

威克汉姆西弗酵母遗传操作系统的建立及其合成四乙酰基植物鞘氨醇的应用

刘浏, 尹正安, 潘力*

华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

刘浏, 尹正安, 潘力. 威克汉姆西弗酵母遗传操作系统的建立及其合成四乙酰基植物鞘氨醇的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 397-415.

LIU Liu, YIN Zheng'an, PAN Li. Establishment and application of a genetic operating system in *Wickerhamomyces ciferrii* for the synthesis of tetraacetyl phytosphingosine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 397-415.

摘要: 威克汉姆西弗酵母(*Wickerhamomyces ciferrii*, *W.c*)是一种异宗生殖的非常规酵母,能够大量生产并分泌四乙酰基植物鞘氨醇(tetraacetyl phytosphingosine, TAPS)。由于其在 TAPS 生产方面的优异性能,本研究旨在构建 *W.c* 的遗传操作系统,以提升四乙酰基植物鞘氨醇(TAPS)的产量,并通过诱变和基因工程手段筛选高产菌株,从而为进一步开发鞘脂类代谢产物的工业生产奠定基础。本研究通过选取 2 个自主复制元件(CEN, 2 μ)并挖掘 11 个内源启动子元件以建立威克汉姆西弗酵母中的遗传操作系统,发现过量表达鞘脂代谢内部途径的 *Syr2* 和 *Lcb2* 能显著提高 TAPS 的产量。同时使用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和流式细胞术建立了威克汉姆西弗酵母单倍体交配型鉴定方法,从双倍体 ATCC 14091 出发,筛选到 5 株单倍体菌株。其中 a-型单倍体 *W.c* 140 生产 TAPS 水平最高,产量达到 4.74 mg/g,滴度达到 32.61 mg/L。使用常压室温等离子体诱变(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)技术和本研究构建的遗传操作技术获得诱变菌株 *W.c* 140-A9 和 *W.c* 140-A11 及过表达重组菌株 *W.c* 140 OELcb2 和 *W.c* 140 OESyr2。与出发株 *W.c* 140 相比,诱变株 TAPS 产量分别提高了 61.39%和 67.09%。过表达重组菌株产量提高至原来的 2.24 和 2.56 倍,达到 10.60 mg/g 和 12.14 mg/g,超过了双倍体 ATCC 14091 的产量。本研究所构建的遗传操作系统和获得的出发菌株为后续在威克汉姆西弗酵母中建立更多遗传工程技术奠定了基础。

关键词: 威克汉姆西弗酵母; 四乙酰基植物鞘氨醇; 鞘脂代谢; 启动子筛选; 单倍体筛选

资助项目: 广东省重点研发计划(2022B0202010001)

This work was supported by the Research and Development Project in Key Areas of Guangdong Province (2022B0202010001).

*Corresponding author. E-mail: btlipan@scut.edu.cn

Received: 2024-05-09; Accepted: 2024-07-10; Published online: 2024-07-11

Establishment and application of a genetic operating system in *Wickerhamomyces ciferrii* for the synthesis of tetraacetyl phytosphingosine

LIU Liu, YIN Zheng'an, PAN Li*

School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

Abstract: *Wickerhamomyces ciferrii* (*W.c.*), an unconventional heterothallic yeast species, is renowned for its high production of tetraacetyl phytosphingosine (TAPS). Due to its excellent performance in TAPS production, this study aimed to construct a genetic operating system of *W.c.* to enhance the production of TAPS and to screen high-yielding strains by mutagenesis and genetic engineering, thus laying the foundation for further development of industrial production of sphingolipid metabolites. In this study, we selected two autonomous replication elements (CEN, 2 μ) and mined 11 endogenous promoter elements to establish a genetic operating system in *W. ciferrii*. The overexpression of *Syr2* and *Lcb2* in the sphingolipid metabolism pathway significantly increased the production of TAPS. Meanwhile, we established a method for the identification of haploid mating types of *W. ciferrii* by combining RT-PCR and flow cytometry. Five strains of *W. ciferrii* with different mating types constructed from the standard diploid *W. ciferrii* ATCC 14091 were screened out. A-type haploid *W.c.* 140 showcased the highest production of TAPS with a yield of 4.74 mg/g and a titer of 32.61 mg/L. Mutant strains *W.c.* 140-A9 and *W.c.* 140-A11 were induced by atmospheric pressure room temperature plasma mutagenesis. The recombinant strains *W.c.* 140 OELcb2 and *W.c.* 140 OESyr2 with overexpression were constructed with the genetic operating system established in this study. The TAPS yields of the mutant strains increased by 61.39% and 67.09%, respectively, compared with that of starting strain *W.c.* 140. The recombinant strains cultured in the LCBNB medium achieved yields of 10.60 mg/g and 12.14 mg/g, respectively, representing 2.24 and 2.56 times of that in strain *W.c.* 140. Moreover, the yields of the two recombinant strains were significantly higher than that of the diploid strain ATCC 14091. The genetic operating system and the haploid strain *W.c.* 140 established in this study provide a basis for the subsequent establishment of genetic engineering tools for *W. ciferrii*.

Keywords: tetraacetyl phytosphingosine; *Wickerhamomyces ciferrii*; sphingolipid metabolism; promoter screening; haploid screening

威克汉姆西弗酵母 (*Wickerhamomyces ciferrii*, *W.c.*), 属于汉逊氏酵母(*Hansenula*)属, 是一种非常规的双倍体异宗生殖酵母, 一般存在于地表水和植物表皮中^[1]。威克汉姆西弗酵母通过出芽或伴随假菌丝进行无性繁殖, 也可以通过形成子囊并在子囊中产生 1 至 4 个子囊

孢子进行有性繁殖^[2]。鞘脂是真核细胞膜的关键组成成分, 其核心由长链碱基(long chain bases, LCB), 即鞘氨醇碱组成^[3]。这一类脂质以其结构的简单性为特征, 主要包括鞘氨醇、二氢鞘氨醇和植物鞘氨醇等^[4]形式, 它们能够通过如磷酸化^[5]或酰化^[6]等生化反应, 形成多样

化的鞘脂分子。其中,四乙酰基植物鞘氨醇(tetraacetyl phytosphingosine, TAPS)是一种经过全面乙酰化修饰的鞘脂衍生物^[7]。TAPS 具有抗血管生成^[8]、维持皮肤角质层屏障、防止过度失水和干燥^[9-10]的功能,在医药^[11]和化妆品^[12-13]等行业中广泛应用。20世纪60年代的研究表明,威克汉姆西弗酵母具备生产 TAPS——一种完全乙酰化的植物鞘氨醇的能力^[14]。当该前体被分泌至培养基中时,可以进行提取并转化为一系列商业化的神经酰胺产品^[15]。这一发现为神经酰胺的低成本工业化生产提供了一条可行的途径。

TAPS 的生物合成过程始于内质网的胞质侧面,以丝氨酸棕榈酰转移酶 (serine

palmitoyltransferase, SPT)的催化作用为起点^[16]。该酶促进 L-丝氨酸与棕榈酰辅酶 A 的缩合,生成 3-酮二氢鞘氨醇,此反应被认为是鞘脂生物合成路径中的限速步骤^[17]。所产生的 3-酮二氢鞘氨醇随后通过还原型辅酶 II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)依赖的 3-酮二氢鞘氨醇还原酶转换为二氢鞘氨醇^[18]。经过 C₄-羟化酶作用的二氢鞘氨醇进一步转化为植物鞘氨醇^[19]。二氢鞘氨醇和植物鞘氨醇接着由鞘氨醇磷酸化酶磷酸化^[20],然后进入补救途径产生磷酸乙醇胺和脂肪醛或通过 N-乙酰化转化为神经酰胺。而植物鞘氨醇的乙酰化是威克汉姆西弗酵母中特有的过程^[21] (图 1)。

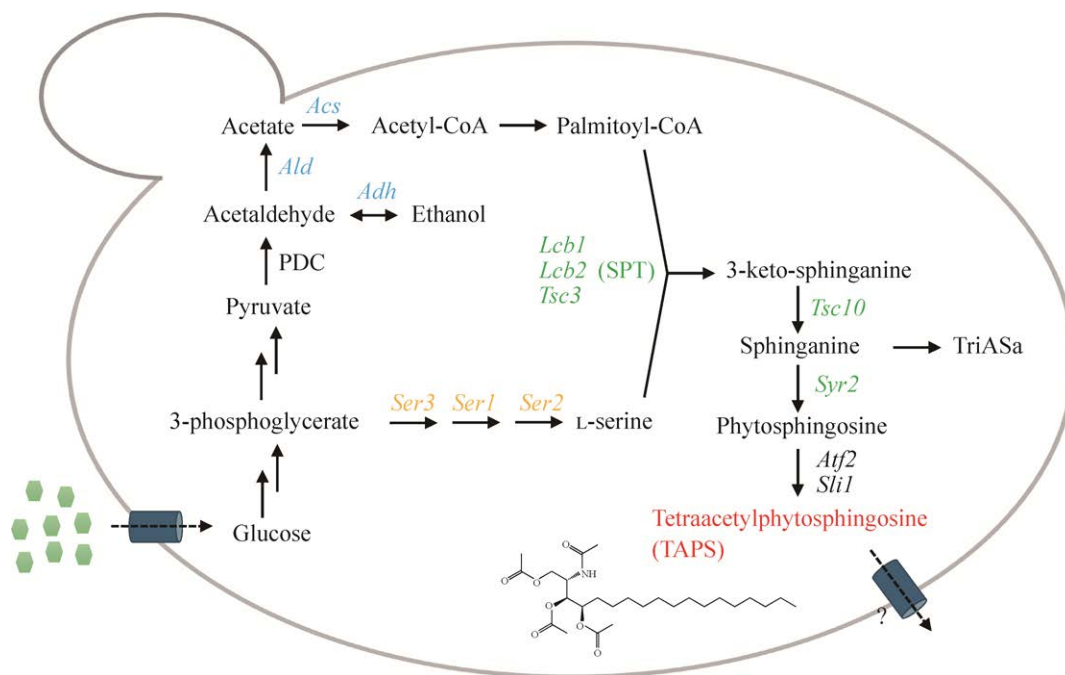


图 1 TAPS 合成途径 *Lcb1*、*Lcb2*、*Tsc3*: 丝氨酸棕榈酰转移酶各亚基基因; *Tsc10*: 3-酮二氢鞘氨醇还原酶基因; *Syr2*: C₄-羟化酶基因; *Ser1*: 磷酸丝氨酸氨基转移酶基因; *Ser2*: 磷酸丝氨酸磷酸化酶基因; *Ser3*: 3-磷酸甘油酸脱氢酶基因; *Acs*: 乙酰辅酶 A 合成酶基因; *Ald*: 乙醛脱氢酶基因; *Adh*: 乙醇脱氢酶基因; “?”表示未知的途径。

Figure 1 The synthesis pathway of TAPS. *Lcb1*, *Lcb2*, *Tsc3*: Serine palmitoyltransferase genes for each subunit; *Tsc10*: 3-ketodihydrosphingosine reductase gene; *Syr2*: C₄-hydroxylase gene; *Ser1*: Phosphoserine aminotransferase gene; *Ser2*: Phosphoserine phosphoryltransferase gene; *Ser3*: 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene; *Acs*: Acetyl coenzyme A synthetase gene; *Ald*: Acetaldehyde dehydrogenase gene; *Adh*: Ethanol dehydrogenase gene; “?” indicates unknown pathway.

