



多倍体模式微生物细胞工厂

王毕轶凡, 赵龙, 谭俊洁, 王颖, 贾斌*

合成生物技术全国重点实验室, 教育部合成生物学前沿科学中心, 天津大学合成生物与生物制造学院, 天津 300072

* 联系人, E-mail: bin.jia@tju.edu.cn

收稿日期: 2025-06-30; 接受日期: 2025-08-30; 网络版发表日期: 2025-09-26

国家重点研发计划(批准号: 2019YFA0903800)和国家自然科学基金(批准号: 31800719)资助

摘要 多倍体微生物因其基因组倍性改变, 具有部分代谢路径表达增强、代谢流量提升及适应环境能力提高等特点, 在生物燃料、高附加值化学品和药物合成等工业领域展现出巨大潜力. 可以通过合成生物技术等手段, 将多倍体模式微生物改造为能够高效生产特定生物产品的细胞工厂. 本文系统综述多倍体酿酒酵母与大肠杆菌的构建策略, 分析多倍化对细胞生理特征的影响机制, 并总结其在化学品生产、异源蛋白表达、萜类合成等方面的研究进展以及一些工业生产中的应用案例. 最后, 本文对当前技术瓶颈及未来发展方向进行探讨.

关键词 多倍体, 细胞工厂, 酿酒酵母, 大肠杆菌, 合成生物学

随着合成生物学的发展, 微生物细胞工厂作为重要研究方向已经日趋成熟, 广泛应用于医药、食品、饲料和众多化学品生产. 其中, 以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)为代表的模式微生物, 因其具有遗传背景清楚、遗传操作方便、生长速度快、培养条件简单等优势^[1,2], 成为微生物细胞工厂的主要底盘细胞. 细胞工厂有效避免化学合成及动植物提取带来的诸多问题, 如破坏环境、周期长、成本高等, 因此同时具有经济效益和可持续发展效益^[3]. 然而, 传统单倍体微生物常面临代谢通量不足、环境适应能力有限等问题, 导致细胞工厂稳定性差、产量低, 制约其工业化潜力.

在传统遗传学分类中, 酿酒酵母通常被划分为单倍体、二倍体和多倍体三种主要状态, 其中自然条件下酿酒酵母主要以单倍体和二倍体形态存在. 然而,

从染色体组倍数本质来看, 二倍体与多倍体均属于基于单倍体的染色体组加倍状态, 因此为突出多倍体在遗传特性应用潜力上与单倍体的差异, 本文将二倍体纳入多倍体范畴进行讨论. 类似地, 实验室常用大肠杆菌一般情况为单倍体, 本文将同时拥有大于等于两套基因组的大肠杆菌细胞统一归类为多倍体. 除传统的同种染色体或基因组加倍形成的多倍体外, 不同种微生物细胞融合后形成的含有异源染色体或基因组的嵌合细胞^[4], 本文也将此类异源融合微生物纳入多倍体范畴进行研究. 为明确区分, 将由同种染色体或基因组加倍产生的多倍体定义为“同源多倍体”; 而携带异种染色体或基因组的微生物定义为“异源多倍体”.

多倍体模式微生物(如多倍体酿酒酵母和多倍体大肠杆菌)因其基因组拷贝数增加, 展现出更强的代谢

引用格式: 王毕轶凡, 赵龙, 谭俊洁, 等. 多倍体模式微生物细胞工厂. 中国科学: 生命科学

Wang B Y F, Zhao L, Tan J J, et al. Polyploid model microbial cell factories (in Chinese). Sci Sin Vitae, doi: [10.1360/SSV-2025-0203](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0203)

能力、更高的胁迫适应性以及更稳定的遗传特性, 为构建稳定、高效的细胞工厂提供新的解决方案. 主要展现几个方面的独特优势: (i) 由于基因组拷贝数增加, 关键代谢酶表达水平提升, 优化代谢碳流分布^[5]; (ii) 胁迫适应性增强, 相关基因的多拷贝对抑制剂、高温、低温等环境胁迫的耐受性显著提高^[6]; (iii) 多拷贝基因冗余, 使细胞允许更大幅度的基因编辑与异源途径整合, 表达水平更稳定^[7]. 这些优势都为使用多倍体模式微生物构建稳定、高效的细胞工厂提供理论基础. 然而, 多倍化带来的代谢负担、基因组不稳定性等问题仍需解决. 目前, 多倍体酿酒酵母的构建策略主要包括物理化学诱导、基因编辑、原生质体融合等方法, 而大肠杆菌作为原核生物, 构建策略主要为基因编辑干扰细胞分裂.

本文围绕多倍体模式微生物细胞工厂的设计与应

用, 综述酿酒酵母和大肠杆菌的多倍体构建策略, 解析多倍化对细胞生理和代谢网络的影响机制, 总结其在乙醇、高附加值化合物及异源蛋白生产中的进展, 并探讨优化多倍体模式微生物细胞工厂的潜在路径. 本综述旨在为多倍体微生物的理性设计和工业化应用提供理论参考和技术展望(图1).

1 多倍体模式微生物的构建策略

真核生物与原核生物在细胞结构和遗传机制上的根本差异, 导致二者的多倍化策略存在显著区别. 酿酒酵母作为真核微生物, 因其具有有性生殖、减数分裂等生物学过程, 可通过物理或化学诱导的途径实现基因组倍性变化. 同时, 基因工程策略和合成生物学工具(如CRISPR/Cas9)的引入进一步拓展其多倍化策略

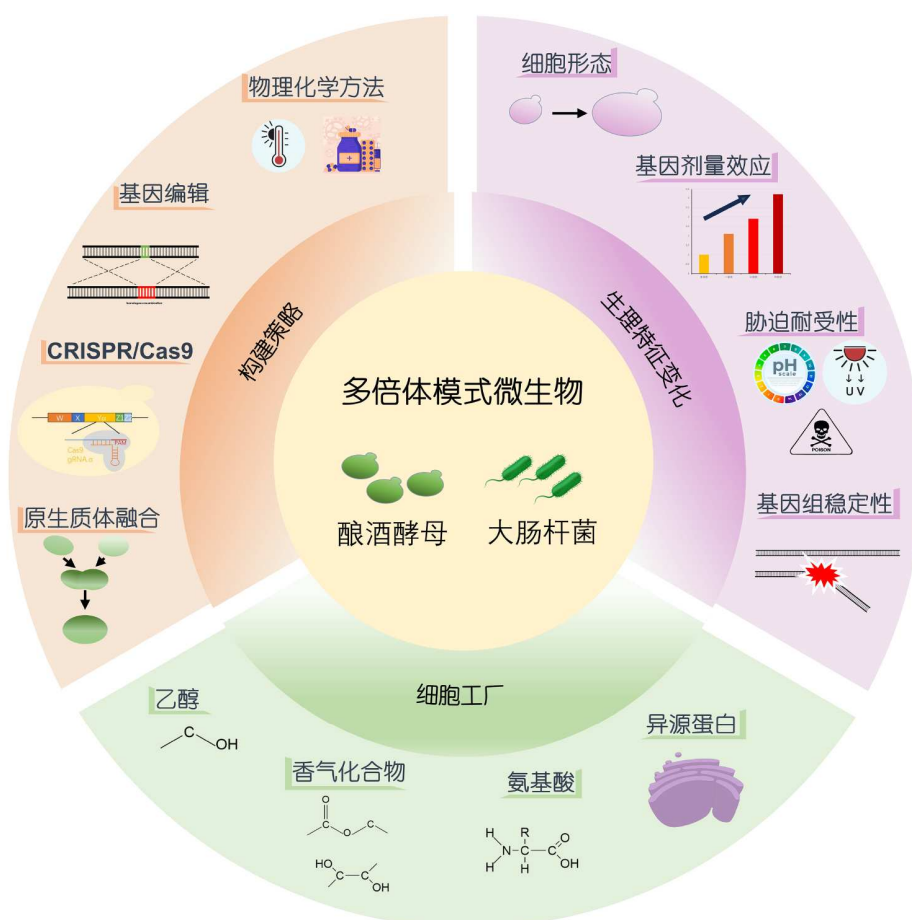


图1 多倍体模式微生物总结图: 构建策略、生理特征变化及细胞工厂应用

Figure 1 Schematic summary of polyploid model microorganisms: construction strategies, physiological trait changes, and cell factory applications

的多样性。相比之下, 大肠杆菌作为典型的原核生物, 缺乏组蛋白包裹的染色体和核膜等真核特征性结构, 通常被认为只含有一条环状染色体。当前大肠杆菌的多倍化策略以基因工程与合成生物学工具为主, 如通过基因编辑调控细胞分裂^[8]或利用CRISPR技术改造染色体^[9]; 同时也存在原生质体融合的相关研究, 但其融合效率较低, 应用范围相对有限^[10](图2)。

1.1 物理化学诱导策略

酿酒酵母在自然界中大多以单倍体或二倍体存在, 单倍体可以通过融合形成二倍体, 而二倍体减数分裂可以产生单倍体孢子。这一切都是由酿酒酵母的交配型决定的, 分为a型和 α 型。a型单倍体可以和 α 型单倍体交配形成二倍体 $\alpha\alpha$, 而二倍体 $\alpha\alpha$ 又可以出芽生殖形成两种交配型的单倍体孢子。酿酒酵母的交配型是由MAT基因座的基因决定的, 带有MATa等位基因的酵母为a型交配型, 而带有MAT α 等位基因的酵母为 α 型交

