

# 代谢工程改造解脂耶氏酵母高效合成赤藓糖醇研究进展

黄良刚<sup>1</sup>, 肖博文<sup>1</sup>, 王文佳<sup>1</sup>, 李雯<sup>2</sup>, 张为宏<sup>2</sup>, 周俊平<sup>1</sup>, 蔡雪<sup>1</sup>, 张博<sup>1</sup>, 柳志强<sup>1\*</sup>, 郑裕国<sup>1</sup>

1 浙江工业大学生物工程学院, 浙江 杭州 310014

2 浙江华康药业股份有限公司, 浙江 衢州 324302

黄良刚, 肖博文, 王文佳, 李雯, 张为宏, 周俊平, 蔡雪, 张博, 柳志强, 郑裕国. 代谢工程改造解脂耶氏酵母高效合成赤藓糖醇研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 665-686.

HUANG Lianggang, XIAO Bowen, WANG Wenjia, LI Wen, ZHANG Weihong, ZHOU Junping, CAI Xue, ZHANG Bo, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Advances in efficient biosynthesis of erythritol by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 665-686.

**摘要:** 赤藓糖醇是一种由微生物在高渗透胁迫条件下生产的新型四碳糖醇, 是良好的代糖产品, 同时也是合成多种 C4 化合物(1,3-丁二烯、1,4-丁二醇、2,5-二氢咪唑等)的平台化合物。与其他多元醇相比, 其主要通过生物发酵法生产, 因此更具挑战性。解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是合成赤藓糖醇的首选底盘, 成为发酵法生产赤藓糖醇的研究热点。目前解脂耶氏酵母工业化生产赤藓糖醇的过程中还存在着亟需突破的瓶颈问题, 如合成代谢弱、副产物多以及工业属性不高等。近年来, 根据产业化需求定制高版本底盘菌株取得了一定进展, 如以葡萄糖和甘油为底物, 利用代谢工程改造的解脂耶氏酵母合成赤藓糖醇的最高水平分别达 196 g/L 和 150 g/L, 但难以进一步突破菌株生产上限。本文综述了解脂耶氏酵母代谢工程改造合成赤藓糖醇的研究进展, 从代谢合成途径、模块化代谢工程改造以及辅助策略提升工业属性等方面, 系统分析了解脂耶氏酵母发酵法生产赤藓糖醇的代谢路径及改造策略, 为增强解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇的研究工作提供一定的研究思路。

**关键词:** 解脂耶氏酵母; 赤藓糖醇; 代谢工程; 基因编辑; 工业属性提升

资助项目: 浙江省重点研发计划(2023C01113)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Zhejiang (2023C01113).

\*Corresponding author. E-mail: microliu@zjut.edu.cn

Received: 2023-05-25; Accepted: 2023-07-18

# Advances in efficient biosynthesis of erythritol by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*

HUANG Lianggang<sup>1</sup>, XIAO Bowen<sup>1</sup>, WANG Wenjia<sup>1</sup>, LI Wen<sup>2</sup>, ZHANG Weihong<sup>2</sup>, ZHOU Junping<sup>1</sup>, CAI Xue<sup>1</sup>, ZHANG Bo<sup>1</sup>, LIU Zhiqiang<sup>1\*</sup>, ZHENG Yuguo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

<sup>2</sup> Zhejiang Huakang Pharmaceutical Co., Ltd., Quzhou 324302, Zhejiang, China

**Abstract:** Erythritol is a novel 4-carbon sugar alcohol produced by microbes in the presence of hyper-osmotic stress. It has excellent potential to serve as an alternative sugar for people with diabetes and also a platform compound for synthesizing various C4 compounds, such as 1,3-butadiene, 1,4-butanediol, 2,5-dihydrofuran and so on. Compared with other polyols, the fermentative production of erythritol is more challenging. *Yarrowia lipolytica* is the preferred chassis of erythritol biosynthesis for its high-titer and high-productivity. At present, there are still some bottlenecks in the production of erythritol by *Y. lipolytica*, such as weak metabolic activity, abundant by-products, and low industrial attributes. Progress has been made in tailoring high version strains according to industrial needs. For example, the highest titer of erythritol produced by the metabolically engineered *Y. lipolytica* reached 196 g/L and 150 g/L, respectively, by using glucose or glycerol as the carbon sources. However, further improving its production performance becomes challenging. This review summarizes the research progress in the synthesis of erythritol by *Y. lipolytica* from the perspectives of erythritol producing strains, metabolic pathways, modular modifications, and auxiliary strategies to enhance the industrial properties of the engineered strain. Key nodes in the metabolic pathway and their combination strategies are discussed to guide the research on promoting the production of erythritol by *Y. lipolytica*.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*; erythritol; metabolic engineering; genome editing; improvement of industrial attributes

赤藓糖醇(erythritol), 又名 1,2,3,4-丁四醇, 分子式为  $C_4H_{10}O_4$ , 无光学活性, 只存在一种内消旋形式<sup>[1]</sup>。产品为白色结晶粉末, 不吸湿, 易溶于水, 也溶于部分有机溶剂, 如吡啶和醇, 具有优异的耐热性和耐酸性。作为一种新型天然无热量甜味剂, 赤藓糖醇甜度约为蔗糖的 60%–70%, 其广泛存在于地衣、真菌、蔬菜水果、发酵食品以及人或动物的组织或体液<sup>[1-3]</sup>。赤藓糖醇具有零热量、不被人体代谢吸收的特

点, 因而不会造成龋齿、不会改变血糖和胰岛素水平, 在食品或添加剂领域应用广泛。相对于其他天然代糖产品赤藓糖醇耐受量大、安全性高、吸湿性低和口感舒适, 在健康饮食市场广受追捧, 但赤藓糖醇的生产比其他多元醇更困难, 市场潜力有待开发<sup>[4]</sup>。虽然赤藓糖醇在 1848 年就被发现, 但是直到 1990 年后才率先被日本批准作为甜味剂直接使用, 到了 21 世纪初在美国以及一些欧洲国家获批, 国内于 2008 年

通过标准<sup>[1-2]</sup>。2022年赤藓糖醇全球市场规模为173 000 t, 预计2024年将达到238 000 t, 2020–2024年4年复合年均增长率为22%, 赤藓糖醇的全球市场需求在未来5年内有望达到350 000 t左右; 国内无糖饮料市场规模在2021年度达到137.9亿元, 到2027年这一市场将提升至276.6亿元规模<sup>[5-7]</sup>。近年来, 赤藓糖醇的应用场景也在不断拓展, 以赤藓糖醇为前体的甘露糖基赤藓糖醇作为一种抗衰老成分, 在医美、化妆品行业应用广泛; 在化工行业, 高稳定性的赤藓糖醇也可用作生产1,3-丁二烯、1,4-丁二醇和2,5-二氢咪喃等功能材料的前体<sup>[1,4,8-11]</sup>。

赤藓糖醇的生产方法包括生物提取、化学合成和微生物发酵。生物提取法产量低、成本高, 难以满足庞大的市场需求。20世纪60年代研究者开发了化学合成法, 主要通过高碘酸法氧化淀粉成双醛淀粉, 在镍催化加氢条件下裂解生成赤藓糖醇<sup>[1]</sup>。该方法存在转化效率低、生产成本低和污染严重等问题, 且质量稳定性和食品安全系数较低, 未能成功应用于商业化生产。目前微生物发酵法是工业化生产赤藓糖醇的唯一方法。微生物发酵生产赤藓糖醇不仅能够克服传统化学合成法的问题, 还具有反应温和、易控制的优点, 也契合“双碳”目标大背景下的绿色生物制造的理念<sup>[1-3,12]</sup>。细菌和真菌都具有合成赤藓糖醇的能力, 产赤藓糖醇的细菌主要包括乳酸菌和酒球菌, 野生及工程菌株产量最高可达2 g/L左右<sup>[13-14]</sup>; 真菌主要包括霉菌和酵母菌, 青霉菌和黑曲霉的野生及工程菌株产量最高达15 g/L左右<sup>[15-16]</sup>。由于细菌和霉菌的赤藓糖醇生产能力较弱, 尚未见工业生产使用。可通过发酵法生产赤藓糖醇的工业菌株以耐高渗酵母为主, 包括假丝酵母属(*Candida*)、球拟酵母属(*Torulopsis*)、毛孢子菌属(*Trichosporum*)、三角酵母属(*Trigonopsis*)、

