

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-095

非常规酵母底盘细胞的设计构建与功能重塑

刘夏^{1,2}, 黄璐¹, 王钦宏³, 段守富¹

(¹ 微生物多样性与资源创新利用全国重点实验室, 中国科学院微生物研究所, 北京 100101; ² 中国科学院大学, 北京 100049; ³ 低碳合成工程生物学全国重点实验室, 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300300)

摘要: 非常规酵母底物利用范围广、环境耐受能力强, 可弥补常规酿酒酵母在工业生物制造中的不足, 是极具潜力的真核生物底盘细胞。本文首先综述非常规酵母的天然优势与多元化工业应用, 进而系统梳理构建非常规酵母底盘细胞的三大核心技术: 遗传调控元件的开发与表征、CRISPR 基因编辑工具的设计与优化、基于代谢通路重构的细胞工厂设计, 完整覆盖从分子元件挖掘、遗传操作工具开发到代谢网络重编程的技术链条。针对当前非常规酵母研究中宿主特异性强、通用工具匮乏、代谢认知模糊及产业转化迟滞等关键瓶颈, 本文提出“实验室适应性进化-多组学深度解析-人工智能驱动设计”深度融合的研究思路, 旨在加速其智能化创制与工程化改造。最后, 本文展望未来四大重点方向: 新型种质资源的系统挖掘、通用型分子工具箱的开发、数据驱动的智能设计体系构建, 以及从实验室到产业化的转化路径探索, 强调通过多学科交叉融合, 推动非常规酵母底盘细胞从基础研究迈向规模化生物制造应用。

关键词: 非常规酵母; 底盘细胞构建; 代谢工程; 生物制造

中图分类号: Q933 文献标志码: A

Engineering and Functional Reprogramming of Non-Conventional Yeast Chassis Cells

LIU Xia^{1,2}, HUANG Lu¹, WANG Qinrong³, DUAN Shoufu¹

(¹ State Key Laboratory of Microbial Diversity and Innovative Utilization, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³ State Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300300, China)

Abstract: Non-conventional yeasts are promising eukaryotic chassis for sustainable biomanufacturing because they combine the genetic accessibility of yeast with broad substrate utilization, strong stress tolerance, efficient protein secretion and species-specific metabolic capabilities. Compared with *Saccharomyces cerevisiae*, they can use methanol, organic acids, pentoses, glycerol and other low-cost or non-food feedstocks, while supporting production of microbial

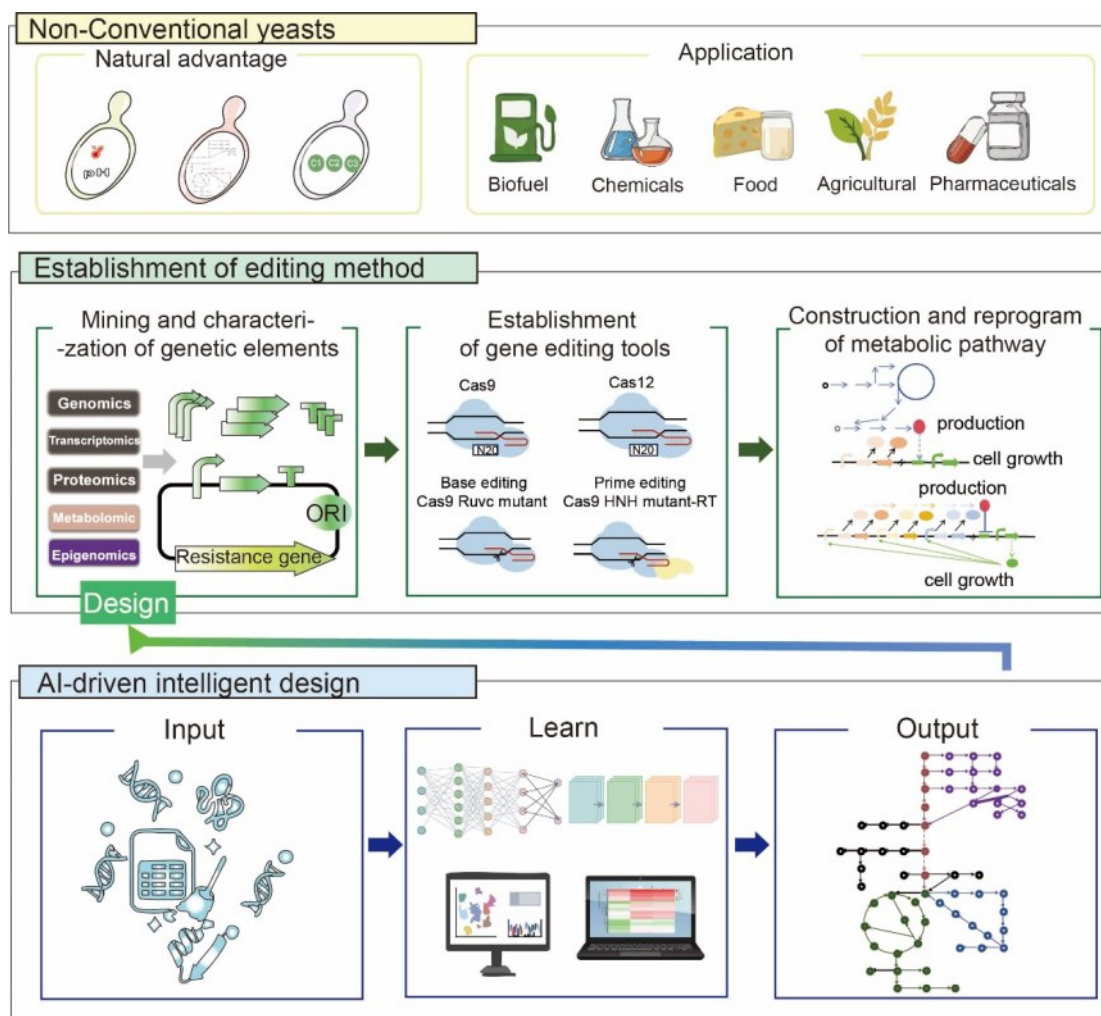
收稿日期: 2026-09-01 修回日期: 2026-10-24

基金项目: 中国科学院三年行动方案项目 (E4SJ1809)。

引用本文: 刘夏, 黄璐, 王钦宏, 段守富. 非常规酵母底盘细胞的设计构建与功能重塑[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-095

Citation: LIU Xia, HUANG Lu, WANG Qinrong, DUAN Shoufu. Engineering and Functional Reprogramming of Non-Conventional Yeast Chassis Cells [J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-095

oils, recombinant proteins, organic acids, biosurfactants, single-cell protein and other value-added products. This review summarizes the natural chassis advantages and industrial applications of non-conventional yeasts and considers current progress through three interconnected engineering pillars: discovery and characterization of genetic regulatory elements, development of host-adapted CRISPR genome-editing systems, and reconstruction of metabolic pathways and cell factories. Promoters, terminators, untranslated regulatory regions, autonomous replication sequences and centromeres provide the basis for tunable expression and stable vector maintenance, whereas species-specific control of guide-RNA expression, Cas protein activity and DNA repair must be considered when designing precise, multiplex genome-editing platforms. Metabolic engineering is expanding from individual pathway installation to coordinated regulation of precursor supply, cofactor and energy balance, organelle compartmentalization, product transport and cellular stress. Linking host physiology with carbon-flow redistribution, redox control and product toxicity is particularly important because these interactions determine whether laboratory improvements can withstand industrial fermentation. Integrated genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, epigenomics and single-cell measurements can connect genotype, regulation, metabolic flux and phenotype, while genome-scale metabolic models can guide the selection of essential genes, competing branches and rate-limiting nodes. Adaptive laboratory evolution complements rational design by enriching phenotypes that are difficult to specify in advance; combined with resequencing and multi-omics analysis, it can reveal the genetic basis of stress tolerance and metabolic adaptation. Artificial intelligence may support regulatory-element design, protein engineering, target prioritization and automated design-build-test-learn cycles, although its performance remains limited by uneven datasets and strong host specificity.



The field must therefore address shortages of portable genetic toolkits, incomplete metabolic knowledge, limited industrial robustness and scale-up barriers. These constraints are especially important across phylogenetically diverse hosts and industrial process conditions. Future progress will depend on systematic exploration of yeast biodiversity, standardized molecular toolboxes, validated computational workflows and closer integration of strain engineering with fermentation and downstream processing. Together, these advances show how interdisciplinary integration can move non-conventional yeast beyond host-specific trial and error toward predictive, modular chassis engineering, accelerating its transition from fundamental research to large-scale biomanufacturing.

Keywords: non-conventional yeasts; chassis cell construction; metabolic engineering; biomanufacturing

1 引言

随着能源危机、粮食短缺、环境污染及气候变化等全球性难题日益严峻，构建绿色高效、可持续的新型生物制造体系，成为工业生物技术领域亟待突破的关键方向^[1, 2]。相较于传统化学合成工艺，微生物生物合成技术具备反应条件温和、三废排放少、生态环境负荷低、原料来源广泛且可再生等优势，是实现高附加值精细化学品、生物燃料、功能食品及生物医药原料绿色生产的核心技术路径^[3, 4]。酵母作为典型的工业微生物，兼具真核生物完善的蛋白质翻译后修饰系统、较强的环境适应能力，以及利用多种廉价废弃生物质原料的潜力，在全球生物制造产业中发挥着不可替代的作用^[5, 6]。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 凭借完善的基因组注释信息、清晰的遗传调控背景以及成熟的分子操作体系，成为合成生物学与代谢工程研究中应用最广泛的真核微生物底盘细胞^[7, 8]。但经过数十年的代谢工程改造与工业化应用，其自身生理特性的固有问题日益凸显：对木糖、甲醇等非常规碳源利用效率低下，对高浓度目标产物、有毒代谢中间产物耐受能力较差，同时在部分高附加值天然产物的定向合成过程中，产物得率、生产强度与最终产能难以满足工业化生产要求，极大制约了生物制造核心理念“降本增效”^[9, 10]。长期聚焦于单一酵母底盘细胞，埋没了大量具备特殊生理代谢功能的微生物多样性资源，进一步压缩了生物制造技术原始创新与工艺多元化开发的空间，制约了生物制造产业的差异化

发展。

相较于传统酿酒酵母，非常规酵母除拥有更为广泛的底物利用谱外，还可高效利用甲醇、甲酸、乙酸、甘油、游离脂肪酸、木质纤维素水解液中的戊糖（木糖、阿拉伯糖）以及各类工业废弃副产物，其在胞内脂质代谢、异源蛋白表达分泌、高温和极端pH耐受及特异性复杂天然产物合成等方面具备独一无二的代谢优势，是下一代高性能工业微生物底盘细胞的理想候选菌株^[11, 12]。但目前非常规酵母的工业化应用潜力仍未被充分挖掘，核心制约因素在于遗传操作体系尚不完善，转化效率偏低、基因编辑技术有限、内源调控元件匮乏等共性问题，制约了非常规酵母从系统工程改造到产业化应用的全链条推进进程^[13]。

近年来，合成生物学、数字化量化与表征、多组学测序与系统生物学技术的快速迭代与系统赋能，极大推动了非常规酵母遗传操作工具库的拓展与升级，在调控元件挖掘、代谢通路重构、菌株鲁棒性提升等方面均取得了突破性进展，为非常规酵母走向产业化应用奠定了坚实的理论与技术基础。基于此，本文系统综述了非常规酵母底盘细胞的天然代谢优势，梳理遗传操作元件开发、基因编辑工具优化、代谢通路重构等底盘细胞构建核心技术，围绕酵母底盘细胞的设计-构建-测试-学习 (DBTL) 工程循环，系统总结了多组学数据驱动的代谢网络解析、适应性进化及人工智能指导的工具开发与靶点预测等前沿技术在酵母底盘细胞理性设计中的应用场景，分析现有技术瓶颈并预判未来发展趋势，以“数据-模型-实验”深度耦合的发展范式，为非常规酵母底盘细胞的

精准设计与产业化落地提供全面的理论参考。

2 非常规酵母作为工业底盘细胞的天然优势与应用场景

相较于遗传背景清晰但生理功能存在固有局限的常规酿酒酵母，非常规酵母因其天然具有的胁迫耐受性与代谢特异性，在复杂工业发酵环境中具备独特竞争优势，基于 Web of science 与 Pubmed 数据库统计酵母底盘细胞在工业及农业方面的文章数量，结果显示酿酒酵母仍占主要份额，非常规酵母正发展成为微生物底盘细胞的重要来源（图1）。基于工业生物制造原料经济性、过程低碳化及菌株鲁棒性的实际需求，非常规酵母具备三大不可替代的天然底盘细胞优势：底物利用谱广谱多元、极端环境胁迫耐受能力突出、菌株特异性代谢通路丰富，可全方位弥补常规酿酒酵母在实际工业化发酵中的应用短板^[14, 15]。依托上述天然的生理与代谢优势，通过简单的代谢工程改造，各类非常规酵母已在一碳生物炼制、低碳食品原料合成、大宗化学品与高附加值化学品生产、重组蛋白表达等多个生物制造场景实现工业