配型^[11]。酿酒酵母的HO基因会使MAT基因座经过同源重组可以发生相互的转变。利用这个原理, Klaus^[12]首先使带营养缺陷型基因的单倍体酵母细胞在完全培养基中生长, 部分细胞会自发突变产生相反交配型并与亲代细胞交配, 形成二倍体细胞。接着利用有丝分裂交换获得交配型纯合的二倍体, 在基本培养基(不含营养缺陷型所需物质)与原始单倍体交配, 逐步获得三倍体、四倍体菌株。

杂合二倍体 $\alpha\alpha$ 理论上无法与其他交配型酵母进行交配, 但杂合子群体中极少数细胞可以通过MAT基因座的基因重组由交配型杂合状态(如 $\alpha\alpha$)转换为纯合状态(如 $\alpha\alpha$ 和 $\alpha\alpha$)。Gunge和Nakatomi^[13]发现, 这种转变的频率约 10^{-6} 到 10^{-7} , 而在更高倍性的杂合子中甚至低于 10^{-8} 。因此通过诱导酵母产生呼吸缺陷突变(RD突变), 结合特定培养基(如乳酸乙醇培养基), 利用不同交配型杂合子的低频交配型转变, 与单倍体进行连续多次的杂交, Gunge和Nakatomi成功培育出三倍体至

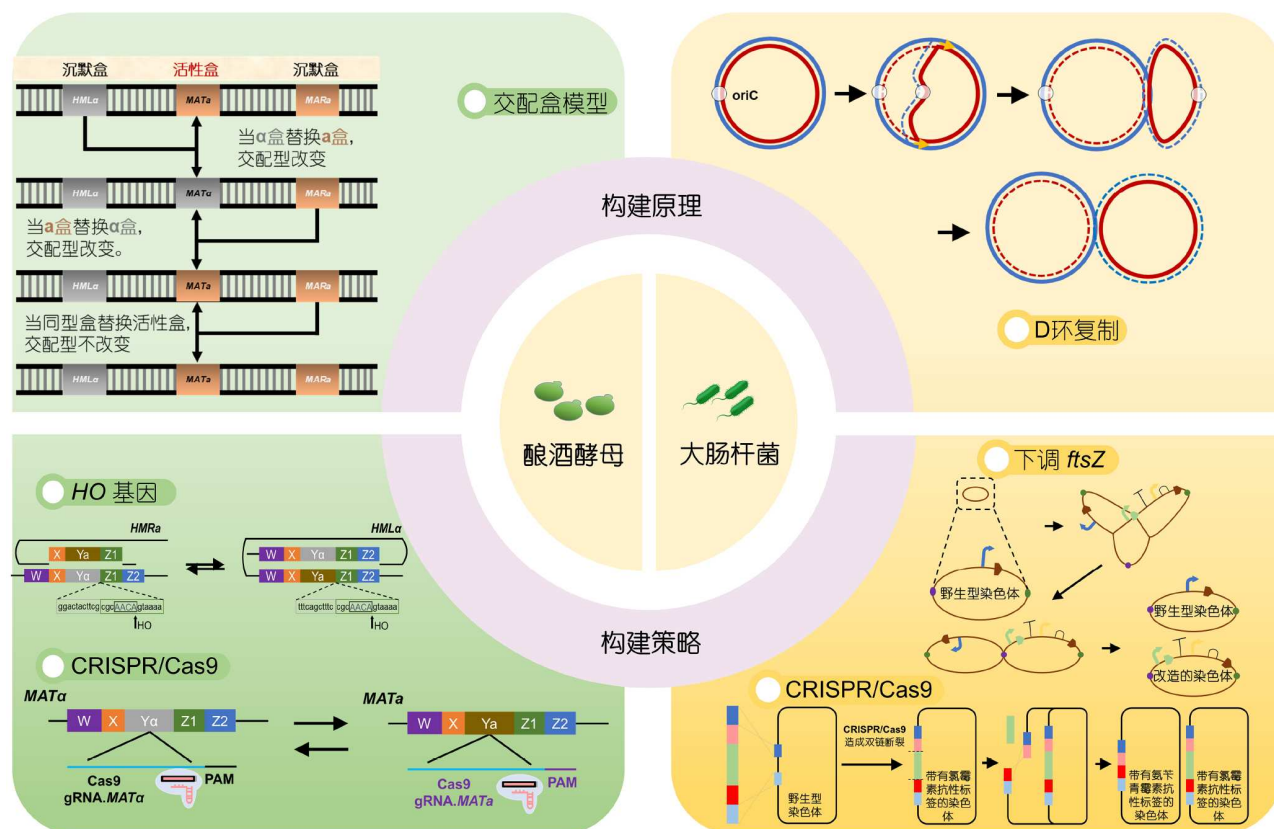


图2 多倍体模式微生物构建的合成生物技术策略

Figure 2 Synthetic biotechnology strategies for the construction of polyploid model microorganisms

八倍体的多倍体酿酒酵母。

除利用营养缺陷或呼吸缺陷的化学手段, 还可以通过热处理等物理手段获得多倍体。Tani等人^[14,15]发现酿酒酵母的孢子发芽过程中对其进行热处理, 会使其发生“内有丝分裂二倍化”, 使染色体数目加倍, 从而获得多倍体细胞。对于异宗配合的酵母菌株, 得到的二倍体细胞具有交配能力, 可用来构建四倍体细胞; 类似地, Salmon^[16]于热处理酵母孢子, 通过测量细胞体积和DNA含量获得三倍体和四倍体细胞, 避免杂交过程和营养标签的使用。

某些抗微管蛋白药物可以通过抑制微管组装, 干扰纺锤体形成, 使细胞不分裂直接进入间期, 导致染色体数目加倍。Zimmermann等人^[17]利用抗微管蛋白药物奥科达唑让酵母细胞出现染色体分离异常, 产生非整倍体, 同时发现丙酮也能诱导酵母细胞产生非整倍体。然而, 抗微管蛋白药物和丙酮等有机试剂的浓度精度要求很高, 浓度过低难以产生诱导效果, 浓度过高会显著降低细胞存活率, 且很难保证细胞稳定产生多倍体, 而是产生大量非整倍体。另外, 一些抗生素也可以间接造成大肠杆菌多倍化。Hongbaek等人^[18]发现大肠杆菌在头孢氨苄作用下形成长丝状体, 其核区正常分裂, 但细胞本身不分裂, 导致多个核区像“串珠”一样连续排列, 包含多个基因组, 间接造成大肠杆菌的多倍化。类似地, 头孢氨苄诱导也存在浓度窗口过窄的问题, 且产生的多倍体大肠杆菌并不稳定。

原生质体融合技术作为一种能够突破物种生殖隔离的经典细胞工程手段, 其在多倍体微生物构建和不同物种之间的杂交中的应用潜力正逐渐凸显^[4]。该技术通过酶解细胞壁获得原生质体, 在聚乙二醇(PEG)法、电融合法或激光诱导融合法等物理或化学诱导^[19]下实现相同或不同物种遗传物质的直接融合, 可有效整合亲本菌株的优良性状。Ferenczy和Maráz^[20]利用PEG使存活状态正常的酵母和一种缺乏线粒体DNA的酵母进行原生质体融合, 获得线粒体功能恢复且营养互补的二倍体菌株。楼纯菊等人^[21]和Takagi等人^[22]利用PEG法将酿酒酵母SC-5单倍体和SC-75二倍体融合, 获得营养型互补的三倍体酵母, 其生长速率和葡萄糖发酵速率均比亲本菌株有显著提高; Zhao等人^[23]将发酵葡萄糖和木糖能力强的酵母菌株LF1和耐抑制剂的酵母菌株BLN26融合, 获得能在含抑制剂的培养基中快速生长、高效产乙醇的二倍体酵母。大肠

杆菌等革兰氏阴性菌的原生质体融合效率显著低于酵母, 需依赖电融合等方法提高成功率^[10]。大肠杆菌原生质体融合的研究也包括同物种和不同物种的融合, 例如任涛等人^[24]将两种对不同药物有耐药性的禽大肠杆菌O2和O78进行融合, 培养出能用于疫苗的双价弱毒菌株; 李木子^[25]融合大肠杆菌ZYD₂和多杀性巴氏杆菌YB₂, 将融合菌制成疫苗, 给鸭子注射后, 能同时检测到针对两种细菌的抗体, 提高疫苗效率; 而Chen等人^[26]则将大肠杆菌HB101和一种厌氧细菌FEM29融合, 使融合菌株能够同时降解纤维素和脱氢二香草醛。尽管原生质体融合法理论上可同时融合多个亲本的基因组, 且避免外源基因或基因工具的导入, 但相比合成生物技术手段效率更低, 操作更复杂, 精确性差。然而, 原生质体融合法非常适合用于不同物种细胞之间的融合, 形成跨物种的多倍体, 尤其适用于未建立高效基因编辑体系或代谢网络仍不透明的菌株, 能够使融合细胞在不解析具体功能基因的情况下, 同时获得不同亲本细胞的优良性状。

上述方法虽能获得多倍体, 但依赖特定遗传标记、操作繁琐、精准性差且效率较低, 极大限制其在工业生产中的应用。相比之下, 合成生物技术能够精准地、较高效率地实现多倍体的定向构建与性状优化。

1.2 合成生物技术策略

酿酒酵母*MAT*基因座决定其交配型, 且*HO*基因使酿酒酵母可以通过同源重组改变交配型, 那么单倍体酿酒酵母在没有等位基因的情况下是如何改变交配型的? 交配盒模型(mating-type cassette)^[11,27]认为在*MAT*基因座的上下游分别存在一个*HML*和*HMR*基因座, 通常情况下*HML*携带*a*基因, *HMR*携带*α*基因。*HML*的*a*基因和*HMR*的*α*基因不表达, 称为沉默盒(silent cassette), 只有存在于*MAT*上的*a*或*α*基因表达, 称为活性盒(active cassette)。当沉默盒的拷贝替代活性盒后, 如果两者本身所带基因型是不同的, 则发生交配型转换。基于这个原理, 便可利用外源的*HO*基因来激活交配型转换的过程, 得到二倍体纯合子, 进而通过交配获得多倍体^[28]。Hou^[29,30]和丁文涛^[31]构建YCplac33-GHK质粒, 包含受半乳糖启动子控制的*HO*和*KanMX*抗性标签, 利用激活的*HO*基因启动酿酒酵母交配型的转换, 再使不同交配型的单倍体、二倍体进行杂交, 即可获得三倍体和四倍体。类似地, 杨华军等人^[32]构建YCp50-

OH, 利用*HO*基因使杂合二倍体酿酒酵母转换为纯合, 并进一步构建三倍体和四倍体. 这样的方法构建的多倍体菌株基因型背景已知, 且无需考虑是否含有选择标记, 更便捷更高效.

