

生物工程

重组解脂亚罗酵母合成菜油甾醇

谭思远¹,董桂茹¹,苏安平¹,牛永洁²,孟永宏¹

(1. 陕西师范大学 食品工程与营养科学学院,西安 710119; 2. 陕西海斯夫生物工程有限公司,陕西 杨凌 712100)

摘要:菜油甾醇是一种具有重要生理活性的植物甾醇。为构建合成菜油甾醇的工程菌株,通过敲除解脂亚罗酵母 *polf* 菌株中麦角固醇合成基因 *ERG5*,促进麦角-5,7,24-三烯醇的体内积累,进而表达经密码子优化的非洲爪蟾 *DHCR7* 基因,使麦角-5,7,24-三烯醇在 *DHCR7* 和 *polf* 胞内 *ERG4* 的共同催化作用下,转化成菜油甾醇,最后利用 GC-MS 对重组菌株的发酵产物进行检测分析。结果表明,重组菌株 *polf-ERG5⁻-DHCR7⁺* (PED) 合成菜油甾醇的产量达 0.485 mg/g (以细胞干重计)。重组解脂亚罗酵母合成菜油甾醇菌株的成功构建,为生物合成法合成植物甾醇提供了新思路。

关键词:植物甾醇;菜油甾醇;麦角固醇;解脂亚罗酵母

中图分类号:Q81;TQ929

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)08-0109-06

Synthesis of campesterol by recombinant *Yarrowia lipolytica*

TAN Siyuan¹, DONG Guiru¹, SU Anping¹, NIU Yongjie², MENG Yonghong¹

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China;

2. Shaanxi Healthful Bioengineering Co., Ltd., Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: Campesterol as one of the phytosterols has important physiological activity. In order to construct engineered strain which could synthesize campesterol, the ergosterol synthesis gene *ERG5* was disrupted in *Yarrowia lipolytica* *polf*, promoting the accumulation of precursor product ergosta-5,7,24-trienol. Then the codon-optimized *DHCR7* gene from *Xenopus laevis* was expressed. Under the coefficient of *DHCR7* and endogenous *ERG4* in *polf*, the ergosta-5,7,24-trienol was transformed into campesterol. The fermentation products of the recombinant strain were analyzed by GC-MS. The results showed that engineered strain which could produce campesterol was obtained, and the maximum yield was 0.485 mg/g (based on dry cell weight). Thus, an engineered strain that could biosynthesize campesterol was successfully constructed, which provided a new way for the biosynthesis of phytosterols.

Key words: phytosterol; campesterol; ergosterol; *Yarrowia lipolytica*

植物甾醇是一种重要的固醇类化合物^[1],具有降低血液中的胆固醇浓度^[2-4]、预防前列腺疾病^[5]、抗癌以及类激素作用^[6-8]。常见的植物甾醇有菜油甾醇、菜籽甾醇、豆甾醇和 β -谷甾醇。其中菜油甾

醇是多种药物的前体,例如:黄体酮和孕烯醇酮^[9-10]。目前,植物甾醇主要从植物油中提取,但只能得到植物甾醇的混合物,且难以进一步分离^[11]。

相较于从植物中获得,利用微生物合成植物甾醇具有微生物生长周期短,生长繁殖不受季节、气候等条件影响的优点,有极大的前景。解脂亚罗酵母(*Yarrowia lipolytica*)是一种典型的产油真菌,经美国食药局认证为 GRAS (Generally Recognized as Safe),其遗传操作方法成熟且细胞内能积累大量的脂质^[12-13]。Mličková^[14]、Holzschu^[15]等的研究表明,细胞内油脂的积累能为低极性化合物的存储提供空

收稿日期:2018-01-11;修回日期:2018-06-07

基金项目:陕西省 2016 年科技统筹创新工程计划项目 (2016KTCQ01-95)

作者简介:谭思远(1993),男,硕士研究生,研究方向为食品生物工程(E-mail)469789413@qq.com。

通信作者:孟永宏,副教授,硕士生导师(E-mail)mengyonghong@snnu.edu.cn。

间,是很多疏水类化合物潜在的宿主。解脂亚罗酵母可以合成麦角固醇,其是真菌细胞膜中的重要组成成分。1993年,麦角固醇的结构被确定,并发现其与菜油甾醇的结构存在高度的相似性^[16],因此改造解脂亚罗酵母中麦角固醇的合成途径合成菜油甾醇将具有很大的潜力。

