

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-090

合成生物技术驱动天然的真核油脂细胞工厂开发

汪庆卓, 宋萍, 黄和

(南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 油脂是重要的工业原料, 也是人类生存的三大营养素之一。为避免因国际环境变化导致外部资源进口遭到封锁, 我国亟需建设、补充和完善油脂供给的新方式。以丰富、廉价的生物质原料替代化石原料生产食用油脂和功能性油脂, 在保障国家能源安全、粮食安全方面意义重大。细菌、酵母、霉菌、微藻等多种微生物具有利用葡萄糖、木质纤维素、淀粉、甘油甚至一碳化合物等原料合成脂肪酸的能力。由于微生物, 特别是产油真菌相比产油植物和动物具有生产周期短、易于大规模生产、占地少、受天气影响小、原料来源丰富等优势, 近年来备受学术界和产业界重视。然而, 如何获取生产效率高且鲁棒性强的微生物油脂细胞工厂, 仍然面临着使能工具有限、油脂产量不高、油脂组分难以控制等诸多挑战。近年来, 合成生物学技术的发展为本领域的研究提供了新的资源、工具和思路。使得产油微生物研究在遗传操作工具创制、代谢途径改造以及高附加值产品开发等方面不断获得突破。本文聚焦于真核油脂细胞工厂的开发, 从天然产油底盘菌株的基因元件、遗传转化方法、基因编辑工具的开发, 油脂细胞工厂代谢途径的重构/调试以及向高附加值脂质化学品方向的升级等方面, 系统总结了合成生物技术驱动油脂细胞工厂开发的研究进展, 可为后续研究提供借鉴。

关键词: 合成生物学; 基因编辑; 产油真菌; 代谢工程; 高附加值产品

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A

Synthetic biotechnology drives the development of natural eukaryotic lipid cell factories

WANG Qingzhuo, SONG Ping, HUANG He

(School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, Jiangsu, China)

Abstract: Lipids are important industrial raw materials and one of the three major nutrients for human survival. In order to avoid the blockade of external resource imports due to unpredictable international market, we urgently need to build new methods for lipids supply. Biomass is the only kind of physical resource based on carbon among many renewable resources. Therefore, The production of edible and functional lipids with abundant and cheap biomass materials instead of fossil materials is of great significance in ensuring national energy security and food security.

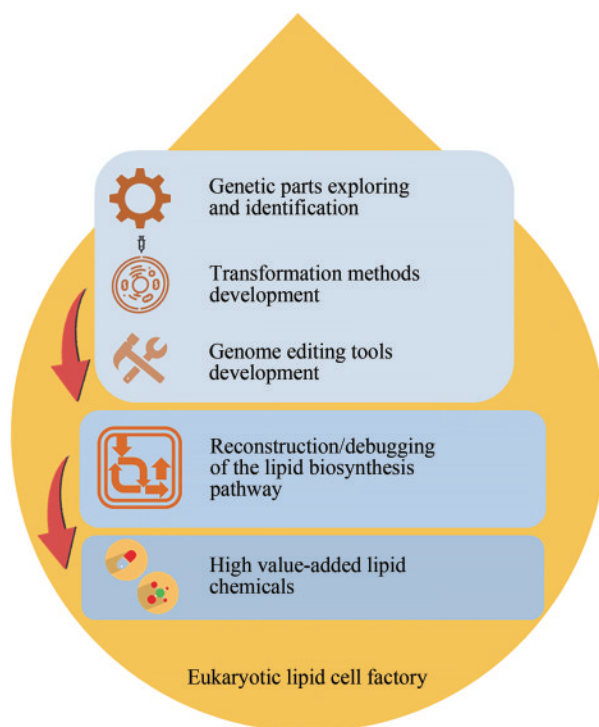
收稿日期: 2020-12-21 修回日期: 2021-03-17

基金项目: 国家重点研发计划 (No.2019YFA0904900)

引用本文: 汪庆卓, 宋萍, 黄和. 合成生物技术驱动天然的真核油脂细胞工厂开发[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 920-941

Citation: WANG Qingzhuo, SONG Ping, HUANG He. Synthetic biotechnology drives the development of natural eukaryotic lipid cell factories [J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 920-941

Bacteria, yeast, mold, microalgae and some other microorganisms have the potential in using glucose, lignocellulose, starch, glycerol or even one carbon compounds to synthesize fatty acids. Due to the advantages of short production cycle, easy large-scale production, less land occupation, less impact of climate change and abundant raw material sources comparing with lipids from plants and animals, microbial lipid production has attracted much attention from academia and industry in recent years. However, there are still many challenges on how to obtain efficient and robust microbial lipid cell factories, such as limited enabling tools, low lipid production and difficult control of lipid components. The development of synthetic biology then provides new resources, tools and ideas for research in this field in recent years. Thus the research of lipid producing microorganisms has made continuous breakthroughs in the creation of genetic manipulation tools, the engineering of lipid biosynthesis pathways and the development of high value-added products. This review focuses on the genetic elements of natural lipid-producing chassis strains, genetic transformation methods, genome editing tools development, the reconstruction/debugging of the metabolic pathways of lipid cell factories, and the upgrade to high value-added lipid chemicals. By systematically summarized the research progress of synthetic biotechnology in driving the development of lipid cell factories, we very much hope to provide reference for future research in this area.



Keywords: synthetic biology; genome editing; oleaginous fungus; metabolic engineering; high value-added products

据国家统计局数据，2019年我国原油和石油对外依存度双破70%，大豆进口量更是突破8000万吨。为避免因国际环境变化（如疫情、战争或其他事件爆发）导致外部资源进口遭到封锁，我国必须建设、补充和完善能源、粮油供给的新方式。生物质是众多可再生资源（如太阳能、风能、水能、地热能等）中唯一一类以碳为基础的实物性

资源，因此以丰富、廉价的生物质原料（如木质纤维素）替代化石原料生产燃料、大宗化学品、食用油脂和功能性油脂等在保障国家能源安全、粮食安全方面意义重大^[1]。

相比于植物和动物来源油脂，微生物来源的油脂因具有生产周期短，场地灵活、占地少，不受气候变化影响，易于大规模生产，原料来源丰

富、成本低廉，易于菌种改良与基因改造，定向生产特定产物等优势倍受重视^[2]。然而，如何获取生产效率高且鲁棒性强的微生物油脂细胞工厂，面临着使能工具有限、油脂产量不高、油脂组分难以控制等问题^[3]。幸运的是，合成生物学的迅猛发展有力促进了油脂细胞工厂的开发。产油微生物研究在遗传操作工具创制、代谢途径改造以及高附加值产品开发等方面不断获得突破。本文中，笔者聚焦关键技术瓶颈，阐述了合成生物技术驱动天然的真核油脂细胞工厂开发的研究进展，力图为后续研究提供借鉴。

1 微生物合成油脂的途径和底盘菌株

细菌、酵母、霉菌、微藻等多种微生物能利用木质纤维素类、糖类、淀粉类、甘油甚至一碳化合物等合成脂肪酸^[4-6]。如图1所示，微生物摄取各种物质后，在产油酵母线粒体及胞质内经各种途径合成的乙酰 CoA，进一步羧化生成丙二酸单酰 CoA；然后乙酰 CoA 和丙二酸单酰 CoA 经脂肪酸合成酶合成丙二酸单酰 ACP，接着再与丙二酸单酰 CoA 反应生成新的脂酰 ACP。每与丙二酸单酰 CoA 反应一次，脂酰 ACP 的碳链延长 2 个碳原子；各种脂酰 ACP 经硫酯酶催化合成不同链

长的脂肪酸。当脂肪酸有过量积累时，被快速转化为脂酰 CoA，然后经过 β -氧化途径分解成乙酰 CoA^[2, 7-8]。在产油微生物中，脂肪酸通常会以甘油三酯 (triacylglycerol, TAG) 的形式储存在胞内，形成脂滴。

在胞内，脂肪酸也可以被转化为各种高附加值产品。当有内源的或者异源引入的去饱和酶系存在时，会生成各种类型的不饱和脂肪酸，包括 ω -6 系列的 γ -亚麻酸 (γ -linoleic acid) 和花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA)，以及 ω -3 系列的 α -亚油酸 (linoleic acid)、二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 等^[9-11]。双键的位置和数目不同使得不同脂肪酸具有不同的生理功能，多种脂肪酸在医学和功能性食品领域备受青睐。脂肪酸还可以被内源的或者异源引入的酰基转移酶 (ACP transferase) 催化酯化，与甲醇或者乙醇合成脂肪酸甲酯 (fatty acid methyl ester, FAME) 或者脂肪酸乙酯 (fatty acid ethyl esters, FAEE)，从而实现生物柴油的体内合成^[6]。另外，有报道称在大肠杆菌或者酿酒酵母中引入脂酰辅酶 A 还原酶 (fatty acyl-coenzyme a reductase) 或脂酰 ACP 还原酶 (fatty acyl-ACP reductase) 基因和醛脱羧基酶 (aldehyde decarboxylase) 基因时，细胞能合成脂

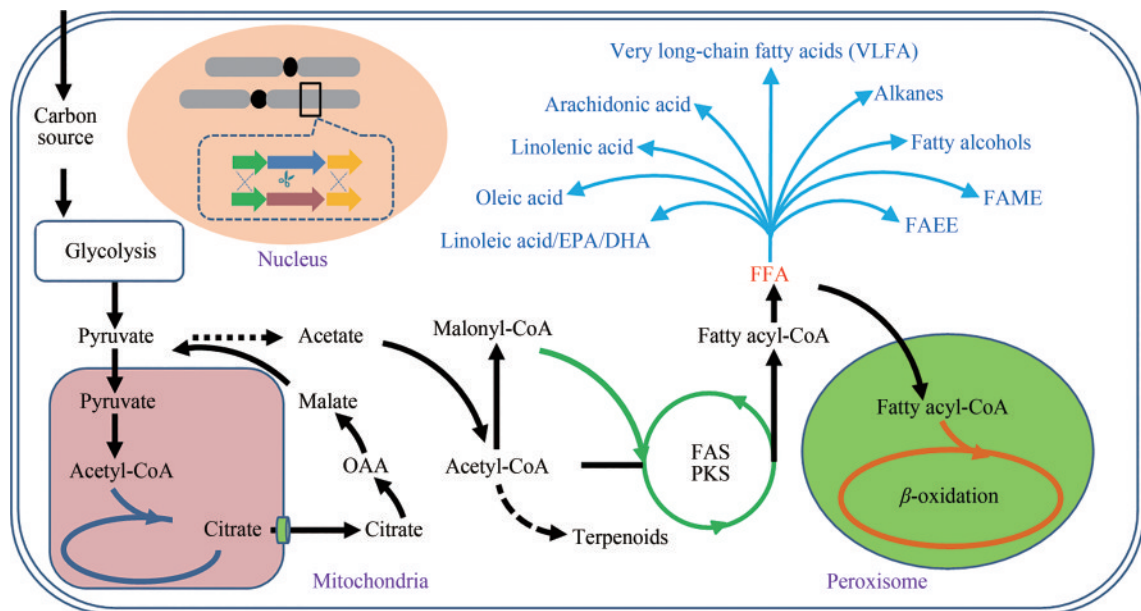


图1 微生物合成脂肪酸及其衍生物的途径

Fig. 1 Pathways of microbial synthesis of fatty acids and derivatives

肪醇、脂肪烷烃、烯烃类化合物^[12-13]，而它们正是汽油、柴油、航空煤油的主要成分。

表1列举了主流的几种微生物生产油脂的研究进展。可以看出，目前比较主流的几种油脂合成微生物细胞工厂包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*)、斯达氏油脂酵母 (*Lipomyces starkeyi*) 和裂殖壶菌 (*Schizochytrium sp.*) 等。

大肠杆菌和酿酒酵母在自然条件下并不会生成油脂，但是因为其基因操作和改造比较容易，因此也常被用于生产油脂。大肠杆菌在生产脂肪酸及其衍生物等领域（例如脂肪酸、激素和烷烃）均取得了重要进展^[17-19]。但是，大肠杆菌对木质纤维素水解液中的抑制物的耐受性不足，这可能会限制其碳源范围。酿酒酵母通过合成生物学改造，在脂肪酸和烷烃等产物的生产方面也获得了较好结果^[20]，但油脂产量整体偏低（目前最高33.4 g/L），副产物乙醇残留较多，且木糖利用效率较低（即使经过戊糖代谢改造），这可能会降

