

代谢工程改造解脂耶氏酵母生产油脂研究进展

沈玉平^{1,2}, 陈诗洁¹, 周 迅¹, 张祖姣^{1,2}

(1. 湖南科技学院 化学与生物工程学院, 湖南 永州 425199; 2. 湖南科技学院 银杏工程研究中心, 湖南 永州 425199)

摘要:微生物油脂是可再生能源发展的重要方向,近年来通过合成生物学方法和代谢工程技术改造,解脂耶氏酵母的产油水平提高迅速,展现了良好的应用发展前景。从代谢途径关键酶调控、负反馈调节解除、代谢途径关键酶异源表达、乙酰辅酶A和NADPH替代途径构建、强化氧化应激保护、促进脂肪酸分泌、适应性进化和计算机辅助模拟8个方面,梳理总结了代谢工程改造解脂耶氏酵母生产油脂的最新研究进展。通过对现有研究分析发现,廉价底物中的毒性成分影响细胞生长和油脂合成,以及油脂调控网络机制的不完全明晰,是限制解脂耶氏酵母油脂产量提升的主要障碍。为此,可通过设计引入解毒途径,添加解毒剂,或筛选毒性化合物耐受菌,以及利用多组学技术和计算机辅助优化进一步解析代谢调控机制解决此问题。此外,在“双碳”背景下,可在解脂耶氏酵母中引入高效的人造光合作用或碳固定途径,利用二氧化碳生产油脂。

关键词:解脂耶氏酵母;微生物油脂;代谢工程;合成生物学

中图分类号:Q939.97;TQ644 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)10-0103-11

Advances in biosynthesis of microbial oils in metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*

SHEN Yuping^{1,2}, CHEN Shijie¹, ZHOU Xun¹, ZHANG Zujiao^{1,2}

(1. College of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, Hunan, China; 2. Hunan Provincial Engineering Research Center for *Ginkgo Biloba*, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, Hunan, China)

Abstract: Microbial oils are an important direction for the development of renewable energy. In recent years, the oils production of engineered *Yarrowia lipolytica* has been rapidly improved through synthetic biology methods and metabolic engineering technology, showing an attractive application prospect. The latest research advances in oils production by *Y. lipolytica* modified by metabolic engineering were summarized as the follow eight aspects: regulation of key enzymes of metabolic pathways, relief of negative feedback regulation, heterologous expression of key enzymes of metabolic pathways, construction of acetyl-CoA and NADPH alternative pathways, protection against oxidative stress, enhancement of fatty acid secretion, adaptive evolution and computer-assisted simulation. The existing research showed that the toxic components in cheap substrates affecting cell growth and oil synthesis as well as the incomplete clarity of the mechanism of oils regulatory network was the bottleneck restricting the improvement of oils production in *Y. lipolytica*. Therefore, designing and introducing detoxification pathways, adding antidotes, or screening strain tolerant to toxic compound, as well as further elucidating metabolic regulatory mechanisms using multi-omics techniques and computer-assisted can address this issues. In addition, in a "double-carbon" background, efficient artificial photosynthesis or carbon fixation pathways can be introduced in *Y. lipolytica* to produce oils with carbon dioxide.

Key words: *Yarrowia lipolytica*; microbial oil; metabolic engineering; synthetic biology

收稿日期:2022-04-07;修回日期:2022-07-01

基金项目:湖南省自然科学基金项目(2020JJ5204);2020年湖南科技学院新工科研究与实践项目;湖南省教育厅科学研究项目(18C1068)

作者简介:沈玉平(1981),男,讲师,博士,研究方向为微生物代谢工程(E-mail)shenyup@mail3.sysu.edu.cn。

通信作者:张祖姣,讲师(E-mail)zhang_zujiao@126.com。

经济社会的高速发展伴随着能源的巨大消耗,以及随之产生的温室效应和环境污染。环境污染、能源安全以及化石能源的日益枯竭,使可再生能源的发展受到了广泛的关注。生物柴油能量密度高、燃烧充分,是良好的化石能源替代品。而微生物油脂是制备生物柴油的理想原料,其生产过程绿色环保,不受土地、气候和生长周期的限制,是可再生能源发展的重要方向^[1]。

微生物油脂是产油微生物以碳水化合物、烃、脂肪酸或一般性油脂为底物合成的一类油脂。自然界中多种微生物,如微藻、酵母、细菌和霉菌等,都能合成油脂。但是,细菌油脂主要为类脂,且主要分布于细胞膜上,分离成本高,产业化意义不大^[2];微藻生长周期长,细胞密度低,易受光照和气候影响,可利用的碳源范围窄,因而其发展受到限制^[3];霉菌虽然油脂合成水平较高,但发酵耗氧量大、能耗高,生产成本低;而产油酵母菌体发酵密度高,油脂含量高,易于分离,同时可利用工业废弃物和农业副产物等廉价底物原料,是理想的微生物油脂细胞工厂^[4-5]。目前,已证实多种酵母可产油脂,如解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)^[6]、圆红冬酵母(*Rhodospiridium toruloides*)^[7]、皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)^[8]、斯达氏油脂酵母(*Lipomyces starkeyi*)^[9]、产油油脂酵母(*Lipomyces lipofer*)^[10]、头状丝孢酵母(*Trichosporon capitatum*)^[11]等。其中,解脂耶氏酵母是美国 FDA 认证的安全级微生物(Generally regarded as safe)^[12],其代谢途径清楚^[13-14]、遗传背景清晰^[15]、遗传操作工具成熟^[16-17],同时也是目前研究最广泛、改造最成功的产油酵母。此外,解脂耶氏酵母油脂成分与动植物油脂类似,可利用底物(包括糖类、烷烃、挥发性有机酸、粗甘油和糖蜜等工农业加工副产物)廉价广泛,是一种应用潜力巨大的产油酵母^[18-22]。

近年来,代谢工程和合成生物学发展迅速,科学家通过各种各样的代谢工程手段提高了解脂耶氏酵母的油脂合成水平。本文综述近年来代谢工程改造解脂耶氏酵母生产油脂的研究进展,对改造策略方法进行了归纳总结,同时对目前解脂耶氏酵母油脂生产的瓶颈及解决对策进行了探讨,并对未来发展进行了展望,以期后续相关研究提供借鉴和参考。

1 解脂耶氏酵母油脂代谢途径

1.1 油脂的合成代谢途径

解脂耶氏酵母胞内积累的油脂主要为甘油三酯(TAG),也有少量甾醇酯(SE),其中95%以上的油

脂以TAG的形式储存在脂质体中,在碳源缺乏时氧化分解,为细胞的生命活动提供能量^[23];此外,解脂耶氏酵母油脂还包括糖脂和磷脂等成分。在解脂耶氏酵母中有两种不同的油脂合成代谢途径,即从头合成途径和非从头合成途径。

