

解脂耶氏酵母细胞工厂生产多不饱和脂肪酸的研究进展

何思成 张紫媛 韩雨晴 苗琳 张翠英 于爱群

(天津科技大学生物工程学院 省部共建食品营养与安全国家重点实验室 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘要: 多不饱和脂肪酸属直链脂肪酸, 是机体生物膜的关键结构组分, 它可以调控糖脂代谢及激素代谢, 具有促进发育、提高免疫力和预防疾病等多种益生功能, 对机体健康具有十分重要的作用。因此, 多不饱和脂肪酸在食品、医药和饲料等多个领域均表现出重要的应用价值和广阔的开发前景, 市场需求持续上升。与传统的海洋生物提取法相比, 微生物合成法具有生产周期短、工艺简单、对环境友好等优势, 近年来利用微生物细胞工厂生产多不饱和脂肪酸等微生物油脂逐渐成为科学界和工业界的研究热点和发展趋势。解脂耶氏酵母作为一种非常规产油酵母, 因其具备高产油脂和脂肪酸的天然能力, 因此成为了代谢工程改造微生物生产多不饱和脂肪酸的首选底盘细胞之一。本文首先介绍了多不饱和脂肪酸的来源及其天然合成途径; 然后总结归纳了当前利用代谢工程策略改造解脂耶氏酵母生产多不饱和脂肪酸的研究现状; 最后对利用解脂耶氏酵母细胞工厂生产多不饱和脂肪酸存在的主要瓶颈问题和未来发展趋势进行了探讨, 期望为未来高效合成多不饱和脂肪酸微生物细胞工厂的构建提供理论支持与思路。

关键词: 多不饱和脂肪酸; 微生物细胞工厂; 解脂耶氏酵母; 产油酵母; 代谢工程

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-0657

Research Progress in the Production of Polyunsaturated Fatty Acids by *Yarrowia lipolytica* Cell Factories

HE Si-cheng ZHANG Zi-yuan HAN Yu-qing MIAO Lin ZHANG Cui-ying YU Ai-qun

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457)

Abstract: Polyunsaturated fatty acids (PUFA) stand as linear olefinic fatty acids that assume a pivotal role as structural constituents within biofilms in living organisms. They wield the power to govern glucose, lipid, and hormone metabolism, yielding an array of physiological functions. Their capabilities encompass fostering developmental progress, bolstering immunity, preventing disease, and the essential maintenance of overall bodily well-being. Consequently, PUFA hold significant intrinsic worth and expansive developmental potential across diverse fields such as functional food, medicine, and animal feed. In contrast to traditional marine biological extraction techniques, microbial synthesis approaches offer distinct advantages, encompassing shortened production cycles, streamlined procedures, and environmental compatibility. In recent years, the utilization of microbial cell factories for generating PUFA and other microbial oils has emerged as a focal point within both scientific and industrial communities. A standout player in this arena is *Yarrowia lipolytica*, an unconventional oleaginous yeast that stands out due to its inherent high-yield lipid and fatty acid production capacity. As substantiated by the publication of *Y. lipolytica*'s complete genome sequence and the rapid advancements in gene expression vectors, genetic transformation methods, synthetic biology components, and gene editing technologies, the domain of metabolic engineering focused on *Y. lipolytica* as a chassis cell for microbial production is undergoing gradual expansion. This article commences by meticulously reviewing the origins and intrinsic pathways that underpin the natural synthesis of PUFA. It subsequently encapsulates the contemporary landscape of research, pinpointing metabolic engineering strategies applied to reconfigure

收稿日期: 2023-07-11

基金项目: 天津市自然科学基金项目 (22JCYBJC00170)

作者简介: 何思成, 男, 研究方向: 生物工程; E-mail: hesicheng2002@tust.edu.cn

通讯作者: 于爱群, 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程、微生物学、合成生物学; E-mail: yuaiqun@tust.edu.cn

Y. lipolytica into a PUFA producer. It further presents an in-depth examination of the central hurdles associated with the deployment of the engineered *Y. lipolytica* strains for PUFA production. Culminating with foresight, the article sketches out the overarching developmental trends in harnessing *Y. lipolytica* cell factories for large-scale industrial PUFA production, aiming to provide theoretical support and ideas for establishing the microbial cell factories in efficiently synthesizing PUFA.

Key words: polyunsaturated fatty acid; microbial cell factory; *Yarrowia lipolytica*; oleaginous yeast; metabolic engineering

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) 是指含有 2 个或 2 个以上碳碳双键的长链脂肪酸, 碳原子数目一般为 18–22 个^[1]。根据距离甲基端第一个双键位置的不同, 通常可将 PUFA 分为 ω -3 系列和 ω -6 系列。长期以来, 市场上的绝大多数 PUFA 是从深海鱼类中直接提取获得的, 而海洋微藻则是 PUFA 的次要来源。近年来, 海洋环境污染和过度捕捞严重破坏了渔业资源, 这也极大地限制了利用海洋鱼类提取 PUFA 产业的发展^[2]。另外, 鱼油中 PUFA 会随着鱼种类、繁殖季节、地理环境等因素改变, 这使得提取到的 PUFA 含量和组成不断发生变化, 少数 PUFA 在鱼油中含量又是较低的。上述因素都造成了传统的 PUFA 制备方法难以满足与日俱增的市场需求, 迫切需要开发稳定、高效、可持续、低成本的新型 PUFA 合成路线^[3–4]。

“微生物细胞工厂”是通过对选定的微生物底盘细胞的代谢途径进行特定改造, 创建出满足定制化需求的生产线, 从而加工制造出人类所需的食品、药品、化学品、燃料、材料等各类型产品, 它现已成为合成生物学领域最为典型的应用研究模式和最为重要的前沿发展方向^[5–6]。其中, 解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 具有多种独特的生理代谢特征, 因此将其作为“微生物细胞工厂”来实现工业产品的合成和生产备受学术界和工业界的高度关注^[7]。

总之, 目前利用微生物细胞工厂发酵生产功能性 PUFA 对于解决 PUFA 资源匮乏问题具有深远意义, 这也吸引了国内外研究人员的广泛关注^[8]。解脂耶氏酵母是异源合成 PUFA 理想的微生物底盘细胞, 近年来利用代谢工程及合成生物学技术在该微生物底盘中重构与优化 PUFA 的合成途径成为了领域内的一项研究热点和发展趋势。本文首先对 PUFA 的微生物来源和代谢途径、解脂耶氏酵母的分子遗传学操作技术进行了介绍; 其次系统总结和梳理了

以解脂耶氏酵母作为底盘细胞异源生产 PUFA 的有关代谢工程实例; 最后对利用解脂耶氏酵母细胞工厂生产 PUFA 存在的主要问题和未来发展方向进行了分析和讨论, 以期从事相关研究的科研人员开辟新的思路提供借鉴与依据。

1 PUFA 的微生物来源及其合成途径

PUFA 是机体生物膜的关键结构组分, 同时已有大量研究表明, 它作为信号分子参与了对糖代谢、脂代谢、激素代谢等多种生理过程的调控^[9–10]。此外, PUFA 在机体中还直接或者间接地发挥着抗癌、抗衰老、抗动脉粥样硬化、降低胆固醇、促进发育、缓解炎症、提高免疫力等多种生理作用^[11–12], 因此其对于机体健康状态的维持起着十分重要的作用^[13–15]。由于 PUFA 具有上述多种重要的生物学功能, 这使其作为功能因子在食品、保健品、医药、饲料等多个领域均表现出了很好的开发前景和应用价值^[16–18]。表 1 列举出了机体中存在的一些重要的 PUFA 及其生理功能。

目前 PUFA 的市场需求量巨大, 利用细菌、真菌和微藻等微生物生产 PUFA 具有生长速率快、营养需求简单、培养条件可控等优势, 因此微生物被认为是替代海洋生物资源生产 PUFA 的理想原料。与细菌相比, 某些微藻和真菌具有较高的 PUFA 含量。藻类中, 一些可进行光合作用的自养型微藻如单胞藻 (*Monodus subterraneus*)、角核指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*)、微拟球藻 (*Nannochloropsis oculata*)、金色奥杜藻 (*Odontella aurita*) 和紫球藻 (*Porphyridium cruentum*) 等都具备合成较高含量 EPA 的能力^[19]; 一些无法进行光合作用的异养型微藻如破囊壶菌 (*Thraustochytrium* spp.) 和裂殖壶菌 (*Schizochytrium limacinum*) 等则可合成较高产量的 DHA^[20]。但利用微藻生产 PUFA 存在着一些明显的瓶颈和制约因素, 如微藻生长缓慢、采收成本高、

