



马克斯克鲁维酵母的遗传与生理特征

莫文娟, 郭超, 吕红*

复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海工业菌株工程技术研究中心, 上海 200438

* 联系人, E-mail: honglv@fudan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-13; 接受日期: 2016-02-03; 网络版发表日期: 2016-03-17

国家高技术研究发展计划(批准号: 2014AA021301, 2013AA102803B, 2012AA021501)和上海市科学技术委员会基地项目(批准号: 13DZ2252000)资助

摘要 马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)广泛存在于酸奶、水果、酸乳酒等环境中, 是食品安全级酵母, 在一个多世纪前被分离获得. 近 20 年来, 由于该酵母表现出的食品安全性、高生长速率、高生物量、耐高温等特征, 得到生产应用领域的关注. 本文从 *K. marxianus* 的基因组遗传特征、分类以及细胞生长、细胞壁组成、糖基化修饰等方面进行了综述, 以期系统认识和了解 *K. marxianus* 酵母.

关键词 马克斯克鲁维酵母, 基因组, 性别转换, 糖基化, 工业应用

马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)是食品安全级酵母, 近年来, 由于其食品安全性、高生长速率、高生物量、耐高温等特征, 越来越得到人们的关注. 早期的研究主要集中在对 *K. marxianus* 自身的生理表型特征的分析上, 近年来, 随着高通量测序技术的快速发展, 先后有 5 株 *K. marxianus* 完成了全基因组的测序分析, 为建立 *K. marxianus* 的生理表型特征与分子遗传特征之间的关联奠定了基础, 也为今后的遗传工程改造提供了分子遗传的理论依据. 为了更好地认识和工业应用 *K. marxianus*, 本文对该酵母的分类、早期研究获得的细胞生理特征以及近期的分子遗传研究进展进行了系统阐述.

1 *Kluyveromyces marxianus* 的来源、分类与命名

K. marxianus 是同宗配合的半子囊菌酵母

(homothallic hemiascomycete yeast), 在分类上位于真菌界(Fungi kingdom), 子囊菌门(Ascomycota), 酵母菌亚门(Saccharomycotina), 酵母纲(Saccharomycetes), 酵母目(Saccharomycetales), 酵母科(Saccharomycetaceae), 克鲁维属(*Kluyveromyces*). 属名 *Kluyveromyces* 是为纪念荷兰微生物学家 Albert Jan Kluyver (1888~1956); 而种名 *marxianus* 是为纪念其发现者 Marx(国籍已不可考), 他在 1888 年第一次从葡萄(*Vitis vinifera* L.)中分离得到该菌种.

K. marxianus 是克鲁维属的代表性物种^[1]. 该物种广泛存在于可食用的自然环境中, 并先后从这些环境中分离获得, 包括俄国的酸乳酒^[2]、酸马奶^[3]、酸奶^[4]、牛奶^[5]、水果^[6]及甘蔗(*Saccharum officinarum*)叶子^[6]等. 目前尚未见到有关 *K. marxianus* 致病性的报道. Khrisanfova^[3]对酸马奶的微生物进行种群分布及功能研究时发现, 酸马奶中 *K. marxianus* 和乳酸菌

引用格式: 莫文娟, 郭超, 吕红. 马克斯克鲁维酵母的遗传与生理特征. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 413–419

Mo W J, Guo C, Lv H. Review of *Kluyveromyces marxianus* genetic and physiological features. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 413–419, doi: 10.1360/N052016-00101

的同时存在对结核分支杆菌具有抗菌活性。因此,在中亚地区的肺结核患者常被建议饮食酸马奶。*K. marxianus* 像酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)一样也被认为是安全可食用的微生物,并先后得到美国食品药品监督管理局(US Food and Drug Administration, FDA)的 GRAS 认证([http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices &id=88](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=88)), 欧盟食品安全监督局(European Food Safety Authority, EFSA)的 QPS 认证 (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/923.htm>); 2013 年被中国国家卫生和计划生育委员会批准为新食品原料 (<http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201401/bca788aead084936b9ef04f99ad5a2b8.shtm>), 是可以引入到食物链或作食品添加剂或食物酶的微生物。其食品安全认证包括: 无食品毒素、无表面活性剂活性、以及无肠道毒素活性。

K. marxianus 被分离后, 由于当时缺乏严格的菌株物种鉴定标准, 曾经有多个不同名称, 包括 *Saccharomyces fragilis*^[6], *Zygosaccharomyces marxianus*^[6], *Kluyveromyces polysporus*^[7], *Kluyveromyces bulgaricus*, *Kluyveromyces cicerisporus*, *Kluyveromyces fragilis*, 以及 *Kluyveromyces wikenii* 等. 直到 1998 年, Kurtzman 和 Fell^[8]通过分析群体遗传结构、杂交能力等作为分类标准, 明确了 *Kluyveromyces marxianus* 物种的一致性, 才把它们统一归为 *K. marxianus*.

