

· 综 述 ·

解脂耶氏酵母表达调控工具的开发及天然产物合成的研究进展

张金宏, 崔志勇, 祁庆生, 侯进

山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266273

张金宏, 崔志勇, 祁庆生, 侯进. 解脂耶氏酵母表达调控工具的开发及天然产物合成的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(2): 478-505.

ZHANG JH, CUI ZY, QI QS, HOU J. The recent advances in developing gene editing and expression tools and the synthesis of natural products in *Yarrowia lipolytica*. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 478-505.

摘 要: 解脂耶氏酵母是一种重要的产油酵母, 由于其能利用多种疏水性底物, 具有良好的耐酸、耐盐等胁迫耐受性, 具有高通量的三羧酸循环, 可提供充足的乙酰辅酶 A 前体等特点, 被认为是生产萜类、聚酮类和黄酮类等天然产物的理想宿主, 在代谢工程领域有着广泛的应用。近年来, 越来越多的基因编辑、表达和调控工具被逐渐开发, 这促进了解脂耶氏酵母合成各种天然产物的研究。文中综述了近年来解脂耶氏酵母中基因表达和天然产物合成方面的研究进展, 并探讨了在该酵母中异源合成天然产物所面临的挑战和可能的解决方案。

关键词: 解脂耶氏酵母; 非常规酵母; 表达调控系统; 天然产物合成; 代谢工程

The recent advances in developing gene editing and expression tools and the synthesis of natural products in *Yarrowia lipolytica*

ZHANG Jinhong, CUI Zhiyong, QI Qingsheng, HOU Jin

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266273, Shandong, China

Abstract: *Yarrowia lipolytica*, as an important oleaginous yeast, has been widely used in metabolic engineering. *Y. lipolytica* is considered as an ideal host for the production of natural products such as

Received: May 6, 2021; **Accepted:** August 27, 2021; **Published online:** January 5, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31970082, 31770101); the Outstanding Youth Foundation of Shandong Province, China (ZR2020YQ18)

Corresponding author: HOU Jin. Tel: +86-532-58632401; E-mail: houjin@sdu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31970082, 31770101); 山东省优秀青年基金 (ZR2020YQ18)

terpenes, polyketides and flavonoids, due to its ability to utilize a variety of hydrophobic substrates, high stress tolerance to acid and salt, high flux of tricarboxylic acid cycle and the ability in providing abundant the common precursor acetyl-CoA. Recently, more and more tools for genetic editing, gene expression and regulation has been developed in *Y. lipolytica*, which facilitate the metabolic engineering of *Y. lipolytica* for bio-manufacturing. In this review, we summarized the recent progresses in developing gene expression and natural product synthesis in *Y. lipolytica*, and also discussed the challenges and possible solutions in heterologous synthesis of natural products in this yeast.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*; unconventional yeast; expression tools; synthesis of natural products; metabolic engineering

模式微生物(如大肠杆菌和酿酒酵母)由于其可利用的分子生物学工具多,长期以来被认为是理想的微生物底盘。近年来,随着基因编辑技术、代谢工程和合成生物学等技术的快速发展,人们逐渐实现了对非常规微生物的编辑和代谢改造,越来越多的具有优良特性的非常规微生物成为了天然产物合成的底盘。产油酵母解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是非常规半子囊酵母,为公认安全微生物(generally regarded as safe, GRAS),是优良天然产物合成宿主^[1-3]。解脂耶氏酵母对多种有机化合物、高盐浓度和pH值表现出高耐受性,可以利用多种廉价碳源,包括葡萄糖、甘油、脂类、烷烃和乙酸等底物^[2],表现出优异的油脂生产和外源蛋白分泌性能,已被用于琥珀酸、 α -酮戊二酸、赤藓糖醇和 β -胡萝卜素等化学品的合成。此外,解脂耶氏酵母通常具有高活性的三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环和磷酸戊糖途径,为天然产物的合成提供了大量的前体物质,同时具备更好的疏水物质(如脂质和烷烃)转运能力^[3-6]。因此,它是适于异源合成萜类、类固醇、聚酮类和黄酮类等天然产物的底盘微生物^[7]。随着遗传操作工具和代谢途径改造策略的不断完善,解脂耶氏酵母将会在生物能源和高价值天然产物生物合成等过程中发挥重要作用。

1 解脂耶氏酵母的分类

1.1 生理特性

解脂耶氏酵母是一种 Crabtree 阴性子囊菌酵母(属于 Saccharomycetes 类, Saccharomycetales 目),广泛存在于生态系统(土壤、海洋水域、菌根、受石油污染的环境)和各种食物(特别是肉类和乳制品,包括奶酪)中^[8-9]。

近10年来,解脂耶氏酵母被认为属于正常的人类菌群,易于在成人的口腔和呼吸道中发现,尤其是糖尿病患者。这种酵母有时也被视为一种可能的条件致病病原体,因为它的生物膜形成能力可能是罕见的导管相关念珠菌血症的原因^[8]。与大多数半子囊菌酵母不同,解脂耶氏酵母是一种专性需氧菌,氧气浓度是其生长的限制因素。其最佳生长温度在25-30℃之间,大多数菌株的温度限制在32-34℃的范围内,极少数菌株可以在37℃生长。解脂耶氏酵母能够在较广的pH范围内生长(pH 3.5-8.0),少数菌株可以耐受较低的pH(2.0)甚至非常高的pH(9.7)。这种酵母还能够吸附金属原子,因此被用于含有重金属(如铬、铁、镍、铜、锌和镉)的废物的生物修复^[10]。

解脂耶氏酵母有 Mat A 和 Mat B 两种交配型,自然分离菌株多数为单倍体^[11-12]。在实验

室条件下^[13]，两种天然 Mat 亲和菌株的交配频率很低，但在实验室生长条件下产生的二倍体状态是稳定的^[11]。解脂耶氏酵母的野生型分离株可以呈现出各种各样的菌落特征：从光滑且有光泽到强烈皱纹且无光泽。这种多样性印证了解脂耶氏酵母是一种二态酵母，可以作为圆形多极出芽细胞、假菌丝（芽殖细胞仍附着）或带有隔膜菌丝的菌丝体生长，具体取决于其生长条件^[11-12,14]。

1.2 功能分类

解脂耶氏酵母实验室菌株的生理和系谱学早就有了广泛的描述^[15]，而用于基因工程的受体菌株在以往的综述中也有总结^[16-18]。解脂耶氏酵母物种的参考菌株是 E150 (CLIB122)，其基因组已完全测序和注释^[19]。最常用的受体菌株包括 E129 (CLIB121)，Po1 系列菌株(Po1d、f、g 和 h)^[20-21]，这些菌株来源于法国农业科学院 (French National Institute for Agricultural Research, INRA) 的工业相关野生型菌株 W29 (CLIB89、ATCC20460 和 CBS7504)。E150、E129 和 Po1 系列均为工程化菌株，由于来自酿酒酵母^[17]的 *SUC2* 基因的异源表达，能够利用蔗糖作为碳源。这一特性使得其能够利用农用工业废物中的糖蜜作为廉价底物^[22-23]。

作为产油酵母，有些解脂耶氏酵母菌株可以自然积累高达细胞干重 (dry cell weight, DCW) 30%–50% 的脂质，这不仅取决于每个野生型分离株的遗传背景，还取决于所使用的碳源和生长条件。在解脂耶氏酵母细胞中，通过基因工程改造可以使脂质积累达到 DCW 的 90%^[9]。与此同时，解脂耶氏酵母具有出色的碳氢化合物（尤其是烷烃）降解能力，因此在生物修复中可以使用这种酵母^[24-26]。

而有些解脂耶氏酵母菌株具有良好的生产有机酸或多元醇的特性。如 20 世纪 70 年代，

美国辉瑞公司将解脂耶氏酵母应用于工业化柠檬酸生产。H222 (DSM 27185) 则是于 20 世纪 80 年代从德国莱比锡的土壤样品中分离出来的菌株，能够生产高水平的柠檬酸^[11,27]，也被改造用于 α -酮戊二酸的生产^[28-29]以及蔗糖的利用^[30]等。此外，有些野生型或传统改良的解脂耶氏酵母菌株具有良好的赤藓糖醇合成能力，如中国保龄宝生物有限公司就利用解脂耶氏酵母进行赤藓糖醇生产。根据菌株特性的不同，可用于不同产品的合成。如多元醇合成菌株可用于功能糖醇的生产；缺乏酵母特异性高糖基化和甘露糖磷酸化的双突变株可被改造用于生产人源化重组蛋白^[31-33]；而高油脂合成的菌株可被用于各种脂类化工产品、生物能源及不饱和脂肪酸等的合成^[18,34]。

2 解脂耶氏酵母表达系统的研究进展

基因表达和调控工具是对宿主进行理性遗传和代谢改造的基础，在微生物细胞工厂的构建过程中发挥重要作用。由于解脂耶氏酵母拥有独特的生理和代谢特征，如细胞形态二态性、同源重组能力差、倾向于利用非同源末端连接进行 DNA 双链断裂修复，其代谢特征也非常明显，如能够利用多种底物、油脂合成能力强、乙酰辅酶 A 的供应充足等。在多种高附加值化合物的生物合成方面相较传统微生物底盘表现出优势，其越来越受到工业微生物领域研究人员的关注。近年来，随着各种合成生物学工具的开发，解脂耶氏酵母表达系统不断完善，人们可以实现以解脂耶氏酵母为宿主的异源基因高效表达、复杂生物合成途径的组装和基因表达水平的精准调控等。

2.1 解脂耶氏酵母中常见的表达载体及相关研究进展

解脂耶氏酵母的基因组改造通常需要遗传

标记, 以便筛选含有特定遗传修饰的细胞。底盘细胞的迭代遗传修饰通常受宿主中可用选择标记的数量限制, 因此选择标记的回收至关重要。包含选择性标记和 Cre 重组酶的 Cre-loxP 重组系统是传统而又功能强大的基因组编辑工具, 可用于有效的基因组整合表达和标记回收。在早期工作中, 用于解脂耶氏酵母菌株筛选的标记主要是营养缺陷型基因, 包括 *LEU2*、*TRP1*、*URA3* 等^[16,35]。*URA3* 标记不仅可以使 5-氟乳清酸 (5-fluoroorotic acid, 5-FOA) 培养基反筛选, 通过将 *URA3* 启动子截短至 41 bp, 可以实现目的基因的高水平表达^[36]。最近, 赤藓糖激酶编码基因 *EYK1* 被开发为一种解脂耶氏酵母筛选标记, 它能够提高转化效率和促进转化子的生长^[37]。与此同时, 许多研究发现解脂耶氏酵母菌株对潮霉素 B、诺尔丝菌素和博来霉素/腐草霉素等抗生素敏感^[38-39]。Hamilton 等鉴定了一个内源的乙酰胺酶编码基因 *YIAMDI*, 并证明该基因可以用作解脂耶氏酵母中的可循环遗传标记, 在乙酰胺培养基上进行正筛选, 然后在氟乙酰胺培养基上进行反筛选^[40]。Edwards 等研究了在细胞中编码 O-乙酰高丝氨酸硫化氢解酶的基因 *MET25*, 并将其开发为遗传标记。*MET25* 的缺失并没有导致解脂耶氏酵母对甲硫氨酸的营养缺陷, 不过培养基中补充二价铅诱导硫化铅 (PbS) 后, PbS 会在 *MET25* 缺失菌中聚集, 使其呈棕色/黑色, 而含有 *MET25* 基因的细胞呈白色, 因此可用于基于颜色的筛选^[41]。随着遗传标记工具库的不断扩充, 将会有力推动解脂耶氏酵母遗传操作的便捷性及其代谢工程应用。

2.2 基因表达载体

2.2.1 游离型载体

基因表达可以采用基因组整合表达或质粒表达等策略。选择质粒作为基因表达载体有利

于快速构建, 但是通常质粒的稳定性较差。酿酒酵母常见的游离质粒包括着丝粒序列 (centromere, CEN) 及染色体自主复制序列 (autonomously replicating sequence, ARS) 和 2 μ m 复制序列。截至目前, 解脂耶氏酵母菌株中未发现天然游离质粒。通过染色体自主复制序列/着丝粒 (ARS/CEN) 能够设计解脂耶氏酵母人工游离型载体, 其在单个细胞中的拷贝数约为 1-3 个 (图 1A)^[42]。最近研究表明, 在着丝粒区上游连接一个启动子能够得到增强型 ARS/CEN 质粒, 相对质粒拷贝数和基因表达水平提高了 80%, 荧光强度动态范围提高了近 2.7 倍^[43]。Lopez 等研究发现, 解脂耶氏酵母的 ARS 显示出独特的结构, 该结构包括一个先前未注释的序列 (spacer), 该序列将复制起点 (origin, ORI) 和着丝粒元件 CEN 连接起来并且在调节质粒行为中起关键作用。与更普遍使用的最小化 ARS 相比, 维持一个天然的 645 bp 的 spacer 可使基因表达产生 4.5 倍的增加和质粒稳定性的提高。通过测试 ARS 内部元件的模块性表明, 质粒稳定性表现出明显的负载基因依赖性^[44]。基于此游离表达体系, Bredeweg 等开发了一套分子工具, 以扩展解脂耶氏酵母在生物学研究和工业应用中的能力。作者首先构建了一组营养缺陷型菌株, 同时敲除 *Ku70* 基因以减弱非同源末端连接。随后构建了一个多用途表达载体 pYL15 (GenBank: KU378202), 该载体中包含高表达启动子 *EXP1*, 10 \times 甘氨酸 linker 和 *sfGFP* 基因, 待表达基因可与 3'端 *sfGFP* 基因融合实现解脂耶氏酵母中目的蛋白质的亚细胞定位分析^[37]。与类似地, Dulermo 等也构建了一系列具有不同强度启动子的表达载体库, 可快速确定目的蛋白质的最优表达水平^[45]。