表 1 生物体中常见的多不饱和脂肪酸类型

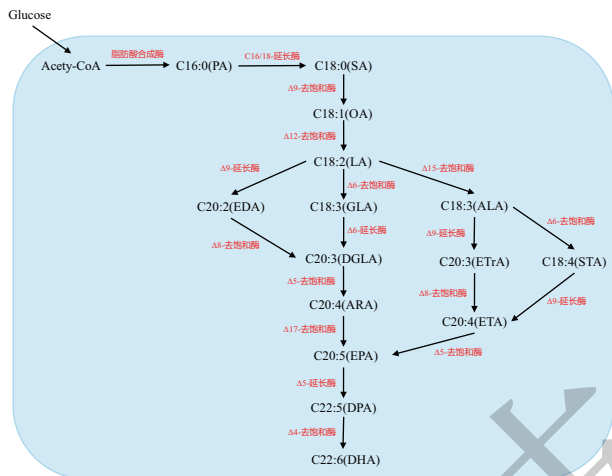
名称 Name	学名 Scientific name	简称 Abbreviation	功能 Functions
ω-3 PUFA			
α- 亚麻酸 (α-linolenic acid, ALA)	Δ ⁹ , Δ ¹² , Δ ¹⁵ - 十八碳三烯酸	Cl8:3n-3 或 ω-3 18:3	抗血栓、降血脂、预防心肌梗塞、维持视网膜等神经系统所必需的营养因子等
二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA)	Δ ⁵ , Δ ⁸ , Δ ¹¹ , Δ ¹⁴ , Δ ¹⁷ - 二十碳五烯酸	C20:5n-3 或 ω-3 20:5	降低心血管疾病的发病率、改善免疫细胞功能、预防及治疗糖尿病等代谢类疾病、预防阿尔兹海默症等
二十二碳五烯酸 (Docosapentaenoic acid, DPA)	Δ ⁷ , Δ ¹⁰ , Δ ¹³ , Δ ¹⁶ , Δ ¹⁹ - 二十二碳五烯酸	C22:5n-3 或 ω-3 22:5	抑制炎症、抑制血小板凝聚、对颈动脉粥样硬化具有保护作用、抑制神经炎症等
二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA)	Δ ⁴ , Δ ⁷ , Δ ¹⁰ , Δ ¹³ , Δ ¹⁶ , Δ ¹⁹ - 二十二碳六烯酸	C22:6n-3 或 ω-3 22:6	促进脑细胞及神经系统发育、预防心脑血管疾病，调节中枢神经功能等
ω-6 PUFA			
亚油酸 (Linolenic acid, LA)	Δ ⁹ , Δ ¹² - 十八碳二烯酸	Cl8:2n-6 或 ω-6 18:2	预防代谢疾病和癌症、抗动脉粥样硬化、抑制肥胖、调节免疫系统等
γ- 亚麻酸 (γ-linolenic acid, GLA)	Δ ⁶ , Δ ⁹ , Δ ¹² - 十八碳三烯酸	Cl8:3n-6 或 ω-6 18:3	抗炎症、抗心血管疾病、抗肿瘤、抗糖尿病、缓解更年期综合征等
二高-γ- 亚麻酸 (Dohomo-γ-linolenic acid, DGLA)	Δ ⁶ , Δ ⁹ , Δ ¹² - 二十碳三烯酸	C20:3n-6 或 ω-6 20:3	抑制血栓素活性、抑制血小板凝聚及细胞分裂素分泌、抗动脉粥样硬化等
花生四烯酸 (Arachidonic acid, ARA)	Δ ⁵ , Δ ⁸ , Δ ¹¹ , Δ ¹⁴ - 二十碳四烯酸	C20:4n-6 或 ω-6 20:4	合成人体前列腺素的重要前体物质、促进婴幼儿大脑发育、抑制人体各类型皮肤疾病病理发展等

油脂含量较低等。目前已经证实的天然高产 PUFA 的油脂真菌主要有高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)、深黄被孢霉 (*Mortierella isabelina*)、木霉 (*Trichoderma* spp.)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、畸雌腐霉 (*Pythium irregulare*) 和樟疫霉 (*Phytophthora cinnamomi*) 等丝状霉菌，以及解脂耶氏酵母 (*Y. lipolytica*)、圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*)、斯达氏油脂酵母 (*Lipomyces starkeyi*)、胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*)、弯假丝酵母 (*Candida curvata*) 和曲隐球菌 (*Cryptococcus curvatus*) 等酵母菌。与微藻相比，这些丝状霉菌和酵母菌能够积累较高产量的 PUFA，且具有生长速度快、基质原料选择宽泛、发酵工艺简单、易于大规模生产等优势，因此，利用真菌发酵法生产 PUFA 展现出了更大的研发潜力。近十几年来，利用高山被孢霉 (*M. alpina*)、深黄被孢霉 (*M. isabellina*) 等被孢霉属菌种发酵合成一种 PUFA——ARA，已经成为了 ARA 的主要工业化生产方法^[21]，但被孢霉发酵过程存在生长缓慢、生物量低、易形成絮状或团块状菌球等缺陷。单细胞酵母发酵具有生长速度快、生产周期短、适合高密度培养、生物安全性高等优点，因此有望成为利用微生物发酵法

生产 PUFA 的新的菌种来源^[22]。

不同微生物物种所合成 PUFA 的链长以及不饱和程度是有所区别的。酵母菌通常生成的 PUFA 碳链长度大于 18，酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等常规酵母产生的长链脂肪酸主要包括饱和脂肪酸 (saturated fatty acids, SFA)，即棕榈酸 (C16:0) 和硬脂酸 (C18:0)；单不饱和脂肪酸 (monounsaturated fatty acids, MUFA)，即棕榈油酸 (C16:1n-7) 和油酸 (C18:1n-9)；不产生任何 PUFA^[23]；而解脂耶氏酵母等非常规酵母则具有相对完整的 PUFA 合成途径^[24]。酵母菌生产 PUFA 主要依靠的是脂肪酸延长去饱和途径，该途径以棕榈酸为底物，并由脂肪酸去饱和酶 (也称脂肪酸脱氢酶，fatty acid desaturase) 和脂肪酸延长酶 (fatty acid elongase) 这两种酶所构成，去饱和酶和延长酶的种类和数量的差异将造成最终酵母菌合成 PUFA 种类的差异，去饱和酶的种类和数量则决定了 PUFA 的不饱和度，是整个合成途径的关键酶。在酵母菌中，PUFA 从头合成途径始于线粒体中产生的柠檬酸：柠檬酸通过线粒体膜转运蛋白运输到细胞质中，一部分柠檬酸被胞质中的 ATP 柠檬酸裂解酶裂解为合成 PUFA 的基本二碳

单位——乙酰辅酶 A^[25]；柠檬酸裂解产生的乙酰辅酶 A 通过脂肪酸合成酶（fatty acid synthase, FAS）生成了棕榈酸，棕榈酸再经过一系列碳链的交替延长和去饱和作用生成了各类 PUFA。图 1 展示了解脂耶氏酵母以葡萄糖为底物生产 PUFA 的内源性合成途径以及通过代谢工程改造已经在该酵母底盘中所构建的各种 PUFA（如 ARA、EPA 和 DHA）的异源合成途径^[26]。



图中实线表示该酵母细胞中内源存在的 PUFA 合成途径；虚线表示通过代谢工程在该酵母细胞中所构建的 PUFA 异源合成途径

In this figure, the solid line indicates the native fatty acid synthesis pathway in *Y. lipolytica* cells, and the dotted line indicates the heterologous PUFA pathway constructed in *Y. lipolytica* through metabolic engineering