自 20 世纪 90 年代起, 几家国外公司便开始对威克汉姆西弗酵母进行工业生产和研究, 通过对威克汉姆西弗酵母进行紫外线照射、诱变剂(甲基磺酸乙酯、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍)处理来筛选高产 TAPS 诱变菌株^[22-24]。同时, 还通过诱导其有性生殖产生子囊孢子筛选高产 TAPS 的单倍体菌株^[25]。此外, 还通过代谢工程改造构建高产 TAPS 的菌株^[26-28]。然而, 截至目前, 国内尚未见针对威克汉姆西弗酵母系统的研究及改造技术的研究。

基于以上结果, 本研究通过探索可用的自主复制元件、寻找不同强度的启动子元件以建立威

克汉姆西弗酵母遗传操作系统, 将其应用于 TAPS 的生产研究。同时, 建立了高效的威克汉姆西弗酵母单倍体制备方法及交配型鉴定方法, 在筛选到的单倍体菌株基础上通过使用常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变技术与本研究建立的遗传操作系统构建高产 TAPS 威克汉姆西弗酵母单倍体菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本研究所用质粒见表 1, 所用菌株见表 2。

表 1 本研究所用质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Descriptions	Sources
pMD18T-cen-nat	Contains centromeric sequence and norethisterone resistance gene	This study
pRS426-nat	Contains 2 μ replication origin and norethisterone resistance gene	This study
p18CN-PENO1-SYR2-TENO1	Contains <i>Syr2</i> gene	This study
p18CN-PENO1-LCB2-TENO1	Contains <i>Lcb2</i> gene	This study

表 2 本研究所用菌株

Table 2 Strains used in this study

Strains	Descriptions	Sources
<i>Wickerhamomyces ciferrii</i> ATCC14091	Diploid standard strain	American Type Culture Collection
<i>W. ciferrii</i> CBS 1990	a-type haploid standard strain	CBS (National Collection of Type Cultures)
<i>W. ciferrii</i> CBS 1991	a-type haploid standard strain	CBS (National Collection of Type Cultures)
<i>W.c</i> 1990/cen-nat	Contains plasmid pMD18T-cen-nat	This study
<i>W.c</i> 1990/2 μ -nat	Contains plasmid pRS426-nat	This study
<i>W.c</i> 14091/cen-nat	Contains plasmid pMD18T-cen-nat	This study
<i>W.c</i> 14091/2 μ -nat	Contains plasmid pRS426-nat	This study
<i>W.c</i> 38	α -type haploid screening strain	This study
<i>W.c</i> 99	α -type haploid screening strain	This study
<i>W.c</i> 105	a-type haploid screening strain	This study
<i>W.c</i> 133	a-type haploid screening strain	This study
<i>W.c</i> 140	a-type haploid screening strain	This study
<i>W.c</i> 140-A9	Mutant strain	This study
<i>W.c</i> 140-A11	Mutant strain	This study
<i>W.c</i> 140 OESyr2	Overexpression strain	This study
<i>W.c</i> 140 OELcb2	Overexpression strain	This study

1.1.2 主要试剂与仪器

Seamless Assembly Cloning Kit, Clone Smarter 公司; PrimeSTAR 聚合酶, TaKaRa 公司; 限制性内切酶, Thermo 公司; 大肠杆菌 TOP 10 感受态、Ezup 柱式酵母基因组 DNA 抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR 产物回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、HiPure Fungal RNA Mini Kit, 广州美基生物科技有限公司; Evo M-MLV 反转录试剂盒, 湖南艾科瑞生物工程有限公司; Zymolyase-20T、硫酸诺尔丝菌素, 上海懋康生物科技有限公司; TAPS 标准品、碘化丙啶(propidium iodide, PI), Sigma 公司。紫外可见分光光度计, Eppendorf 公司; 多功能酶标仪, Tecan 公司; 高效液相色谱仪, Agilent Technologies 公司。

1.1.3 主要培养基及溶液

种子培养基——酵母提取物蛋白胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD): 细菌学蛋白胨 20 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L。

发酵培养基——long chain base nutrient broth (LCBNB): 酵母提取物 0.700 g/L, 葡萄糖 44.000 g/L, 七水硫酸镁 0.880 g/L, 二水氯化钙 0.220 g/L, 氯化铵 4.830 g/L, 氯化钠 0.300 g/L, 磷酸二氢钾 1.000 g/L, 邻苯二甲酸氢钾 20.000 g/L, 微量元素(每 L 中含: 96% 硫酸 20.000 mL, 一水合柠檬酸 50.000 g, 七水硫酸亚铁 48.000 g, 七水硫酸锌 16.700 g, 七水硫酸铜 2.500 g, 一水硫酸锰 1.880 g, 硼酸 2.000 g, 碘化钾 0.500 g) 0.300 mL/L, 维生素(每 L 中含: 96%硫酸 3.600 mL, 烟酸 2.000 g, D-泛酸钙 2.000 g, 硫胺素 2.000 g, 吡哆醇 0.320 g, D-生物素 0.016 g) 0.150 mL/L。

YMgI 培养基: 酵母提取物 3 g/L, 麦芽提取物 3 g/L, 细菌学蛋白胨 5 g/L, 甘油 3 g/L。

MA 培养基: 麦芽提取物 50 g/L, 琼脂 45 g/L。

改良 McClary 培养基: 葡萄糖 20.000 g/L, 氯化钾 1.800 g/L, 醋酸钠 8.200 g/L, 七水硫酸锌 0.127 g/L, 琼脂 20.000 g/L。

WCCB 培养基^[29]: 醋酸钠 7.60 g/L, 氯化钾 17.40 g/L, 硫酸镁 0.18 g/L, 葡萄糖 0.90 g/L, 琼脂粉 15.00 g/L。

Solution A: 1.00 mol/L 山梨醇, 0.01 mol/L N,N-二羟乙基甘氨酸(pH 8.35), 3% (体积比)乙二醇。

Solution B: 40% (质量体积比) PEG 1000, 0.20 mol/L bicine (pH 8.35)。

Solution C: 0.15 mol/L NaCl, 0.01 mol/L bicine (pH 8.35)。

FACS 缓冲液: 0.20 mol/L Tris-HCl, 0.02 mol/L EDTA, 调整 pH 至 7.40。

1.2 方法

1.2.1 荧光重组表达载体及过表达载体的构建与转化

本研究所有载体构建及大肠杆菌转化方法详见参考文献[30]。

威克汉姆西弗酵母感受态制备: 取出威克汉姆西弗酵母甘油保藏管, 在 YPD 固体培养基上划线, 30 °C 培养 48 h。挑取单菌落到 20 mL YPD 液体培养基中, 30 °C、250 r/min 摇床培养过夜。控制起始 $OD_{600}=0.15$ 转接对应体积的菌体至 100 mL YPD 液体培养基中(250 mL 摇瓶), 30 °C、250 r/min 培养至 $OD_{600}=0.6-1.0$ 。将菌液倒入无菌离心管中, 4 °C 离心 5 min 收集菌体。加入 50 mL solution A, 轻轻吹打使菌体重悬, 4 °C 离心 5 min 收集菌体, 重复洗涤 2 次。用 2 mL solution A 重悬菌体, 每管分装 200 μ L 至 2 mL 无菌离心管中, 放置于 -80 °C 超低温冰箱保存。

威克汉姆西弗酵母转化: 将 10 μ L DNA 与

carrier DNA 充分混匀后, 加入威克汉姆西弗酵母感受态中, 使用恒温混匀仪 37 °C、800 r/min 匀速振荡 10 min。加入 1.5 mL solution B, 置于 30 °C 水浴摇床, 100 r/min 孵育 1 h。离心 5 min 收集菌体, 使用 1 mL solution C 重悬菌体。离心 5 min 收集菌体, 加入 1 mL YPD 液体培养基, 30 °C、250 r/min 孵育 4 h。离心 5 min 收集菌体, 使用 200 μL YPD 液体培养基重悬菌体, 涂布于含诺尔丝菌素的 YPD 固体培养基上, 于 30 °C 培养, 待转化子长出进行鉴定。

1.2.2 菌株发酵培养及生长情况检测

将-80 °C 保藏的威克汉姆西弗酵母菌株在 YPD 固体培养基进行划线, 在 30 °C 恒温培养箱中倒置培养 48 h; 挑取单菌落接种于装有 25 mL YPD 液体培养基的 100 mL 三角瓶中, 30 °C、250 r/min 培养 72 h 作为发酵种子液, 采用紫外可见分光光度计检测 OD_{600} 。接种至装有 100 mL LCBNB 培养基的 500 mL 摇瓶中, 控制起始 OD_{600} 为 0.15, 30 °C、250 r/min 培养 96 h。

1.2.3 TAPS 的提取与检测

取 1 mL 发酵液离心 30 min 收集菌体, 加入 1 mL 甲醇进行充分提取, 挥发掉上清后, 将沉淀重新溶解在 200 μL 甲醇中, 此为高效液相色谱检测的样品。使用 ZORBAX SB-C8 column (Agilent, 4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) 连接波长设定为 200 nm 的紫外检测器, 流动相 A 由水 (18.45%, 体积比) 和三氟乙酸 (0.05%, 体积比) 组成, 流动相 B 为甲醇 (81.5%, 体积比), 以 0.5 mL/min 的流速在 60 °C 的柱温下运行 35 min。菌体干重测定方法为: 取已知重量的干燥离心管装满 1 mL 菌液, 离心 10 min 后丢弃上清, 完全蒸干离心管中残留的培养基, 再次测量重量, 相减后获得菌体干重。

1.2.4 荧光强度测定

取 200 μL 菌液转移至 96 孔微量酶标板中,

用 Tecan Infinite M200 酶标仪检测荧光。荧光程序: 激发 488 nm, 发射 520 nm, 增益值 100。同时在 600 nm 处进行细胞密度检测。采用不含荧光的对照菌株进行荧光校正, 随后按照公式 (1) 计算相对荧光强度 ($FI_{corrected}$)。

$$FI_{corrected} = \frac{FI}{OD_{600}} - \frac{FI_{control}}{OD_{600(control)}} \quad (1)$$

1.2.5 诱导威克汉姆西弗酵母孢子形成

挑取新鲜的 YPD 固体培养基上的威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091 单菌落接种于 YMgI 液体培养基中, 25 °C 培养 3 d。吸取 200 μL 培养液均匀涂布于固体孢子形成培养基上, 25 °C 培养 7 d, 其间每天均在显微镜下观察孢子的形成情况, 统计 5 个视野中的酵母总数和孢子数, 使用公式 (2) 计算产孢率:

$$\text{产孢率} \% = \frac{\text{孢子数}}{\text{总细胞数}} \quad (2)$$

1.2.6 威克汉姆西弗酵母孢子的分离

待大量孢子生成时, 蘸取适量固体孢子形成培养基上的菌体制成 2 mL 菌悬液 (控制菌体含量在 10^8 个细胞/mL), 55 °C 水浴处理 5 min 后离心 5 min 收集菌体。加入 1 mL PBS 缓冲液重悬后离心 5 min 收集菌体。再加入 1 mL PBS 缓冲液和 5 μL β-巯基乙醇, 在 30 °C 的水浴摇床中 100 r/min 均匀振荡 30 min。离心 5 min 收集菌体后加入 1 mL Zymolyase-20T (10 mg/mL), 30 °C、100 r/min 下反应 2 h。将菌液稀释合适倍数后涂布至 YPD 固体培养基上培养产生单菌落, 挑取单菌落于固体 MA 培养基中进行二次培养。