1.1.1 从头合成

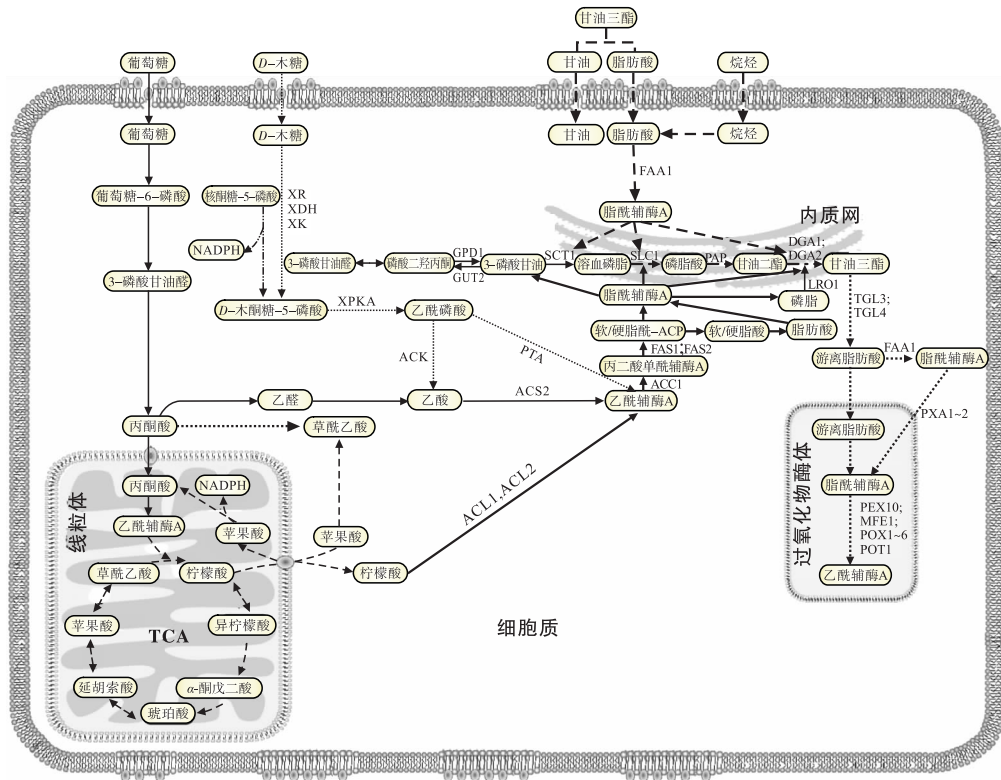
从头合成是指解脂耶氏酵母在氮源耗尽、碳源充足的情况下,将过量的碳源底物经过糖酵解途径(EMP)、磷酸戊糖途径(PPP)、脂肪酸合成途径和甘乃迪途径(Kennedy Pathway),最终生成TAG的过程,主要分为三大部分(见图1):第一部分是培养基中氮源耗尽,三羧酸循环受阻的情况下,糖酵解途径产生的丙酮酸在线粒体中经过ATP-柠檬酸裂解酶(ACL)、苹果酸脱氢酶(MHE)、苹果酸酶(ME)等催化,生成脂肪酸前体物乙酰辅酶A和还原型辅酶II(NADPH);第二部分是乙酰辅酶A经乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、脂肪酸合成酶复合体(FAS)作用,不断延长碳链,合成软脂酰-ACP或硬脂酰-ACP,随后转运至内质网,继续合成TAG,或进一步延长碳链后最终生成相应脂肪酸,或还原生成不饱和脂肪酸;第三部分是脂酰辅酶A和三磷酸甘油(G3P)经三磷酸甘油酰基转移酶(SCT1)、溶血磷脂酰基转移酶(SLC1)、磷脂酸磷酸酶(PAP)、二酰基甘油酰基转移酶(DGA1/DGA2)作用,最终生成TAG。

1.1.2 非从头合成

非从头合成是指解脂耶氏酵母将烷烃或油脂水解产物甘油、脂肪酸等吸收至胞内,经过不同的代谢途径生成TAG的过程。烷烃转运至细胞后,在内质网中经P450依赖性烷烃单加氧酶羟基化,随后生成相应的脂肪醇,并在长链醛氧化酶作用下氧化生成相应的脂肪酸。油脂水解产物和烷烃氧化生成的脂肪酸与辅酶A经脂酰辅酶A合成酶(FAA1)催化生成脂酰辅酶A,并进一步组装生成TAG(见图1)。

1.2 油脂的分解代谢途径

TAG一般储存于脂质体中,当环境中碳源缺乏时氧化分解释放能量以维持机体的正常代谢活动。首先,TAG在三酰甘油脂肪酶TGL3和TGL4作用下,水解生成甘油和游离脂肪酸。游离脂肪酸与辅酶A经FAA1催化生成脂酰辅酶A,并由转运蛋白PXA1和PXA2转运到过氧化物酶体中。此外,游离脂肪酸也可直接转运至过氧化物酶体中,经辅酶A/脂酰辅酶A连接酶催化生成脂酰辅酶A(图1)。脂酰辅酶A经过 β -氧化最终进入三羧酸循环彻底氧化成二氧化碳和水,释放能量和NADPH。



注:细点划线(---▶),糖酵解途径;细圆点虚线(.....▶),磷酸戊糖途径氧化阶段;细短划线(----▶),木糖代谢途径;细实线(——▶),三羧酸(TCA)循环及其中间物相关反应;粗实线(——▶),TAG 从头合成途径;粗短划线(---▶),TAG 非从头合成途径;粗圆点虚线(.....▶),甘乃迪途径;粗点划线(---▶),脂肪酸 β -氧化途径。XR. 木糖还原酶;XDH. 木糖醇脱氢酶;XK. 木酮糖激酶;XPKA. 磷酸酮醇酶;ACK. 乙酸激酶;PTA. 磷酸转乙酰酶;ACS. 乙酰辅酶 A 合成酶;ACL. ATP-柠檬酸裂解酶;GPD1. 3-磷酸甘油脱氢酶;GUT2. 3-磷酸甘油脱氢酶;FAA. 脂酰辅酶 A 合成酶;SCT. 3-磷酸甘油酰基转移酶;SLC. 溶血磷脂酰基转移酶;PAP. 磷脂酸磷酸酶;DGA. 二酰基甘油酰基转移酶;LRO1. 磷脂-二酰基甘油酰基转移酶;TGL. 三酰甘油脂肪酶;PXA. 过氧化物酶体脂肪酸转运蛋白;PEX. 过氧化物酶体生物合成因子;MFE. 多功能氧化酶;POX. 酰基辅酶 A 氧化酶;POT. 过氧化物酶体酰基硫解酶;FAS. 脂肪酸合成酶复合体;ACC. 乙酰辅酶 A 羧化酶

图 1 解脂耶氏酵母中油脂代谢途径(根据参考文献[24]整理)

2 提高解脂耶氏酵母油脂产量的代谢工程策略

近年来,得益于代谢工程技术和合成生物学的迅速发展,科学家采用了各种各样的方法和手段改造解脂耶氏酵母,提高了油脂产量,主要的改造策略大致可分为以下 8 类:①调控代谢途径中的关键基

因;②解除负反馈调节;③异源表达合成途径中的关键酶;④构建高效的乙酰辅酶 A 和 NADPH 替代途径;⑤强化氧化应激保护;⑥促进脂肪酸的分泌;⑦适应性进化;⑧计算机辅助模拟。表 1 列出了各类改造策略部分代表性实例。