大肠杆菌由于无法有性生殖, 难以像酿酒酵母一样在改变交配型后反复融合获得多倍体. 因此针对大肠杆菌的多倍化策略主要是打破大肠杆菌“分裂-复制”的同步性, 使染色体数目在未分裂细胞内积累. Wang等人^[8]将含有氯霉素筛选标签和弱化*ftsZ* (控制细胞分裂的主要基因)的表达盒整合到基因组*ftsZ*之前, 用氯霉素进行筛选, 获得多倍体大肠杆菌. 但该方法无法稳定获得特定倍性的单种菌株, 构建出来的菌株中有33.2%细胞含2条染色体, 57.7%含3条, 8.9%含4条, 需要经过后续的筛选获得单一倍性.

在探索微生物多倍体构建的技术进程中, 合成生物学展现出独特的优势. 作为一门融合传统生物学、工程学、数学及计算机科学的前沿交叉学科, 合成生物学被誉为第三次生物技术革命^[33,34]. 合成酵母基因组计划(Sc2.0)是合成生物学领域的里程碑项目, 旨在从头设计并合成酿酒酵母的完整基因组^[35], 并实现合成酵母与天然酵母在功能上的完全对等. 天津大学、清华大学、华大基因完成四条合成型染色体的构建, 其中天津大学元英进团队完成synV和synX的构建^[35-38]. 在sc2.0工程突破单条染色体合成技术的基础上, Jia等人^[39]将含有synV染色体的单倍体酵母和含synIII染色体的单倍体酵母进行交配, 获得同时含有synIII和synV的二倍体酿酒酵母, 并通过多轮重组和筛选进化出类胡萝卜素产量提高38.8倍的菌株.

CRISPR作为新兴的合成生物学工具, 具有精准靶向、高效可控、广泛适应等特性^[40], 相较于传统物理化学诱导方法, 可通过设计特异性sgRNA实现多倍体菌株的精准、高效构建, 为模式微生物的多倍化提供了新的思路. 基于其诸多优势, Xie等人^[41]开发一种交配型转换工具, 其原理为通过设计特定的gRNA引导Cas9蛋白, 在*MAT*基因位点制造双链断裂, 同时转入目标交配型的DNA片段(如*MATa*或*MATα*供体序列), 利用同源重组实现交配型转换. 使用这种方法, 单倍体和二倍体细胞的交配型转换效率可达80%以上, 且无需诱导*HO*基因或复杂的孢子分离步骤. 随后, Sun^[42]和Krogerus^[43]等人均利用这种方法构建四倍体酵母, 并发掘出多倍体酿酒酵母作为细胞工厂的优势. 利用

CRISPR/Cas9工具, Wang等人^[9]在大肠杆菌的染色体上插入一个包含两个抗性基因和CRISPR识别位点编辑盒. 通过CRISPR/Cas9系统诱导染色体断裂, 利用细菌自身的修复机制, 让一条染色体断裂后重组成两条独立的染色体, 并通过抗生素筛选, 成功得到含有两套基因组的二倍体大肠杆菌, 且在双抗生素的培养基中基因组构型十分稳定.

合成生物技术策略在多倍体酿酒酵母和大肠杆菌的构建中展现出显著优势, 不仅突破传统诱变方法的低精确度局限性, 更通过基因组改造的广泛性推广到更多微生物, 为工业菌株的多倍化开辟新路径.

2 多倍化对模式微生物生理特性的影响机制

微生物因基因组拷贝数增加导致的多倍化, 出现细胞形态、基因剂量效应、胁迫抗性增强和基因组稳定性下降等特性(表1).

2.1 酿酒酵母

DNA不仅是遗传信息的载体, 其数量本身也影响细胞的生理特征. 1971年, 关于DNA含量和细胞大小的关系, Bennett提出核型理论, 即细胞核内DNA的总量通过物理化学性质直接影响细胞表型, 而不依赖于DNA的编码信息^[51,52]. 无论物种差异多大, 同类细胞(如脊椎动物红细胞、植物分生细胞)的体积始终与DNA含量成正比, 例如脊椎动物中, 红细胞体积与DNA含量呈对数线性关系, 斜率接近1, 即体积随DNA含量增加而线性增大^[44]. 对于多倍体酿酒酵母, 基因组倍性的增加导致细胞核体积和DNA含量的增加, 进一步导致细胞体积的增加. Dilorio等人^[5]测定多倍体酿酒酵母的体积, 发现从单倍体到四倍体, 细胞由球形渐变为椭球形且体积递增, (其中单倍体酿酒酵母为78 μm^3 , 二倍体为230 μm^3 , 三倍体达到430 μm^3 , 四倍体达到460 μm^3). 随着基因组倍性的变化, 多倍体酿酒酵母的某些基因的表达也会直接或间接影响细胞体积. 例如, Galitski等人^[46]发现酵母某些蛋白表达水平的上调或下调程度与基因组倍数成正比, 对比不同倍性的酿酒酵母发现10个基因因为倍性升高而上调, 7个基因因为倍性升高而下调. 其中G1周期蛋白Cln1和Pcl1的表达受到抑制, 多倍体酿酒酵母G1期延长, 细胞

表 1 多倍体酿酒酵母和多倍体大肠杆菌生理特征变化对比

Table 1 Comparisons of physiological characteristic changes between polyploid *Saccharomyces cerevisiae* and polyploid *Escherichia coli*

菌种	多倍体酿酒酵母	多倍体大肠杆菌
细胞形态	体积显著增大; 形状从球形变为椭球形; 细胞核体积增大; 比表面积缩小 ^[5,44-46]	细胞体积、长度增加; 多个染色体聚集成单一较大核区 ^[8,9]
生长特性	生长速率下降: 细胞周期延长, G1期、S期DNA复制时间、 M期染色体分离时间延长; 活细胞密度随倍性升高而降低 ^[6,45-47]	倍增时间延长; 稳定期生物量提升, 细胞密度更高; 代谢网络冗余导致生长耗能增加 ^[8,9]
胁迫抗性	细胞壁稳定性增强; 高温、高渗、低pH、乙醇胁迫、醛类胁迫、氧化胁迫、 高糖胁迫等条件下较单倍体抗性更强 ^[5-7,17]	代谢冗余提升环境适应能力; 低pH较单倍体抗性更差, 但紫外线、乙酸胁迫抗性 更强 ^[8,9]
基因组稳定性	稳定性下降 ^[48-50]	自然状态多倍体易退化, 人工构建菌株在无筛选压力下 染色体丢失率高 ^[9]

持续生长, 因此细胞体积增大。

然而, 随着细胞体积的增大, 细胞比表面积却在不断缩小, 这会影响跨膜运输的效率。多倍体细胞中离子通道和转运蛋白的密度相对降低, 可能导致物质交换速率减慢^[45], 多倍体酿酒酵母也符合以上规律, 活细胞密度随着倍性的升高而降低, 这也解释了细胞体积为什么不能无限增大。同时, 多倍体酿酒酵母的生长速率随倍性升高而下降, 这不仅是因为细胞比表面积降低导致的物质交换速率减慢, 更因为酿酒酵母倍性的增加促使一个细胞周期对应时间的增加^[47]。由于DNA含量的增加, 基因组复制所需时间增加, 细胞S期增长, 同时G2期检验点、纺锤体组装检验点的相关基因位点的表达也会受到基因组倍性变化的影响^[6,47]。多倍体酿酒酵母的染色体组增多, 需要更多时间完成同源染色体的分离, M期延长, 进而导致细胞周期延长, 生长速率减慢^[45]。

多倍体酵母在细胞结构重塑的同时, 基因组拷贝数的增加带来的剂量效应、核质比例与膜结构的改变都使其对环境胁迫的响应展现出显著优势。非整倍体酿酒酵母是指其体染色体数目偏离正常整倍数的遗传变异菌株。非整倍体的出现最能够体现基因组拷贝数增加带来的剂量效应对环境变化的响应。Morard等人^[53]对比五种乙醇耐受性不同的酿酒酵母, 发现高乙醇耐受性的菌株普遍存在第三条染色体的非整倍体。转录组分析显示, 第三条染色体上的基因在乙醇压力下表达显著上调, 说明这条染色体上的基因对酵母应对乙醇至关重要。额外的基因组拷贝意味着相关基因的剂量增加, 让酵母更大通量地合成应对乙醇压力的蛋白质。Morard也发现这种非整倍体现象不仅在实验