1.2.7 RT-PCR 与流式细胞术鉴定酵母倍性

离心收集菌体后用无菌水清洗去除培养基, 置于-80 °C 冰箱冷冻, 随后研磨至细小的粉末, 酵母总 RNA 的提取按照 HiPure Fungal RNA Mini Kit 的说明书进行, RNA 反转录采用

Evo M-MLV 反转录试剂盒的方法。RT-PCR 引物序列见表 3, 反应条件为: 预变性 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

表 3 RT-PCR 引物列表

Table 3 Primers used in RT-PCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')
MATa JD-F	TACAGAAAGGCTATTGAGGC
MATa JD-R	GTTGTCTCTCTCTGCTGTTT
MAT α 1 JD-F	CAACTGTTACTTTAGTCGCC
MAT α 1 JD-R	CAAGTATTGTCTCCAGTTCC
MAT α 2 JD-F	TCCACTCTATTAGGCTCTTC
MAT α 2 JD-R	TCTCTGTATCTAGGACCAC

收集 0.5 mL 生长至对数期($OD_{600}=0.6-0.8$)的酵母细胞, 低温下用 70%乙醇进行透化和固定; 用 0.5 mL FACS 缓冲液洗涤固定的细胞, 加入 100 μ L RNase A (1 mg/mL), 37 °C 孵育 2 h; 再用 1 mL 1 \times PBS 洗涤, 加入 100 μ L 碘化丙啶 (50 μ g/mL), 4 °C 过夜染色; 加入 900 μ L 1 \times PBS 后, 过 200 目洗净无菌滤网到流式管中, 作为流式检测的样品。

1.2.8 数据分析

所有数据的测定均进行 3 次独立的生物学重复, 使用 Excel 及 PowerPoint 进行数据统计和图表制作。数据处理及分析使用 GraphPad Prism 9 和 FlowJo X 软件, 并使用 *t* 检验来确定本研究中各结果的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 威克汉姆西弗酵母遗传操作系统的建立

威克汉姆西弗酵母 α 型单倍体为低 TAPS 生产菌株, 表现为不生产 TAPS 或产量较低, 而 a 型单倍体菌株的 TAPS 产量通常较高, 部分甚至优于双倍体菌株^[6]。在 LCBNB 培养基中, 双倍体 ATCC14091 生产 TAPS 产量可以达

到 7.35 mg/g, 滴度 52.28 mg/L, α 型单倍体 CBS1991 不具备生产 TAPS 的能力, 而 a 型单倍体 CBS1990 生产 TAPS 性能较差, 产量为 2.85 mg/g, 滴度仅为 15.23 mg/L, 远远不及双倍体 ATCC14091 (图 2A、2B)。

遗传工程中最关键的步骤是构建稳定的表达载体。为了确保转化子的正确筛选, 利用经密码子优化的诺尔丝菌素抗性基因作为标记。同时, 由于并未挖掘到威克汉姆西弗酵母内源性自主复制元件, 为了保证质粒在该酵母中自主复制, 采用酿酒酵母来源的 CEN 着丝粒序列及 2 μ 复制原点, 构建了专门针对威克汉姆西弗酵母的穿梭质粒, 并系统评估了不同复制元件对其生长的影响。通过转化获得含 CEN 着丝粒序列的威克汉姆西弗酵母菌株(*W.c* 1990/*cen-nat*, *W.c* 14091/*cen-nat*)以及含 2 μ 复制原点的威克汉姆西弗酵母菌株(*W.c* 1990/2 μ -*nat*, *W.c* 14091/2 μ -*nat*)。对于威克汉姆西弗酵母单倍体 CBS1990, 在 YPD 培养基中, 无论是含哪种复制原点质粒, 培养 4 d 后 OD_{600} 能达到 20 以上; 然而, 在 LCBNB 培养基中, 菌株 *W.c* 1990/*cen-nat* 在生长 4 d 后, OD_{600} 能够达到 6 左右, 与不含质粒的对照菌株 *W.c* 1990 生长情况相似, 但菌株 *W.c* 1990/2 μ -*nat* 在 4 d 的培养过程中, OD_{600} 一直维持在 1 以下。对于威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091, 无论携带哪种复制原点的质粒, 在上述不同培养条件下, 均不会造成生长抑制 (图 2C)。LCBNB 培养基与 YPD 培养基的主要差异在于缺少有机氮源。为了探究氮源是否对 LCBNB 培养的菌株 *W.c* 1990/2 μ -*nat* 造成了生长抑制, 将在 LCBNB 培养基中的菌株 *W.c* 1990/2 μ -*nat* 转接至 LCBNBP 培养基(额外添加了 20 g/L 蛋白胨的 LCBNB)中。此操作解除了其生长限制, 使得 *W.c* 1990/2 μ -*nat* 在 LCBNBP 培养基中的 OD_{600} 值达到 14.25 (图 2D)。这一发

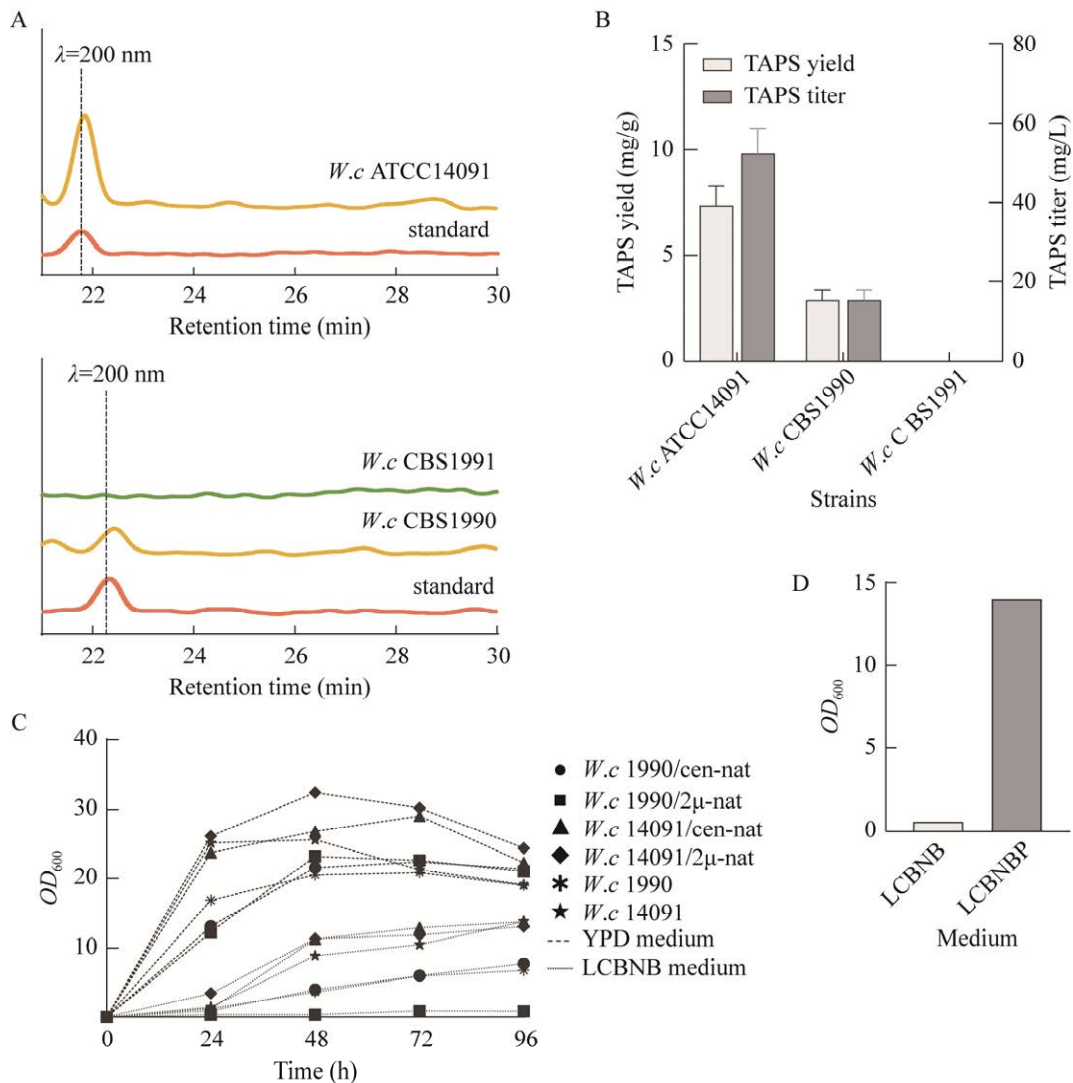


图2 威克汉姆西弗酵母标准菌株 TAPS 的生产性能及不同培养基下菌株生长差异的比较 A: 威克汉姆西弗酵母 ATCC14091、CBS1990 和 CBS1991 发酵液 HPLC 结果; B: 威克汉姆西弗酵母 ATCC14091、CBS1990、CBS1991 TAPS 产量及滴度比较; C: 含不同复制原点的威克汉姆西弗酵母菌株在 YPD 和 LCBNB 下的生长差异比较; D: 菌株 *W.c* 1990/2μ-nat 在 LCBNB 和 LCBNBP 下生长差异比较。

Figure 2 TAPS production performance of *W. ciferrii* standard strains and comparison of growth in different media. A: HPLC results of fermentation broths of *W. ciferrii* ATCC14091, CBS1990 and CBS1991; B: Comparison of TAPS yields and titers for *W. ciferrii* ATCC14091, CBS1990, and CBS1991; C: Comparison of growth differences between *W. ciferrii* strains containing different replication origins under YPD and LCBNB; D: Comparison of growth differences of *W.c* 1990/2μ-nat under LCBNB and LCBNBP.