低油脂转化率。

不同于大肠杆菌、酿酒酵母等非天然产油菌株，产油酵母 (oleaginous yeast) 如解脂耶氏酵母、圆红冬孢酵母和斯达氏油脂酵母，以及海洋真菌裂殖壶菌、破囊壶菌等能够天然地积累过量油脂，特别适用于油脂及其衍生物的合成^[21-22]。2017年 Qiao 等利用合成生物学手段对解脂耶氏酵母进行了系统改造，获得的最优菌株生产强度达 1.2 g/(L·h)，油脂得率 0.27 g/g 葡萄糖，油脂产量创纪录地达到 98.7 g/L^[22]；圆红冬孢酵母和斯达氏油脂酵母在优化的培养条件下（加上营养限制或者环境胁迫），胞内油脂含量可达细胞干重 50%~70%^[2, 4-5, 34]；裂殖壶菌、破囊壶菌不仅生物量高（可达 200 g/L），油脂含量高（可达 70%），更难得的是其中高附加值的多不饱和脂肪酸（尤其是 DHA）占比极高^[25-26]。以上产油真菌还具有显著的工业微生物的特征，如能广泛利用各种碳源（包括己糖和戊糖）和氮源，可高密度培养，抗逆性强（可直接发酵木质纤维素水解液）等^[4-5]。

总的来说，真核生物较原核生物（主要是大

表1 近几年主流的微生物油脂细胞工厂的研究进展

Tab. 1 Research progress of microbial lipid cell factories in recent years

菌株	底物	油脂产量/(g/L)	生产强度/[g/(L·h)]	文献
<i>Chlorella vulgaris</i>	CO ₂ /葡萄糖	41.95	0.583	[14]
<i>Rhodococcus opacus</i>	乳制品废水	2.2	0.023	[15]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	乳酸/光照	—	0.028	[16]
<i>Escherichia coli</i>	葡萄糖	3.6	0.075	[17]
<i>E. coli</i>	葡萄糖	7.0	0.12	[18]
<i>E. coli</i>	葡萄糖	21.5	0.5	[19]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	葡萄糖	10.4	0.087	[13]
<i>S. cerevisiae</i>	葡萄糖	33.4	0.17	[20]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	葡萄糖	15.25	0.105	[21]
<i>Y. lipolytica</i>	葡萄糖	98.9	1.2	[22]
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	葡萄糖	78.7	0.57	[23]
<i>R. toruloides</i>	葡萄糖	89.4	0.62	[24]
<i>Schizochytrium sp.</i>	葡萄糖	55.3	0.46	[25]
<i>Schizochytrium sp.</i>	葡萄糖	80.14	0.53	[26]
<i>Lipomyces starkeyi</i>	甜高粱茎汁	6.4	0.033	[27]
<i>L. starkeyi</i>	玉米棒芯水解液	8.1	0.042	[28]
<i>Mortierella isabellina</i>	冷杉木水解液	18.55	0.086	[29]
<i>Cryptococcus curvatus</i>	废纸水解液	5.75	0.08	[30]
<i>Trichosporon fermentans</i>	甘薯藤水解液	6.98	0.024	[31]
<i>Trichosporon oleaginosus</i>	生物柴油副产物	21.87		[32]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	纯甘油	16.28	0.1	[33]

肠杆菌) 在油脂产量和生产强度上有明显优势。在真核生物中, 天然产油真菌的产油水平远高于非天然的模式菌株如酿酒酵母。尤为重要的是, 经过遗传改造后, 天然产油真菌的油脂产量可有大幅提升^[11, 22], 这充分说明了这些天然产油菌株的油脂开发潜力。

2 合成生物学为油脂细胞工厂开发提供了丰富的使能工具

高效的遗传操作技术是油脂细胞工厂开发的前提条件, 然而天然产油真菌往往不是模式菌株, 这

意味着其遗传操作技术发展难度更大, 很难从根本的遗传层面改善其油脂合成水平。随着合成生物学的发展, 近10年来高通量测序成本急剧降低, 越来越多的产油微生物的基因组被陆续测序, 其染色体结构、基因编码、蛋白功能、代谢途径等信息日渐清晰, 深化了学界对产油真菌的认知。另外, 转录组学的研究在一定程度上促进了合成生物学元件(如启动子、终止子等)的挖掘和表征。同时, 遗传转化技术的进步使得更多的产油菌株能被改造; 最重要的是, CRISPR/Cas系统介导的基因编辑技术已在部分产油真菌中被成功开发, 彻底改写了产油真菌的遗传操作技术发展格局(图2)。

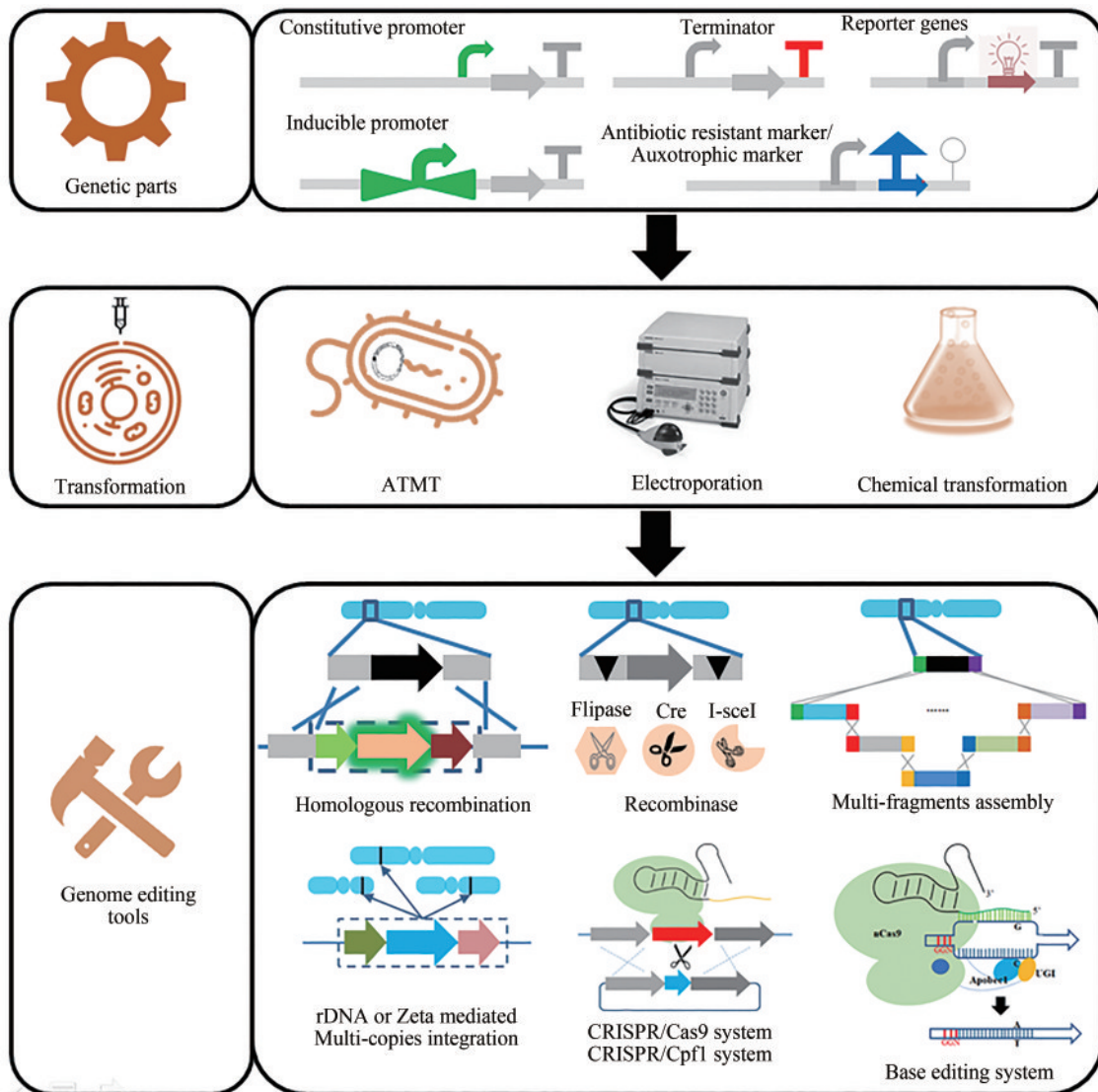


图2 合成生物学驱动产油真菌使能工具开发

Fig. 2 Synthetic biology drives the development of enabling tools for lipid producing fungi

2.1 产油真菌合成生物学元件的挖掘与表征

合成生物学元件, 包括启动子、终止子、筛选标记、复制子等, 是对目标菌株进行遗传操作的载体或工具。解脂耶氏酵母是遗传操作研究比较成熟的产油真菌之一, 目前已积累了很多可用的基因表达元件, 包括严谨性不同的诱导型启动子如 P_{LEU2} 、 P_{G3P} 、 P_{ICLI} 、 P_{POT1} 、 P_{POX1} 、 P_{POX2} 和 P_{POX5} [35-36], 强度不同的组成型启动子如 P_{TEF} 、 P_{EXP1} 、 P_{GPAT} 、 P_{GPD} 、 P_{YAT1} 、 P_{FBA} 和 P_{GPM1} [37-38], 以及终止子如 T_{spr2t} 、 T_{lip2t} 、 T_{mig1t} 、 T_{pex20t} 和 T_{pox3t} 等 [9, 39]。有趣的是, 酿酒酵母基因组中的终止子如 T_{cyc1t} 和 T_{pho5t} 也可以在解脂耶氏酵母中发挥功能 [36, 39]。在筛选标记方面, 营养缺陷型标记如 URA3/ura3d4 (尿嘧啶)、LEU2 (亮氨酸)、TRP1 (色氨酸) 和 HisG (组氨酸) 等在解脂耶氏酵母中应用较多 [40-41], 而抗生素抗性标记使用较少, 仅有博来霉素 (bleomycin /phleomycin) 抗性基因 *phleoR* 和潮霉素 (hygromycin B) 抗性基因 *hph* 可用于少数株系 [42]。至于复制子, 它一般来自于菌株的内生性游离质粒或者染色体上的自主复制序列。由于解脂耶氏酵母中无游离质粒, 目前研究多以解脂耶氏酵母基因组上的自主复制序列 (autonomously replicating sequences, ARS) ARS18、ARS68 或者着丝粒 (CEN) 序列 CEN1-227&ORI1001 作为游离质粒的复制元件, 但拷贝数极低, 难以实现目的基因的高拷贝、超表达功能 [43-44]。幸运的是, 在解脂耶氏酵母染色体上存在串联重复核糖体 DNA (tandemly repeated ribosomal DNA, rDNA) 位点, 部分菌株染色体上还存在分散的重复 Ylt1 反转录转座子位点以及约束 Ylt1 的 zeta 因子位点 (一个长末端重复序列), 可作为整合靶点实现多拷贝重组 [44-45]。

相比于解脂耶氏酵母, 其他产油真菌的元件挖掘及表征的研究相对滞后。在圆红冬孢酵母中, 已有较多的诱导型启动子 (如 P_{LDPI} 、 P_{DAOI} 、 P_{PHO89} 、 P_{ADH2} 和 P_{GALI} 等 [46-47])、组成型启动子 (如 P_{PGI} 、 P_{PGK} 、 P_{FBA} 、 P_{TPI} 、 P_{GPD} 、 P_{ACCI} 和 P_{ACLI} 等 [48-49])、终止子 (如 T_{hsp} 、 T_{gpd} 等 [50]) 等被相继鉴定和表征。常用的抗性筛选标记如 HYG (潮霉素抗性)、BLE (博来霉素抗性)、NEO (新霉素抗性)、G418 (遗传霉素抗性), 营养缺陷型标记如 URA3、LEU2

等, 以及荧光素酶 (luciferase)、绿色荧光蛋白 (GFP) 等报告基因也可在圆红冬孢酵母中正常使用 [51]。然而, 目前尚未在圆红冬孢酵母中发现任何内生性游离质粒, 也没有发现任何染色体上的自主复制序列或着丝粒序列可作为圆红冬孢酵母中游离质粒的复制子 [52], 因此圆红冬孢酵母的转化载体基本上都是自杀型或者整合型的, 对后续转化效率有较高要求。