表 1 代谢工程改造解脂耶氏酵母生产油脂代表性实例

菌株	底物	产物	发酵方式	遗传操作修饰	油脂含量/%	产量/(g/L)	生产速率/(g/(L·h))	产率/(g/g)	参考文献
AJD	甘油	TAG	摇瓶	TEF-DGA1-TKL1	23.94	1.42	-	-	[25]
Po1g	乙酸	TAG	摇瓶	SLC1	43.9	0.84	-	0.133	[26]
AJD	粗甘油	TAG	摇瓶	DGA1	21	-	-	0.07	[20]
Po1g	葡萄糖	TAG	摇瓶	pMT015-TEF-DGA2	55.65	2.39	-	0.145	[26]
Polh	葡萄糖	TAG	摇瓶	pINA1292sp-hp4d-MmACL	23.1	-	-	-	[27]
ACA-DC50109	葡萄糖	TAG	摇瓶	Δ MIG1	48.7	-	-	-	[28]
ATCC20362	葡萄糖	TAG	摇瓶	Δ SNF1	30	-	-	-	[29]

续表 1

菌株	底物	产物	发酵方式	遗传操作修饰	油脂含量/%	产量/(g/L)	生产速率/(g/(L·h))	产率/(g/g)	参考文献
NS18	葡萄糖	TAG	1 L 发酵罐分批补料发酵	<i>GPD1 - RtDGA1, CpDGA2, ΔTGL3</i>	73	84.5	0.73	0.20	[30]
Po1g	葡萄糖	TAG	2 L 发酵罐分批发酵	<i>TEFin - DGA1, hp4d - ACC1</i>	61.7	17.55	0.143	0.195	[31]
Po1g	醋酸 + 醋酸钠	TAG	2 L 发酵罐分批补料发酵	<i>ACC1, DGA1</i>	59.3	115	0.8	0.16	[32]
Po1d	葡萄糖 + 木糖	TAG	2 L 发酵罐分批补料发酵	<i>ΔPOX1 ~6, ΔTGLA, GPD1, DGA2, XDH, XR, XK, AnXPKA, AnACK</i>	67	16.5	0.185	0.344	[33]
Po1f	葡萄糖	TAG	3 L 发酵罐分批发酵	<i>ΔPEX10, ΔMFE1, TEF - DGA1</i>	71	25.3	-	0.21	[34]
Po1g	葡萄糖	TAG	3 L 发酵罐分批发酵	<i>TEFin - DGA1, TEFin - ACC1, TEFin - SCD</i>	67	55	0.707	0.234	[35]
Po1g	葡萄糖	TAG	3 L 发酵罐分批补料发酵	<i>ScZWF, ylSOD1, ylGSR, ylGPO, EcAldH</i>	81.4	72.7	0.97	0.252	[36]
Po1g	葡萄糖	脂肪酸甲酯	3 L 发酵罐分批补料发酵	<i>ACC1, DGA1, McMCE2, CaGapC</i>	66.8	98.9	1.2	0.269	[4]
Po1f	葡萄糖	TAG	3 L 发酵罐分批补料发酵	<i>PEX10, DGA2, ΔMGA2</i>	-	25.0	0.145	0.213	[37]
Po1g	葡萄糖	TAG	3 L 发酵罐分批补料发酵	<i>DGA1, ACC1, perCAT2, AnPK, BsPta</i>	-	66.4	0.565	0.229	[38]
Po1f	葡萄糖	TAG	3 L 发酵罐分批发酵	<i>PEX10, MFE1, DGA1, EMS Mutagenesis and adaptive evolution</i>	86.9	38.9	0.509	0.243	[39]
W29	蔗糖	TAG	5 L 发酵罐分批发酵	<i>ΔTGLA, ΔPOX1 ~6, DGA2, GPD1, HXK1, ScSUC2</i>	26.2	9.15	-	0.063	[40]
W29	葡萄糖	TAG	5 L 发酵罐分批补料发酵	<i>GPD1, DGA2, ΔPOX1 ~6, ΔTGLA</i>	55	-	-	0.14	[41]
Po1d	甘露糖	TAG	5 L 发酵罐分批发酵	<i>GAL1, GAL7, GAL10E, GAL10M</i>	16.6	3.22	-	0.056	[42]
W29	菊粉	TAG	5 L 发酵罐分批补料发酵	<i>ΔPOX1 ~6, ΔTGLA, DGA2, GPD1, HXK1, GAL1, GAL7, GAL10E, GAL10M, ScSUC2, KmINU1</i>	43.0	23.82	0.158	0.16	[43]
ATCC 20362	粗甘油	TAG	5 L 发酵罐分批补料发酵	<i>ΔPOX1 ~6, ΔTGLA, DGA2, GPD1, HXK1, ScSUC2</i>	31.0	24.2	0.43	0.1	[44]
W29	葡萄糖	脂肪酸	5 L 发酵罐分批发酵	<i>ΔFAA1, ΔMFE1, DGA2, TGLA, KITGL3</i>	120.4	21	-	0.20	[45]
Po1f	葡萄糖	TAG	5 L 发酵罐分批发酵	<i>SCD, DGA1, ACC1, DGA1, ΔMFE1, Δ - 12D, Δ - 15D, ΔPEX10</i>	77.8	50	-	-	[46]

注:pMT015、pINA1292sp 为质粒载体;hp4d、TEF、TEFin 为启动子;Δ 表示敲除基因;列表中基因名称表示过表达该基因;基因名称前两个字母表示基因来源,如 *ScSUC2* 表示酿酒酵母(*S. cerevisiae*)来源的 *SUC2* 基因;- ,表示文献中并未列出该项指标。油脂含量,指干细胞(DCW)油脂的质量分数;产量,指单位体积的培养基中 TAG、脂肪酸或脂肪酸衍生物的质量,单位为 g/L;产率,指每消耗 1 g 底物所生产的 TAG、脂肪酸或脂肪酸衍生物的质量,单位为 g/g;生产速率,指单位时间、单位体积的培养基中生产的 TAG、脂肪酸或脂肪酸衍生物的质量,单位为 g/(L·h)

2.1 调控代谢途径中的关键基因

过表达合成途径中的关键基因或者敲除基因阻断竞争和分解代谢途径,是提升目标产物合成水平最简单有效的方法,也是最常用的代谢工程策略。

2.1.1 过表达合成途径中的关键酶

过表达合成途径中的关键酶,可以提高整条代谢途径的反应速度,从而提高产物的合成速率。ACC 是脂肪酸合成的限速酶,DGA 是 TAG 合成的限速酶,GPD 和 ACL 是乙酰辅酶 A 合成的关键酶,转酮酶(TKL)和 ME 是 NADPH 合成的关键酶。研究表明,单独或协同过表达 ACC^[31, 35]、

DGA^[26, 31, 34-35, 40]、TKL^[25]、ACL^[31, 34]、GPD^[30, 47]、ME^[4],均能明显提高解脂耶氏酵母的油脂产量。

Blazeck 等^[34]通过对解脂耶氏酵母油脂合成途径中 AMP 脱氨酶基因(*AMPD*)、苹果酸酶基因(用于提高 NADPH 的供给)、*ACL1*、*ACL2*、*DGA1*、*DGA2* 组合过表达,单敲除或双敲除脂肪酸降解途径中的过氧化物酶体生物合成因子(*PEX10*)、多功能氧化酶基因(*MFE1*),获得了 57 株基因型不同的菌株,发现双敲除 *PEX10*、*MFE1* 和过表达 *DGA1* 基因的菌株油脂产量最高,在优化发酵条件下试管发酵油脂产量达到 6.0 g/L,菌体油脂含量达到 74%,分别较