菜油甾醇分子结构中22位和B环上的7位比麦角固醇少两个双键。在解脂亚罗酵母中,外界碳源经糖酵解途径和甲羟戊酸途径(MVA)生成法尼基焦磷酸(FPP),FPP经过ERG9、ERG1、ERG5、ERG4等13个酶的催化作用合成麦角固醇^[16-17]。

在此过程中,麦角甾-5,7,24-三烯醇在ERG5基因编码的C-22去饱和酶和ERG4基因编码的C-24固醇还原酶作用下合成麦角固醇。Duport等^[18]的研究表明,7-脱氢胆固醇还原酶(DHCR7)能将甾醇B环7号碳原子上的双键还原。因此,敲除ERG5基因,保证植物甾醇22位上的碳键不被氧化,然后在外源的DHCR7基因和解脂亚罗酵母内ERG4基因的共同作用下,同时还原7和24位上的双键,即改造解脂亚罗酵母中麦角固醇合成途径使其合成菜油甾醇,技术路线见图1。

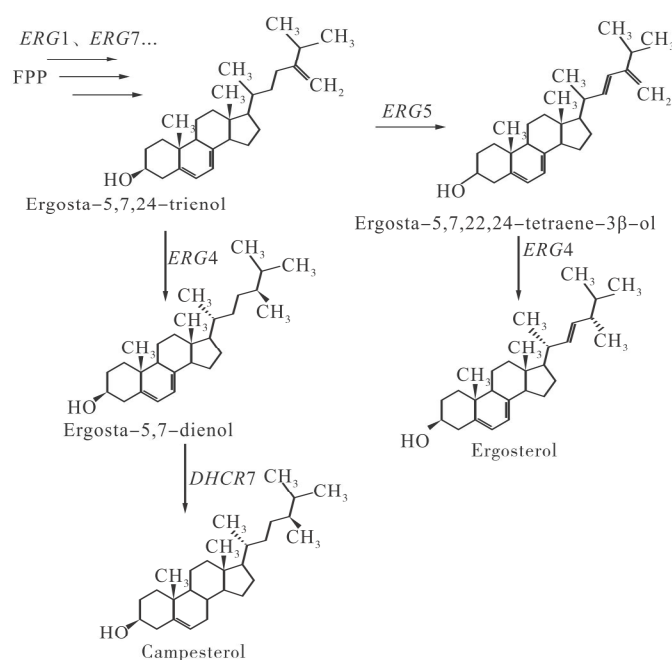


图1 改造解脂亚罗酵母中麦角固醇合成途径合成菜油甾醇的技术路线

本文以产油的解脂亚罗酵母(*Y. lipolytica* polf)菌株为基础,敲除ERG5基因,表达经密码子优化的非洲爪蟾DHCR7基因^[19],构建了一株能产菜油甾醇的解脂亚罗酵母菌株polf-ERG5⁻-DHCR7⁺(PED),为利用生物合成法合成单一的植物甾醇化合物奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(DH5 α)购自上海生工,解脂亚罗酵母菌株polf;质粒pLoxp-ura-loxp、质粒pJN44-CRE、质粒pJN44均由本实验室保存。

1.1.2 试剂

所有常规的生化试剂均购自生工生物工程有限公司;标准品胆甾烷醇购自Sigma公司;酵母转化试

剂盒购自美国Zymo公司;质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒、PCR清洁试剂盒均购自AxyGen公司;限制性内切酶类均购自Thermo公司。

1.1.3 培养基

LB培养基:蛋白胨10 g/L,酵母粉5 g/L,氯化钠10 g/L,需要时添加1.7%的琼脂粉、氨苄青霉素100 μ g/mL。

YPD培养基:葡萄糖20 g/L,酵母粉10 g/L,蛋白胨20 g/L,需要时添加1.7%的琼脂粉。

SD-Ura培养基:葡萄糖20 g/L,YNB(Yeast nitrogen base, without amino acids & ammonium sulfate)1.7 g/L,(NH₄)₂SO₄ 5 g/L,Drop-out mix synthetic minus uracil w/o yeast nitrogen base 2 g/L,需要时添加2.5%的琼脂粉。