类似于圆红冬孢酵母, 其他研究较多的产油真菌如斯达氏油脂酵母、裂殖壶菌、破囊壶菌等的合成生物学元件开发在启动子、终止子及筛选标记等方面也有很大进展, 但主要遭遇缺少独立复制元件的问题 [8, 53-57]。另外, 在基因编辑工具中常用的核定位信号 (nuclear localization sequence, NLS) 以及 III 型 RNA 聚合酶可识别的启动子 (可启动 sgRNA 这样的小 RNA), 也有待进一步鉴定和扩充 [2, 58-59]。

2.2 产油真菌遗传转化方法的开发与优化

将携带有各种合成生物学功能元件以及外源基因的穿梭载体成功导入是产油真菌遗传操作系统开发的起点, 意味着该菌能被遗传改造, 可在基因层面或代谢途径水平进行理性设计。另外, 遗传转化也直接关系到遗传改造 (尤其是基因编辑) 的成败, 因为大部分遗传操作工具的效果严重依赖于转化效率, 转化子数目越多, 获得正突变株的可能性越大 [2]。一般来说, 转化效率与载体类型、转化方法、菌株特性等因素高度相关。

如前所述, 解脂耶氏酵母的遗传操作技术相对成熟, 早在 1985 年就有成功转化的报道 [60]。目前主要有化学转化法、电转化和 YLOS 试剂盒转化等方法。解脂耶氏酵母的化学转化法借鉴于酿酒酵母的醋酸锂转化方法, 转化效率一般可达 10^4 CFU/ μ g DNA [60-61]。特别地, 质粒线性化后转化效率会明显提升。电穿孔转化方法的转化效率与醋酸锂转化基本接近。有意思的是, 在电转前使用醋酸锂等或硫代化合物如 DTT 等处理感受态, 可使转化效率进一步提升 [62]。YLOS 转化试剂盒由 YEASTERN 生物技术公司研制, 优化了感受态细胞制备及转化流程, 转化效率也较传统的化学

转化和电转化有所提升,但价格昂贵,仅在常规转化效率较低时会用到。

圆红冬孢酵母的外源基因转化方法与解脂耶氏酵母几乎同年被开发出来,由聚乙二醇(PEG)介导进行原生质体转化,转化效率约 10^3 CFU/ μ g DNA^[63],外源基因主要以随机插入方式被整合至基因组上。由于原生质体转化步骤烦琐且高度依赖于操作技能,近年来圆红冬孢酵母转化主要采用同样是随机插入但操作比较简单的根癌农杆菌介导的转化法(*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, ATMT)^[64]。然而,ATMT转化有一定的宿主依赖性,而且转化效率相对较低(约40~1000 CFU/ μ g DNA)。近几年陆续报道了更简单的电穿孔和其他化学转化方法,但转化效率有时甚至低于ATMT,有待进一步优化^[20, 65]。

相比于解脂耶氏酵母和圆红冬孢酵母,其他产油真菌的遗传操作系统开发较晚。裂殖壶菌的遗传转化体系最早见诸专利^[66],后来陆续有经同行评议的电转化及农杆菌介导转化的报道^[67-68]。虽经多年发展,实际操作中裂殖壶菌的转化效率有很高的株系依赖性,同种质粒在不同株系之间的转化效率差别很大^[56, 58, 67, 69],另一个重要的产油真菌斯达氏油脂酵母,直到2014年其醋酸锂转化方法才被开发出来^[70]。值得庆幸的是,近几年,斯达氏油脂酵母的遗传转化研究进展迅速,目前PEG介导的原生质体转化以及ATMT转化方法也可用于该菌,尽管转化效率还不太高^[53-54, 71]。

综上,在产油真菌中,转化效率的低下严重限制了遗传操作工具在产油真菌中的开发与使用^[20]。因此,新的转化方法探索及转化条件优化等工作应是产油真菌遗传转化研究后续的关注重点。

2.3 产油真菌基因编辑方法的开发与优化

高效、可靠的遗传操作工具是产油真菌代谢工程改造的利器。遗传操作工具借助载体转化进入胞内,因此其功能的发挥严重依赖于载体类型(自主复制型或自杀型、整合型等)以及载体转化效率。除此之外,遗传操作工具功能的发挥也与宿主的DNA修复能力(尤其是同源重组效率)密

切相关。

一般来说,位于自主复制型载体上的遗传操作工具的功能发挥几乎不受限于转化效率,因为即使转化后仅获得一个携带质粒的转化子,也能通过该转化子的传代、扩增来丰富转化子的多样性,以完成后续遗传操作和正转化子筛选工作。这在一定程度上解释了为何在众多的天然产油真菌中,解脂耶氏酵母的遗传操作工具最为完备^[34, 72-73],根本原因在于解脂耶氏酵母中有复制型质粒可用^[43-44]。目前在解脂耶氏酵母中已可成功实现基于同源重组的靶标基因的无痕删除或整合(等位基因替换)^[74],重组酶介导的位点特异性重组^[75-76],多片段体内/体外组装^[77-78],基于zeta因子或者rDNA序列的目的基因多拷贝整合^[45, 79],基于CRISPR/Cas系统的基因编辑^[74, 80-83],以及由CRISPR/Cas系统辅助的碱基编辑^[84]等多种操作。然而,一个潜在的问题是,解脂耶氏酵母倾向于启动非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)而不是同源重组(homologous recombination, HR)来进行DNA修复^[85],这导致在解脂耶氏酵母中进行精确的基因编辑时需设置长达1 kb左右的上下游序列(同源臂),以方便同源重组^[80]。在敲除与NHEJ修复方式密切关联的*KU70*基因后,解脂耶氏酵母的NHEJ修复能力降低,相应地,同源重组能力被刺激增强^[80, 86-87]。较高的同源重组能力不仅有助于宿主借助同源臂修复由Cas9、nCas9以及重组酶造成的DNA断裂,而且可以大幅提升体内多片段组装的成功率,同时减少非特异性的修复或者非靶向插入。

除解脂耶氏酵母外,大部分产油真菌中无可用的复制型质粒,外源基因只能被装载在自杀质粒或者整合型质粒[如配合根癌农杆菌介导转化(ATMT)使用的Ti质粒]上,也就是说质粒进入细胞后,质粒上的非整合元件仅能在一个细胞分裂周期内起作用,故而遗传操作工具的作用(同源重组或随机插入等重组行为)效率严重依赖于转化效率。毕竟在重组概率一定的情况下,转化子越多,获得正转化子的可能性就越大。以圆红冬孢酵母为例,目前可在该酵母中使用的几种CRISPR/Cas系统均放置在自杀质粒或者整合型的Ti质粒上以醋酸锂化学转化或ATMT方式转化进

入胞内^[58-59, 88]。CRISPR/Cas系统中的Cas9表达盒多被整合在宿主基因组上,但引导Cas9切割的sgRNA均以瞬时表达获得,Cas9切割及同源臂修复需要在细胞分裂前完成。上述连续多步骤的DNA/蛋白质互作过程必须在一个细胞周期内完成,难度较大,故而圆红冬孢酵母基因编辑的阳性转化子的数目较少,而且整合型的Cas9可能会引起潜在的脱靶问题^[88]。对于部分可重复利用而又被整合在染色体上的基因元件(如抗性标记、营养缺陷型标记、报告基因等),需以特殊方法进行回收。由Cre/loxP、FLP/FRT、I-SceI等重组酶系统介导的位点特异性重组已经被引入圆红冬孢酵母用于目的片段的回收^[89-91]。影响基因编辑效率的另一个因素是圆红冬孢酵母的DNA修复系统。和解脂耶氏酵母类似,它也倾向于使用NHEJ而不是HR修复DNA,因此有必要在底盘菌株水平抑制NHEJ或刺激HR。Koh等^[92]发现*KU70*基因缺失后,圆红冬孢酵母的*CAR2*基因的同源重组敲除株的比例可由10.5%提升至75.8%,显示了较好的底盘可塑性。

在其他产油真菌中,遗传操作工具的开发和应用尽管受制于复制元件缺乏、转化效率低下、同源重组能力较弱等因素,但也在不断发展,目前已能够实现基本的异源基因过表达,靶标基因敲除等操作^[20]。表2总结了目前可在各种产油真菌中使用的遗传操作工具及其效果。在CRISPR/Cas系统出现之前,等位基因替换一直是产油真菌精细基因编辑的首选,但是现在正逐步被CRISPR/nCas9或者CRISPR/Cpf1以及它们辅助的碱基编辑技术替代。目前来看,CRISPR-Cas系统是一种颠覆性技术,有力加速了产油真菌的遗传操作技术发展,但部分产油真菌缺乏可用的复制型质粒、转化效率低、同源重组能力弱等仍是限制基因编辑效率的瓶颈。

3 产油真菌代谢工程研究进展

组学数据加深了科学家对产油真菌的遗传背景、生理、代谢方面的理性认识;质粒转化和遗传操作技术,以及启动子、终止子、筛选标记和报告系统,为代谢工程改造提供了工具。利用代

谢工程改造解脂耶氏酵母、圆红冬孢酵母、裂殖壶菌、斯达氏油脂酵母等在脂肪酸及其衍生产品开发^[102]、类胡萝卜素的产量提升、胞内产物外排/分泌、底物谱拓展以及菌株抗逆研究等方面已经取得了一些进展,显示了进一步分子遗传改造的巨大潜力。如前所述,解脂耶氏酵母的遗传操作工具发展最为成熟,因此其代谢工程改造研究也最为系统和完善^[103-104]。本节以解脂耶氏酵母为例,详细介绍产油真菌代谢工程的策略及研究进展。

解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)属半子囊菌类,严格好氧,是食品安全级菌株^[7, 105]。作为应用最广泛、研究最多的非常规酵母之一,解脂耶氏酵母具有理化特征和遗传背景较清晰、分子操作相对成熟、代谢调控可控等优势^[106],已被广泛地认作是脂质合成微生物的模式菌株。由于其抗逆性强、耐酸碱环境、底物谱广、胞内乙酰辅酶A和三羧酸循环代谢通量高等特殊的理化性质和代谢特征,被广泛地认为具有卓越的生物技术工业应用价值,因此已被开发作为诸多精细化学品和天然产物的潜在微生物细胞工厂。目前产品包括二十二碳六烯酸^[9]、赤藓糖醇^[107]、柠檬酸^[108]、2-苯乙醇^[109-110]、番茄红素^[111]、虾青素^[112]、法呢烯^[113]、芳樟醇^[114]、花生四烯酸^[115-116]、紫色杆菌素^[109]和超长链蜡酯^[117]等。特别地,解脂耶氏酵母的脂质积累量能达到细胞干重的38%^[118-120]。

在解脂耶氏酵母油脂合成途径中,三酰基甘油酯(TAGs)首先被合成,随后通过一系列化学修饰包括氧化、碳链延伸、复分解或碳氢活化生成脂质终产物^[121]。近年来随着合成生物学及代谢工程技术的发展,解脂耶氏酵母也被赋予了合成非常规脂肪酸及脂肪酸衍生物的能力,如多不饱和脂肪酸和 γ -癸内酯等^[122]。具体来说,在外界环境中氮源含量较低的情况下,解脂耶氏酵母细胞会激活、协调不同的代谢途径以葡萄糖或其他碳源(如有机酸、醇等)为底物合成三酰基甘油酯^[122]。其代谢机理是氮限制导致解脂耶氏酵母胞内AMP浓度迅速下降,低水平的AMP抑制了异柠檬酸脱氢酶(IDH)的活性,进而下调三羧酸循环(TCA)的代谢通量,导致柠檬酸在线粒体中积累;过量积累的柠檬酸会在线粒体膜转换蛋白作

表2 典型产油真菌遗传操作工具研究进展

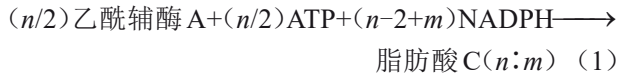
Tab. 2 Research progress on genetic tools of typical lipid producing fungi