化生产，产业化价值持续提升。

不同非常规酵母菌株依托自身天然优势形成细分领域专用底盘细胞，且均已开展针对性工程化改造与产业化应用探索，基于不同的工业应用功能维度（产物积累、原料转化、工业转化）可分为油脂合成型酵母、甲基营养型酵母及极端耐受型酵母三大类（图2）。不同酵母在功能应用中并非单一维度，同一菌株可能同时具备多种代谢优势与生理特征。

2.1 油脂合成型酵母

第一类为油脂合成型非常规酵母，因其天然具备极高的脂质积累能力，能将碳源高效转化为胞内脂质（图2A）。油脂合成型酵母可在适宜碳源与氮源限制条件下将较多碳流导向脂质，而酿酒酵母在高糖条件下更易发生乙醇溢流。酿酒酵母是典型的 Crabtree 阳性酵母，在高浓度葡萄糖存在的情况下，即使在有氧环境中，也优先进行发酵产乙醇而非有氧呼吸。碳代谢通路在丙酮酸分流的关键节点受丙酮酸脱羧酶（PDC）和醇脱氢酶（ADH）的影响，生成乙醇而非脂质。油脂合成型酵母（如 *Yarrowia lipolytica*、*Rhodospiridium*

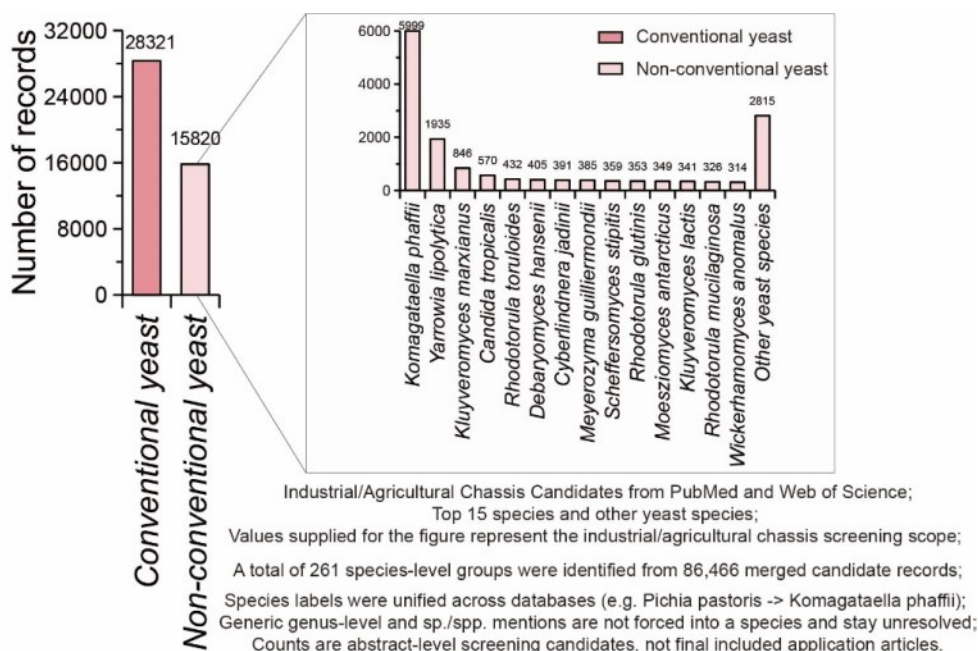


图1 常规酵母与非常规酵母底盘细胞的研究统计。

Fig. 1 Research statistics on conventional and non-conventional yeast chassis cells.

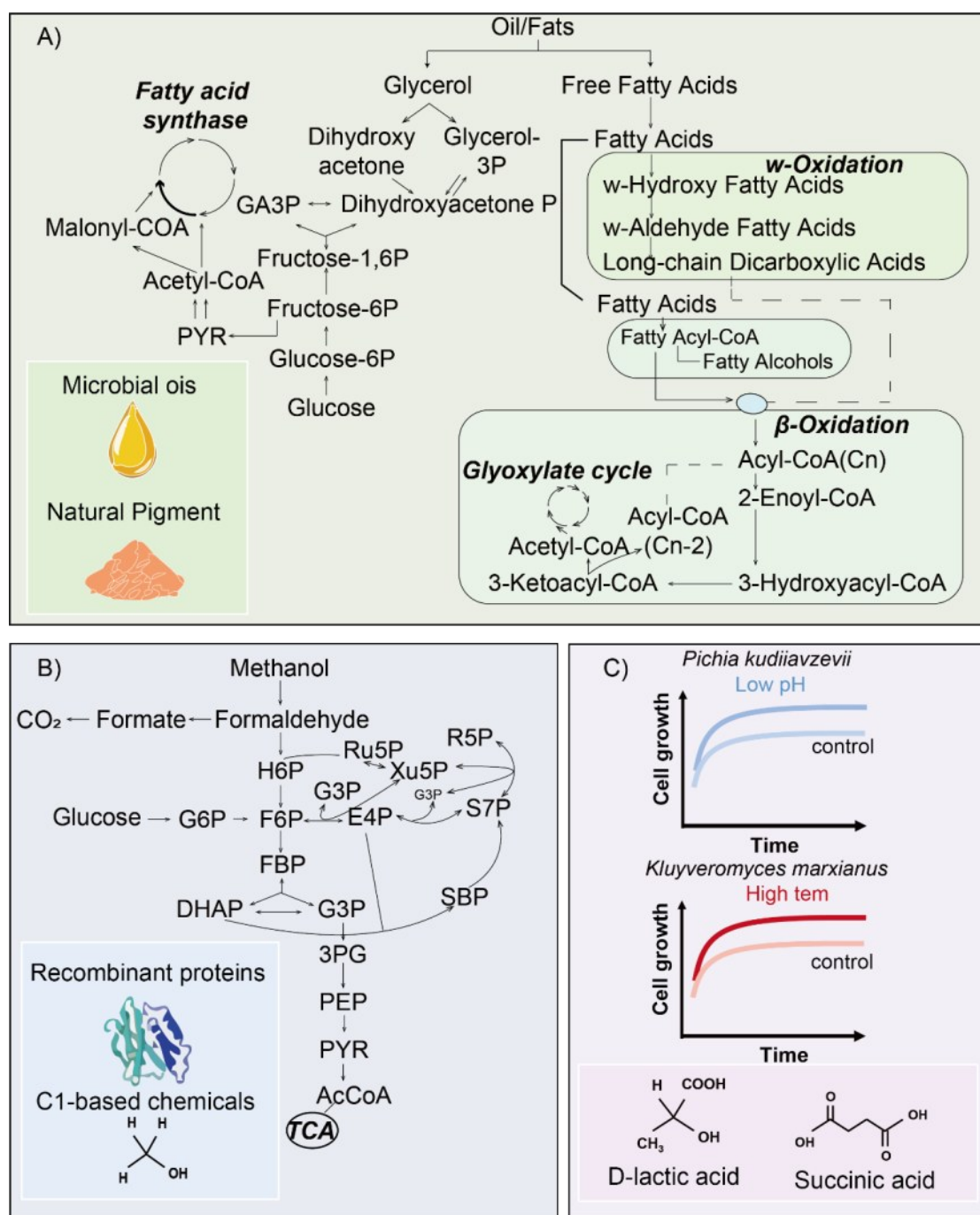


图2 油脂合成型酵母、甲基营养型酵母及极端耐受型酵母的优势及应用。

Fig. 2 Advantages and applications of oleaginous, methylotrophic, and extremotolerant yeasts.

toruloides) 等作为 Crabtree 阴性酵母, 更偏向于有氧呼吸, 碳代谢流可通过三羧酸循环 (TCA) 和脂肪酸合成途径在氮源限制的条件下将碳源高效导入脂质合成^[16-19]。

除碳流分配外, 乙酰辅酶 A 供应机制也是影响脂质合成的关键因素之一。作为脂肪酸合成的直接前体胞质乙酰辅酶 A, 酿酒酵母的获取方式为

丙酮酸脱羧生成乙醛, 再经乙酸途径转化生成, 与乙醇发酵密切耦合。然而油脂合成型酵母获取乙酰辅酶 A 的核心路径是 ATP-柠檬酸裂解酶 (ACL) 依赖途径, 线粒体柠檬酸转运至胞质后, 由高活性的 ACL 裂解生成乙酰辅酶 A, 效率更高^[20-24]。

上述关键因素的差异最终体现在脂质积累能力。野生型酿酒酵母的脂质含量较低, 但油脂合

成型酵母例如 *Yarrowia lipolytica* 野生型也能积累约 30-50%^[25, 26]。总的来说,酿酒酵母的代谢优势是发酵产醇,油脂合成型酵母的优势是储备脂质。依托解脂耶氏酵母成熟的遗传操作体系,研究人员通过重构淀粉生物合成途径与糖异生代谢通路,实现以二氧化碳电解产物乙酸盐为底物合成淀粉微晶粒,工程菌株淀粉含量可达 47.18%DCW,人工设计了以 CO₂ 为底物间接转化合成食品原料的低碳生物制造新路径,拓展了油脂酵母的全新应用

场景^[27]。红酵母在胞内油脂积累过程中,往往同步合成类胡萝卜素等天然色素,这一特征使其并非单一的产油细胞,而是兼具油脂与色素多元合成能力的多功能底盘细胞,在功能性油脂和天然产物生物制造领域展现出广阔的应用前景^[28]。厚皮毛孢子菌作为另一种极具潜力的产油酵母,兼具生长迅速与底物谱广泛的双重优势,可有效利用工业副产物进行规模化发酵,是微生物油脂生产的理想工业底盘细胞^[29, 30]。

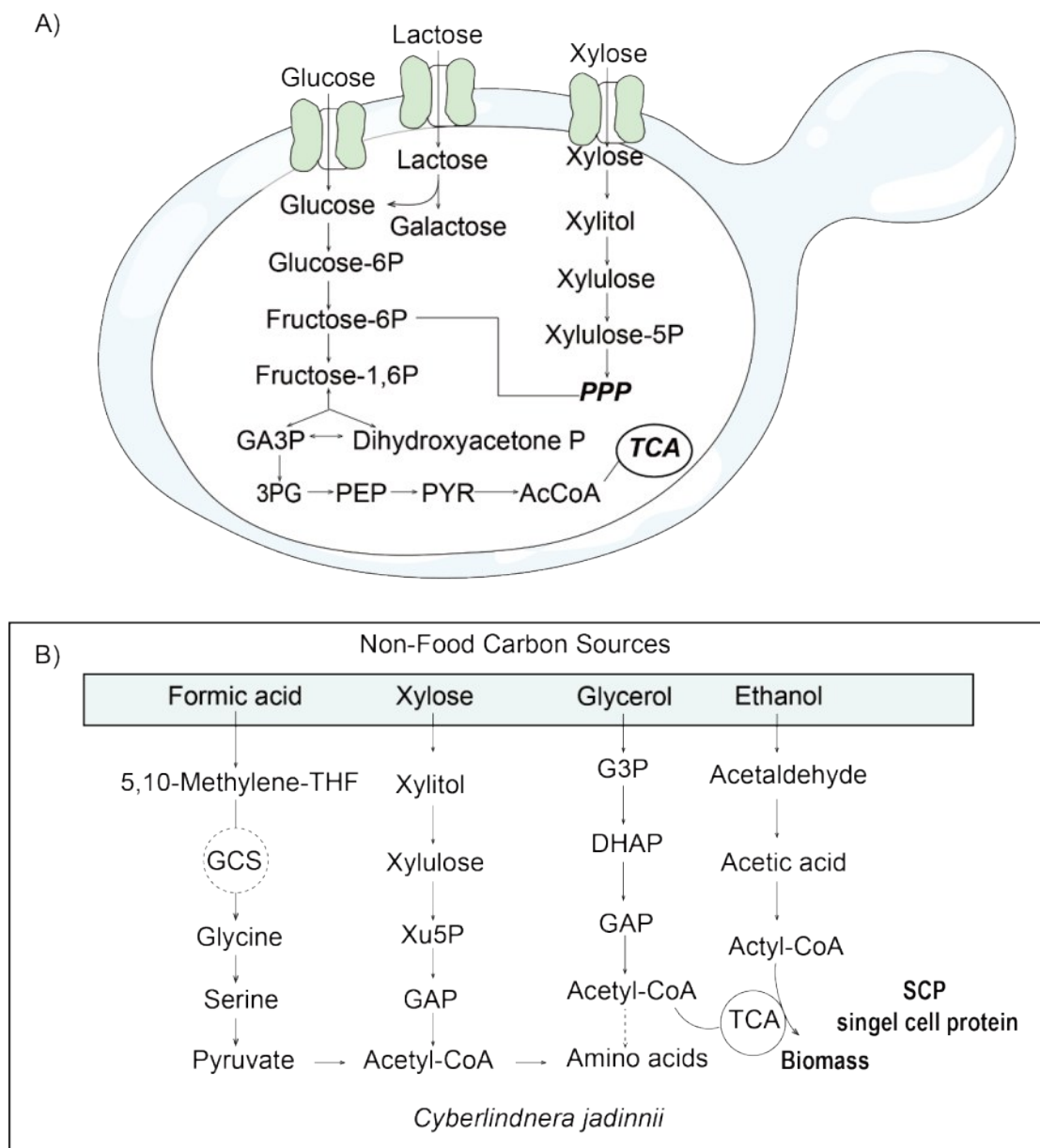


图3 非常规酵母在利用廉价可再生原料及非粮底物方面的优势及应用。

Fig.3 Advantages and application of non-conventional yeasts in utilizing low-cost renewable feedstocks and non-food one-carbon substrates.