2003年, 美国人 Kurtzman 和 Robnett^[9]依据多基因序列分析, 包括 rDNA 基因(18S, 26S, ITS)、单拷贝核基因(translation elongation factor 1alpha, actin-1 RNA polymerase II)、以及线粒体编码的基因(cytochrome oxidase II)组成一条“super gene”, 重新构建了 *Kluyveromyces* 属的酵母进化树^[10]。如图 1 所示, *Kluyveromyces* 属的酵母可分为 6 个进化上的分支, 把 *Kluyveromyces* 属的酵母分为 6 个种。已有的细胞功能研究表明, *K. marxianus* 在种内存在很大的生理代谢差异, 包括生长速度、耐温性, 以及分泌能力等, 具有较高的种内多样性^[11]。同在酵母科下的 *Kluyveromyces* 属与 *Saccharomyces* 属中的菌株, 其生理性质较为相近, 都能利用葡萄糖发酵酒精, 且生长形态相似^[12]。但 *Kluyveromyces* 属的酵母具有 Kluyver 效应, 即在需氧条件下能利用糖(如蔗糖、麦芽糖)生长, 糖主要进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA), 而不是酒精发酵, 而在氧气受限时不生长^[12]。

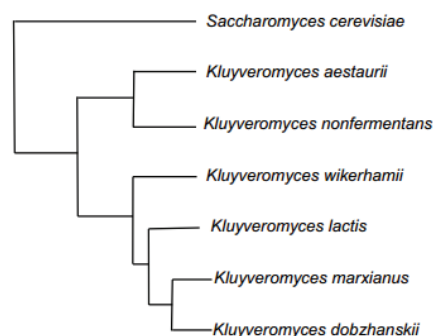


图 1 *Kluyveromyces* 属的进化分析^[9,10]

Saccharomyces 属的酵母具有 Crabtree 效应, 即在有氧或无氧生长时, 更偏好于将葡萄糖发酵成酒精。

2 *K. marxianus* 的基因组特征与性别转换

K. marxianus 的基因组全长约 11.0 Mb, 有 8 条核染色体, 最小是 0.9 Mb, 最大是 1.7 Mb, 以及一个大小约 46 kb 的线粒体基因组^[13]. 全基因组预测含有 4952 个编码蛋白的基因(基因平均长度是 1.5 kb), 其中 98% 不含有内含子. 另外有 202 个 tRNA 基因. 有 422 个基因仅在 *K. marxianus* 与乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 中含有, 可能与属的特异性有关; 而 193 个基因仅在 *K. marxianus* 中含有, 可能与种的特异性有关^[13]. 目前已经报道了 5 株 *K. marxianus* 的全基因序列, 并进行了功能注释, 包括 *K. marxianus* KCTC 17555^[14], DMB1^[15], CCT 7735^[5], DMKU 3-1042^[13], 以及 NBRC1777^[16]. 但对 *K. marxianus* 的比较功能基因组的研究至今未见报道.

此外, 研究人员对 *K. marxianus* 在特定环境条件下的基因表达进行了转录组分析^[13,17]. *K. marxianus* 具有耐高温的生理特征, 研究人员对该酵母在 45℃ 和 30℃ 条件下生长时的基因表达进行了转录组分析^[13], 发现在 45℃ 条件下, 负责还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (reductive nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 生成的戊糖磷酸途径中的基因有明显上调, 提示 NADPH 的大量产生, 提高了细胞抗氧化能力, 可能是 *K. marxianus* 耐高温的主要原因^[13]. *K. marxianus* 表达菊粉酶, 且能够产乙醇, 添加不同浓度的菊粉会影响其菊粉酶的表达量和乙醇产量, 针对这一特征, Gao 等人^[17]分析了 *K. marxianus* 在不同菊粉浓度下的基因转录谱, 发现参

与抗氧化压力的基因上调, 以及葡萄糖抑制的消除, 可能是细胞高活力及菊粉酶高表达的主要原因. 以上研究从转录组水平初步揭示了 *K. marxianus* 生理特征的遗传基础.