菌株	工具	原理	载体	转化方法	文献
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Golden Gate 或 Biobrick 体外多片段组装;	体外分子砌块组装, 体内同源重组(双交换)	线性化质粒	醋酸锂转化	[77-78]
<i>Y. lipolytica</i>	体内多片段组装	同源重组(双交换)	线性化 DNA 片段	醋酸锂转化	[93]
<i>Y. lipolytica</i>	Cre-lox 重组酶系统	位点特异性重组	复制型质粒	醋酸锂转化	[75-76]
<i>Y. lipolytica</i>	基于 rDNA 或 zeta 位点的多拷贝整合	同源重组(单交换或双交换)	自杀质粒或者线性化片段	醋酸锂转化	[45, 79]
<i>Y. lipolytica</i>	染色体随机整合	非同源末端连接	线性化片段	醋酸锂转化	[94]
<i>Y. lipolytica</i>	CRISPR/Cas9 介导的基因编辑, 单基因或多基因敲除、整合	Cas9 切割基因组后, 宿主启动同源重组及非同源末端连接修复	复制型质粒	醋酸锂转化或电转化	[74, 80-83]
<i>Y. lipolytica</i>	CRISPR/dCas9 介导的转录抑制	失去切割活性的 Cas9 结合在靶标序列可阻碍转录正常进行	复制型质粒	醋酸锂转化	[95-96]
<i>Y. lipolytica</i>	CRISPR/dCas9 介导的转录激活	失去切割活性的 Cas9 结合在启动子区域, 招募激活因子后可上调转录	复制型质粒	醋酸锂转化	[97]
<i>Y. lipolytica</i>	CRISPR/Cpf1 介导的基因编辑	Cas9 切割基因组后, 宿主进行非同源末端连接修复	复制型质粒	醋酸锂转化	[98]
<i>Y. lipolytica</i>	CRISPR/Cas9 辅助的碱基编辑系统	胞嘧啶脱氨酶作用后, 宿主碱基对由 C-G 转变为 T-A	复制型质粒	醋酸锂转化	[84]
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	CRISPR/Cas9 基因编辑, 单基因或多基因敲除	非同源末端连接	Ti 质粒	农杆菌介导转化	[88]
<i>R. toruloides</i>	CRISPR/Cas9 基因编辑, 单基因或多基因敲除	非同源末端连接	自杀质粒	醋酸锂化学转化	[59]
<i>R. toruloides</i>	CRISPR/Cas9 基因编辑, 单基因或整合, 多基因敲除	非同源末端连接或同源重组	Ti 质粒	农杆菌介导转化	[58]
<i>R. toruloides</i>	等位基因替换	同源重组(双交换)	Ti 质粒	农杆菌介导转化	[92, 99]
<i>R. toruloides</i>	重组酶系统(Cre-loxP, Flipase-FRT, I-SceI)	位点特异性重组	自杀质粒或 Ti 质粒	农杆菌介导转化或 PEG 介导原生质体转化	[89-91]
<i>R. toruloides</i>	染色体随机整合	非同源末端连接	Ti 质粒	农杆菌介导转化	[51, 64]
<i>R. toruloides</i>	染色体随机整合	非同源末端连接	自杀质粒	PEG 介导原生质体转化	[63]
<i>R. toruloides</i>	染色体随机整合	非同源末端连接	线性化 DNA 片段	电转化	[52]
<i>Schizochytrium</i> sp.	染色体定点整合	同源重组(双交换)	(线性化的)自杀质粒	电穿孔转化	[56-57, 69, 100]
<i>Schizochytrium</i> sp. TIO1101	染色体定点整合	同源重组(单交换)	线性化自杀质粒	电穿孔转化	[55]
<i>Schizochytrium</i> sp.	染色体随机整合	非同源末端连接	线性化自杀质粒	电穿孔转化	[101]
<i>Schizochytrium</i> sp.	染色体随机整合	非同源末端连接	Ti 质粒	农杆菌介导转化	[68]
<i>Lipomyces starkeyi</i>	染色体随机整合	非同源末端连接	Ti 质粒	农杆菌介导转化	[54]
<i>L. starkeyi</i>	染色体定点整合	同源重组(双交换)	线性化的自杀质粒	PEG 介导原生质体转化	[53, 71]

用下转运至细胞质, 之后通过 ATP 柠檬酸裂解酶 (ACL) 将柠檬酸裂解为胞质乙酰辅酶 A 和草酰乙

酸, 胞质乙酰辅酶 A 是脂质的合成直接前体。式 (1) 为解脂耶氏酵母中脂肪酸 (酰基辅酶 A)

合成的总化学计量关系式（其中 n 和 m 分别表示链长和饱和度）^[122]：



进一步，3分子酰基辅酶A与1分子甘油-3-磷酸（G3P）在内质网和脂质体表面通过Kennedy途径缩合形成三酰基甘油酯，并储存于脂质体（lipid body）中，具体反应如下：首先，在甘油-3-磷酸酰基转移酶（SCT1）的作用下消耗1分子酰基辅酶A酰化甘油-3-磷酸形成溶血磷脂酸（LPA）；进一步，消耗1分子酰基辅酶A，血磷脂酸被血磷脂酸酰基转移酶（SLC1）酰化生成酸钛酸（PA）；酸钛酸被酸钛酸磷酸酶（PAP）去磷酸化释放二酰基甘油（DAG）；最后，以1分子酰基辅酶A为最终酰基供体通过DAG酰基转移酶（DGA1或DGA2）合成三酰基甘油，或以甘油磷脂为酰基供体通过磷脂DAG酰基转移酶（LRO1）合成^[122-123]。

基于清晰的脂质代谢网络（图3），通过工程

手段理性地进行合成途径设计、前体强化供给、途径表达优化、降解途径抑制及调控网络编辑重构等技术能有效地改善、提高解脂耶氏酵母合成脂质产物的能力^[124]。其中，最成功、典型的案例是美国杜邦公司通过引入多个拷贝的异源延长酶和去饱和酶基因，同时对解脂耶氏酵母自身的脂质合成途径进行重构，包括过表达C_{16/18}延伸酶、Δ12去饱和酶、降低过氧化物体β-氧化活性等，最终工程菌株能生产占总细胞干重的25%的二十碳五烯酸（EPA），成功实现了EPA微生物发酵法商业生产^[9]。此外，麻省理工学院Stephanopoulos团队重构解脂耶氏酵母胞内NADPH的合成网络，有效地促进了油脂的合成，最终油脂达到98.9 g/L，产量再创纪录^[22]。下面结合近年来微生物合成油脂进展（表3），通过代谢工程角度主要从脂质合成途径优化、辅因子工程、降解途径抑制和分泌等方面进行介绍如何设计、构建解脂耶氏酵母脂质细胞工厂。

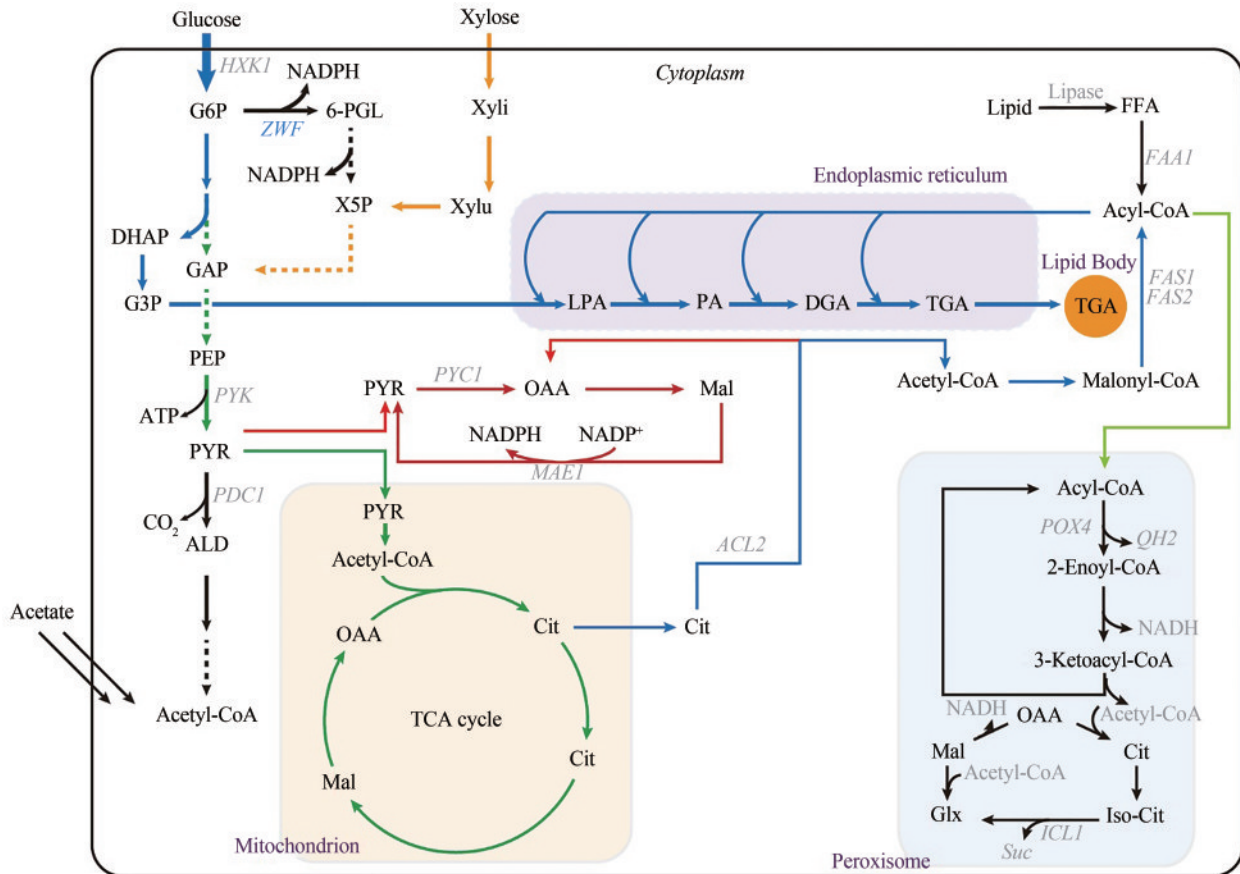


图3 产油真菌胞内脂质合成代谢网络

Fig. 3 Lipid biosynthesis network of oil producing fungi

表3 代谢工程改造 *Yarrowia lipolytica* 合成油脂及衍生品的研究进展Tab. 3 Research progress in metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* synthesizing lipids and derivatives

工程菌	宿主	遗传操作	产物	产量	底物	培养方式
S14G190-ACC1 Y-4311 ^[125]	ATCC 20460	敲除甘油-3-磷酸脱氢酶(Gpd1和Gut2)和氧化物酶体基质蛋白Pex10; 过表达乙酰辅酶A羧化酶ACC1	游离脂肪酸	2.03 g/L	甘油和正十二烷	摇瓶
M-MHY1 ^[126]	ACA-DC 50109	敲除C2H2锌指蛋白Mhy1	三乙酰甘油酯	43.1% (DCW)	葡萄糖	摇瓶
y1XYL+Obese-XA ^[127]	PO1d	敲除酰基辅酶A氧化酶(POX1-6)和脂肪酶Tgl4; 过表达DAG酰基转移酶DGA1、磷酸转酮酶XPKA、乙酸激酶ACK、乙酰辅酶A合成酶ACS2、磷酸转乙酰酶XA、木糖还原酶XR、木糖醇脱氢酶XDH和木酮糖激酶XK	三乙酰甘油酯	16.5 g/L	蔗糖	发酵罐
JMY3580 ^[128]	ATCC 20460	敲除DAG酰基转移酶(Dga1、Dga2和Lro1)和酰基辅酶A甾醇酰基转移酶; 过表达DAG酰基转移酶DGA2	脂肪酸	9.9 g/L	甘油	摇瓶
ADgm-hi ^[122]	PO1g	过表达乙酰辅酶A羧化酶ACC1、DAG酰基转移酶DGA1、NAD ⁺ 激酶YEF和3-磷酸甘油醛脱氢酶GapC	脂肪酸甲酯	98.9 g/L	葡萄糖	发酵罐
W29 (Dpex10 ZWF1 ACBP) ^[129]	ATCC 20460	敲除氧化物酶体基质蛋白Pex10; 过表达葡萄糖-6-磷酸脱氢酶ZWF	三乙酰甘油酯	30% (DCW)	葡萄糖	摇瓶
PO1f-6-D ^[130]	PO1f	过表达来源 <i>Mortierella alpina</i> 的 $\Delta 6$ 去饱和酶	γ -亚油酸	71.6 mg/L	葡萄糖	摇瓶
ALDH ^[131]	PO1g	过表达乙酰辅酶A羧化酶ACC1、DAG酰基转移酶DGA1、醛脱氢酶EcAldH(来源于 <i>E. coli</i>)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶ZWF(来源于 <i>S. cerevisiae</i>)、谷胱甘肽二硫还原酶GSR和硫氧还蛋白还原酶TRX	三乙酰甘油酯	72.7 g/L	葡萄糖	发酵罐
Tafar1-5copy- Δ dga1 fao1 ^[132]	PO1f	敲除DAG酰基转移酶Dga1和脂肪醇氧化酶Fao1; 过表达脂肪酰辅酶A还原酶Tafar1	脂肪醇	690.21 mg/L	甘油	发酵罐
AD pYLXP-yIFAS1-EcTesA ^[133]	PO1g	表达脂肪酸合酶FAS1和硫脂酶EcTesA(来源于 <i>E. coli</i>)	游离脂肪酸	9.67 g/L	葡萄糖	发酵罐
AD pYLXP-AbAtfA-scCat2 ^[133]	PO1g	表达蜡酯合酶AbAtfA(来源于 <i>A. baylyi</i> ADP1)和肉碱乙酰转移酶scCat2	脂肪酸乙酯	142.5 mg/L	葡萄糖	摇瓶
AD pYLXP- Maqu2220-EcfadD ^[133]	PO1g	表达脂肪酰辅酶A合成酶Maqu2220和EcfadD(来源于 <i>Marinobacter aquaeolei</i> 和 <i>E. coli</i>)	脂肪酸醇	2.15 g/L	葡萄糖	摇瓶
AD pYLXP-MmCAR-BsuSfp-PmADO ^[133]	PO1g	表达羧酸还原酶MmCAR(来源于 <i>M. marinum</i>)、磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶BsuSfp(来源于 <i>Bacillus subtilis</i>)和醛脱甲氧化酶PmADO (<i>Prochlorococcus marinus</i>)	脂肪烷烃	23.3 mg/L	葡萄糖	摇瓶
AD pYLXP-yIACC1-yIDGA1-scCat2 ^[133]	PO1g	表达乙酰辅酶A羧化酶ACC1、DAG酰基转移酶DGA1和肉碱乙酰转移酶Cat2	三乙酰甘油酯	66.4 g/L	葡萄糖	发酵罐
PMOC ^[134]	PO1h	表达聚羟基脂肪酸合酶PhaC1	聚羟基链烷酸酯	1.11 g/L	正十二烷	摇瓶