毕赤酵母属(*Pichia*)、小丛梗孢(*Moniliella*)、担子菌属(*Aureobasidium*)、圆酵母属(*Torula*)和亚罗酵母属(*Yarrowia*)等菌属<sup>[2,12,17]</sup>, 工业菌株产量最高可达241 g/L<sup>[17]</sup>。其中亚罗酵母属(*Yarrowia*)的解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)作为一种非常规酵母, 已被美国食品药品监督管理局认定为通常被认为是安全的(generally regarded as safe, GRAS)菌株<sup>[18]</sup>, 其具有耐受低pH、高渗透压的工业属性, 同时基因编辑工具较为齐全且底物选择具有广谱性, 成为国内外工业生产赤藓糖醇的主要菌株<sup>[2-3,18-19]</sup>。解脂耶氏酵母也通过了我国的安全国家标准(GB 26404—2011)食品级赤藓糖醇生产认证<sup>[20]</sup>, 在赤藓糖醇的生产中广泛使用。

当前, 淀粉质原料的市场价格普遍上涨且赤藓糖醇相对附加值较低, 各生产企业间面临日趋严峻的同质化竞争, 研究人员聚焦对菌株的非理性筛选和发酵工艺优化以期提升发酵产量和转化率, 从而为下游市场拉出利润空间。但基于非理性的自然界筛选和人工诱变技术常不能按照工业需求定制性能优异的生产菌株。此外, 发酵工艺优化提升菌株的发酵性能空间有限, 难以突破底盘细胞自身上限。随着合成生物技术的快速发展, 提升赤藓糖醇生产性能已经从传统的非理性筛选、发酵工艺优化逐渐过渡到定向设计重构, 不仅能够克服传统方法的缺点, 同时还具有周期短、效率高和目标明确的优势<sup>[2-3]</sup>。目前利用合成生物学技术开发解脂耶氏酵母赤藓糖醇细胞工厂的研究工作已经取得重要进展<sup>[3,12]</sup>, 主要集中在合成途径功能基因过表达及其有效组合、降解和副产物途径消除、辅助策略提升工业属性等, 但目前发酵生产赤藓糖醇依旧存在周期长和时空产率低的问题。基于此, 本综述将从代谢合成途径、关键基因功能、底盘菌设计与改造等方面分模块系

统梳理解脂耶氏酵母赤藓糖醇合成途径及其调控机制以及系统代谢工程改造研究进展, 讨论代谢路径关键节点及其组合策略, 旨在为代谢工程改造解脂耶氏酵母高产赤藓糖醇提供指导。

## 1 解脂耶氏酵母赤藓糖醇的代谢合成途径

国内以三元生物、保龄宝和华康药业等为代表的赤藓糖醇生产企业皆以葡萄糖为碳源发酵生产赤藓糖醇。在解脂耶氏酵母中, 以葡萄糖为底物合成赤藓糖醇的代谢途径如图 1 所示, 葡萄糖经己糖转运蛋白进入细胞后在己糖激酶(hexokinase, HK, YAL10B22308p)的作用下, 消耗 1 分子 ATP 将其转化为葡萄糖-6-磷酸(glucose-6-P, G-6-P)。部分 G-6-P 进入戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway, PPP)。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(ZWF1, YAL10E22649p)在消耗 1 分子  $\text{NADP}^+$  的基础上将葡萄糖-6-磷酸脱氢, 生成 6-磷酸葡萄糖内酯(6-phosphogluconolactone, 6-PGL), 同时释放 1 分子  $\text{NADPH}$  和  $\text{H}^+$ 。随后, 6-磷酸葡萄糖内酯经内酯酶(6-phosphogluconolactonase, SOL3)加水生成 6-磷酸葡萄糖酸(6-phosphogluconic acid, 6-PG), 再经 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(GND1, YAL10B15598p)氧化生成 5-磷酸核酮糖(ribulose-5-P, Ru-5-P), 该过程消耗 1 分子  $\text{NADP}^+$  同时生成 1 分子  $\text{NADPH}$ 、1 分子  $\text{H}^+$  和 1 分子  $\text{CO}_2$ 。以上过程称为 PPP 的氧化阶段, 为赤藓糖醇的合成提供 2 分子还原力, 该过程伴随着二氧化碳的释放, 存在碳流失。氧化阶段合成的 Ru-5-P 分别在差向异构酶(RKII, YAL10B06941p)、异构酶(RPE1, 该酶在解脂耶氏酵母中尚未鉴定)作用下转化为 5-磷酸木酮糖(xylulose-5-P, X-5-P)和 5-磷酸

核糖(ribose-5-P, R-5-P)。两个异构体在转酮酶(TKL1, YAL10E06479p)作用下转化为 7-磷酸景天庚酮糖(sedo-heptulose-7-P, S-7-P)和 3-磷酸甘油醛(glyceraldehyde-3-P, GA-3-P), 紧接着转醛酶(TAL1, YAL10F15587p)将 S-7-P 和 GA-3-P 转化为 6-磷酸果糖(fructose-6-P, F-6-P)和赤藓糖醇前体 4-磷酸赤藓糖(erythrose-4-P, E-4-P), 该过程为 PPP 的非氧化阶段, 负责赤藓糖醇合成前体的供应。E-4-P 经磷酸酶(E4PP, 该酶在解脂耶氏酵母中尚未鉴定)去磷酸化作用生成赤藓糖, 然后经赤藓糖还原酶(erythritase reductase, ER, 该酶在解脂耶氏酵母中存在多个同工酶)加氢还原为赤藓糖醇, 这两步分别消耗 1 分子 ADP 和 1 分子  $\text{NADPH}$ , 是赤藓糖醇的合成关键步骤<sup>[21-23]</sup>。

合成途径保证了解脂耶氏酵母高效生产, 而底盘细胞生长所需的物质和能量则由糖酵解途径(Embden meyerhof pathway, EMP)和三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)供应。G-6-P 大部分流入 EMP 途径, 生成的中间体 F-6-P 和 GA-3-P 可在 TKL1 的作用下生成 X-5-P 和 E-4-P, 该过程与 PPP 途径存在交集, 进一步为赤藓糖醇合成提供了前体<sup>[21-23]</sup>。常规培养条件下, 解脂耶氏酵母倾向于高密度生长, 发酵生产过程则需要高渗透压力条件, 以激活糖醇合成途径发挥对细胞的保护作用<sup>[24]</sup>, 在该过程中还存在着大量的副产物, 包括柠檬酸、阿拉伯糖醇和甘露醇等<sup>[21]</sup>。阿拉伯糖醇的前体来源于 PPP 氧化阶段产物 Ru-5-P<sup>[25-26]</sup>; 甘露醇的合成则以糖酵解/糖异生中间代谢物 F-6-P 为前体<sup>[27-28]</sup>, 这些副产物不仅竞争碳流, 同时也加重了下游分离纯化的成本消耗。