K. marxianus 在自然界中既能以单倍体细胞存在又能以二倍体形式存在, 其营养增殖(即无性繁殖)都是出芽方式. *K. marxianus* 单倍体细胞有两种不同性别, 即交配型 a(mating-type a, MATa)型与交配型 α (mating-type α , MAT α)型. 其二倍体能被诱导发生减数分裂形成 4 个单倍体孢子, 由子囊包裹, 子囊外周没有其他纲真菌所带有的子囊壳. 2011 年, Lane 等人^[11]率先鉴定了 *K. marxianus* 基因组上的性别基因. 他们利用 *K. lactis* 的同源基因, 找到了 *K. marxianus* 基因组上的交配型位点, 即异染色质交配位点左(heterochromatin mating left, HML)、异染色质交配位点右(heterochromatin mating right, HMR)及 MAT 位点. 发现在 MAT 位点上分别编码了 Mata1, Mata2, Mat α 1, Mat α 2 及 Mat α 3 蛋白, 因此 MATa 和 MAT α 基因大小不同. 通过对 MAT 位点性别位点的 PCR 分析, 可以鉴定 *K. marxianus* 的性别和倍型^[11]. 即 PCR 产物仅有一个电泳条带, 则是单倍体, 有两个电泳条带, 则是二倍体. 依据条带的大小可以鉴定是 MATa 型或 MAT α . Lane 等人^[11]分析了来源于奶制品、土壤、植物及水果的 13 株 *K. marxianus* 菌株的性别, 发现 3 株是二倍体, 7 株是 MATa 型单倍体, 2 株是 MAT α 型单倍体. 这一结果是否意味着在自然界中 KM 更多地以单倍体形式存在, 还需要进行更多的性别和倍型的分析.

K. marxianus 也像 *S. cerevisiae* 一样在同宗配合时发生性别转换. 在 *K. marxianus* 单倍体细胞的克隆集落中, 有一部分细胞会发生性别转换, 变成另一种性别, 两种不同性别的单倍体细胞发生交配融合, 形成杂合子二倍体^[11]. 在 *S. cerevisiae* 中已经发现了其同宗配合时的性别转换机制, 是由同宗配合转换核酸内切酶(homothallic switching endonuclease, HO)基因编码的内切核酸酶介导的, 内切核酸酶 HO 将位于异染色质区 HML 或 HMR 位点上的备选性别基因切下, 替换了 MAT 活性位点的性别基因(MATa 型或 MAT α 型), 实现了在 *S. cerevisiae* 中的性别转换^[18]. 在 *K. lactis* 中采取的性别转换机制与 SC 中不同^[19], 其 HO 已退化成假基因. 在 *K. lactis* 的 MAT α 位点引入了新基因 MAT α 3, 编码了一个转座酶, 具有 DNA

酶的功能. *K. lactis* 在发生性别转换时, DNA 结合蛋白 Mts1 高表达, 与 MATa 位点及 MAT α 位点结合, 然后招募 DNA 剪切酶对 MAT 位点进行切割, 造成 DNA 损伤, 通过同源重组修复, 完成性别转换^[19]. 在 MAT α 型到 a 型的性别转换中, 需要转座酶 α 3 蛋白, 完成切割 DNA 的作用. 在 MATa 型到 α 型的性别转换中, 需要不同的转座元件进行调控, 而不是 α 3, 目前机制未知. 在 *K. marxianus* 的 MAT α 位点也发现存在 MAT α 3^[11], 则 *K. marxianus* 是否采用了与 *K. lactis* 同样的方式进行性别转换, 还有待进一步研究.

3 *K. marxianus* 具有快速生长、耐高温等生理特征

K. marxianus 具有高生长速率、高生物量、耐高温、可利用多种碳源生长等特征, 成为工业应用的潜力菌株^[10,12]. 已有报道表明, 在工业化生产有价值的酵母菌株中, *K. marxianus* 的最大生长速率最高, 达到 0.60 h^{-1} ^[10], *K. lactis* 的最大生长速率是 0.50 h^{-1} ^[10], *S. cerevisiae* 是 0.37 h^{-1} ^[10], 毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是 0.18 h^{-1} ^[20]. 同时, 优化后的 *K. marxianus* 的细胞生物量能达到 103 g(细胞干重)/L ^[21], *K. lactis* 的细胞干重能达到 38 g/L ^[22], *S. cerevisiae* 的细胞干重是 14 g/L ^[23], *P. pastoris* 的细胞干重是 101 g/L ^[24].