续表

工程菌	宿主	遗传操作	产物	产量	底物	培养方式
YL-ad9 ^[135]	PO1f	过表达乙酰辅酶A羧化酶 ACC1、DAG 酰基转移酶 DGA1 和硬脂酰辅酶A去饱和酶 SCD	三乙酰甘油酯	55 g/L	葡萄糖	发酵罐
Y4305 ^[9]	ATCC 20362	敲除氧化物酶体基质蛋白 Pex10、脂肪酶1、固醇载体蛋白 scp2 和未知功能基因 <i>yali0c1871</i> ; 过表达 $C_{16/18}$ 延伸酶和 $\Delta 12$ 、 $\Delta 9$ 、 $\Delta 8$ 、 $\Delta 5$ 和 $\Delta 17$ 去饱和酶	ω -3 二十碳五烯酸	15%(DCW)	葡萄糖	摇瓶

3.1 前体合成途径优化

解脂耶氏酵母胞质中乙酰辅酶A是由ATP柠檬酸裂解酶(ACL)裂解柠檬酸产生,其作为乙酰基供体,是脂肪酸酰基链延伸的基本单位。然而,过表达或异源表达的ATP柠檬酸裂解酶均未显著提高解脂耶氏酵母的脂肪酸产量^[136-137],可能是由于解脂耶氏酵母的胞质乙酰辅酶A合成与氮饥饿存在代谢偶联。为此,Xu等^[20]设计了5种胞质乙酰辅酶A的合成方式以解除胞质乙酰辅酶A的合成与氮饥饿的代谢偶联,包括丙酮酸-乙酸途径、丙酮酸-乙醛途径、丙酮酸甲酰裂解酶、乙酰辅酶A穿梭回路和非氧化磷酸戊糖途径,结果表明构建乙酰辅酶A穿梭回路和非氧化磷酸戊糖途径能显著地增加了油脂的产量。此外,引入酿酒酵母来源的乙酰辅酶A合成酶(ACS2)也能有效促进油脂的合成^[138]。特别是,乙酸摄取途径可以作为乙酰辅酶A合成供给的捷径,以乙酸为碳源同时强化乙酸合酶能显著提高胞质乙酰辅酶A的水平^[139]。

乙酰辅酶A羧化酶ACC能催化乙酰辅酶A生成丙二酰辅酶A,丙二酰辅酶A是脂肪酸酰基链延伸的骨架。Tai等^[140]过表达解脂耶氏酵母自身的乙酰辅酶A羧化酶ACC,能促使脂肪酸的产量增加2倍,表明强化乙酰辅酶A羧化酶的表达也是促进脂质合成的关键。

3.2 辅因子工程

脂质是还原度较高的代谢产物,来源于乙酰辅酶A的乙酰基($\text{CH}_3\text{-CO-}$)只能通过NADPH还原后,才能成为脂肪酸的酰基链^[52]。研究表明,NADPH供给是解脂耶氏酵母脂质合成的重要

限速步骤,且NADPH的供给方式会影响底物/产物电子传递效率,进而改变脂质产量和得率^[22]。通常来说,在产油真菌中胞质NADPH的供应有2种方式,分别是磷酸戊糖途径和苹果酸酶^[141]。Wasylenko等采用¹³C同位素标记法对脂肪酸高/低产解脂耶氏酵母工程菌株进行代谢流分析,确定胞质NADPH主要通过磷酸戊糖途径供给^[142]。与此同时,Dulermo和Zhang等分别对解脂耶氏酵母中苹果酸酶编码基因MAE1进行失活和过表达,皆未显著影响油脂的合成^[133, 143],进一步佐证了解脂耶氏酵母胞质NADPH主要通过磷酸戊糖途径供给的结论。强化表达解脂耶氏酵母磷酸戊糖途径中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶ZWF1,油脂产量能较出发菌株提高41%^[129]。值得一提的是,Qiao等通过设计、引入人工合成途径重构胞质NADPH供给,打破解脂耶氏酵母自身NADPH代谢的桎梏,实现将糖酵解途径产生的NADH转化为NADPH,最终油脂产量达98.9 g/L,此产量为目前报道最高^[22]。

3.3 降解途径抑制

当碳底物耗尽时,脂质会通过再活化(remobilization)或 β -氧化降解方式以维持细胞正常代谢^[141]。解脂耶氏酵母的脂质再活化是由脂肪酶TGL4催化,该酶定位于脂质体表面,敲除该基因能将脂肪酸产量提高2倍^[144]。解脂耶氏酵母的 β -氧化发生在过氧化物酶体中,共包括四个反应,最终将酰基链缩短两个碳,释放一个乙酰辅酶A分子^[122]。 β -氧化途径第一步反应是由6种酰基辅酶A氧化酶(POX1-6)催化,其可识别不同链长的酰基辅酶A;第二步和第三步反应是由双功能过氧化物酶(MFE2)完成;最后一步反应由3-酮酰

辅A硫醇化酶(POT1)实现,抑制 β -氧化是防止脂质降解、促进脂质进一步积累的主要工程靶点。比如,Dulermo等失活基因*POXI-6*和*MFE1*,同时优化解脂耶氏酵母的脂肪酸合成途径,最终脂质积累量能达到细胞干重的65%~75%^[119]。此外,敲除过氧化物酶体中*PEX3*、*PEX10*和*PEX311*基因(编码过氧化物酶体基质蛋白),能破坏过氧化物酶体的形成,抑制 β -氧化,有效增加脂质的产量^[9, 21, 145]。

3.4 脂肪酸的分泌

尽管相比于野生菌株,工程解脂耶氏酵母菌株合成脂质产物的能力取得了实质性的进展^[122],但到目前为止,只有高附加值脂质产物EPA实现了工业化生产^[9],因此为了进一步推动微生物脂质工业,工程菌株合成脂质的能力亟待进一步提高。脂质分泌合成为构建高效微生物油脂细胞工厂提供新的契机,将脂质产物分泌至胞外,不仅能增加产量,也能避免中间代谢物积累对细胞造成毒性,同时还可以减少产物回收的成本。为此,Amaro等首先将参与脂肪酸再活化和降解相关的两个基因(*FAA1*和*MFE2*)缺失,缺失后的细胞不再能将脂肪酸转化为酰基辅酶A或进行 β -氧化,并进一步消除脂质体的形成以释放游离脂肪酸。最终,工程菌株的胞外的游离脂肪酸浓度为10.4 g/L,相当于每克细胞合成1.2 g的脂质,远远超过细胞的存储极限^[120]。

相比于解脂耶氏酵母,其他典型产油真菌如圆红冬孢酵母、裂殖壶菌、破囊壶菌及斯达氏油脂酵母的代谢工程研究还处于起步阶段^[11, 53, 100-101, 125],基本停留在油脂合成途径关键基因的超表达阶段,旁路途径的弱化或敲除都还比较少见,暗示目前的代谢工程改造研究仍在初级阶段,缺乏系统性和大局观。因此,开发新型遗传操作工具助推代谢工程研究是当务之急。代谢工程研究的另一个迫切需求是升级目标产物。目前的代谢工程改造主要以油脂高产为目的。事实上,很多油脂的衍生产物如不饱和脂肪酸、烷烃、脂肪醇等属于高附加值产品,也值得大力开发。

4 产油真菌产品高值化研究进展

以不饱和脂肪酸、长链烷烃、脂肪醇、萜类为代表的高值化学品由于应用领域广、经济性高而具备良好的商业价值。代谢工程改造模式微生物如大肠杆菌、酿酒酵母用于高值化学品的合成已进行广泛的研究和综述。近年来,越来越多研究者尝试利用解脂耶氏酵母、圆红冬孢酵母、裂殖壶菌、破囊壶菌等产油真菌合成高值化合物。这些真核产油微生物在油脂产量和生产强度上有明显优势,因此在上述高值化学品合成应用中极具开发潜力^[146]。

破囊壶菌和裂殖壶菌由于具有生物量高,抗逆性强,底物谱广、天然产油量高以及油脂中高附加值不饱和脂肪酸占比极高的特征^[25-26],适用于不饱和脂肪酸及相关高值衍生物的生产。破囊壶菌(*Thraustochytrium*)和裂殖壶菌属于破囊壶菌科(*Thraustochytriaceae*),是一类单细胞海洋原生生物,常见于海水和红树林中,其中多种不饱和脂肪酸高产菌种已经被鉴定^[147-149]。由于早期研究中,裂殖壶菌和破囊壶菌的分类学和系统发育研究存在一定混乱和交叉,以下介绍中以裂殖壶菌为主,包括部分破囊壶菌内容。

裂殖壶菌的脂肪酸组成很简单,主要是以 $C_{14:0}$ 和 $C_{16:0}$ 为代表的短链脂肪酸以及以 $C_{22:5}$ 和 $C_{22:6}$ 为主的长链多不饱和脂肪酸^[150]。在作为DHA生产菌的菌株筛选过程中,研究人员还发现了其他具有商业价值的化合物如类胡萝卜素或角鲨烯的积累。这些化学品已被广泛应用于食品,饲料和药品领域,以产油真菌作为细胞工厂合成相关高附加值化合物将极具应用价值。

4.1 DHA

20世纪80年代中期开始,人们开始认识到长链多不饱和 ω -3脂肪酸(如EPA、DHA)的重要性^[151]。DHA是一种对人类健康必不可少的不饱和脂肪酸,可以促进眼睛和神经系统的发育,且有利于成年人心血管健康,其最初的主要来源是深海鱼油。裂殖壶菌能够以三酰基甘油的形式积累高水平的脂质,其中DHA含量可高达总脂质的

30%~70%，因此作为 DHA 生产者极具竞争力^[150]。从裂殖壶菌种提取的富含 DHA 油脂已被美国 FDA 授予公认安全（Generally Recognized as Safe, GRAS）认证用于商业化生产。

20 世纪 90 年代初期，研究人员成功鉴定并开始使用裂殖壶菌生产 DHA^[152]。几年后，美国 OmegaTech 公司将基于裂殖壶菌的富 DHA 油进行商业化，该公司后来被 Martek 收购，现在已成为 DSM 的一部分^[153]。