解脂耶氏酵母具有广谱碳源的利用能力。甘油是一种储量巨大的低值可再生资源, 利用

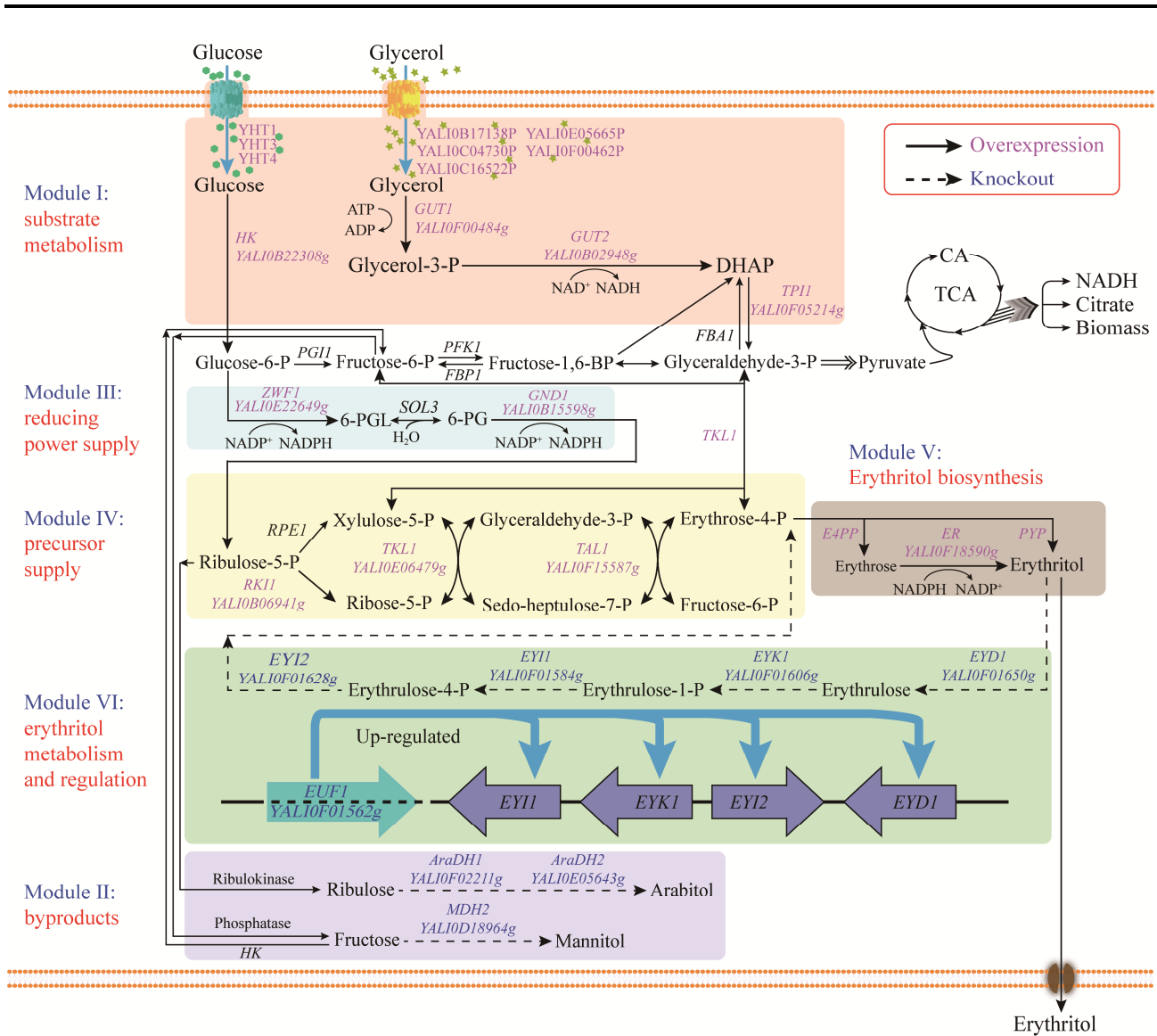
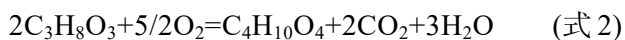
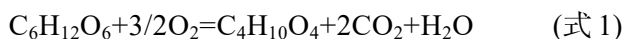


图1 赤藓糖醇生物合成、降解途径及其调控

Figure 1 The biosynthesis, degradation pathway of erythritol and its regulation. P: Phosphate; BP: Bisphosphate; DHAP: Dihydroxyacetone phosphate; CA: Citric acid; TCA: Tricarboxylic acid cycle; *YHT*: Encoding hexose transporter; *HK*: Encoding hexokinase; *GUT1*: Encoding glycerol kinase; *GUT2*: Encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase; *TP11*: Encoding triosephosphate isomerase; *FBA1*: Encoding fructose-bisphosphate aldolase; *PFK1*: Encoding phosphofructokinase; *FBPI*: Encoding fructose-1,6-bisphosphatase; *PGII*: Encoding glucose-6-phosphate isomerase; *ZWF1*: Encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase; *SOL3*: Encoding 6-phosphogluconolactonase; *GND1*: Encoding phosphogluconate dehydrogenase; *RPE1*: Encoding ribulose-5-phosphate 3-epimerase; *RK11*: Encoding ribulose-5-phosphate isomerase; *TKL1*: Encoding transketolase; *TAL1*: Encoding transaldolase; *E4PP*: Encoding erythrose-4-phosphate phosphatase; *ER*: Encoding erythrose reductase; *PYP*: Encoding sugar alcohol phosphatase; *EYD1*: Encoding erythritol dehydrogenase; *EYK1*: Encoding erythrulose kinase; *EYI1*: Encoding erythrulose-1-phosphate isomerase; *EYI2*: Encoding erythrulose-4-phosphate isomerase; *EUF1*: Encoding erythritol utilization factor; *AraDH*: Encoding arabitol dehydrogenase; *HK*: Encoding hexokinase; *MDH*: Encoding mannitol dehydrogenase.

其作为底物发酵生产赤藓糖醇,近年来也颇受研究者关注。解脂耶氏酵母具有利用高浓度甘油的特征,甘油可渗透也可经转运蛋白进入细胞,在甘油激酶(GUT1, YAL10F00484p)消耗 1 分子 ATP 作用下转化为 3-磷酸甘油。随后磷酸甘油脱氢酶(GUT2, YAL10B02948p)将 3-磷酸甘油脱氢生成磷酸二羟丙酮(dihydroxyacetone phosphate, DHAP),该过程伴随着 1 分子  $\text{NAD}^+$  转化为 NADH。随后异构酶(TPI1)将 DHAP 异构为 GA-3-P,一部分 GA-3-P 经丙酮酸流入 TCA 循环,提供细胞各项生命活动的原料、能量、辅因子;另一部分则在糖异生作用下生成 F-6-P 进入 PPP,糖异生途径也含有与 PPP 途径产生的中间产物 F-6-P 和 GA-3-P,流向赤藓糖醇的合成<sup>[21-22]</sup>(图 1)。以葡萄糖合成赤藓糖醇,通过反应式 1 计算的理论得率为 67.7%,而以甘油为碳源合成赤藓糖醇的理论得率为 66.3%(反应式 2),可见利用甘油发酵生产赤藓糖醇在产物理论得率水平具有良好的可行性。



## 2 解脂耶氏酵母赤藓糖醇的降解途径及其调控机制

在优先碳缺乏的情况下,解脂耶氏酵母可代谢赤藓糖醇,导致赤藓糖醇产率下降。Carly 等采用插入诱变和高通量筛选相结合的方法分离到一株不能以赤藓糖醇为唯一碳源生长的突变株,该表型与赤藓糖激酶基因 *EYK1* (YAL10F01606g)的失活有关<sup>[29]</sup>。缺失 *EYK1* 的工程菌会大量积累赤藓酮糖,过量的赤藓酮糖反馈抑制 EYD1 的活性,在生物反应器培养过程中,其产量比野生型菌株高 26%,生产率提升 30%<sup>[29]</sup>。此后,Carly 等进一步以斯达氏油脂酵