室进化实验中出现, 也存在于自然分离的酵母菌株中, 说明它是酵母在长期乙醇环境中进化出的一种生存策略: 酵母通过非整倍体快速重组基因组, 在单基因缺失或极端环境中实现“跳跃式”适应, 其效率远超逐点突变。前人研究表明, 在不同的环境压力下(如高温、高pH、DNA损伤和内质网应激等), XVI染色体上的*RLM1*, *MKK2*, XIII染色体上的*ATR1*, XV染色体上的*STI1*, *PDR5*, III染色体上的*CCP1*, *UTH1*, V染色体、II染色体上的*ALG7*, *PRE7*, *YBR085C-A*, XI染色体上的*CCP1*, *UTH1*, I染色体上的*CLN3*, *CCR4*及染色体XII上的snoRNA, 额外的基因组拷贝导致的剂量效应, 缓解不同环境压力下的细胞异常状态^[54-61], 如表2所示。

乙醇发酵是酿酒酵母细胞工厂最主要、最核心的用途之一。然而, 发酵过程中往往面临高浓度底物、不适宜温度以及乙醇累积导致的渗透压、毒性等胁迫。耐受性越强的酿酒酵母细胞工厂, 越能在高负荷发酵条件下保持稳定代谢, 最终实现乙醇产量的最大化。因此酿酒酵母乙醇耐受性的提高一直是乙醇发酵中的热门研究方向。类似非整倍体, 酿酒酵母倍性的整倍增加也会提高对乙醇胁迫等环境的耐受性。丁文涛^[31]发现, 四倍体酿酒酵母在12%乙醇中存活率较二倍体提高15%, 在30%葡萄糖的发酵环境下酿酒酵母的抗性随倍性的增加而增强, 但乙醇产量因能量分流而下降; Voordeckers等人^[62]在恒浊器中进行为期两年的进化实验, 发现单倍体酿酒酵母迅速二倍体化, 且二倍体在9%乙醇环境下的适应性显著高于单倍体, 除倍性的增加以外还有*VPS70*等位点突变的原因; Origone等人^[63]将酿酒酵母与葡萄汁酵母(*Saccharomyces uvarum*)和

表 2 酿酒酵母非整倍体的产生原因和抗性机制
Table 2 Causes of aneuploidy and resistance mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*

非整倍染色体	环境胁迫	抗性机制	参考文献
I, XII	SUMO蛋白酶缺失	染色体 I 的 <i>CLN3</i> , <i>CCR4</i> , 染色体 XII 的 snoRNA 基因表达变化	[60,61]
II	内质网应激	染色体 II 的 <i>ALG7</i> , <i>PRE7</i> , <i>YBR085C-A</i> 表达上调	[58]
III	高温	染色体 III 多于 14 个基因的表达上调.	[57]
V	高 pH	未知	[57]
XI	氧化胁迫	染色体 XI 的 <i>CCP1</i> 和 <i>UTH1</i> 表达上调	[59]
XIII	DNA 损伤	染色体 XIII 的 <i>ATRI</i> 上调	[54]
XV	<i>Hsp90</i> 抑制导致蛋白毒性	染色体 XV 的 <i>STI1</i> , <i>PDR5</i> 上调	[56]
XVI	<i>MYO1</i> 基因缺失	染色体 XVI 的 <i>RLM1</i> 上调	[55]

真贝酵母(*Saccharomyces eubayanus*)杂交获得三倍体酵母,发现其在低温、高糖、高乙醇多胁迫条件下的综合表现优于亲本.除主流的葡萄糖底物发酵,多倍体酿酒酵母在其他碳源条件下也具有优势. Liu 等人^[7]在玉米水解物中利用木糖发酵,发现三倍体酵母菌株通过增强高温耐受性、乙酸盐代谢能力及木糖代谢通量,显著提升复杂水解物中的发酵效率; Selmecki 等人^[64]指出四倍体酵母在棉子糖培养基中的适应速率显著快于单倍体和二倍体,且拥有更高的有益突变率和更高的选择系数.研究指出,多倍体酿酒酵母耐受性的提高主要因为以下几个方面: (i) 增加应激响应基因剂量,如 *ADH1* 每细胞酶活性与倍性呈正比,增强乙醇代谢能力^[5]; (ii) 转运蛋白扩增,如 *HXT6/7amp* 表达增强加速葡萄糖摄取,减少胞外糖积累,降低渗透压胁迫^[65]; (iii) 信号通路激活,如 *SNF3* 突变上调 *HXT2-4*, 防止高糖下转运蛋白饱和^[65]; (iv) 细胞壁稳定性增强,如 *CHS3* 表达上调提高细胞壁厚度^[31]、*SSD1* 和 *UTH1* 突变使细胞壁锚定更稳定、微孔直径缩小^[66]; (v) 细胞膜通透性调控,如泛素连接酶基因 *Rsp5* 表达上调 2.3 倍,加速损伤膜蛋白的降解与更新^[62].

然而,酿酒酵母并不是倍性越高对所有胁迫条件的耐受程度就越强.高克慧^[6]利用实验室常用酵母菌株 CEN.PK2-1C 和 CEN.PK2-1D 构建出二倍体至四倍体,在多种压力下测试发现,高温、高渗、低 pH、醛类胁迫、氧化胁迫等条件下,二倍体和三倍体在展现出综合优势,尤其是三倍体在高渗、甲酸等胁迫下表现优异.这说明,胁迫耐受性与倍性的关系并非简单正相关,而是呈现显著的胁迫类型特异性及基因型-环境互作效应.因此需针对目标胁迫环境(特定温度、特定 pH、高乙醇浓度等)定向选择倍性,而非盲目追求高

倍体.

同时,多倍体酿酒酵母由于染色体分离效率降低、纺锤体附着异常等问题,基因组稳定性有所下降.随着倍性的增加, VII 染色体的丢失频率显著上升,其中三倍体丢失率约为二倍体的 30 倍,而四倍体高达 1000 倍^[48].四倍体酿酒酵母由于基因组数量大幅增加,对同源重组基因(如 *RAD51*, *RAD54*)、姐妹染色单体黏连基因(如 *SMC1*)和纺锤体功能基因(如 *IPL1*, *BIMI*)依赖更强^[49,50],这些基因缺陷会导致特异性致死. Storchová 等人^[49]在四倍体酵母中发现高频 syntelic 附着(姐妹染色单体的两个动粒同时附着于同一纺锤体极)及纺锤体极体表面积和纺锤体长度不匹配的问题,前者导致染色体无法正常分离,引发非整倍体或染色体丢失,而后者导致微管附着模式异常,引发高频染色体分离错误.基因组的不稳定可以产生丰富的遗传变异,为复杂性状的进化提供原材料,但会逐步破坏菌株遗传的一致性,进而损害代谢途径的稳定性,制约细胞工厂的运行效率.因此,在后续的多倍体酿酒酵母细胞工厂的研究中,可以通过基因组重排技术^[39]、提升相关基因表达^[49,50]或设置环境条件选择多倍体^[67]等措施避免上述问题的出现.

2.2 大肠杆菌

大肠杆菌是以二分裂的方式进行无性生殖,经染色体复制、核区分离和细胞膜内陷完成分裂.此前认为稳定期细胞会持续分裂至单染色体,每个子细胞均为单倍体,然而 Akerlund 等人^[68]发现培养多天后,稳定期的大肠杆菌群体中始终有大量细胞含有 2 条、4 条甚至 8 条染色体,从未观察到全部细胞只有 1 条染色体的情况.虽然细胞有多个染色体,但显微镜下通常

只看到1个核区,说明多个染色体可能聚集在一起,形成一个较大的核区结构,成为多倍体大肠杆菌。与酿酒酵母不同的是,这种自然形成的多倍体大肠杆菌几乎不分裂,仅仅维持存活。这种自然形成的多倍体大肠杆菌和人工构建的大肠杆菌均由细胞分裂抑制得到。

类似于酿酒酵母,大肠杆菌倍性升高也伴随着细胞形态、生长情况和胁迫耐受性的改变。野生型及实验室常用模式大肠杆菌的长度通常为1~3 μm ,呈短杆状,而二倍体大肠杆菌长度增加到4~5 μm ,体积和表面积分别增加50%和30%^[9]; Wang等人^[8]构建的多倍体大肠杆菌(含有2~4倍染色体)相比初始单倍体大肠杆菌体积增加了0.5倍。倍性的增加也导致大肠杆菌DNA含量大幅增加和生长速率的降低。多倍体大肠杆菌的倍增时间一定程度上高于单倍体,如二倍体在无抗生素条件下倍增时间延长至77.66 min,相对单倍体增加了45%^[9]。然而,稳定期的多倍体大肠杆菌相比单倍体生物量有所提升,细胞密度更高^[31]。这些现象的出现可以归因于代谢网络冗余,染色体复制耗能导致生长速率下降,但基因冗余允许其在稳定期积累更多物质。

与酿酒酵母相同,大肠杆菌多倍化后在多种胁迫条件下展现出显著的耐受性优势。例如低pH环境、乙酸胁迫、紫外线辐射的条件下,多倍体大肠杆菌的生长情况均好于单倍体^[8,9]。耐受优势的出现主要来源于染色体增加带来的基因剂量效应,如多倍体中酸性应激基因*gadA*, *gadB*, *gadC*显著上调,增强质子泵活性和胞内pH缓冲能力,帮助细胞抵御酸性损伤,从而增强其在低pH环境中的生长能力^[8]。

尽管自然状态下的大肠杆菌也存在很多多倍体情况,但其基因组不稳定,容易出现退化。类似地,人工构建的多倍体在抗生素筛选条件下表现出较高的遗传稳定性,但在无选择压力时易发生染色体丢失。通过CRISPR技术构建的二倍体大肠杆菌,在含有筛选成分的培养基中连续传代100代后,仍有超过95%的克隆维持双染色体结构。当移除筛选压力后,仅有12.5%的克隆保持二倍体状态^[9]。这种不稳定性在多倍体大肠杆菌作为细胞工厂进行工业化生产时,可能导致代谢途径中断或产物合成效率波动,因此需要通过抗生素筛选、代谢物压力或人工分区系统等条件进行稳定性控制,以确保其在发酵中维持目标表型。