2.2 甲基营养型酵母

第二类为甲基营养型酵母，立足非常规酵母天然的甲醇同化路径，可为一碳生物炼制构建从碳源高效转化到目标产物合成的技术链条（图2B）。甲基营养型酵母能以甲醇作为唯一碳源进行生长代谢，其第一步是将甲醇由高活性的醇氧化酶（AOX）氧化生成甲醛，但酿酒酵母不能天然利用甲醇，虽然其基因组中可能含有编码具有微弱甲醇氧化能力的酶，但不足以支持生长。研究者通过工程模块回路（EMC）策略构建了合成甲基型酿酒酵母，并通过ALE进一步提高了其甲醇利用能力^[31]，但仍存在一定局限。甲醇代谢的另一关键瓶颈在于甲醛积累对细胞生长具有毒性，过氧化物酶体是甲醇解毒的核心枢纽，通过细胞器区室化工程，将甲醛引导至两条路径：同化和异化。同化途径是指二羟丙酮合成酶将甲醛与木酮糖单磷酸（XuMP）循环结合转化为细胞可用的物质（二羟丙酮，DHA和3-磷酸甘油醛，GAP）。异化途径是当甲醛积累过量时，它与谷胱甘肽（GSH）自发结合，形成S-羟甲基谷胱甘肽。随后，被胞质中的甲醛脱氢酶（FLD）等酶系氧化生成CO₂，从而降低甲醛积累所造成的生长抑制。甲基营养型酵母的核心优势在于甲醇同化途径全部定位在核心细胞器过氧化物酶体中，当菌株以甲醇为碳源进行生长时，过氧化物酶体快速增殖，多个关键酶通过过氧化物酶体靶向信号精准定位发挥解毒功能，而酿酒酵母的过氧化物酶体不具备这套核心途径，且相关酶系分布在细胞质或缺失^[32-34]。

甲基营养型酵母的典型代表包括巴斯德毕赤酵母（*Komagataella phaffii*）与多形汉逊酵母（*Ogataea polymorpha*）。巴斯德毕赤酵母凭借其外源蛋白表达与分泌能力，是目前真核生物中商业化应用较为广泛的重组蛋白表达底盘细胞之一，该菌株可以甲醇作为唯一碳源实现目标蛋白或化合物的生物合成^[35]。研究者通过全局代谢网络重编程强化甲醇同化代谢通量、降低甲醛积累，有效提升了胞内还原力水平，使脂肪酸产量高达23.4 g/L，通过巧妙的代谢通路快速切换，将脂肪酸生产菌株改造为脂肪醇合成菌株，为甲醇低碳生物制造提供了经济可持续的方案^[36]。多形汉逊

酵母同样具备天然的甲醇同化能力，针对甲醇同化过程中NADH/NADPH代谢通量失衡的瓶颈问题，研究者通过改造关键酶辅因子偏好性，将乳酸脱氢酶由NADH依赖型改造为NADPH依赖型，缓解了胞内氧化还原水平的失衡，成功打通了从甲醇到L-乳酸的高效合成路径，为可降解塑料单体的绿色生物制造提供了优质底盘细胞^[37]。

2.3 环境耐受型酵母

第三类为环境耐受型酵母，在菌株耐受方面，多数非常规酵母天然具有耐高温、酸碱、高渗透压及有机溶剂等极端环境的能力，可适配大多数工业发酵工艺，减少温控、酸碱调控等配套设备的过程能耗与工艺成本^[38]，与酿酒酵母相比，因其天然具备对多种工业胁迫的先天耐受性，无需或仅需少量遗传改造即可在恶劣条件下正常生长和发酵而广泛应用于特定化合物的生物合成。其中，库德里阿兹威毕赤酵母（*Pichia kudriavzevii*）耐酸性极强，可在低pH环境下维持稳定代谢活性，无需频繁调控发酵体系pH，现已应用于衣康酸等有机酸工业化生产^[39]；马克斯克鲁维酵母（*Kluyveromyces marxianus*）耐热性能优异，可在近50°C高温条件下生长，能够降低工业发酵冷却能耗，适配高温绿色发酵工艺^[40, 41]（图2C）。

除上述专属领域底盘细胞，马克斯克鲁维酵母、乳酸克鲁维酵母与树干毕赤酵母（*Scheffersomyces stipitis*）^[42-45]等非常规酵母在高效利用木糖、乳糖等廉价可再生原料方面也具有极强的优势，能够有效降低发酵原料成本，缓解生物制造对粮食原料的依赖，助力化工副产物资源化利用与双碳目标的实施（图3A）。芽生丝孢酵母（*Starmerella bombicola*）可天然高产槐糖脂生物表面活性剂，无需复杂通路改造即可实现绿色生物表面活性剂高效合成^[46]。产朊假丝酵母可利用于非粮原料（如甲酸、木糖、甘油及乙醇）进行SCP生产，其中以乙醇为底物在5 L发酵罐中蛋白含量可高达68.60%（图3B）^[47]。

综上，非常规酵母凭借其天然优势，已覆盖多种应用场景，相比常规酿酒酵母更贴合工业实际发酵需求。但天然野生型非常规酵母仍存在内

源代谢调控网络解析不完整、遗传操作工具箱不完善、目标产物合成通量不足等固有缺陷,难以直接满足工业化生产高产、高效、高鲁棒性的严苛标准。因此,需要依托合成生物学与代谢工程技术,开展遗传表达元件优化、精准基因编辑技术开发、全局代谢通路重构等改造工作,进一步开发非常规酵母底盘细胞的应用潜力。

3 非常规酵母底盘细胞的设计构建与优化策略

非常规酵母天然具备优异的工业发酵适配性,但野生型菌株存在遗传背景不明、游离质粒稳定性差、外源基因表达调控体系不完善等问题,直接影响了工程化改造的效率。为此,核心遗传表达元件的挖掘、高效基因编辑工具的开发是提升代谢工程改造效率、实现模块化组装与动态调控的核心基础^[13, 48]。

3.1 遗传调控元件的系统挖掘与工程化改造

(1) 启动子

启动子是调控基因转录起始、决定基因表达强度与时序的核心顺式作用元件,精准匹配不同表达强度需求的启动子文库,是实现底盘细胞代谢通路精细调控的核心前提。现阶段非常规酵母启动子开发主要依托三大技术方向:内源天然型启动子的筛选表征、人工杂合型启动子的理性设计、信号响应型启动子的智能构建。

在内源启动子筛选与应用方面,研究者基于解脂耶氏酵母内源碳氮代谢通路相关基因进行系统筛选,共表征81个内源启动子,成功挖掘到与甘露醇脱氢酶相关的启动子 P_{MnDH2} ,将其应用在调控红景天苷关键酶合成基因的表达水平,可实现红景天苷的高效合成^[49]。天然启动子表达强度较为单一,作为调控元件其响应特性(严谨性、灵敏度和响应阈值)不足,人工杂合启动子具有更强的表达强度和更丰富的调控模式,通过碱基突变、转录因子结合位点(Transcription Factor Binding Site, TFBS)的理性设计、人工智能辅助设计改造酵母天然启动子或合成新的杂合启动子

可高效调控特定的基因表达水平,调控代谢效率,是合成生物学中必不可少的基因元件。

基于最小组成型启动子,通过组合不同拷贝数上游激活序列(Upstream Activating Sequence, UAS)与保守核心启动子区域,可梯度调控目标基因的转录水平,该策略已成功应用于蜡酯、异戊醇等产物的高效生物合成^[28, 50-51]。研究者通过融合表达外源DNA结合结构域与转录激活结构域在巴斯德毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)中设计与表征了杂合启动子文库,表达强度范围为16%~520%^[52]。组合密码子偏好性优化Kozak序列^[53]、替换启动子 P_{ADH2} 上游激活调控区^[54]等手段,进一步提升了重组蛋白与复杂次级代谢产物的合成效率。为解决巴斯德毕赤酵母甲醇诱导发酵过程中的易燃易爆问题,科研人员基于组成型 P_{GAP} 启动子构建随机突变杂合启动子文库,无需甲醇诱导即可实现高强度基因表达,高效合成单萜类化合物蒎烯,实现无需添加甲醇的安全发酵工艺^[55]。但组成型杂合强启动子表达多个基因时,会引入代谢负担,出现生长速度变慢、影响发酵效率的现象,信号响应型启动子可根据环境信号自动调节基因的表达水平,利于在不增加细胞代谢负担的情况下调节多个关键基因的表达,构建一个反馈调节系统,实现底盘细胞工厂的动态调控。因此,信号响应型启动子的挖掘与设计在细胞工厂的设计与构建中具有很高的应用前景。信号响应型启动子除化学物质、温度、pH等环境响应型启动子外,还包括依托小分子化合物(如木糖、葡萄糖、脂肪酸等)构建的代谢物响应型启动子。环境响应型启动子可通过智能响应环境变化实时监测单个细胞内的不同参数,监控工业生产过程中底盘细胞的生理反应。例如,研究人员在树干毕赤酵母(*Scheffersomyces stipitis*)中利用响应氧限制的 $PsADH2$ 启动子用于异源表达木聚糖酶^[56]。代谢物响应型启动子可通过动态调控解耦细胞生长与生产或偶联生长与生产,减轻异源合成途径引入产生的代谢负担,以及代谢物积累带来的胁迫压力和细胞毒性,是合成生物学通过基因线路设计对生长代谢及途径模块动态调控的有效手段和核心元件。研究者通过理性设计,将细菌转录调控因子FadR结合位点整合至核心启动子序列

中, 构建脂肪酸动态响应型杂合启动子, 通过智能响应胞内脂酰辅酶A浓度自主调控转录强度, 平衡菌体生长与产物合成之间的代谢通量, 提高了 ω -羟基棕榈酸的产量^[15]。除此之外, 研究者通过挖掘与表征马克斯克鲁维酵母的天然内源启动子^[57], 构建标准化启动子工具箱^[58], 设计碳源响应型杂合启动子 P_{pIN450} ^[59]扩展了非常规酵母的基础元件库, 为非常规酵母的启动子挖掘提供了思路与方向。

(2) 终止子

终止子是基因转录末端的关键调控元件, 其功能不仅限于终止mRNA的转录过程, 还可通过影响mRNA的胞内稳定性与转录本丰度, 进而调控相应编码蛋白的表达水平, 是构成完整基因表达单元不可或缺的核心组分^[60-61]。不同终止子可改变mRNA丰度及蛋白表达, 其效应不等同于转录终止效率对mRNA半衰期的直接决定。研究者通过实验证据表明巴斯德毕赤酵母的蛋白表达水平由mRNA丰度决定, 且利用计算机模拟得到蛋白表达水平反映mRNA 3'-UTR二级结构稳定性的预测结果^[60]。与启动子研究取得的系统性进展相比, 非常规酵母终止子的发掘与表征尚处于起步阶段, 规模化功能筛选与元件性能评估工作严重滞后^[62]。当前工程实践中可用的终止子仍高度依赖于菌株内源序列及酿酒酵母的异源通用元件, 种类单一且功能可调性有限。

在巴斯德毕赤酵母中, 除工业发酵最常用的内源终止子 T_{AOX1} 外, 酿酒酵母来源的 T_{CYC1} 也具备良好的转录终止适配性。后续研究在此基础上, 补充筛选 T_{TDH3} 、 T_{RPS2} 、 T_{RPPIB} 等8个性能稳定的内源终止子, 进一步丰富了该菌株的终止子元件库^[63]。解脂耶氏酵母除通用异源终止子 T_{ScCYC1} 外, 其多种内源终止子如 T_{XPR2} 与 T_{LIP2} 也具备良好的适配性^[62], 该菌株的多个天然终止子具备梯度表达调控潜力, 可为后续关键基因的精细表达提供调控元件^[64-65]。乳酸克鲁维酵母的常用终止子为内源终止子 T_{LAC4} 及酿酒酵母来源的 T_{GPD1} 、 T_{ADH1} 、 T_{ADH2} ^[66]。多形汉逊酵母的主流终止子为 T_{MOX} 、 T_{AMO} 及异源 T_{ScADH1} ^[67]。

(3) 复制子

除启动子、终止子等转录调控元件外, 游离表达质粒的复制稳定性与细胞分裂过程中的精准

分配能力, 同样限制了非常规酵母外源基因的长效稳定表达。酿酒酵母来源质粒在部分非常规酵母中难以稳定, 主要受复制与分离元件的宿主兼容性限制。ARS是真核生物基因组自主复制的核心功能序列, 可招募复制复合体, 保障质粒在细胞分裂周期内完成自主DNA复制。在酿酒酵母中, 大小约200bp且含有11 bp的保守的复制起始核心基序5'-(A/T)AAA(C/T)ATAAA(A/T)-3'。然而非常规酵母的ARS序列往往更长, 且不存在跨物种的保守核心基序。CEN序列为细胞分裂过程纺锤体特异性结合位点, 能够在有丝分裂与减数分裂过程中牵引质粒与染色体均等分配至子代细胞, 避免质粒丢失。非常规酵母的CEN序列结构具有宿主差异, 不能由近缘物种中的位置保守性推断其跨宿主功能兼容性, 具体功能仍须在目标宿主进行实验验证。ARS负责载体自主复制, CEN负责载体稳定分离, 二者协同作用, 可构建低拷贝、高稳定性酵母游离载体, 有效解决高拷贝质粒代谢负担大、无CEN/ARS载体传代丢失率高的工程痛点^[68-70]。