图 1 解脂耶氏酵母中 PUFA 生物合成途径示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the PUFA synthetic pathway in *Y. lipolytica*

2 解脂耶氏酵母合成生物学工具的研究进展

解脂耶氏酵母的全基因组序列已经公布，其遗传转化体系经过近十几年的发展也逐渐成熟并完善。近年来，针对该酵母的合成生物学元件和基因编辑技术也有了蓬勃发展。再加上该酵母具有多种独特的生理代谢特征，因此解脂耶氏酵母已经成为了当今代谢工程及合成生物学领域中备受关注且极具发展潜力的工业微生物底盘细胞之一。本部分主要对解脂耶氏酵母底盘的合成生物学元件和基因编辑技术进行简要介绍。

2.1 启动子

启动子序列决定了微生物细胞内多数基因的表

达水平，也是构建基因表达载体的基本功能组件，因此可以说是最为重要的合成生物学元件之一，选择并使用合适表达强度的启动子成为了合成生物学研究中对底盘中特定基因表达进行调控的最常用方法^[27-28]。最早从解脂耶氏酵母中分离鉴定并广泛应用于调控外源基因表达的内源性启动子包括碱性胞外蛋白酶基因的启动子 pXPR（诱导型强启动子）^[29] 和翻译延伸因子 1- α 基因的启动子 pTEF1（组成型强启动子）^[30]。诱导型启动子能够基于特定诱导物或阻遏物的浓度来调控目的基因的表达，因此在解脂耶氏酵母细胞工厂的构建中显示出了比组成型启动子更好的优势。目前解脂耶氏酵母底盘可用的诱导型启动子主要包括 pLIP2、pPOX2、pPOT1、pXPR2、pICL1 等^[31-32]。近年来，更多的解脂耶氏酵母内源性启动子得到了序列克隆与活性初步鉴定，但其功能和应用仍有待于进一步验证和完善^[33-34]。

许多研究表明，对于解脂耶氏酵母底盘来说，强启动子不一定是提高蛋白质表达水平的最佳选择^[35]。因此，有必要对解脂耶氏酵母内源性启动子序列及其 5' 端侧翼序列进行分段功能分析，并通过定向或非定向改造开发出转录活性更强的人工合成启动子。例如，利用分段分析方法，研究人员证明了上游激活序列（upstream activating sequence, UAS1B）对 pXPR2 启动子活性影响最为显著。在此基础上，Madzak 等^[36]通过在 pLEU2 启动子上游添加 UAS1B 元件构建了人工合成的组成型强启动子 pHP1d、pHP2d、pHP3d 和 pHP4d；启动子活性分析结果显示，人工合成启动子强度随 UAS1B 拷贝数的增加而增加。而 pHP4d 也是目前在解脂耶氏酵母底盘中得到最广泛应用的杂合启动子之一，能够表现出准组成型的高水平活性。进一步地，Blazeck 等^[37-38]在 pLEU2 和 pTEF1 启动子上游也分别添加了多个 UAS1B 元件，结果显示启动子活性同样大大提高，这就再一次证实了 UAS1B 元件的重要功能。此外，研究人员利用启动子截短和重排的方法对不同启动子元件（如核心启动子、TATA 框、近端序列、UAS）进行了功能分析，结果表明了这些序列都是决定解脂耶氏酵母启动子强度的重要因素^[39]。解脂耶氏酵母中天然脂肪酸诱导型酰基辅酶 A 氧化

酶 2 (pPOX2) 启动子由上游激活序列 (A1、A2 和 A3)、调节序列 (R1 和 R2) 以及核心启动子序列组成, Lv 等^[40] 研究表明 pAIR1x2A3 启动子 (包括 2 个 A1R1 序列和 1 个 pPOX2 核心启动子序列) 具有脂肪酸诱导的最广泛的表达范围。这些具有不同强度和不同诱导特性的启动子能够调控解脂耶氏酵母中 PUFA 的合成代谢网络。重要的是, 诱导型启动子具有动态调节解脂耶氏酵母脂肪酸谱的能力, 所以在生长阶段天然脂肪酸不会减少, 反而能够在积累期快速合成。例如, pYAT1 启动子已被用于调控解脂耶氏酵母 PUFA 合成途径中的关键基因^[41]。表 2 列出了目前解脂耶氏酵母表达系统中可用的组成型和诱导型启动子类型。

2.2 DNA 重组

构建解脂耶氏酵母细胞工厂的首要步骤是需要将外源 DNA 片段以正确的顺序首尾相连, 然后插入

到目标载体中^[48-52]。基于酶切或单元克隆的传统技术已不能满足构建具有复杂遗传功能的微生物细胞工厂的要求。近十几年来已经开发出了许多针对解脂耶氏酵母的 DNA 重组策略, 如一步 PCR 法^[49]、Gateway 克隆^[37]、BioBricks^[50]、Gibson 组装^[51] 和 Golden Gate^[52] 等。一步 PCR 法是利用重叠延伸 PCR (OE-PCR) 技术, 将重叠 45 或 60 个碱基的 4 个基因盒组装起来, 然后将混合片段直接转化解脂耶氏酵母进行组装和插入 rDNA 位点。Gateway 克隆允许通过 att 位点将特定基因从供体载体转移到多个目的载体中^[35]。Wong 等^[50] 研究发现具有 4 个可调节限制位点的载体 (*Avr* II、*Xba* I、*Spe* I 和 *Nhe* I) 在使用基于 BioBrick 的组装时能构建多个模块化元件。Gibson 组装需要多个两端重叠约 30 个碱基片段, 以便核酸外切酶生成单链悬挑结构, 之后 DNA 聚合酶填充退火区域上的间隙, DNA 连接酶密封缺口并

表 2 解脂耶氏酵母表达系统中常用的启动子

Table 2 Most prominently used promoters for heterologous expression in <i>Y. lipolytica</i>			
类型 Type	名称 Names	特征 Characteristics	参考文献 Reference
组成型启动子 Constitutive promoters	pTEF	内源	[30]
	pTDH1、pGPM1、pFBAIN	内源	[33]
	pEXP1、pGPAT、pGPD	内源	[24]
	pDGA1、pACC、pIDH2、pFAS2、 pFAS1、pPOX4、pZWF1、pIDP2	内源	[34]
	pTEF _{in}	内源	[41]
诱导型启动子 Inducible promoters	pGAP、pACL2	内源	[34]
	pXPR2	内源; 肽诱导型	[29]
	pPOX2、pPOT1	内源; 脂肪酸、烷烃及蓖麻油酸甲酯诱导型; 葡萄糖及甘油阻遏型	[42]
	pLIP2、pALK1	内源; 脂肪酸及烷烃诱导型	[43]
	pYAT1	内源; 低氮诱导型	[24]
	pEYK1、pEYD1	内源; 赤藓醇及赤藓糖诱导型; 葡萄糖及甘油阻遏型	[44]
	pALK1	内源; 正癸烷诱导型; 甘油阻遏型	[45]
	pPAT1	内源; 正癸烷及油酸诱导型; 甘油阻遏型	[45]
	pTHR1、pMET3、pSER1、pCTR1、 pCTR2	内源; 铜阻遏型	[27]
	pHP4d	杂合	[37]
	pnUASIXPR2-LEU、pnUASIXPR2- TEF	杂合	[38]
	pEYK1-nAB、pEYK1-4AB-coreTEF、 pEYK1/EYD1B-coreEYK1	杂合; 赤藓醇及赤藓糖诱导型; 葡萄糖及甘油阻遏型	[46]
	pTEFR1	杂合; 脂肪酰基辅酶 A 诱导型	[47]
	p (AIR1) _{x2} A3	杂合; 油酸诱导型	[40]