K. marxianus 具有高温下稳定生长的性质, 能在 52°C 生长^[10]; 而其他有工业应用潜力的酵母的最高生长温度都低于 40°C , *K. lactis* 是 37°C ^[10], *S. cerevisiae* 是 35°C ^[10], *P. pastoris* 是 30°C ^[25]. 不同的 *K. marxianus* 菌株, 其耐温性也有差别. Lane 等人^[11] 2011 年的报道中, 比较了 13 株 *K. marxianus* 细胞的耐温性, 发现所有菌株在温度高达 42°C 时都有相似的生长情况; 但在 48°C 时, 只有 CBS 397 和 NCYC 2887 能茁壮生长.

K. marxianus 可以利用多种碳源生长, 包括葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等常规碳源, 还包括乳糖、半乳糖、木糖等^[10,12]. 该酵母还具有高蛋白含量, 总蛋白量占细胞干重的 71.9% ^[26]. 此外, *K. marxianus* 具有良好的分泌性能^[10,12].

4 *K. marxianus* 的细胞壁含有更多的甘露糖蛋白

K. marxianus 像其他酵母细胞壁成分一样, 外层

是甘露聚糖(可溶),多用于细胞表面识别。内层是葡聚糖(由碱溶性葡聚糖与碱不溶性葡聚糖组成),支撑细胞壁并使其坚韧。中间一层是蛋白质。几丁质是紧靠细胞膜的一层晶体状结构,在酵母出芽时生成。Nguyen 等人^[27]在 1998 年比较了菌株 *K. marxianus* 1586 与 *S. cerevisiae* 1117 的细胞壁成分。如表 1 所示,*K. marxianus* 细胞壁中的甘露糖蛋白以及总的细胞壁干重都高于 *S. cerevisiae* 酵母细胞壁甘露聚糖能够吸附肠道病原菌,干扰肠道病原体黏附到黏膜组织,且能激活体液免疫和细胞免疫^[28],因此可食用酵母的细胞壁甘露糖量越多,越有利于肠道健康。

酵母细胞壁中的蛋白主要是细胞壁功能必需的酶,如糖基转移酶、葡聚糖酶、几丁质酶、肽酶等。但细胞壁成分解析的研究工作反复证明了胞内一些蛋白(如糖醇解酶、热休克蛋白等)也存在于细胞壁中^[29]。例如,在 *S. cerevisiae* 细胞壁中发现甘油醛-3-磷酸脱氢酶的多肽存在,但功能未知^[29]。这些非传统的细胞壁蛋白,大多功能未知,推测可能参与了免疫识别或胞间连接^[30]。在 *K. marxianus* 细胞壁中也发现了糖醇解酶类——甘油醛-3-磷酸-脱氢酶的异构体(p37)的存在,介导了细胞絮凝^[31,32]。

5 *K. marxianus* 的 N-糖基化修饰中含有较短的高聚甘露糖链

K. marxianus 像其他酵母一样,蛋白翻译后有 N-糖基化和 O-糖基化修饰。酵母和哺乳动物细胞蛋白质的 N-糖基化修饰,都是在内质网中上完成,识别位点都是 Asn-X-Ser/Thr(X 是除了脯氨酸之外的任一氨基酸),都是在靶位点天冬酰胺残基上连接寡糖核心 Man₈GlcNAc₂,随后运输到高尔基体完成进一步的糖基化修饰(图 2)。在哺乳动物细胞的高尔基体中,寡糖核心被修剪成 Man₅GlcNAc₂,再进一步添加 GlcNAc, Gal, 唾液酸以及岩藻糖。在酵母高尔基体中,α1,6-甘露糖基转移酶 Och1 催化一个甘露糖,以 α1,6-的方式连接到寡糖核心 Man₈GlcNAc₂ 外侧链上。随后,不同的酵母中会进一步按照 α1,6-(主链)和 α-1,2(侧链)方式连接不同数量的甘露糖,形成不同聚合度的高聚甘露糖重复单元。如图 2 所示,以下将分别介绍 *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *K. lactis*, *K. marxianus* 蛋白糖基化修饰的特征。