现表明,游离质粒的高拷贝复制依赖于氮源以提供能量和反应底物。相比之下,双倍体因其较强的鲁棒性,对外界培养条件的变化具有更好的适应能力,其生长和质粒复制基本不会被影响。

先前的研究已经报道了使用烯醇化酶启动子 P_{ENO1} 、3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子 P_{GAPDH} 以及丙酮酸脱氢酶复合物 α 亚基启动子 P_{PDA1} 在威克汉姆西弗酵母中表达抗性基因或与代谢途径

相关的基因^[26-27]。为了构建更为多样化的威克汉姆西弗酵母表达系统,仅依赖少数已知的启动子元件显然是不够的。因此,本研究根据酿酒酵母常用的启动子,选取了5个中心代谢途径相关的启动子:翻译延伸因子启动子 P_{TEF1} 、乙醇脱氢酶启动子 P_{ADH} 、丙糖磷酸异构酶 P_{TPI1} 、丙酮酸脱氢酶 P_{PDC} 以及苹果酸脱氢酶 P_{MDH} 。除此之外,根据威克汉姆西弗酵母 CBS1990 转录组数据分析选取了3个不同表达强度的启动子:硬脂酰辅酶 A 去饱和酶启动子 P_{655} 、肌动蛋白 $\beta/\gamma 1$ 启动子 P_{6616} 、NADH 脱氢酶启动子 P_{4705} 。通过荧光测定发现,所有的重组荧光表达菌株均表现出不同程度的绿色荧光,表明这些内源性启动子均能有效驱动在威克汉姆西弗酵母单倍体 CBS1990 中 meGFP 的转录表达(图 3A)。根据校正后的荧光强度,表征为强启动子($FI_{corrected} > 5\ 000$)的有3个: P_{ENO1} 、 P_{GAPDH} 、 P_{PDC} , 表征为中等强度启动子的($FI_{corrected} = 500-2\ 000$)有5个: P_{MDH} 、 P_{655} 、 P_{ADH} 、 P_{6616} 、 P_{4705} , 表征为低强度启动子的($FI_{corrected} < 500$)有3个: P_{TEF1} 、 P_{TPI1} 、 P_{PDA1} (图 3B)。

2.2 过量表达 TAPS 合成相关基因对产物合成的影响

为了探究 TAPS 合成途径中过量表达基因对目标产物合成的影响,采用了表征为强组成型启动子 P_{ENO1} , 针对鞘脂代谢的关键途径,以及丝氨酸和棕榈酰辅酶 A 这2种前体物质的合成相关基因,在威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091 中进行过量表达。

首先,对鞘脂代谢内部基因进行过量表达(图 4A)。过表达 *Tsc3* 和 *Tsc10* 后,与对照菌株相比,TAPS 产量分别增加了 17.07%和 20.00%。而过表达编码其中一个 SPT 的亚基 *Lcb1* 后,产量没有显著改变;过表达另一个亚基 *Lcb2* 后,产量达到 9.72 mg/g,提高了 32.24%。影响最

为显著的是过表达 *Syr2* 基因,该基因所编码的 C4-羟化酶催化二氢鞘氨醇转变为植物鞘氨醇。相较于威克汉姆西弗酵母野生型双倍体 ATCC14091 来说,过表达该基因后的菌株 TAPS 产量达到 14.91 mg/g,提升了 2.03 倍。过表达 *Syr2* 能够显著提高 TAPS 的产量,主要是因为 *Syr2* 编码的 C4-羟化酶能催化 TAPS 的直接前体物植物鞘氨醇的合成。过表达 SPT 各亚基因以及 *Tsc10* 基因虽然增加了二氢鞘氨醇的产量,但二氢鞘氨醇也能被转化为鞘脂代谢的另一个产物三乙酰基植物鞘氨醇,因此对 TAPS 产量的提高效果并不明显。

此外,还对前体丝氨酸合成(*Ser1*, *Ser2*, *Ser3*)和乙酰辅酶 A 合成(*Acs1*, *Acs2*, *Ald1*, *Adh2*)相关基因进行过表达,发现相对于标准双倍体菌株,过表达这些基因并没有显著提高 TAPS 的产量(图 4B)。对于丝氨酸合成基因的过表达来说,由于微生物体内氨基酸的代谢处于一个较为平衡的状态,途径基因的过表达几乎不会影响代谢平衡。外加丝氨酸前体能够影响 TAPS 的产量可能是由于细胞内丝氨酸的可用量增加间接影响鞘脂的生物合成途径,从而导致轻微的 TAPS 的量增加。这与整合过量表达丝氨酸代谢相关基因^[26]相似,均没有对产量产生显著影响。而在胞质中,乙酰辅酶 A 的合成主要依赖于以下2个途径:柠檬酸裂解酶途径通常存在于产油酵母中^[31],威克汉姆西弗酵母缺乏 *Acl* 基因,这表明在威克汉姆西弗酵母中不使用该途径合成乙酰辅酶 A。丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)旁路途径是酵母中普遍存在的乙酰辅酶 A 合成的主要途径^[32]。乙酰辅酶 A 不仅是多重中心碳代谢的枢纽物质,其合成后也可能流向形成其他底物的通路,在威克汉姆西弗酵母中,并非所有的乙酰辅酶 A 都用于合成棕榈酰辅酶 A。过表达

PDH 旁途径中乙酰辅酶 A 合成相关基因对 TAPS 的产量影响不大。

2.3 威克汉姆西弗酵母子孢子的诱导及单倍体初筛方法的建立

虽然理论上在威克汉姆西弗酵母单倍体

CBS1990 上进行基因工程操作较为便利,但是相比于威克汉姆西弗酵母 ATCC14091,其初始产量偏低。因此,从威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091 中分离并筛选出一株高产 TAPS 的单倍体菌株显得尤为关键。在单倍体筛选的过

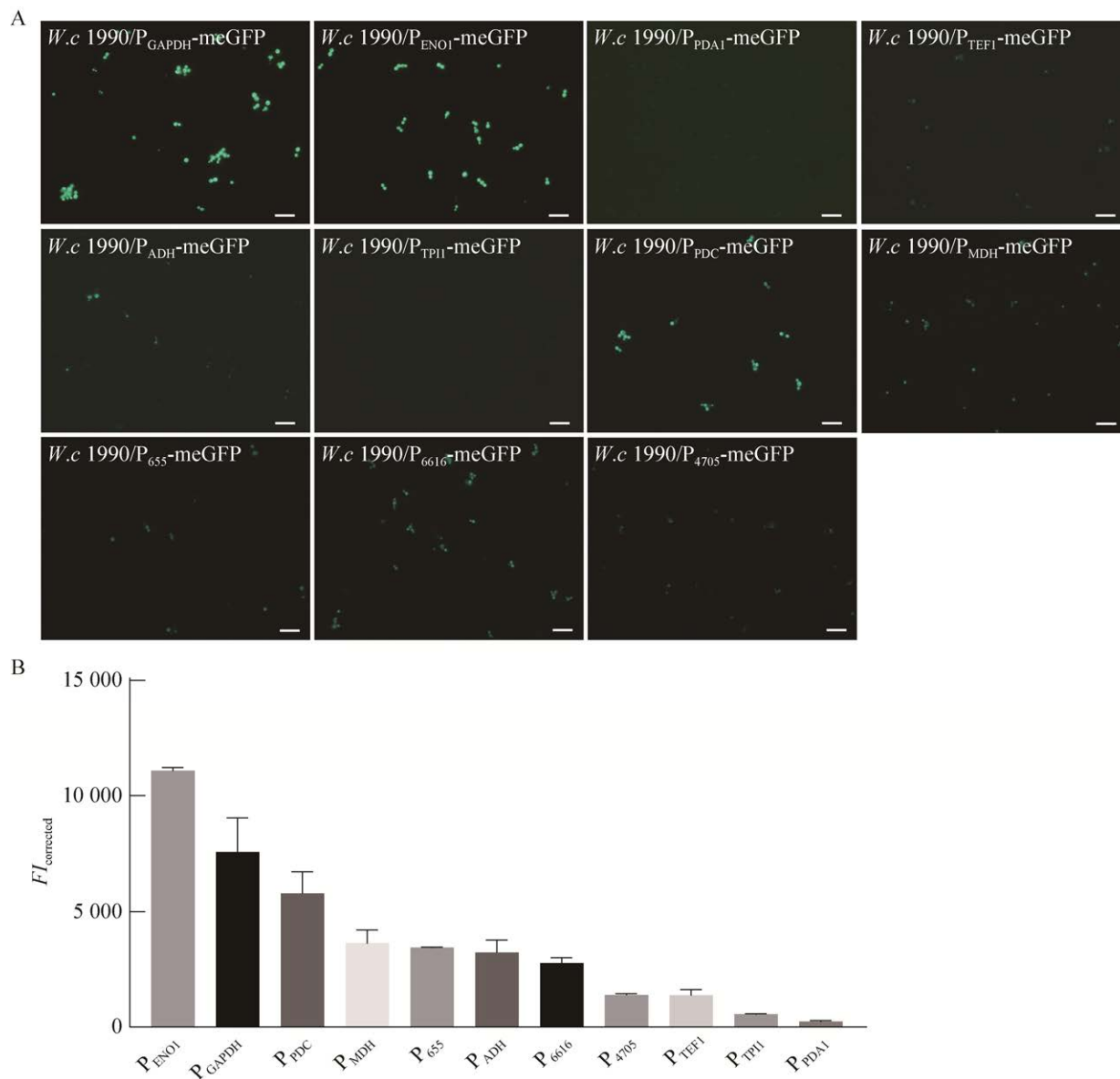


图 3 威克汉姆西弗酵母内源启动子的筛选 A: 威克汉姆西弗酵母单倍体重组菌株的荧光观察。Bar=10 μ m。B: 不同启动子在威克汉姆西弗酵母 CBS1990 中的强度表征。

Figure 3 Screening for endogenous promoters in *W. ciferrii*. A: Fluorescence observation of haploid recombinant strains of. Bar=10 μ m. B: Characterization of the relative fluorescence intensities of different promoters in *W. ciferrii* CBS1990.

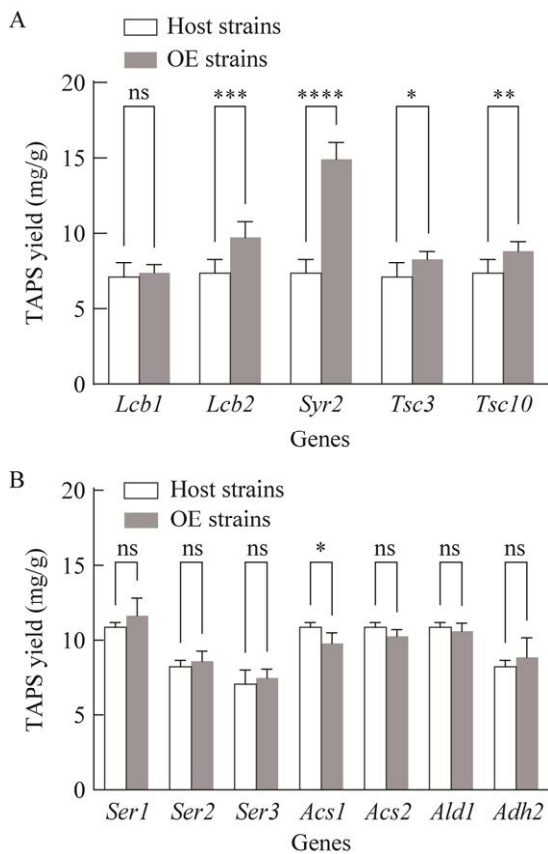


图 4 过量表达不同基因对 TAPS 产量的影响
A: 过量表达鞘脂代谢相关基因对 TAPS 产量的影响; B: 过量表达丝氨酸合成和乙酰辅酶 A 合成相关基因对 TAPS 产量的影响。****表示 $P \leq 0.0001$, ***表示 $P \leq 0.001$, **表示 $P \leq 0.01$, *表示 $P \leq 0.05$, ns 表示 $P > 0.05$ 。

Figure 4 The effect of overexpression of different genes on the yield of TAPS. A: Effects of overexpression of sphingolipid metabolism-related genes on TAPS production. B: Effects of overexpression of genes related to serine synthesis and acetyl-CoA synthesis on the production of TAPS. **** means $P \leq 0.0001$, *** means $P \leq 0.001$, ** means $P \leq 0.01$, * means $P \leq 0.05$, ns means $P > 0.05$.