将 DNA 片段共价连接在一起^[51]。Engler 等^[52]研究发现可利用 II 型限制性内切酶构建标准化和可互换的 DNA 文库。值得注意的是,每一种 DNA 组装技术都有其优缺点,需要根据具体的基因改造需求来进行使用。OE-PCR 和 Gibson 组装方法简单、快速,但每个组分依赖不同的引物,难以组装含有多个重复序列的 DNA 片段序列。相反,使用 Gateway 方法可以容易地重组和改变含有目标基因的重组载体,而 BioBricks 和 Golden Gate 更适合高通量文库的构建^[50,53]。这些先进的 DNA 组装技术能够帮助快速组装需要在解脂耶氏酵母底盘中进行表达的多基因途径。此外,Golden Gate 法已应用于启动子改组实验^[54],该实验有助于筛选到控制不同 PUFA 合成途径中限速基因表达的最佳启动子。

2.3 基因编辑

目前,在解脂耶氏酵母底盘中已经建立了多种基因敲除和整合工具,这在解脂耶氏酵母染色体上重新设计和构建合成途径提供了可能性。Cui 等^[55]开发出了外体质粒,实现了蛋白质简易表达或快速表征,但这种基因表达方法显示出了遗传不稳定性。对于酵母菌而言,传统的基因组编辑技术主要依赖于非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)或同源定向修复(homologous-directed repair, HR)^[56]。在解脂耶氏酵母中,利用 NHEJ 和营养缺陷型或抗生素抗性选择标记可以将外源基因随机整合到基因组中。修复 DNA 双链断裂(DNA double strand break, DSB)的主要方法是通过 NHEJ 而不是 HR^[54]。NHEJ 过程的随机性阻碍了插入位点的精确控制,但这一特性反过来又可用于生成染色体突变文库。Cui 等^[55]通过 NHEJ 将多个大片段 DNA 引入解脂耶氏酵母基因组中,导致插入片段的染色体位置和基因拷贝数发生变化,自动生成了多样化的基因表达文库。与此同时,Bai 等^[57]建立了 NHEJ 介导的基因组文库技术,允许随机整合多个异源片段,从而产生了具有优异表型的不同菌株。Jang 等^[58]为了提高解脂耶氏酵母中 HR 的表达频率及效率,阻断了 NHEJ 通路中负责修复 DSB 的 *KU70* 基因,并使用羟基脲使细胞周期同步于 S 期。结果显示,解脂耶氏酵母中同源重组 HR 频率显著

提高(超过 46%)。此外,Ding 等^[54]通过增加同源臂长度、下调/删除 *KU70* 或 *KU80* 来抑制 NHEJ 以及异源表达来自酿酒酵母的 ScRad52p,成功提高了解脂耶氏酵母的 HR 效率。Wagner 等^[59]使用 26S rDNA 或 Zeta DNA 位点和转座子突变的多拷贝基因整合法成功拓展了解脂耶氏酵母的基因编辑方法库。

重复的基因整合需要标记基因的循环使用。Gao 等^[60]通过回收两侧带有两个 hisG 位点的 Ura3 表达盒以及 Cre-loxP 系统能够在含有 5-氟硼酸的平板上进行多轮基因操作。Lv 等^[61-63]将 Cre-loxP 系统与靶向存在于解脂耶氏酵母基因组中至少 200 个拷贝中的 26S rDNA 相结合,可以实现重复的基因整合,而无需构建具有不同位点同源臂的质粒。Zhu 等^[64]基于此建立了一种基因多拷贝方法,可以替代传统的多拷贝方法。通过增加基因整合到基因组的轮次来微调 HpCrtW 和 HpCrtZ 的转录表达,并同时应用 HpCrtW 和 HpCrtZ 的模块化酶组装。此外,Zhou 等^[65]基于 Cre/loxP 位点特异性重组系统开发出了一一种新型高效的基因整合工具。其只需一个单一的选择标记,可以完全切除所有不必要的序列,从而实现了在相同整合位点重复完成基因的整合操作。近期,一个由自主复制序列(ARS)、一个着丝粒(CEN)和两个端粒元件(TEL)组成的解脂耶氏酵母人工染色体(yIAC)被开发出来,可用于多个基因表达盒的有效组装。基于此结果,Guo 等^[66]将一个含有 8 个基因表达盒长 23 kb 的重组 yIAC 成功整合到了解脂耶氏酵母基因组中,结果使解脂耶氏酵母工程菌株能够同时消耗利用木糖和纤维二糖。

2.4 CRISPR-Cas 系统

2013 年,CRISPR-Cas 系统被首次成功应用于对酵母菌即酿酒酵母染色体基因组的修饰^[67]。紧接着,该技术就在其他酵母底盘中如解脂耶氏酵母^[68-69]、巴斯德毕赤酵母^[70]、乳酸克鲁维酵母^[71]和粟酒裂殖酵母^[72]等中实现了成功应用。其中,Schwartz 等^[68]将由混合 RNA 聚合酶 III 启动子表达的 gRNA 和经密码子优化的 Cas9 蛋白共转化到解脂耶氏酵母宿主菌株中,结果显示目标基因的敲除率达到了 90%。Gao 等^[73]将 gRNA 表达盒和 Cas9 表

达盒插入到同一质粒中,然后将该质粒分别转化至解脂耶氏酵母野生型、 $\Delta KU70$ 菌株和 $\Delta KU70/\Delta KU80$ 菌株中,结果显示野生型菌株和 $\Delta KU70/\Delta KU80$ 菌株中的基因定向编辑效率分别为 85.6% 和 94.1%。Holkenbrink 等^[74]又构建了针对解脂耶氏酵母底盘的 EasyCloneYAL1 系统,单基因敲除率为 90%,双基因敲除率为 6%–66%。Gao 等^[75]通过构建两个整合型载体(各含 1 个 Cas9 表达盒和 1 个 sgRNA 表达盒),其效率约为 20%。紧接着,该课题组又构建了含有 1 个 Cas9 表达盒和 2 个 sgRNA 表达盒的质粒,并将其与含有待敲入基因的质粒进行共转化,基因同源重组整合效率为 15%–37%。Larroude 等^[76]使用 Golden Gate 技术构建了一组用于编辑解脂耶氏酵母基因组的含有不同标记的 CRISPR-Cas 系统。此外, Schwartz 等^[77]开发出了一种可以对 sgRNA 在解脂耶氏酵母底盘中的切割效率进行定量的方法。

3 代谢工程改造解脂耶氏酵母合成 PUFA 的应用实例

解脂耶氏酵母作为代谢工程改造底盘细胞具有以下特征:(1)解脂耶氏酵母的安全级较高,能够用于食品和医药的生产^[78]。(2)该酵母是一种产油酵母,具备天然积累高含量脂质的能力,其脂质积累量可达细胞干重(dry cell weight, DCW)的 40% 以上,因此是生产游离脂肪酸、甘油三酯、生物柴油等脂质相关物质的理想宿主菌株。(3)该酵母对油脂类物质具有较强的分解能力^[79]。(4)该酵母能够在多种碳基质如亲水性和疏水性廉价碳源上生长^[80–81],并通过特定代谢途径将其转化成各种高值化合物。(5)该酵母对各种不利生长条件的适应能力较强,例如可以在低 pH 和高渗透压条件下生长,从而有利于减少细菌污染^[82]。(6)该酵母不受葡萄糖效应的影响,因此不会进行有氧酒精发酵^[83]。(7)该酵母具有完全测序的基因组和相对成熟的遗传操作工具(如目前已开发了各种受体菌株和表达载体^[81–84]),因此它已常被用作非模式微生物底盘/宿主菌来生产各种产品,成为了目前代谢工程和合成生物学方向使用最广泛的非常规酵母底盘之一^[81, 85]。

近年来,研究者纷纷尝试利用代谢工程技术来

改造解脂耶氏酵母底盘以生产 PUFA。本文选择了部分代表性成果进行介绍,具体包括, ω -3 PUFA: ALA、EPA 和 DHA; ω -6 PUFA: LA、GLA 和 ARA。