出发菌株提高了13.6倍和3.4倍,而在5 L发酵罐中发酵油脂产量达到25.3 g/L,菌体油脂含量达到71%,分别较出发菌株提高了60.7倍和3.2倍。

Tai等^[31]研发了一种“推-拉”的策略,即通过hp4d和TEFin启动子控制ACC1,推动乙酰辅酶A的合成,摇瓶发酵使油脂含量提高到17.1%,较出发菌株(8.77%)提高了0.95倍,通过强启动子TEFin过表达DGA1,驱动TAG的合成,油脂含量提高到33.8%,较出发菌株提高了2.85倍。此外,二者同时过表达时,展现了良好的协同作用,油脂含量提高到41.4%,较出发菌株提高了3.72倍。2 L发酵罐分批发酵,菌体油脂含量达到61.7%,较出发菌株提高了6倍,产量达到17.55 g/L,产率达到0.195 g/g,生产速率达到0.143 g/(L·h)。实验结果证明了协同过表达ACC1和DGA1可以有效提高解脂耶氏酵母油脂产量。

Qiao等^[35]用强启动子TEFin控制ACC1和DGA1过表达,同时过表达利于油脂生成的 $\Delta-9$ 硬脂酰辅酶A去饱和酶基因(SCD),意外发现菌株能够耐受高浓度的葡萄糖(300 g/L),且生长速率提高了2倍,在3 L发酵罐中发酵油脂产量达到55 g/L,菌体油脂含量达到67%,产率较出发菌株提高了2.93倍,达到0.234 g/g,生产速率高达0.707 g/(L·h)。

Silverman等^[26]分别过表达甘油酯合成、脂肪酸合成、中心碳代谢途径关键基因,NADPH生成相关基因,油脂合成调控因子和转运蛋白编码基因等44个基因,结果发现:以葡萄糖为碳源时,过表达DGA2,油脂产量、含量和产率较出发菌株分别提高2.36、1.65、2.46倍;以乙酸为碳源时,过表达SLC1,油脂产量、含量和产率较出发菌株分别提高0.99、0.91、1.51倍。

此外,除关键基因外,过表达合成途径中相关途径的基因也能提高油脂产量。Dobrowolski等^[25]将磷酸戊糖途径中的5个基因——TKL1、转醛缩酶(TAL1)、核酮糖-5-磷酸-3-差向异构酶(RPE1)、6-葡萄糖酸脱氢酶(GND1)、6-葡萄糖脱氢酶(ZWF1)分别与DAG1同时过表达,发现TKL1和DAG1共表达时油脂产量最高,达到1.42 g/L,油脂含量达到23.94%,分别较出发菌株提高70%和40%。

过表达关键酶是提高解脂耶氏酵母油脂产量常用的手段。但是,由于合成途径的基因多已被学者研究,多基因组合协同过表达或通过系统生物学挖掘新的靶点基因将是未来研究的方向。

2.1.2 阻断油脂分解途径和竞争途径

在解脂耶氏酵母发酵后期,由于胞内糖转运系统效率降低,无法及时补给代谢所需的碳源,细胞将分解胞内储存的TAG用于保证基础代谢,另外竞争途径与油脂竞争碳代谢流,二者均会降低油脂的合成水平。因此,阻断油脂分解途径和竞争途径,如抑制脂肪酸的 β -氧化、磷脂的合成,抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的表达,阻断糖原合成途径^[48],阻止TAG降解^[49],均可有效提高解脂耶氏酵母油脂产量。

Beopoulos等^[49]通过敲除催化3-磷酸甘油转化生成磷酸二羟丙酮关键酶3-磷酸甘油脱氢酶基因GUT2,增加3-磷酸甘油的供给,油脂含量较野生型菌株提高了3倍。随后,在*Y. lipolytica* Δ GUT2中进一步敲除脂肪酸 β -氧化的限速酶酰基辅酶A氧化酶基因POX1~POX6,油脂含量较野生型菌株提高了4倍。

Dulermo等^[47]敲除GUT2和过表达GPD1,使G3P的水平提高了5.6倍,随后敲除POX1~6,油脂含量达到70%,较出发菌株提高13.6倍。

Bhutada等^[48]改造过的工程解脂耶氏酵母中敲除糖原合成酶基因GSY1,使糖原含量由16%下降至0,油脂含量达到52.4%,较出发菌株提高17%。

2.2 解除负反馈调节

解除代谢途径的负反馈调节,能有效增大合成代谢途径通量,驱动碳代谢流转向目标产物的合成。在氮源耗尽、碳源充足的情况下,解脂耶氏酵母由生长转向油脂合成。但是,高浓度葡萄糖产生的葡萄糖阻遏效应,导致相关基因表达下调,从而影响油脂的合成。SNF1和MIG1是葡萄糖阻遏效应的两个重要的负调控因子。Wang等^[28]发现,敲除MIG1后,油脂合成途径相关的多个基因表达水平都发生了上调,而脂肪酸降解途径中的基因MFE1却出现了下调,菌体油脂含量也由36%提高到48.7%,较出发菌株提高了35%。Seip等^[29]发现,敲除SNF1后,ACL1和乙酰辅酶A合成酶基因ACS2的表达水平发生了上调,从而增大了前体物乙酰辅酶A的供给,使油脂含量较野生型菌株提高了2.6倍。Abghari等^[50]在野生型*Y. lipolytica* H222中敲除SNF1、FAA1和POX1~6,脂肪酸产量由0.34 g/L提高到3.30 g/L,较出发菌株提高了8.7倍。Liu等^[37]在研究基因MGA2功能时发现,MGA2调控 $\Delta 9$ -硬脂酰-ACP去饱和酶基因OLE1的表达,在野生型*Y. lipolytica* Polf中突变MGA2(G643R),并过表达DGA1,使油脂产量达到25.0 g/L,较出发菌

株提高了近 60 倍,产率达到 0.213 g/g,生产速率高达 0.145 g/(L·h)。比较转录组学分析显示, *MGA2* 的失活上调了 EMP 途径,弱化了 TCA 循环,中心碳代谢流转向 TAG 骨架 G3P 和乙酰辅酶 A 的合成,导致了油脂产量的提高。

Δ -9 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶基因 (*SCD*) 催化饱和脂肪酸转化成单不饱和脂肪酸, Qiao 等^[35] 发现,在野生型解脂耶氏酵母中单独过表达 *SCD* 并不能提高油脂产量,但是在过表达 *ACC1* 和 *DGA1* 的基础上继续过表达 *SCD*, 不仅能解除饱和脂肪酸对 *ACC1* 的反馈抑制,还能增大脂肪酸合成的碳代谢流。摇瓶发酵时,不仅油脂产量较出发菌株大幅度提高,生长速率也大幅度增加。

目前,解脂耶氏酵母油脂合成的调控机制尚未彻底解析清楚,相信随着解脂耶氏酵母全基因组测序的完成以及合成生物学和系统生物学的发展,油脂合成分子调控机制将更加明晰,进一步释放解脂耶氏酵母油脂细胞工厂的油脂生产潜能。