程中, 子囊孢子的形成及其数量显著影响着高产菌株的筛选效率。在威克汉姆西弗酵母减数分裂过程中, 遗传物质的重组和错配作用产生广泛的基因多样性, 进而形成数千至数万种遗

传背景不同的子囊孢子。提高产孢率能直接扩大具有高产 TAPS 特性单倍体菌株的筛选概率。

因此, 本研究使用 3 种不同的孢子形成培养基(改良 McClary 培养基、MA 培养基和 WCCB 培养基)培养威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091, 诱导其产孢 7 d 后, 观察不同培养基平板上的菌体状态。WCCB 培养基中生长的威克汉姆西弗酵母孢子呈现较大圆球状, 每个子囊内约有 2-4 个子囊孢子, 培养 7 d 时产孢率约为 51.11%。改良 McClary 培养基上生长的威克汉姆西弗酵母通常呈现出芽生殖现象, 产生的子囊孢子数极少, 培养 7 d 时产孢率约为 8.97%。MA 培养基中生长的威克汉姆西弗酵母出现较多的假丝状菌体, 并且能够观察到异宗生殖酵母属独有的帽状孢子, 培养 7 d 后产孢率可达 62.34% (表 4)。由上述结果可以看出, 在威克汉姆西弗酵母中, 醋酸钠和锌离子诱导产孢的效果^[33]并不显著。然而, 在缺乏氮源和可发酵性碳源的环境下生长, 可以显著促进其产孢。

表 4 不同孢子形成培养基中威克汉姆西弗酵母的产孢率(%)

Table 4 Spore production rate (%) of *W. ciferrii* in different sporulation media

Sporulation medium	Incubation time (d)			
	4	5	6	7
Modified McClary medium	4.88	5.13	7.26	8.97
MA medium	41.23	49.11	56.73	62.34
WCCB medium	36.84	45.05	47.74	51.11

将 3 株标准株(威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091、威克汉姆西弗酵母单倍体 CBS1990 和 CBS1991)点板于 MA 培养基平板上, 观察其表型差异(图 5A)。在 MA 培养基上生长时, 不同倍型菌落的表型存在明显差异, 除了双倍体菌落的大小明显大于单倍体外, 它们在菌落形

态和颜色上也有较大区别。威克汉姆西弗酵母 CBS1990 (a 型)的菌落呈乳白色, 边缘较为平整, 中心呈凸起; 而威克汉姆西弗酵母 CBS1991 (α 型)的菌落为淡黄色, 边缘呈锯齿状。在孢子形成培养基上生长 7 d 的威克汉姆西弗酵母 ATCC 14091 经过水浴处理和酶解后, 进行涂布。将生长出的单菌落分别点板至 MA 培养基上, 通过观察菌落形态的差异, 可初步筛选出单倍体候选菌株(图 5B)。

2.4 威克汉姆西弗酵母单倍体菌株交配型的鉴定及单倍体筛选株 TAPS 产量测定

酿酒酵母单倍体的交配型可通过扩增基因组中的 $MATa/MAT\alpha$ 基因直接确定。然而, 由于不同倍型的威克汉姆西弗酵母基因组均含 1 个 $MATa$ 基因和 2 个 $MAT\alpha$ 基因($MAT\alpha 1, MAT\alpha 2$)^[34],

仅依靠基因组扩增方法无法进行鉴定。鉴于交配型差异可能由交配型相关基因表达差异引起, 根据转录组数据分析, 威克汉姆西弗酵母 ATCC14091 和 CBS1990 均表达 3 种交配型基因, 而 CBS1991 仅表达 2 种 $MAT\alpha$ 基因, 不表达 $MATa$ 基因(图 6A)。同时, 分别用引物 $MATa$ JD-F/ $MAT\alpha 1$ JD-F/ $MAT\alpha 2$ JD-F 和 $MATa$ JD-R/ $MAT\alpha 1$ JD-R/ $MAT\alpha 2$ JD-R 扩增不同菌株的 $MATa$ 、 $MAT\alpha 1$ 、 $MAT\alpha 2$ 基因, 通过琼脂糖凝胶电泳分析其差异。对于 $MATa$ 基因, 在威克汉姆西弗酵母单倍体 CBS1990 和双倍体 ATCC14091 中, 均可扩增出对应的 289 bp 条带。相反, CBS1991 无法扩增出此条带, 表明其不表达 $MATa$ 基因。对于 $MAT\alpha 1$ 和 $MAT\alpha 2$ 基因, 在 3 个菌株中均可扩增出对应的 293 bp 和

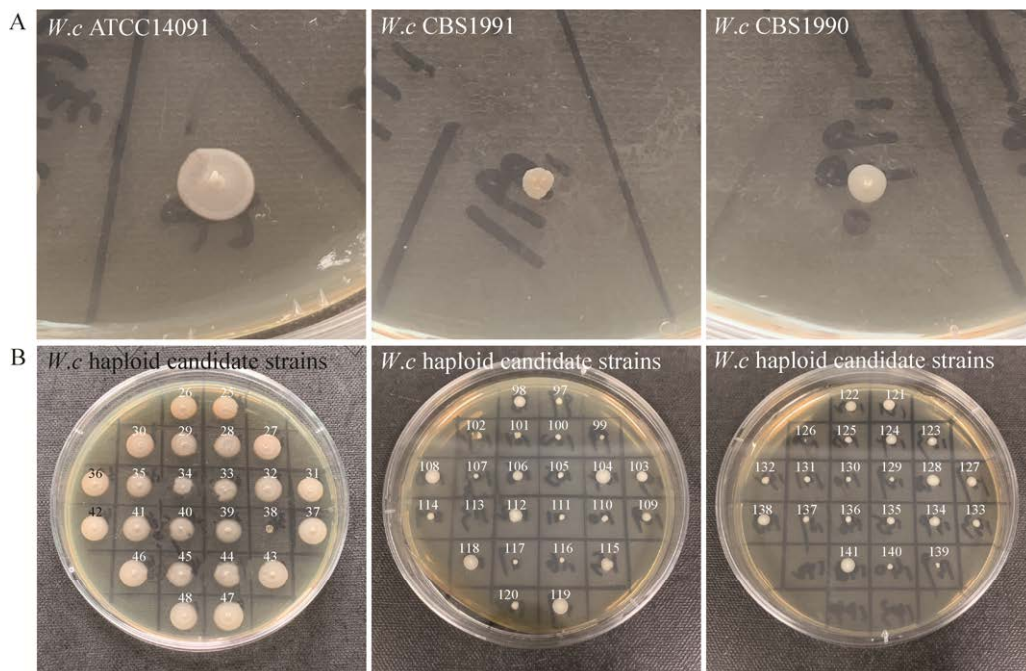


图 5 威克汉姆西弗酵母单倍体初筛菌落形态图 A: 威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091 和单倍体 CBS1990、CBS1991 在 MA 培养基上的表型差异; B: 威克汉姆西弗酵母单倍体候选株在 MA 培养基的表型初筛鉴定。

Figure 5 Morphology of haploid primary screening colonies of *W. ciferrii*. A: Phenotypic differences between *W. ciferrii* diploid ATCC14091 and haploid CBS1990, CBS1991 on MA medium; B: Identification of *W. ciferrii* haploid candidates for phenotypic priming on MA medium.

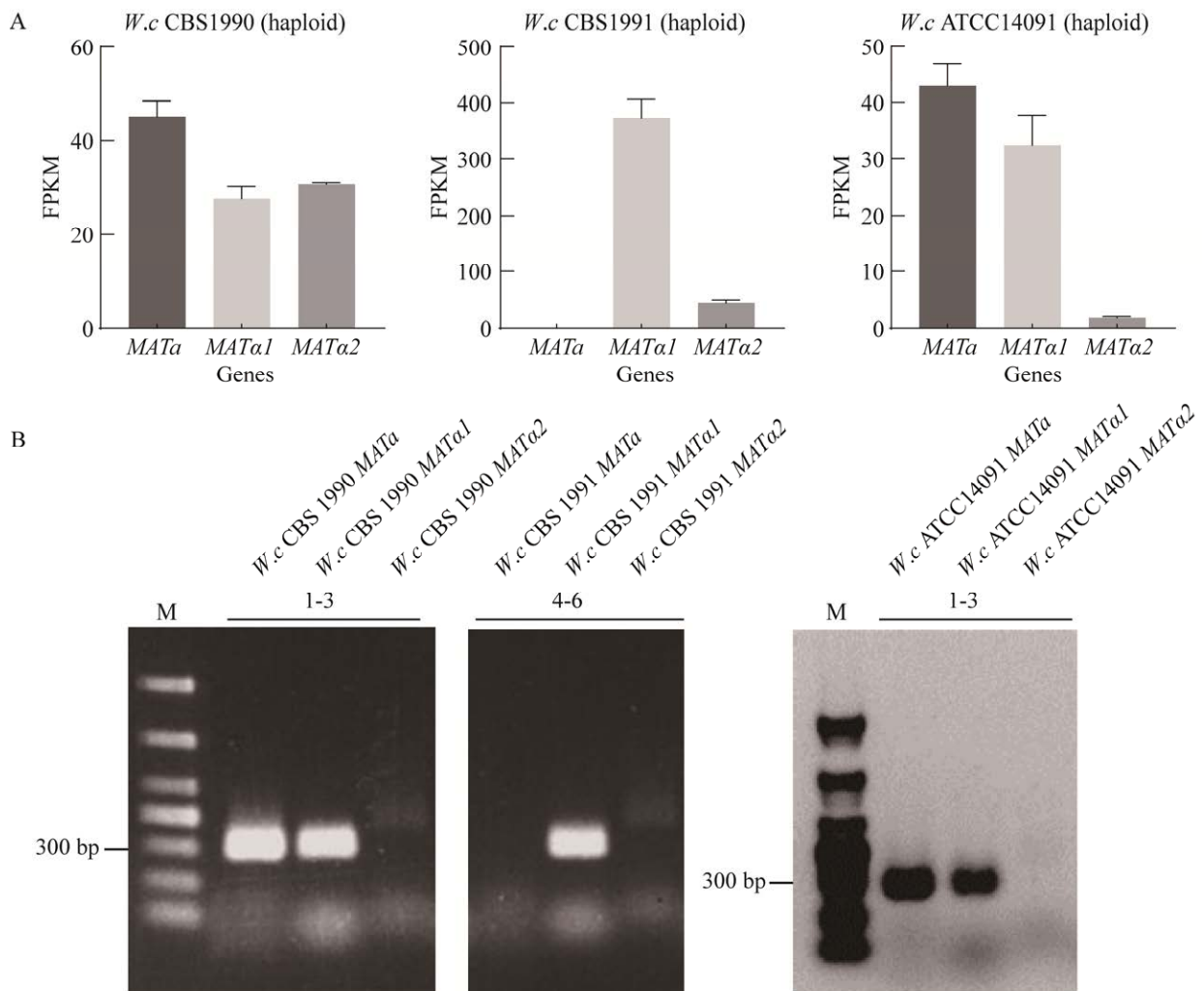


图6 威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091 和单倍体 CBS1990、CBS1991 交配型基因表达差异 A: 转录组测定结果; B: RT-PCR 鉴定结果。FPKM: 每千个碱基的转录每百万映射读取的 fragments。

Figure 6 Differential expression of mating genes in the *W. ciferrii* diploid ATCC14091 and haploid CBS1990, CBS1991. A: Transcriptome assay results; B: RT-PCR identification results. FPKM: Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments.