在 *S. cerevisiae* 中, N-寡糖链含有多达 200 个

甘露糖残基^[33],其 N-寡糖链的延伸骨架的重复单元 (Man_{α1,6})₅(Man_{α1,2})₇(Man_{α1,3})₅ManPO₄³⁻,其中含有磷酸二酯键,磷酸基团通过 C1 连接两个甘露糖。在每个重复单元的末端还含有 α-1,3-甘露糖帽子^[34]。这种 α-1,3 连接的甘露糖基,有很高的免疫原性^[35]。

在 *P. pastoris* 中, N-寡糖链长度是 Man₅₀GlcNAc₂,比 *S. cerevisiae* 中的短。N-寡糖链的重复单元是 (Man_{α1,6})₃(Man_{α1,2})₄(Man_{β1,2})₃PO₄³⁻,其中也含有甘露糖磷酸二酯,但具体的连接方式未知^[36]。在 *P. pastoris* 中,没有 α-1,3 甘露糖基转移酶基因,即 MNN1 家族的酶(Mnn1, Mnt2, Mnt3 及 Mnt4)^[37],*P. pastoris* 的糖蛋白中没有末端的 α-1,3 甘露糖,但有 β-1,2 连接的甘露糖^[36]。这种 β-1,2 连接的寡聚甘露糖在白色念珠菌(*Candida albicans*)中被证明有很强的宿主-病原反应,干扰宿主免疫系统的反应^[38],这种糖基结构的存在可能具有潜在的危险性^[37]。

在 *K. lactis* 中,其 N-寡糖链单元是 (Man_{α1,6})₃-(Man_{α1,2})₆(Man_{α1,3})₂GlcNAc_{β1,4},与 *S. cerevisiae* 类似,但不含磷酸,而是在甘露糖末端再加上 α-1,2 连接的 GlcNAc 作为末端^[39],该反应由基因葡萄糖 N-乙酰转移酶 1(glucose N-acetyltransferase 1, *GNT1*)来催化^[37]。*K. lactis* 有相应的 MNN1 家族基因^[37],则有末端的 α-1,3 连接的甘露糖。

在 *K. marxianus* 中, N-糖基链中 α-甘露聚糖具有梳子状的结构^[40], N-寡糖链单元是 (Man_{α1,6})₂-(Man_{α1,2})₃,缺乏磷酸基团,且在 α-1,6 甘露聚糖骨架的末端是 α-1,3 连接的甘露糖作为末尾。Yoshida 等人^[34]通过对 *K. marxianus* YIT 8292 细胞壁的糖链研究进一步证实了 *K. marxianus* 的 N-连接的多聚糖侧链具有更短的 α-1,2 连接的甘露聚糖形式,且甘露聚糖中有更少的磷酸含量。

对于 O-糖基化,酵母与哺乳动物都是在 Ser 或 Thr 上直接增加单糖残基。但两者有显著差异。在哺乳动物中, O-糖链的起始是 GalNAc,起始于高尔基体中,用 UDP-GalNAc 作为糖供体,并在高尔基体延长,逐渐增加 Gal, GlcNAc, Fuc 及 NeuNAc;在酵母中, O-糖基化的起始是甘露糖,起始于内质网,用 Man-P-Dol(长醇)作为单糖供体。延长在高尔基体中进行,逐渐增加甘露糖或半乳糖,形成 Man-α1, 2-Man-α1,2-Man-Ser/Thr,该结构是否对人体有抗原性尚无定论^[41]。Man₁₋₃-Ser/Thr 结构在不同的酵母中经过处理,通过增加半乳糖或甘露糖到不同的分支上,形

表 1 *K. marxianus* 与 *S. cerevisiae* 的细胞壁成分对比^[27]

酵母物种	细胞壁干重(%)	细胞壁成分			
		葡聚糖		几丁质(%)	甘露糖蛋白(%)
		碱溶性(%)	碱不溶性(%)		
<i>K. marxianus</i>	30.8~34.2	44.9~51.1	17.3~19.7	1.01~1.21	22.1~29.1
<i>S. cerevisiae</i>	28.4~30.6	29.4~37.6	34.3~40.3	3.11~3.61	20.9~27.9