母(*Lipomyces starkeyi*)的赤藓糖醇脱氢酶为模板,鉴定了解脂耶氏酵母内源性赤藓糖醇脱氢酶 *EYD1*,在缺失 *EYK1* 的菌株中过表达 *EYD1* 构建了以赤藓糖醇为碳源生产赤藓酮糖的细胞工厂,转化率可达 69%,证明了 *EYD1* 在赤藓糖醇分解中的关键作用<sup>[30]</sup>。通过对比布氏杆菌(*Brucella abortus*)的赤藓糖醇分解代谢途径,发现 YAL10F01628g 和 YAL10F01584g 与异构酶基因 *EryI* (*RpiB*)和 *EryH* (*TpiA2*)的相似度分别达 47%和 37%,且定位在与 *EUFI*、*EYK1* 和 *EYD1* 相同的区域<sup>[31]</sup>。Mirończuk 等发现 YAL10F1628g 缺失导致菌株赤藓糖醇同化能力受损,而赤藓糖醇合成能力基本不变,并基于此提出假说:赤藓糖醇被赤藓糖醇激酶磷酸化再被脱氢酶 EYD1 氧化,最后经两个异构酶作用转化为 E-4-P 的代谢分解路径<sup>[31]</sup>。随后,Niang 等证明了赤藓糖酮是赤藓糖醇分解代谢途径的第一个中间体,成功表征并确定了 YAL10F01584g 为代谢路径中的另一个异构酶基因,在 Mirończuk 等的基础上根据代谢顺序重新命名 YAL10F01628g 为 *EYI2*,YAL10F01584g 命名为 *EYI1*,完整解析了解脂耶氏酵母中赤藓糖醇分解代谢路径<sup>[32]</sup>。首先,赤藓糖醇经 EYD1 脱氢转化为赤藓酮糖,随后其被 EYK1 磷酸化,再经 EYI1、EYI2 催化异构为 PPP 中间体 E-4-P,流入 EMP/TCA(图 1)。

解脂耶氏酵母 MK1 经紫外诱变获得解脂耶氏酵母 K1 菌株,比较基因组分析表明解脂耶氏酵母 K1 中 YAL10F01562g 基因 200 号位密码子突变导致翻译提前终止<sup>[33]</sup>,并且该菌株中 YAL10F01562g 的翻译回复突变可回补对赤藓糖醇的利用能力。此外,当赤藓糖醇作为唯一碳源时,解脂耶氏酵母 MK1 菌株中 YAL10F01562g 的表达水平相较于以甘油或葡萄糖为底物增加了 10 倍。对其编码蛋白的一级结构分析发现存在

一个 DNA 结合结构域和真菌特异转录因子结构域, 表明 *YAL10F01562g* 是一种转录因子<sup>[33]</sup>。*EYD1*、*EYK1*、*EYI1*、*EYI2* 和 *EUFI* 以基因簇的形式排列在基因组, 被命名为赤藓糖醇利用簇(图 1), *EUFI* 调控赤藓糖醇降解途径的基因的转录<sup>[24,33]</sup>, 但 *EUFI* 可能不是调节赤藓糖醇利用的唯一因子, 因为 *EUFI* 缺失菌株仍可以在一定程度上使用赤藓糖醇作为碳源<sup>[24]</sup>。

### 3 解脂耶氏酵母赤藓糖醇代谢途径的模块化改造研究

在用于工业化生产的微生物细胞工厂构建过程中, 基于合成生物学的内源基因的工程改造和异源途径的引入往往会导致代谢失衡, 模块化代谢工程将合成路径中的酶分组为一系列相互作用的模块, 以提高代谢途径通量和重建代谢平衡, 给高效产物合成途径设计提供了新思路<sup>[34-36]</sup>。本小节根据模块化代谢工程原理基于合成途径通量平衡考虑将解脂耶氏酵母合成赤藓糖醇生物途径分为 5 大模块: 碳摄取和同化模块、副产物模块、PPP 氧化模块与非氧化模块和合成模块, 分模块讨论目前赤藓糖醇细胞工厂研究的最新进展。

#### 3.1 碳摄取和同化模块

葡萄糖是解脂耶氏酵母生长与生产的优先碳源, 其通过己糖转运蛋白进入细胞后经己糖激酶完成磷酸化, 从而进入代谢途径。24-糖蛋白转运体家族中的 YHT1-YHT6 负责葡萄糖内转运, 其中, YHT1 (*YALI0C06424p*)、YHT3 (*YALI0F19184p*)和 YHT4 (*YALI0E23287p*)是高效的非专一性己糖转运蛋白, 可内运葡萄糖、果糖、甘露糖和半乳糖等六碳糖, 拓宽了解脂耶氏酵母底物谱(图 1)。YHT1 和 YHT4 缺陷型菌株无法在上述 4 种己糖为唯一碳源的培养基

上生长, 因此是主要的活性己糖转运蛋白; YHT3 则主要在稳定期表达, 偶尔在指数生长期表达<sup>[23,37]</sup>。转录组数据显示无论是以葡萄糖、果糖还是以葡萄糖、甘油为单一或混合底物, 解脂耶氏酵母 W29 和 H222 菌株在氮胁迫条件下, YHT1 和 YHT4 都处于高转录水平, 说明转运蛋白的差异表达依赖于碳源和氮浓度<sup>[38]</sup>。并且, YHT1、YHT3、YHT4 都有明显的甘露糖偏好性, 其次是葡萄糖和果糖, 这对指导解脂耶氏酵母工程化改造利用含甘露糖木质纤维素进行有益化合物的生产提供了重要参考价值。需要指出的是, 在酿酒酵母中表达异源 YHT3 对于改善菌株的己糖偏好性是最有效的, 工程菌株能够更加快速利用葡萄糖、果糖和甘露醇混合底物<sup>[37]</sup>。

己糖激酶通过糖酵解途径催化细胞内己糖的初始磷酸化, 该酶在解脂耶氏酵母中由 *YIH XK1* (*YALI0B22308g*)基因编码, 可以磷酸化葡萄糖、果糖和甘露糖, 对葡萄糖展现出更高的亲和性<sup>[23]</sup>。*YIH XK1* 的过表达可以提高己糖的利用率, 增加糖酵解的碳通量, 如内源性表达 *YIH XK1* 可将己糖激酶活性提高 329%, 转录水平提高 315%, 糖酵解过程中的葡萄糖-6-磷酸含量提高 92%, 从而在  $\beta$ -胡萝卜素工程菌株中提升了其生物量和比生产速率<sup>[39]</sup>。作为生物质原料的其他替代碳源, 如糖蜜(主要成分为葡萄糖和果糖)也可被解脂耶氏酵母高效利用。来自粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的己糖激酶 SpHXK1 对葡萄糖、果糖的  $K_m$  值分别为 8.4、1.5 mmol/L, 而解脂耶氏酵母 YIH XK1 和酿酒酵母 ScHXK2 对葡萄糖、果糖的  $K_m$  值分别为 0.38、3.56 mmol/L 和 0.25 mmol/L、1.5 mmol/L,  $K_m$  值越低, 代表了酶与底物的亲和力越高。3 种己糖激酶中只有 SpHXK1 对果

糖的高亲和力,同时对葡萄糖保持低亲和力。该酶在解脂耶氏酵母中异源过表达在保持其对葡萄糖高效利用的同时可加速果糖的同化,克服葡萄糖和果糖无法平行利用导致的发酵周期较长问题<sup>[23]</sup>。