目前非常规酵母ARS与CEN序列的主流鉴定方法分为基因组文库筛选法、高通量测序结合蛋白富集分析法两大类。基因组文库筛选为经典通用手段: 将酵母全基因组片段化后连接至无复制能力的空载质粒, 转化宿主菌株后通过抗性筛选存活转化子, 反向定位具备自主复制功能的ARS片段, 该方法操作简便、适用于绝大多数未注释基因组的非常规酵母^[11]。而CEN序列多采用CUT&RUN染色质蛋白富集测序技术, 靶向富集着丝粒结合蛋白对应的DNA片段, 精准定位基因组中高AT含量、长反向重复结构的着丝粒区域, 分辨率远高于传统文库筛选法^[71]。在元件工程改造与应用层面, 已有大量成熟研究支撑载体优化。研究者在巴斯德毕赤酵母中通过基因组测序注释, 定位4条染色体全长CEN序列, 截短得到111 bp最小功能核心CEN片段, 搭配同源ARS序列构建新型游离质粒, 质粒连续传代50代后丢失率低于3%, 稳定性远优于传统游离载体^[72-73]。针对解脂耶氏酵母, 研究证实必须同时导入同源ARS与CEN序列才能构建稳定复制质粒, 单独导入ARS仅能实现短暂复制, 无法完成细胞分裂均等分配,

通过优化ARS核心保守序列和CEN序列后,载体复制效率显著提升^[74-75]。此外,红酵母通过CUT&RUN技术首次精准鉴定全长着丝粒序列,基于该天然CEN序列搭建稳定穿梭载体,有效推动该油脂酵母多基因通路稳定整合表达^[71]。综上,ARS与CEN功能元件的挖掘与人工截短优化,是完善非常规酵母载体工具箱、实现外源代谢通路无压力长效表达的关键补充,也是后续底盘细胞标准化构建不可或缺的核心环节。

目前,非常规酵母底盘细胞的合成生物学改造仍受限于核心遗传元件的储备不足与功能缺陷,具体表现为:启动子元件库及天然转录终止子数量有限,缺乏梯度化的表达强度,异源元件在不同菌株中的适配性差异显著,标准化、功能可预测的人工元件体系尚未建立。同时,适用于多种非常规酵母的自主复制序列(ARS)与着丝粒序列(CEN)挖掘不足,导致游离型载体的复制稳定性及外源基因长效表达难以保障。针对上述瓶颈,后续研究应着力于以下方向:一是面向多类非常规酵母系统开展标准化元件的规模化发掘,系统评估基因元件的跨菌株适配性,通过理性设计与定向改造构建表达强度梯度可控的基因元件库。二是持续挖掘并优化同源及异源ARS、CEN核心功能元件,建立兼具自主复制能力与稳定遗传分配性能的标准化载体表达体系。通过上述策略的系统推进,旨在全方位补齐非常规酵母在精细表达调控与稳定载体构建方面的遗传元件短板,为高效底盘细胞的开发奠定元件基础。

3.2 高效基因编辑工具的开发与适配

非常规酵母具备得天独厚的工业发酵生理优势,但相较于遗传操作体系高度成熟、编辑范式标准化的常规酿酒酵母,其底盘细胞精准改造进程依旧滞后,核心瓶颈在于缺乏宿主适配性、高效率的基因组编辑工具与配套分子操作体系,极大地制约了复杂代谢通路的理性重构与菌株性能迭代升级^[48]。精准高效的基因组编辑技术是重塑胞内代谢网络、打通目标产物合成通路、实现目标化合物高效生产的核心技术支撑^[13]。真核微生物基因组编辑依赖DNA双链断裂(DSB)触发内源修复通路完成基因修饰,主要包括非同源末端

连接(NHEJ)与同源重组(HR)两种核心修复途径^[76]。酿酒酵母内源HR修复通路活性极强,仅需短片段同源臂即可实现高效、精准的定点基因整合,而绝大多数非常规酵母内源修复通路存在明显偏好性,细胞受损DNA主要依托NHEJ通路完成易错修复,同源重组修复效率极低,叠加适配载体匮乏、特异性表达元件缺失等短板,从而降低了精准定点编辑的效率,制约了非常规酵母底盘细胞的设计与改造^[13, 77, 78]。

CRISPR-Cas基因编辑系统凭借操作简便、编辑效率高、可编程性强等优势,有力推动了非常规酵母基因编辑平台(表1)的搭建与迭代,但不同酵母菌株的遗传背景差异极大,CRISPR编辑体系通常需要重新验证与适配,须结合宿主自身转录调控系统(驱动gRNA转录和Cas蛋白表达的功能元件存在物种特异性)及DNA修复特征(调控HR/NHEJ通路关键蛋白的表达水平与活性不同,不等同于HR核心蛋白在各物种中普遍缺失)进行模块化定向设计^[76-78]。针对树干毕赤酵母、巴斯德毕赤酵母、马克斯克鲁维酵母、解脂耶氏酵母等代表性非常规酵母,通过敲除或抑制KU70、KU80、NEJ1、DNL4等NHEJ通路关键功能基因,抑制非同源末端修复途径,联合CRISPR-Cas靶向产生的DNA双链断裂,显著增强了同源重组介导的精准编辑效率^[79-82]。对于多形汉逊酵母、嗜热甲醇酵母等甲基营养型酵母,编辑瓶颈集中于sgRNA转录表达不足与载体系统兼容性差,通过构建tRNA-gRNA融合表达模块、开发基因组整合型sgRNA平台及优化游离型载体,有效提升编辑系统的稳定性与表达效率^[83-86]。此外,针对乳酸克鲁维酵母与解脂耶氏酵母,通过Cas9密码子优化、筛选适配性RNA聚合酶III型启动子,已实现多基因敲除、定点整合及基因组安全位点批量筛选的标准化编辑流程^[87-88]。

与酿酒酵母相比,非常规酵母的编辑方法仍存在编辑效率较低,跨物种特异性难的问题,当前的研究主要围绕修复通路、表达元件、Cas蛋白变体、生物信息学辅助设计四大方向开展系列优化。在修复通路重塑层面,通过敲除KU70/KU80等NHEJ核心基因或过表达Rad51/Rad52等HR关键因子,双向调控以提升精准整合效率^[79, 99]。在转录元件适配层面,引入人工杂合启动子或T7噬

表1 非常规酵母的遗传编辑方法

Table1 Genetic editing methods for non-conventional yeasts

物种	CRISPR 系统	表达盒或质粒信息	参考文献
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CRISPR/Cas	P _{TEFin} -HH-gRNA-HDV P _{TEF} -Cas9	[89]
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CRISPR/Cas9	P _{SNR52} -sgRNA P _{GAPDH} -Cas9-T _{NOS}	[90]
<i>Cutaneotrichosporon oleaginosus</i>	CRISPR/Cas9	-	[91]
<i>Komagataella phaffii</i>	CRISPR/Cas9	P _{GAP} -Cas9 P _{GAP} -HH-sgRNA-HDV	[92]
<i>Ogataea polymorpha</i>	CRISPR-Cas12a/Cpf1	P _{OpGAP} -Cas9 tRNA ^{AGA}	[93]
	CRISPR/Cas9	P _{OpTDH3} -Cas9 P _{OpSNR6} -Trna ^{CUG} -sgRNA	[83]
<i>Pichia kudriavzevii</i> (原文 <i>Issatchenkia orientalis</i>)	CRISPR/Cas9	P _{TEF1} -Cas9 P _{RPR1} -tRNA ^{Leu}	[94]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CRISPR/Cas12a	P _{KmPDC1} -Cas12a P _{KmSNR52} - crRNA	[95]
	SlugCas9-HF	P _{TEF} -SlugCas9 P _{KmRPR1} -SagRNA	[96]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CRISPR/Cas9	P _{ScTDH3} -HH-sgRNA-HDV P _{AsTEF} -Cas9	[97]
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	CRISPR/dCas9	P _{SNR52} -sgRNA	[80]
<i>Candida glycerinogenes</i>	CRISPR/Cas9	P _{GAP} -CgCas9 P _{GAP} -HH-sgRNA-HDV	[98]

菌体转录系统与核酸酶，突破宿主内源 Pol III 启动子资源匮乏对 sgRNA 表达的限制，提升引导 RNA 转录丰度 [87, 100]。在核酸酶工程改造层面，开发 xCas9、KKH-SaCas9 等广谱 PAM 识别变体，突破传统 Cas9 蛋白 PAM 序列限制，极大拓展基因组可编辑位点覆盖范围 [101-103]。在编辑特异性优化层面，依托 CHOPCHOP、Cas-OFFinder 等专用生信工具完成 sgRNA 理性设计与脱靶风险评估，从源头降低非特异性编辑概率，提升基因组编辑精准度与成功率 [3, 104]。gRNA 的设计与活性预测是目前较为成熟的核心领域，不同预测工具存在各自优势与特点（表 2）[105]，分别面向候选靶点选择、活性预测或潜在脱靶搜索，其输出不能互相替代。其中 CHOPCHOP 适用于候选 sgRNA 设计与排序，Cas-OFFinder 适用于按 PAM 与错配条件枚举潜在脱靶位点，不直接预测切割活性 [106-107]。以解脂耶氏酵母为例，DeepGuide 利用 SpCas9/LbCas12a 全基因组筛选数据训练活性预测模型，体现了宿主相关实验数据对评分适配的重要性 [108]。

整体而言，非常规酵母高效精准编辑体系的

发展，需多技术协同赋能，后续仍需持续迭代优化，进一步适配工业化底盘细胞的高通量、自动化编辑需求。

3.3 代谢通路的模块化组装与代谢调控

工业微生物底盘细胞的理性创制并非单一基因或局部通路的简单修饰，而是针对胞内物质代谢网络、基因转录调控网络以及产物跨膜分泌网络的全局性、系统性重塑 [110]。针对非常规酵母固有代谢瓶颈，代谢通路重构策略主要涵盖六大核心方向：1、外源基因表达元件的适配优化，确保异源酶在底盘细胞中的高效可溶表达与功能验证；2、异源合成通路的模块化组装，通过多基因协同调控与代谢节点重构实现合成路径的有序贯通；3、关键前体代谢通量的定向强化，提升目标产物合成所需底物的供给能力；4、胞内辅因子与能量代谢的平衡，保障还原力与 ATP 的充足供给与动态分配；5、竞争或旁路代谢通量的削弱或阻断，降低副产物生成及碳源分流，提高目标途径的底

表2 不同工具的对比分析

Table 2 Comparative analysis of different tools

工具类型	优缺点
CHOPCHOP	用于候选 sgRNA 靶点设计,支持多种 CRISPR 任务;宿主基因组与评分模型的适用性需核对,不能据此给出跨宿主统一准确度等级 ^[106] 。
Cas-OFFinder	在给定基因组或序列中按 PAM 与错配条件搜索潜在脱靶位点;用于序列层面筛查,不直接输出切割活性或实际脱靶发生率 ^[107] 。
DeepGuide	以解脂耶氏酵母 SpCas9/LbCas12a 筛选数据训练的活性预测模型;原文有实验验证,迁移至其他宿主仍需重训练与验证 ^[108] 。
CRISPOR	结合多种活性与潜在脱靶评分进行 sgRNA 排序,并提供克隆、验证相关引物设计;评分适用性仍取决于训练数据及宿主条件 ^[109] 。
Benchling	可提供优质的脱靶分析与序列整合功能,其中靶标活性预测仍基于通用模型实现,已集成至综合性分子生物学平台。
Synthego/IDT	专注于 gRNA 合成的商业工具,其评分模型为专有技术,且针对其自有产品进行了优化,未经实验验证的物种可能缺乏精确性。

物利用效率;6、菌株产物耐受性与外排分泌功能的工程化改造,通过转运蛋白的筛选与改造,强化产物的胞外积累能力并减轻胞内产物抑制效应。通过多维度代谢网络改造,打破天然代谢瓶颈,重塑全局碳流分布,最终实现目标产物合成通量、得率与生产强度的同步提升。

辅因子与能量代谢网络重构是解除氧化还原失衡、提升还原性生物基产物合成效能的核心手段,亦是当前非常规酵母代谢工程的核心策略之一。对于游离脂肪酸、有机酸、高级醇等高度依赖还原力供给的还原性目标产物,胞内 NADH、NADPH 等还原力的总供给水平、时空分布特征以及与关键合成酶的辅因子适配度,直接决定胞内全局代谢流分配比例,也是限制目标产物最大化积累的核心限速节点。在多形汉逊酵母 (*Ogataea polymorpha*) 中,研究人员通过强化磷酸戊糖途径通量以提升胞内 NADPH 内源再生能力,有效解除游离脂肪酸生物合成过程中的还原力供给瓶颈,显著增强了游离脂肪酸的合成通量与产量^[111]。除动态调控胞内还原力水平外,关键限速酶辅因子偏好性的定向分子改造,能够从酶分子层面实现合成通路 with 还原力供给的精准匹配,是辅因子工程的精细化改造策略^[37]。辅因子工程改造存在底物依赖性与亚细胞区室化,缺乏通用的改造方案,单纯提升辅因子总量不考虑平衡往往无法实现产物增产^[112-114]。例如,在巴斯德毕赤酵母中,将 NADH 激酶 Pos5 靶向不同位置(细胞质和线粒体),胞质定位可提高分泌型抗体片段的比生产率,而线粒体定位未有明显差异^[115]。通过细胞器