3 多倍体细胞工厂研究进展

传统单倍体微生物在面对发酵中的高渗、底物抑制和产物毒性等挑战时,常因代谢通量不足、胁迫抗性差或遗传稳定性差等劣势限制应用,需要进行相应的改造从而适应生产。而多倍体具有诸多优点,尤其是基因剂量效应,使其在作为细胞工厂进行工业发酵时相对单倍体展现出诸多优势(表3)。

3.1 乙醇

乙醇作为一种绿色化学品,常常作为染料、溶剂、食品添加剂应用于能源、化工、食品、医药等行业。酿酒酵母在工业发酵中乙醇的研究和应用占到很大的比例。酿酒酵母乙醇发酵的主要途径是糖酵解途径(Embden-Meyerhof-Parnas pathway, EMP)。首先,葡萄糖被酿酒酵母吸收进入糖酵解途径,经过十步反应释放能量产生丙酮酸。接着,丙酮酸经过丙酮酸脱羧酶的催化生成 CO_2 和乙醛。最后,乙醛通过乙醇脱氢酶产生乙醇。前人的研究集中在针对关键基因的活性调节、代谢路径的重构,如醇脱氢酶基因*ADH1*, *ADH2*^[75~77]、甘油-3-磷酸脱氢酶基因*GDP1*, *GDP2*^[7~78]等,而多倍体酿酒酵母乙醇生产的研究主要依赖于多倍体本身的胁迫抗性优势等特点以及进一步的基因组重排或适应性进化。Dilorio等人^[5]在YEPA培养基中对单倍体至四倍体酵母进行分批厌氧发酵,结果显示每细胞乙醇积累速率随细胞倍性升高而增加,其中四倍体菌株每细胞乙醇积累量可达单倍体的6.9倍。酶活性分析显示,乙醇脱氢酶和色氨酸合成酶的单位细胞的酶活性与细胞倍性呈直接比例关系。侯丽华^[30]构建三倍体、四倍体和非整倍体菌株HLH33, HLH34和HLH34-M,调控全局转录因子*SPT15/SPT3*及进行基因组重排,显著提高底物-产物转化率,残糖降低58.70%,乙醇产量提高5.33%;丁文涛^[31]利用CN1为出发菌株,构建三倍体和四倍体酿酒酵母,发现因代谢负担的增加,高倍体酿酒酵母的耗糖速度降低。进一步通过EMS诱变和基因组重排筛选出了在浓醪发酵中残糖浓度降低61%、乙醇产量提高1.3%的菌株WTE2,提升至13.3 g/100 mL。然而因为能量分流,四倍体产量略降,为11.0 g/100 mL,但其在13%乙醇胁迫下存活率达60.8%,更适合高浓度乙醇发酵场景,这与Scott等人^[65]的四倍体的*HXT*基因拷贝数增加及染色质开放状态导致四倍体在高糖环境

表 3 多倍体微生物细胞工厂的应用实例
Table 3 Representative application examples of polyploid microbial cell factories

产物	底盘	策略	产量/结果	参考文献
乙醇	多倍体酿酒酵母	过表达截短的 <i>tHMGR</i> 和 <i>IDII</i> , 反向融合 <i>ERG20_{ww}/t3CrGES</i> 与另一拷贝 <i>ERG20_{ww}</i> 共表达, 补料分批发酵	四倍体菌株每细胞乙醇积累量达单倍体的6.9倍	[5]
		构建三倍体、四倍体和非整倍体菌株, 调控全局转录因子 <i>SPT15/SPT3</i> 及进行基因组重排	残糖降低58.70%, 乙醇产量提高5.33%	[30]
		构建三倍体和四倍体, EMS诱变和基因组重排筛选	浓醪发酵中乙醇产量提升至13.3 g/100 mL	[31]
		在携带XR-K270R突变的单倍体至三倍体菌株中, 于40℃两阶段发酵	三倍体菌株木糖利用率提升4倍, 乙醇产率达10.6 g/L	[7]
		共表达 α -淀粉酶和糖化酶, 直接以木薯淀粉为底物发酵	4天内乙醇体积分数达8.68%	[69]
		利用含约19个拷贝的 <i>bglI</i> 基因的单倍体酵母BGL-a构建不同倍性菌株	二倍体BGL-a α 发酵乙醇滴度35.65 g/L, 产率83.69%	[70]
	拉格酵母	构建二倍体至四倍体, 25℃麦芽汁发酵	四倍体乙醇含量达(10.4 $\pm$ 0.06)% ABV	[71]
2,3-丁二醇		部分敲除丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶, 引入细菌来源的2,3-丁二醇合成途径并表达NADH氧化酶	葡萄糖发酵中产量达178 g/L, 木薯水解液中达132 g/L	[72]
乙酸乙酯	多倍体酿酒酵母	将 <i>PGK1</i> 启动子精确插入 <i>ATF1</i> 基因上游, 过表达所有 <i>ATF1</i> 等位基因	乙酸乙酯产量增加约20%, 达23.98~24.00 mg/L	[73]
		以高产乙酸乙酯的单倍体为亲本构建二倍体和四倍体	乙酸乙酯产量达(3431.05 $\pm$ 38.08) mg/L	[42]
β -葡萄糖苷酶		通过 δ 序列整合和三倍体减数分裂筛选非整倍体菌株	β -葡萄糖苷酶活性达34 U/mL	[74]
类胡萝卜素		基于含有synIII和synV染色体的二倍体, 采用MuSIC策略经5轮迭代循环	类胡萝卜素产量达37.39 mg/L, 是初始菌株的38.8倍	[39]
香气化合物	拉格酵母	杂交育种获得四倍体	3-甲基丁酸乙酯2.60 mg/L、己酸乙酯0.48 mg/L、乙酸乙酯62.84 mg/L	[71]
L-苏氨酸	多倍体大肠杆菌	构建含2~4条染色体的菌株, 分批补料发酵	产量达160.3 g/L, 较单倍体提升14.7%	[8]

下耗糖效率更高的结论具有一致性。在利用葡萄糖作为底物进行乙醇发酵的研究中, 多倍体菌株展现出一定程度的高产率与适应性。然而, 随着循环经济理念和“双碳”目标的深入贯彻, 以粮食作物为原料的葡萄糖底物与粮食安全存在潜在的矛盾, 逐渐推动研究者将目光转向木质素、玉米提取物等非粮食作物资源。相较于传统单倍体或二倍体菌株, 多倍体酿酒酵母因其基因组的加倍特性赋予更强的代谢可塑性, 能够通过基因剂量效应激活更多与复杂碳水化合物代谢相关的基因表达, 从而高效利用这些结构更为复杂的底物。Liu等人^[7]在未解毒玉米芯水解物中对携带XR-K270R突变的单倍体至三倍体菌株进行40℃两阶段发酵, 三倍体菌株S16率达10.6 g/L, 是二倍体的7倍, 木糖利用率提升4倍。该菌株的优势源自多倍化增强的木糖异构酶XYL1基因剂量和高温耐受性基因HSP26的上调。三倍体酵母的核孔复合体密度比二倍体增加25%^[45], 这

可能加速了木糖代谢基因XYL1的mRNA输出, 这也进一步促进了其在玉米芯水解物中木糖利用速率的提升。Liu等人^[69]在多倍体重组菌株*S.cerevisiae*-AG中共表达 α -淀粉酶和糖化酶, 可直接以木薯淀粉为底物发酵乙醇。4天内乙醇体积分数达8.68%, 而淀粉水解率达82.7%, 比原始出发菌的乙醇产量提高了46.66%。研究发现重组菌株培养上清液中 α -淀粉酶活性达1940 U/mL, 糖化酶活性达15.5 U/mL, 分别为单独表达菌株的2.03和2.7倍。Wang等人^[70]另辟蹊径, 将研究方向转到二倍体酵母的交配型, 利用含约19个拷贝的*bglI*基因的单倍体酵母BGL-a构建8株不同倍性不同交配型的菌株, 在酸和碱预处理的玉米芯中进行乙醇发酵, 发现二倍体BGL-a α 发酵效果最佳, 乙醇滴度和产率分别为35.65 g/L和83.69%, 说明异宗配合二倍体酵母相对同宗配合更适合于纤维素乙醇发酵。

在酿酒酵母杂交种或其他菌种的乙醇发酵中, 多

倍体的优势也有所体现. 拉格酵母(*Saccharomyces pastorianus*)由酿酒酵母和真贝酵母得到, 兼具酿酒酵母高产乙醇的特性和真贝酵母耐低温的优势^[79,80], 已广泛应用于啤酒酿造. Zavaleta等人^[79]利用酿酒酵母和真贝酵母杂交得到拉格酵母, 发现杂交种主要以三倍体为主, 且生物乙醇谱系的HB41中与脂肪酸代谢及乙醇耐受相关的位点*POT1*, *ECI1*和*MGA2*上调, 可以作为乙醇发酵的多倍体细胞工厂; 类似地, Krogerus等人^[71]构建二倍体至四倍体的拉格酵母, 25°C麦芽汁发酵23天后, 四倍体、三倍体乙醇含量达(10.4±0.06)% ABV, (9.8±0.25)% ABV, 而二倍体仅(5.3±0.01)% ABV, 同时三倍体和四倍体表现出更快的发酵速率和更高的风味酯浓度(如3-甲基丁酸乙酯、己酸乙酯); 酿酒酵母与真贝酵母的四倍体杂交种, 利用减数分裂分离产生孢子克隆, 成功获得具有表型多样性的拉格酵母菌株. 随后, 该课题组^[81]又利用减数分裂分离产生孢子克隆, 发现倍性与发酵速率正相关, 其中部分四倍体菌株发酵速度更快, 香气化合物产量较亲本提升2.5倍, 但多倍体基因组稳定性较差, 连续传代后单倍体分离株出现染色体拷贝数变异.