226 bp 条带,证明这 2 个基因均被表达(图 6B)。因此,通过 RT-PCR 技术可有效区分 α 型单倍体,使用该方法鉴定了所有筛选出的单倍体候选株。在这些候选株中,仅编号为 38 和 99 的 2 个菌株(后续命名为 *W.c* 38 和 *W.c* 99)未表达 *MATa* 基因,因此可以判定它们为 α 型单倍体(图 7)。由于威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091 和 α 型单倍体 CBS1990 均表达 3 个交配型基因,

这导致无法仅通过 RT-PCR 结果区分双倍体与 α 型单倍体菌株。考虑到单倍体与双倍体细胞的遗传物质含量差异,使用流式细胞术分析,在相同条件下,经染色的单倍体细胞核所产生的峰形会相对于双倍体出现前移现象。编号 105、133、140 的菌株(后续命名为 *W.c* 105、*W.c* 133、*W.c* 140)确认为单倍体(图 8),结合 RT-PCR 结果,这 3 株菌可确认为 α 型单倍体。本研究开发

的方法能够有效筛选威克汉姆西弗酵母的单倍体并确定其交配型。相对于以往依赖于观察孢子形成培养基上是否产生孢子的方法^[29], 本研究提出的方案显著增强了准确性与操作便捷性。

将本研究中筛选到的 5 株单倍体威克汉姆西弗酵母菌株与 3 株标准株(威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091、单倍体 CBS1990 和 CBS1991)进行 TAPS 生产性能比较。2 株 α 型单倍体筛选株 *W.c* 38、*W.c* 99 与标准 α 型单倍体 CBS1991 相同, 均没有检出 TAPS, 3 株 α

型单倍体均有生产 TAPS 的能力, 但性能仍较标准双倍体菌株产量低, 威克汉姆西弗酵母筛选株 *W.c* 133 TAPS 产量甚至不如标准 α 型单倍体 CBS1990, 而筛选株 *W.c* 105 和 *W.c* 140 TAPS 生产性能均优于标准 α 型单倍体 CBS1990, 其中, 菌株 *W.c* 140 生产 TAPS 性能最佳, 产量达到 4.74 mg/g, 滴度达到 32.61 mg/L (图 9A、9B)。

2.5 ARTP 诱变育种和遗传改造构建高产 TAPS 单倍体菌株

诱变育种可有效筛选获得耐应激菌株。为

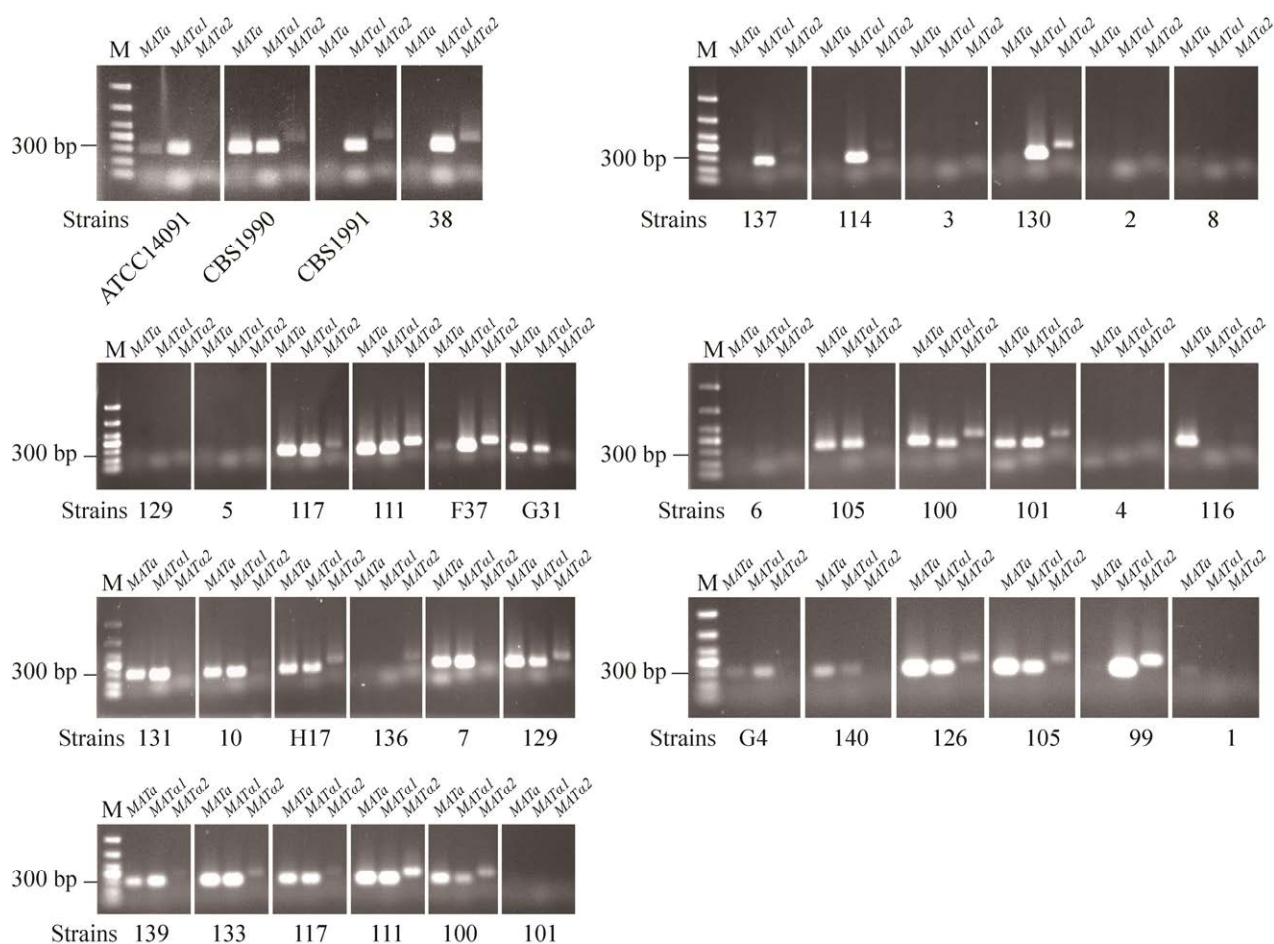


图 7 威克汉姆西弗酵母单倍体候选株 RT-PCR 鉴定结果 每组从左到右 3 条泳道分别为 *MATa*、*MATα1*、*MATα2* 验证。由于并非所有候选株都为单倍体, 故仅显示菌株编号。

Figure 7 RT-PCR identification results in haploid candidate strains of *W. ciferrii*. The three lanes in each group from left to right were validated for *MATa*, *MATα1*, *MATα2*. Since not all candidate strains are haploid, only the number of strains is shown.

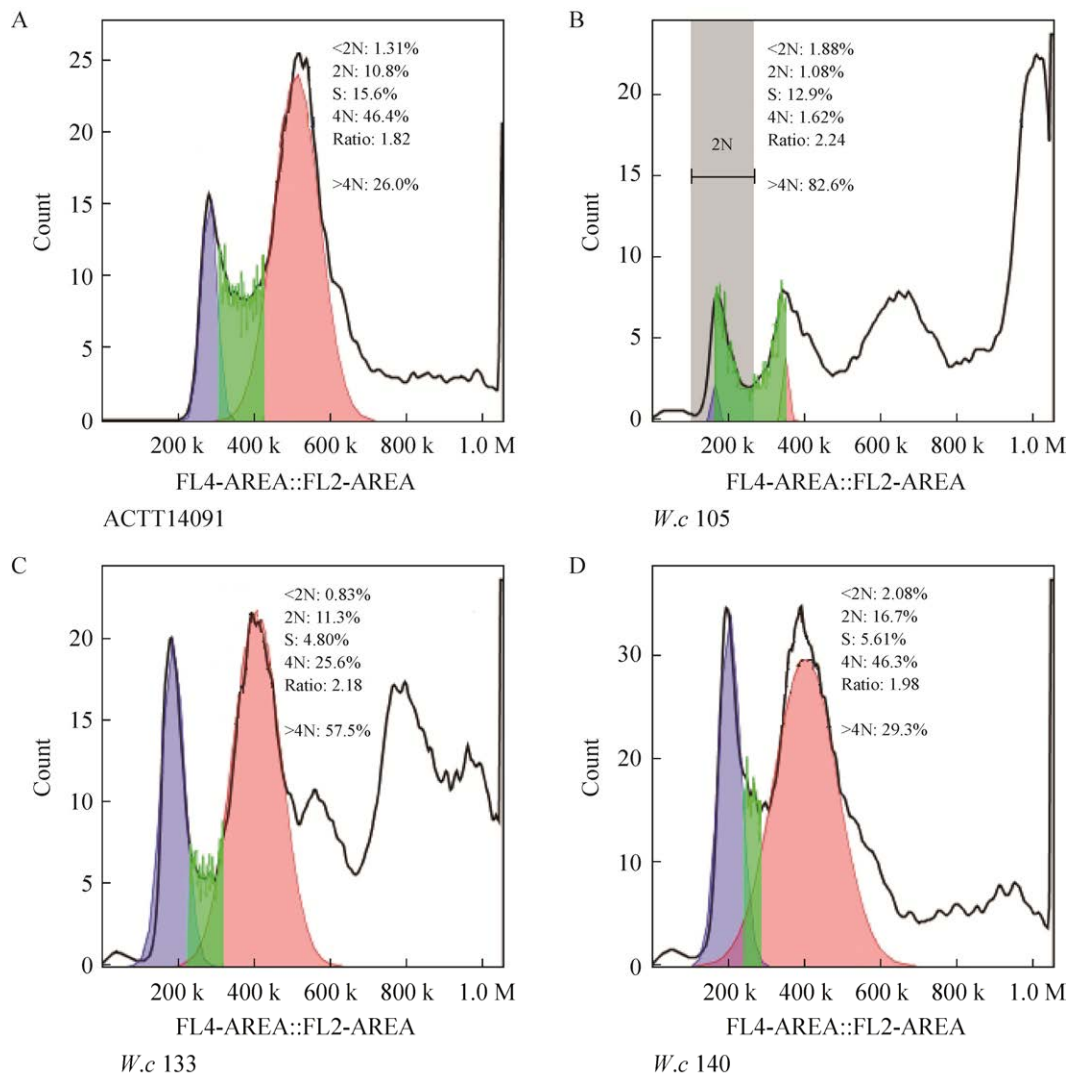


图 8 威克汉姆西弗酵母双倍体 ATCC14091 (A)及单倍体候选株 *W.c* 105 (B)、*W.c* 133 (C)、*W.c* 140 (D) 流式鉴定图

Figure 8 Flow characterization of diploid strain *W. ciferrii* ATCC1409 (A) and haploid candidate strains of *W.c* 105 (B), *W.c* 133 (C), *W.c* 140 (D).