尽管解脂耶氏酵母具有优异的代谢能力,

但依然缺乏 DNA 大片段组装的工具。酵母人工染色体 (yeast artificial chromosomes, YACs) 最早是在酿酒酵母中开发并应用于大片段 DNA 的插入、基因组文库构建和功能分析。在最近的一个报道中, 研究人员首次在解脂耶氏酵母中设计和构建人工染色体 (*Y. lipolytica*-specific artificial chromosome, yIAC), 以实现快速、高效的基因和染色体组装 (图 1B)。通过体内组装可以将多个基因以 90% 的组装效率产生一条 23 kb 的线性染色体, 并应用于纤维二糖和木糖共利用代谢途径的快速构建和优化。在使用必需基因 *Hem1* 作为天然选择压力的情况下, yIAC 能够在多个世代中保持高稳定性^[46]。最近, 针对解脂耶氏酵母缺乏游离型

表达载体的缺点, 本课题组从解脂耶氏酵母线粒体 DNA 中挖掘和鉴定了一段 516 bp 的线粒体复制子 mtORI, 它能够介导高蛋白表达水平和遗传稳定性的环状质粒自主复制。在 *Po1fKu70* 敲除菌株中, mtORI 质粒的同质性得到显著改善, 最高拷贝数达到 5.0 个/细胞。该结果表明, 线粒体来源 DNA 序列可用于建立高稳定性自主复制质粒, 将会补充现有的解脂耶氏酵母合成生物学工具库^[47]。

2.2.2 整合型载体

尽管游离型载体具有操作便捷、转化效率高等优点, 其遗传稳定性差的问题仍然存在。将目的基因整合到酵母基因组能够实现持续存在和稳定表达。整合型载体通常含有 1 个或

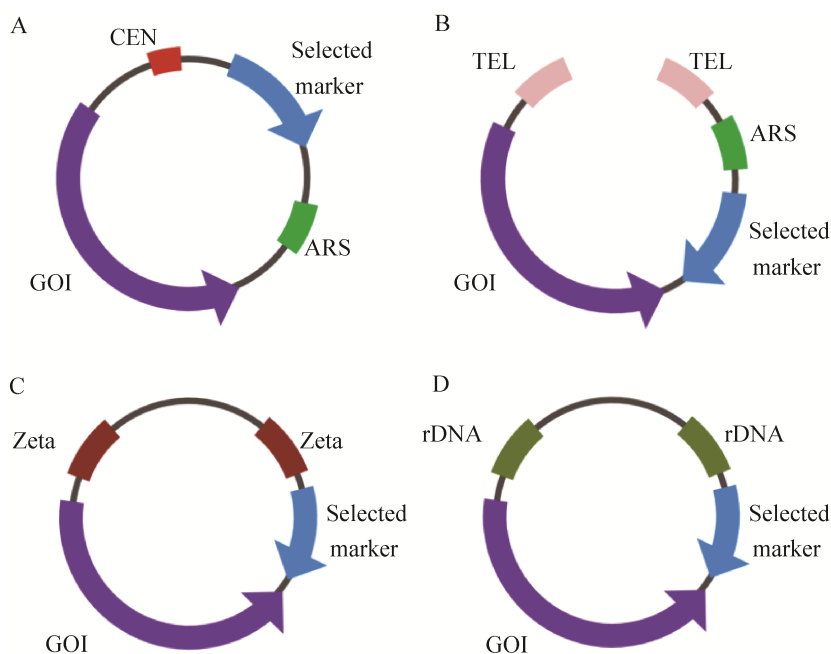


图 1 解脂耶氏酵母常见的表达载体示意图

Figure 1 Schematic diagram of common expression vectors of *Y. lipolytica*. (A) *Y. lipolytica* artificial episomal vector containing autonomously replicating sequence/centromere (ARS/CEN). (B) *Y. lipolytica*-specific artificial chromosome yIAC, consisting of two telomere sequences TEL and one centromere, and the origin of replication are composed of the autonomously replicating sequence ARS. Using the digested yIACs plasmid and PCR amplified expression cassette to rapidly achieve *in vivo* assembly of yIAC modules. (C) Zeta-dependent expression vector that can mediate single-copy or multi-copy genome integration. (D) *Y. lipolytica* rDNA dependent multi-copy integration vector, including rDNA fragments with unique restriction sites and selection markers.

2个与基因组序列同源的DNA区域,分别通过单交换或双交换进行同源重组。当解脂耶氏酵母作为宿主时,同源臂长度必须超过0.5–1 kb才能实现较高的靶向效率^[18,48]。而Zeta序列是一段500 bp的Ylt1-反转录转座子来源的DNA序列,Zeta序列依赖的通用整合型载体可以进行随机异位整合,并被广泛应用于解脂耶氏酵母基因和代谢途径过表达(图1C)^[49]。当结合一个启动子弱化的筛选标记时,Zeta整合载体能够实现基因的多拷贝随机基因组插入^[50]。Lv等结合Cre-loxP系统的高重组效率和26S rDNA的高整合率,开发了一种迭代整合方法促进解脂耶氏酵母中多拷贝代谢途径的构建(图1D)。以植物来源的类黄酮途径为试验平台,实现了在随机位点上的高效、多拷贝基因组整合。Cre重组酶的瞬时表达能够有效去除标记,并允许迭代基因组整合^[51]。

2.3 CRISPR介导的基因组编辑系统的设计

2.3.1 同源/非同源依赖基因组编辑

通常来说,定点基因组整合和敲除依赖于宿主细胞的同源重组(homologous recombination, HR)修复。通过构建含有侧翼同源臂的供体DNA,基于HR的策略能够靶向基因组特定区域(图2)。由于其独特的DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)修复路径选择倾向性,与酿酒酵母相比较,解脂耶氏酵母HR能力较弱。这导致在进行外源基因整合时,同源臂长度要求在0.5 kb(最佳长度为0.75–1 kb)以上才能获得可接受的效率^[52]。当非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)途径中负责DSBs修复的*ku70*基因缺失时,将会促进短同源臂条件下的同源重组,但是伴随有转化效率的降低^[48]。最近有研究人员提出了另一种基于CRISPR干扰(CRISPR interference, CRISPRi)的策略,将9个靶向基因中的8个进行有效抑制

以增强HR。通过对*Ku70*和*Ku80*基因进行多重靶向,并通过将*MxiI*融合到失活的Cas9来增强抑制作用,HR效率高达90%^[53]。此外,羟基脲处理能够使包括解脂耶氏酵母在内的各种酵母细胞停滞在S期,基因组靶向效率提高至90%^[54]。为提高HR基因编辑的效率,Ji等将酿酒酵母中HR机制的关键成分编码基因*RAD52*在解脂耶氏酵母中表达,结果表明,同源臂长为1 000 bp时,该策略可实现高达95%的基因靶向效率,是野生型菌株的6.5倍,是传统*ku70*敲除策略的1.6倍^[55]。最近,Gao等尝试通过重组机制工程以增强非常规酵母多形汉逊酵母(*Ogataea polymorpha*)基于同源重组的基因编辑的能力。通过在该菌株中表达HR相关蛋白,包括来自酿酒酵母的ScSAE2、ScRAD52、ScRAD51和内源的OpRAD52,以及利用抑制型启动子下调NHEJ修复途径,使CRISPR基因编辑效率从20%–30%增加至60%–70%。上述研究对解脂耶氏酵母也具有很好的借鉴意义^[56]。

尽管人们已经做了很多的努力来利用HR机制将外源DNA整合到靶向基因组位点,但由于HR修复效率较低且同源臂构建过程烦琐,解脂耶氏酵母的途径改造依然费时费力,尤其是对多基因生物合成途径而言。很早之前,人们就发现基于Ylt1反转录转座子Zeta序列的表达载体可以在不含有该转座系统的菌株(例如W29及其衍生菌株)中进行随机整合,推测这一现象是由解脂耶氏酵母自身NHEJ修复机制造成的(图2)。基于Zeta序列已经开发出一系列随机整合型载体并用于代谢途径改造。近期,本课题组研究发现非同源DNA片段能够在NHEJ介导下高效插入至解脂耶氏酵母基因组中,由于整合基因拷贝数和基因组位点不同,整合菌株表现出明显的基因表达水平差异。据

此, 我们开发了非同源依赖的随机基因组整合策略用于表达文库的构建和筛选。作为验证, 构建了脂肪酶基因 *LIP2* 和 β -胡萝卜素合成途径表达文库, 并通过高通量筛选获得了高产工程菌株^[57]。该结果证明了非同源依赖的基因组整合对于构建多基因代谢途径和模块化表达文库有很大的潜力, 能够促进解脂耶氏酵母代谢工程应用。最近, Bai 等通过调节 NHEJ 修复途径, 使用有缺陷的 *URA3* 标记和优化迭代转化, 在解脂耶氏酵母中建立了一种高效的 NHEJ 介导的基因组文库技术, 使基因整合效率提高了 22.74 倍^[58]。尽管 NHEJ 依赖的随机基因组整合具有高效、便捷等优点, 能够快速产生基因插入文库用于宿主菌株的代谢途径改造, 但是该方法具有基因整合位点和拷贝数随机性, 不仅需要进行后续基因组定位和拷贝数分析, 而且有可能造成宿主基因组必需基因的插入失活。因此, 我们进一步借助 CRISPR/Cas9 系统和 NHEJ 修复在解脂耶氏酵母开发一种非同源依赖的定点基因组编辑方法 (图 2)。通过优化 Cas9 的切割效率、调控 DNA 修复保真性和细胞周期同步化, 靶向基因组整合效率达到了 55%^[59]。来自德克萨斯州立大学奥斯汀分校的研究团队使用密码子优化的高活性 piggyBac 转座酶 (hyperactive piggyBac transposase, hyPBBase), 证实了解脂耶氏酵母体内转座。当两侧连接 piggyBac 反向末端重复序列 (inverted terminal repeat, ITR) 时, DNA 序列 (即选择标记或整合盒) 可以从复制型载体调动并插入到解脂耶氏酵母基因组中。该转座系统用于构建解脂耶氏酵母全基因组插入突变文库, 结合一系列营养缺陷型或显性筛选标记, 也被用于构建整合载体。然而, piggyBac 整合不是在基因组中完全随机发生, 而是靶向 TTAA 序列 (存在于不到 2/3 的已注释解脂耶氏酵母编码序列, 并且倾向

于活跃转录区域), 这限制了全基因组插入诱变的应用^[39]。

2.3.2 CRISPR 介导的基因组整合

CRISPR 系统可以诱导基因组特定位点产生 DSBs, 然后可以在存在同源供体 DNA 的情况下进行 HR 修复, 也可以实施不依赖供体 DNA 的 NHEJ 修复 (图 2)。在解脂耶氏酵母等重要工业菌株中构建高效的基因组编辑工具 CRISPR/Cas 系统, 对于降低遗传操作难度、缩短改造周期具有十分重要的意义。最近, 基因组编辑工具 CRISPR 已被改造用于解脂耶氏酵母中非遗传标记依赖的基因整合和缺失。Schwartz 等首次在解脂耶氏酵母中开发了 CRISPR-Cas9 基因组编辑工具^[60], 并且发现 III 型 RNA 聚合酶复制向导 RNA 的转录时, 单基因敲除效率高达 92%。当 NHEJ 被失活后, DNA 片段基因组整合效率约为 100%。该研究小组进一步开发了一种基于 CRISPR-Cas9 的基因组整合工具, 可将无标记的目标基因迭代整合到解脂耶氏酵母基因组中, 同时快速构建了一条半合成番茄红素生物合成途径。最近, T7 聚合酶也被用于解脂耶氏酵母的向导 RNA (guide RNA, gRNA) 转录, 以使 CRISPR/Cas9 介导的敲除效率达到 60%^[61]。这些研究初步显示出了 CRISPR-Cas9 编辑技术的潜力, 但是仍然需要进一步优化提高基因组整合效率。Schwartz 等开发了一种全基因组突变筛选策略来量化单个 sgRNA 在基因组文库中的切割效率, 鉴定出覆盖 94% 基因的高效 sgRNA^[62]。Borsenberger 等通过提取胞内 sgRNA 测序发现, sgRNA 的表达, 尤其是靶序列 5' 末端的碱基错配, 是产生功能性核糖核酸蛋白复合物的限制因素^[63]。Holkenbrink 等介绍了适用于解脂耶氏酵母的 EasyCloneYALI 遗传工具箱, 该工具箱可在 CRISPR/Cas9 的帮助下将基因表达载

体无标记整合到特定的基因组位点。使用非复制型 DNA 修复片段 (例如 DNA 寡核苷酸) 转化酵母可实现 80% 以上的基因组编辑效率^[38]。近期, Gao 等开发了同源依赖的末端连接 (homology mediated end joining, HMEJ) 方法, 通过一对 sgRNA 同时切割基因组 2 个位点实现基因组敲除和整合, 利用短同源臂时靶向效率是 HR 的 2 倍。这种双重切割策略对于长度不超过 3.5 kb 的基因的编码区和非编码区都非常有效。此外, 在 *PEX10* 位点上证实了基于 HR 或 HMEJ 的 DNA 切割辅助整合的可行性。因此, 这种基因

切除方法可以与基于 HMEJ 的基因整合方法相结合, 巩固和加快代谢工程的发展^[64]。

与 Cas9 不同, Cpf1 主要识别富含 T 的 PAM(TTTN) 位点, 并在目标序列的下游切割 DNA 产生黏性末端, 从而可以对同一遗传靶标进行重复编辑来提高靶向编辑效率。与此同时, CRISPR-Cpf1 具有简化的 crRNA 结构, 可以作为 CRISPR/Cas9 编辑系统的有力补充。为了证明 CRISPR-Cpf1 在解脂耶氏酵母中的实用性, Yang 等优化了 CRISPR-Cpf1 系统并实现了两个反向选择标记精氨酸通透酶 (约为 93%) 和乳