己糖转运蛋白 YHT3 对果糖利用的速率取决于共表达的己糖激酶种类。当 YHT3 与 YIHXK1 共表达时,果糖的消耗只发生在葡萄糖耗尽之后,并且,培养基中果糖浓度需要达到 1.5 g/L 阈值才能以低速率消耗;而 YHT3 与 SpHXK1 共表达触发了一种完全不同的糖耗速度差异,允许葡萄糖和果糖快速且几乎平行地利用。在 SpHXK1 菌株中,YHT3 作用效果明显,而 YIHXK1 菌株中,借助其他转运体可以缓慢消耗果糖,但不能与葡萄糖平行消耗。YHT3 与不同己糖激酶共表达造成的葡萄糖和果糖共利用速率有显著差异,表明了转运蛋白 YHT3 和己糖激酶之间存在相互作用,这可能是由于对果糖亲和力较低的 YIHXK1 直接或间接影响 YHT3 对果糖的转运<sup>[23]</sup>。一方面,高果糖亲和力的 SpHXK1 可以快速转化低浓度果糖;另一方面,SpHXK1 不与内源蛋白互作,允许不间断的果糖摄入。除了对己糖起作用的保守结构域外,YIHXK1 一级结构存在一个区别于其他己糖激酶(如 SpHXK1)的特征结构域,即一个不典型的 37 个氨基酸环,该区域横跨在葡萄糖和 ATP 结合结构域之间,在抑制剂结合和基因表达调控中发挥重要作用<sup>[40]</sup>。该结构可以与 YHT3 相互作用,有效地减缓糖摄入,保护细胞免受中央碳代谢中的碳溢出和/或增加细胞内渗透压。在工程菌株生产柠檬酸的过程中发现单独过表达任何一种己糖激酶都可加速对果糖的利用,而过表达 SpHXK1 和转运蛋白的工程菌虽然表现出更高的葡萄糖和果糖利用效率,但柠檬酸产量却大幅下降,积累了大量

的多元醇,如甘露醇、赤藓糖醇,推测可能是由于糖酵解途径酶活力限制导致碳通量重定向至其他途径,如磷酸戊糖途径;也有可能是高糖内流导致细胞内渗透压升高,从而激活了体内渗透压的平衡防御机制,由此产生多元醇<sup>[23]</sup>。

在葡萄糖和甘油的混合碳源中,解脂耶氏酵母能够快速利用甘油<sup>[22]</sup>,表明除了以葡萄糖为代表的己糖摄取系统,该底盘还存在强大的甘油利用能力。甘油是生物柴油生产过程的主要副产物,来源丰富可再生、价格低廉,具有工业应用的潜能。Erian 等深入研究了甘油转运蛋白对解脂耶氏酵母在低浓度甘油条件下的吸收利用能力<sup>[41]</sup>,通过对 2 个酿酒酵母来源的甘油转运蛋白 ScFPS1 和 ScSTL1 进行系统发育和序列相似性比对从解脂耶氏酵母中筛选到 10 个可能参与甘油运输的转运蛋白。随后通过对甘油利用缺陷的酿酒酵母进行回补分析,确定该系列假定转运蛋白中有 6 个能够使酿酒酵母  $\Delta stl1$  菌株在甘油上生长,并且敲除该 6 个转运蛋白的解脂耶氏酵母在低浓度甘油中不能生长,单独回补 YALI0B17138g、YALI0C04730g、YALI0C16522g、YALI0E05665g 或 YALI0F00462g 能够恢复其甘油利用的功能。有意思的是,在高浓度甘油中解脂耶氏酵母甘油转运缺陷株生长并未受到影响,这表明在高甘油浓度下解脂耶氏酵母甘油转运存在尚待解析的机制<sup>[41]</sup>。

在开发解脂耶氏酵母平台以实现从甘油生产高附加值产品的过程中,Mironczuk 等在 *Y. lipolytica* A101 中过表达 GUT1 和 GUT2 来强化甘油同化,工程菌株在 5 L 生物反应器中能够在 44–48 h 内利用 150 g/L 的甘油,与对照菌株相比,GUT1 和 GUT2 的共表达对赤藓糖醇的生产率提升 35%<sup>[42]</sup>。此外还发现,GUT2 的单独过表达虽然促进甘油消耗以及细胞生物量,但赤藓糖醇的转化率下降了 26%,柠檬酸



含量提升了 11 倍<sup>[42]</sup>,表明 *GUT2* 过表达可以强化 G-3-P 合成 DHAP 的过程,提升的碳通量易流向 TCA 循环,促使柠檬酸过量积累,而敲除 *GUT2* 则阻断 G-3-P 至 DHAP 的合成途径,从而积累脂质合成的前体 G-3-P 导致脂质合成增加<sup>[43]</sup>,反面证明了 *GUT2* 在 G-3-P 合成 DHAP 过程中的重要性。而 Carly 等<sup>[44]</sup>在菌株 *Y. lipolytica* JMY2900 中过表达 *GUT1*、*GUT2* 和 *TPI1* 中任一或两个基因,都会促进赤藓糖醇的合成,单基因过表达 *GUT1*、*GUT2* 和 *TPI1* 的转化率分别提升 22%、22%和 17%,该结果与 Zhang 等报道的类似<sup>[22]</sup>,但与 Mirończuk 等<sup>[42]</sup>在 *Y. lipolytica* A101 菌株中负面的实验结果相反。此外,Carly 等<sup>[44]</sup>在 *Y. lipolytica* JMY2900 中过表达 *GUT1* 和 *GUT2* 效果不如单基因过表达 *GUT1*,并且 *GUT1* 和 *TPI1* 共表达与单基因过表达 *GUT1* 提升率持平。3-磷酸甘油醛异构酶(3-phosphoglyceraldehyde isomerase, *TPI1*)可催化 3-磷酸甘油醛(3-phosphoglyceraldehyde, GAP)和磷酸二羟基丙酮(dihydroxyacetone phosphate, DHAP)的相互转化,为可逆反应。单独过表达 *TPI1* 基因加强了赤藓糖醇的合成通路,推动 DHAP 向 GAP 转化,从而提升赤藓糖醇的产量;但是 *TPI1* 与其他基因组合过表达提升的效率没有表现出各个单基因提升效率的累加,这种情况在赤藓糖醇代谢工程改造过程中经常出现,一方面可能与出发菌株的生产性能相关;另一方面可能与基因表达插入的位点相关。Yang 等的研究也表明 *GUT1* 基因单独过表达时其表达水平显著高于与 *GUT2* 共过表达时表达水平<sup>[45]</sup>。Jagtap 等探究了高渗条件下相关基因的表达量,发现 *GUT2* 在低、高渗条件下表达无差异,*GUT1* 在高渗条件下相较于低渗条件下提升了惊人的 32 倍<sup>[46]</sup>。这一结果表明高渗条件诱导了 *GUT1* 的表达,而渗透压保护剂赤藓

糖醇需要在高渗、低 pH 条件下产生。相同基因的性能出现差异很可能是不同菌株代谢流向偏好性造成的<sup>[42,44]</sup>。尽管不同菌株有不同的代谢流向偏好性,但 *GUT1* 在甘油代谢模块中的关键性作用是被一致性论证的,因此,在构建高产赤藓糖醇细胞工厂过程中过表达 *GUT1* 是强化甘油同化的首要策略。

### 3.2 副产物模块的代谢工程改造

在高渗条件下,解脂耶氏酵母能够合成分泌多种多元醇,如赤藓糖醇、甘露醇、阿拉伯糖醇和核糖醇等,以发挥渗透压保护剂的功能。此外,解脂耶氏酵母还具有强大的柠檬酸合成能力,杂酸和杂醇在野生型菌株 PO1f 和 MK1 中发酵产量占比约为 25%–40%<sup>[21,46]</sup>。对于工业生产而言,杂醇或杂酸的代谢合成不仅降低了底物转化率,也增加了下游分离纯化的成本。研究表明,甘露醇和阿拉伯糖醇的生物合成可竞争赤藓糖醇主代谢途径的碳流,但其不参与维持细胞生命活动,因此阻断甘露醇和阿拉伯糖醇合成途径将碳流重定向至赤藓糖醇合成主路径成为代谢改造的首选策略。在大多数子囊门真菌中,甘露醇循环由两个途径组成<sup>[27-28]</sup>。途径 I: 6-磷酸果糖(F-6-P)被 NAD(H)依赖的甘露醇脱氢酶(mannitol dehydrogenase, MPD)转化为甘露醇-1-磷酸(mannitol-1-phosphate, M-1-P),随后在甘露醇-1-P 磷酸酶(mannitol-1-P phosphatase, MPP)作用下脱磷酸化转化为甘露醇;途径 II: F-6-P 脱磷酸后被一个可逆的 NADP(H)依赖的甘露醇脱氢酶(MDH)氧化生成甘露醇。解脂耶氏酵母的 MDH 已经被鉴定和表征,暂未发现 MPD 和 MPP 的同源物<sup>[27-28]</sup>。阿拉伯糖醇在解脂耶氏酵母中由 PPP 的中间体核酮糖-5-磷酸去磷酸化得到核酮糖,再经阿拉伯糖醇脱氢酶催化脱氢合成<sup>[25-26]</sup>。Wang 等通过序列比对筛选了解脂耶氏酵母 5 个内源性脱氢酶 AraDH1、AraDH2、