多倍体酿酒酵母因其基因剂量效应和胁迫耐受性, 在乙醇发酵领域展现出显著优势. 然而, 高倍性菌株仍面临基因组稳定性差、代谢负担大等问题. 未来可通过CRISPR技术精准编辑优化关键基因、结合基因组重排技术提升遗传稳定性, 或利用适应性进化筛选低代谢负担的多倍体菌株, 进一步释放多倍体在乙醇高效生产中的应用潜力.

3.2 高附加值化合物

除了乙醇发酵, 多倍体模式微生物在高附加值化合物和异源蛋白合成领域同样具有很强的潜力. 这类化合物(如萜类、氨基酸等)因结构复杂、功能独特, 在医药、食品、日用品、精细化工等领域具有重要的作用和应用价值.

与乙醇发酵类似地, 高附加值化合物的发酵中多倍体菌株也由于基因剂量效应扩展了应用场景. Lee和Seo^[72]利用CRISPR/Cas9技术在工业多倍体酿酒酵母中部分敲除丙酮酸脱羧酶*PDC1*/5/6和乙醇脱氢酶*ADH1*, 引入细菌来源的2,3-丁二醇合成途径*alsS*, *alsD*并表达NADH氧化酶*noxE*. 在葡萄糖和木薯水解液发酵中均表现优异, 2,3-丁二醇产量分别达到178和132 g/L.

该菌株可以稳定遗传, 克服多倍体基因组不稳定的劣势; 而Dong等人^[73]则将*PGK1*启动子精确插入*ATF1*基因上游, 构建所有*ATF1*等位基因过表达的多倍体酿酒酵母菌株. 实验表明该菌株的*ATF1* mRNA水平提高4倍, 乙醇乙酰转移酶*AATase*活性提升3倍, 乙酸乙酯产量较亲本菌株增加约20%, 达到23.98~24.00 mg/L. 该研究证明在多倍体酵母中使用“自克隆”策略进行基因编辑的可行性. Sun等人^[42]聚焦乙酸乙酯的生产, 以高产乙酸乙酯的单倍体酿酒酵母PG α 为亲本, 构建一系列二倍体和四倍体酵母, 其中四倍体菌株酸耐受性和发酵性能进一步提升, 乙酸乙酯产量达到(3431.05±38.08) mg/L, 是工业菌株YQ的3.2倍; 在酶蛋白的稳定高效表达方面, Yang等人^[74]通过 δ 序列整合和三倍体减数分裂筛选出非整倍体酵母菌株, β -葡萄糖苷酶活性达34 U/mL, 是单倍体的2.2倍, 连续传代50代后活性保持在98.5%. 该研究表明, δ 整合结合三倍体减数分裂可通过增加基因剂量和诱导非整倍体变异, 有效提高外源基因表达水平, 为酿酒酵母的异源蛋白表达和纤维素利用效率优化提供新途径.

除天然染色体介导的多倍体酿酒酵母构建策略外, 整合合成染色体的多倍体体系在相关研究领域也展现出良好应用前景. 例如, Jia等人^[39]基于含有synIII和synV染色体的二倍体酵母, 开发Multiplex SCRaM-bLE Iterative Cycling (MuSIC)策略, 经5轮迭代循环使类胡萝卜素产量达到37.39 mg/L, 是初始菌株的38.8倍. 存在合成型染色体的菌株, 由于loxPsym位点的存在, 在Cre重组酶被激活时重排效率更高; 并且因为合成型染色体与野生型染色体共存, 形成遗传冗余, 能够避免单倍体重排时必需基因缺失导致的细胞死亡.

在多倍体酿酒酵母研究的基础上, 酿酒酵母杂交种和多倍体大肠杆菌也为高附加值产品生产开辟新路径. 前文提到的Krogerus课题组对拉格酵母做的工作中, 杂交育种获得的四倍体酵母中3-甲基丁酸乙酯、己酸乙酯、乙酸乙酯、3-甲基丁醇、2-苯乙醇产量均比其他倍性的菌株高, 分别达到2.60, 0.48, 62.84, 89.42和1.56 mg/L^[71]. 基于上述结果推测, 拉格酵母在挥发性香气成分的生物合成中也具备优良的底盘细胞潜力. 而Wang等人^[8]则构建含2~4条染色体的多倍体大肠杆菌菌株, 在分批补料发酵中L-苏氨酸产量达160.3 g/L, 较单倍体菌株提升14.7%, 刷新工业发酵纪录, 为氨基酸生产提供高抗逆底盘菌株. 转录组分析显

示, TCA循环基因*gltA*, *sdhABCD*和苏氨酸合成基因*thrB/C*上调1.5~2.0倍, 同时该菌株对低pH和乙酸的抗性也显著增强。

通过基因编辑、合成染色体整合及跨物种杂交等策略, 多倍体模式微生物在萜类、氨基酸、酯类等复杂分子的高效生产中取得一定成效, 成为优良的细胞工厂底盘。然而, 高倍性菌株的基因组稳定性调控、代谢网络平衡优化及复杂底物利用效率提升等问题仍待进一步的研究。

4 挑战与未来方向

多倍体模式微生物凭借其基因组倍性变化导致的基因剂量效应和代谢冗余优势, 在人工细胞工厂生产中展现出巨大的潜力。相比传统的微生物改造方法, 多倍体模式微生物(即多倍化手段)具有以下显著优势和创新: (i) 传统微生物改造中, 关键基因的过表达依赖质粒载体或单拷贝整合, 往往存在易丢失或表达量有限的问题, 而多倍体可通过染色体拷贝数增加实现基因剂量提升, 如四倍体酿酒酵母的ADH1酶活性与倍性呈正比^[5], 无需额外载体构建; (ii) 传统基因工程需解析底盘菌株的代谢网络和异源基因的调控网络, 而原生质体融合技术的多倍化策略可直接整合不同物种的代谢优势, 如Zhao等人^[23]融合酿酒酵母LF1与BLN26, 获得兼具双功能的二倍体菌株, 且显著缩短菌株开发周期; (iii) 传统微生物改造通过单点突变或多点突变等手段增强胁迫抗性^[56], 而多倍体可通过基因剂量效应^[7]、细胞结构重塑^[31]、代谢网络冗余^[8]等多维度多方面共同作用提升菌株耐受性。

然而, 多倍体模式微生物细胞工厂仍面临诸多挑战。遗传层面, 多倍体微生物的基因组稳定性随倍性升高而一定程度上下降, 染色体分离异常也会导致代谢途径相关基因丢失, 进而破坏菌株遗传的一致性。多倍体酿酒酵母和大肠杆菌在无筛选压力下均存在基因组退化问题^[9,48]。代谢负担方面, 基因组倍性增加导致DNA复制能耗上升、细胞周期延长, 生长速率的下降与产物合成效率形成矛盾, 生长需要能量的上升也导致能量分流倾向于细胞周期而非生产, 限制了工业发酵中的生物量积累。此外, 大肠杆菌多倍体的构建

依赖基因编辑干扰细胞分裂, 难以稳定获得多倍体菌株。

作为一门前沿交叉学科, 合成生物学为突破上述瓶颈提供新的解决方案和创新策略。在遗传稳定性调控方面, 可利用CRISPR技术定向编辑关键基因, 或是结合合成染色体构建, 增强代谢途径表达的稳定性; 针对代谢负担问题, 在发酵前期维持二倍体保证生长速率, 后期触发基因组加倍也许是平衡生长代谢与生产的可行方法。另外, 实验室适应性进化和逆向代谢工程的策略, 也为多倍体菌代谢路径的优化提供新路径。

目前多倍体研究主要集中在酿酒酵母与大肠杆菌, 未来可基于基因剂量效应这一共性机制, 探索其在其他真菌、细菌等微生物中产物合成的潜力。如巴斯德毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)的交配型转换可通过两个MAT基因座的同源重组实现^[82], 而解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)的交配型转换可通过同源重组或CRISPR手段实现MAT基因座上MATA和MATB的切换, 进而完成交配型的转换^[83]。因此, 可利用类似于酿酒酵母的交配策略^[27~29]或原生质体融合策略^[21,23]构建多倍体, 比较不同倍性下的生长情况、胁迫耐受程度和产物产量(如外源蛋白和脂类物质), 筛选最优工程菌; 而针对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和克雷伯氏菌(*Klebsiella spp*)^[84], 可利用类似于大肠杆菌多倍化的手段^[31], 使用FtsZ抑制剂(PC190723)处理细胞, 抑制细菌细胞分裂相关蛋白FtsZ的功能, 使细胞无法分裂但持续进行DNA复制, 从而形成包含多个基因组拷贝的多倍体细胞^[85], 进而利用类似地方法筛选优势菌株。

多倍体模式微生物细胞工厂在降低工业生产碳排放、推动绿色制造等方面具有重要的意义, 深度契合国家生物制造战略中关于构建高效、绿色、安全产业体系的核心发展方向, 也与“双碳”目标的战略要求高度适配。目前, 针对酿酒酵母、大肠杆菌等模式微生物的多倍体研究已取得系列进展, 为其在生物制造中的应用奠定基础。尽管基因组稳定性调控、代谢负担平衡等问题仍需解决, 但随着合成生物学技术的不断发展, 这些瓶颈有望逐步突破。未来, 通过进一步拓展多倍体策略在更多微生物中的应用, 其将成为推动生物制造产业高效、可持续发展的重要技术支撑, 为实现工业领域的绿色转型提供有力保障。