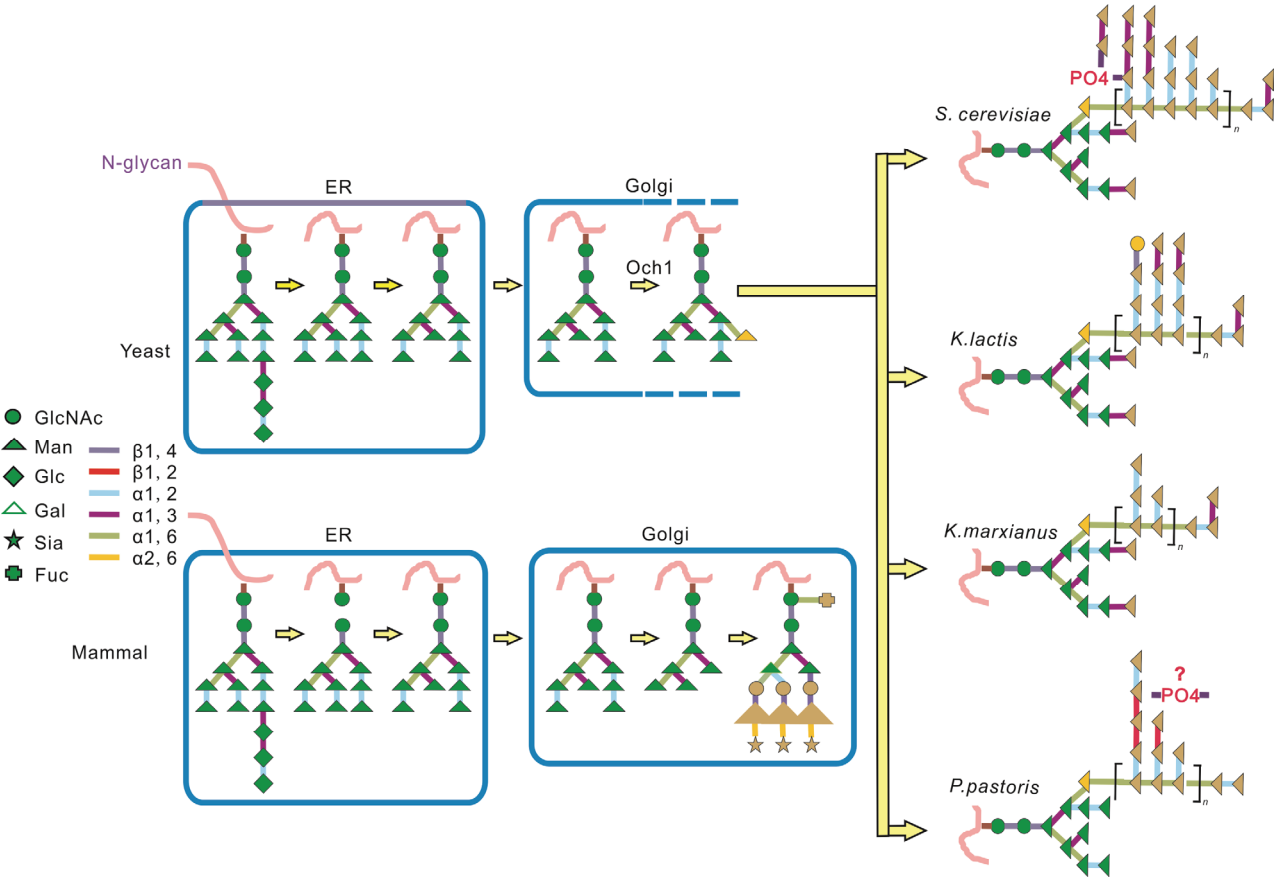


图 2 酵母与哺乳动物的 N-糖基化修饰过程比较

左侧是酵母与哺乳动物的 N-糖基化修饰的关键步骤, 右侧是 4 种主要的酵母表达系统的 N-寡聚糖链结构比较. 不同形状代表了不同单糖, 在内质网(ER)中连上的最初寡糖核心用绿色表示, 在高尔基体中所加上的糖基用黄色或棕色表示. n 表示酵母特有的 N-寡糖链上高聚甘露糖重复单元的个数. ER: 内质网; Golgi: 高尔基体; Yeast: 酵母; Mammal: 哺乳动物; N-glycan: N-聚糖; GlcNAc: N-乙酰葡萄糖; Man: 甘露糖; Glc: 葡萄糖; Gal: 半乳糖; Sia: 唾液酸; Fuc: 岩藻糖

成 $\text{Hex}_{\leq 8}$ 的结构. *S. cerevisiae* 的 O-寡聚糖链是 Man_{1-6} , 是其细胞生存所必需的. *P. pastoris* 的 O-糖基化具有 Man_3 , 并存在 β -1,2 连接的甘露糖^[37]. 通过 *P. pastoris* 表达重组蛋白发现其具有高度的 O-糖基化^[42]. *K. lactis* 及 *K. marxianus* 的 O-糖基化研究报道较少.