MDH1、MDH2 和 XDH, 从中鉴定到甘露醇和阿拉伯糖醇合成途径中的关键脱氢酶基因, 结合酶的底物特异性确定了编码甘露醇脱氢酶的关键基因 *MDH2*, 该基因的敲除使工程菌株 (HCY113) 不合成甘露醇<sup>[47]</sup>。值得注意的是, Jagtap 等<sup>[46]</sup>首次采用气相色谱质谱联用 (gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS) 比较了高渗和低渗条件下其他多元醇的积累情况, 发现高渗条件下山梨醇、肌醇以及核糖醇的相对浓度分别提升了 1.07、3.2 和 7.7 倍, 进一步证明高渗条件激活多元醇对细胞的保护作用, 但这些多元醇的绝对含量尚缺绝对定量数据, 可能是因其含量较低, 在解脂耶氏酵母中没有进行系统研究。研究表明在培养基中加入 NaCl 可以减少 46% 和 30% 副产物甘露醇和阿拉伯糖醇<sup>[45]</sup>, 主要是因为添加 NaCl 导致培养基渗透压升高, 引起产物中赤藓糖醇、甘露醇和阿拉伯糖醇各组分的变化, 相应的结果在 Bilal 等的研究也有报道<sup>[48]</sup>。

适量补充柠檬酸也能有效地提高赤藓糖醇的产量<sup>[49]</sup>, 可见柠檬酸水平的变化与赤藓糖醇的合成联系紧密。Zhang 等的研究显示过表达赤藓糖醇合成路径中相关酶可以提升进入 PPP 途径的碳流量, 从而使进入糖酵解途径的代谢流量相应减少<sup>[22]</sup>。反之, 如果糖酵解途径代谢流减弱也能增加赤藓糖醇的合成途径, 因此该团队通过过表达 AMP 脱氢酶编码基因 (*AMPD*, *YALI0E11495g*) 来降低 AMP 依赖的异柠檬酸脱氢酶的活性, 增加柠檬酸在 TCA 循环中的累积水平, 反馈抑制碳流进入 TCA 循环和糖酵解, 从而有利于 PPP 途径和赤藓糖醇的合成。过表达 *AMPD* 的菌株细胞干重下降了 18%, 赤藓糖醇产量增加了 12.5%<sup>[22]</sup>, 证明通过平衡细胞生长来增加赤藓糖醇产量策略的可行性, 但副产物柠檬酸的含量并未得到控制。如何平衡柠檬酸合

成和赤藓糖醇的积累成为一个难点, 进一步强化赤藓糖醇主合成路径竞争 TCA 代谢流或许是一个很好的选择, 不仅可以减弱菌体生长, 还可以降低柠檬酸副产物的含量。

### 3.3 PPP 氧化模块的代谢工程改造

糖酵解途径为细胞代谢提供 ATP 和 NADH, 而磷酸戊糖途径 (PPP) 不仅为多元醇生物合成提供充足的前体, 同时也是其还原力 NADPH 的主要来源。根据还原力和前体供应可将其分为氧化和非氧化两个阶段。PPP 途径氧化阶段涉及的脱氢酶 *ZWF1* (*YALI0E22649p*) 和 *GND1* (*YALI0B15598p*) 分别在催化 6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖内酯氧化的过程中, 将  $\text{NADP}^+$  还原为 NADPH, 成为代谢工程改善解脂耶氏酵母辅因子供应的热点基因<sup>[50-51]</sup>。多项研究表明, 相同浓度甘油和葡萄糖条件下, 甘油可提供更高的渗透压, 从而更有利于渗透压保护剂赤藓糖醇的生成<sup>[22,24]</sup>。Mirończuk 等的研究为这一现象提供了分子层面的解释, 即甘油的高强度渗透压导致 *ZWF1* 三倍于葡萄糖培养条件下的表达量, 在加强 PPP 途径的同时为赤藓糖醇生物合成过程提供了更多的还原力, 而 *GND1* 在两种碳源培养条件下的转录水平相近, 对渗透压和碳源种类依赖性较弱<sup>[21]</sup>。因此, Mirończuk 等率先在解脂耶氏酵母中强化 *ZWF1* 和 *GND1* 的表达, 过表达 *ZWF1* 和 *GND1* 的工程菌株将代谢流向赤藓糖醇合成方向转移, 促进赤藓糖醇的合成和甘油的利用速率, 在摇瓶水平将 *Y. lipolytica* MK1 的产量由 25.30 g/L 分别提升至 40.16 g/L 和 42.53 g/L。除此之外, 研究者还发现两种脱氢酶还可在赤藓糖醇的同化过程中发挥作用<sup>[21]</sup>。该结果在 Wang 等<sup>[47]</sup>和 Cheng 等<sup>[52]</sup>的工作中得到进一步验证: Wang 等在构建耐热型高产赤藓糖醇菌株的工作中, 也选择过表达 *ZWF1* 和 *GND1* 再生赤藓糖醇合成过程中消耗的

NADPH 以提升菌株生产性能<sup>[47]</sup>。Cheng 等在过表达 3 种赤藓糖还原酶(ER)的工程菌株中联合过表达 *ZWF1* 和 *GND1* 以促使菌株 NADPH 辅因子循环,使工程菌的产量提升了 6%,该结果继续为 *ZWF1* 和 *GND1* 在赤藓糖醇合成中的积极作用提供了有力支持<sup>[52]</sup>。但也存在相反结论的报道,如 Zhang 等<sup>[22]</sup>将涉及还原力循环的 3 个基因 *ER*、*ZWF1* 和 *GND1* 共过表达却发现工程菌株的生物量和赤藓糖醇的产量都意外地下降了,一方面可能是和出发菌株的性能有关,另一方面可能和多基因联合过表达引起代谢流方向变化不确定性相关<sup>[53]</sup>。总体而言,通过过表达 *ZWF1* 和 *GND1* 强化还原力供应进而改善解脂耶氏酵母赤藓糖醇生长和生产性能的技术路线是被广泛认可的。

### 3.4 PPP 非氧化模块的代谢工程改造

解脂耶氏酵母的 PPP 非氧化阶段由异构酶 RPE1、RKI1,转酮酶 TKL1 和转醛酶 TAL1 等 4 个关键酶参与(图 1),其中 TKL1 也可以催化糖酵解/糖异生中间体 GA-3-P 和 F-6-P 合成 PPP 途径的中间体 X-5-P 和 E-4-P,且在 PPP 途径涉及的所有基因中其转录活性最高,被视为这一过程的关键酶<sup>[21]</sup>。PPP 途径为脂质和多元醇的生产提供了丰富的前体,途径基因表达水平的提升可以实现代谢流的强化,同样适用于其他依赖于 PPP 途径合成目标产物的代谢工程改造<sup>[32,45-46]</sup>。Yang 等在模式菌株 *po1g* 中过表达 *TKL1* 使得赤藓糖醇滴度、转化率和时空产率增加至 40 g/L、0.45 g/g 和 0.333 g/(L·h),与对照菌株相比分别增加了 48.1%、50%和 48%,证明了 *TKL1* 在促进赤藓糖醇合成的重要性<sup>[45]</sup>。在低氧条件下,以 *Y. lipolytica* MK1 为底盘分别过表达 *TKL1* 和 *TAL1* 可以在摇瓶水平使解脂耶氏酵母利用甘油生产赤藓糖醇的产量相对于野生株分别提升 2 倍和 1.8 倍。过表达 *TKL1* 的