SD-Leu培养基:葡萄糖20 g/L,YNB 1.7 g/L,

(NH₄)₂SO₄ 5 g/L, Drop-out mix synthetic minus leucil w/o yeast nitrogen base 2 g/L, 需要时添加 2.5% 的琼脂粉。

发酵培养基: 葡萄糖 80 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3.25 g/L, Uracil 20 mg/L, YNB 1.7 g/L, KH₂PO₄ 2.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L。

1.1.4 仪器与设备

梯度 PCR 仪 (Applied Biosystems); 755B 紫外分光光度计; 凝胶成像仪; 电泳设备; 恒温金属浴 (IKA 公司); 台式高速冷冻离心机 (Sigma 公司); QP-2010 Ultra 气相色谱-质谱联用仪 (日本岛津)。

1.2 实验方法

1.2.1 敲除质粒及表达质粒的构建

敲除质粒 pERG5-up-Loxp-ura-Loxp-down 的构建参考 Fickers 等方法^[20]。以 *Y. lipolytica* polf 基因组为模板扩增得到 ERG5 基因 (YALI0A18062g) 的上游片段 700 bp (引物 ERG5-UP-F/R) 和下游片段 670 bp (引物 ERG5-DOWN-F/R)。将得到的上下游片段分别连接到质粒 pLoxp-ura-loxp 的 URA3 两端, 将构建的质粒转化到 DH5 α 中并挑选单菌落克隆, 酶切验证。

表达质粒 pJN44-DHCR7, 以质粒 pJN44 为载体, 密码子优化的 DHCR7 (NCBI-Gene ID: 379273) 基因经南京金丝瑞合成, 酶切、连接转化到 DH5 α 中并挑选单菌落克隆, 酶切验证。实验中使用引物序列见表 1。

表 1 实验中使用的引物序列

引物	引物序列(5'-3')
ERG5-UP-F	CTGACGGCCCGAGCAAATAGCGAGTAGATTG
ERG5-UP-R	TGCAGTCTAGAGGTGGCGGAGTTGTGTT
ERG5-DOWN-F	ATCTAACTACTGGTATATAGGTTTGTAATG
ERG5-DOWN-R	ACTTACATATGGATTGGAAAGATGCTCTTTA
ERG5-TEST-F	CGAAATAGGAAAACCCAAGA
ERG5-TEST-R	CAGAGAAAGCTATACGCTCAC
URA3-F	TCCTGGAGGCAGAAGAACTT
URA3-R	AGCCCTTCTGACTCACGTAT

注: 引物中所加酶切位点的序列用下划线标示。

1.2.2 polf-ERG5⁻菌株及 polf-ERG5⁻-DHCR7⁺菌株的构建

(1) 基因敲除菌株的筛选: 构建好的敲除质粒 pERG5-up-Loxp-ura-Loxp-down 用 NdeI 酶线性化后转入 *Y. lipolytica* polf (Ura⁻, Leu⁻), 涂布于营养缺陷型的培养基 SD-Ura 上。挑选单菌落接种到 2 mL 的 YPD 培养基中, 24 h 后提取 DNA 使用引物 ERG5-TEST-F/URA3-R 和 URA3-F/ERG5-TEST-R 分别对双交换的上下游片段进行 PCR 验证。

(2) URA3 marker 的去除: 将 pJN44-CRE 转入成功验证 ERG5 基因敲除的菌株中, 涂布于营养缺陷型的培养基 SD-Leu 上, 待转化子中 CRE 基因表达之后, 在 SD-Ura、SD-Leu 的平板上筛选, 并进行 PCR 扩增验证 (CRE 蛋白能识别染色体上的 Loxp 位点并定向切割重组, 去掉染色体上的 URA3 基因片段), 验证正确的菌株命名为 *Y. lipolytica* polf-ERG5⁻。