工程将巴斯德毕赤酵母脂肪醇生物合成途径定位于过氧化物酶体,相比全局辅因子调控策略,可更高效推动脂肪醇的定向合成^[116]。

综上所述,非常规酵母底盘细胞的理性改造已从局部通路的简单干预,演进为对物质代谢、转录调控及产物分泌网络的全局性系统重塑。围绕代谢瓶颈,通路重构与辅因子工程等策略协同推进,逐步打破了宿主固有的氧化还原限制与碳流分配壁垒。然而,鉴于酵母菌株遗传背景的多样性与代谢机制的复杂性,通用型改造方案难以直接复用。未来研究应立足菌株个性特征,深度融合多组学解析、基因组尺度模型预测与人工智能辅助设计,构建“全局调控+局部精准干预”相结合的工程策略,推动非常规酵母底盘细胞向高效、鲁棒、可编程的方向持续演进,为绿色生物制造提供坚实的平台技术支撑。

4 多组学与系统生物学在底盘细胞开发中的应用

多组学整合分析是系统解析底盘细胞代谢网络的核心手段。该策略依托高通量测序与质谱技术,系统获取基因组、转录组、蛋白组、代谢组与表观组等多维数据,从而实现对细胞动态响应过程的系统解析。通过数据归一化、多维统计与相关性分析等生物信息学手段,深度挖掘不同分子层级间的协同调控关系及差异响应模式,全面阐明异源途径引入或环境扰动下底盘细胞的代谢

重塑与调控机制，为微生物细胞工厂的理性设计与定向优化提供了坚实的理论支撑。

4.1 基于多组学数据驱动的靶点挖掘与理性设计

非常规酵母底盘细胞的精准理性设计，受制于菌株遗传背景注释不完善、胞内代谢调控网络解析不透彻等固有难题，单纯依赖试错式代谢工程改造难以突破菌株性能上限。依托基因组、转录组、蛋白质组、代谢组、表观组及单细胞测序在内的多组学联合分析技术，能够全局解析非常规酵母的分子调控网络，挖掘未知功能基因与代谢限速靶点。在传统表型特征的基础上，同时整合“时间维度（同一细胞/菌株在不同时间点的表型变化）”与“空间维度（在空间上的分布，如不同细胞器）”和“多种组学数据”，可进一步揭示基因型、转录表达、蛋白功能、代谢通量、表观遗传调控及菌株表型的内在关联，为非常规酵母底盘细胞从局部单点改造走向全局系统重塑提供底层数据支撑。

4.2 基于基因组规模代谢网络模型（GEMs）的功能预测与代谢优化

基因组尺度代谢网络模型（GEMs）作为系统生物学核心计算工具，整合基因组注释信息、基因—蛋白—反应关联、胞内物质计量平衡关系以及亚细胞区室化代谢特征，能够构建微生物基因型与宏观表型之间的量化桥梁，实现给定约束下的稳态代谢通量预测、必需基因筛选与潜在工程靶点智能挖掘，是非常规酵母底盘细胞理性设计不可或缺的计算平台^[117]。依托通量平衡分析（FBA）及各类衍生优化算法，GEMs可在给定碳源与氧摄取约束下模拟菌株生长代谢规律、副产物分流机制、基因敲除或过表达后的代谢流重分配趋势，从理论层面预判改造效果，大幅降低实验试错成本，为底盘细胞宿主筛选、代谢通路定向优化提供量化理论指导^[118]。酶约束、动态过程及pH响应分析需进一步引入相应参数或扩展模型，不能由常规FBA直接获得。

目前工业应用的经典非常规酵母已建立多种基因组尺度代谢模型，但其覆盖度与验证程度仍有

差异，涵盖解脂耶氏酵母、巴斯德毕赤酵母、马克斯克鲁维酵母、树干毕赤酵母、红酵母等经典工业菌株，逐步形成适配不同工业应用场景的代谢网络模型（表3）^[119-151]。研究人员在解脂耶氏酵母脂质合成体系改造中，依托代谢网络模型预测脂质合成关键限速节点与竞争支路，通过cMOMA分析预测并敲除YALI0F30745g，工程菌株脂质产量相较于野生型菌株提升了45%，为模型指导下细胞工厂的高效构建提供了参考基础^[130]。

总体来说，多组学数据耦合代谢网络模型的系统改造策略已应用于多株非常规酵母^[136, 152]，可推动非常规酵母底盘细胞改造从传统经验驱动的盲目试错模式，转向数据驱动、计算预判、精准靶向的系统理性设计新模式，助力下一代酵母底盘细胞的智能化开发。多组学高通量解析技术与基因组尺度代谢网络模型的深度耦合，如能充分考虑复杂细胞代谢的调控网络，有望精炼通量预测，提高靶点选择的准确性。

5 适应性实验室进化与人工智能在底盘细胞开发中的应用

在底盘细胞开发过程中，适应性实验室进化（Adaptive Laboratory Evolution, ALE）与人工智能（Artificial Intelligence, AI）正成为突破细胞性能瓶颈的双引擎。ALE通过对底盘细胞施加定向选择压力，可快速筛选出耐受性强、底物利用效率高的优良表型，但其遗传基础与调控机制往往难以直接解析。AI通过对ALE过程产生的多组学数据进行深度学习与建模，辅助识别突变—表型关联并提出候选改造靶点，其预测能力取决于数据规模、质量及宿主适配性，仍需实验验证。两者融合形成“实验进化-数据驱动-模型预测-设计指导”的闭环策略，弥补了传统理性设计靶点有限、非理性筛选效率低下的缺陷，为构建高效鲁棒性工业底盘细胞提供了系统化的解决方案。

5.1 ALE介导的底盘细胞表型驯化与多突变协同机制解析

受制于非常规酵母部分调控通路未知、复杂

表3 非常规酵母的代谢网络模型及其应用场景

Table 3 Genome-scale metabolic models of non-conventional yeasts and their application scenarios

物种/菌株	模型	应用场景与证据范围	参考文献
<i>Yarrowia lipolytica</i>	eciYali5-GEM	结合生长阶段蛋白质组约束, 预测脂质/类胡萝卜素改造靶点; 新靶点仍待验证。	[119]
	iYli21	整合碳源转录组; 比较底物利用及不同底物的产物理论得率, 辅助碳源选择。	[126]
<i>Komagataella phaffii</i>	ecPichia	通过酶约束预测基因靶点; 改善糖酵解和TCA循环通量促进红没药烯合成。	[127]
	iMT1026	整合糖基化、脂质及能量代谢; 以碳源、供氧和重组蛋白生产数据验证。	[133]
	iMT1026v3	整合甘油和甲醇作为唯一碳源生长的新型特定生物量方程, 扩展底物预测范围。	[135]
	iAUKM	预测SAM增产靶点; IPP过表达在葡萄糖/甘油条件下分别提高SAM积累16%/14%。	[136]
	iLD1283	耦合转录组优化甲醇诱导下柠檬酸钠补料; 5 L补料发酵SAM达10.87 g/L。	[137]
<i>Pichia kudriavzevii</i> (原文 <i>Issatchenkia orientalis</i> SD108)	iSor850	结合宿主生物量及能量维持数据; 预测丁二酸生长耦联敲除策略, 部分靶点验证。	[138]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	iSM996	模拟多碳源生长, 结合30/45°C转录组分析温度相关代谢, 辅助耐热底盘设计。	[139]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	iOD907	以碳源表型、连续培养及敲除数据验证; 用于培养基设计和工程靶点分析。	[140]
<i>Ogataea polymorpha</i>	iUL909	验证底物利用; 预测甲醇/葡萄糖条件下乳酸、丁二酸增产反应, 待工程验证。	[141]
	hanpo-GEM	仅用于演示使用 raven 进行 GEM 重构的流程, 尚未针对生物模拟进行验证与优化。	[142]
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	iBB814	分析木糖利用、辅因子循环及厌氧生长需求; 提供木质纤维素转化设计线索。	[143]
	iDH814	分析NADPH/NADH平衡变化与木糖醇副产物形成。	[144]
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Rhto-GEM	验证葡萄糖/木糖/甘油生长; 预测亚麻酸、三酰甘油及类胡萝卜素工程靶点。	[145]
	iRhto1108	验证碳源阿拉伯糖和纤维素及氮源脯氨酸的生长; 容纳高分辨率脂质组学数据, 预测三酰甘油生成。	[146]
	ecRhtoGEM	整合蛋白质组、脂质组及酶约束; 分析葡萄糖/木糖/乙酸条件下脂质合成与NADPH分配。	[147]
	Rt_IFO0880	整合功能注释和多组学数据(包括转录组学、蛋白质组学、代谢组学和RB-TDNA测序); 用于脂质积累和木质纤维素碳源利用。	[148]
<i>Cutaneotrichosporon oleaginosus</i>	iNP636	对不同碳源的实验数据进行定性预测; 建议ATP-柠檬酸裂解酶作为改善脂质生成的关键靶点	[149]
<i>Lachancea kluyveri</i>	iPN730	结合动态FBA分析供氧/碳源对乙酸乙酯及乙醇形成的影响, 并解析尿嘧啶利用。	[150]
<i>Lipomyces starkeyi</i> (NRRL Y-11557)	iLst996	碳源生长表型验证, 预测脂理论得率; 为油脂生产及底物选择提供模型依据。	[151]

胁迫响应网络难以人工精准解析等问题, 理性代谢工程改造往往无法解决产物毒性胁迫、极端发酵环境耐受、内源代谢紊乱等复杂工程难题。适应性实验室进化(ALE)作为逆向工程改造手段, 无需预先明确菌株遗传调控机制, 通过持续梯度胁迫培养促进有利变异及优势突变株富集, 是提升非常规酵母工业胁迫耐受性、修复代谢网络缺陷、挖掘未知优良突变靶点的高效手段, 现已广泛应用于非常规酵母底盘细胞耐受性强化与代谢

性能升级研究^[153-154]。现阶段ALE技术主要应用于缓解高浓度目标产物带来的胞内毒性压力, 提升菌株产物耐受能力与发酵产量。还可复现工业发酵过程的高温、高渗、酸、碱胁迫等恶劣工况, 提升底盘细胞工业发酵的鲁棒性。针对丁二酸合成解脂耶氏酵母工程菌株, 还原性三羧酸循环重构会引发胞内还原力失衡、全局代谢网络紊乱, 进而抑制菌体生长与产物合成。通过连续多轮适应性实验室进化, 进化菌株的生长得到恢复, 后

续结合线粒体通路重构与氧化还原平衡优化提高丁二酸产量,为代谢通路重构后菌株代谢缺陷修复提供了简便可行的解决方案^[153]。与此同时,将高通量基因组重测序、转录组差异等组学技术与ALE耦合联用,有望筛选与适应性表型相关的候选突变及调控通路,仍需通过等位基因重构等实验验证因果关系,从分子层面解析菌株耐受机制与代谢适应性进化机理,实现表型进化与基因型解析的双向闭环^[154]。

5.2 AI驱动代谢通量深度学习预测与组学联合迭代优化

合成生物学高通量实验平台持续迭代,相关元件序列、酶学参数、发酵表型及组学数据持续积累,但非常规酵母的数据规模、质量与宿主覆盖度仍不均衡。人工智能(AI)凭借强大的数据拟合、特征提取与预测生成能力,成为破解非常规酵母遗传背景复杂、分子工具匮乏、改造试错成本高等痛点的新一代核心技术。相较于酿酒酵母成熟的标准化改造体系,非常规酵母存在元件通用性差、代谢调控网络复杂、改造靶点不明确等问题,传统依赖科研人员经验的迭代试错实验周期长、改造成本高、优化上限有限。人工智能算法可整合生物元件序列特征、蛋白质空间结构、多组学表达数据、发酵表型参数等多维数据,辅助表达元件和蛋白设计,并为代谢工程提出候选方案,其应用范围应依据具体宿主的数据与实验验证^[155-156]。

人工智能对非常规酵母底盘细胞的赋能覆盖“生物元件、功能蛋白、代谢通路”三层级,实现从微观分子到宏观细胞工厂的全链条智能化优化。在基因表达调控元件层面,AI可精准识别启动子、终止子、UTR区等关键功能保守基序,预测元件表达强度与动态响应规律,定向设计梯度化、可诱导、可编程的人工调控元件文库。在功能蛋白改造层面,依托深度学习蛋白结构预测模型与蛋白计算设计模型,提出关键酶候选改造位点,辅助实验验证热稳定性、底物谱及催化活性等关键指标,以干湿结合的改造模式评估其在工业高温、高有机溶剂等发酵环境中的适应性^[155]。在代谢网络层面,AI可辅助筛选碳代谢流瓶颈、竞争支路、