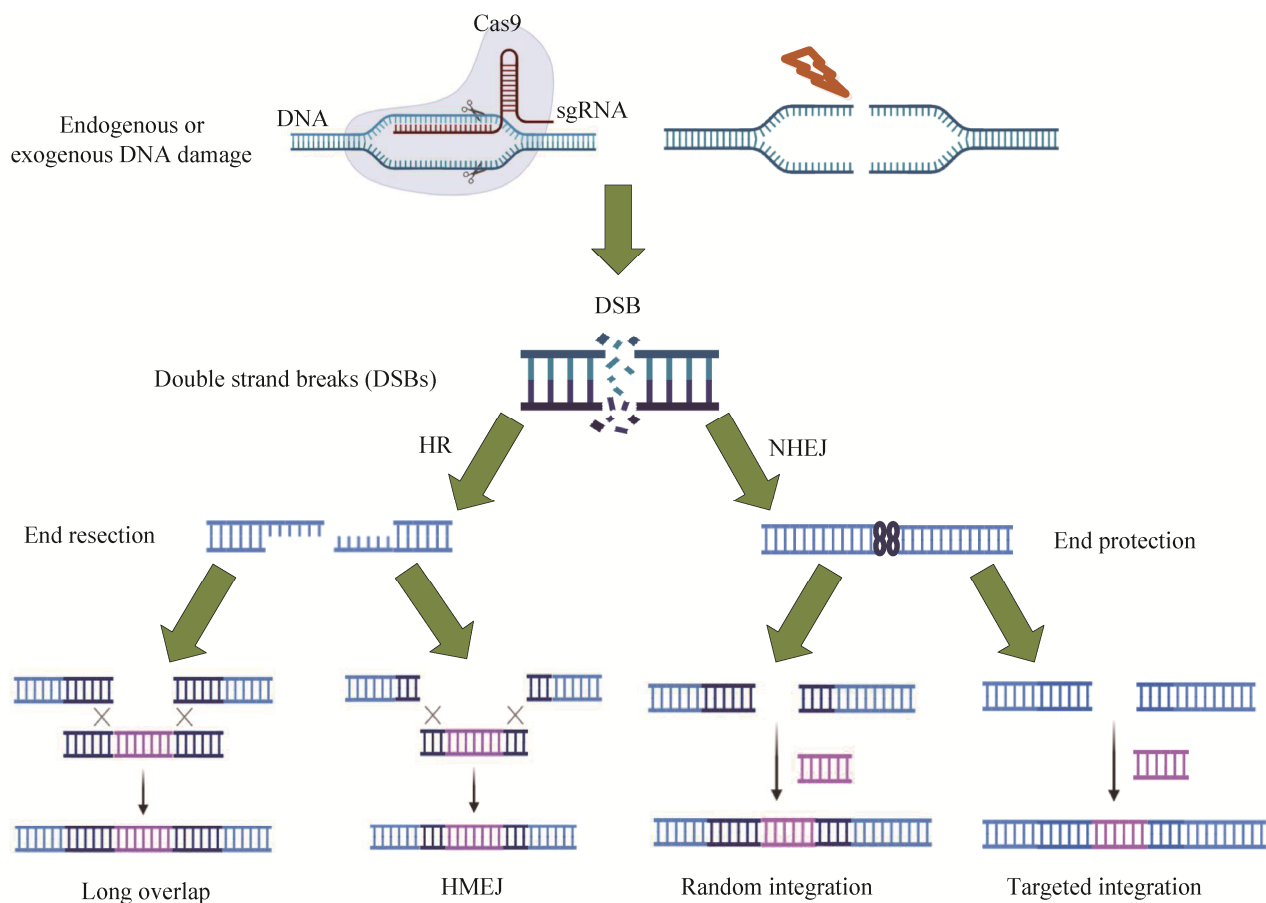


图 2 解脂耶氏酵母基于同源重组 HR 和非同源末端连接 NHEJ 的基因编辑系统设计原理

Figure 2 The design principle of a gene editing system based on homologous recombination (HR) and non-homologous terminal junction (NHEJ) in *Y. lipolytica*.

昔 5'-磷酸脱羧酶 (约为 96%) 的高效编辑, 三重基因组靶标 (*CANI-URA3-MET25*) 的编辑效率达到 41.7%^[65]。与此同时, Ramesh 等描述了一个双重功能的 CRISPR-Cpf1 系统, 它能够同时进行基因编辑和基因调控^[66]。使用截短的 gRNA 可抑制 Cpf1 核酸酶活性并用于基因的激活与抑制, 长度为 23–25 bp 的 gRNA 可实现高效基因组编辑。

2.4 基因表达和调控工具

2.4.1 组成型启动子

微生物细胞工厂的创建通常需要一系列精准表征的天然或者人工合成启动子元件。Wong 等建立了一套基于荧光素酶报告基因的高灵敏系统, 以表征一组 (共 12 个) 天然启动子^[67]。他们发现 *TEF1* 启动子表现出最强的表达水平, 而来自 TCA 循环、糖酵解、戊糖磷酸途径和脂质氧化途径的其他 11 个启动子表现出的相对转录活性范围为 *TEF1* 启动子活性的 0.7% 至 29.7%。近年来, 大量研究通过人工设计和重构上游激活序列 (upstream activation sequence, UAS) 和核心启动子来生成拥有强大表达活性的杂合启动子, 其对于任何宿主的异源基因表达和代谢途径改造都是必不可少的。在解脂耶氏酵母早期研究中, 人们就通过对 *XPR2p* 序列剖析发现其上游激活序列 (UAS) 不受培养条件的限制, 从而设计了杂合启动子 *hp4d*^[20]。*hp4d* 启动子的表达具有很明显的时序性, 有助于异源蛋白的高效表达和分泌, 已成为应用最广泛的启动子之一。Blazeck 等发现解脂耶氏酵母中的 UAS 可以发挥增强子的作用, UAS 区域的多拷贝串联可以普遍用于增加启动子的表达水平^[68]。该团队随后鉴定了解脂耶氏酵母天然 *TEF* 启动子中的假定 UAS 元件, 并通过组合不同的 UAS 元件从头开发了一系列具有不同表达强度的解脂耶氏酵母的杂合启动子文

库, 其最高表达水平比强组成型 *TEF* 启动子高出近 7 倍。与此同时, Shabbir 等对解脂耶氏酵母的启动子结构进行了系统研究, 结果表明, 启动子的强度可以通过 TATA 盒序列, 核心启动子和上游激活序列的改造进行微调。该工作不仅开发了一组新的杂合启动子, 同时为解脂耶氏酵母的代谢工程应用提供了有效的启动子改造策略^[69]。

2.4.2 诱导型启动子与生物传感器

作为次级调控方式, 诱导型启动子为基因表达提供了时序控制维度, 这有助于工业发酵中的生长和生产阶段的解耦联。最早被挖掘和使用的解脂耶氏酵母诱导型启动子主要来自油脂代谢相关基因, 例如 *POX2* 和 *POT1* 等, 它们受油酸、烷烃等底物的诱导并被葡萄糖和甘油完全抑制^[15]。通过分析已公开的解脂耶氏酵母转录组数据, Kamineni 等鉴定了 4 个天然启动子, 它们从生长到脂质积累的过渡过程中会发生下调^[70]。随后, 这些启动子被用于控制 2 个去饱和酶基因的表达, 从而可以在脂质积累阶段改变细胞脂质谱, 而无需培养添加剂。Trassaert 等分离并表征了编码赤藓糖激酶的 *EYK1* 基因的启动子, 赤藓糖醇和赤藓糖的存在大大增加了 *EYK1* 启动子的诱导水平^[71]。通过鉴定上游激活序列 UAS1EYK1, 并构建包含 UAS1XPR2 或 UAS1EYK1 串联重复序列的新杂合启动子, 实现了更高表达水平和更精细的剂量依赖性诱导表达。在另外一项研究中, Park 等通过在赤藓糖醇分解代谢相关 *EYD1* 和 *EYK1* 的启动子区域内的系统发育足迹识别了 4 个保守的顺式调控模块 (*cis*-regulatory modules, CRMs), 并发现 4 个上游激活序列参与了赤藓糖醇依赖的启动子诱导表达^[72]。最终成功开发了强度可变的赤藓糖醇诱导型启动子, 其强度范围从 0.1 SFU/h 到 457.5 SFU/h, 该杂合启动子可用于解脂耶氏酵母基因表达水平的调节。

最近, Xiong 等分离得到若干个 Cu^{2+} 诱导型启动子和抑制型启动子^[73]。工程化设计了 6 个 Cu^{2+} 诱导型启动子, 通过串联上游激活序列提高其动态调控范围。工程化 Cu^{2+} 诱导型启动子已成功用于新型生物产物蜡酯生产途径的构建。以解脂耶氏酵母为宿主开发新的合成启动子的持续努力, 将进一步增强解脂耶氏酵母基因表达控制能力, 扩展其应用领域。

生物传感器是指一类能够识别并响应特定的胞内或胞外信号 (如某种代谢物的变化), 并将其转化为输出信号的基因回路。生物传感器能够监控细胞生理和代谢变化, 被广泛应用于代谢途径动态调节和高产菌株的高通量筛选。截至目前, 解脂耶氏酵母中生物传感器的构建和应用案例仍然较少。Lv 等在深入研究天然启动子 *POX2* 的基础上设计了一种人工脂肪酸诱导型启动子, 并与 CRISPRi 元件结合以抑制油脂生成途径^[74]。与此同时, 作者首次将异源的柚皮素转录激活因子 FdeR 及其同源的 DNA 结合位点 FdeO 引入解脂耶氏酵母, 所构建的人工启动子均可被柚皮素诱导 (响应范围为 0 mg/L 至 50 mg/L)。类黄酮敏感的杂合启动子用于控制亮氨酸的合成, 赋予工程菌株以柚皮素依赖的选择性细胞生长优势。最终, 通过将化学成瘾与负的自动调节性遗传回路相结合来提高工程菌株的代谢稳定性和柚皮素产量。

2.4.3 CRISPR 系统依赖的基因表达调控

除了在基因组编辑中发挥重要作用之外, 基于 CRISPR 系统的基因调控手段具有在很大的动态范围内进行高选择性转录调节的能力。其中, CRISPRi 系统主要涉及 2 个部分: 内切核酸酶活性缺失的特异性核酸酶和 gRNA。Zhang 等基于核酸酶缺陷 dCas9 和 dCpf1 在解脂耶氏酵母中建立了 CRISPRi 系统, 同时借助 Golden-brick 一步组装技术开发多重 gRNA 策

略^[75]。与此同时, Schwartz 等筛选了一系列用于解脂耶氏酵母的异源转录激活域, 最成功的是合成的激活因子 VPR 融合到 dCas9 以创建功能性 CRISPR 激活 (CRISPR activation, CRISPRa) 系统。随后, 通过 CRISPRa 系统激活 2 个天然 β -葡萄糖苷酶基因的表达, 实现了以纤维二糖作为唯一碳源的细胞生长改善^[76]。通过对向导 RNA 间隔区长度的研究, Ramesh 等发现当其截断至 16 nt 时, 可抑制 Cpf1 核酸酶活性, 而不影响与靶基因位点的结合。基于该实验结果, 作者将 Cpf1 与转录调节因子融合实现目的基因的激活和抑制。使用 Cpf1-Mxi1 融合蛋白可实现 mRNA 水平降低 7 倍, 而 Cpf1-VPR 的 CRISPR 激活使 hrGFP 表达提高 10 倍^[66]。

3 解脂耶氏酵母天然产物合成研究进展

解脂耶氏酵母是天然的产油微生物, 近年来随着人们对解脂耶氏酵母代谢特征的理解, 以及高效遗传工具的发展, 已经有越来越多的工作对其代谢途径进行重编程来生产天然产物^[77]。

产油特性使得它在营养限制条件下可以积累大量的中性脂质 (>20% *W/W*)。通过代谢工程改造, 目前最好的工程菌株脂质生产效率可达 1.2 g/(h·L), 其脂质含量达到细胞干重的 90%^[78]。

解脂耶氏酵母天然不产生萜类、黄酮类和聚酮类等天然产物, 但是它作为复杂天然产物合成的底盘细胞具有以下几点优势^[79-80]: 首先, 解脂耶氏酵母可以产生充足的胞质乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 以实现油脂的大量积累, 而乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 同样可以作为萜类、黄酮类等高价值天然产物的合成前体; 其次, 解脂耶氏酵母拥有较高的磷酸戊糖途径代谢通量, 能够提供大量生物合成所需的 NADPH; 为

了储存过量的疏水性油脂,解脂耶氏酵母胞内含有丰富的脂滴亚细胞结构,可以为类胡萝卜素疏水性产物等物质提供储存场所;最后,解脂耶氏酵母具有优良的鲁棒性,对很多毒性产物(如柠檬烯等)具有较好的耐受性。

3.1 增强关键前体物质乙酰辅酶 A 的供应

乙酰辅酶 A 是一种重要的中心代谢物,参与脂肪酸、固醇、氨基酸等的生物合成以及 DNA、蛋白质乙酰化调控等多种生理和代谢活动。此外,乙酰辅酶 A 是萜类、黄酮和聚酮等高价天然产物生产的前体物质。因此保障乙酰辅酶 A 的充足供应不仅有助于目的代谢产物的积累,而且能够减少对微生物宿主代谢网络的影响。与原核生物不同,酵母中乙酰辅酶 A 的产生和运输受亚细胞分区的阻隔,其合成分布于线粒体、过氧化物酶体和细胞质中。由于绝大多数天然产物生物合成途径位于细胞质,胞质乙酰辅酶 A 的合成通常是天然产物高产的决定因素。

在解脂耶氏酵母中,胞质乙酰辅酶 A 的合成主要是在 ATP-柠檬酸裂解酶(ATP citrate lyase, ACL)催化下,柠檬酸裂解产生并主要进入脂质合成代谢途径。在碳源过量和限氮培养条件下,解脂耶氏酵母细胞中的 AMP 脱氨酶(AMP deaminase, AMPD)被激活,并引起细胞内 AMP 的快速下降。这导致 TCA 循环中的异柠檬酸脱氢酶失活和柠檬酸的积累。线粒体内的柠檬酸通过线粒体膜中特定的转运蛋白转运至细胞质中,参与乙酰辅酶 A 的合成。因此,胞质乙酰辅酶 A 的合成受培养条件的调控,且合成通量较高,有利于乙酰辅酶 A 衍生物的合成。Markham 等通过 4 种不同的代谢工程策略增加乙酰辅酶 A 前体形成,结果发现丙酮酸支路途径(丙酮酸脱羧酶 PDC、乙醛脱氢酶 ALD、乙酰辅酶 A 合酶 ACS)和 β -氧化途径的