(3) 表达质粒 pJN44-DHCR7 转入敲除了 ERG5 的菌株 YL-PE 中得到菌株 polf-ERG5⁻-DHCR7⁺。

1.2.3 生长曲线的测定

将待发酵菌种在相应的固体培养基上活化, 挑取单菌落接种于试管中, 于 30℃、180 r/min 在摇床中培养 24 h, 以 2% 的接种量接种至摇瓶中, 于 30℃、180 r/min 在摇床中培养 6 d。在不同发酵时间点取样, 用紫外分光光度计在 600 nm 处测定发酵液的吸光度, 吸光度超过 0.8 时选择合适的稀释倍数稀释。

1.2.4 细胞干重的测定

取 50 mL 发酵液, 4 000 × g 离心 10 min 后弃去上清, 并用去离子水清洗两次后收集菌体沉淀, 在 105℃ 烘干至恒重, 计算每毫升发酵液的细胞干重, 以 mg/mL 表示, 然后绘制细胞干重与 OD₆₀₀ 之间的标准曲线。

1.2.5 菌体甾醇提取及分析

取 2 mL 发酵液于厌氧管 (16 mm × 125 mm) 中, 加入胆甾醇标准品 100 μL (4 mg/mL 的储备液稀释 100 倍), 3 mol/L 的氢氧化钾甲醇溶液 2.5 mL, 于 90℃ 皂化, 每 20 min 取出厌氧管振荡数秒, 100 min 后取出冷却试管。加入 2 mL 蒸馏水, 2 mL 正己烷, 在旋涡振荡器上振荡试管 5 min, 待反应液

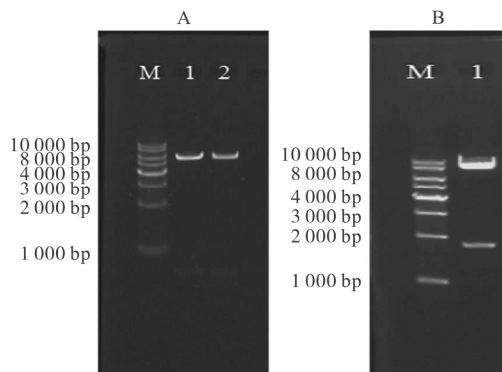
分层,取含样品的正己烷层于衍生化瓶中,加入 100 μL 的衍生化试剂(99 μL BSTFA + 1 μL TMCS),在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 60 min,冷却后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待气质分析。

GC 条件:Rtx-5MS 色谱柱(30 m \times 0.25 μm \times 0.25 μm);进样口温度 290 $^{\circ}\text{C}$;柱箱初始温度 100 $^{\circ}\text{C}$;分流比 10:1;进样量 1 μL ;载气为高纯氮气,流量 1.2 mL/min;程序升温初始温度为 100 $^{\circ}\text{C}$,以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升至 280 $^{\circ}\text{C}$ 保持 15 min。MS 条件:离子源为 EI 源;电离能 70 eV,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$;接口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。数据采集方式为 SIM 模式,其中胆甾烷醇、麦角固醇和菜油甾醇的特征离子分别选择 m/z 75、 m/z 337、 m/z 129。

2 结果与分析

2.1 敲除质粒、表达质粒的验证

本实验分别连接了 *Y. lipolytica* *polF* 中 *ERG5* 基因的上游片段 700 bp、下游片段 670 bp 到质粒 pLoxp-ura-loxp(5 088 bp)上,上下游片段分别使用 *ApaI*/*XbaI*、*SpeI*/*NdeI* 进行酶切验证,分别可以得到 702 bp/5 680 bp 和 677 bp/5 705 bp 的片段,结果如图 2A 所示。由图 2A 可知,成功构建了敲除质粒。表达质粒 pJN44-DHCR7 使用 *HindIII*/*SalI* 进行酶切验证,分别可以得到 1 723 bp 和 7 508 bp 的片段,结果如图 2B 所示。由图 2B 可知,成功构建了表达质粒。



注:M 代表 marker,下同;A 中 1 代表用 *ApaI* 和 *XbaI* 酶切对 *ERG5* 上游片段的验证,2 代表用 *SpeI* 和 *NdeI* 酶切对 *ERG5* 下游片段的验证;B 中 1 代表用 *HindIII* 和 *SalI* 酶切对表达质粒中基因 *DHCR7* 片段大小的验证。