参考文献

- 1 Zhong Y T, Shang C Y, Wang Y D, et al. Advances in synthesis of succinic acid using yeast cell factories (in Chinese). *Chin J Biotech*, 2024, 40: 2644–2665 [钟馥涛, 尚长宇, 王言东, 等. 利用酵母细胞工厂合成丁二酸的研究进展. *生物工程学报*, 2024, 40: 2644–2665]
- 2 Yang Y Q, Liu Q Q, Tian S, et al. Research progress in energy metabolism design of cell factories (in Chinese). *Chin J Biotech*, 2025, 41: 1098–1111 [杨一群, 刘清清, 田硕, 等. 细胞工厂能量代谢设计研究进展. *生物工程学报*, 2025, 41: 1098–1111]
- 3 Wang C L, Cao Z Q, Qin X H, et al. A perspective: engineering of *Escherichia coli* as a microbial cell factory for terpenoids production (in Chinese). *Chin J Bioprocess Eng*, 2019, 17: 1–7 [王崇龙, 曹智钦, 覃小华, 等. 大肠杆菌微细胞工厂生产萜类化合物研究进展. *生物加工过程*, 2019, 17: 1–7]
- 4 Liu M Y, Li P, Long M. Advances in microbial protoplast fusion technology in genetic breeding and its application (in Chinese). *China Feed*, 2014, 07: 17–21 [刘敏跃, 李鹏, 龙淼. 微生物原生质体融合育种技术及其应用研究进展. *中国饲料*, 2014, 07: 17–21]
- 5 Dilorio A A, Weathers P J, Campbele D A. Comparative enzyme and ethanol production in an isogenic yeast ploidy series. *Curr Genet*, 1987, 12: 9–14
- 6 Gao K H. The effects of ploidy changes on phenotypes and gene expression of *Saccharomyces cerevisiae* (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Hangzhou: Zhejiang University, 2015 [高克慧. 酿酒酵母倍性变化对表型和基因表达的影响. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2015]
- 7 Liu L, Jin M, Huang M, et al. Engineered polyploid yeast strains enable efficient xylose utilization and ethanol production in corn hydrolysates. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 655272
- 8 Wang S, Chen X, Jin X, et al. Creating polyploid *Escherichia coli* and its application in efficient L-threonine production. *Adv Sci*, 2023, 10: 2302417
- 9 Wang P, Zhao D, Li J, et al. Artificial diploid *Escherichia coli* by a CRISPR chromosome-doubling technique. *Adv Sci*, 2023, 10: 2205855
- 10 Gokhale D V, Puntambekar U S, Deobagkar D N. Protoplast fusion: a tool for intergeneric gene transfer in bacteria. *Biotechnol Adv*, 1993, 11: 199–217
- 11 Krebs J E, Goldstein E S, Kilpatrick S T. In: Jiang S M, ed. *Lewin's genes XII* (in Chinese). Beijing: Science Press, 2021. 345–347 [J E克雷布斯, E S戈尔茨坦, S T基尔帕特里克. In: 江松敏, ed. *Lewin 基因 XII*. 北京: 科学出版社, 2021. 345–347]
- 12 Haefner K. A technique to establish systems of haploid to polyploidy *Saccharomyces* strains which are most identical with respect to their chromosome sets and most homozygous. *Microbiol Res*, 2010, 6: 86–88
- 13 Gunge N, Nakatomi Y. Genetic mechanisms of rare matings of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* heterozygous for mating type. *Genetics*, 1972, 70: 41–58
- 14 Tani Y, Tomohiro Y, Miyata A, et al. Endomitotic diploidization of *Saccharomyces cerevisiae* by heat treatment during spore germination. *Yeast*, 2010, 9: 519–521
- 15 Tani Y, Tomohiro Y, Miyata A, et al. A novel method for breeding polyploid cells by heat-induced endomitotic diploidization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57: 2063–2066
- 16 Salmon J M. Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *J Fermentation Bioeng*, 1997, 83: 253–260
- 17 Zimmermann F K, Mayer V W, Scheel I. Induction of aneuploidy by oncodazole (nocodazole), an anti-tubulin agent, and acetone. *Mutat Res-Fund Mol M*, 1984, 141: 15–18
- 18 Hongbaek C, Tsuyoshi U, Thomas G B. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*, 2014, 159: 1300–1311
- 19 Wang C P, Wei Q, Bao G L, et al. Progress on microbial protoplast fusion technology (in Chinese). *Prog Vet Med*, 2008, 29: 64–67 [王春平, 韦强, 鲍国连, 等. 微生物原生质体融合技术研究进展. *动物医学进展*, 2008, 29: 64–67]
- 20 Ferenczy L, Maráz A. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 1977, 268: 524–525
- 21 Lou C J, Shen Y Q, Jiao R S, et al. Protoplast fusion of *Saccharomyces cerevisiae* (in Chinese). *Acta Mycol Sin*, 1985, 4: 118–124 [楼纯菊, 沈永强, 焦瑞身, 等. 酿酒酵母单倍体与双倍体原生质体的融合. *真菌学报*, 1985, 4: 118–124]
- 22 Takagi A, Harashima S, Oshima Y. Hybridization and polyploidization of *Saccharomyces cerevisiae* strains by transformation-associated cell fusion. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49: 244–246
- 23 Zhao J, Zhao Y, Wu L, et al. Development of a robust *Saccharomyces cerevisiae* strain for efficient co-fermentation of mixed sugars and

- enhanced inhibitor tolerance through protoplast fusion. [Microorganisms](#), 2024, 12: 1526
- 24 Ren T, Huang Q Y, Ou S S. Studies on spheroplast formation and regeneration of *Escherichia coli* O₂(No^r,Chl^s) and O₇₈(Chl^r,Nor^s) strains (in Chinese). *J South China Agric Univ*, 1998, 19: 49–53 [任涛, 黄青云, 欧守籽. 大肠杆菌O₂(No^r,Chl^s) and O₇₈(Chl^r,Nor^s)原生质体制备和再生的研究. 华南农业大学学报, 1998, 19: 49–53]
 - 25 Li M Z. Establishment and study on the protoplast fusion of *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2012 [李木子. 鸭源大肠杆菌和多杀性巴氏杆菌原生质体融合及融合菌株免疫原性的研究. 硕士学位论文. 成都: 四川农业大学, 2012]
 - 26 Chen W, Ohmiya K, Shimizu S. *Escherichia coli* spheroplast-mediated transfer of pBR322 carrying the cloned *Ruminococcus albus* cellulase gene into anaerobic mutant strain FEM29 by protoplast fusion. [Appl Environ Microbiol](#), 1988, 54: 2300–2304
 - 27 Haber J E. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. [Annu Rev Genet](#), 1998, 32: 561–599
 - 28 Takagi A, Harashima S, Oshima Y. Construction and characterization of isogenic series of *Saccharomyces cerevisiae* polyploid strains. [Appl Environ Microbiol](#), 1983, 45: 1034–1040
 - 29 Hou L, Li X, Wang C, et al. Construction of ploidy series of *Saccharomyces cerevisiae* by the plasmid YCplac33-GHK. [J Ind Microbiol Biotechnol](#), 2013, 40: 393–397
 - 30 Hou L H. Development of new methods for genetic manipulation in *Saccharomyces cerevisiae* and construction of strains with improved ethanol yield (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Tianjin: Tianjin University, 2007 [侯丽华. 酿酒酵母遗传操作方法研究及乙醇发酵高产菌株构建. 博士学位论文. 天津: 天津大学, 2007]
 - 31 Ding W T. Improving on the ethanol yield of *Saccharomyces cerevisiae* through construction of polyploids and genome shuffling (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Tianjin: Tianjin University, 2009 [丁文涛. 多倍体构建及基因组重排对提高酿酒酵母乙醇产量的研究. 硕士学位论文. 天津: 天津大学, 2009]
 - 32 Yang H J, Liu C, Ma X X, et al. An approach for construction and rapid selection of *Saccharomyces cerevisiae* polyploidy series strains (in Chinese). *Food Ferment Ind*, 2014, 40: 106–110 [杨华军, 刘成, 马向霞, 等. 一种酿酒酵母多倍体系列菌株的构建及快速筛选方法. 食品与发酵工业, 2014, 40: 106–110]
 - 33 Liu H M. Rearrangement of synthetic chromosome V in polyploid yeast (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Tianjin: Tianjin University, 2018 [刘慧敏. 多倍体酵母合成型V号染色体的重排. 硕士学位论文. 天津: 天津大学, 2018]
 - 34 Zhou J, Yu S, Zhou Y F. Recent progress and prospects of synthetic biology (in Chinese). *J Funct Polym*, 2024, 37: 549–558 [周军, 于水, 周永丰. 合成生物学的发展与展望. 功能高分子学报, 2024, 37: 549–558]
 - 35 Xie Z X, Li B Z, Mitchell L A, et al. “Perfect” designer chromosome V and behavior of a ring derivative. [Science](#), 2017, 355: eaaf4704
 - 36 Shen Y, Wang Y, Chen T, et al. Deep functional analysis of synII, a 770-kilobase synthetic yeast chromosome. [Science](#), 2017, 355: eaaf4791
 - 37 Wu Y, Li B Z, Zhao M, et al. Bug mapping and fitness testing of chemically synthesized chromosome X. [Science](#), 2017, 355: eaaf4706
 - 38 Zhang W, Zhao G, Luo Z, et al. Engineering the ribosomal DNA in a megabase synthetic chromosome. [Science](#), 2017, 355: eaaf3981
 - 39 Jia B, Wu Y, Li B Z, et al. Precise control of SCRaMbLE in synthetic haploid and diploid yeast. [Nat Commun](#), 2018, 9: 1933
 - 40 Aljabali A A A, El-Tanani M, Tambuwala M M. Principles of CRISPR-Cas9 technology: advancements in genome editing and emerging trends in drug delivery. [J Drug Deliver Sci Tech](#), 2024, 92: 105338
 - 41 Xie Z X, Mitchell L A, Liu H M, et al. Rapid and efficient CRISPR/Cas9-based mating-type switching of *Saccharomyces cerevisiae*. [G3 Genes Genomes Genet](#), 2018, 8: 173–183
 - 42 Sun C, Wang X, Wang R, et al. Construction of high ethyl acetate-producing diploid/ tetraploid *Saccharomyces cerevisiae* through CRISPR/Cas9-mediated mating-type switching. [Food Biosci](#), 2025, 64: 105965
 - 43 Krogerus K, Fletcher E, Rettberg N, et al. Efficient breeding of industrial brewing yeast strains using CRISPR/Cas9-aided mating-type switching. [Appl Microbiol Biotechnol](#), 2021, 105: 8359–8376
 - 44 Gregory T R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. [Biol Rev](#), 2001, 76: 65–101
 - 45 Doyle J J, Coate J E. Polyploidy, the nucleotype, and novelty: the impact of genome doubling on the biology of the cell. [Int J Plant Sci](#), 2019, 180: 1–52
 - 46 Galitski T, Saldanha A J, Styles C A, et al. Ploidy regulation of gene expression. [Science](#), 1999, 285: 251–254
 - 47 Zhai Z H, Wang X Z. Cell biology (in Chinese). 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2011. 54–67 [翟中和, 王喜忠. 细胞生物学. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2011. 54–67]