2.3 异源表达合成途径的关键酶

异源表达油脂合成途径中的关键酶是解除解脂耶氏酵母油脂合成瓶颈的重要方法。目前,已有众多研究者通过异源表达关键酶提高了油脂产量。

Friedlander 等^[30] 在基因组上过表达圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*) 来源的 *DGA1* 和黑麦角菌 (*Claviceps purpurea*) 来源的 *DGA2*, 并敲除三酰甘油脂肪酶基因 3 (*TGL3*) 阻止 TAG 的降解,在 1 L 发酵罐水平补料分批发酵,油脂产量达到 84.5 g/L,菌体油脂含量达到 73%,产率为 0.20 g/g,生产速率高达 0.73 g/(L·h),较出发菌株野生型 *Y. lipolytica* NS18 分别提高 5.60、1.92、1.86、5.64 倍。

Kamineni 等^[51] 将肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 来源的磷酸酮醇酶 (XPK) 和己酸菌 (*Clostridium kluyveri*) 来源的磷酸转乙酰酶 (Pta) 的基因密码子优化后整合到已敲除磷酸果糖激酶 (PFK) 基因的解脂耶氏酵母基因组上过表达,使碳代谢流由核酮糖-5-磷酸转向乙酰辅酶 A 的合成,油脂产量和生产速率较出发菌株野生型 *Y. lipolytica* YB-3392 分别提高了 19% 和 78%。

Yan 等^[46] 通过异源表达亚麻 (*Linum usitatissimum* L.) 来源的 Δ -15 去饱和酶基因 Δ -15D, 过表达内源 *SCD*、 Δ -12 去饱和酶基因 Δ -12D、*ACC1* 和 *DGA1*, 敲除 *PEX10* 和 *MFE1*, 构建的解脂耶氏酵母工程菌,摇瓶发酵油脂含量达到 56.34%,较出发菌株野生型 *Y. lipolytica* Polf (7.2%) 提高了 6.8 倍,在 5 L 发酵罐中发酵,油脂

产量为 50 g/L,油脂含量为 77.8%。

ACL 催化柠檬酸裂解产生草酰乙酸和乙酰辅酶 A,是乙酰辅酶 A 合成的关键酶,但是在解脂耶氏酵母中单独过表达 *ACL*,油脂产量的提高幅度却十分有限^[34]。Zhang 等^[27] 发现,这是由于内源 *ACL* 的米氏常数 (K_M) 高达 3.6 mmol/L,对底物柠檬酸的亲和力差。为此,通过对不同来源的 *ACL* 进行筛选,筛选出一个 K_M 低至 0.05 mmol/L 的来源于小鼠 (*Mus musculus*) 的 *ACL* 基因,利用多拷贝质粒 pINA1292sp 过表达,使菌体油脂含量从 7.3% 提高到 23.1%,提高了 2.2 倍。

Zhang 等^[52] 在解脂耶氏酵母中异源表达透明颤菌 (*Vitreoscilla*) 来源的血红蛋白基因 *VHb*, 提高发酵过程中氧的利用效率,使细胞浓度提高了 27%,菌体油脂含量由 10.5% 提高到 14.5%,提高了 38%。

2.4 构建高效的前体物替代合成途径

脂肪酸是合成 TAG 的基本骨架,每合成 1 分子硬脂酸 (C18:0) 则需要 9 分子的乙酰辅酶 A 和 16 分子的 NADPH。9 分子乙酰辅酶 A 需要消耗 4.5 分子的葡萄糖 (其中丙酮酸脱氢酶催化脱羧形成 CO_2 导致 1/3 的碳原子丢失)。此外,由于解脂耶氏酵母细胞质中不存在 NADH 激酶和 NADH - NADPH 转氢酶,因此 NADH 不能自由转换为 NADPH。以葡萄糖为碳源时, NADPH 的生成主要依赖磷酸戊糖途径 (PPP)^[53]。但是,这并非生成 NADPH 的最佳选择,因为 6-磷酸葡萄糖脱氢酶催化 6-磷酸葡萄糖生成 NADPH 同时脱羧释放 1 分子二氧化碳,导致了碳原子的额外损耗,因而增加了生产成本^[54]。1 分子葡萄糖经 PPP 途径完全代谢后生成 12 分子的 NADPH,而 16 分子的 NADPH 需消耗 4/3 分子的葡萄糖。因此,合成 1 分子硬脂酸共需 5.83 分子的葡萄糖。

为提升葡萄糖的转化效率和前体物乙酰辅酶 A 和 NADPH 的供应,科学家们构建了更加高效的乙酰辅酶 A 和 NADPH 替代途径。

2.4.1 构建乙酰辅酶 A 替代合成途径

氮饥饿使 TCA 循环受阻,积累的柠檬酸由 ACL 催化裂解生成草酰乙酸和乙酰辅酶 A,解脂耶氏酵母由生长转向油脂合成。因此,解脂耶氏酵母生长与油脂合成分离,油脂合成与氮饥饿偶联,在一定程度上影响了油脂的合成效率。

Xu 等^[38] 构建了 5 个乙酰辅酶 A 替代合成途径,并引入到之前构建好的解脂耶氏酵母工程菌 (过表达 *ACC1* 和 *DGA1*, *Y. lipolytica*/pMT065 - hp4d -

ACC1 - TEFin - DGA1) 中筛选比较,发现过表达酿酒酵母(*S. cerevisiae*)来源的过氧化物酶体肉碱乙酰转移酶基因 *perCAT2* 途径既能提高油脂产量,也能提高菌体油脂含量,摇瓶发酵油脂产量达到 0.215 g/L,较出发菌株提高 23%,还可使油脂合成与氮饥饿偶联,在氮源存在的情况下依然可以合成油脂。随后,又过表达构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)来源的磷酸解酮酶基因(*PK*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源的 *Pta* 基因以提高 NADPH 的供给,摇瓶发酵油脂产率达到 0.225 g/g,较出发菌株提高 29%,在 3 L 发酵罐中发酵,油脂产量达 66.4 g/L,产率达到 0.229 g/g,生产速率达到 0.565 g/(L·h),较出发菌株野生型 *Y. lipolytica* W29 提高了 3.1 倍。

Niehus 等^[33]通过在解脂耶氏酵母中过表达内源木糖醇脱氢酶(XDH)、木糖还原酶(XR)和内源木酮糖激酶(XK)的基因,使其能够利用木糖合成油脂。此外,额外构建了两条从木酮糖-5-磷酸合成乙酰辅酶 A 的途径。第一条途径是过表达构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)来源的磷酸酮醇酶(XPKA)将 D-木酮糖-5-磷酸转化为乙酰磷酸,然后过表达枯草芽孢杆菌来源的磷酸转乙酰酶将乙酰磷酸转化为乙酰辅酶 A。第二条途径是过表达构巢曲霉来源的 XPKA 和乙酸激酶(ACK)基因合成乙酸,随后通过 ACS2 将其转化为乙酰辅酶 A。两条途径均能提高油脂的产量,但第二条途径效果更佳,在 2 L 发酵罐中发酵,油脂产量达到 16.5 g/L,为出发菌株的 8.3 倍,油脂含量达到 67%,产率达到 0.344 g/g,生产速率为 0.185 g/(L·h)。