强化对胞质乙酰辅酶 A 合成的增加最为显著(图 3),通过上述途径的超表达促进三乙酸内酯(triacetate lactone, TAL)的合成,使 TAL 产量达到了 35.9 g/L^[81]。同样以最简单的聚酮化合物 TAL 作为目标代谢物,Liu 等证明了解脂耶氏酵母中乙酸利用途径(乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC1,苹果酸酶 MAE1)和细菌衍生的胞质丙酮酸脱氢酶 PDH 可以作为乙酰辅酶 A 合成的替代途径^[82]。最近,磷酸转酮酶(phosphoketolase, PK)和磷酸转乙酰酶(phosphotransacetylase, PTA)组成的 PK-PTA 途径被引入解脂耶氏酵母以增加胞质乙酰辅酶 A 供应。作为代谢中间体,乙酰辅酶 A 在细胞质中迅速耗尽,因此,乙酸盐(乙酰辅酶 A 的衍生物)被用作指示乙酰辅酶 A 产生的指标。作为指示标记的乙酸盐积累相比对照明显提高,终产物 β -紫罗兰酮的产量提高了 2.5 倍。值得注意的是,该乙酰辅酶 A 合成途径具有更高效的碳利用效率,仅需 4 步即可利用 1 mol 葡萄糖产生 3 mol 乙酰辅酶 A,而天然途径中 1 mol 葡萄糖在细胞质最多只能产生 2 mol 乙酰辅酶 A,且需要 14 个步骤^[83]。

3.2 脂质的合成

解脂耶氏酵母可以积累大量的储存脂质,并具有生产多不饱和脂肪酸和其他生物燃料脂质的巨大潜力。通过逆向分析哺乳脂肪细胞的表型,Qiao 等确定了 δ -9 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(stearyl CoA desaturase, SCD)是解脂耶氏酵母脂质合成途径限速步骤,同时过表达 SCD、乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC1 和二酰基甘油酯酰基转移酶(diacylglyceryl acyltransferase, DGA1)得到一株脂质高产菌株,该菌株脂质产量约为 55 g/L 且碳转化率达到理论转化率的 84.7%^[84]。此外,Liu 等采用一种进化代谢工程方法,将脂质合成与漂浮细胞富集联系在一起,通过迭代过程进化将出发菌株的产量提高 55%,脂

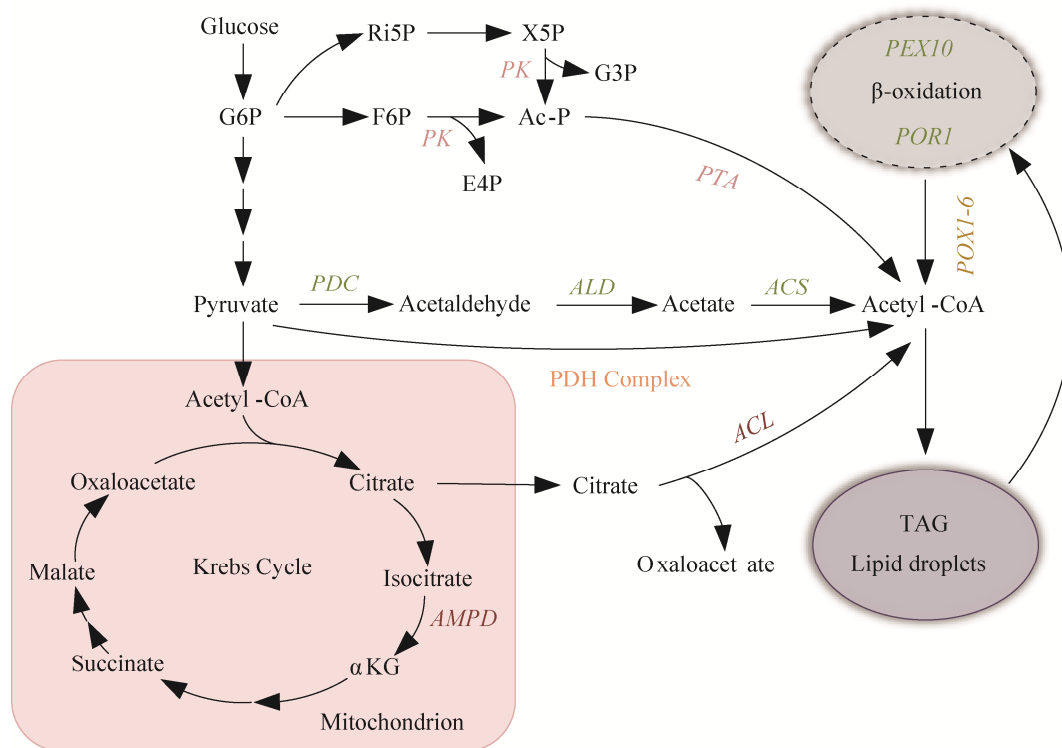


图 3 代谢工程策略促进解脂耶氏酵母胞质乙酰辅酶 A 的合成 PK: 磷酸转酮酶; PTA: 磷酸转乙酰基酶; PDC: 丙酮酸脱羧酶; ALD: 乙醛脱氢酶; ACS: 乙酰辅酶 A 合酶; PEX10: 过氧化物酶体基质蛋白; POX: 酰基辅酶 A 氧化酶; PDH: 丙酮酸脱氢酶; ACL: ATP-柠檬酸裂解酶; AMPD: AMP 脱氨酶; TAG: 三油酸甘油酯

Figure 3 Metabolic engineering strategies promote the synthesis of cytoplasmic acetyl-coenzyme A in *Y. lipolytica*. PK: phosphoketolase; PTA: phosphotransacetylase; PDC: pyruvate decarboxylase; ALD: aldehyde dehydrogenase; ACS: acetyl-CoA synthase; PEX10: peroxisome matrix protein; POX: acyl-CoA oxidase; PDH: pyruvate dehydrogenase; ACL: ATP-citrate lyase; AMPD: AMP deaminase; TAG: triacylglycerol.

质产量和含量分别为 39.1 g/L 和 87%^[85]。这些研究结果证明, 工程化解脂耶氏酵母能够高效生产脂质, 同时展现了其在其他油脂衍生化学品生物合成中的巨大潜力。为了最大限度地捕获由底物分解代谢产生的电子, 从而提高底物到产物的产量, Qiao 等采用将糖酵解 NADH 转化为脂质生物合成前体 NADPH 或乙酰辅酶 A 的策略设计了 13 株解脂耶氏酵母菌株, 最佳工程菌株的脂肪酸甲酯生产力达到了 1.2 g/(L·h)^[86]。

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 由于其独特的结构而具有重要的生理功能, 对人体健康具有重要意义。典型的

PUFAs 包括 ω -6 化合物 γ -亚麻酸 (gamma linolenic acid, GLA) 和花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA), 以及 ω -3 化合物二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 和二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA)。但它们的传统来源包括动物和植物, 已经无法满足需求, 因此通过代谢改造一些产油微生物来合成 PUFAs^[87]。目前利用解脂耶氏酵母菌株生产 EPA 已经实现商业化。Xue 等在解脂耶氏酵母中过表达一系列去饱和酶和延伸酶, 使得工程菌株产生了占干细胞重量 15% 的 EPA。同时发现过氧化物酶体生物发生相关基因 *PEX10* 的

失活对于获得高 EPA 产量至关重要, 并可能有助于增加其他具有商业价值的脂类产品的产量^[34]。共轭亚油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 对于人体健康益处良多, 比如预防癌症、抗动脉粥样硬化和抗肥胖症作用以及免疫系统的调节等。Zhang 等在解脂耶氏酵母中使用 *hp16d* 强启动子和多拷贝整合质粒共表达了来自高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 的 $\Delta 12$ 去饱和酶和亚油酸异构酶, 经基因改造的解脂耶氏酵母产生的反式-10, 顺式-12-CLA 的含量约占总脂肪酸的 10% 和 DCW 的 0.4%。此外, 在生长培养基中也检测到了高达 0.9 g/L 的反式-10, 顺式-12-CLA。当用大豆油培养重组酵母时, 反式-10, 顺式-12-CLA 的累积量达到总脂肪酸的 44%, 即 30% 的 DCW^[88]。随着分子生物学和基因工程工具的迅速发展, 解脂耶氏酵母代谢工程为脂质的过量生产提供了有效的平台。但是, 解脂耶氏酵母中脂质产生的调控可能比已知的更为复杂, 与脂质生产相关的大量酶具有多种功能和复杂的调节机制。在不久的将来, 要在代谢工程化的解脂耶氏酵母中实现脂质的工业化生产也是一个巨大的挑战。

3.3 萜类化合物合成

萜类化合物及其衍生物可以被用于生物燃料、香料、防腐剂和药品等的工业生产, 并因其极大的商业价值而受到广泛关注。与解脂耶氏酵母相比, 酿酒酵母具有清楚的遗传背景和完善的遗传操作工具, 因此早期研究中研究人员倾向使用其作为萜类化合物的合成宿主。其中, 青蒿素前体的酵母生物合成与商品化推广是一个经典案例, Westfall 等优化了酿酒酵母中的甲羟戊酸途径, 实现了高水平的紫穗槐二烯和青蒿酸的合成^[89]。近年来, 解脂耶氏酵母逐步被进行代谢改造用于单萜、倍半萜类、三萜类和四萜类等化合物的生产。有趣的是, 由

于内源甲羟戊酸途径为萜类合成提供更多的香叶基焦磷酸 (geranyl diphosphate, GPP)、法呢基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 等前体, 此外, 胞内丰富的脂滴为疏水性产物提供储存场所, 解脂耶氏酵母展现出优异的萜类化合物生物合成能力^[90]。随着代谢工程和合成生物学策略的不断发展, 解脂耶氏酵母将会成为一种用于萜类化合物高效生产的微生物细胞工厂。

α -法呢烯 (α -farnesene) 是最简单的无环倍半萜烯之一, 是一种在植物防御中具有重要功能的化合物, 在蚜虫和白蚁中起到危险警报以及定位信号的作用。 α -法呢烯正在被开发作为生物燃料的前体以及潜在的生物喷射燃料候选物。Yang 等将含有 *tHMG1*、*IDI*、*ERG20* 和密码子优化的 α -法呢烯合酶 (α -farnesene synthase, OptFS) 基因的组合过表达载体整合到解脂耶氏酵母 *Po1h* 的基因组中, 该重组菌株在摇瓶和发酵罐培养基中分别产生约 57 mg/L 和 260 mg/L 的 α -法呢烯^[91]。最近, 本课题组运用非同源依赖随机基因组整合技术, 构建了甲羟戊酸途径表达文库并筛选获得一株甲羟戊酸高产解脂耶氏酵母菌株。在此基础上, 通过迭代整合甲羟戊酸途径的所有基因及 α -法呢烯合成酶基因, 分批补料发酵中工程菌株可产生 25.5 g/L 的 α -法呢烯^[92]。这是已报道的解脂耶氏酵母生产萜类化合物的最高产量。(+) - 诺卡酮 ((+) - nocaketone) 是一种备受欢迎的倍半萜类化合物, 天然存在于葡萄柚 (*Citrus paradisi*) 和柚子 (*Citrus grandis*) 等植物中。由于其特殊的气味特性和较低的气味阈值, (+) - 诺卡酮被广泛用于香料, 化妆品和食品行业。最近, Guo 等通过共表达 (+) - 瓦伦烯合酶 ((+) - valencene synthase, CnVS), (+) - 诺卡酮合酶 ((+) - nocaketone synthase,

opCYP706M1)和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶 (NADPH-cytochrome P450 reductase, opAtCPR1) 异源生物合成(+)-诺卡酮。通过蛋白融合和增强甲羟戊酸代谢途径通量, 最终工程菌株实现的(+)-诺卡酮产量为 978.2 $\mu\text{g/L}$ 。这项研究为 P450 酶在解脂耶氏酵母中的高效表达以及构建天然产物代谢途径提供了范例^[93]。紫穗槐二烯 (amorphadiene) 是青蒿素的直接倍半萜烯烃前体, 它是通过紫穗槐二烯合酶 (amorphadiene synthase, ADS) 的作用从 FPP 前体衍生而来的。Marsafari 等发现解脂耶氏酵母中羟甲基戊二酰辅酶 A (hydroxymethylglutaryl-CoA, HMG-CoA)和乙酰辅酶 A 的供应是紫穗槐二烯生产的 2 个限制瓶颈。通过组合抑制脂肪酸合酶和激活脂肪酸降解途径, 紫穗槐二烯产量提高到了 171.5 mg/L 。该研究结果表明, 平衡碳通量和控制前体竞争途径是改善解脂耶氏酵母中萜类化合物合成的关键因素^[94]。