工程菌在 5 L 罐中赤藓糖醇产量提升近 70%,且强化了 PPP 途径推动了下游碳源的利用,进而促进了甘油利用速率,使得工程菌能够在 94 h 内完全耗尽 100 g/L 甘油,而对照菌株仅消耗 72 g/L 甘油<sup>[21]</sup>。在解脂耶氏酵母 JMY2900 中过表达 *TKL1* 尽管能将代谢流“拉”向 PPP 途径,将底盘菌转化率从 0.46 g/g 提升至 0.59 g/g,但并未加速甘油的消耗,甚至还呈现出更慢的趋势<sup>[44]</sup>。Zhang 等在研究基因组合过表达的工作中发现在 *Y. lipolytica* *po1f* 中单基因过表达 *TKL1* 或 *TAL1* 的菌株比原始菌株产量都能提高 60%以上<sup>[22]</sup>。此外,也有报道证明 *TKL1* 参与调节细胞呼吸作用。过表达 *TKL1* 的工程菌株在发酵过程中对溶氧的依赖程度下降,低氧条件下,一方面低搅拌浆转速减弱了剪切力,减少了对细胞的损伤;另一方面也减少了副产物的生成,简化了分离纯化工艺<sup>[21]</sup>。这些结果都说明 *TKL1* 和 *TAL1* 在赤藓糖醇生物合成中的关键作用,是代谢工程改造的优选基因。但 Jagtap 等以 *Y. lipolytica* *Po1f* 为底盘菌单基因过表达测试 *TKL1* 的效果,仅获得(11.1±2.7) g/L 赤藓糖醇,相对于出发菌株(10.70±0.20) g/L 的产量,*TKL1* 对于赤藓糖醇产量提升效果不佳<sup>[46]</sup>,推测可能与其采用的基因编辑策略有关:Zhang 等<sup>[22]</sup>利用 CRISPR 技术将 *TKL1* 基因定点整合至 *XPR2* 位点,而 Jagtap 等<sup>[46]</sup>将 *TKL1* 通过随机插入整合至基因组,插入位点以及基因拷贝数都存在不确定性,且插入的位点可能破坏了菌株的某些参与重要生理活动的基因,从而造成菌株合成赤藓糖醇性能上的差异。

非氧化模块中的异构酶 RKI1 对提升赤藓糖醇的合成也有积极作用,如 Zhang 等<sup>[22]</sup>通过基因过表达加强甘油代谢以及前体合成相关基因加强了细胞内 X-5-P 和 E-4-P 的供应,大大促进了赤藓糖醇的合成。在此工程底盘基础上

进一步过表达 *TAL1* 对赤藓糖醇的合成却几乎没有影响, 与单基因过表达时效果差异很大, 可能的原因是其他 PPP 代谢产物的供应不平衡, 如 5-磷酸核糖(R-5-P)相对不足。因此, 进一步增加 R-5-P 供应为随后的转酮和转醛反应提供更丰富和平衡的底物组合, 赤藓糖醇的最终浓度和产率均显著提高约 30%<sup>[22]</sup>。应用调控 *RKII* 表达水平来平衡复合基因改造工程菌引起的代谢失衡问题, 也为其他利用组合表达策略可能遇到的问题提供了解决方案参考。

### 3.5 赤藓糖醇合成模块的代谢工程改造

PPP 途径完成了赤藓糖醇关键前体 4-磷酸赤藓糖(E-4-P)的合成, 随后在合成模块关键酶 4-磷酸赤藓糖磷酸酶(erythrose-4P phosphatase, E4PP)和赤藓糖还原酶(erythrose reductase, ER)的连续催化作用下合成终产物赤藓糖醇。据报道, 在大肠杆菌中, 卤酸脱卤酶类水解酶超家族的一个成员 HAD13 显示出高度的 E-4-P 去磷酸化活性( $K_{cat}/K_m$  值为 106), 由 *YidA* 基因(*EG11195*)编码, 而内源性 *E4PP* 还没有在解脂耶氏酵母中得到表征<sup>[54]</sup>。Kuznetsova 等在解脂耶氏酵母中异源表达了密码子优化的 *YidA* 基因, 工程菌株生物量下降, 赤藓糖醇产量也显著低于野生型。该结果可能与 *YidA* 基因产物水解 DHAP 的能力有关, DHAP 被水解导致菌体内代谢流的减少, 影响了菌体的生长和目的产物合成<sup>[45,54]</sup>。

NADPH 依赖的赤藓糖还原酶(erythrose reductase, ER)属于醛酮还原酶家族, 催化解脂耶氏酵母生产赤藓糖醇合成途径的最后一个关键步骤, 其表达水平直接关系到赤藓糖醇的合成效率。在内源性 ER 被表征以前, Carly 等就已经在 *Y. lipolytica* JMY2900 中异源表达了密码子优化后的来源于 *C. magnolia* CBS2800 的赤藓糖还原酶基因 *ALR*, 并没有观察到对赤藓糖醇

生产能力的提高<sup>[44]</sup>。Janek 等<sup>[55]</sup>于 2017 年首次成功鉴定一种预测的解脂耶氏酵母内源赤藓糖还原酶基因 *YAL10F18590g*。通过在 *Y. lipolytica* MK1 中过表达验证其对菌株合成赤藓糖醇的影响, 重组菌产量、产率和转化率分别由初始的 68.2 g/L、(0.45±0.02) g/g 和(0.87±0.05) g/(L·h)提升至 78.1 g/L、(0.52±0.06) g/g 和(1.00±0.12) g/(L·h), 且  $Zn^{2+}$ 对酶活有正向促进作用<sup>[55]</sup>。但是敲除 *YAL10F18590g* 仅导致赤藓糖醇产量的降低, 并未中断赤藓糖醇的合成, 由此推测解脂耶氏酵母中还存在其他 ER 同工酶<sup>[55]</sup>。Cheng 等以 *Megachiliensis* 和 *Moniliella* sp.中 ER 同工酶为模板, 根据其严格依赖 NADPH 的特性在 *Y. lipolytica* CGMCC7326 的基因组中鉴定和表征了解脂耶氏酵母其他 2 个内源赤藓糖还原酶 ER10 (*YALI0D07634p*)和 ER25 (*YALI0C13508p*), 进一步将 *ER10*、*ER25* 和 *ER27* 分别在 *Y. lipolytica* CGMCC7326 中过表达, 赤藓糖醇的产量由 154 g/L 提升至 174、177、182 g/L (表 1)。敲除 *ER25* 和 *ER27* 导致赤藓糖醇产量分别下降了 11.1%和 17.1%。奇怪的是, *ER10* 基因的缺失导致重组菌合成赤藓糖醇的产量、产率分别提升了 10%和 9%, 且 3 个 *ER* 基因同时过表达的重组菌仅合成 178 g/L 的赤藓糖醇, 不及 *ER27* 单突变株。而 3 个 *ER* 基因复合突变株仍能合成 96 g/L 赤藓糖醇, 表明合成赤藓糖醇的替代生化途径或其他未知的 *ER* 基因仍有待鉴定<sup>[52]</sup>。最近的研究鉴定了 *ER27* 的一种同系物 *YALI0B07117g*, 其高度保守区的醛酮还原酶区序列与醛酮还原酶(aldehyde ketone reductase, AKR)结构域序列高度相似, 在 N 端醛酮还原酶区之前有 28 个氨基酸序列。敲除该基因后将会造成赤藓糖醇生产过程中副产物甘露醇和阿拉伯糖醇 2-3 倍的提升, 过表达则会提高基质消耗速率, 从而提升赤藓糖醇合成产率<sup>[56]</sup>。