- 48 Mayer V W, Aguilera A. High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res Fundamental Mol Mech Mutagenesis*, 1990, 231: 177–186
- 49 Storchová Z, Breneman A, Cande J, et al. Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature*, 2006, 443: 541–547
- 50 Storchova Z. Ploidy changes and genome stability in yeast. *Yeast*, 2015, 31: 421–430
- 51 Bennett M D, Riley R. The duration of meiosis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1971, 178: 277–299
- 52 Bennett M D. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1972, 181: 109–135
- 53 Morard M, Macías L G, Adam A C, et al. Aneuploidy and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Genet*, 2019, 10: 82
- 54 Pavelka N, Rancati G, Zhu J, et al. Aneuploidy confers quantitative proteome changes and phenotypic variation in budding yeast. *Nature*, 2010, 468: 321–325
- 55 Rancati G, Pavelka N, Fleharty B, et al. Aneuploidy underlies rapid adaptive evolution of yeast cells deprived of a conserved cytokinesis motor. *Cell*, 2008, 135: 879–893
- 56 Chen G, Bradford W D, Seidel C W, et al. Hsp90 stress potentiates rapid cellular adaptation through induction of aneuploidy. *Nature*, 2012, 482: 246–250
- 57 Yona A H, Manor Y S, Herbst R H, et al. Chromosomal duplication is a transient evolutionary solution to stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 21010–21015
- 58 Beaupere C, Dinatto L, Wasko B M, et al. Genetic screen identifies adaptive aneuploidy as a key mediator of ER stress resistance in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 9586–9591
- 59 Kaya A, Gerashchenko M V, Seim I, et al. Adaptive aneuploidy protects against thiol peroxidase deficiency by increasing respiration via key mitochondrial proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 10685–10690
- 60 Ryu H Y, Wilson N R, Mehta S, et al. Loss of the SUMO protease Ulp2 triggers a specific multichromosome aneuploidy. *Genes Dev*, 2016, 30: 1881–1894
- 61 Ryu H Y, López-Giráldez F, Knight J, et al. Distinct adaptive mechanisms drive recovery from aneuploidy caused by loss of the Ulp2 SUMO protease. *Nat Commun*, 2018, 9: 5417
- 62 Voordeckers K, Kominek J, Das A, et al. Adaptation to high ethanol reveals complex evolutionary pathways. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005635
- 63 Origone A C, González Flores M, Rodríguez M E, et al. Inheritance of winemaking stress factors tolerance in *Saccharomyces uvarum*/*S. eubayanus*×*S. cerevisiae* artificial hybrids. *Int J Food Microbiol*, 2020, 320: 108500
- 64 Selmecki A M, Maruvka Y E, Richmond P A, et al. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. *Nature*, 2015, 519: 349–352
- 65 Scott A L, Richmond P A, Dowell R D, et al. The influence of polyploidy on the evolution of yeast grown in a sub-optimal carbon source. *Mol Biol Evol*, 2017, 34: 2690–2703
- 66 Avrahami-Moyal L, Engelberg D, Wenger J W, et al. Turbidostat culture of *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A under selective pressure elicited by ethanol selects for mutations in SSD1 and UTH1. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12: 521–533
- 67 Tong K, Datta S, Cheng V, et al. Genome duplication in a long-term multicellularity evolution experiment. *Nature*, 2025, 639: 691–699
- 68 Akerlund T, Nordström K, Bernander R. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1996, 177: 6791–6797
- 69 Liu Z H, Zheng Y Y, Gong Y X, et al. Direct conversion from cassava to bioethanol with a recombinant strain of yeast (in Chinese). *J Shenzhen Univ Sci Eng*, 2012, 29: 548–552 [刘泽寰, 郑阳阳, 龚映雪, 等. 利用重组酵母实现木薯至乙醇的直接转化. 深圳大学学报理工版, 2012, 29: 548–552]
- 70 Wang J, Ma Y, Zhang K, et al. Mating type and ploidy effect on the β -glucosidase activity and ethanol-producing performance of *Saccharomyces cerevisiae* with multiple δ -integrated bgl 1 gene. *J Biotechnol*, 2016, 231: 24–31
- 71 Krogerus K, Arvas M, De Chiara M, et al. Ploidy influences the functional attributes of *de novo* lager yeast hybrids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 7203–7222
- 72 Lee Y G, Seo J H. Production of 2,3-butanediol from glucose and cassava hydrolysates by metabolically engineered industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 204
- 73 Dong J, Hong K, Zhang C, et al. Increased acetate ester production of polyploid industrial brewer's yeast strains via precise and seamless “self-cloning” integration strategy. *Iran J Biotech*, 2019, 17: 38–45
- 74 Yang H, Liu C, Zou S, et al. Improving bgl1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* through meiosis in an isogenic triploid. *Biotechnol*

- [Lett](#), 2014, 36: 1279–1285
- 75 Sharma S, Tauro P. Control of ethanol production by yeast: role of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase. [Biotechnol Lett](#), 1986, 8: 735–738
- 76 Dellomonaco C, Fava F, Gonzalez R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. [Microb Cell Fact](#), 2010, 9: 3
- 77 Gao Y Y. Breeding of low-ethanol-wine yeasts (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2020 [高莹莹. 低醇葡萄酒酵母菌株的选育. 硕士学位论文. 天津: 天津科技大学, 2020]
- 78 Ansell R, Granath K, Hohmann S, et al. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. [EMBO J](#), 1997, 16: 2179–2187
- 79 Zavaleta V, Pérez-Través L, Saona L A, et al. Understanding brewing trait inheritance in *de novo* Lager yeast hybrids. [mSystems](#), 2024, 9: 12
- 80 Gibson B, Geertman J M A, Hittinger C T, et al. New yeasts—new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. [FEMS Yeast Res](#), 2017, 17: 1–32
- 81 Krogerus K, Magalhães F, Castillo S, et al. Lager yeast design through meiotic segregation of a *Saccharomyces cerevisiae*×*Saccharomyces eubayanus* Hybrid. [Front Fungal Biol](#), 2021, 2: 733655
- 82 Heisteringer L, Gasser B, Mattanovich D. Creation of stable heterothallic strains of *Komagataella phaffii* enables dissection of mating gene regulation. [Mol Cell Biol](#), 2018, 38: e00398-17
- 83 Han C, Kwon H, Park G, et al. Enhanced mating-type switching and sexual hybridization in heterothallic yeast *Yarrowia lipolytica*. [FEMS Yeast Res](#), 2020, 20: foaa011
- 84 Hao J. Cell factories of *Klebsiella* spp. (in Chinese). [Sci Sin Vitae](#), 2023, 53: 1072–1082 [郝建. 克雷伯氏菌细胞工厂. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1072–1082]
- 85 Dichosa A E K, Fitzsimons M S, Lo C C, et al. Artificial polyploidy improves bacterial single cell genome recovery. [PLoS One](#), 2012, 7: e37387

Polyplloid model microbial cell factories

WANG BiYiFan, ZHAO Long, TAN JunJie, WANG Ying & JIA Bin*

State Key Laboratory of Synthetic Biology, Frontiers Science Center for Synthetic Biology (Ministry of Education), School of Synthetic Biology and Biomanufacturing, Tianjin University, Tianjin 300072, China

* Corresponding author; E-mail: bin.jia@tju.edu.cn

Due to altered genomic ploidy, polyploid model microorganisms exhibit characteristics such as enhanced expression of some metabolic pathways, increased metabolic flux, and improved environmental adaptability. They show great potential in biofuel production, synthesis of high-value chemicals, and pharmaceutical synthesis. Polyploid model microorganisms can be engineered into cell factories via synthetic biotechnology and other methods to efficiently produce specific biological products. We systematically summarize the construction strategies of polyploid *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*, and analyze the mechanisms by which polyploidization affects cellular physiological characteristics. We also summarize research progress in chemical production, heterologous protein expression, terpenoid synthesis, and some application cases in industrial production. Finally, we will discuss current technical bottlenecks and future development directions.

polyploidy, cell factory, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, synthetic biology

doi: [10.1360/SSV-2025-0203](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0203)