柠檬烯 (limonene) 是众所周知的环状单萜, 是香精和香料行业中最重要和广泛使用的萜类之一。从植物中提取柠檬烯及其衍生物的商业化生产受到市场供应不稳定的困扰, 而这些化合物的化学合成又受到高能耗和污染物排放的阻碍。微生物的异源生物合成为柠檬烯及其衍生物的可持续供应提供了一种有前景的替代方法。另一方面, 柠檬烯具有较强细胞毒性, 这对提高柠檬烯产量提出了严峻的挑战。代谢工程策略, 如过表达前体途径酶, 已被用于提高柠檬烯产量^[95]。解脂耶氏酵母中编码胞质甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径, 能够提供类异戊二烯前体异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP)用于萜类生物合成。Cao 等在解脂耶氏酵母中异源优化表达了编码 neryl 二磷酸合酶 1 (neryl diphosphate

synthase 1, NDPS1) 和柠檬烯合酶 (limonene synthase, LS) 的 2 个基因, 同时过表达 MVA 途径中关键酶基因, 在优化丙酮酸和十二烷浓度下, 最终工程菌株柠檬烯产量为 23.56 mg/L ^[96]。Arnesen 等以解脂耶氏酵母为平台菌株生产过量的单萜类、倍半萜类、二萜类、三萜类和四萜类。通过表达紫苏 (*Perilla frutescens*) 来源的柠檬烯合成酶, 单萜类平台菌株柠檬烯产量为 35.9 mg/L , 比相同条件下未表达甲羟戊酸途径的菌株提高了 100 倍^[97]。Cheng 等引入了藿香 (*Agastache rugosa*) 来源的柠檬烯合成基因, 该基因导致了柠檬烯产量的增加, 并进行了进一步的优化研究。以甘油为碳源, 并选择柠檬酸作为辅助碳源, 在优化培养基上进行补料分批发酵, 获得工程菌株柠檬烯产量为 165.3 mg/L , 是迄今柠檬烯产量最高的解脂耶氏酵母菌株^[98]。

齐墩果酸 (oleanolic acid) 是一种三萜类化合物, 以其抗氧化活性而闻名。Li 等通过过表达甲羟戊酸途径中关键基因, 同时将细胞色素 P450 酶 CYP716A12 与 NADPH-P450 还原酶 ATR1 进行蛋白融合, 使解脂耶氏酵母的齐墩果酸产量增加至 540.7 mg/L ^[99]。这项研究显示了以解脂耶氏酵母为平台生产高价值三萜类化合物的可行性。桦木酸 (betulinic acid) 是另外一种植物来源的五环戊烷型三萜, 具有抗病毒、抗肿瘤和抗其他代谢物综合征等多种药理活性。Jin 等应用一种多模块代谢工程策略系统改造解脂耶氏酵母, 以生产桦木酸及其相关三萜化合物。作者首先筛选和过表达了 25 种外源细胞色素 P450 单加氧酶和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶组合, 然后过表达内源的甲羟戊酸、乙酰辅酶 A 生成和氧化还原辅因子供应模块, 摇瓶培养中桦木酸和总的三萜产量分别达到 51.8 mg/L 和 204.9 mg/L ^[100]。原人参二醇

(protopanaxadiol) 是一种天然的 C30 类异戊二烯, 表现出抗癌、抗肿瘤、抗病毒和抗生素等特性, 具有重要的医学应用和商业价值。Wu 等通过引入一条异源的木糖利用途径, 并且过表达异源原人参二醇生物合成途径, 构建可以利用木糖作为唯一碳源生产原人参二醇的解脂耶氏酵母工程菌株。随后, 作者利用包括调控辅因子平衡、增强前体物供应和增强木糖代谢速率等代谢工程策略进一步促进了原人参二醇合成。在分批补料发酵中, 木糖作为底物的原人参二醇产量达到了 300 mg/L^[101]。羽扇豆酚 (lupeol) 是一种五环三萜烯, 是从 2,3-氧化角鲨烯转化为一类卢潘烷型三萜类化合物的重要中间代谢产物, 由于其抗 HIV、抗癌和抗炎活性, 受到了越来越多的关注。最近, Zhang 等报道了通过过表达 $\Delta 9$ -脂肪酸去饱和酶 OLE1 以及干扰磷脂酸磷酸酶 PAH1 和二酰基甘油激酶 DGK1 来控制解脂耶氏酵母脂质成分, 两种表型都加速了有毒产物向细胞外的运输, 并最终刺激了三萜类化合物羽扇豆酚的合成能力, 摇瓶中总产量为 411.72 mg/L, 比初始菌株提高了 33.2 倍^[102]。

类胡萝卜素是一类重要且多样化的脂肪族 C40 分子, 具有抗氧化作用, 在营养和健康中具有多种应用。番茄红素 (lycopene) 是一种结构相对简单的类胡萝卜素, 是合成大多数其他类胡萝卜素化合物的起点。在最近的一项工作中, Schwartz 等验证了一系列宿主和途径改造策略以提高解脂耶氏酵母的番茄红素生产。其中, 甲羟戊酸途径的过表达和营养缺陷型的回补被证明是最有效的措施, 在 1 L 生物反应器中工程菌株产生 21.1 mg/g DCW 的番茄红素^[103]。Zhang 等发现番茄红素合成途径基因的拷贝数和 AMPD 的过表达能够显著影响番茄红素产量, 其含量达到 (46–60) mg/g DCW^[104]。与此同时, Luo 等通过异源表达 *CHK* 和 *IPK* 基因引

入两步异戊烯醇利用途径, 增加解脂耶氏酵母中 IPP 及其异构体 DMAPP 的产生^[105]。异戊烯醇利用途径产生的 IPP 和 DMAPP 含量比天然甲羟戊酸途径提高 15.7 倍, 从而更好地用于番茄红素的合成。将这些代谢工程策略与进一步发酵优化相结合, 最终获得了 4.2 g/L 的番茄红素。 β -胡萝卜素 (β -carotene) 是一种橙色颜料, 可以作为着色剂、抗氧化剂和维生素前体。Gao 等将来自毛霉菌 (*Mucor circinelloides*) 的双功能酶八氢番茄红素合成酶/番茄红素环化酶 (phytoene synthase/lycopene cyclase, CarRP) 和八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene dehydrogenase, CarB) 引入解脂耶氏酵母, 实现了 β -胡萝卜素的合成。随后, 从乙酰辅酶 A 到 β -胡萝卜素的 11 个基因被过表达, 同时首次探究了途径基因拷贝数对代谢终产物积累的影响。在补料分批发酵中, 所得改造菌株可消耗 233 g/L 葡萄糖产生 4 g/L 的 β -胡萝卜素^[35]。随后, Larroude 等首次证实脂质生产菌株相比于野生型菌株更适宜于 β -胡萝卜素生产, 同时利用 Golden Gate DNA 组装方法对代谢途径中基因的表达启动子进行筛选。作者同样使用了多拷贝整合策略提高 GGS1、HMG1、CarB 和 CarRP 的表达, β -胡萝卜素产量达到了 6.5 g/L 和 90 mg/g DCW, 这是迄今为止微生物合成 β -胡萝卜素的最高纪录^[106]。虾青素 (astaxanthin) 是一种红色的类胡萝卜素, 主要用作食品和饲料添加剂。Kildegaard 等最先改造解脂耶氏酵母代谢途径以产生虾青素。首先, 他们将红发夫酵母 (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) 的双功能八氢番茄红素合成酶/番茄红素环化酶和八氢番茄红素去饱和酶 (phytoene desaturase, CrtI) 引入解脂耶氏酵母基因组。优化了 HMG1 和 GGS1/crtE 的活性, 并且下调竞争性途径的角鲨烯合成酶 SQS1。最后, 引入了来自副球菌属 (*Paracoccus*

sp.) 的 β -胡萝卜素酮酶 (β -carotene ketolase, CrtW) 和来自 *Pantoea ananatis* N81106 的羟化酶 (hydroxylase, CrtZ), 将 β -胡萝卜素转化为虾青素, 通过优化 CrtZ 和 CrtW 拷贝数在微量滴定板培养中虾青素的产量达到 54.6 mg/L^[107]。为了进一步促进虾青素的微生物合成, Tramontin 等优化

GPPS 合酶的表达来提高 β -胡萝卜素前体的生产, 并以此为平台菌株引入不同物种来源和拷贝数的 CrtZ 和 CrtW, 最终虾青素产量达到 285 mg/L。尽管目前虾青素发酵指标尚不能达到工业化生产需求, 这些研究结果表明解脂耶氏酵母在构建虾青素生物合成细胞工厂方面具有极大潜力^[108]。

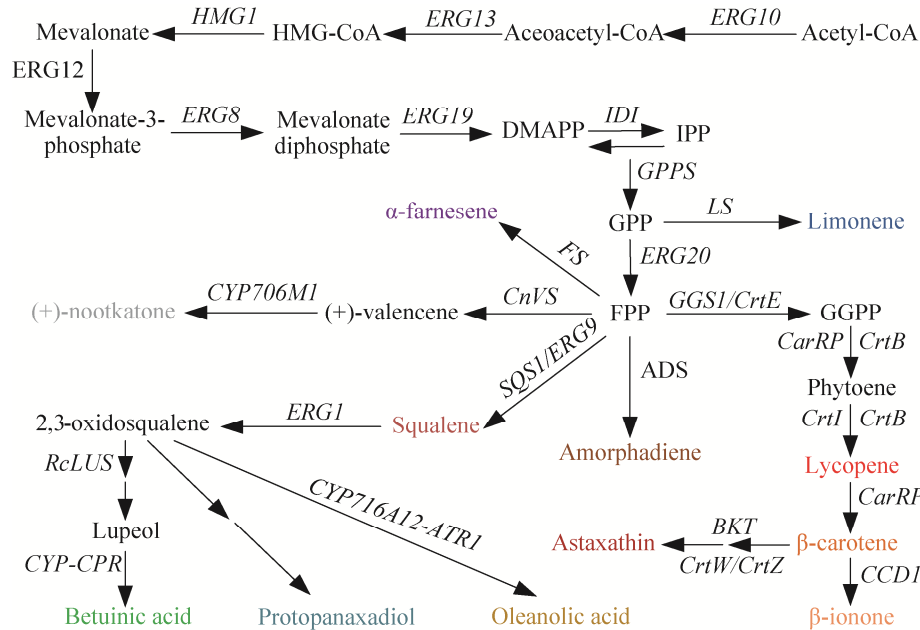


图 4 解脂耶氏酵母中萜类化合物的生物合成途径 ERG10: 乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶; ERG13: 羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶; HMG1: 羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; ERG12: 甲羟戊酸激酶; ERG8: 磷酸甲羟戊酸激酶; ERG19: 二磷酸丙戊酸脱羧酶; IDI: 异戊烯基焦磷酸异构酶; GPPS: 牻牛基焦磷酸合酶; ERG20: 法呢烯焦磷酸合酶; SQS1/ERG9: 法呢基焦磷酸法尼基转移酶; LS: 柠檬烯合酶; FS: 法呢烯合酶; CnVS: 瓦伦烯合酶; CYP706M1: 诺卡酮合酶; ADS: 紫穗槐二烯合酶; GGS1/CrtE: 香叶基二磷酸合酶; CarRP: 并苯合酶/番茄红素环化酶; CarB: 八氢番茄红素脱氢酶; CrtI: 番茄红素合酶; CrtB: 八氢番茄红素合成酶; CCD1: 类胡萝卜素裂解双加氧酶 1; CrtW: β -胡萝卜素酮醇酶; CrtZ: β -胡萝卜素羟化酶; ERG1: 角鲨烯环氧酶; RcLUS: 蓖麻羽扇豆醇合成酶; CYP: 细胞色素 P450; CPR: 细胞色素 P450 还原酶; CYP716A12: 齐墩果酸合酶; ATR1: NADPH-细胞色素 P450 还原酶

Figure 4 Biosynthetic pathway of terpenoids in *Y. lipolytica*. ERG10: acetyl-CoA C-acetyltransferase; ERG13: hydroxymethylglutaryl-CoA synthase; HMG1: hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; ERG12: mevalonate kinase; ERG8: phosphomevalonate kinase; ERG19: diphosphomevalonate decarboxylase; IDI: isopentenyl-diphosphate isomerase; GPPS: geranylgeranyl diphosphate synthase; ERG20: farnesyl-diphosphate synthase; SQS1/ERG9: farnesyl-diphosphate farnesyltransferase; LS: limonene synthase; FS: farnesene synthase; CnVS: valencene synthase; CYP706M1: nokadone synthase; ADS: amorphadiene synthase; GGS1/CrtE: geranylgeranyl-diphosphate synthase; CarRP: phytoene synthase/lycopene cyclase; CarB: phytoene dehydrogenase; CrtI: lycopene synthase; CrtB: phytoene synthase; CCD1: carotenoid-cleaving dioxygenase 1; CrtW: β -carotene ketolase; CrtZ: β -carotene hydroxylase; ERG1: squalene monooxygenase; RcLUS: lupeol synthase; CYP: cytochrome P450; CPR: cytochrome P450 reductase; CYP716A12: oleanolic acid synthase; ATR1: NADPH-cytochrome P450 reductase.