裂殖壶菌和破囊壶菌使用标准的脂肪酸合酶复合物来合成短链饱和脂肪酸，主要是 C_{14:0} 和 C_{16:0}^[154]。对于长链不饱和脂肪酸，在自然界中存在两种生物合成途径：延长去饱和酶途径和聚酮合酶（PKS）途径。延长去饱和途径从短链饱和脂肪酸出发，利用去饱和酶和延长酶来产生多不饱和脂肪酸。而 PKS 途径可催化不饱和脂肪酸的从头合成，在该过程中，通过还原、脱水、还原、缩合的循环合成长链不饱和脂肪酸^[155]。已有研究表明，裂殖壶菌及破囊壶菌通过 PKS 途径合成高水平的 DHA^[156]。相比于 FAS 途径，通过 PKS 合成 1 分子 DHA 需消耗 14 分子还原力 NADPH，相比延长去饱和途径节约了 40%，同时副产物更少。

裂殖壶菌和破囊壶菌的油脂积累具有阶段性的特征，在未经基因工程改造的裂殖壶菌和破囊壶菌中，通过控制氮源、溶解氧实现的多阶段发酵过程结合合适的发酵罐设计和放大策略，可显著提高油脂和 DHA 产量^[25, 157-158]。而通过合适的发酵罐选择和发酵放大策略，裂殖壶菌可实现生物量超过 150 g/L，油脂产量 103.6 g/L，DHA 产量 44.3 g/L，DHA 产率 369.08 mg/(L·h)^[25]。在此基础上，已有研究通过代谢工程手段对裂殖壶菌进行改造以获得更优良的产油性能。如通过表达超氧化物歧化酶基因以减轻发酵过程中胞内产生的活性氧，从而提升 DHA 产量^[100]。

4.2 角鲨烯

角鲨烯是固醇生物合成的中间体，被广泛用作药物乳剂中的赋形剂，用于递送疫苗、药物和其他药用前体。角鲨烯可以改善免疫系统，因此可以用作癌症治疗中的保护剂，也可作为化妆品

中的保湿剂和抗氧化剂^[159]。从 2014 年到 2019 年，角鲨烯的全球销量由 4156.9 t 增加至 6547.2 t，复合年增长率为 9.80%，预计到 2025 年，角鲨烯全球销售额将达到 1.64 亿美元。

由于存在甲羟戊酸（mevalonate, MVA）途径和充裕的乙酰辅酶 A 供应，因此在裂殖壶菌和破囊壶菌中可通过 MVA 途径经由法呢基二磷酸（farnesyl diphosphate, FPP）合成角鲨烯。以 *Aurantiochytrium* 属为代表的一些破囊壶菌，已被证明可积累超过 30% DCW 的角鲨烯。其中菌株 18 W-13a 和 Yonez5-1 分别能够生产占总脂质 69% 和 94% 的角鲨烯^[160-161]，但产量较低（约 1 g/L）。裂殖壶菌 CCTCC M209059 可在生长和脂质积累阶段前期积累大量角鲨烯，达到总脂质 38%，滴度最高可达约 3 g/L^[162]，而在脂质积累后期角鲨烯浓度会逐渐降低。

由于缺乏生产动力学研究，破囊壶菌和裂殖壶菌的角鲨烯合成水平暂时相对较低，后续提升空间很大。而相对明确的、线性的生物合成途径和也提示基因工程改造可能是提高产油真菌角鲨烯产量的有效策略。

4.3 类胡萝卜素

类胡萝卜素是一类天然色素的总称，可分为叶黄素和胡萝卜素。商业上最重要的类胡萝卜素是叶黄素中的虾青素、鸡油菌素、叶黄素和玉米黄素，以及胡萝卜素中的 β -胡萝卜素和番茄红素。类胡萝卜素的主要用途是在食品和饲料中用作着色剂，也由于具有抗氧化功能在营养，药品和化妆品领域的应用不断增加^[163]。目前由于微生物合成法不具有成本优势，大多数类胡萝卜素目前仍由化学合成或通过植物提取获得。

类胡萝卜素的合成与角鲨烯类似，均通过 MVA 途径合成，并且以 FPP 为共同前体。已有研究表明破囊壶菌 ONC-T18 可同时合成 β -胡萝卜素和虾青素、玉米黄素等类胡萝卜素，总含量约为 30 $\mu\text{g/g}$ DCW^[164]。破囊壶菌 CHN-1 和 *Aurantiochytrium* sp. KH105 都被报道可以合成少量虾青素^[165-166]。迄今为止报道类胡萝卜素天然产量最高的产油真菌是破囊壶菌 AS4-A1，可合成高达 0.3~0.45 g/L 虾

青素^[167]。

解脂耶氏酵母由于同样具备MVA途径及充裕的乙酰辅酶A供给,已被用于代谢工程改造合成类胡萝卜素如 β -胡萝卜素^[168-169]、番茄红素^[170]或虾青素^[112]。也可借鉴相应策略用于提升裂殖壶菌和破囊壶菌的类胡萝卜素类化合物产量。

5 总结与展望

微生物油脂作为重要化工原料及潜在的营养补充物,在保障我国经济发展、粮食安全、能源安全等方面有重要作用。相比于细菌,天然产油真菌在油脂产量和生产强度上有巨大优势,有潜力被进一步改造为油脂细胞工厂。当前天然产油真菌改造的主要瓶颈在于缺乏遗传操作工具。幸运的是,合成生物学的飞速发展有力推动了该领域的研究。天然产油真菌在合成生物学元件挖掘、外源基因转化方法以及遗传工具开发等方面已取得重要进展。而且,随着基因组和转录组研究深入,越来越多的内源基因元件如启动子、终止子、筛选标记、复制子等会被鉴定和使用。另外,很多在模式菌株如酿酒酵母或者丝状真菌中已经成功应用的转化方法、遗传工具、筛选标记或者报告系统也开始被引入产油真菌。以上努力将促成产油真菌遗传操作技术尤其是基因编辑技术的不断改进和迭代更新,有力推动其代谢工程及产品升级研究。当前的代谢工程及产品高值化研究与合成生物学思想联系紧密,跨物种募集元件,超时空调试途径及网络已成为可能,但元件、途径、装置之间及它们与宿主系统的适配仍是当前的主要难题,需要依赖可靠的模型或者算法指导,需要依托精确高效的基因编辑工具和先进发酵控制系统。

可以预期,在合成生物学时代,未来的产油真菌的代谢工程将更多地与遗传操作工具开发和产品高值化升级相联系。以人工智能和大数据技术挖掘和表征新型合成生物学元件,借鉴和引进已经在其他菌株中高效使用的遗传转化方法,开发更多的高效基因编辑工具将成为常态;而代谢工程在基因组规模代谢网络模型、流平衡分析算法以及更先进模型算法的指引下,在多尺度智能

过程控制装备的协助下,有力推动下一代产真核油脂细胞工厂的开发。

参 考 文 献

- [1] 谭天伟,苏海佳,陈必强,等.绿色生物制造[J].北京化工大学学报(自然科学版),2018,45(5):107-118.
TAN T W, SU H J, CHEN B Q, et al. Green bio-manufacturing[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2018, 45(5): 107-118.
- [2] WEN Z Q, ZHANG S F, ODOH C K, et al. *Rhodospiridium toruloides*-A potential red yeast chassis for lipids and beyond[J]. FEMS Yeast Research, 2020, 20(5): foaa038.
- [3] 胡学超,任路静,胡耀池,等.裂殖壶菌制备二十二碳六烯酸油脂的研究历程及发展前景[J].食品与发酵工业,2018,44(11):311-316.
HU X C, REN L J, HU Y C, et al. Research progress and development prospect of producing docosahexaenoic acid oil by *Schizochytrium* sp.[J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(11): 311-316.
- [4] SHI S, ZHAO H. Metabolic engineering of oleaginous yeasts for production of fuels and chemicals[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2185.
- [5] PATEL A, KARAGEORGOU D, ROVA E, et al. An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and Omega-3 fatty acid-based industries[J]. Microorganisms, 2020, 8(3).
- [6] PARK Y K, NICAUD J M, LEDESMA-AMARO R. The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(3): 304-317.
- [7] MA J B, GU Y, MARSAFARI M, et al. Synthetic biology, systems biology, and metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* toward a sustainable biorefinery platform[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2020, 47(9/10): 845-862.
- [8] TAKAKU H, MATSUZAWA T, YAOI K, et al. Lipid metabolism of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(14): 6141-6148.
- [9] XUE Z X, SHARPE PAMELA L, HONG S-P, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 734-740.
- [10] WANG Y N, ZHANG S F, POTTER M, et al. Overexpression of Delta12-fatty acid desaturase in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* for production of linoleic acid-rich lipids[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 180(8): 1497-1507.
- [11] FILLET S, RONCHEL C, CALLEJO C, et al. Engineering

- Rhodospiridium toruloides* for the production of very long-chain monounsaturated fatty acid-rich oils[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(19): 7271-7280.
- [12] ZHOU Y J, BUIJS N A, ZHU Z, et al. Harnessing yeast peroxisomes for biosynthesis of fatty-acid-derived biofuels and chemicals with relieved side-pathway competition[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(47): 15368-15377.
- [13] ZHOU Y J J, BUIJS NICOLAAS A, ZHU Z W, et al. Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11709.
- [14] YE Y, HUANG Y, XIA A, et al. Optimizing culture conditions for heterotrophic-assisted photoautotrophic biofilm growth of *Chlorella vulgaris* to simultaneously improve microalgae biomass and lipid productivity[J]. Bioresource Technology, 2018, 270: 80-87.
- [15] KUMAR S, GUPTA N, PAKSHIRAJAN K. Simultaneous lipid production and dairy wastewater treatment using *Rhodococcus opacus* in a batch bioreactor for potential biodiesel application[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2015, 3(3): 1630-1636.
- [16] KIM D, LEE J, HWANG Y, et al. Continuous cultivation of photosynthetic bacteria for fatty acids production[J]. Bioresource Technology, 2013, 148: 277-282.
- [17] ZHENG Y, LI L, LIU Q, et al. Boosting the free fatty acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a cytosolic Acinetobacter baylyi thioesterase[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(1): 76.
- [18] DELLOMONACO C, CLOMBURG J M, MILLER E N, et al. Engineered reversal of the beta-oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals[J]. Nature, 2011, 476(7360): 355-359.
- [19] XIAO Y, BOWEN C H, LIU D, et al. Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis[J]. Nature Chemical Biology, 2016, 12(5): 339-344.
- [20] YU T, ZHOU Y J, HUANG M, et al. Reprogramming yeast metabolism from alcoholic fermentation to *Lipogenesis*[J]. Cell, 2018, 174(6): 1549-1558.
- [21] BLAZECK J, HILL A, LIU L, et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3131.
- [22] QIAO K, WASYLENKO T M, ZHOU K, et al. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(2): 173-177.
- [23] ZHAO X, HU C M, WU S G, et al. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(5): 627-632.
- [24] LEE J J L, CHEN L W, CAO B, et al. Engineering *Rhodospiridium toruloides* with a membrane transporter facilitates production and separation of carotenoids and lipids in a bi-phasic culture[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(2): 869-877.
- [25] GUO D S, JI X J, REN L J, et al. Development of a multi-stage continuous fermentation strategy for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.[J]. Bioresource Technology, 2018, 269: 32-39.
- [26] SUN X M, REN L J, BI Z Q, et al. Adaptive evolution of microalgae *Schizochytrium* sp. under high salinity stress to alleviate oxidative damage and improve lipid biosynthesis[J]. Bioresource Technology, 2018, 267: 438-444.
- [27] MATSAKAS L, STERIOTI A-A, ROVA U, et al. Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807[J]. Industrial Crops and Products, 2014, 62: 367-372.
- [28] HUANG C, CHEN X F, YANG X Y, et al. Bioconversion of corncob acid hydrolysate into microbial oil by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(4): 2197-2204.
- [29] HARDE S M, WANG Z, HORNE M, et al. Microbial lipid production from SPORL-pretreated Douglas fir by *Mortierella isabellina*[J]. Fuel, 2016, 175:64-74.
- [30] ANNAMALAI N, SIVAKUMAR N, OLESKOWICZ-POPIEL P. Enhanced production of microbial lipids from waste office paper by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*[J]. Fuel, 2018, 217: 420-426.
- [31] SHEN Q, CHEN Y, LIN H, et al. Agro-industrial waste recycling by *Trichosporon fermentans*: conversion of waste sweet potato vines alone into lipid[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(9): 8793-8799.
- [32] CHEN J X, ZHANG X L, YAN S, et al. Lipid production from fed-batch fermentation of crude glycerol directed by the kinetic study of batch fermentations[J]. Fuel, 2017, 209:1-9.
- [33] KARAMEROU E E, THEODOROPOULOS C, WEBB C. Evaluating feeding strategies for microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*[J]. Engineering in Life Sciences, 2017, 17(3): 314-324.
- [34] MILLER K K, ALPER H S. *Yarrowia lipolytica*: more than an oleaginous workhorse[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(23/24): 9251-9262.
- [35] MADZAK C, BLANCHIN-ROLAND S, CORDERO OTERO R R, et al. Functional analysis of upstream regulating regions from the *Yarrowia lipolytica* XPR2 promoter[J]. Microbiology, 1999, 145(Pt 1): 75-87.