辅因子失衡位点及基因必需性关键核心靶点,提出仍需宿主实验验证的单个靶点优化或多基因协同改造候选方案^[157]。此外,人工智能与合成生物学标准的「设计-构建-测试-学习(DBTL)」闭环研发体系、自动化生物铸造平台深度融合,能够自动完成实验数据采集、结果分析、下一轮改造方案迭代,彻底颠覆传统线性人工试错研发模式,有效缩短酵母底盘细胞开发周期、降低实验耗材成本、提升改造实验可重复性与稳定性^[158]。

整体而言,人工智能在非常规酵母底盘细胞开发中的应用正逐步升级,应用场景从早期单一的启动子、终止子等基础生物元件筛选与优化,延伸至表达系统模块化组装、全长代谢通路协同重构、底盘细胞全局性能优化等多层级场景。未来人工智能设计将与高通量筛选平台结合挖掘极端环境优势特色底盘细胞,通过多组学分析技术与基因组代谢网络模型等大模型深度融合,构建全流程数据驱动的智能酵母底盘细胞研发体系,筛选超高性能的细胞工厂,全面推动非常规酵母细胞工厂朝着自动化、精准化、智能化的方向发展(图4)^[156]。

6 挑战与未来展望

得益于合成生物学工具迭代与多维度前沿技术赋能,非常规酵母底盘细胞改造已逐步摆脱传统经验试错模式,向着系统理性设计与智能化改造方向迈进,在低碳生物制造领域展现出巨大应用潜力^[16]。但受制于菌株固有物种异质性、底层技术短板及产业化壁垒,该领域发展仍存在诸多关键瓶颈,结合全文研究进展,对现存挑战与未来发展方向总结如下。

现阶段非常规酵母底盘细胞研发与应用主要存在四点核心局限:第一,菌株宿主特异性极强,缺乏跨菌株通用的标准化遗传元件与编辑工具,遗传操作通用性差、改造成本偏高;第二,多数菌株代谢调控网络解析不够全面,高精度动态代谢模型匮乏,制约了计算机辅助理性设计的精度;第三,实验室优化菌株工业发酵鲁棒性不足,发酵工艺放大及下游产物分离纯化难度大,成果转化受阻;第四,国内自主酵母种质资源挖掘不足,

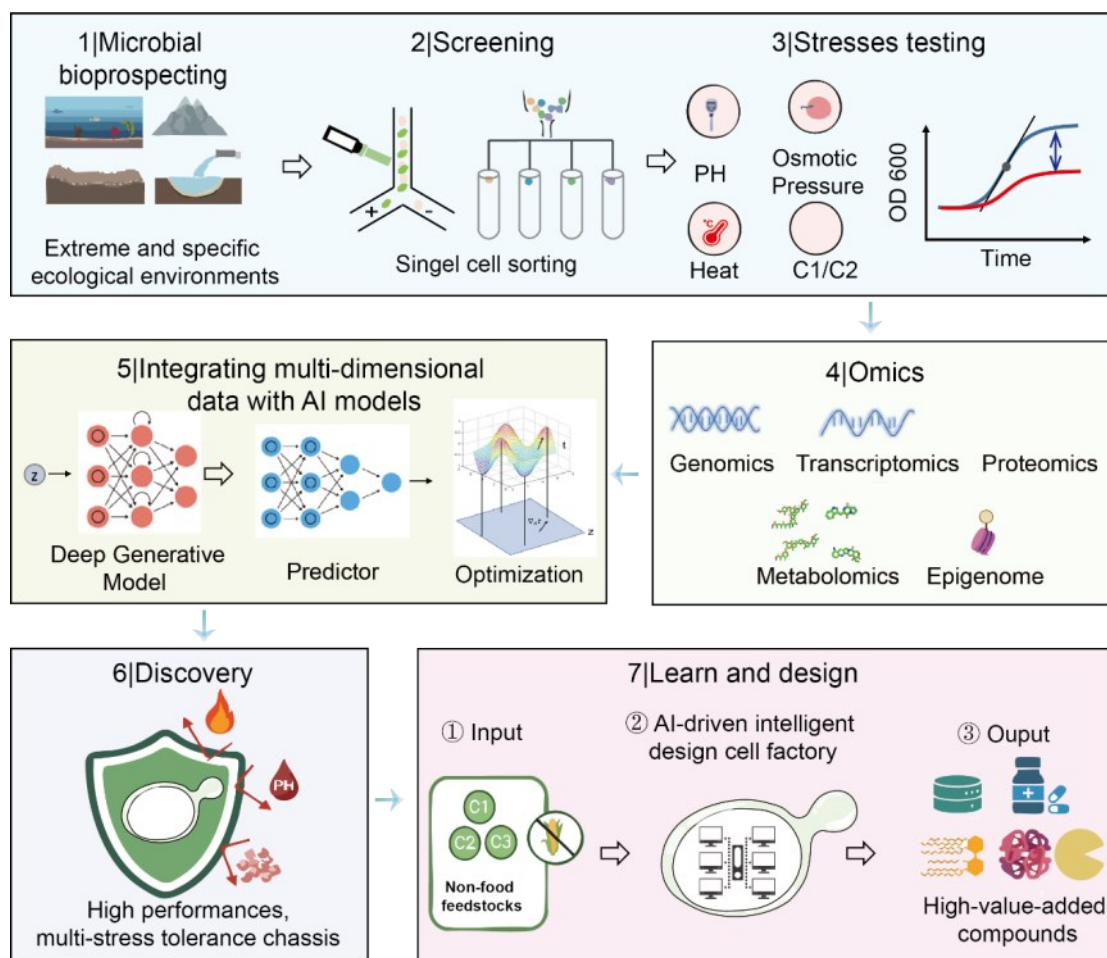


图4 非常规酵母底盘细胞的筛选与创制。

Fig. 4 Screening and engineering of non-conventional yeast chassis cells.

外加海外专利壁垒与菌种审批限制，进一步延缓了产业化落地进程。

针对上述瓶颈，未来非常规酵母底盘细胞研究可聚焦四大方向推进突破：一是挖掘多样生态位与工业场景中的酵母资源，搭建自主菌种与元件资源库，摆脱外部技术与种质依赖；二是开发通用型遗传操作工具箱，推动表达元件、编辑体系标准化，降低菌株改造门槛；三是推动多组学技术与人工智能深度融合，构建真菌专属智能设计平台，逐步提高底盘细胞设计的预测能力与实验验证效率；四是强化产学研协同合作，立足工业真实发酵场景优化菌株性能与配套工艺，打通实验室到工业化的转化通路。

常规酿酒酵母与非常规酵母具备差异化的底盘细胞优势，酿酒酵母工具体系成熟，适合基础机制研究，非常规酵母天然适配严苛的工业发酵

场景，二者可形成互补研发体系。未来通过融合两类酵母研发经验，补齐非常规酵母底层工具短板、完善代谢网络理论体系、打通工程化转化壁垒，能够进一步构建兼具高编辑效率、高发酵鲁棒性、高产物合成能力的新一代酵母底盘细胞。综上，非常规酵母底盘细胞开发是合成生物学、代谢工程与工业生物技术交叉领域的核心研究方向，其技术突破将助力绿色生物制造替代传统化工生产，助力双碳目标的实现，在未来全球生物经济发展进程中具备不可替代的战略价值。

参 考 文 献

- [1] LI M, LANG X, MORAN CABRERA M, et al. CRISPR-mediated multigene integration enables Shikimate pathway refactoring for enhanced 2-phenylethanol biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*[J]. Biotechnol Biofuels, 2021, 14

- (1): 3.
- [2] KARIM N, SHISHIR M R I, GOWD V, et al. Hesperidin-An Emerging Bioactive Compound against Metabolic Diseases and Its Potential Biosynthesis Pathway in Microorganism[J]. Food Rev Int, 2022, 38(sup1): 170-192.
 - [3] RASCHMANOVA H, WENINGER A, GLIEDER A, et al. Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects[J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(3): 641-665.
 - [4] THORWALL S, SCHWARTZ C, CHARTRON J W, et al. Stress-tolerant non-conventional microbes enable next-generation chemical biosynthesis[J]. Nat Chem Biol, 2020, 16(2): 113-121.
 - [5] QIU X, ZHANG J, ZHOU J, et al. Stress tolerance phenotype of industrial yeast: industrial cases, cellular changes, and improvement strategies[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(16): 6449-6462.
 - [6] NIELSEN J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering[J]. Bioengineered, 2013, 4(4): 207-211.
 - [7] RAINHA J, RODRIGUES J L, RODRIGUES L R. CRISPR-Cas9: A Powerful Tool to Efficiently Engineer *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Life, 2021, 11(1): 13.
 - [8] MOON S Y, SON S-H, OH S S, et al. Harnessing Cellular Organelles to Bring New Functionalities into Yeast[J]. Biotechnol Bioprocess Eng, 2023, 28(6): 936-948.
 - [9] XIAO Y, TAN X, HE Q, et al. Systematic metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for beta-farnesene production[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2024, 12: 1392556.
 - [10] RANAIVOARISOA T O, BAI W, KARTHIKEYAN R, et al. Overexpression of RuBisCO form I and II genes in *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 augments polyhydroxyalkanoate production heterotrophically and autotrophically[J]. Appl Environ Microbiol, 2024, 90(9): e0143824.
 - [11] WAGNER J M, ALPER H S. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances[J]. Fungal Genet Biol, 2016, 89: 126-136.
 - [12] PATRA P, DAS M, KUNDU P, et al. Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts[J]. Biotechnol Adv, 2021, 47: 107695.
 - [13] LOBS A K, SCHWARTZ C, WHEELDON I. Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications[J]. Synth Syst Biotechnol, 2017, 2(3): 198-207.
 - [14] FABARIUS J T, WEGAT V, ROTH A, et al. Synthetic Methylophony in Yeasts: Towards a Circular Bioeconomy[J]. Trends Biotechnol, 2021, 39(4): 348-358.
 - [15] PARK B G, KIM J, KIM E-J, et al. Application of Random Mutagenesis and Synthetic FadR Promoter for de novo Production of ω -Hydroxy Fatty Acid in *Yarrowia lipolytica*[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 624838.
 - [16] PAUL, DEBARATI, et al. Metabolic switch points enabling targeted lipid accumulation in oleaginous and non-oleaginous yeasts: A comparative review[J]. Bioresour Technol Rep, 2026, 102824.
 - [17] OSORIO-GONZÁLEZ, CARLOS S, et al. Crabtree effect on *Rhodospiridium toruloides* using wood hydrolysate as a culture media[J]. Fermentation, 2022, 9(1), 11.
 - [18] TIUKOVA, IEVGENIIA A, et al. Proteome analysis of xylose metabolism in *Rhodotorula toruloides* during lipid production [J]. Biotechnol Biofuels, 2019, 12(1), 137.
 - [19] JIANG W, LEE SG, ALPER HS, et al. Engineering the yeast *Yarrowia lipolytica* for biomanufacturing[J]. Curr Opin Biotechnol, 2026, 99: 103473.
 - [20] SATO R, ARA S, YAMAZAKI H, et al. Citrate-mediated acyl-coa synthesis is required for the promotion of growth and triacylglycerol production in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*[J]. Microorganisms, 2021, 9(8), 1693.
 - [21] ZHANG H, ZHANG L, CHEN H, et al. Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP: citrate lyase from *Mus musculus*[J]. J biotechnol, 2014, 192: 78-84.
 - [22] LIU, LEQIAN, et al. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*[J]. Metab Eng, 2015, 29: 36-45.
 - [23] FAKAS, STYLIANOS. Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Eng Life Sci, 2017, 17(3): 292-302.
 - [24] MOON S Y, AN N Y, LEE J Y. Transforming non-conventional yeasts into key players in biotechnology: advances in synthetic biology applications[J]. Front Microbiol, 2025, 16: 1600187.
 - [25] BEOPOULOS A, NICAUD J M, GAILLARDIN C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 90(4): 1193-1206.
 - [26] GROENEWALD M, BOEKHOUT T, NEUVEGLISE C, et al.

- Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential[J]. Crit Rev Microbiol, 2014, 40(3): 187-206.
- [27] SHI Z, XU Z, RONG W, et al. Reprogramming yeast metabolism for customized starch-rich micro-grain through low-carbon microbial manufacturing[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 2784.
- [28] GAO Qidou, DONG Yaqi, HUANG Ying, LIU Yijuan, YANG Xiaobing. Advances in gene editing and natural product synthesis of *Rhodotorula toruloides*[J]. Chin J Biotechnol, 2023, 39(6): 2313-2333.
- [29] BRACHARZ F, BEUKHOUT T, MEHLMER N, et al. Opportunities and challenges in the development of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* ATCC 20509 as a new cell factory for custom tailored microbial oils[J]. Microb Cell Fact, 2017, 16(1): 178.
- [30] DI FIDIO N, MINONNE F, ANTONETTI C, et al. *Cutaneotrichosporon oleaginosus*: A Versatile Whole-Cell Biocatalyst for the Production of Single-Cell Oil from Agro-Industrial Wastes[J]. Catalysts, 2021, 11(11): 1291.
- [31] ZHAN C, LI X, LAN G, et al. Reprogramming methanol utilization pathways to convert *Saccharomyces cerevisiae* to a synthetic methylotroph[J]. Nat Catal, 2023, 6(5): 435-450.
- [32] GAO L, CAI P, PENG C, et al. Advances in metabolic engineering of methylotrophic yeasts[J]. Chin J Biotechnol, 2021, 37(3): 966-979.
- [33] YURIMOTO, HIROYA, MASAHIRO OKU, et al. Yeast Methylotrophy: Metabolism, Gene Regulation and Peroxisome Homeostasis[J]. Int J Microbiol, 2011, (1): 101298.
- [34] WANG, HAOYU, FAN BAI, et al. Understanding methanol metabolism through systems biology: advances and future perspectives[J]. Curr Opin Biotech, 2025, 96: 103370.
- [35] KARBALAEI M, REZAEE S A, FARSIANI H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(9): 5867-5881.
- [36] CAI P, WU X, DENG J, et al. Methanol biotransformation toward high-level production of fatty acid derivatives by engineering the industrial yeast *Pichia pastoris*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(29): e2201711119.
- [37] YU W, ZHANG C, LI Y, et al. Methanol biotransformation for the production of biodegradable plastic monomer L-lactate in yeast[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 10756.
- [38] MUKHERJEE V, RADECKA D, AERTS G, et al. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation[J]. Biotechnol Biofuels, 2017, 10: 216.
- [39] SUN W, VILA-SANTA A, LIU N, et al. Metabolic engineering of an acid-tolerant yeast strain *Pichia kudriavzevii* for itaconic acid production[J]. Metab Eng Commun, 2020, 10: e00124.
- [40] LYU Y, WU P, ZHOU J, et al. Protoplast transformation of *Kluyveromyces marxianus*[J]. Biotechnol J, 2021, 16(12): e2100122.
- [41] HA-TRAN D M, NGUYEN T T, HUANG C-C. *Kluyveromyces marxianus*: Current State of Omics Studies, Strain Improvement Strategy and Potential Industrial Implementation[J]. Fermentation, 2020, 6(4): 124.
- [42] RUCHALA J, KURYLENKO O O, DMYTRUK K V, et al. Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*) [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2020, 47(1): 109-132.
- [43] MASTELLA L, SENATORE V, BELTRANI T, et al. *Scheffersomyces stipitis* ability to valorize different residual biomasses for vitamin B (9) production[J]. Microb Biotechnol, 2023, 16(2): 392-403.
- [44] KOBAYASHI Y, INOKUMA K, MATSUDA M, et al. Resveratrol production of a recombinant *Scheffersomyces stipitis* strain from molasses[J]. Biotechnol Notes, 2022, 3: 1-7.
- [45] KOBAYASHI Y, INOKUMA K, MATSUDA M, et al. Resveratrol production from several types of saccharide sources by a recombinant *Scheffersomyces stipitis* strain[J]. Metab Eng Commun, 2021, 13: e00188.
- [46] DE GRAEVE M, DE MAESENEIRE S L, ROELANTS S, et al. *Starmerella bombicola*, an industrially relevant, yet fundamentally underexplored yeast[J]. FEMS Yeast Res, 2018, 18(7).
- [47] WEI ZHONG, CHONG XIE, KUAN CHEN, et al. Valorizing Non-Food Carbon Sources: Discovery and Characterization of a *Cyberlindnera jadinii* for Single-Cell Protein Synthesis[J]. ACS Sustainable Chem Eng, 2026, 14(36): 16145-16159.
- [48] JENSEN M K, KEASLING J D. Recent applications of synthetic biology tools for yeast metabolic engineering[J]. FEMS Yeast Res, 2015, 15(1): 1-10.
- [49] WANG C, LIN M, YANG Z, et al. Characterization of the endogenous promoters in *Yarrowia lipolytica* for the biomanufacturing applications[J]. Process Biochem, 2023, 124: 245-252.
- [50] BLAZECK J, LIU L, REDDEN H, et al. Tuning gene

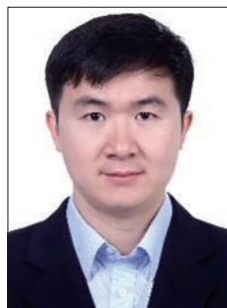
- expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(22): 7905-14.
- [51] XIONG X, CHEN S. Expanding Toolbox for Genes Expression of *Yarrowia lipolytica* to Include Novel Inducible, Repressible, and Hybrid Promoters[J]. ACS Synth Biol, 2020, 9(8): 2208-2213.
- [52] ZHU Q, LIU Q, YAO C, et al. Yeast transcriptional device libraries enable precise synthesis of value-added chemicals from methanol[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(17): 10187-10199.
- [53] JIN X, ZHANG W, WANG Y, et al. Biosynthesis of non-animal chondroitin sulfate from methanol using genetically engineered *Pichia pastoris*[J]. Green Chemistry, 2021, 23(12): 4365-4374.
- [54] ERDEN-KARAOGLAN F, KARAOGLAN M, YILMAZ G, et al. Deletion analysis of *Pichia pastoris* alcohol dehydrogenase 2 (ADH2) promoter and development of synthetic promoters [J]. Biotechnol J, 2022, 17(2): e2100332.
- [55] LAI J, SONG L, ZHOU Y, et al. Fine-Tuned Gene Expression Elements from Hybrid Promoter Libraries in *Pichia pastoris* [J]. ACS Synth Biol, 2024, 13(1): 310-318.
- [56] GÖRGENS JF, PASSOTH V, VAN ZYL WH, et al. Amino acid supplementation, controlled oxygen limitation and sequential double induction improves heterologous xylanase production by *Pichia stipitis*[J]. FEMS Yeast Res, 2005, 5(6-7): 677-83.
- [57] RAJKUMAR A S, VARELA J A, JUERGENS H, et al. Biological Parts for *Kluyveromyces marxianus* Synthetic Biology[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7: 97.
- [58] KUMAR P, SAHOO D K, SHARMA D. The identification of novel promoters and terminators for protein expression and metabolic engineering applications in *Kluyveromyces marxianus*[J]. Metab Eng Commun, 2021, 12: e00160.
- [59] BASSETT S, DA SILVA N A. Engineering a carbon source-responsive promoter for improved biosynthesis in the non-conventional yeast *Kluyveromyces marxianus*[J]. Metab Eng Commun, 2024, 18: e00238
- [60] ITO Y, TERAJ G, ISHIGAMI M, et al. Exchange of endogenous and heterogeneous yeast terminators in *Pichia pastoris* to tune mRNA stability and gene expression[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(22): 13000-13012.
- [61] MATSUYAMA T. Recent developments in terminator technology in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biosci Bioeng, 2019, 128(6): 655-661.
- [62] JIANG D, YANG M, CHEN K, et al. Exploiting synthetic biology platforms for enhanced biosynthesis of natural products in *Yarrowia lipolytica*[J]. Bioresour Technol, 2024, 399: 130614.
- [63] PRIELHOFER R, BARRERO J J, STEUER S, et al. GoldenPiCS: a Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris*[J]. BMC Syst Biol, 2017, 11(1): 123.
- [64] MADZAK C, GAILLARDIN C, BECKERICH J M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review[J]. J Biotechnol, 2004, 109(1-2): 63-81.
- [65] JIANG W, WANG S, AHLHEIT D, et al. High-throughput metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* through gene expression tuning[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2025, 122(23): e2426686122.
- [66] VAN OYEN A J, DEKKER P, HUANG M, et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*[J]. FEMS Yeast Res, 2006, 6(3): 381-392.
- [67] SARAYA R, KRIKKEN A M, KIEL J A, et al. Novel genetic tools for *Hansenula polymorpha*[J]. FEMS Yeast Res, 2012, 2(3): 271-278.
- [68] EVATT J M, SADLI A D, RAPACZ B K, et al. Centromere pairing enables correct segregation of meiotic chromosomes[J]. Curr Biol, 2024, 34(10): 2085-2093.e6.
- [69] DONG D, WANG X, ZONG H, et al. Construction of a novel plasmid for an industrial yeast *Candida glycerinogenes* by dual-autonomously replicating sequence strategy[J]. J Biosci Bioeng, 2023, 135(1): 10-16.
- [70] DHAR M K, SEHGAL S, KAUL S. Structure, replication efficiency and fragility of yeast ARS elements[J]. Res Microbiol, 2012, 163(4): 243-53.
- [71] SCHULTZ J C, CAO M, MEJIA A, et al. CUT&RUN identifies centromeric DNA regions of *Rhodotorula toruloides* IFO0880[J]. FEMS Yeast Res, 2022, 21(8).
- [72] STURMBERGER L, CHAPPELL T, GEIER M, et al. Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence[J]. J Biotechnol, 2016, 235: 121-31.
- [73] NAKAMURA Y, NISHI T, NOGUCHI R, et al. A Stable, Autonomously Replicating Plasmid Vector Containing *Pichia pastoris* Centromeric DNA[J]. Appl Environ Microbiol, 2018, 84(15).
- [74] LOPEZ C, CAO M, YAO Z, et al. Revisiting the unique structure of autonomously replicating sequences in *Yarrowia lipolytica* and its role in pathway engineering[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105(14-15): 5959-5972.

- [75] VERNIS L, ABBAS A, CHASLES M, et al. An origin of replication and a centromere are both needed to establish a replicative plasmid in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(4): 1995-2004.
- [76] BAI W, HUANG M, LI C, et al. The biological principles and advanced applications of DSB repair in CRISPR-mediated yeast genome editing[J]. Synth Syst Biotechnol, 2023, 8(4): 584-596.
- [77] FRACZEK M G, NASEEB S, DELNERI D. History of genome editing in yeast[J]. Yeast, 2018, 35(5): 361-368.
- [78] KAPOOR S A, CHOUDHARY P, KASANA R C. Exploring CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing Advances in Conventional and Non-conventional Yeast Species[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2025, 197(11): 7083-7122.
- [79] WENINGER A, FISCHER J E, RASCHMANOVA H, et al. Expanding the CRISPR/Cas9 toolkit for *Pichia pastoris* with efficient donor integration and alternative resistance markers [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(4): 3183-3198.
- [80] CAO M, GAO M, PLOESSL D, et al. CRISPR-Mediated Genome Editing and Gene Repression in *Scheffersomyces stipitis*[J]. Biotechnol J, 2018, 13(9): e1700598.
- [81] NAMBU-NISHIDA Y, NISHIDA K, HASUNUMA T, et al. Development of a comprehensive set of tools for genome engineering in a cold- and thermo-tolerant *Kluyveromyces marxianus* yeast strain[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8993.
- [82] 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 Synth Biol, 2016, 5(4): 356-359.
- [83] NUMAMOTO M, MAEKAWA H, KANEKO Y. Efficient genome editing by CRISPR/Cas9 with a tRNA-sgRNA fusion in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*[J]. J Biosci Bioeng, 2017, 124(5): 487-492.
- [84] WANG L, DENG A, ZHANG Y, et al. Efficient CRISPR-Cas9 mediated multiplex genome editing in yeasts[J]. Biotechnol. Biofuels, 2018, 11(1): 277.
- [85] PHITHAKROTCHANAKOON C, PUSEENAM A, WONGWISANSRI S, et al. CRISPR-Cas9 enabled targeted mutagenesis in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2018, 365(11).
- [86] 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]. Biotechnol J, 2020, 15(1): e1900238.
- [87] HORWITZ A A, WALTER J M, SCHUBERT M G, et al. Efficient Multiplexed Integration of Synergistic Alleles and Metabolic Pathways in Yeasts via CRISPR-Cas[J]. Cell Syst, 2015, 1(1): 88-96.
- [88] SCHWARTZ C, SHABBIR-HUSSAIN M, FROGUE K, et al. Standardized Markerless Gene Integration for Pathway Engineering in *Yarrowia lipolytica*[J]. ACS Synth Biol, 2017, 6(3): 402-409.
- [89] SHULIANG GAO, YANGYANG TONG, ZHIQIANG WEN, et al. Multiplex gene editing of the *Yarrowia lipolytica* genome using the CRISPR-Cas9 system[J]. J Ind Microbiol Biot, 2016, 43(8): 1085-1093.
- [90] PETER B OTOUPAL, MASAKAZU ITO, ADAM P ARKIN, et al. Multiplexed CRISPR-Cas9-Based Genome Editing of *Rhodospiridium toruloides*[J]. mSphere, 2019, 4(2): 2379-5042.
- [91] SHAIANI P, T FUCHS, P GRABAN, et al. Mastering Targeted Genome Engineering of GC-Rich Oleaginous Yeast for Tailored Plant Oil Alternatives for the Food and Chemical Sector[J]. Microb Cell Fact, 2023, 22(1): 25.
- [92] ZHIXIAN YU A, KAIDI CHEN B, GULIKEZI MAIMAITIREXIATI B, et al. A dual-dimensional CRISPR toolkit enables one-step high-efficiency multiplex genome editing in *Komagataella phaffii*[J]. Metab Eng, 2026, 98: 102525.
- [93] SENQIN HOU, SHIBIN YANG, WENQIN BAI. Multi-gene precision editing tool using CRISPR-Cas12a/Cpf1 system in *Ogataea Polymorpha*[J]. Microb Cell Fact, 2025, 24:28.
- [94] TRAN, VINH G, et al. Development of a CRISPR/Cas9-based tool for gene deletion in *Issatchenkia orientalis*[J]. Msphere, 2019, 4(3): e00345-19.
- [95] ZHA HAO, YANJIE LI, ZHONGMEI HU. et al. Development of a CRISPR/Cas12a genome editing toolbox in *Kluyveromyces marxianus* and its application in succinic acid biosynthesis[J]. Synth Syst Biotechnol, 2025, 11: 193-204.
- [96] ZHOU, HUANYU, et al. Efficient and markerless gene integration with SlugCas9-HF in *Kluyveromyces marxianus*[J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 797.
- [97] LINGTONG LIAO, XIURU SHEN, ZHIYU SHEN, et al. CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Protein Expression and Secretion in *Kluyveromyces lactis*[J]. ACS Synth Biol, 2024, 13(7): 2105-2114.
- [98] MINYANG ZHU, LEI SUN, XINYAO LU, et al. Establishment of a transient CRISPR-Cas9 genome editing system in *Candida glycerinogenes* for co-production of ethanol