3.1 ω -3 系列脂肪酸

Damude 等将来自串珠镰刀菌(*Fusarium moniliformis*)的 $\Delta 15$ - 去饱和酶引入解脂耶氏酵母中进行表达,结果显示该酶具有将内源 LA 一步转化生成 ALA 的能力(图 1),ALA 的积累量达到了总脂肪酸(total fatty acids, TFA)的 20% 以上^[86]。为了进一步提高 ALA 的产量, Cordova 等^[87]选择了高效积累油酸(占 TFA 80%)的解脂耶氏酵母菌株作为出发底盘,并表达了圆红冬孢酵母(*R. kratochvilovae*) $\Delta 15$ - 去饱和酶;因为该出发底盘能够提供更多的前体物质——油酸,工程菌株中 ALA 含量得以提高。Tezaki 等^[88]通过验证解脂耶氏酵母细胞膜磷脂层的脂肪酸组成证明了 PUFA 合成量与细胞膜流动性之间具有一定的正关联性;而在低温条件下,解脂耶氏酵母细胞可通过提高其胞内脂肪酸的不饱和度来维持其细胞膜的流动性。因此,研究者将工程菌株在 20℃ 下对该工程菌株进行培养,ALA 含量显著增加,达到了 TFA 的近 30%。通过补料分批发酵,解脂耶氏酵母工程菌株最终产生了 1.4 g/L 的 ALA,这是目前酵母底盘生产 ALA 的最高产量。Li 等^[89]将可异源生产 ALA 的解脂耶氏酵母工程菌株与可利用木糖生长的解脂耶氏酵母工程菌株进行杂交,产生的子一代可以发酵木糖产生 1.42 g/L 的 ALA。这一结果首次展示了利用菌株杂交的方式实现酵母发酵木糖生产 PUFA 的可能性。

迄今为止,由美国杜邦公司使用代谢工程策略改造解脂耶氏酵母生产 EPA 获得的产量是目前微生物细胞工厂里的最高值^[24, 90]。首先,研究者对所保存的 40 株解脂耶氏酵母菌株进行了筛选发现,最适产脂菌株 ATCC 20362 的油脂产量超过了 100 g/L,脂质生产率超过 1 g/L/h。其次,将三拷贝的 $\Delta 12$ - 去饱和酶、两拷贝的 $\Delta 6$ - 去饱和酶、四拷贝的 C18/20- 延长酶、五拷贝的 $\Delta 5$ - 去饱和酶和三拷贝的 $\Delta 17$ - 去饱和酶转化至该菌株中,使其能够通过 $\Delta 6$ 途径成功产生了 EPA(占 TFA 3%)(图 1)。紧接着,研究者又通过异源基因筛选、强启动子、多拷贝整合等策

略实现了去饱和酶和延长酶活性的增加。最终,工程菌株共携带有 19 个过表达的异源基因,发酵后其 EPA 产量高达 TFA 的 40%^[91-93]。

Gemperlein 等^[94]在解脂耶氏酵母底盘中异源表达了原核来源的 PUFA 合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGC),并成功实现了 DHA 的异源合成。研究人员将来源于黏细菌的聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)样 PUFA 合成酶以及来源于束状芽孢杆菌的 DPA/DHA 型 PUFA 合成酶转化至解脂耶氏酵母底盘中,由此得到的工程菌株所产生的 DHA 产量为 86.5 mg/L,占 TFA 的 10.5%。为了进一步提高 DHA 的产量,研究人员比较了不同培养基组成及培养条件对 PUFA 生产菌株 DHA 产量的影响情况。结果表明,甘油对 DHA 生产菌合成 DHA 的促进作用最为显著(例如,在甘油培养基中 DHA 产量可达到葡萄糖培养基的 2 倍)。此外,限制培养基中磷酸盐缓冲液的含量对 DHA 生产也具有一定的正向影响。在葡萄糖和甘油培养基中,当使用 2-吗啉乙磺酸(4-morpholineethanesulfonic acid, MES)代替磷酸盐缓冲液时,可观察到 DHA 产量的显著提高,最终通过代谢工程和发酵优化的组合使用可使 DHA 合成量达到 100 mg/L,占 TFA 的 16.6%。

3.2 ω -6 系列脂肪酸

Sun 等^[95]将来自高山被孢霉的 $\Delta 6$ -去饱和酶引入到解脂耶氏酵母中,构建了一株能够高产 GLA 的工程菌株(占 TFA 的 4.6%)。同时,这项研究也证明了变温策略可提高解脂耶氏酵母生产 GLA 的能力。通过 28℃ 预培养和 20℃ 移温培养的策略对所获得的工程菌株进行发酵优化,所得 GLA 产量为 71.6 mg/L。

Zhang 等^[96]在解脂耶氏酵母中以高拷贝数表达了来自痤疮丙酸杆菌的亚油酸异构酶,使其在能够发酵葡萄糖产生反式 -10, 顺式 -12 CLA,产物含量达到了 TFA 的 5.6% (DCW 的 0.23%), LA 到 CLA 的底物转化率达到 80%。Zhang 等^[97]进一步使用组合代谢工程策略培育出的解脂耶氏酵母工程菌株能够产生高达 TFA 10% (DCW 0.4%) 的 CLA,该菌株经发酵条件优化后能够发酵大豆油培养基产生 4 g/L 的 CLA (TFA 的 44%, DCW 的 30%)。本

研究中使用的代谢工程策略包括:(1)使用改良的 pHP4d 启动子(pHP4d 启动子与另外 12 个拷贝的 UAS1B 融合)共过表达亚油酸异构酶和 $\Delta 12$ -去饱和酶;(2)通过多拷贝整合质粒进一步增强这两个异源基因的表达量,最终所构建的解脂耶氏酵母工程菌株是生产反式 -10, 顺式 -12 CLA 的理想菌株。

Liu 等^[98]首次采用一步 PCR 法将核糖体 RNA (ribosomal DNA, rDNA)作为整合位点对解脂耶氏酵母细胞进行了工程化改造,并证明了同源整合效率与 rDNA 重叠区长度有关。使用该方法将高山被孢霉来源的 ARA 完整生物合成途径基因(近 10 kb)快速组装到解脂耶氏酵母的染色体上,效率高达 23%。所构建的工程菌株具有较高的遗传稳定性,并能够合成高水平的 ARA (TFA 的 0.4%)。

表 3 列举出了目前经代谢工程策略改造后的微生物底盘生产部分 PUFA 的最高产量及占总脂肪酸含量,也证明了经代谢工程改造的解脂耶氏酵母工程菌株具有高产 PUFA 的显著优势。

4 总结与展望

PUFA 因其具有优良的生理功能及营养价值,现已作为高附加值生物活性物质广泛添加到了功能性食品等各种产品中,近年来市场上对于 PUFA 的需求量和价格持续大幅度增加,因此急需解决现有生产瓶颈或发展新的生产路线。不论从生态环保、投产比,抑或是产业规模来看,利用微生物发酵生产 PUFA 的方法均具有很大优势,这是一条经济高效的 PUFA 绿色合成途径。解脂耶氏酵母作为一种天然高产油脂及脂肪酸的产油酵母,具备相对成熟的分子遗传体系和不断完善的合成生物学元件,因此成为了利用代谢工程策略改造微生物生产 PUFA 的首选底盘细胞之一。目前的研究结果也表明,经代谢工程改造后的解脂耶氏酵母细胞工厂已经实现了多种 PUFA 的合成,并展现出了优良的 PUFA 生产能力,因此其应用价值与发展前景是极为广阔的。

然而,由于对解脂耶氏酵母的基础及应用研究起步较晚,再加上该酵母存在的一些固有特性,在一定程度上限制了该酵母底盘在代谢工程及合成生物学方面的应用。目前所获得的 PUFA 产量还无法达到大规模工业化、效益化生产的要求,有以下几

表 3 代谢工程改造微生物底盘生产部分多不饱和脂肪酸的产量情况

Table 3 Representative examples of PUFA production by metabolically engineered microorganisms				
工程菌株 Engineered strain	多不饱和脂肪酸 PUFA	最高产量 Maximum titer	占总脂肪酸含量 Proportion of TFA/%	参考文献 References
小球藻 (<i>Chlorella vulgaris</i>)	ALA	—	10.8	[99]
圆红冬孢酵母 (<i>R. kratochvilovae</i>)	ALA	—	5.9	[100]
解脂耶氏酵母 (<i>Y. lipolytica</i>)	ALA	1 400 mg/L	28	[86~87]
裂殖壶菌 (<i>Schizochytrium</i> sp.)	EPA	1 740 mg/L	1.9	[101]
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	EPA	31.4 mg/g DCW	—	[102]
解脂耶氏酵母 (<i>Y. lipolytica</i>)	EPA	3 200 mg/L	56.6	[24]
酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i>)	DHA	39.6 mg/L	10.2	[103]
恶臭假单胞菌 (<i>Paseudomonas putida</i>)	DHA	1.4 mg/g	—	[104]
解脂耶氏酵母 (<i>Y. lipolytica</i>)	DHA	86.5 mg/L (12.8 mg/g DCW)	10.5	[94]
解脂耶氏酵母 (<i>Y. lipolytica</i>)	CLA	4 000 mg/L	44	[97]
解脂耶氏酵母 (<i>Y. lipolytica</i>)	ARA	118.1 mg/L	—	[105]