紫罗兰酮是一类植物来源的萜类香气化合物,对香料和调味品行业很有价值。Czajka等通过向一个高产 β -胡萝卜素平台菌株引入木犀(*Osmanthus fragrans*)来源的类胡萝卜素裂解双加氧酶1(cleavage dioxygenase 1, CCD1)首次实现了解脂耶氏酵母中 β -紫罗兰酮(β -ionone)的合成,2 L发酵罐中 β -紫罗兰酮产量达到380 mg/L^[109]。在另外一项研究中,Lu等采用模块化途径工程的方法构建和优化了 β -紫罗兰酮代谢途径,以便构建解脂耶氏酵母高效细胞工厂。通过优化胞质乙酰辅酶A的供应,增加甲羟戊酸途径通量和 β -紫罗兰酮合成的3个模块,在3 L发酵罐中实现了 β -紫罗兰酮的最高产量0.98 g/L^[83]。利用亲水相互作用色谱-串联质谱技术,可定量工程化解脂耶氏酵母 α -紫罗兰酮生产菌株的生理反应和新陈代谢的瞬时变化。动态标记结果表明,在高细胞密度发酵下TCA循环活性受到抑制,从而导致生长阶段甲羟戊酸的溢流并在紫罗兰酮生产阶段被吸收^[110]。

萜类化合物生产的代谢工程研究表明,解脂耶氏酵母是一个潜在的合成植物萜类化合物的平台菌株。可以进一步通过更多的基因工具,如CRISPR/Cas9基因编辑技术和蛋白质工程,使解脂耶氏酵母的遗传操作更加高效和快速。

3.4 黄酮类和聚酮类等化合物合成

黄酮类化合物是苯丙类植物次生代谢物的一个多元化家族,广泛存在于水果、蔬菜、草药和植物中。药物研究和动物试验已经证明了它们具有预防衰老相关疾病活性的植物化学物质,包括治疗神经和心血管疾病、帕金森病和阿尔茨海默病等。Lv等测试了解脂耶氏酵母生产高价值类黄酮和羟基化类黄酮的潜力。他们通过模块化的构建和表征,来确定解脂耶氏酵母中黄酮类生物合成的限速步骤,在此基础上,优化查尔酮合酶模块和羟化酶模块,使工程菌

株利用葡萄糖产生252.4 mg/L柚皮素(naringenin)、134.2 mg/L雌黄醇(eriodyctiol)和110.5 mg/L黄衫素(taxifolin)^[111]。此外,Wei等在解脂耶氏酵母中同时表达木糖利用和柚皮素生物合成途径,以葡萄糖和木糖为底物产生柚皮素^[112]。利用木糖诱导型生物传感器控制柚皮素合成途径的构建实现了木糖作为底物和合成诱导剂的双重功能,将木糖的利用与柚皮素的生物合成结合在一起并提高了产量。在摇瓶培养水平,木糖诱导的柚皮苷产量可以达到715.3 mg/L。Palmer等通过表达过氧化物酶体基质蛋白PEX10调控 β -氧化,显著提高了柚皮素合成,产量达到898 mg/L,为解脂耶氏酵母合成柚皮素的最高产量^[113]。

在产油解脂耶氏酵母中柚皮素和脂质合成竞争相同的前体。近期,Lv等提出了通过将化学成瘾与负反馈调控相结合来提高代谢稳定性和产量的策略^[74]。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,使丙二酰辅酶A的代谢流重新分配以促进黄酮合成,并使柚皮素产量增加74.8%。此外,通过柚皮素调控的生物传感器来控制亮氨酸的合成,赋予细胞黄酮成瘾表型,从而使柚皮素产生菌株具有了生长优势。经过工程改造的酵母在324代中仍具有90.9%的柚皮素产量。没有黄酮类成瘾的细胞在经过300代以上的传代后恢复了生长适应性,但失去了94.5%的柚皮素产量。

聚酮化合物(polyketides, PKs)是微生物在重要的制药应用中产生的次级代谢产物,包括抗肿瘤药(如格尔德霉素、马贝霉素),免疫抑制剂(他克莫司、西罗莫司),并具有降低胆固醇(洛伐他汀、普伐他汀)能力,还具有抗生素(四环素、红霉素)和杀虫剂(多杀菌素)的特性。但是,这些生物活性代谢物的产量在天然宿主中通常较低,这主要是因为它们的生

物合成基因簇 (biosynthetic gene clusters, BGC) 大多是沉默的, 或者其起始底物有限。为了提高 PKs 的产量, 已经开发了多种策略, 包括对天然宿主进行代谢工程或在不同宿主中异源表达其 BGC^[115]。通常, 通过使用丙二酰辅酶 A 延伸单元, 乙酰辅酶 A 或丙酰基辅酶 A 的迭代缩合进行聚酮化合物的生物合成。TAL 不仅是一种重要的平台化合物, 它也是最简单的聚酮化合物, 常被用于评估底盘细胞的聚酮化合物潜能。Yu 等在解脂耶氏酵母过表达非洲茵 (*Gerbera hybrida*) 来源的 2-吡喃酮合酶基因生产 TAL。在氮限制的生长条件诱导脂质生物合成的同时增加了 TAL 产量。通过使用转座子来整合多拷贝的 2-吡喃酮合酶基因, 提高 TAL 生产水平。在氮受限的培养基中, TAL 产量为 2.6 g/L^[115]。在另外一项并行研究中, Liu 等利用乙酸吸收途径供应更多胞质乙酰辅酶 A, 并过表达内源性乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC1、苹果酸酶 MAE1 和细菌源胞质丙酮酸脱氢酶 PDH, 使得在摇瓶中以工业乙酸为底物时 TAL 的产量可达 4.76 g/L^[82]。之前一系列研究已经证明, 产油酵母解脂耶氏酵母是生产简单的聚酮化合物 TAL 的最佳宿主。

除了黄酮类化合物, 其他的芳香族化合物在医疗保健、食品工业、营养保健品补充剂和医药中间体等领域也被广泛应用, 拥有数 10 亿美元的全球市场。Gu 等解除了莽草酸途径中的限速步骤, 实现了解脂耶氏酵母为宿主的 5 种芳香族化合物的从头合成^[116]。作者发现消除氨基酸形成和改造 DAHP 合成酶解除反馈抑制是缓解前体竞争和莽草酸途径的反馈调节的关键步骤。异源磷酸转酮酶的过表达和丙酮酸激酶的缺失, 进一步将 4-磷酸赤藓糖和磷酸烯醇丙酮酸引导进入莽草酸途径。利用该底盘细胞, 合成了 2 426 mg/L 的 2-苯基乙醇, 593 mg/L 的

对香豆酸, 12 mg/L 的白藜芦醇, 366 mg/L 的紫色杆菌素和 55 mg/L 的脱氧紫色杆菌素。这项工作为解脂耶氏酵母中莽草酸途径衍生物的生产提供了可能性。随后, 同一课题组发现 Ehrlich 途径的选择性和 2-酮戊二酸的量是 2-苯基乙醇 (2-phenylethanol, 2-PE) 高效生产的限制因素^[117]。作者通过逐步重构的方式确定了 Ehrlich 途径的最佳催化模块, 构建胞质 α -酮戊二酸途径, 改造二羧酸转运蛋白以提高 α -酮戊二酸的利用。结合阻断前体竞争途径并减轻脂肪酸合成等策略, 使 2-苯基乙醇的产量达到 2 669.5 mg/L。与之类似地, Shang 等增强解脂耶氏酵母莽草酸途径用于糖苷类化合物熊果苷 (arbutin) 的生物合成。发现 DAHP 合酶的高水平表达对熊果苷合成至关重要, 经优化熊果苷产量达到 8.6 g/L^[118]。Sáez-Sáez 等解除莽草酸代谢相关基因的反馈抑制, 同时在基因组整合 5 个拷贝的异源白藜芦醇 (resveratrol) 合成途径, 使白藜芦醇产量达到 12.4 g/L, 是迄今为止报道的微生物从头合成白藜芦醇最高产量^[119]。上述研究表明, 解脂耶氏酵母是合成聚酮、黄酮及其他芳香族化合物的优良底盘, 如在解脂耶氏酵母中合成 TAL、白藜芦醇等产物的产量, 远高于利用其他微生物合成的产量, 说明充足的前体供应对于产物合成的重要性。

3.5 其他种类天然产物

甾醇由于其重要的生物活性而受到越来越多的关注。产油酵母解脂耶氏酵母具有较大的脂滴, 可为积累的一类固醇化合物提供储存。在最近的研究中, Qian 等研究了脂质含量与菜油甾醇积累之间的关系, 发现菜油甾醇 (campesterol) 主要存在于解脂耶氏酵母脂滴中^[120]。通过过表达 2 个拷贝的 7-脱氢胆固醇还原酶 (7-dehydrocholesterol reductase, dhcr7), 进一步促进了菜油甾醇积累。使用 5 L 生物反应器获

得的最大菜油甾醇产量为 837 mg/L。

中链和长链甲基酮是脂肪酸衍生的化合物，可用作生物燃料混合剂，调味剂和香料。最近，Hanko 等利用解脂耶氏酵母固有的高通量脂肪酸 β -氧化途径，生产长链和非常长链的甲基酮 (methyl ketones)^[121]。通过缺失 *Pot1* 基

因以截断过氧化物酶体中 β -氧化反应，导致 C13-C23 范围内的饱和、单不饱和和二不饱和甲基酮的生物合成。最后，通过额外过表达异源细菌甲基酮生物合成途径的和靶向过氧化物酶体，在最佳条件下进行生物反应器培养可产生 314.8 mg/L 的总甲基酮产量。

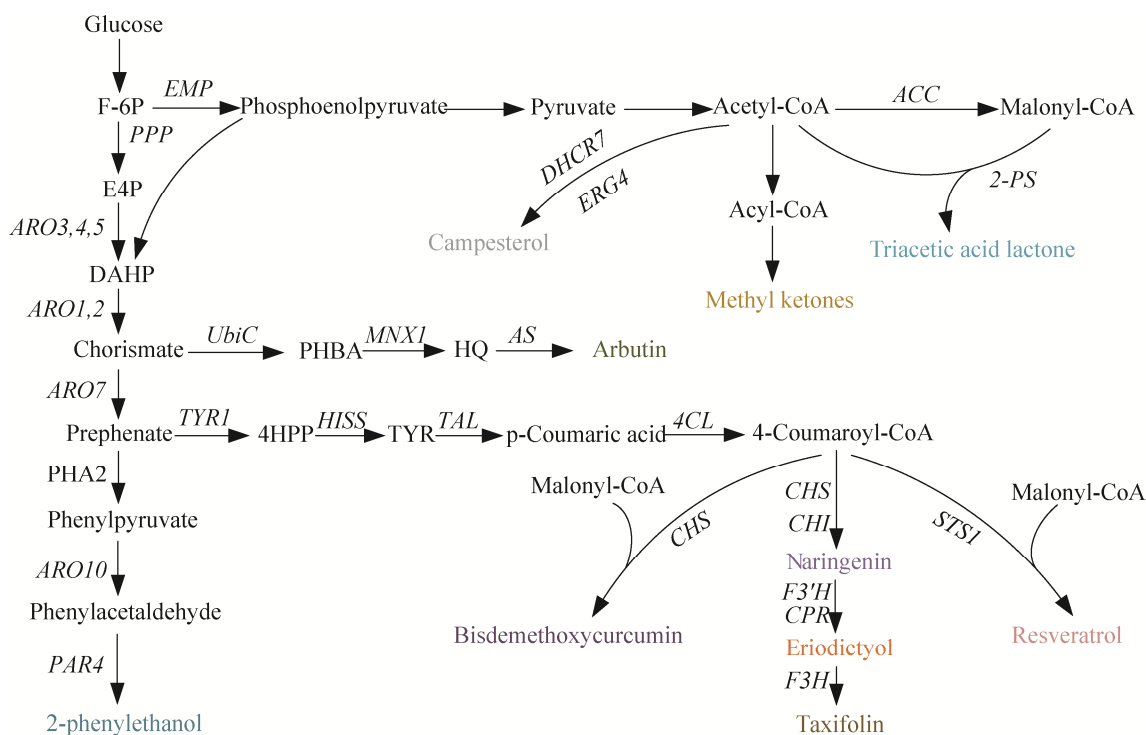


图 5 黄酮类及芳香族衍生物的生物合成途径 E4P: 赤藓糖-4-磷酸; DAHP: 3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖-7-磷酸; PHBA: 对羟基苯甲酸; HQ: 对苯二酚; Tyr: 酪氨酸; ACC: 乙酰辅酶A羧化酶; ARO: 五功能芳香族化合物合成相关蛋白; PHA2: 苯甲酸酯脱水酶; PAR4: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; 2-PS: 2-吡喃酮合酶; DHCR7: 7-脱氢胆固醇还原酶; ERG4: C-24 固醇还原酶; UbiC: 分支酸丙酮酸裂解酶; MNX1: 4-羟基苯甲酸酯 1-羟化酶; AS: 对苯二酚葡萄糖基转移酶; TYR1: 苯甲酸脱氢酶; TAL: 酪氨酸解氨酶; 4CL: 4-香豆酸-辅酶A连接酶; CHS: 查尔酮合成酶; CHI: 查尔酮异构酶; F3'H: 类黄酮 3'-羟化酶; CPR: 细胞色素 P450 还原酶; F3H: 黄烷酮 3-羟化酶; STS1: 白藜芦醇合酶

Figure 5 Biosynthetic pathway of flavonoids and aromatic derivatives. E4P: erythrose-4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptanose-7-phosphate; PHBA: p-hydroxybenzoic acid; HQ: hydroquinone; Tyr: tyrosine; ACC: acetyl-CoA carboxylase; ARO: pentafunctional AROM polypeptide; PHA2: prephenate dehydratase; PAR4: phenylacetaldehyde reductases; 2-PS: 2-pyrone synthase; DHCR7: 7-dehydrocholesterol reductase; ERG4: delta24(24(1))-sterol reductase; UbiC: chorismate pyruvate-lyase; MNX1: 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase; AS: hydroquinone glycosyltransferase; TYR1: benzoate dehydrogenase; TAL: tyrosine ammonia lyase; 4CL: 4-coumaric acid-CoA ligase; CHS: chalcone synthase; CHI: chalcone isomerase; F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase; CPR: cytochrome P450 reductase; F3H: flavanone 3-hydroxylase; STS1: resveratrol synthase.

