(3): 423-426
- [12] Gong Y, Wu SH, Yi Y, Zhao DL, Huang CJ. Haploid formation and preparation of *Saccharomyces cerevisiae* ascospore[J]. China Brewing, 2011(9): 80-84 (in Chinese)  
龚熠, 伍时华, 易弋, 赵东玲, 黄翠姬. 酿酒酵母子囊孢子单倍体形成和制备的研究[J]. 中国酿造, 2011(9): 80-84
- [13] Zhao YF, Chang XJ, Du W, Sun CP, Liu HJ. Optimization of fermentation conditions and medium for Fumonisin B<sub>1</sub> carboxylesterase production in *Pichia pastoris*[J/OL]. Food and Fermentation Industries. [2020-10-14]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.024449> (in Chinese)  
赵一凡, 常晓娇, 杜稳, 孙长坡, 刘虎军. 毕赤酵母产伏马毒素 B<sub>1</sub> 羧酸酯酶发酵条件和培养基的优化[J/OL]. 食品与发酵工业. [2020-10-14]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.024449>
- [14] Song YM, Jia XW, Li SB, Gao CJ. Industrial microorganism of *Yarrowia lipolytica* and its industrial application[J]. China Biotechnology, 2020, 40(9): 77-86 (in Chinese)  
宋以梅, 贾秀伟, 李树标, 高翠娟. 工业微生物解脂耶氏酵母及其应用研究[J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(9): 77-86
- [15] Roiha H, Shuster EO, Brow DA, Guthrie C. Small nuclear rnas from budding yeasts: phylogenetic comparisons reveal extensive size variation[J]. Gene, 1989, 82(1): 137-144
- [16] Butler G, Kenny C, Fagan A, Kurischko C, Gaillardin C, Wolfe KH. Evolution of the *MAT* locus and its Ho endonuclease in yeast species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(6): 1632-1637
- [17] Han C, Kwon H, Park G, Jang M, Lee HJ, Seo S, Kwon M, Jeon W, Lee H, Lee H, et al. Enhanced mating-type switching and sexual hybridization in heterothallic yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. FEMS Yeast Research, 2020, 20(2): foaa011