了获得更多高产 TAPS 菌株, 选择了 ARTP 诱变育种技术。基于菌株生长特性的显著差异, 选取了 10 株生长优势菌进行 TAPS 产量的检测, 可以发现菌株 *W.c* 140-A9 和 *W.c* 140-A11 生产 TAPS 性能显著提升, 产量分别达到 7.65 mg/g 和 7.92 mg/g, 与 *W.c* 140 菌株相比分别提高了 61.39%和 67.09%(图 10A、10B)。由于菌株 *W.c* 140 已完成基因组测序, 遗传背景清晰, 在其

基础上, 使用本研究建立的遗传操作工具分别过量表达了 *Syr2* 和 *Lcb2* 这 2 个基因。该操作显著提高了 *W.c* 140 菌株 TAPS 生产性能, 获得的过量表达重组菌株 *W.c* 140 OESyr2 和 *W.c* 140 OELcb2 产量分别达到 12.14 mg/g 和 10.60 mg/g, 分别是 *W.c* 140 菌株的 2.56 倍和 2.24 倍, 超过了威克汉姆西弗酵母标准双倍体菌株 ATCC14091 的水平(图 10C、10D)。

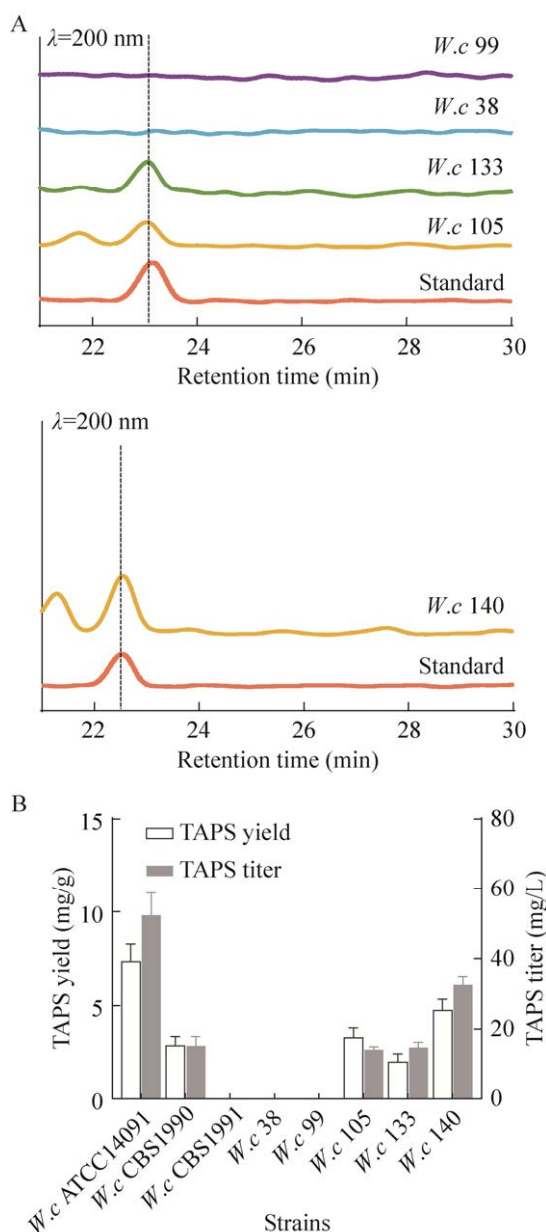


图9 威克汉姆西弗酵母单倍体筛选株的TAPS生产性能 A: 威克汉姆西弗酵母单倍体菌株W.c 38、W.c 99、W.c 105、W.c 133、W.c 140发酵液HPLC结果; B: 威克汉姆西弗酵母筛选株和标准株TAPS产量及滴度比较。

Figure 9 TAPS production performance of *W. ciferrii* haploid screening strains. A: HPLC results of fermentation broths of haploid strains W.c 38, W.c 99, W.c 105, W.c 133, W.c 140; B: Comparison of TAPS yield and titer of *W. ciferrii* screening and standard strains.

3 讨论与结论

目前已报道了一些威克汉姆西弗酵母中遗传工具的开发。Bae等^[28]成功开发了一种在威克汉姆西弗酵母中的高效整合转化系统。通过对核糖体蛋白L41基因进行定点诱变,使其第56位的脯氨酸替换为谷氨酰胺,从而赋予其对放线菌酮的抗性。同时利用威克汉姆西弗酵母的核糖体DNA(ribosomal DNA, rDNA)片段作为多拷贝基因整合的靶点。由于缺乏抗性标记,2007年Boergel等^[35]采用了5-氟乳清酸(5-fluoroorotic acid, 5-FOA)和 α -氨基己二酸的选择压力,成功构建了尿嘧啶缺陷型和赖氨酸缺陷型的单倍体威克汉姆西弗酵母菌株。尽管这些菌株可用于工业大规模生产,但与野生型相比,即便在没有药物的条件下,它们的生长仍受到显著抑制。针对威克汉姆西弗酵母强大的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)机制导致的基因靶向效率较低的问题, Schorsch等^[27]于2009年采用了一种创新策略,通过利用Cre-loxP系统,对Lig4基因进行了精确敲除;这一操作将Ura3基因的靶向敲除效率从原本的1%提升至87%,显著增强了同源重组(homologous recombination, HR)的效率。2023年,Yoo等^[36]使用5-FOA筛选出尿嘧啶缺陷的双倍体威克汉姆西弗酵母菌株,并构建了含尿嘧啶选择标记和CEN着丝粒序列的表达载体。本研究也构建了可用于威克汉姆西弗酵母单倍体和双倍体的基础表达载体,除了发现CEN着丝粒序列在威克汉姆西弗酵母中可用外,还发现2 μ 复制原点也可以作为基础表达载体的复制元件。同时本研究还筛选了不同强度的启动子元件,丰富了遗传表达系统。

目前国际上仅有德国赢创工业集团(Evonik Industries AG)和韩国斗山集团(DOOSAN)掌握威克汉姆西弗酵母生产TAPS技术并垄断相应

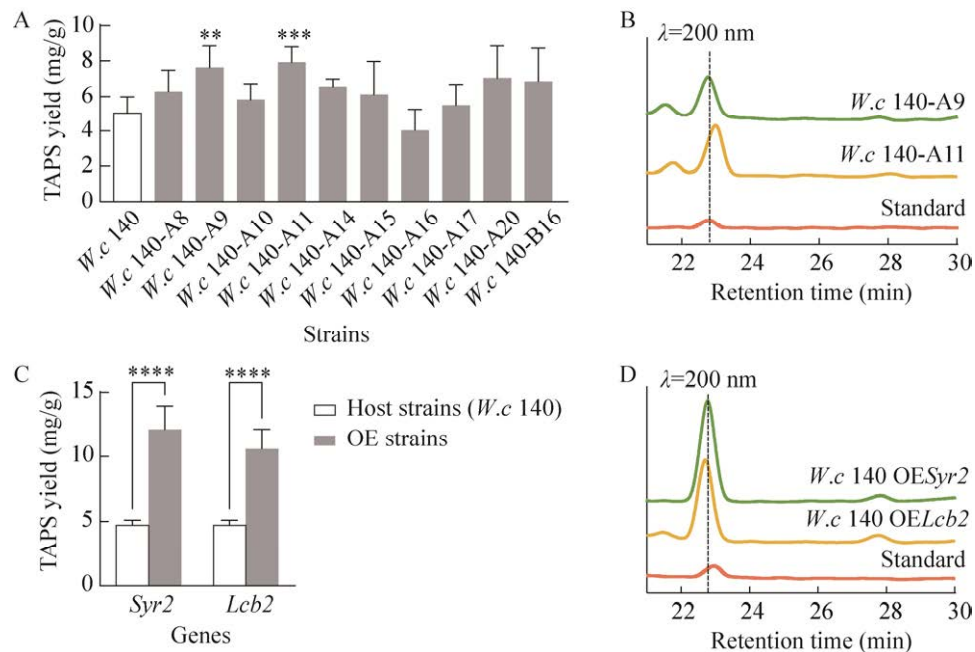


图 10 威克汉姆西弗酵母诱变菌株及过量表达重组菌株的 TAPS 生产性能 A: 威克汉姆西弗酵母诱变菌株 TAPS 产量比较; B: 威克汉姆西弗酵母诱变菌株 *W.c* 140-A9、*W.c* 140-A11 发酵液 HPLC 结果; C: 威克汉姆西弗酵母过量表达重组菌株 TAPS 产量比较; D: 威克汉姆西弗酵母过量表达重组菌株 *W.c* 140 OESyr2、*W.c* 140 OELcb2 发酵液 HPLC 结果。****表示 $P \leq 0.0001$, ***表示 $P \leq 0.001$, **表示 $P \leq 0.05$ 。
Figure 10 TAPS production performance of mutant strains and overexpressed recombinant strains of *W. ciferrii*. A: Comparison of TAPS yields of *W. ciferrii* mutant strains; B: HPLC results of fermentation broths of *W.c* 140-A9 and *W.c* 140-A11; C: Comparison of TAPS yields of *W. ciferrii* overexpression strains; D: HPLC results of fermentation broths of *W.c* 140 OESyr2 and *W.c* 140 OELcb2. **** means $P \leq 0.0001$, *** means $P \leq 0.001$, ** means $P \leq 0.05$.

的产品。韩国斗山集团研究团队通过应用薄层色谱层析技术, 筛选出了一株高产 TAPS 的威克汉姆西弗酵母单倍体菌株, 命名为 DSCC 7-25^[25]。与当前广泛使用的威克汉姆西弗酵母 NRRL Y-1031 F-60-10 相比, DSCC 7-25 具有更快的生长速度和更高的 TAPS 产量; 通过对发酵条件的进一步优化, 采用补料分批发酵的策略, 该研究团队将 TAPS 及其衍生物的滴度提高到了 14 g/L^[25]。本研究通过构建高效的威克汉姆西弗酵母单倍体交配型鉴定方法, 通过转录组数据分析发现 α 型单倍体与双倍体以及 a 型单倍体之间的差异, 即 α 型单倍体缺乏 MATa 基因表达, 并结合流式细胞术区分出 a 型单倍体。

最终获得了最优的单倍体菌株 *W.c* 140, 在摇瓶水平发酵产量达到 4.74 mg/g, 滴度达到 32.61 mg/L, 明显优于标准单倍体菌株 CBS1990。

除了通过单倍体筛选获得高产 TAPS 威克汉姆西弗酵母菌株外, 过往的研究也采用传统诱变的方法, 如紫外线照射、 γ 射线照射、甲磺酸乙酯和 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍, 以此引入随机突变, 从而筛选高产 TAPS 的威克汉姆西弗酵母菌株。Boer 等^[22]对威克汉姆西弗酵母 F-60-10 进行了一系列诱变实验, 获得了 5 种高产突变菌株: 5F11、4D11、15G8、20A11 以及 27D10; 这些突变株的产量显著高于亲本菌株, 提高了约 40% 至 60%。2021 年, Choi

等^[23]在威克汉姆西弗酵母 NRRL Y-1031 F-60-10A 这一菌株的基础上, 采用 γ 射线辐照诱变技术, 成功获得了一株高效产生 TAPS 的突变株 736; 在分批发酵过程中, 该突变株显示出了显著的生产能力, 滴度达到了 17.7 g/L; 通过脂肪酸分析和遗传变异分析揭示, 突变株 736 关键酶基因并未突变, 但其 C16:0、C16:1、C18:1 和 C18:2 脂肪酸水平增加, 并且 *Tsc10* 的转录水平较野生型提升了 30%。在 2022 年的研究中, Park 等^[24]以威克汉姆西弗酵母双倍体 NRRL Y-1031 作为亲本菌株, 通过甲基磺酸乙酯的诱变并经过多次筛选, 成功分离出了一株具有高产 TAPS 特性的突变体 M40; 通过添加糖蜜作为碳源, 此突变体能够有效提高神经酰胺前体(包括 TAPS 和 TriAPS)的产量, 其最高滴度可达到 5.114 g/L。本研究采用了不同于上述方法的 ARTP 诱变技术, 成功获得了菌株 *W.c* 140-A9 和 *W.c* 140-A11, 使产量较亲本菌株相比提高了 61.39% 和 67.09%, 产量分别达到 7.65 mg/g 和 7.92 mg/g。