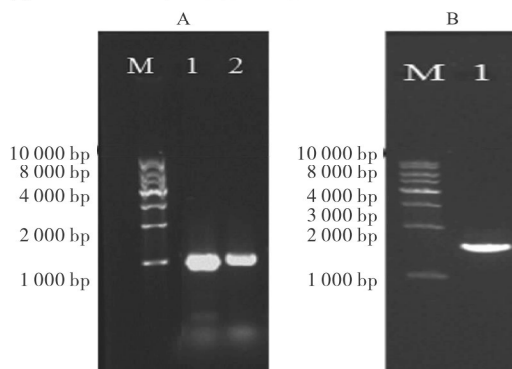
图 2 敲除质粒 pERG5 (A) 和表达质粒 pJN44-DHCR7 (B) 酶切验证图

2.2 *ERG5*⁻ 菌株的筛选及 PCR 验证

参照方法 1.2.2,将线性化后的敲除质粒转入 *polF*(*Ura*⁻、*Leu*⁻) 菌株,利用基因同源重组,用带有 *Loxp* 的 *URA3* 基因替换掉 *ERG5* 基因。对于敲除 *ERG5* 的菌株进行 PCR 验证,通过引物 *ERG5*-TEST-F 和 *URA3*-R PCR、*ERG5*-TEST-R 和

URA3-F PCR 扩增分别可以得到 990、994 bp 的片段,PCR 验证结果如图 3A 所示。由图 3A 可知,目标基因 *ERG5* 被成功替换。

参照方法 1.2.2,将 JN44-CRE 质粒,转入经验证的阳性克隆 *polF*-*ERG5*⁻ 中,表达 *CRE* 就可以去掉 marker *URA3*。去掉 marker 的菌株通过引物 *ERG5*-TEST-F 和 *ERG5*-TEST-R PCR 扩增可以得到 1 508 bp 的片段,如图 3B 所示。由图 3B 可知,*polF*-*ERG5*⁻ 菌株构建成功。



注:A 中 1 代表使用引物 *ERG5*-TEST-F/*URA3*-R 对 *ERG5* 上游片段的验证,2 代表使用引物 *ERG5*-TEST-R/*URA3*-F 对 *ERG5* 下游片段的验证;B 中 1 代表使用引物 *ERG5*-TEST-F/*ERG5*-TEST-R 对 *URA3* 标记去除的验证。

图 3 *ERG5* 敲除菌株筛选 (A) 和 *URA3* 标记去除 (B) PCR 验证图

2.3 基因敲除菌株 *polF*-*ERG5*⁻ 生长特性分析

基因敲除破坏了酵母细胞内的代谢平衡,对细胞的生长有一定的影响,为了考察构建的菌株的生长情况,对 *polF* 和 *polF*-*ERG5*⁻ 生长曲线分别进行测定,结果如图 4 所示。