- [36] JURETZEK T, WANG H J, NICAUD J M, et al. Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of β -galactosidase in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2000, 5(5): 320-326.
- [37] BLAZECK J, LIU L, REDDEN H, et al. Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(22): 7905-7914.
- [38] HONG S P, SEIP J, WALTERS-POLLAK D, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to express secretory invertase with strong FBA1IN promoter[J]. *Yeast*, 2012, 29(2): 59-72.
- [39] MADZAK C, GAILLARDIN C, BECKERICH J M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 109(1/2): 63-81.
- [40] DALL M T, NICAUD J M, GAILLARDIN C. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Current Genetics*, 1994, 26(1): 38-44.
- [41] CHEON S A, HAN E J, KANG H A, et al. Isolation and characterization of the *TRP1* gene from the yeast *Yarrowia lipolytica* and multiple gene disruption using a TRP blaster[J]. *Yeast*, 2010, 20(8): 677-685.
- [42] OTERO R C, GAILLARDIN C. Efficient selection of hygromycin-B-resistant *Yarrowia lipolytica* transformants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 46(2): 143-148.
- [43] LIU L Q, OTOUPAL P, PAN A, et al. Increasing expression level and copy number of a *Yarrowia lipolytica* plasmid through regulated centromere function[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(7): 1124-1127.
- [44] FOURNIER P, ABBAS A, CHASLES M, et al. Colocalization of centromeric and replicative functions on autonomously replicating sequences isolated from the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(11): 4912-4916.
- [45] JURETZEK T, LE DALL M, MAUERSBERGER S, et al. Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Yeast*, 2001, 18(2): 97-113.
- [46] LIU Y, KOH C M J, NGOH S T, et al. Engineering an efficient and tight D-amino acid-inducible gene expression system in *Rhodospiridium/Rhodotorula* species[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 170.
- [47] JOHNS A M, LOVE J, AVES S J. Four inducible promoters for controlled gene expression in the oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1666.
- [48] WANG Y N, LIN X P, ZHANG S F, et al. Cloning and evaluation of different constitutive promoters in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Yeast*, 2016, 33(3): 99-106.
- [49] LIU Y, YAP S A, KOH C M, et al. Developing a set of strong intronic promoters for robust metabolic engineering in oleaginous *Rhodotorula (Rhodosporidium)* yeast species[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 200.
- [50] DÍAZ T, FILLET S, CAMPOY S, et al. Combining evolutionary and metabolic engineering in *Rhodospiridium toruloides* for lipid production with non-detoxified wheat straw hydrolysates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(7): 3287-3300.
- [51] LIN X P, WANG Y N, ZHANG S F, et al. Functional integration of multiple genes into the genome of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(4): 547-555.
- [52] XUE J, BALAMURUGAN S, LI D W, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase as a target for highly efficient fatty acid biosynthesis in microalgae by enhancing NADPH supply[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 212-221.
- [53] OGURO Y, YAMAZAKI H, SHIDA Y, et al. Multicopy integration and expression of heterologous genes in the oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79(3): 512-515.
- [54] DAI Z Y, DENG S, CULLEY D E, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of oleaginous yeast *Lipomyces* species[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(15): 6099-6110.
- [55] YAN J F, CHENG R B, LIN X Z, et al. Overexpression of acetyl-CoA synthetase increased the biomass and fatty acid proportion in microalga *Schizochytrium*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(5): 1933-1939.
- [56] LI Z, MENG T, LING X, et al. Overexpression of malonyl-CoA: ACP transacylase in *Schizochytrium* sp. to improve polyunsaturated fatty acid production[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(21): 5382-5391.
- [57] WANG F, BI Y, DIAO J, et al. Metabolic engineering to enhance biosynthesis of both docosahexaenoic acid and odd-chain fatty acids in *Schizochytrium* sp. S31[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 141.
- [58] JIAO X, ZHANG Y, LIU X, et al. Developing a CRISPR/Cas9 system for genome editing in the basidiomycetous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(7): e1900036.
- [59] OTOUPAL P B, ITO M, ARKIN A P, et al. Multiplexed CRISPR-Cas9 based genome editing of *Rhodospiridium toruloides*[J]. *mSphere*. 2019, 20;4(2): e00099-19.
- [60] DAVIDOW L S, APOSTOLAKOS D, O'DONNELL M M, et al. Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Current Genetics*, 1985, 10(1): 39-48.

- [61] CHEN D C, BECKERICH J M, GAILLARDIN C. One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 48(2): 232-235.
- [62] WANG J H, HUNG W, TSAI S H. High efficiency transformation by electroporation of *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 2011, 49(3): 469-472.
- [63] TULLY M, GILBERT H J. Transformation of *Rhodospiridium toruloides*[J]. Gene, 1985, 36(3): 235-240.
- [64] LIU Y B, KOH C M J, SUN L H, et al. Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *RtGPD1* and development of genetic transformation method by dominant selection in oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(2): 719-729.
- [65] TSAI Y Y, OHASHI T, KANAZAWA T, et al. Development of a sufficient and effective procedure for transformation of an oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU₃-TK16[J]. Current Genetics, 2017, 63(2): 359-371.
- [66] ROESSLER P, MATTHEWS T, RAMSEIER T, et al. Product and process for transformation of thraustochytriales microorganisms: US2003166207-A1[P]. 2001.
- [67] LIPPMEIER J C, CRAWFORD K S, OWEN C B, et al. Characterization of both polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathways in *Schizochytrium* sp.[J]. Lipids, 2009, 44(7): 621-630.
- [68] CHENG R, MA R, LI K, et al. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*[J]. Microbiological Research, 2012, 167(3): 179-186.
- [69] REN L J, ZHUANG X Y, CHEN S L, et al. Introduction of ω -3 desaturase obviously changed the fatty acid profile and sterol content of *Schizochytrium* sp. [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(44): 9770-9776
- [70] CALVEY C H, WILLIS L B, JEFFRIES T W. An optimized transformation protocol for *Lipomyces starkeyi*[J]. Current Genetics, 2014, 60(3): 223-230.
- [71] OGURO Y, YAMAZAKI H, ARA S, et al. Efficient gene targeting in non-homologous end-joining-deficient *Lipomyces starkeyi* strains[J]. Current Genetics, 2017, 63(4): 751-763.
- [72] LARROUDE M, ROSSIGNOL T, NICAUD J M, et al. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(8): 2150-2164.
- [73] SHI T Q, HUANG H, KERKHOVEN E J, et al. Advancing metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* using the CRISPR/Cas system[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(22): 9541-9548.
- [74] SCHWARTZ C, SHABBIR-HUSSAIN M, FROGUE K, et al. Standardized markerless gene integration for pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(3): 402-409.
- [75] FICKERS P, LE DALL M T, GAILLARDIN C, et al. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55(3): 727-737.
- [76] VANDERMIES M, DENIES O, NICAUD J M, et al. EYK₁ encoding erythrulose kinase as a catabolic selectable marker for genome editing in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 139: 161-164.
- [77] LARROUDE M, PARK Y K, SOUDIER P, et al. A modular Golden Gate toolkit for *Yarrowia lipolytica* synthetic biology[J]. Microbial Biotechnology, 2019, 12(6): 1249-1259.
- [78] WONG L, ENGEL J, JIN E, et al. YaliBricks, a versatile genetic toolkit for streamlined and rapid pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*[J]. Metabolic Engineering Communications, 2017, 5: 68-77.
- [79] BULANI S I, MOLELEKI L, ALBERTYN J, et al. Development of a novel rDNA based plasmid for enhanced cell surface display on *Yarrowia lipolytica*[J]. AMB Express, 2012, 2(1): 27.
- [80] GAO S L, TONG Y Y, WEN Z Q, et al. Multiplex gene editing of the *Yarrowia lipolytica* genome using the CRISPR-Cas9 system[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(8): 1085-1093.
- [81] SCHWARTZ C M, HUSSAIN M S, BLENNER M, et al. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(4): 356-359.
- [82] GAO D, SMITH S, SPAGNUOLO M, et al. Dual CRISPR-Cas9 cleavage mediated gene excision and targeted integration in *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology Journal, 2018, 13(9): e1700590.
- [83] ABDEL-MAWGOUD A M, STEPHANOPOULOS G. Improving CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiency in *Yarrowia lipolytica* using direct tRNA-sgRNA fusions[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 106-115.
- [84] BAE S J, PARK B G, KIM B G, et al. Multiplex gene disruption by targeted base editing of *Yarrowia lipolytica* genome using cytidine deaminase combined with the CRISPR/Cas9 system[J]. Biotechnology Journal, 2020, 15(1): e1900238.
- [85] RICHARD G F, KERREST A, LAFONTAINE I, et al. Comparative genomics of hemiascomycete yeasts: genes involved in DNA replication, repair, and recombination[J]. Molecular Biology and Evolution, 2005, 22(4): 1011-1023.
- [86] KRETZSCHMAR A, OTTO C, HOLZ M, et al. Increased homologous integration frequency in *Yarrowia lipolytica* strains defective in non-homologous end-joining[J]. Current Genetics, 2013, 59(1/2): 63-72.
- [87] VERBEKE J, BEOPOULOS A, NICAUD J M. Efficient ho-

- mologous recombination with short length flanking fragments in Ku70 deficient *Yarrowia lipolytica* strains[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(4): 571-576.
- [88] SCHULTZ J C, CAO M F, ZHAO H M. Development of a CRISPR/Cas9 system for high efficiency multiplexed gene deletion in *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(8): 2103-2109.
- [89] SUN W Y, YANG X B, WANG X Y, et al. Developing a flipase-mediated marker recycling protocol for the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(6): 933-940.
- [90] 孙文怡. 基于农杆菌介导的圆红冬孢酵母遗传重组系统的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2017.
- SUN W Y. Agrobacterium-mediated genetic transformation-based genetic recombination system for *Rhodospiridium toruloides*[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2017.
- [91] FILLET S C, GONZÁLEZ B S, BARRENO M C R, et al. Production of microbial oils with an elevated oleic acid content: WO2016185073A1[P]. 2016.
- [92] KOH C M, LIU Y B, MOEHNINSI, et al. Molecular characterization of KU70 and KU80 homologues and exploitation of a KU70-deficient mutant for improving gene deletion frequency in *Rhodospiridium toruloides*[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 50.
- [93] GAO S L, HAN L N, ZHU L, et al. One-step integration of multiple genes into the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(12): 2523-2528.
- [94] CUI Z Y, JIANG X, ZHENG H H, et al. Homology-independent genome integration enables rapid library construction for enzyme expression and pathway optimization in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(2): 354-363.
- [95] SCHWARTZ C, WHEELDON I. CRISPR-Cas9-mediated genome editing and transcriptional control in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1772: 327-345.
- [96] ZHANG J L, PENG Y Z, LIU D, et al. Gene repression via multiplex gRNA strategy in *Y. lipolytica*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 62.
- [97] SCHWARTZ C, CURTIS N, LÖBS A K, et al. Multiplexed CRISPR activation of cryptic sugar metabolism enables *Yarrowia lipolytica* growth on cellobiose[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(9): e1700584.
- [98] YANG Z, EDWARDS H, XU P. CRISPR-Cas12a/Cpf1-assisted precise, efficient and multiplexed genome-editing in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2020, 10: e00112.
- [99] SUN W Y, YANG X B, WANG X Y, et al. Homologous gene targeting of a carotenoids biosynthetic gene in *Rhodospiridium toruloides* by Agrobacterium-mediated transformation[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(7): 1001-1007.
- [100] ZHANG S, HE Y, SEN B, et al. Alleviation of reactive oxygen species enhances PUFA accumulation in *Schizochytrium* sp. through regulating genes involved in lipid metabolism[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2018, 6: 39-48.
- [101] HAN X, ZHAO Z N, WEN Y, et al. Enhancement of docosahexaenoic acid production by overexpression of ATP-citrate lyase and acetyl-CoA carboxylase in *Schizochytrium* sp.[J]. *Biotechnology for Biofuels* 2020, 13(1): 131.
- [102] JI X J, HUANG H. Engineering microbes to produce polyunsaturated fatty acids[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(4): 344-346.
- [103] WANG J, LEDESMA-AMARO R, WEI Y, et al. Metabolic engineering for increased lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*-a review[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 313: 123707.
- [104] LIU H H, JI X J, HUANG H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(8): 1522-1546.
- [105] GU Y, XU P. Synthetic yeast brews neuroactive compounds[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17: 8-9.
- [106] MARKHAM K A, ALPER H S. Synthetic biology expands the industrial potential of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(10): 1085-1095.
- [107] QIU X, XU P, ZHAO X, et al. Combining genetically-encoded biosensors with high throughput strain screening to maximize erythritol production in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 60: 66-76.
- [108] YUZBASHEVA E Y, AGRIMI G, YUZBASHEV T V, et al. The mitochondrial citrate carrier in *Yarrowia lipolytica*: its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 264-274.
- [109] GU Y, MA J, ZHU Y, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a chassis for *de novo* synthesis of five aromatic-derived natural products and chemicals[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(8): 2096-2106.
- [110] GU Y, MA J, ZHU Y, et al. Refactoring Ehrlich pathway for high-yield 2-phenylethanol production in *Yarrowia lipolytica*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(3): 623-633.
- [111] MATTHÄUS F, KETELHOT M, GATTER M, et al. Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(5): 1660-1669.
- [112] KILDEGAARD K R, ADIEGO-PÉREZ B, DOMÉNECH BELDA D, et al. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for produc-