2.4.2 构建 NADPH 替代合成途径

脂肪酸合成和去饱和化均需要大量的 NADPH,因此 NADPH 的供给对油脂的合成有着重要的影响。Qiao 等^[4]通过化学计量理论计算,系统地分析比较了 PPP 途径、丙酮酸-草酰乙酸-苹果酸转氢反应、NADPH 特异性 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GapC)和非氧化性糖酵解途径 4 条 NADPH 合成途径效率的差异,构建了 13 株不同的解脂耶氏酵母工程菌,发现同时过表达 *GapC* 和卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)来源的 *ME*,激活丙酮酸-草酰乙酸-苹果酸循环,在消耗 1 分子 ATP 的情况下可将 1 分子 NADH 转化为 1 分子 NADPH,在 3 L 发酵罐中分批补料发酵,油脂产量高达 98.9 g/L,油脂含量达 66.8%,脂肪酸甲酯产率达 0.269 g/g,分别较出发菌株提高 107%、22% 和 46%,生产速率达到 1.2 g/(L·h),展现了很好的生产应用潜力。

2.5 强化氧化应激保护

解脂耶氏酵母只有在氮饥饿条件下才进行油脂的合成,但氮源的缺乏也会引起一系列压力应激响应,氧化应激就是其中的一种,即产生大量的羟自由基、活性氧和自由醛(如丙二酰半醛、4-羟基壬醛),这些活性自由基将导致 DNA 的损伤,影响酶的催化功能,促进细胞衰老和死亡,从而影响油脂的合成^[36]。此外,为应对氧化应激压力,细胞不得不分解储存的油脂以维持细胞稳态^[55]。

Xu 等^[36]在解脂耶氏酵母中分别对 3 个内源氧化应激蛋白基因——氧化物还原酶(*ylSOD1*)、谷胱甘肽还原酶(*ylGSR*)、谷胱甘肽二硫还原酶(*ylGPO*),以及 2 个异源氧化应激蛋白基因——*E. coli* 来源的醛脱氢酶(*EcAldH*)和酿酒酵母来源的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*ScZWF*)进行过表达研究,发现同时过表达 *EcAldH*、*ScZWF*、*ylGSR* 和 *ylGPO* 时效果最佳,改造后的细胞呈圆球形,展现出良好的抗氧化能力,摇瓶发酵油脂含量、生产速率和产率分别达到 87%、0.265 g/(L·h) 和 0.227 g/g,较出发菌株分别提高 1.12、4.1 倍和 0.82 倍,3 L 发酵罐发酵油脂产量达到 72.7 g/L,油脂含量由 40.6% 显著提升至 81.4%,生产速率高达 0.97 g/(L·h)。

强化氧化应激保护,降低细胞氧化应激损伤,是提高解脂耶氏酵母油脂产量的另一条途径,也是今后研究的方向。

2.6 促进脂肪酸的分泌

分离提取高昂的费用是制约微生物油脂产业化的一个重要因素。常见的微生物油脂提取方法是先将细胞分离干燥后,使用有机溶剂提取。如果将合成的油脂分泌到胞外,则可利用有机膜迅速将油脂和培养基分离开来,简化提取工序,节约经济成本。为此,Ledesma - Amaro 等^[45]研发了两种脂肪酸的分泌策略,并进行了比较。第一种策略是在解脂耶氏酵母中过表达脂肪酸合成途径中的基因 *DGA2*,敲除脂肪酸降解基因 *FAA1* 阻止脂肪酸的进一步酰基化,敲除 *MFE1* 阻止脂肪酸的 β -氧化,过表达内源 *TGL4* 和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)来源的 *TGL3* 基因促进脂肪酸的分泌,摇瓶发酵胞外脂肪酸产量达到 2.8 g/L。第二种策略是敲除 *ARE1*、*DGA1*、*DGA2* 和磷脂-二酰基甘油酰基转移酶基因(*LRO1*),使细胞不能形成脂质体,同样敲除 *FAA1* 阻止脂肪酸酰基化,敲除 *MFE1* 阻止脂肪酸 β -氧化,过表达大白鼠(*Rattus norvegicus*)来源的乙酰辅酶 A 硫酯酶 II(TEII)促进脂肪酸分泌,摇瓶发酵胞外脂肪酸含量达到 3.0 g/L。由此看出,两种策略均

可促进脂肪酸的分泌。最后,在 5 L 发酵罐中发酵,以葡萄糖为碳源时,胞外脂肪酸含量由出发菌株的 0 g/L 增加到 4.3 g/L,脂肪酸产量、产率和油脂含量分别为 17.1 g/L、0.14 g/g 和 92.4%,分别较出发菌株提高 1.76、1.80 倍和 4.19 倍;而添加正十二烷进行双相发酵时,胞外脂肪酸产量达到 10.4 g/L,脂肪酸产量、产率和油脂含量分别为 21 g/L、0.20 g/g 和 120.4%,分别较出发菌株提高 2.39、3.00 倍和 5.76 倍。

2.7 适应性进化

理性的遗传操作修饰能够有目的、针对性地提高解脂耶氏酵母的油脂产量,但往往也会导致生物量的下降^[31]。适应性进化则可以有效地避免这个问题,在不需要了解 and 掌握菌株遗传调控信息的基础上,通过诱变和长期驯化,获得具有特定性状的突变菌株,如提高产量或赋予耐受性等。因为不涉及遗传操作,所以基本不影响细胞生长^[56]。

Liu 等^[39]发现油脂产量高的细胞,其相对密度小,通常悬浮在培养基上层,而油脂产量低的则因相对密度大,沉降于底部。以此为基础,建立了一个快速筛选高产解脂耶氏酵母突变株的方法。首先,通过甲基磺酸乙酯(EMS)对 Blazcek 等^[34]构建的工程菌进行诱变,培养 144 h 后低速(100 × g)离心,油脂产量高的突变株富集在培养基上方,将富集的菌体分离后继续培养、离心,如此反复循环。最后,尼罗红染色后利用流式细胞仪筛选最终富集的文库,成功筛选到 2 株油脂产量提高 3.5 倍、生长速率提高 70% 的进化菌株。其中 E26 在 3 L 发酵罐发酵油脂产量、菌体油脂含量和产率分别为 38.9 g/L、86.9% 和 0.243 g/g,较出发菌株分别提高 54%、22% 和 54%,并且进化菌无需氮饥饿处理即可合成油脂。全基因组重测序及后续验证实验显示, γ -氨基丁酸合成途径中的琥珀酸半醛脱氢酶(SSADH)基因 *UGA2* 突变(Pro209Ser)导致 γ -氨基丁酸的合成受阻,削弱了流向 TCA 循环的碳代谢流,驱使更多的碳代谢流转向油脂的合成,从而提高了油脂的产量。Daskalaki 等^[57]利用实验室适应性进化技术,传代 77 代,得到的进化菌株油脂含量达到 44%,较出发菌株提高 30%。

由此可见,适应性进化可在不影响菌株生长的前提下提高油脂的产量。但是,适应性进化涉及大量样本的筛选,因此开发高通量的筛选方法是关键。此外,还可联合比较组学对进化菌株进行分析,挖掘油脂产量提升的新基因靶点。

2.8 计算机辅助模拟

理性的遗传修饰和改造能够有效提高目标产物的产量,但由于细胞代谢网络的复杂性,从细胞内成千上万的代谢反应和调控途径中找到合适的基因改造靶点非常困难,往往要经过反复试错才能成功。因此,基于计算机和大量的组学数据,通过对代谢网络大规模计算、模拟和分析,找出合适的代谢工程改造策略,可减少改造的盲目性,更快更好地获得高产菌株。目前,已有很多科学家基于计算机辅助,成功提高了解脂耶氏酵母的油脂产量^[58-60]。