- and xylonic acid[J]. *J Biosci Bioeng*, 2019, 128(3): 283-289.
- [99] CHARPENTIER M, KHEDHER A H Y, MENORET S, et al. CtlP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1133.
- [100] MORSE N J, WAGNER J M, REED K B, et al. T7 Polymerase Expression of Guide RNAs in vivo Allows Exportable CRISPR-Cas9 Editing in Multiple Yeast Hosts[J]. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(4): 1075-1084.
- [101] KLEINSTIVER B P, PREW M S, TSAI S Q, et al. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(12): 1293-1298.
- [102] KLEINSTIVER B P, PREW M S, TSAI S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities[J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 481-485.
- [103] HU J H, MILLER S M, GEURTS M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 57-63.
- [104] STOVICEK V, HOLKENBRINK C, BORODINA I. CRISPR/Cas system for yeast genome engineering: advances and applications[J]. *FEMS Yeast Res*, 2017, 17(5).
- [105] DIAS R. G., FREITAS F. P. M., BARBOSA S. L. et al. 10 years of CRISPR/CAS genomic engineering in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2026, 49, 1767-1783.
- [106] LABUN K, MONTAGUE T G, KRAUSE M, et al. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W171-W174.
- [107] BAE S, PARK J, KIM J S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(10): 1473-1475.
- [108] BAISYA D, RAMESH A, SCHWARTZ C, et al. Genome-wide functional screens enable the prediction of high activity CRISPR-Cas9 and -Cas12a guides in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 922.
- [109] CONCORDET J P, HAEUSSLER M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1): W242-W245.
- [110] GUO-QIANG CHEN, FUQING WU, SHUANG ZHENG, et al. Current status and applications of microbial chassis strains for Chinese biomanufacturing industry[J]. *BACS*, 2025, 40(1): 2-13.
- [111] GAO J, YU W, LI Y, et al. Engineering co-utilization of glucose and xylose for chemical overproduction from lignocellulose[J]. *Nat Chem Biol*, 2023, 19(12): 1524-1531.
- [112] HONG KQ, FU XM, SHU XY, et al. Recent Advances in Cofactor Engineering Applied to Modulate Esters or Higher Alcohols in Fermented Beverages of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Fermentation*, 2026, 12(3), 165.
- [113] KWAK S, JO JH, YUN EJ, et al. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains[J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(2): 271-283.
- [114] YIN MQ, XU K, LUAN T, et al. Metabolic engineering for compartmentalized biosynthesis of the valuable compounds in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiol Res*, 2024, 286: 127815.
- [115] TOMÀS-GAMISANS M, ANDRADE C C P, MARESCA F, et al. Redox Engineering by Ectopic Overexpression of NADH Kinase in Recombinant *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*): Impact on Cell Physiology and Recombinant Production of Secreted Proteins[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(6): e02038-19.
- [116] ZHAI X, GAO J, LI Y, et al. Peroxisomal metabolic coupling improves fatty alcohol production from sole methanol in yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(12): e2220816120.
- [117] THIELE I, PALSSON B O. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction[J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(1): 93-121.
- [118] ORTH J D, THIELE I, PALSSON B O. What is flux balance analysis?[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(3): 245-8.
- [119] DE BIAGGI JS, PARK YK, KERKHOVEN EJ, et al. Enzyme-constrained genome-scale model of *Yarrowia lipolytica* predicts growth-phase specific metabolic engineering targets [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2026, 110-123.
- [120] LOIRA N, DULERMO T, NICAUD JM, et al. A genome-scale metabolic model of the lipid-accumulating yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *BMC Syst Biol*, 2012, 6: 35.
- [121] PAN P, HUA Q. Reconstruction and in silico analysis of metabolic network for an oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e51535.
- [122] KAVŠČEK M, BHUTADA G, MADL T, et al. Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*[J]. *BMC Syst Biol*, 2015, 9: 72.
- [123] KERKHOVEN EJ, POMRANING KR, BAKER SE, et al. Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*[J]. *NPJ Syst Biol Appl*, 2016, 2: 16005.
- [124] WEI S, JIAN X, CHEN J, et al. Reconstruction of genome-

- scale metabolic model of *Yarrowia lipolytica* and its application in overproduction of triacylglycerol[J]. *Bioresour Bioprocess*, 2017, 4: 51.
- [125] MISHRA P, LEE NR, LAKSHMANAN M, et al. Genome-scale model-driven strain design for dicarboxylic acid production in *Yarrowia lipolytica*[J]. *BMC Syst Biol*, 2018, 12: 12.
- [126] GUO Y, SU L, LIU Q, et al. Dissecting carbon metabolism of *Yarrowia lipolytica* type strain W29 using genome-scale metabolic modelling[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 2503-2511.
- [127] PINAR KOCABAŞ. Modeling meets metabolic engineering: The iPichia consensus model as basis for metabolic studies in *Komagataella phaffii*[J]. *Biochem Eng*, 2026, 225: 109940.
- [128] SOHN SB, GRAF AB, KIM TY, et al. Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for in silico analysis of heterologous protein production [J]. *Biotechnol J*, 2010, 5: 705-715.
- [129] CHUNG BK, SELVARASU S, ANDREA C, et al. Genome-scale metabolic reconstruction and in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement [J]. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 50.
- [130] KIM M, PARK B G, KIM E J, et al. In silico identification of metabolic engineering strategies for improved lipid production in *Yarrowia lipolytica* by genome-scale metabolic modeling[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 187.
- [131] CASPETA L, SHOAIE S, AGREN R, et al. Genome-scale metabolic reconstructions of *Pichia stipitis* and *Pichia pastoris* and in silico evaluation of their potentials[J]. *BMC Syst Biol*, 2012, 6: 24.
- [132] IRANI ZA, KERKHOVEN EJ, SHOJAOSADATI SA, et al. Genome-scale metabolic model of *Pichia pastoris* with native and humanized glycosylation of recombinant proteins[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113: 961-969.
- [133] TOMÀS-GAMISANS M, FERRER P, ALBIOL J. Integration and validation of the genome-scale metabolic models of *Pichia pastoris*: a comprehensive update of protein glycosylation pathways, lipid and energy metabolism[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0148031.
- [134] YE R, HUANG M, LU H, et al. Comprehensive reconstruction and evaluation of *Pichia pastoris* genome-scale metabolic model that accounts for 1243 ORFs[J]. *Bioresour Bioprocess*, 2017, 4: 22.
- [135] TOMÀS-GAMISANS M, FERRER P, ALBIOL J. Fine-tuning the *P. pastoris* iMT1026 genome-scale metabolic model for improved prediction of growth on methanol or glycerol as sole carbon sources[J]. *Microb Biotechnol*, 2018, 11: 224-237.
- [136] SUBASH CHANDRA BOSE K, SHAH M I, KRISHNA J, et al. Genome-scale metabolic model analysis of *Pichia pastoris* for enhancing the production of S-adenosyl-L-methionine[J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2023, 46(10): 1471-1482.
- [137] DONG L, SONG W, LI Z, et al. Mechanistic insights into sodium citrate-induced metabolic rewiring for enhanced S-adenosylmethionine synthesis via transcriptomics and constraint-based modeling[J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2026, 49(1): 119-136.
- [138] SUTHERS PF, DINH HV, FATMA Z, et al. Genome-scale metabolic reconstruction of the non-model yeast *Issatchenkia orientalis* SD108 and its application to organic acids production [J]. *Metab Eng Commun*, 2020, 11: e00148.
- [139] MARCISAUSKAS S, JI B, NIELSEN J. Reconstruction and analysis of a *Kluyveromyces marxianus* genome-scale metabolic model[J]. *BMC Bioinf*, 2019, 20(1): 551.
- [140] DIAS O, PEREIRA R, GOMBERT AK, et al. iOD907, the first genome-scale metabolic model for the milk yeast *Kluyveromyces lactis*[J]. *Biotechnol J*, 2014, 9: 776-790.
- [141] LIEBAL UW, FABRY BA, RAVIKRISHNAN A, et al. Genome-scale model reconstruction of the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*[J]. *BMC Biotechnol*, 2021, 21: 23.
- [142] ZORRILLA F, KERKHOVEN EJ. Reconstruction of Genome-Scale Metabolic Model for *Hansenula polymorpha* Using RAVEN[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2513: 271-290.
- [143] BALAGURUNATHAN B, JONNALAGADDA S, TAN L, et al. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model for *Scheffersomyces stipitis*[J]. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 27.
- [144] HILLIARD M, DAMIANI A, HE QP, et al. Elucidating redox balance shift in *Scheffersomyces stipitis*' fermentative metabolism using a modified genome-scale metabolic model [J]. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 140.
- [145] TIUKOVA I A, PRIGENT S, NIELSEN J, et al. Genome-scale model of *Rhodotorula toruloides* metabolism[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(12): 3396-3408.
- [146] DINH HV, SUTHERS PF, CHAN SHJ, et al. A comprehensive genome-scale model for *Rhodospiridium toruloides* IFO0880 accounting for functional genomics and phenotypic data[J]. *Metab Eng Commun*, 2019, 9: e00101.
- [147] REKËNA A, PINHEIRO M J, BONTURI N, et al. Genome-scale metabolic modeling reveals metabolic trade-offs associated with lipid production in *Rhodotorula toruloides*[J].

- PLoS Comput Biol, 2023, 19(4): e1011009.
- [148] KIM J, CORADETTI ST, KIM YM, et al. Multi-omics driven metabolic network reconstruction and analysis of lignocellulosic carbon utilization in *Rhodospiridium toruloides* [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021 8: 612832.
- [149] PHAM N, REIJNDERS M, SUAREZ-DIEZ M, et al. Genome-scale metabolic modeling underscores the potential of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* ATCC 20509 as a cell factory for biofuel production[J]. Biotechnol Biofuels, 2021, 14: 2.
- [150] NANDA P, PATRA P, DAS M, et al. Reconstruction and analysis of genome-scale metabolic model of weak Crabtree positive yeast *Lachancea kluyveri*[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 16314.
- [151] CZAJKA J J, HAN Y, KIM J, et al. Genome-scale model development and genomic sequencing of the oleaginous clade *Lipomyces*[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2024, 12: 1356551.
- [152] SHAHREEN N, OSINUGA A, MALLA S, et al. Multi-omics integration in genome-scale metabolic models: a review of constraint-based approaches[J]. Mol Omics, 2026, 22(2).
- [153] CUI Z, ZHONG Y, SUN Z, et al. Reconfiguration of the reductive TCA cycle enables high-level succinic acid production by *Yarrowia lipolytica*[J]. Nat Commun, 2023, 14 (1): 8480.
- [154] SUN T, SUN M L, LIN L, et al. Combining multiplex metabolic engineering with adaptive evolution strategies for high-level succinic acid production in *Yarrowia lipolytica*[J]. Synth Syst Biotechnol, 2026, 11: 48-58.
- [155] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. Nature, 2021, 596(7873): 583-589.
- [156] HONGZHONG LU, LUCHI XIAO, WENBIN LIAO, et al. Cell factory design with advanced metabolic modelling empowered by artificial intelligence[J]. Metab Eng, 2024, 85: 61-72.
- [157] WATCHARAWIPAS A, RUNGUPHAN W, KHAMWACHIRAPITHAK P, et al. Integrating yeast biodiversity and machine learning for predictive metabolic engineering[J]. FEMS Yeast Res, 2025, 25: foaf072.
- [158] MARTINEZ J P O, SPEIGHT R E. High-throughput yeast engineering in biofoundries: towards autonomous and scalable synthetic biology[J]. FEMS Yeast Res, 2026, 26.



通讯作者: 段守富(1989-),男,研究员,博士生导师,研究方向:1. 酵母菌多样性利用与抗逆功能元件挖掘;2. 酵母菌基因组与表观基因组协同进化机制;3. 非粮新型酵母底盘构建。
E-mail: duansf@im.ac.cn



第一作者: 刘夏(1997-),女,博士研究生,研究方向:非常规酵母的遗传操作体系构建。
E-mail: liuxia26@mails.ucas.ac.cn

作者贡献声明:

刘夏:文献调研与整理,提出基本框架,相关图表绘制,论文撰写与修订;黄璐:文献调研与整理,提出框架;王钦宏:参与论文修订;段守富:参与论文框架提出,文献调研,图表绘制,撰写论文及修订论文;所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

利益冲突:

作者王钦宏是本刊编委,在同行评议过程中未进行影响公平性的行为。其他作者没有利益冲突。