个主要问题亟待突破：

(1) 该酵母本身不含有可自主复制的游离质粒，因此在该酵母底盘中进行外源基因表达时，需要首先构建人工整合载体，操作烦琐、工作量大。而且，虽然已经具有了多种解脂耶氏酵母表达系统可用的组成型和诱导型强启动子，但是在终止子元件方面的研究还相对落后。因此为解脂耶氏酵母构建能够稳定高效进行自主复制的游离型质粒，继续筛选更优的合成生物学组件（主要是终止子），开发序列更短、性能更强的人工启动子元件和人工终止子元件，都将是下一步工作的重点工作。

(2) 目前仍然缺乏可对解脂耶氏酵母基因组中多个基因进行同时快速编辑的简便高效、特异性强的方法。未来需要研究者们开发出更多适用于解脂耶氏酵母基因组编辑的创新工具和技术。

(3) NHEJ 是该酵母完成 DNA 双链断裂修复的主要形式，因此该酵母胞内的非同源重组效率极高，导致基因定点敲除和敲入非常困难。利用 CRISPR-Cas9 介导的基因整合技术虽然能够提高其同源重组的成功率，但现有技术仍未完全解决该酵母更倾向于进行非同源重组的问题。

(4) 目前利用代谢工程技术在该底盘中所进行的遗传操作还相对较少，所用改造策略也并不完善，所以需要对该底盘进行更广泛的定向遗传改造（包括途径基因工程、启动子工程、辅助因子工程、蛋

白质工程、前体工程、细胞器工程、细胞毒性工程、动态控制工程等），使代谢流更多地流向 PUFA 的合成途径，进而提高该非常规酵母细胞工厂生产 PUFA 的效率。

(5) 我们推测 PUFA 在解脂耶氏酵母中可能发挥了某些重要功能，但目前有关这一问题的研究却相对较少；而且，解脂耶氏酵母不饱和脂肪酸合成和积累的分子调控机制尚不清晰，因此还需要深入研究 PUFA 的具体功能以及外界条件对解脂耶氏酵母合成 PUFA 的代谢影响及其调控机制。只有明确了这些关键核心问题，才能有的放矢，最终实现 PUFA 在解脂耶氏酵母底盘细胞中的进一步增产。

(6) 该酵母是严格需氧的非发酵酵母，只有在氧气充足时才能达到最佳的生长和代谢状态，这可能是利用该酵母在工业上大规模发酵生产 PUFA 潜在的制约因素。

参 考 文 献

[1] 赵成,陈雪芳,熊莲,等.脂溶性荧光染料测定微生物油脂的研究进展[J].新能源进展,2019,7(1):85-92.

Zhao C, Chen XF, Xiong L, et al. Research progress of determining microbial lipid by liposoluble fluorescent probe [J] . Adv N Renew Energy, 2019, 7 (1) : 85-92.

[2] Carlson SJ, Fallon EM, Kalish BT, et al. The role of the ω-3 fatty acid DHA in the human life cycle [J] . JPEN J Parenter Enteral

- Nutr, 2013, 37 (1) : 15-22.
- [3] Lorente-Cebrián S, Costa AGV, Navas-Carretero S, et al. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence [J] . J Physiol Biochem, 2013, 69 (3) : 633-651.
- [4] Ajami M, Eghtesadi S, Habibey R, et al. Effect of short and long-term treatment with omega-3 Fatty acids on scopolamine-induced amnesia [J] . Iran J Pharm Res, 2012, 11 (2) : 533-540.
- [5] 袁姚梦, 邢新会, 张翀. 微生物细胞工厂的设计构建: 从诱变育种到全基因组定制化创制 [J] . 合成生物学, 2020, 1 (6) : 656-673.
- Yuan YM, Xing XH, Zhang C. Progress and prospective of engineering microbial cell factories: from random mutagenesis to customized design in genome scale [J] . Synth Biol J, 2020, 1 (6) : 656-673.
- [6] 赵禹, 刘士琦, 李建, 等. 解脂耶氏酵母作为微生物细胞工厂的应用研究进展 [J] . 食品科学, 2021, 42 (19) : 388-400.
- Zhao Y, Liu SQ, Li J, et al. Advances in the application of *Yarrowia lipolytica* as a microbial cell factory [J] . Food Sci, 2021, 42 (19) : 388-400.
- [7] 王晖, 薛庆节, 杨媛媛, 等. 解脂耶氏酵母在食品工业中的应用 [J] . 食品与发酵工业, 2018, 44 (8) : 291-297.
- Wang H, Xue QJ, Yang YY, et al. Application of *Yarrowia lipolytica* in food industry [J] . Food Ferment Ind, 2018, 44 (8) : 291-297.
- [8] 郑煜泓, 孙青, 陈振, 等. 微生物细胞工厂生产化学品的研究进展——以几种典型小分子和大分子化学品为例 [J] . 化工学报, 2021, 72 (12) : 6109-6121.
- Zheng YK, Sun Q, Chen Z, et al. Progress for chemicals production via microbial cell factory: selecting several small molecules and macromolecular products as examples [J] . CIESC J, 2021, 72 (12) : 6109-6121.
- [9] Rossetti RG, Seiler CM, DeLuca P, et al. Oral administration of unsaturated fatty acids: effects on human peripheral blood T lymphocyte proliferation [J] . J Leukoc Biol, 1997, 62 (4) : 438-443.
- [10] Chang CS, Sun HL, Lii CK, et al. Gamma-linolenic acid inhibits inflammatory responses by regulating NF-kappaB and AP-1 activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages [J] . Inflammation, 2010, 33 (1) : 46-57.
- [11] Engler MM, Schambelan M, Engler MB, et al. Effects of dietary gamma-linolenic acid on blood pressure and adrenal angiotensin receptors in hypertensive rats [J] . Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 218 (3) : 234-237.
- [12] Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases [J] . Exp Biol Med, 2008, 233 (6) : 674-688.
- [13] Das UN. Tumoricidal and anti-angiogenic actions of gamma-linolenic acid and its derivatives [J] . Curr Pharm Biotechnol, 2006, 7 (6) : 457-466.
- [14] Escrich E, Moral R, Grau L, et al. Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer [J] . Mol Nutr Food Res, 2007, 51 (10) : 1279-1292.
- [15] Tilvis RS, Helve E, Miettinen TA. Improvement of diabetic control by continuous subcutaneous insulin infusion therapy changes fatty acid composition of serum lipids and erythrocytes in type 1 (insulin-dependent) diabetes [J] . Diabetologia, 1986, 29 (10) : 690-694.
- [16] Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, et al. Long-chain conversion of [¹³C] linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men [J] . J Lipid Res, 2005, 46 (2) : 269-280.
- [17] Tai EKK, Wang XB, Chen ZY. An update on adding docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) to baby formula [J] . Food Funct, 2013, 4 (12) : 1767-1775.
- [18] Russell FD, Bürgin-Maunders CS. Distinguishing health benefits of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids [J] . Mar Drugs, 2012, 10 (11) : 2535-2559.
- [19] Gupta A, Barrow CJ, Puri M. Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils [J] . Biotechnol Adv, 2012, 30 (6) : 1733-1745.
- [20] Aasen IM, Ertesvåg H, Heggset TMB, et al. Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA) , squalene, and carotenoids [J] . Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100 (10) : 4309-4321.
- [21] Ji XJ, Ren LJ, Nie ZK, et al. Fungal arachidonic acid-rich oil: research, development and industrialization [J] . Crit Rev Biotechnol, 2014, 34 (3) : 197-214.
- [22] Chang LL, Lu HQ, Chen HQ, et al. Lipid metabolism research in oleaginous fungus *Mortierella alpina*: current progress and future prospects [J] . Biotechnol Adv, 2022, 54: 107794.