Kavscek 等^[60]在酿酒酵母基因组规模代谢网络模型(GEM)的基础上,构建了解脂耶氏酵母 GEM 模拟细胞生长和油脂合成,模型预测显示产油期较低的葡萄糖摄取速率和溶氧水平有利于油脂积累,随后通过调整葡萄糖的流加速率和控制溶氧,使油脂产量提高了 4 倍以上。Kim 等^[59]对 Kavscek 等^[60]的解脂耶氏酵母 GEM 进行了改进,成功预测出多个需要过表达和敲除的基因,对其中 3 个提高幅度最大的基因进行实验验证,发现敲除鸟氨酸代谢途径中的亚甲基四氢叶酸脱氢酶基因 YALIOF30745g,菌体油脂含量提高 45%。Wei 等^[58]在 Pan^[61]、Kerkhoven^[62]等构建的 GEM 的基础上构建了一个新的解脂耶氏酵母 GEM iYL_2.0,预测过表达 6 个基因可以提高前体物乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A 的浓度,进而提高油脂产量,同时,代谢模拟显示培养基中添加 *L*-Gly、*L*-Ala、*L*-Cys、*L*-Ser、*L*-Thr 和 *L*-Asp 能够提高油脂产量,其中添加 *L*-Thr 或 *L*-Asp 可使油脂产量提高 55.5%。

3 结语

解脂耶氏酵母是一种具有多种优良特性的非常规产油酵母,是生产微生物油脂理想的底盘细胞,特别是代谢工程改造的解脂耶氏酵母展现了良好的应用与发展前景。但是,要实现工业化生产,仍然有许多问题需要解决。

首先,高昂的生产成本仍然是制约解脂耶氏酵母工业化的主因。因此,构建能高效利用廉价底物,如木质纤维素、农产品加工副产物和工业废水,生产微生物油脂的解脂耶氏酵母,将是下一步改造的方向。但是,这些廉价底物成分复杂,常含有抑制菌株生长代谢的有毒物质,影响细胞的生长和油脂的合成。为此,设计解毒途径或添加解毒剂来提高工程菌株对有毒化合物的耐受性,或筛选具有抑制物耐受性的油脂高产菌将有助于解决这一难题。

其次,可通过多组学技术进一步剖析油脂合成的调控机制,了解脂质代谢的调控机制和瓶颈,指导

计算机代谢模型设计和优化更高效的合成途径,保证代谢途径中的前体物得到充分供应,平衡代谢通量和辅因子,解除反馈抑制,进一步推动油脂产量接近或达到理论最大值。

此外,为缓解全球二氧化碳排放持续增长导致的气候变化,未来工业生物技术的主要发展方向是利用微生物细胞工厂将二氧化碳转化为社会生产生活用品。我国也在2020年9月明确提出了2030年“碳达峰”与2060年“碳中和”目标。因此,研究高效的人造光合作用或碳固定途径,并引入到解脂耶氏酵母中,以二氧化碳为底物生产油脂,将是解脂耶氏酵母油脂未来的发展方向。

微生物代谢工程和合成生物学的迅速发展,大大提高了微生物细胞工厂的构建和改造水平。我们有理由相信,未来随着合成生物学的发展,将会发展更多更先进的遗传改造策略方法,助力解脂耶氏酵母油脂生产水平的提升,使其在油脂生产方面发挥越来越重要的作用,最终成为工业生产油脂的最佳微生物细胞。

参考文献:

- [1] MA Y Q, GAO Z, WANG Q H, et al. Biodiesels from microbial oils: opportunity and challenges [J]. *Bioresour Technol*, 2018, 263: 631–641.
- [2] 包文君, 李子富, 王雪梅, 等. 产油酵母利用廉价原料合成油脂的研究进展 [J]. *化工进展*, 2021, 40(5): 2484–2495.
- [3] MUNOZ C F, SUDFELD C, NADUTHODI M I S, et al. Genetic engineering of microalgae for enhanced lipid production [J/OL]. *Biotechnol Adv*, 2021, 52: 107836 [2022–04–07]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107836>.
- [4] QIAO K J, WASYLENKO T M, ZHOU K, et al. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(2): 173–177.
- [5] QIN L, LIU L, ZENG A P, et al. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts [J]. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 1507–1519.
- [6] PAWAR P P, ODANETH A A, VADGAMA R N, et al. Simultaneous lipid biosynthesis and recovery for oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 237 [2022–04–07]. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1576-7>.
- [7] QI F, SHEN P J, HU R F, et al. Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate [J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 74 [2022–04–07]. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01712-0>.
- [8] GUERFALI M, AYADI I, BELHASSEN A, et al. Single cell oil production by *Trichosporon cutaneum* and lignocellulosic residues bioconversion for biodiesel synthesis [J]. *Process Saf Environ*, 2018, 113: 292–304.
- [9] FIDIO D N, DRAGONI F, ANTONETTI C, et al. From paper mill waste to single cell oil: enzymatic hydrolysis to sugars and their fermentation into microbial oil by the yeast *Lipomyces starkeyi* [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2020, 315: 123790 [2022–04–07]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123790>.
- [10] DOUROU M, ECONOMOU C N, AGGELI L, et al. Bioconversion of pomegranate residues into biofuels and bioactive lipids [J/OL]. *J Clean Prod*, 2021, 323: 129193 [2022–04–07]. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129193>.
- [11] WU H, LI Y Y, CHEN L, et al. Production of microbial oil with high oleic acid content by *Trichosporon capitatum* [J]. *Appl Energy*, 2011, 88(1): 138–142.
- [12] 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.
- [13] DOUROU M, AGGELI D, PAPANIKOLAOU S, et al. Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2018, 102: 2509–2523.
- [14] BEOPOULOS A, CESCUT J, HADDOUCHE R, et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production [J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48: 375–387.
- [15] LIU L, ALPER H S. Draft genome sequence of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* PO1f, a commonly used metabolic engineering host [J/OL]. *Genome A*, 2014, 2(4): e00652–14 [2022–04–07]. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00652-14>.
- [16] SHI T Q, HUANG H, KERKHOVEN E J, et al. Advancing metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* using the CRISPR/Cas system [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2018, 102: 9541–9548.
- [17] LARROUDE M, ROSSIGNOL T, NICAUD J M, et al. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica* [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36: 2150–2164.
- [18] MAGDOULI S, GUEDRI T, TAREK R, et al. Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica* [J]. *Bioresour Technol*, 2017, 243: 57–68.
- [19] MAGDOULI S, GUEDRI T, ROUISSI T, et al. Sync between leucine, biotin and citric acid to improve lipid production by *Yarrowia lipolytica* on crude glycerol-based media [J/OL]. *Biomass Bioenerg*, 2020, 142: 105764