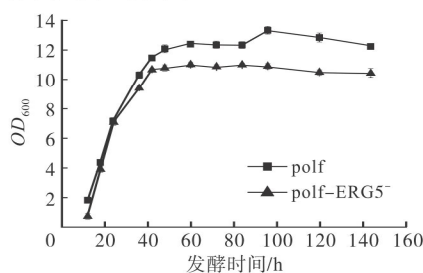


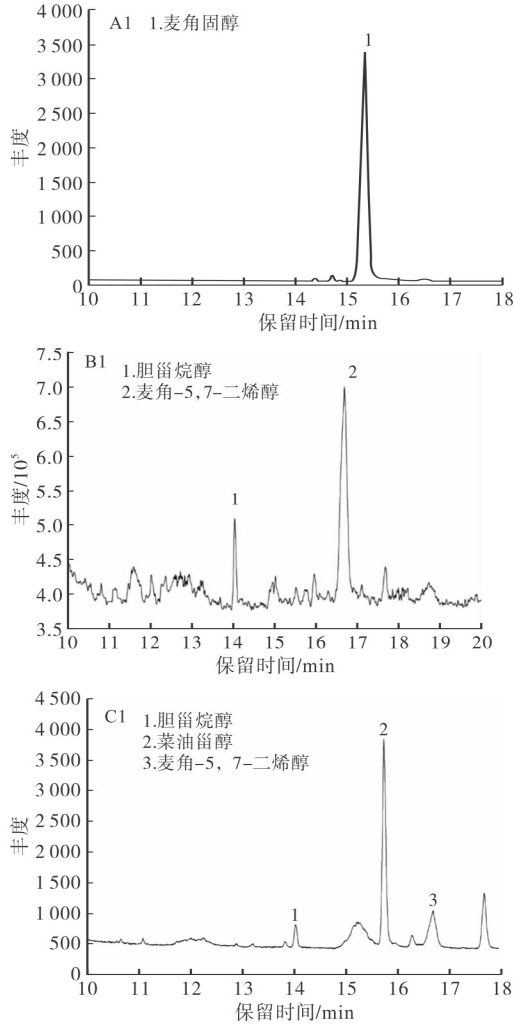
图 4 *ERG5* 敲除菌株生长特性分析

由图 4 可知,*polF* 菌株达到稳定期的 OD_{600} 最大为 13.29,*polF*-*ERG5*⁻ 在稳定期的 OD_{600} 最大为 10.95。说明 *ERG5* 基因的敲除对菌株的生长产生了一定的抑制作用,酵母的生长能力减弱,但是并没有产生致死效应。因为在酵母体内麦角固醇合成的过程中,破坏其合成前期基因 *ERG9*、*ERG1*、*ERG7* 等 8 个必需基因会对酵母产生致死效应,破坏合成后

期的其他非必需基因 (*ERG6*、*ERG2*、*ERG3*、*ERG5* 等) 不会影响细胞的正常生长^[13]。

2.4 重组菌株的产物确认及产量分析

分别将 *polF*、*polF* - *ERG5*⁻、*polF* - *ERG5*⁻ -



注:A1. *Y. lipolytica polF* 发酵产物麦角固醇在特征离子 m/z 337 下的质量色谱图 (MC); A2. *Y. lipolytica polF* 发酵产物麦角固醇的质谱图 (MS); B1. 对照质粒 pJN44 转入 *polF* - *ERG5*⁻ 中发酵产物麦角-5,7-二烯醇的总离子流图; B2. 对照质粒 pJN44 转入 *polF* - *ERG5*⁻ 中发酵产物麦角-5,7-二烯醇的 MS 图; C1. *Y. lipolytica polF* - *ERG5*⁻ - *DHCR7*⁺ (PED) 发酵产物菜油甾醇在特征离子 m/z 129 下的 MC 图; C2. *Y. lipolytica polF* - *ERG5*⁻ - *DHCR7*⁺ (PED) 发酵产物菜油甾醇的 MS 图。

图5 重组菌株发酵产物鉴定

由图5可知, *polF* 能合成麦角固醇, 在 15.370 min 处有麦角固醇特征离子 m/z 337 下的 MC 峰, PED 的发酵产物有菜油甾醇, 在 15.761 min 处有菜油甾醇特征离子 m/z 129 下的 MC 峰, *polF* - *ERG5*⁻ 的发酵产物既没有麦角固醇也没有菜油甾醇, 但在 16.680 min 处有前体物质麦角-5,7-二烯醇的色谱峰。经验证, 麦角固醇和菜油甾醇保留时间与其标准品的保留时间一致, 且两者的质谱图与对应的标准质谱图基本一致。由此, 可以断定重组菌株 PED 可以合成菜油甾醇。

DHCR7⁺ (PED) 在发酵培养基中摇瓶发酵并取样, 以 1.2.5 中方法对样品进行处理进行 GC-MS 分析。重组菌株发酵产物鉴定结果见图5。

将 PED 菌株摇瓶发酵培养 6 d, 测定菜油甾醇产量的变化, 结果见图6。

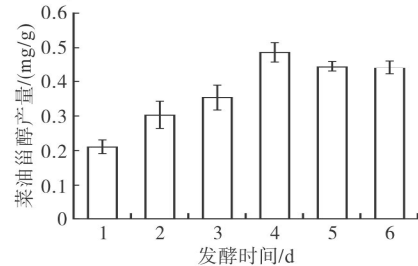


图6 重组菌株 PED 在摇瓶发酵下菜油甾醇产量变化情况

由图6可知,在发酵培养基下,发酵初期菜油甾醇的产量随发酵时间的延长而增大,发酵到4 d时菜油甾醇的产量达到最大,为0.485 mg/g(以细胞干重计),之后菜油甾醇产量不再升高。