表 1 代谢工程改造解脂耶氏酵母合成天然产物策略汇总

Table 1 The summary of the metabolic engineering strategies to synthesize the natural products in *Y. lipolytica*

Products	Strains	Engineering strategies	Carbon sources	Medium	Fermentation	Titers	References
Lipids							
EPA	ATCC#20362	Δ -9 pathway; Δ -12, Δ -8, Δ -5, Δ -17 desaturase gene; Δ -9 elongase gene; ▲PEX10;	Glucose	Synthetic medium	Shake flasks	56.6% of the TFA (by weight)	[34]
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12-CLA Terpenes	Polh	FADS12, d12; opai	Glucose, Soybean oil	Synthetic medium	Fermenter	10.0% of total fatty acids; 44.0% of total fatty acids	[88]
α -farnesene	Polh	tHMG1, IDI, ERG20, OptFS	Glucose	Synthetic medium	Fermenter	260.0 mg/L	[91]
α -farnesene	Polf	MVA pathway; α -FS	Glucose	Rich medium	Fed-batch fermentation	25.5 g/L	[92]
(+)-nocaketone	ATCC 201249	CrtVS, opCYP706M1, opAtCPR1	Glucose	Rich medium	Shake flasks	978.2 μ g/L	[93]
Amorphadiene	Polg	MVA pathway, HMG-CoA; ADS, HMG1; POT1, PAT1	Glucose	Synthetic medium	Shake flasks	171.5 mg/L	[94]
Limonene	Polf	NDPS1, LS; MVA pathway	Glucose	Rich medium	Shake flasks	23.6 mg/L	[96]
Limonene	W29-derived ST6512	MVA pathway; LS	Glucose	Rich medium	Shake flasks	35.9 mg/L	[97]
Limonene	Polf	LS, NDPS1	Glycerol, citric acid	Rich medium	Bioreactor	165.3 mg/L	[98]
Astaxanthin	GB20	CrtYB, CrtI; ↓SQS1; CrtW, CrtZ	Glucose	Rich medium	Deep-well plate	54.6 mg/L	[107]
Astaxanthin	ST6899	CrtE, GGPPs7; CrtW, HpBKT; HpCrtZ	Glucose	Rich medium	Fed-batch fermentation	285.0 mg/L	[108]
Oleanolic acid	ATCC 201249	MVA pathway; CYP716A12, ATR1	Glucose	Rich medium	Fermenter	540.7 mg/L	[99]
Betulinic acid	ATCC 201249	CYP-CPR; ERG1, ERG9, HMG1; EMC, EMT, Rtme, Gape; ACL1/2; β -oxidation pathway	Glucose	Rich medium	Shake flasks	51.8 mg/L	[100]

(待续)

(续表 1)

Products	Strains	Engineering strategies	Carbon sources	Medium	Fermentation	Titer	References
Protopanaxadiol	ATCC 201249	XR, XDH, yIXKS; tHMG1, ERG9, ERG20; TAL, TKL, TX	Xylose	Rich medium	Fermenter	300.0 mg/L	[101]
Lupeol	ATCC 201249	OLE1, PAH1, DGK1; HMG1, ERG9, ERG1	Glucose	Rich medium	Shake flasks	411.7 mg/L	[102]
Lycopene	PoIf	MVA pathway; HMG1, CrtI, MVD1, EGR8, CrtB, CrtE	Glucose	Rich medium	Bioreactor	21.1 mg/g DCW	[103]
Lycopene	PoIf	CrtB, CrtI, CrtE; HMG-CoA, IDI, HMG; ACL1/2, AMPD; GPDI, DGAI/2	Glucose	Synthetic medium	Bioreactor	(46.0–60.0) mg/g DCW	[104]
Lycopene	PoIf	CHK, IPK; CrtE, CrtB; CrtI; ACC1, DGAI; IDI, ERG20	Glucose, palmitic acid	Synthetic medium	Bioreactor	4.2 g/L	[105]
β -carotene	ATCC MYA2613	CarRP, CarB; HMGR1, GGS1; ERG8/10/12/13/19/20	Glucose	Rich medium	Bioreactor	4.0 g/L	[35]
β -carotene	PoId	GGs1, HMG1, CarB, CarRP	Glucose	Rich medium	Fed-batch fermentation	6.5 g/L	[106]
β -ionone	PoIf	MVA pathway; CarB, CarRP; CCD1	Glucose, glycerol	Rich medium	Fermenter	380.0 mg/L	[109]
β -ionone	PoIf	CarB, CarRP, CCD1; MVA pathway; PK, PTA	Glucose	Rich medium	Fed-batch fermentation	1.0 g/L	[83]
α -ionone	WT(CLIB138)	LSLCYe, OfCCDI	Glucose, ethanol, MVA	Rich medium	Bioreactor	(408.0±50.0) mg/L	[110]
Flavonoids and polyketides							
Naringenin, eriodictyol, taxifolin	PoIf	GhF3'H, YIAR01; RfTAL, Pe4CL, PhCHS, MsCHI, EcACS, CgACC, YICPR, YIACS2, ScCPR1	Glucose	Synthetic medium	Fed-batch fermentation	252.4 mg/L naringenin, 134.2 mg/L eriodictyol, 110.5 mg/L taxifolin	[111]
Naringenin	PoIf	TAL, CHS, CHI, 4CL; \blacktriangle DGAI; XDH, XKS, XT, XR	Glucose, Xylose	Rich medium	Shake flasks	(715.3±12.8) mg/L	[112]

(待续)

(续表 1)

Products	Strains	Engineering strategies	Carbon sources	Medium	Fermentation	Titer	References
Naringenin	Po1f	PEX10, ACC1; Nt4CL, HsPKS1, PEX10, OsCUS, Aro4(K221L)	Glucose	Synthetic medium	Bioreactor	898.0 mg/L	[113]
Triacetic acid lactone	W29/CLIB89	2-PS	Glucose	Synthetic medium	Bioreactor	2.6 g/L	[115]
Triacetic acid lactone	W29	ACC1, MAE1, PDH; GH2PS	Glucose, acetic acid	Synthetic medium	Shake flasks	4.8 g/L	[82]
Triacetic acid lactone	Po1f	g2ps1, ACC1; PDH complex PDC, ACS, ALD; PEX10	Glucose, Sodium acetate	Synthetic medium	Bioreactor	(35.9±3.9) g/L	[81]
2-PE	Po1g	yIARO10, yIPAR4, yIPHA2, yIARO7; ScARO7G141S; yIARO1/2; scARO4K229L, AroGS180F; yIARO10; ADH, PAR4; ▲ALD2/3, PHA2, yIDGA1/2; CitB, yIIDP2, yODC1	Glucose	Rich medium	Shake flasks	2 426.2 mg/L	[116]
2-PE	Po1g	yIARO10; ADH, PAR4; ▲ALD2/3, PHA2, yIDGA1/2; CitB, yIIDP2, yODC1	Glucose	Synthetic medium	Shake flasks	2 669.5 mg/L	[117]
Arbutin	Po1f	UbiC, MNX1, AS; DHS1/2	Glucose	Rich medium	Bioreactor	(8.6±0.7) g/L	[118]
Resveratrol	ST6512	TAL, 4CL, VST1; ARO4, ARO7; ▲PDC5	Glucose	Rich medium	Fed-batch bioreactor	(12.4±0.3) g/L	[119]
Other natural products							
Campesterol	Po1f	dher7; ▲ERG5	Glucose	Synthetic medium	Bioreactor	837.0 mg/L	[120]
Methylketone	Po1f	▲po1t; ACO, FadB, FadM-SKL	Glucose	Rich medium	Bioreactor	314.8 mg/L	[121]

4 讨论

与酿酒酵母、大肠杆菌和其他模型宿主相比,解脂耶氏酵母具有卓越的代谢能力,可以生产大量的燃料、油脂化学物质和天然产品。同样地,工业上的一些有利特性,包括对化学物质的耐受,高蛋白的生产和分泌能力,使解脂耶氏酵母成为一个有吸引力的真菌宿主。近年来,合成生物学工具的开发和代谢工程快速发展,极大地促进了解脂耶氏酵母合成各种天然产物的发展。新的遗传标记、表达载体、基因编辑工具、代谢调控元件被开发出来,用于天然产物合成底盘的构建。而通过正交的生物合成途径的开发、乙酰辅酶 A 等供应策略的应用、蛋白质工程、脂质工程等的应用,也极大地提高了解脂耶氏酵母各种重要产物合成的能力。尽管如此,利用解脂耶氏酵母生产天然产物依然面临诸多挑战,需要进一步提高转化效率、构建新的遗传工具、全面实施和利用 CRISPR/Cas9,以及开发更多代谢网络模型。此外,异源蛋白的表达活性低,固有代谢途径调控困难,内源途径和异源途径难以适配等问题也限制了产量的提高。

针对这些问题,未来可以利用细胞器工程、辅因子工程、多酶复合体的组装等策略,进一步提高解脂耶氏酵母天然产物合成的能力。研究表明,代谢途径的亚细胞定位可以为复杂的生物合成途径提供合适的环境和足够的前体或酶,比如过氧化物酶体的区域化生产^[122]。过氧化物酶体是脂肪酸发生 β -氧化的主要部位,能够提供更多乙酰辅酶 A,被其他途径利用,是一种很有前途的生产天然产物的亚细胞工厂。

此外,一直以来细胞工厂构建主要集中在前体供应、酶工程、通量平衡等方面。然而,辅因子往往被忽视。特别是许多天然产物生物

合成的催化酶都需要特定的辅因子,而异源宿主酵母的辅因子供应不足。虽然已有一些辅因子工程的策略被提出,但人们对细胞辅因子平衡的调控机制仍知之甚少。另一方面,不同生物之间辅因子的生物合成和调控变化对细胞工厂的辅因子工程提出了巨大的挑战。因此,阐明辅因子在解脂耶氏酵母中的生物合成、分布和运输是辅助因子调控的关键。

除了常规代谢工程策略外,还可以运用其他策略,包括:构建多酶复合物、开发有毒化合物外排的有效转运系统、调控脂质含量和细胞形态等,也有助于提高天然产物的生产。综上所述,随着更多的工程技术手段和遗传工具的开发,解脂耶氏酵母作为平台菌株进行天然产物生物合成的巨大潜力将进一步被挖掘出来。

REFERENCES

- [1] Walker RSK, Pretorius IS. Applications of yeast synthetic biology geared towards the production of biopharmaceuticals. *Genes (Basel)*, 2018, 9(7): 340.
- [2] Fickers P, Cheng HR, Sze Ki Lin C. Sugar alcohols and organic acids synthesis in *Yarrowia lipolytica*: where are we? *Microorganisms*, 2020, 8(4): 574.
- [3] Miller KK, Alper HS. *Yarrowia lipolytica*: more than an oleaginous workhorse. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(23/24): 9251-9262.
- [4] Spencer J, Ragout de Spencer A, Laluec C. Non-conventional yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(2): 147-156.
- [5] Beopoulos A, Desfougeres T, Sabirova J, et al. The hydrocarbon-degrading oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Handb Hydrocarbon Lipid Microbiol*, 2010, 2010: 2111-2121.
- [6] Thevenieau F, Beopoulos A, Desfougeres T, et al. Uptake and assimilation of hydrophobic substrates by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Handb Hydrocarbon Lipid Microbiol*, 2010, 2010: 1513-1527.
- [7] Chen R, Yang S, Zhang L, et al. Advanced strategies for production of natural products in yeast. *iScience*,

- 2020, 23(3): 100879.
- [8] Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, et al. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit Rev Microbiol*, 2014, 40(3): 187-206.
- [9] Fröhlich-Wyder MT, Arias-Roth E, Jakob E. Cheese yeasts. *Yeast*, 2019, 36(3): 129-141.
- [10] Sutherland JB, Cornelison C, Crow SA Jr. *CANDIDA | Yarrowia lipolytica (Candida lipolytica)*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Amsterdam: Elsevier, 2014: 374-378.
- [11] Barth G, Gaillardin C. *Yarrowia lipolytica*. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996: 313-388.
- [12] Barth G, Gaillardin C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, 19(4): 219-237.
- [13] Thevenieau F, Nicaud JM, Gaillardin C. Applications of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast Biotechnol: Divers Appl*, 2009, 2009: 589-613.
- [14] Pérez-Campo FM, Domínguez A. Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol*, 2001, 43(6): 429-433.
- [15] Juretzek T, Wang HJ, Nicaud JM, et al. Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of β -galactosidase in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2000, 5(5): 320-326.
- [16] Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol*, 2004, 109(1/2): 63-81.
- [17] Madzak C, Beckerich JM. (2013) Heterologous protein expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G. (eds) *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology Monographs*, vol 25. Berlin: Springer Press, 2013: 1-76.
- [18] Madzak C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(11): 4559-4577.
- [19] Dujon B, Sherman D, Fischer G, et al. Genome evolution in yeasts. *Nature*, 2004, 430(6995): 35-44.
- [20] Madzak C, Tréton B, Blanchin-Roland S. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2000, 2(2): 207-216.
- [21] Madzak C. New tools for heterologous protein production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Pandalai SG (ed). *Recent Research Developments in Microbiology*. Trivandrum: Research Signpost, 2003: 453-479.
- [22] Lazar Z, Rossignol T, Verbeke J, et al. Optimized invertase expression and secretion cassette for improving *Yarrowia lipolytica* growth on sucrose for industrial applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40(11): 1273-1283.
- [23] Yan J, Han B, Gui X, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to simultaneously produce lipase and single cell protein from agro-industrial wastes for feed. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 758.
- [24] Bankar AV, Kumar AR, Zinjarde SS. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(5): 847-865.
- [25] Żogała B, Robak M, Rymowicz W, et al. Geoelectrical observation of *Yarrowia lipolytica* bioremediation of petrol contaminated soil. *Pol J Environ Stud*, 2005, 14: 665-669.
- [26] Barth G, Weber H. Genetic studies on the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. Inactivation and mutagenesis. *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie*, 1983, 23(3): 147-157.
- [27] Xie D, Jackson EN, Zhu Q. Sustainable source of *Omega-3* eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(4): 1599-1610.
- [28] Guo HW, Su SJ, Madzak C, et al. Applying pathway engineering to enhance production of alpha-ketoglutarate in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(23): 9875-9884.
- [29] Yovkova V, Otto C, Aurich A, et al. Engineering the α -ketoglutarate overproduction from raw glycerol by overexpression of the genes encoding NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(5): 2003-2013.
- [30] Förster A, Aurich A, Mauersberger S, et al. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of