酵母作为表达系统, 在高效表达外源蛋白方面拥有明显的优势, 如易生长、易培养、易控制、操作简单、表达量稳定等. 但酵母蛋白糖基化修饰, 特别是过度甘露糖基化产生的免疫原性, 一直限制了酵母系统表达在药用蛋白生产制备中的应用. 前期, 研

究人员针对 *P. pastoris* 的 N-糖基化进行工程改造, 希望消除过度的甘露糖基化^[43]. 与其他酵母相比较, *K. marxianus* 在 N-糖基链上的高聚甘露糖链更短, α -1,3 甘露糖更少, 没有 *P. pastoris* 酵母中的 β -1,2 甘露糖. 因此, 在 *K. marxianus* 中表达的外源蛋白应该具有更安全优势. 此外, *K. marxianus* 酵母自身的高生长速率, 能够在较短的时间内达到较高生物量、蛋白含量高、适宜生长温度广等特征, 更适合工业生产与应用, 有望在食品安全级微生物生产与应用中发挥更大作用.

参考文献

- 1 Lachance M A. Current status of *Kluyveromyces systematics*. FEMS Yeast Res, 2007, 7: 642–645
- 2 Korsak N, Taminiau B, Leclercq M, et al. Short communication: evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. J Dairy Sci, 2015, 98: 3684–3689
- 3 Khrisanfova L P. Antimicrobial properties of Koumiss from cow and mare milk. Moloch Prom, 1969, 30: 16
- 4 Fleet G H. Spoilage yeasts. Crit Rev Biotechnol, 1992, 12: 1–44
- 5 Silveira W B, Diniz R, Cerdán M E. Genomic sequence of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 (UFV-3), a highly lactose-fermenting yeast isolated from the brazilian dairy industry. Genome Announc, 2014, 2: e01136-14.
- 6 Lodder J, Kreger-van Rij N J W. The Yeasts: A Taxonomic Study. Amsterdam: NHPC, 1952
- 7 van der Walt J P. *Kluyveromyces*—a new yeast genus of the Endomycetales. Antonie van Leeuwenhoek, 1956, 22: 265–272
- 8 Kurtzman C P, Fell J W. The Yeasts. A Taxonomic Study. Amsterdam Elsevier: Science, 1998
- 9 Kurtzman C P, Robnett C J. Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Saccharomyces complex*” determined from multigene sequence analyses. FEMS Yeast Res, 2003, 3: 417–432
- 10 Lane M M, Morrissey J P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister’s shadow. Fungal Biol Rev, 2010, 24: 17–26
- 11 Lane M M, Burke N, Karreman R, et al. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 100: 507–519
- 12 Rodicio R, Heinisch J J. Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. Yeast, 2013, 30: 165–177
- 13 Lertwattanasakul N, Kosaka T, Hosoyama A. Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. Biotechnol Biofuels, 2015, 8: 47
- 14 Jeong H, Lee D H, Kim S H. Genome sequence of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555. Genome Announc, 2012, 11: 1584–1585
- 15 Suzuki T, Hoshino T, Matsushika K. Draft genome sequence of *Kluyveromyces marxianus* strain DMB1, isolated from sugarcane bagasse hydrolysate. Genome Announc, 2014, 2: e00733-14
- 16 Inokuma K, Ishii J, Hara K. Complete genome sequence of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777, a nonconventional thermotolerant yeast. Genome Announc, 2015, 3: e00389–15
- 17 Gao J Q, Yuan W, Li Y, et al. Transcriptional analysis of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology. Biotechnol Biofuels, 2015, 8: 1
- 18 Haber J E. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2012, 191: 33–64
- 19 Barsoum E, Martinez P, Stefan U. Astrom, $\alpha 3$, a transposable element that promotes host sexual reproduction, Genes Dev, 2009, 24: 33–44
- 20 Gao M J, Zheng Z Y, Wu J R, et al. Improvement of specific growth rate of *Pichia pastoris* for effective porcine interferon- α production with an on-line model-based glycerol feeding strategy. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93: 1437–1445
- 21 Hensing M, Vrouwenvelder H, Hellinga C, et al. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 42: 516–521
- 22 Blondeau K, Boze H, Jung G, et al. Physiological approach to heterologous human serum albumin production by *Kluyveromyces lactis* in chemostat culture. Yeast, 1994, 10: 1297–1303
- 23 Najafpour G, Younesi H, Ismail K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technol, 2004, 92: 251–260
- 24 Sreekrishna K, Tschopp J F, Thill G P, et al. Expression of human serum albumin in *Pichia pastoris*. US Patent, 5707828, 1998
- 25 Zhong Y J, Yang L, Guo Y J, et al. High-temperature cultivation of recombinant *Pichia pastoris* increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human interleukin-10. Microb Cell Fact, 2014, 13: 163
- 26 Fonseca G G, Gombert A K, Heinzle E, et al. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. FEMS Yeast Res, 2007, 7: 422–435
- 27 Nguyen T H, Fleet G H, Rogers R L. Composition of the cell walls of several yeast species. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 50: 206–212
- 28 胡梦红, 王有基, 熊邦喜. 一种新型水产饲料添加剂——酵母细胞壁. 水利渔业, 2006, 26: 75–76
- 29 Rasta D M, Baumgartner D, Mayer C, et al. Cell wall-associated enzymes in fungi. Phytochemistry, 2003, 64: 339–366
- 30 Delgado M L, O’Connor J E, Azorin I, et al. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the

- Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. Microbiology, 2001, 147: 411–417
- 31 Almeida C, Queirós O, Wheals A, et al. Acquisition of flocculation phenotype by *Kluyveromyces marxianus* when overexpressing *GAP1* gene encoding an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J Microbiol Methods, 2003, 55: 433–440
 - 32 Moreira R F, Fernandes P A, Moradas-Ferreira P. *Kluyveromyces marxianus* flocculence and growth at high temperature is dependent on the presence of the protein p37. Microbiology, 1998, 144: 681–688
 - 33 Nakanishi-Shindo Y, Nakayama K, Tanaka A, et al. Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1,6-polymannose outer chain from *och1*, *och1mnn1*, and *och1mnn1alg3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1993, 268: 26338–26345
 - 34 Yoshida Y, Naito E, Mizukoshi E. Side-chain structure of cell surface polysaccharide, mannan, affects hypocholesterolemic activity of yeast. J Agric Food Chem, 2009, 57: 8003–8009
 - 35 Ballou C E. Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. Methods Enzymol, 1990, 185: 440–470
 - 36 Vinogradov E, Petersen B O, Duus J. Isolation and characterization of non-labeled and ¹³C-labeled mannans from *Pichia pastoris* yeast. Carbohydr Res, 2000, 325: 216–221
 - 37 Delic M, Valli M, Pfeffer A, et al. The secretory pathway: exploring yeast diversity. FEMS Microbiol Rev, 2013, 37: 872–914
 - 38 Mille C, Bobrowicz P, Trinel P A, et al. Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. J Biol Chem, 2008, 283: 9724–9736
 - 39 Morka K, Pietruszka J, Berstenhorst S. Comparative expression of lipase CAL-A in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Hansenula polymorphata* investigate a possible host influence. J Biotechnol, 2014, 191: 176–186
 - 40 Kobayashi H, Komido M, Watanabe M, et al. Structure of cell wall mannan of *Candida kefyr* IFO 0586. Infect Immun, 1994, 62: 4425–4431
 - 41 Podzorski R P, Gray G R, Nelson N D. Different effects of native *Candida albicans* mannan and mannan-derived oligosaccharides on antigen-stimulated lymphoproliferation *in vitro*. J Immunol, 1990, 144: 707–716
 - 42 Gemmill T R, Trimble R B. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1426: 227–237
 - 43 Laukens B, De Visscher C, Callewaert N. Engineering yeast for producing human glycoproteins: where are we now? Future Microbiol, 2015, 10: 21–34

Review of *Kluyveromyces marxianus*' Genetic and Physiological Features

MO WenJuan, GUO Chao & LV Hong

Shanghai Engineering Research Center of Industrial Microorganisms, State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200438, China

Kluyveromyces marxianus widely exists in environments such as yogurt, fruit, and kefir. It was first isolated approximately a century ago and regarded as a food-safe yeast. In recent decades, *K. marxianus* has gained increasing attention in the industrial application field because of its specific characteristics such as food safety, high growth rate, large biomass, and high thermostability. In this review, we summarize the genomic features, taxonomy, and physiological features such as cell growth, cell wall composition, and glycosylation of *K. marxianus* to characterize this relatively unknown yeast.

***Kluyveromyces marxianus*, genome, sex conversion, glycosylation, industrial application**

doi: 10.1360/N052016-00101