3 结论

本研究在 *polf* 菌株中通过 *ERG5* 基因敲除和 *DHCR7* 基因表达,构建了一株可以产菜油甾醇的解脂亚罗酵母菌株,菜油甾醇的最大产量为0.485 mg/g(以细胞干重计),该结果为用生物合成法合成植物甾醇提供了新思路,有望解决植物提取法难以得到单一甾醇的难题。

参考文献:

- [1] 鲁海龙, 史宣明, 张旋, 等. 植物甾醇制取及应用研究进展[J]. 中国油脂, 2017, 42(10):134-137.
- [2] DEMONTY I, RAS R T, HC V D K, et al. Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake[J]. J Nutr, 2009, 139(2):271-284.
- [3] KATAN M B, GRUNDY S M, JONES P, et al. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels[J]. Mayo Clinic Proc, 2003, 78(8):965-978.
- [4] RAS R T, GELEIJNSE J M, TRAUTWEIN E A. LDL-cholesterol-lowering effect of plant sterols and stanols across different dose ranges: a meta-analysis of randomised controlled studies[J]. Brit J Nutr, 2014, 112(2):214-219.
- [5] 程丽艳, 屠凌岚, 史红. 植物甾醇对慢性非细菌性前列腺炎的干预作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(12):1348-1353.
- [6] SHAHZAD N, KHAN W, MD S, et al. Phytosterols as a natural anticancer agent: current status and future perspective[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88:786-794.
- [7] AWAISHEH S S, KHALIFEH M S, AL-RUWAILI M A, et al. Effect of supplementation of probiotics and phytosterols alone or in combination on serum and hepatic lipid profiles and thyroid hormones of hypercholesterolemic rats[J]. J Dairy Sci, 2013, 96(1):9-15.
- [8] NIEMINEN P, PÖLÖNEN I, MUSTONEN A M. Increased reproductive success in the white American mink (*Neovison vison*) with chronic dietary β -sitosterol supplement[J]. Anim Reprod Sci, 2010, 119(3/4):287-292.
- [9] NARUSE R, HORI K I, TERASAWA T, et al. Alterations of plant sterols, lathosterol, oxidative stress and inflammatory markers after the combination therapy of ezetimibe and statin drugs in type 2 diabetic patients[J]. Obes Res Clin Pract, 2014, 9(1):67-74.
- [10] WU A H B, RUAN W, TODD J, et al. Biological variation of β -sitosterol, campesterol, and lathosterol as cholesterol absorption and synthesis biomarkers[J]. Clin Chim Acta, 2014, 430:43-47.
- [11] 万建春, 姜波. 结晶法分离纯化大豆甾醇中 β -谷甾醇和豆甾醇单体[J]. 食品科技, 2008, 33(8):127-131.
- [12] BEOPOULOS A, CESCUT J, HADDOUCHE R, et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production[J]. Prog Lipid Res, 2009, 48(6):375-387.
- [13] BEOPOULOS A, MROZOVA Z, THEVENIEAU F, et al. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(24):7779-7789.
- [14] MLIČKOVÁ K, ROUX E, ATHENSTAEDT K, et al. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme a oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(7):3918-3924.
- [15] HOLZSCHU D L, CHANDLER F W, AJELLO L, et al. Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity[J]. Sabouraudia, 1979, 17(1):71-78.
- [16] 林晓珊, 江宏文, 张毅. 酵母麦角固醇生物合成及其基因调控的研究[J]. 生物学杂志, 2010, 27(6):83-86.
- [17] VEEN M, LANG C. Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways[J]. Biochem Soc Trans, 2005, 33(5):1178-1181.
- [18] DUPOURT C, SPAGNOLI R, DEGRYSE E, et al. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(2):186-189.
- [19] DU H X, XIAO W H, WANG Y, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for campesterol overproduction[J]. Plos One, 2016, 11(1):e0146773.
- [20] FICKERS P, LE D M, GAILLARDIN C, et al. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. J Microbiol Meth, 2003, 55(3):727-737.