- the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(6): 1409-1417.
- [31] Park JN, Song Y, Cheon SA, et al. Essential role of YIMPO1, a novel *Yarrowia lipolytica* homologue of *Saccharomyces cerevisiae* MNN4, in mannosylphosphorylation of N- and O-linked glycans. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(4): 1187-1195.
- [32] Moon HY, Van TL, Cheon SA, et al. Cell-surface expression of *Aspergillus saitoi*-derived functional α -1, 2-mannosidase on *Yarrowia lipolytica* for glycan remodeling. J Microbiol, 2013, 51(4): 506-514.
- [33] De Pourcq K, Tiels P, Van Hecke A, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce glycoproteins homogeneously modified with the universal Man3GlcNAc2 N-glycan core. PLoS One, 2012, 7(6): e39976.
- [34] Xue ZX, Sharpe PL, Hong SP, et al. Production of *Omega*-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 734-740.
- [35] Gao S, Tong Y, 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.
- [36] Le Dall MT, Nicaud JM, Gaillardin C. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Curr Genet, 1994, 26(1): 38-44.
- [37] Bredeweg EL, Pomraning KR, Dai Z, et al. A molecular genetic toolbox for *Yarrowia lipolytica*. Biotechnol Biofuels, 2017, 10: 2.
- [38] Holkenbrink C, Dam MI, Kildegaard KR, et al. EasyCloneYALI: CRISPR/Cas9-based synthetic toolbox for engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Biotechnol J, 2018, 13(9): e1700543.
- [39] Wagner JM, Williams EV, Alper HS. Developing a piggyBac transposon system and compatible selection markers for insertional mutagenesis and genome engineering in *Yarrowia lipolytica*. Biotechnol J, 2018, 13(5): e1800022.
- [40] Hamilton M, Consiglio AL, MacEwen K, et al. Identification of a *Yarrowia lipolytica* acetamidase and its use as a yeast genetic marker. Microb Cell Fact, 2020, 19(1): 22.
- [41] Edwards H, Yang Z, Xu P. Characterization of Met25 as a color associated genetic marker in *Yarrowia lipolytica*. Metab Eng Commun, 2020, 11: e00147.
- [42] Vernis L, Abbas A, Chasles M, et al. An origin of replication and a centromere are both needed to establish a replicative plasmid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Mol Cell Biol, 1997, 17(4): 1995-2004.
- [43] Liu L, Otoupal P, Pan A, et al. Increasing expression level and copy number of a *Yarrowia lipolytica* plasmid through regulated centromere function. FEMS Yeast Res, 2014, 14(7): 1124-1127.
- [44] Lopez C, Cao MF, Yao ZY, et al. Investigating the role of noncoding regulatory DNA in plasmid development for *Yarrowia lipolytica*. Authorea 2020. DOI:10.22541/au.160691063.38058320/v1
- [45] Dulermo R, Brunel F, Dulermo T, et al. Using a vector pool containing variable-strength promoters to optimize protein production in *Yarrowia lipolytica*. Microb Cell Fact, 2017, 16(1): 31.
- [46] Guo ZP, Borsenberger V, Croux C, et al. An artificial chromosome yIAC enables efficient assembly of multiple genes in *Yarrowia lipolytica* for biomanufacturing. Commun Biol, 2020, 3(1): 199.
- [47] Cui Z, Zheng H, Jiang Z, et al. Identification and characterization of the mitochondrial replication origin for stable and episomal expression in *Yarrowia lipolytica*. ACS Synth Biol, 2021, 10(4): 826-835.
- [48] Verbeke J, Beopoulos A, Nicaud JM. Efficient homologous recombination with short length flanking fragments in Ku70 deficient *Yarrowia lipolytica* strains. Biotechnol Lett, 2013, 35(4): 571-576.
- [49] Bordes F, Fudalej F, Dossat V, et al. A new recombinant protein expression system for high-throughput screening in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J Microbiol Methods, 2007, 70(3): 493-502.
- [50] Davidow LS, Dezeew JR. Procédé pour la transformation de *Yarrowia lipolytica*: EP, EP0138508 B1. 1992.
- [51] Lv Y, Edwards H, Zhou JW, et al. Combining 26s rDNA and the Cre-loxP system for iterative gene integration and efficient marker curation in *Yarrowia lipolytica*. ACS Synth Biol, 2019, 8(3): 568-576.
- [52] Fickers P, Le Dall MT, Gaillardin C, et al. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J Microbiol Methods, 2003, 55(3): 727-737.
- [53] 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.
- [54] Tsakraklides V, Brevnova E, Stephanopoulos G, et al. Improved gene targeting through cell cycle synchronization. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133434.
- [55] Ji Q, Mai J, Ding Y, et al. Improving the homologous recombination efficiency of *Yarrowia lipolytica* by grafting heterologous component from *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng Commun*, 2020, 11: e00152.
- [56] Gao J, Gao N, Zhai X, et al. Recombination machinery engineering for precise genome editing in methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. *iScience*, 2021, 24(3): 102168.
- [57] Cui ZY, Jiang X, Zheng HH, et al. Homology-independent genome integration enables rapid library construction for enzyme expression and pathway optimization in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(2): 354-363.
- [58] Bai QY, Cheng S, Zhang JL, et al. Establishment of genomic library technology mediated by non-homologous end joining mechanism in *Yarrowia lipolytica*. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(12): 2114-2128.
- [59] Cui ZY, Zheng HH, Zhang JH, et al. A CRISPR/Cas9-mediated, homology-independent tool developed for targeted genome integration in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*, 2021, 87(6): e02666-20.
- [60] 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.
- [61] Morse NJ, Wagner JM, Reed KB, et al. T7 polymerase expression of guide RNAs *in vivo* allows exportable CRISPR-Cas9 editing in multiple yeast hosts. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(4): 1075-1084.
- [62] Schwartz C, Cheng JF, Evans R, et al. Validating genome-wide CRISPR-Cas9 function improves screening in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng*, 2019, 55: 102-110.
- [63] Borsenberger V, Onésime D, Lestrade D, et al. Multiple parameters drive the efficiency of CRISPR/Cas9-induced gene modifications in *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Biol*, 2018, 430(21): 4293-4306.
- [64] Gao D, Smith S, Spagnuolo M, et al. Dual CRISPR-Cas9 cleavage mediated gene excision and targeted integration in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol J*, 2018, 13(9): e1700590.
- [65] Yang Z, Edwards H, Xu P. CRISPR-Cas12a/Cpf1-assisted precise, efficient and multiplexed genome-editing in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng Commun*, 2020, 10: e00112.
- [66] Ramesh A, Ong T, Garcia JA, et al. Guide RNA engineering enables dual purpose CRISPR-Cpf1 for simultaneous gene editing and gene regulation in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(4): 967-971.
- [67] Wong L, Engel J, Jin E, et al. YaliBricks, a versatile genetic toolkit for streamlined and rapid pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng Commun*, 2017, 5: 68-77.
- [68] Blazeck J, Liu L, Redden H, et al. Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(22): 7905-7914.
- [69] Shabbir Hussain M, Gambill L, Smith S, et al. Engineering promoter architecture in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(3): 213-223.
- [70] Kamineni A, Chen SY, Chifamba G, et al. Promoters for lipogenesis-specific downregulation in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*, 2020, 20(5): foaa035.
- [71] Trassaert M, Vandermies M, Carly F, et al. New inducible promoter for gene expression and synthetic biology in *Yarrowia lipolytica*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 141.
- [72] Park YK, Korpys P, Kubiak M, et al. Engineering the architecture of erythritol-inducible promoters for regulated and enhanced gene expression in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*, 2019, 19(1): foy105.
- [73] Xiong XC, Chen SL. Expanding toolbox for genes expression of *Yarrowia lipolytica* to include novel inducible, repressible, and hybrid promoters. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(8): 2208-2213.
- [74] Lv Y, Gu Y, Xu J, et al. Coupling metabolic addiction with negative autoregulation to improve strain stability and pathway yield. *Metab Eng*, 2020, 61: 79-88.
- [75] Zhang JL, Peng YZ, Liu D, et al. Gene repression via multiplex gRNA strategy in *Y. lipolytica*. *Microb Cell Fact*, 2018, 17(1): 62.

- [76] 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): e1700584.
- [77] Muhammad A, Feng X, Rasool A, et al. Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Adv*, 2020, 43:107555.
- [78] Zeng SY, Liu HH, Shi TQ, et al. Recent advances in metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for lipid overproduction. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2018, 120(3): 1700352.
- [79] Ganesan V, Spagnuolo M, Agrawal A, et al. Advances and opportunities in gene editing and gene regulation technology for *Yarrowia lipolytica*. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 208.
- [80] Sun L, Alper HS. Non-conventional hosts for the production of fuels and chemicals. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 59: 15-22.
- [81] Markham KA, Palmer CM, Chwatko M, et al. Rewiring *Yarrowia lipolytica* toward triacetic acid lactone for materials generation. *PNAS*, 2018, 115(9): 2096-2101.
- [82] 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.
- [83] 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(1): 49.
- [84] Qiao K, Imam Abidi SH, Liu H, et al. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng*, 2015, 29: 56-65.
- [85] Liu LQ, Pan A, Spofford C, et al. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng*, 2015, 29: 36-45.
- [86] Qiao K, 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.
- [87] Ji XJ, Huang H. Engineering microbes to produce polyunsaturated fatty acids. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(4): 344-346.
- [88] Zhang BX, Chen HQ, Li M, et al. Genetic engineering of *Yarrowia lipolytica* for enhanced production of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 70.
- [89] Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, et al. Production of amorphaadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinin acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *PNAS*, 2012, 109(3): 655-656.
- [90] Ma YR, Wang KF, Wang WJ, et al. Advances in the metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for the production of terpenoids. *Bioresour Technol*, 2019, 281: 449-456.
- [91] 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.
- [92] Liu YH, Jiang X, Cui ZY, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for production of α -farnesene. *Biotechnol Biofuels*. 2019, 12:296.
- [93] Guo XY, Sun J, Li DS, et al. Heterologous biosynthesis of (+)-nootkatone in unconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem Eng J*, 2018, 137: 125-131.
- [94] Marsafari M, Xu P. Debottlenecking mevalonate pathway for antimalarial drug precursor amorphaadiene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng Commun*, 2020, 10: e00121.
- [95] Jongedijk E, Cankar K, Buchhaupt M, et al. Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(7): 2927-2938.
- [96] Cao X, Lv YB, Chen J, et al. Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 214.
- [97] Arnesen JA, Kildegaard KR, Cernuda Pastor M, et al. *Yarrowia lipolytica* strains engineered for the production of terpenoids. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 945.
- [98] 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 Bioprocess Eng*, 2019, 24(3): 500-506.
- [99] Li DS, Wu YF, Wei PP, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for heterologous oleanolic acid production. *Chem Eng Sci*, 2020, 218: 115529.
- [100] 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(1): 77.
- [101] Wu Y, Xu S, Gao X, et al. Enhanced protopanaxadiol production from xylose by engineered *Yarrowia lipolytica*. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 83.
- [102] Zhang JL, Bai QY, Peng YZ, et al. High production of triterpenoids in *Yarrowia lipolytica* through manipulation of lipid components. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 133.
- [103] Schwartz C, Frogue K, Misa J, et al. Host and pathway engineering for enhanced lycopene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2233.
- [104] Zhang XK, Nie MY, Chen J, et al. Multicopy integrants of crt genes and co-expression of AMP deaminase improve lycopene production in *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol*, 2019, 289: 46-54.
- [105] Luo Z, Liu N, Lazar Z, et al. Enhancing isoprenoid synthesis in *Yarrowia lipolytica* by expressing the isopentenol utilization pathway and modulating intracellular hydrophobicity. *Metab Eng*, 2020, 61: 344-351.
- [106] Larroude M, Celinska E, Back A, et al. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(2): 464-472.
- [107] Kildegaard KR, Adiego-Pérez B, Doménech Belda D, et al. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of astaxanthin. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(4): 287-294.
- [108] 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.
- [109] Czajka JJ, Nathenson JA, Benites VT, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce the aroma compound β -ionone. *Microb Cell Fact*, 2018, 17(1): 136.
- [110] Czajka JJ, Kambhampati S, Tang YJ, et al. Application of stable isotope tracing to elucidate metabolic dynamics during *Yarrowia lipolytica* α -ionone fermentation. *iScience*, 2020, 23(2): 100854.
- [111] Lv Y, Marsafari M, Koffas M, et al. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(11): 2514-2523.
- [112] Wei W, Zhang P, Shang Y, et al. Metabolically engineering of *Yarrowia lipolytica* for the biosynthesis of naringenin from a mixture of glucose and xylose. *Bioresour Technol*, 2020, 314: 123726.
- [113] Palmer CM, Miller KK, Nguyen A, et al. Engineering 4-coumaroyl-CoA derived polyketide production in *Yarrowia lipolytica* through a β -oxidation mediated strategy. *Metab Eng*, 2020, 57: 174-181.
- [114] Jin WB, Guo CJ. Boosting polyketides production in cell factories: shared target-pathway for pharmaceutical polyketides engineering. *Synth Syst Biotechnol*, 2020, 5(1): 35-36.
- [115] Yu J, Landberg J, Shavarebi F, et al. Bioengineering triacetic acid lactone production in *Yarrowia lipolytica* for pogostone synthesis. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(9): 2383-2388.
- [116] Gu Y, Ma JB, Zhu YL, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a chassis for *de novo* synthesis of five aromatic-derived natural products and chemicals. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(8): 2096-2106.
- [117] Gu Y, Ma JB, Zhu YL, et al. Refactoring Ehrlich pathway for high-yield 2-phenylethanol production in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(3): 623-633.
- [118] Shang Y, Wei W, Zhang P, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for enhanced production of arbutin. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(5): 1364-1372.
- [119] Sáez-Sáez J, Wang G, Marella ER, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for high-level resveratrol production. *Metab Eng*, 2020, 62: 51-61.
- [120] Qian YD, Tan SY, Dong GR, et al. Increased campesterol synthesis by improving lipid content in engineered *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(16): 7165-7175.
- [121] Hanco EKR, Denby CM, Sánchez i Nogué V, et al. Engineering β -oxidation in *Yarrowia lipolytica* for methyl ketone production. *Metab Eng*, 2018, 48: 52-62.
- [122] Dusséaux S, Wajn WT, Liu YX, et al. Transforming yeast peroxisomes into microfactories for the efficient production of high-value isoprenoids. *PNAS*, 2020, 117(50): 31789-31799.

(本文责编 陈宏宇)