- [23] Uemura H. Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives [J] . *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95 (1) : 1-12.
- [24] Xue ZX, Sharpe PL, Hong SP, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* [J] . *Nat Biotechnol*, 2013, 31 (8) : 734-740.
- [25] Zhang HY, Zhang LN, Chen HQ, et al. Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP: citrate lyase from *Mus musculus* [J] . *J Biotechnol*, 2014, 192 Pt A: 78-84.
- [26] Gong YM, Wan X, Jiang ML, et al. Metabolic engineering of microorganisms to produce omega-3 very long-chain polyunsaturated fatty acids [J] . *Prog Lipid Res*, 2014, 56: 19-35.
- [27] Xiong XC, Chen SL. Expanding toolbox for genes expression of *Yarrowia lipolytica* to include novel inducible, repressible, and hybrid promoters [J] . *ACS Synth Biol*, 2020, 9 (8) : 2208-2213.
- [28] 赵禹, 赵雅坤, 刘士琦, 等. 非常规酵母的分子遗传学及合成生物学研究进展 [J] . *微生物学报*, 2020, 60 (8) : 1574-1591.
- Zhao Y, Zhao YK, Liu SQ, et al. Advances in molecular genetics and synthetic biology tools in unconventional yeasts [J] . *Acta Microbiol Sin*, 2020, 60 (8) : 1574-1591.
- [29] Ogrydziak DM, Scharf SJ. Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica* CX161-1B [J] . *J Gen Microbiol*, 1982, 128 (6) : 1225-1234.
- [30] Müller S, Sandal T, Kamp-Hansen P, et al. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica* [J] . *Yeast*, 1998, 14 (14) : 1267-1283.
- [31] Larroude M, Rossignol T, Nicaud JM, et al. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica* [J] . *Biotechnol Adv*, 2018, 36 (8) : 2150-2164.
- [32] Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review [J] . *J Biotechnol*, 2004, 109 (1-2) : 63-81.
- [33] Hong SP, Seip J, Walters-Pollak D, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to express secretory invertase with strong FBA11N promoter [J] . *Yeast*, 2012, 29 (2) : 59-72.
- [34] Jin EQ, Wong L, Jiao Y, et al. Rapid evolution of regulatory element libraries for tunable transcriptional and translational control of gene expression [J] . *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2 (4) : 295-301.
- [35] Dulermo R, Brunel F, Dulermo T, et al. Using a vector pool containing variable-strength promoters to optimize protein production in *Yarrowia lipolytica* [J] . *Microb Cell Fact*, 2017, 16 (1) : 31.
- [36] 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] . *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2000, 2 (2) : 207-216.
- [37] Blazeck J, Liu LQ, Redden H, et al. Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach [J] . *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77 (22) : 7905-7914.
- [38] Blazeck J, Reed B, Garg R, et al. Generalizing a hybrid synthetic promoter approach in *Yarrowia lipolytica* [J] . *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97 (7) : 3037-3052.
- [39] Shabbir Hussain M, Gambill L, Smith S, et al. Engineering promoter architecture in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J] . *ACS Synth Biol*, 2016, 5 (3) : 213-223.
- [40] Lv YK, Gu Y, Xu JL, et al. Coupling metabolic addiction with negative autoregulation to improve strain stability and pathway yield [J] . *Metab Eng*, 2020, 61: 79-88.
- [41] Tai M, Stephanopoulos G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production [J] . *Metab Eng*, 2013, 15: 1-9.
- [42] 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* [J] . *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2000, 5 (5) : 320-326.
- [43] Sassi H, Delvigne F, Kar T, et al. Deciphering how LIP2 and POX2 promoters can optimally regulate recombinant protein production in the yeast *Yarrowia lipolytica* [J] . *Microb Cell Fact*, 2016, 15 (1) : 159.
- [44] Trassaert M, Vandermies M, Carly F, et al. New inducible promoter for gene expression and synthetic biology in *Yarrowia lipolytica* [J] . *Microb Cell Fact*, 2017, 16 (1) : 141.
- [45] Mori K, Iwama R, Kobayashi S, et al. Transcriptional repression by glycerol of genes involved in the assimilation of n-alkanes and fatty

- acids in yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. FEMS Yeast Res, 2013, 13 (2): 233-240.
- [46] Park YK, Korpys P, Kubiak M, et al. Engineering the architecture of erythritol-inducible promoters for regulated and enhanced gene expression in *Yarrowia lipolytica* [J]. FEMS Yeast Res, 2019, 19 (1): 10.1093/femsyr/foy105.
- [47] Park BG, Kim J, Kim EJ, et al. Application of random mutagenesis and synthetic FadR promoter for *de novo* production of ω -hydroxy fatty acid in *Yarrowia lipolytica* [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 624838.
- [48] Larroude M, Celinska E, Back A, et al. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene [J]. Biotechnol Bioeng, 2018, 115 (2): 464-472.
- [49] Gao SL, Han LN, Zhu L, et al. One-step integration of multiple genes into the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. Biotechnol Lett, 2014, 36 (12): 2523-2528.
- [50] Wong L, Holdridge B, Engel J, et al. Genetic tools for streamlined and accelerated pathway engineering in *Yarrowia lipolytica* [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1927: 155-177.
- [51] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases [J]. Nat Methods, 2009, 6 (5): 343-345.
- [52] Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability [J]. PLoS One, 2008, 3 (11): e3647.
- [53] Ma JB, Gu Y, Marsafari M, et al. Synthetic biology, systems biology, and metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* toward a sustainable biorefinery platform [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2020, 47 (9-10): 845-862.
- [54] Ding Y, Wang KF, Wang WJ, et al. Increasing the homologous recombination efficiency of eukaryotic microorganisms for enhanced genome engineering [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103 (11): 4313-4324.
- [55] Cui ZY, Zheng HH, Jiang ZN, et al. Identification and characterization of the mitochondrial replication origin for stable and episomal expression in *Yarrowia lipolytica* [J]. ACS Synth Biol, 2021, 10 (4): 826-835.
- [56] Ji QC, Mai J, Ding Y, et al. Improving the homologous recombination efficiency of *Yarrowia lipolytica* by grafting heterologous component from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metab Eng Commun, 2020, 11: e00152.
- [57] Bai QY, Cheng S, Zhang JL, et al. Establishment of genomic library technology mediated by non-homologous end joining mechanism in *Yarrowia lipolytica* [J]. Sci China Life Sci, 2021, 64 (12): 2114-2128.
- [58] Jang IS, Yu BJ, Jang JY, et al. Improving the efficiency of homologous recombination by chemical and biological approaches in *Yarrowia lipolytica* [J]. PLoS One, 2018, 13 (3): e0194954.
- [59] Wagner JM, Williams EV, Alper HS. Developing a piggyBac transposon system and compatible selection markers for insertional mutagenesis and genome engineering in *Yarrowia lipolytica* [J]. Biotechnol J, 2018, 13 (5): e1800022.
- [60] Gao SL, Tong YY, Zhu L, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production [J]. Metab Eng, 2017, 41: 192-201.
- [61] Lv YK, 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* [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8 (3): 568-576.
- [62] Lv YK, Marsafari M, Koffas M, et al. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8 (11): 2514-2523.
- [63] Lv YK, Qian S, Du GC, et al. Coupling feedback genetic circuits with growth phenotype for dynamic population control and intelligent bioproduction [J]. Metab Eng, 2019, 54: 109-116.
- [64] Zhu HZ, Jiang S, Wu JJ, et al. Production of high levels of 3, 3'-S-astaxanthin in *Yarrowia lipolytica* via iterative metabolic engineering [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70 (8): 2673-2683.
- [65] Zhou QH, Jiao LC, Li WJ, et al. A novel cre/lox-based genetic tool for repeated, targeted and markerless gene integration in *Yarrowia lipolytica* [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (19): 10739.
- [66] Guo ZP, Borsenberger V, Croux C, et al. An artificial chromosome yIAC enables efficient assembly of multiple genes in *Yarrowia lipolytica* for biomanufacturing [J]. Commun Biol, 2020, 3 (1): 199.
- [67] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41 (7): 4336-4343.
- [68] Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, et al. Synthetic RNA

- polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica* [J]. *ACS Synth Biol*, 2016, 5 (4): 356-359.
- [69] Schwartz C, Shabbir-Hussain M, Frogue K, et al. Standardized markerless gene integration for pathway engineering in *Yarrowia lipolytica* [J]. *ACS Synth Biol*, 2017, 6 (3): 402-409.
- [70] Weninger A, Hatzl AM, Schmid C, et al. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *J Biotechnol*, 2016, 235: 139-149.
- [71] Horwitz AA, Walter JM, Schubert MG, et al. Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-cas [J]. *Cell Syst*, 2015, 1 (1): 88-96.
- [72] Jacobs JZ, Ciccaglione KM, Tournier V, et al. Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5344.
- [73] Gao SL, Tong YY, Wen ZQ, et al. Multiplex gene editing of the *Yarrowia lipolytica* genome using the CRISPR-Cas9 system [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43 (8): 1085-1093.
- [74] Holkenbrink C, Dam MI, Kildegaard KR, et al. EasyCloneYALI: CRISPR/Cas9-based synthetic toolbox for engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Biotechnol J*, 2018, 13 (9): e1700543.
- [75] Gao DF, Smith S, Spagnuolo M, et al. Dual CRISPR-Cas9 cleavage mediated gene excision and targeted integration in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Biotechnol J*, 2018, 13 (9): e1700590.
- [76] Larroude M, Trabelsi H, Nicaud JM, et al. A set of *Yarrowia lipolytica* CRISPR/Cas9 vectors for exploiting wild-type strain diversity [J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 42 (5): 773-785.
- [77] Schwartz C, Cheng JF, Evans R, et al. Validating genome-wide CRISPR-Cas9 function improves screening in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Metab Eng*, 2019, 55: 102-110.
- [78] Ng TK, Yu AQ, Ling H, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* towards food waste bioremediation: production of fatty acid ethyl esters from vegetable cooking oil [J]. *J Biosci Bioeng*, 2020, 129 (1): 31-40.
- [79] Qi BX, Fraser T, Mugford S, et al. Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22 (6): 739-745.
- [80] Liu HH, Ji XJ, Huang H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: past, present and future [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33 (8): 1522-1546.
- [81] Dobrowolski A, Drzymała K, Mituła P, et al. Production of tailor-made fatty acids from crude glycerol at low pH by *Yarrowia lipolytica* [J]. *Bioresour Technol*, 2020, 314: 123746.
- [82] Christen S, Sauer U. Intracellular characterization of aerobic glucose metabolism in seven yeast species by ¹³C flux analysis and metabolomics [J]. *FEMS Yeast Res*, 2011, 11 (3): 263-272.
- [83] Bati N, Hammond EG, Glatz BA. Biomodification of fats and oils: trials with *Candida lipolytica* [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1984, 61 (11): 1743-1746.
- [84] Park YK, Ledesma-Amaro R. What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry? [J]. *Trends Biotechnol*, 2023, 41 (2): 242-254.
- [85] Hamilton ML, Powers S, Napier JA, et al. Heterotrophic production of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids by trophically converted marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Mar Drugs*, 2016, 14 (3): 53.
- [86] Damude HG, Zhang HX, Farrall L, et al. Identification of bifunctional delta12/omega3 fatty acid desaturases for improving the ratio of omega3 to omega6 fatty acids in microbes and plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (25): 9446-9451.
- [87] Cordova LT, Alper HS. Production of α -linolenic acid in *Yarrowia lipolytica* using low-temperature fermentation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102 (20): 8809-8816.
- [88] Tezaki S, Iwama R, Kobayashi S, et al. Δ 12-fatty acid desaturase is involved in growth at low temperature in yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488 (1): 165-170.
- [89] Li HB, Alper HS. Producing biochemicals in *Yarrowia lipolytica* from xylose through a strain mating approach [J]. *Biotechnol J*, 2020, 15 (2): e1900304.
- [90] Salunke D, Manglekar R, Gadre R, et al. Production of polyunsaturated fatty acids in recombinant *Lipomyces starkeyi* through submerged fermentation [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2015, 38 (7): 1407-1414.
- [91] Xie DM, Jackson EN, Zhu Q. Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99 (4):

- 1599-1610.
- [92] Gu ZN, Shan K, Chen HQ, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids and their role in cancer chemoprevention [J] . Curr Pharmacol Rep, 2015, 1 (5) : 283-294.
- [93] Chen Y, Meesapyodsuk D, Qiu X. Transgenic production of omega-3 very long chain polyunsaturated fatty acids in plants: accomplishment and challenge [J] . Biocatal Agric Biotechnol, 2014, 3 (1) : 38-43.
- [94] Gemperlein K, Dietrich D, Kohlstedt M, et al. Polyunsaturated fatty acid production by *Yarrowia lipolytica* employing designed myxobacterial PUFA synthases [J] . Nat Commun, 2019, 10 (1) : 4055.
- [95] Sun ML, Madzak C, Liu HH, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for efficient γ -linolenic acid production [J] . Biochem Eng J, 2017, 117: 172-180.
- [96] Zhang BX, Rong CC, Chen HQ, et al. *De novo synthesis of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid in oleaginous yeast Yarrowia lipolytica* [J] . Microb Cell Fact, 2012, 11: 51.
- [97] Zhang BX, Chen HQ, Li M, et al. Genetic engineering of *Yarrowia lipolytica* for enhanced production of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid [J] . Microb Cell Fact, 2013, 12: 70.
- [98] Liu HH, Madzak C, Sun ML, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for arachidonic acid production through rapid assembly of metabolic pathway [J] . Biochem Eng J, 2017, 119: 52-58.
- [99] Norashikin MN, Loh SH, Aziz A, et al. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in *Chlorella vulgaris* using an endogenous omega-3 fatty acid desaturase gene with its promoter [J] . Algal Res, 2018, 31: 262-275.
- [100] 肖虎. 硫化叶菌病毒基因 *ORF2* 促进红冬孢酵母产多不饱和脂肪酸和类胡萝卜素的研究 [D] . 昆明: 昆明理工大学, 2018.
- Xiao H. *ORF2* gene of *Sulfolobus* promoting polyunsaturated fatty acids and carotenoids produced by *Rhodospiridium kratochvilovae* [D] . Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2018.
- [101] 李志朋. 裂殖壶菌利用聚酮合成酶途径合成 ω -3 多不饱和脂肪酸代谢机制 [D] . 厦门: 厦门大学, 2019.
- Li ZP. Metabolic mechanism of ω -3 polyunsaturated fatty acid synthesis in *Schizochytrium* through polyketide synthase pathway [D] . Xiamen: Xiamen University, 2019.
- [102] Amiri-Jami M, Abdelliamid AG, Hazaa M, et al. Recombinant production of omega-3 fatty acids by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 [J] . FEMS Microbiol Lett, 2015, 362 (20) : fnv166.
- [103] 张明亮. 海洋微生物聚酮合酶途径合成不饱和脂肪酸的分子调控机制研究 [D] . 福州: 福建师范大学, 2019.
- Zhang ML. Molecular regulation mechanism of biosynthesis unsaturated fatty acids by polyketide synthase pathway in marine microbes [D] . Fuzhou: Fujian Normal University, 2019.
- [104] Gemperlein K, Zipf G, Bernauer HS, et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for production of docosahexaenoic acid based on a myxobacterial PUFA synthase [J] . Metab Eng, 2016, 33: 98-108.
- [105] Liu HH, Wang C, Lu XY, et al. Improved production of arachidonic acid by combined pathway engineering and synthetic enzyme fusion in *Yarrowia lipolytica* [J] . J Agric Food Chem, 2019, 67 (35) : 9851-9857.

(责任编辑 朱琳峰)