- tion of astaxanthin[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, 2(4): 287-294.
- [113] LIU Y H, JIANG X, CUI Z Y, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for production of α -farnesene[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 1-11.
- [114] CAO X, WEI L J, LIN J Y, et al. Enhancing linalool production by engineering oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biore-source Technology*, 2017, 245(pt b): 1641-1644.
- [115] XUE Z X, HE H X, HOLLERBACH D, et al. Identification and characterization of new Δ -17 fatty acid desaturases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(5): 1973-1985.
- [116] LIU H H, WANG C, LU X Y, et al. Improved production of arachidonic acid by combined pathway engineering and synthetic enzyme fusion in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(35): 9851-9857.
- [117] GAO Q, YANG J L, ZHAO X R, et al. *Yarrowia lipolytica* as a metabolic engineering platform for the production of very-long-chain wax esters[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(39): 10730-10740.
- [118] DOUROU M, AGGELI D, PAPANIKOLAOU S, et al. Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(6): 2509-2523.
- [119] DULERMO T, NICAUD J M. Involvement of the G3P shuttle and β -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(5): 482-491.
- [120] LEDESMA-AMARO R, DULERMO R, NIEHUS X, et al. Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 38-46.
- [121] LEDESMA-AMARO R, NICAUD J M. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids[J]. *Progress in Lipid Research*, 2016, 61: 40-50.
- [122] LAZAR Z, LIU N, STEPHANOPOULOS G. Holistic approaches in lipid production by *Yarrowia lipolytica*[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(11): 1157-1170.
- [123] ATHENSTAEDT K, JOLIVET P, BOULARD C, et al. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source[J]. *Proteomics*, 2006, 6(5): 1450-1459.
- [124] XU P, LI L, ZHANG F, et al. Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(31): 11299-11304.
- [125] YUZBASHEVA E Y, MOSTOVA E B, ANDREEVA N I, et al. A metabolic engineering strategy for producing free fatty acids by the *Yarrowia lipolytica* yeast based on impairment of glycerol metabolism[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(2): 433-443.
- [126] WANG G, LI D, MIAO Z, et al. Comparative transcriptome analysis reveals multiple functions for Mhy1p in lipid biosynthesis in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2018, 1863(1): 81-90.
- [127] NIEHUS X, CRUTZ-LE COQ A M, SANDOVAL G, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to enhance lipid production from lignocellulosic materials[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 11.
- [128] GAJDOŠ P, NICAUD J M, ČERT K M. Glycerol conversion into a single cell oil by engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2017, 17(3): 325-332.
- [129] YUZBASHEVA E Y, MOSTOVA E B, ANDREEVA N I, et al. Co-expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and acyl-CoA binding protein enhances lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *New Biotechnology*, 2017, 39(pt a): 18-21.
- [130] SUN M L, MADZAK C, LIU H-H, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for efficient γ -linolenic acid production[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 117:172-180.
- [131] XU P, QIAO K, STEPHANOPOULOS G. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(7): 1521-1530.
- [132] WANG G, XIONG X, GHOGARE R, et al. Exploring fatty alcohol-producing capability of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 107.
- [133] XU P, QIAO K, AHN W S, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(39): 10848-10853.
- [134] GAO C J, QI Q S, MADZAK C, et al. Exploring medium-chain-length polyhydroxyalkanoates production in the engineered yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(9): 1255-1262.
- [135] QIAO K, IMAM ABIDI S H, LIU H, et al. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 56-65.
- [136] DULERMO T, LAZAR Z, DULERMO R, et al. Analysis of ATP-citrate lyase and malic enzyme mutants of *Yarrowia lipolytica* points out the importance of mannitol metabolism in fatty acid synthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1851(9): 1107-1117.
- [137] LEDESMA-AMARO R, LOZANO-MARTÍNEZ P, JIMÉNEZ A, et al. Engineering *Ashbya gossypii* for efficient biolipid pro-

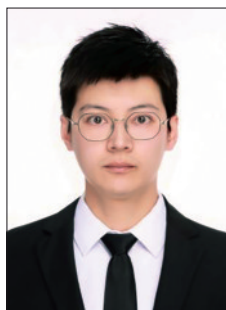
- duction[J]. *Bioengineered*, 2015, 6(2): 119-123.
- [138] GAO Q, CAO X, HUANG Y Y, et al. Overproduction of fatty acid ethyl esters by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* through metabolic engineering and process optimization[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(5): 1371-1380.
- [139] LIU H, MARSAFARI M, WANG F, et al. Engineering acetyl-CoA metabolic shortcut for eco-friendly production of polyketides triacetic acid lactone in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 60-68.
- [140] TAI M, STEPHANOPOULOS G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 1-9.
- [141] BELLOU S, TRIANTAPHYLLOIDOU I E, MIZERAKIS P, et al. High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 234: 116-126.
- [142] WASYLENKO T M, AHN W S, STEPHANOPOULOS G. The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 27-39.
- [143] ZHANG H Y, ZHANG L N, CHEN H Q, et al. Regulatory properties of malic enzyme in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*, and its non-involvement in lipid accumulation[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(12): 2091-2098.
- [144] DULERMO T, TR TON B, BEOPOULOS A, et al. Characterization of the two intracellular lipases of *Y. lipolytica* encoded by *TGL3* and *TGL4* genes: new insights into the role of intracellular lipases and lipid body organisation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1831(9): 1486-1495.
- [145] MAUERSBERGER S, WANG H J, GAILLARDIN C, et al. Insertional mutagenesis in the *n*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes involved in hydrophobic substrate utilization[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(17): 5102-5109.
- [146] JI X J, LEDESMA-AMARO R. Microbial lipid biotechnology to produce polyunsaturated fatty acids[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(8): 832-834
- [147] HONDA D, YOKOCHI T, NAKAHARA T, et al. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene[J]. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1999, 46(6): 637-647.
- [148] YOKOYAMA R, SALLEH B, HONDA D. Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. nov[J]. *Mycoscience*, 2007, 48(6): 329-341.
- [149] YOKOYAMA R, HONDA D. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov[J]. *Mycoscience*, 2007, 48(4): 199-211.
- [150] SUN X M, XU Y S, HUANG H. Thraustochytrid cell factories for producing lipid compounds[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(7): 648-650.
- [151] JI X J, REN L J, HUANG H. Omega-3 biotechnology: a green and sustainable process for omega-3 fatty acids production[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3: 158.
- [152] BARCLAY W, WEAVER C, METZ J, et al. Development of a docosahexaenoic acid production technology using *Schizochytrium*: historical perspective and update[M]. Urbana, Illinois: AOCS Press, 2010: 75-96.
- [153] AASEN I M, ERTESVÅG H, HEGGESET T M B, et al. Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene, and carotenoids[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(10): 4309-4321.
- [154] HAUVERMALE A, KUNER J, ROSENZWEIG B, et al. Fatty acid production in *Schizochytrium* sp.: involvement of a polyunsaturated fatty acid synthase and a type I fatty acid synthase[J]. *Lipids*, 2006, 41(8): 739-747.
- [155] RATLEDGE C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production[J]. *Biochimie*, 2004, 86(11): 807-815.
- [156] MEESAPYODSUK D, QIU X. Biosynthetic mechanism of very long chain polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrium* sp. 26185[J]. *Journal of Lipid Research*, 2016, 57(10): 1854-1864.
- [157] GUO D S, JI X J, REN L J, et al. Development of a scale-up strategy for fermentative production of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. [J]. *Chemical Engineering Science*, 2018, 176: 600-608.
- [158] CHEN C Y, YANG Y T. Combining engineering strategies and fermentation technology to enhance docosahexaenoic acid (DHA) production from an indigenous *Thraustochytrium* sp. BM2 strain[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 179-185.
- [159] HUANG Z R, LIN Y K, FANG J Y. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: Potential uses in cosmetic dermatology[J]. *Molecules*, 2009, 14(1): 540-554.
- [160] NAKAZAWA A, MATSUURA H, KOSE R, et al. Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production[J]. *Bioresource*

- Technology, 2012, 109: 287-291.
- [161] NAKAZAWA A, KOKUBUN Y, MATSUURA H, et al. TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production[J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(1): 29-41.
- [162] REN L J, SUN G N, JI X J, et al. Compositional shift in lipid fractions during lipid accumulation and turnover in *Schizochytrium* sp.[J]. Bioresource Technology, 2014, 157: 107-113.
- [163] BERMAN J, ZORRILLA-LÓPEZ U, FARRÉ G, et al. Nutritionally important carotenoids as consumer products[J]. Phytochemistry Reviews, 2015, 14(5): 727-743.
- [164] ARMENTA R E, BURJA A, RADIANTINGTYAS H, et al. Critical assessment of various techniques for the extraction of carotenoids and co-enzyme Q10 from the Thraustochytrid strain ONC-T18[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(26): 9752-9758.
- [165] CARMONA M L, NAGANUMA T, YAMAOKA Y. Identification by HPLC-MS of carotenoids of the *Thraustochytrium* CHN-1 strain isolated from the seto inland sea[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(4): 884-888.
- [166] AKI T, HACHIDA K, YOSHINAGA M, et al. Thraustochytrid as a potential source of carotenoids[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2003, 80(8): 789-794.
- [167] BENITA Quilodrán, HINZPETER Ivonne, HORMAZABAL Emilio, et al. Docosahexaenoic acid (C22: 6n-3, DHA) and astaxanthin production by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 a native strain with high similitude to *Ulkenia* sp.: evaluation of liquid residues from food industry as nutrient sources[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2010, 47(1/2): 24-30.
- [168] GAO S L, TONG Y Y, ZHU L, et al. Production of β -carotene by expressing a heterologous multifunctional carotene synthase in *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(6): 1-7.
- [169] GAO S L, TONG Y Y, ZHU L, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production[J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 192-201.
- [170] SCHWARTZ C, FROGUE K, MISA J, et al. Host and pathway engineering for enhanced Lycopene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2233.



通讯作者: 黄和(1974—),男,博士,教授。研究方向为微生物资源挖掘和代谢工程,结合发酵工程等手段进行下游产品(生物基化学品、营养化学品、医药中间体等)的开发。

E-mail: huangh@njnu.edu.cn



第一作者: 汪庆卓(1991—),男,博士,博士后。研究方向为微生物代谢工程与合成生物学。

E-mail: qzwwang@njnu.edu.cn