- [2022 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105764>.
- [20] DOBROWOLSKI A, DRZYMALA K, RZETCHONEK D A, et al. Lipid production from waste materials in seawater – based medium by the yeast *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 547 [2022 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105764>.
- [21] GAJDOS P, HAMBALKO J, SLANY O, et al. Conversion of waste materials into very long chain fatty acids by the recombinant yeast *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. *FEMS Microbiol Lett*, 2020, 367; 6 [2022 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa042>.
- [22] CHEN L, YAN W, QIAN X J, et al. Increased lipid production in *Yarrowia lipolytica* from acetate through metabolic engineering and cosubstrate fermentation [J]. *ACS Synth Biol*, 2021, 10: 3129 – 3138.
- [23] WALKER C, DIEN B, GIANNONE R J, et al. Exploring proteomes of robust *Yarrowia lipolytica* isolates cultivated in biomass hydrolysate reveals key processes impacting mixed sugar utilization, lipid accumulation, and degradation [J/OL]. *Msystems*, 2021, 6(4): e0044321 [2022 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1128/msystems.00443-21>.
- [24] LAZAR Z, LIU N, STEPHANOPOULOS G. Holistic approaches in lipid production by *Yarrowia lipolytica* [J]. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(11): 1157 – 1170.
- [25] DOBROWOLSKI A, MIRONCZUK A M. The influence of transketolase on lipid biosynthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19: 138 [2022 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01398-x>.
- [26] SILVERMAN A M, QIAO K J, XU P, et al. Functional overexpression and characterization of lipogenesis – related genes in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2016, 100: 3781 – 3798.
- [27] ZHANG H Y, ZHANG L N, CHEN H Q, 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.
- [28] WANG Z P, XU H M, WANG G Y, et al. Disruption of the *MIG1* gene enhances lipid biosynthesis in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA – DC 50109 [J]. *BBA – Mol Cell Biol L*, 2013, 1831(4): 675 – 682.
- [29] SEIP J, JACKSON R, HE H X, et al. *Snf1* is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(23): 7360 – 7370.
- [30] FRIEDLANDER J, TSAKRAKLIDES V, KAMINENI A, et al. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain [J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 77 [2022 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0492-3>.
- [31] TAI M, STEPHANOPOULOS G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production [J]. *Metab Eng*, 2013, 15: 1 – 9.
- [32] XU J Y, LIU N, QIAO K J, et al. Application of metabolic controls for the maximization of lipid production in semicontinuous fermentation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(27): E5308 – E5316.
- [33] NIEHUS X, COQ C L, SANDOVAL G, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to enhance lipid production from lignocellulosic materials [J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 11 [2022 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1010-6>.
- [34] BLAZECK J, HILL A, LIU L Q, et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production [J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3131 [2022 - 04 - 07]. <https://doi.org/10.1038/ncomms4131>.
- [35] QIAO K J, IMAM ABIDI S H, LIU H J, et al. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Metab Eng*, 2015, 29: 56 – 65.
- [36] XU P, QIAO K J, STEPHANOPOULOS G. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(7): 1521 – 1530.
- [37] LIU L Q, MARKHAM K, BLAZECK J, et al. Surveying the lipogenesis landscape in *Yarrowia lipolytica* through understanding the function of a *Mga2p* regulatory protein mutant [J]. *Metab Eng*, 2015, 31: 102 – 111.
- [38] XU P, QIAO K J, AHN W S, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop – in transportation fuels and oleochemicals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(39): 10848 – 10853.
- [39] LIU L Q, PAN A, SPOFFORD C, et al. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Metab Eng*, 2015, 29: 36 – 45.
- [40] LAZAR Z, DULERMO T, NEUVEGLISE C, et al. Hexokinase: a limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Metab Eng*, 2014, 26: 89 – 99.
- [41] SAGNAK R, COCHOT S, MOLINA – JOUVE C, et al. Modulation of the glycerol phosphate availability led to concomitant reduction in the citric acid excretion and increase in lipid content and yield in *Yarrowia lipolytica* [J]. *J Biotechnol*, 2018, 265: 40 – 45.
- [42] LAZAR Z, GAMBOA – MELENDEZ H, COQ C L, et al. Awakening the endogenous Leloir pathway for efficient

- galactose utilization by *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 185 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0370-4>.
- [43] HAPETA P, RAKICKA M, DULERMO R, et al. Transforming sugars into fat – lipid biosynthesis using different sugars in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Yeast*, 2017, 34(7): 293–304.
- [44] RAKICKA M, LAZAR Z, DULERMO T, et al. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by – products under different culture conditions [J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 104 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0286-z>.
- [45] LEDESMA – AMARO R, DULERMO R, NIEHUS X, et al. Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids [J]. *Metab Eng*, 2016, 38: 38–46.
- [46] YAN F X, DONG G R, QIANG S, et al. Overexpression of $\Delta 12$, $\Delta 15$ – *D* desaturases for enhanced lipids synthesis in *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 289 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00289>.
- [47] DULERMO T, NICAUD J M. Involvement of the G3P shuttle and *beta* – oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Metab Eng*, 2011, 13: 482–491.
- [48] BHUTADA G, KAVSCEK M, LEDESMA – AMARO R, et al. Sugar versus fat: elimination of glycogen storage improves lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. *FEMS Yeast Res*, 2017, 17: 020 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox020>.
- [49] 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.
- [50] ABGHARI A, MADZAK C, CHEN S L. Combinatorial engineering of *Yarrowia lipolytica* as a promising cell biorefinery platform for the *de novo* production of multi – purpose long chain dicarboxylic acids [J/OL]. *Fermentation*, 2017, 3: 40 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.3390/fermentation3030040>.
- [51] KAMINENI A, CONSIGLIO A L, MACEWEN K, et al. Increasing lipid yield in *Yarrowia lipolytica* through phosphoketolase and phosphotransacetylase expression in a phosphofructokinase deletion strain [J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2021, 14: 113 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01962-6>.
- [52] ZHANG H, KANG X, XIAO N, et al. Intracellular expression of *Vitreoscilla* haemoglobin improves lipid production in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2019, 68: 248–257.
- [53] 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]. *Metab Eng*, 2015, 30: 27–39.
- [54] 徐鹏. 纪念王义翹教授: 解脂耶氏酵母替代植物油脂的技术瓶颈及展望 [J]. *合成生物学*, 2021, 2(4): 509–527.
- [55] SHI K, GAO Z, SHI T Q, et al. Reactive oxygen species – mediated cellular stress response and lipid accumulation in oleaginous microorganisms: the state of the art and future perspectives [J/OL]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 793 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00793>.
- [56] PORTNOY V A, BEZDAN D, ZENGLER K. Adaptive laboratory evolution: harnessing the power of biology for metabolic engineering [J]. *Curr Opin Biotech*, 2011, 22(4): 590–594.
- [57] DASKALAKI A, PERDIKOULI N, AGGELI D, et al. Laboratory evolution strategies for improving lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2019, 103(20): 8585–8596.
- [58] WEI S S, JIAN X X, CHEN J, et al. Reconstruction of genome – scale metabolic model of *Yarrowia lipolytica* and its application in overproduction of triacylglycerol [J/OL]. *Bioresour Bioproc*, 2017, 4: 51 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0180-6>.
- [59] 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/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 187 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1518-4>.
- [60] KAVSCEK M, BHUTADA G, MADL T, et al. Optimization of lipid production with a genome – scale model of *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. *BMC Syst Biol*, 2015, 9: 72 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0217-4>.
- [61] PAN P C, HUA Q. Reconstruction and in silico analysis of metabolic network for an oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51535 [2022-04-07]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051535>.
- [62] KERKHOVEN E J, POMRANING K R, BAKER S E, et al. Regulation of amino – acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. *NPJ Syst Biol Appl*, 2016, 2: 16005 [2022-04-07]. <http://dx.doi.org/10.1038/npjbsa.2016.5>.