此外, 代谢工程改造也是获得高产 TAPS 威克汉姆西弗酵母菌株的有效途径。2012 年, Schorsch 等^[26]在先前开发的威克汉姆西弗酵母 *Lig4* 基因敲除株的基础上, 采取了双重策略进行进一步的遗传改造, 以优化产物合成; 首先, 通过敲除与 L-Ser 分解代谢相关的 *Shm1*、*Shm2*、*Chal* 基因, 并过量表达与 L-Ser 合成代谢相关的 *Ser3* 基因, 增加了 L-Ser 的可用性; 其次, 对酵母的鞘氨醇代谢途径进行了工程改造, 包括过量表达编码 SPT 2 个关键亚基的基因 *Lcb1* 和 *Lcb2*, 敲除 SPT 的调控亚基基因 *Orm12*, 以及 *Lcb4*, 且通过 P_{GAPDH} 驱动 *Lcb2* 和 *Syr2* 的过量表达; 这些遗传操作导致了多个遗传修饰的结合, 显著提高了 TAPS 的产率, 改造后的威克汉姆西弗酵母重组菌株产量达到 199 mg/g。

本研究在上述通过单倍体筛选获得的菌株 *W.c* 140 中, 通过分别增强 *Syr2* 和 *Lcb2* 基因的表达, 获得菌株 *W.c* 140 OEL*Lcb2*、*W.c* 140 OES*Syr2*, 使 TAPS 产量提升至 10.60 mg/g 和 12.14 mg/g。虽然由于菌株遗传背景及构建方法不同, TAPS 产量仍然低于上述报道, 但是本研究为国内威克汉姆西弗酵母生产 TAPS 的研究奠定了基础, 最终获得的改造株产量超过了威克汉姆西弗酵母双倍体菌株 ATCC14091 的水平。本研究构建的威克汉姆西弗酵母遗传操作系统和单倍体交配型鉴定方法, 为威克汉姆西弗酵母的基础生物学研究提供了可靠的遗传工具和操作手段, 后续研究可以通过组合策略获得高产 TAPS 的单倍体威克汉姆西弗酵母, 这也为 TAPS 的生物合成与高产提供了有用的代谢改造策略。

REFERENCES

- [1] WICKERHAM LJ, BURTON KA. A simple technique for obtaining mating types in heterothallic diploid yeasts, with special reference to their uses in the genus *Hansenula*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1954, 67(3): 303-308.
- [2] KURTZMAN CP. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 99(1): 13-23.
- [3] FYRST H, SABA JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators[J]. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6: 489-497.
- [4] MERRILL JR AH, SCHMELZ EM, DILLEHAY DL, SPIEGEL S, SHAYMAN JA, SCHROEDER JJ, RILEY RT, VOSS KA, WANG E. Sphingolipids: the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, 142(1): 208-225.
- [5] SPIEGEL S, MILSTIEN S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, 4: 397-407.
- [6] LEE T. Acetylation of sphingosine by PAF-dependent transacylase[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1996, 416: 113-119.
- [7] 崔柳伟, 王凯峰, 纪晓俊. 四乙酰基植物鞘氨醇生物合成的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(6): 2204-2214.
CUI LW, WANG KF, JI XJ. Fermentative production of tetraacetyl phytosphingosine: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(6): 2204-2214 (in Chinese).
- [8] KIM HJ, KIM HJ, KIM SH, KIM TY. Tetraacetyl phytosphingosine-induced caspase activation and apoptosis occur through G2 arrest in human keratinocyte HaCaT cells[J]. *Journal of Investigative*

- Dermatology, 2003, 121(5): 1135-1137.
- [9] MASUKAWA Y, NARITA H, SHIMIZU E, KONDO N, SUGAI Y, OBA T, HOMMA R, ISHIKAWA J, TAKAGI Y, KITAHARA T, TAKEMA Y, KITA K. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum[J]. Journal of Lipid Research, 2008, 49(7): 1466-1476.
- [10] SHOYAMA Y, OKABE H, KISHIMOTO Y, COSTELLO C. Total synthesis of stereospecific sphingosine and ceramide[J]. Journal of Lipid Research, 1978, 19(2): 250-259.
- [11] 杨官翠, 刘金宜, 蒋佩洁, 许玉溪, 田小龙, 王筱淇, 王瑞, 杨世杰, 宋清晓, 魏锦, 张曦. 植物鞘氨醇诱导白血病细胞凋亡的作用及机制研究[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(4): 359-368.
- [12] YANG GC, LIU JY, JIANG PJ, XU YX, TIAN XL, WANG XQ, WANG R, YANG SJ, SONG QX, WEI J, ZHANG X. Anti-tumor effects of phytosphingosine on leukemia cells by inducing cell apoptosis[J]. Journal of Army Medical University, 2024, 46(4): 359-368 (in Chinese).
- [13] MIZUTANI Y, MITSUTAKE S, TSUJI K, KIHARA A, IGARASHI Y. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function[J]. Biochimie, 2009, 91(6): 784-790.
- [14] CODERCH L, LÓPEZ O, deLa MAZA A, PARRA JL. Ceramides and skin function[J]. American Journal of Clinical Dermatology, 2003, 4(2): 107-129.
- [15] BRAUN PE, SNELL EE. The biosynthesis of dihydrosphingosine in cell-free preparations of *Hansenula ciferrii*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1967, 58(1): 298-303.
- [16] AMALIA L, TSAI SL. Ceramide's role and biosynthesis: a brief review[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2023, 28(3): 371-378.
- [17] GAULT CR, OBEID LM, HANNUN YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2010, 688: 1-23.
- [18] HANADA K, HARA T, NISHIJIMA M. D-serine inhibits serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the initial step of sphingolipid biosynthesis[J]. FEBS Letters, 2000, 474(1): 63-65.
- [19] HARRISON PJ, DUNN TM, CAMPOPIANO DJ. Sphingolipid biosynthesis in man and microbes[J]. Natural Product Reports, 2018, 35(9): 921-954.
- [20] MASHIMA R, OKUYAMA T, OHIRA M. Biosynthesis of long chain base in sphingolipids in animals, plants and fungi[J]. Future Science OA, 2019, 6(1): FSO434.
- [21] NAGIEC MM, SKRZYPEK M, NAGIEC EE, LESTER RL, DICKSON RC. The LCB4 (YOR171c) and LCB5 (YLR260w) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(31): 19437-19442.
- [22] BARENHOLZ Y, EDELMAN I, GATT S. The metabolic basis for the accumulation of acetylated sphingosine bases in the yeast *Hansenula ciferrii*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1971, 248(3): 458-465.
- [23] BOER L, VAN D, WILDT I. Microbial strains producing sphingolipid bases, US5910425[P]. 1999-06-08.
- [24] CHOI JY, HWANG HJ, CHO WY, CHOI JI, LEE PC. Differences in the fatty acid profile, morphology, and tetraacetylphytosphingosine-forming capability between wild-type and mutant *Wickerhamomyces ciferrii*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 662979.
- [25] PARK SB, TRAN QG, RYU AJ, YUN JH, KWON KK, LEE YJ, KIM HS. Fluorescence-activated cell sorting-mediated directed evolution of *Wickerhamomyces ciferrii* for enhanced production of tetraacetyl phytosphingosine[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2022, 39(4): 1004-1010.
- [26] PEK UH, SEO PC, HONG SY, CHOI WS. Isolation of a novel yeast strain, *Pichia ciferrii* DSCC 7-25, with high fermentation productivity of sphingolipids: KR19960067997A[P]. 1998-09-15.
- [27] SCHORSCH C, KÖHLER T, ANDREA H, BOLES E. High-level production of tetraacetyl phytosphingosine (TAPS) by combined genetic engineering of sphingoid base biosynthesis and L-serine availability in the non-conventional yeast *Pichia ciferrii*[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(2): 172-184.
- [28] SCHORSCH C, KÖHLER T, BOLES E. Knockout of the DNA ligase IV homolog gene in the sphingoid base producing yeast *Pichia ciferrii* significantly increases gene targeting efficiency[J]. Current Genetics, 2009, 55(4): 381-389.
- [29] BAE JH, SOHN JH, PARK CS, RHEE JS, CHOI ES. Integrative transformation system for the metabolic engineering of the sphingoid base-producing yeast *Pichia ciferrii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 812-819.
- [30] 张天萌, 刘金钊, 朱倩倩, 罗德学, 刘英杰, 郭学平. 一种高产鞘脂类微生物菌株、它的筛选方法和它的用途: CN114736815A[P]. 2022-07-12.
- [31] ZHANG TM, LIU JZ, ZHU QQ, LUO DX, LIU YJ, GUO XP. High-yield sphingolipid microbial strain, and screening method therefor and use thereof: CN114736815A[P]. 2022-07-12 (in Chinese).
- [32] 曾旭. Monacolin J 生物合成途径在黑曲霉中的异源重构及发酵优化[D]. 广州: 华南理工大学, 2022.
- [33] ZENG X. Heterologous reconstruction of Monacolin J biosynthetic pathway in *Aspergillus niger* and fermentation optimization[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022(in Chinese).
- [34] HUANG YY, JIAN XX, LV YB, NIAN KQ, GAO Q, CHEN J, WEI LJ, HUA Q. Enhanced squalene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica* based on metabolically engineered acetyl-CoA metabolism[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 281: 106-114.
- [35] VAN ROSSUM HM, KOZAK BU, PRONK JT, VAN MARIS AJA. Engineering cytosolic acetyl-coenzyme A supply in *Saccharomyces cerevisiae*: pathway stoichiometry, free-energy conservation and redox-cofactor balancing[J]. Metabolic Engineering, 2016, 36: 99-115.
- [36] BILINSKI CA, MILLER JJ. Induction of normal ascosporeogenesis in two-spored *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, acetate, and zinc[J]. Journal of Bacteriology, 1980, 143(1): 343-348.
- [37] SCHNEIDER J, ANDREA H, BLOM J, JAENICKE S, RÜCKERT C, SCHORSCH C, SZCZEPANOWSKI R, FARWICK M, GOESMANN A, PÜHLER A, SCHAFFER S, TAUCH A, KÖHLER T, BRINKROLF K. Draft genome sequence of *Wickerhamomyces ciferrii* NRRL Y-1031 F-60-10[J]. Eukaryotic Cell, 2012, 11(12): 1582-1583.
- [38] BOERGEL D, HUELLER T, SCHAFFER S. Methods and materials for the transformation of the yeast *Pichia ciferrii*, US20070264716[P]. 2007-11-15.
- [39] YOO SW, KIM M, PARK BS, YOON J, OH MK. *Wickerhamomyces ciferrii* auxotroph and expression vector for improved production of tetraacetyl phytosphingosine[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2023, 28(5): 804-812.