表 1 模块化代谢工程改造解脂耶氏酵母高产赤藓糖醇研究现状

Table 1 Summary of production of erythritol by modularized metabolic engineering in *Yarrowia lipolytica*

Module	Initial titer (g/L)	Initial yield (g/g)	Strain	Carbon source	Strategy	Scale	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Qery (g/(L·h))	References
Substrate metabolism	35.00	0.46	<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	Gly	OEGUT1	35/250 mL	/	0.56	/	[44]
					OEGUT2		/	0.56	/	
					OETPII		/	0.54	/	
					OEGUT1-GUT2		/	0.54	/	
					OEGUT1-TPII		/	0.56	/	
	57.70	/	<i>Y. lipolytica</i> A101	Gly	OEGUT1 (GK)	2/5 L	71.30	0.48	0.990	[42]
					OEGUT2 (GDH)		41.60	0.28	/	
					OEGUT1-GUT2		78.00	0.52	1.080	
	10.70	0.11	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	Gly	OEGUT1 (GK)	50/250 mL	21.09	0.21	0.176	[46]
Reducing power supply	25.30	0.25	<i>Y. lipolytica</i> MK1	Gly	OEGND1	30/300 mL	40.16	0.40	0.430	[21]
					OEZWF1		42.53	0.43	0.450	
	154.00	0.51	<i>Y. lipolytica</i> GMCC7326	Glu	OEGND1-ZWF1	0.5/2 L	Improve 6.70%	Improve 14.30%	/	[52]
Precursor supply	35.00	0.46	<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	Gly	OETKL1	35/250 mL	/	0.59	/	[44]
					OEE4PP		30.00	0.44	/	
					OEER		/	0.57	/	
	25.30	0.25	<i>Y. lipolytica</i> MK1	Gly	OETKL1	30/300 mL	51.09	0.51	0.540	[21]
					OETALI		46.69	0.47	0.500	
	37.10	0.37	<i>Y. lipolytica</i> MK1	Gly	OEER	30/300 mL	44.44	0.44	0.770	[55]
	68.20	0.45	<i>Y. lipolytica</i> MK1	Gly	OEER	2/5 L	78.10	0.52	1.000	[55]
	154.00	0.51	<i>Y. lipolytica</i> GMCC7326	Glu	OEER10	0.5/2 L	174.00	0.58	2.100	[52]
					OEER25		177.00	0.59	2.100	
					OEER27		182.00	0.61	2.200	
OEER10-ER25-ER27					178.00		0.59	2.100		
10.70	0.11	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	Gly	OEPYP	50/250 mL	18.60	0.186	0.155	[46]	
				OETKL1		11.10	0.111	0.092		
				OEPYP-TKLI		15.26	0.153	0.127		
27.00	0.30	<i>Y. lipolytica</i> Y01	Gly	OETKL1	50/250 mL	40.00	0.45	0.333	[45]	
Erythritol metabolism	30.70	0.39	<i>Y. lipolytica</i> W29	Gly	$\Delta EYK1$	1/2 L	35.70	0.49	0.590	[29]
	27.00	0.30	<i>Y. lipolytica</i> Y01	Gly	$\Delta EYD1$	50/250 mL	9.40%	3.60%	/	[45]
Multi-module combination	55.80	0.44	<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	Gly	OEGUT1-TKLI	1/2 L	79.40	0.48	0.740	[44]
				Gly	$\Delta EYK1::GUT1-TKLI$	1/2 L	80.60	0.53	1.030	
	35.00	0.46	<i>Y. lipolytica</i> JMY2900	Gly	OEGUT1-ER	35/250	/	0.61	/	[44]

(待续)

(续表 1)

Module	Initial titer (g/L)	Initial yield (g/g)	Strain	Carbon source	Strategy	Scale	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Qery (g/(L·h))	References
	154.00	0.51	<i>Y. lipolytica</i> GMCC7326	Glu	OEER10-ER25-ER27-ZWF1-GND1	0.5/2 L	190.00	0.63	2.400	[52]
	145.00 (33 °C)	0.48	<i>Y. lipolytica</i> GMCC7326	Glu	$\Delta$ MDH2 $\Delta$ EYD1::RSP5::ZWF1::GND1	0.5/2 L	190.00	0.63	1.970	[47]
	156.00 (33 °C)	0.52	<i>Y. lipolytica</i> GMCC7326	Glu	$\Delta$ MDH2 $\Delta$ EYD1::RSP5::ZWF1::GND1	100/150 L	188.00	0.627	2.210	[47]
	165.00 (33 °C)	0.55	<i>Y. lipolytica</i> GMCC7326	Glu	$\Delta$ MDH2 $\Delta$ EYD1::RSP5::ZWF1::GND1	22.5/30 m <sup>3</sup>	196.00	0.653	2.510	[47]
	10.70	0.11	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	Gly	OEPYP-GUT1	50/250 mL	23.98	0.24	0.200	[46]
					OEPYP-GUT1-TKLI		27.48	0.28	0.286	
					OEPYP-GUT1-TKLI		58.80	/	/	
/	/	/	<i>Y. lipolytica</i> Po1f	Gly	$\Delta$ EYD1::GUT1-TPII-TKLI-TAL1	30/250 mL	40.00	0.40	/	[22]
					$\Delta$ EYD1::GUT1-TPII-TKLI-TAL1-RKII		52.00	0.52	/	
	27.00	0.30	<i>Y. lipolytica</i> Y01	Gly	OEGUT1-GUT2-TKLI	50/250 mL	65.00	0.56	0.541	[45]
					$\Delta$ EYD1::GUT1-GUT2-TKLI	2/5 L	150.00	0.62	1.250	

/: Data not shown.

最近, 研究者在解脂耶氏酵母中重构了 E-4-P 到赤藓糖醇的合成通路, 用一个酿酒酵母来源的糖醇磷酸酶(sugar alcohol phosphatase) PYP 取代 E4PP 和 ER 直接催化 E-4-P 合成赤藓糖醇, 缩短合成通路提升效率的同时还可以避免 E-4-P 到赤藓糖醇两步反应之间代谢流不平衡和还原力供应不足的问题<sup>[46]</sup>。这种来自酿酒酵母的 PYP 在细胞内负责平衡 PPP 和糖酵解的强度, 通过水解 PPP 中的磷酸糖醇盐产生相应的糖醇来防止其对生长的抑制<sup>[57]</sup>。在 *Y. lipolytica* W29 中过表达虽然没有观察到原本的解除生长抑制的作用, 细胞干重反而从 8.52 g/L 下降到 6.89 g/L, 但是赤藓糖醇浓度和甘油利用率分别提升至对照菌株的 1.7 倍和 1.5 倍。当然, 生物量下降也可能与该酶消耗 E-4-P 导致 PPP 途径代谢流拉动加强有关。

### 3.6 多模块组合强化

单一模块的改造, 仅仅能加强或平衡某一局部代谢流, 对于代谢路径长且复杂的赤藓糖醇合成通路来说效果有限, 因此, 研究者们多采用多模块协同改造策略来完成高效赤藓糖醇细胞工厂的开发(表 1)。

Carly 等采用代谢工程技术过表达了 GUT1 和 TKLI, 同时敲除了 EYK1, 综合了底物代谢、前体合成以及代谢分解模块, 构建了性能显著提升的赤藓糖醇细胞工厂, 菌株拥有较高的甘油同化能力和转化率, 同时产物分解被抑制, 赤藓糖醇产量提高了 78%, 最高浓度的发酵周期缩短了 40%, 大大提升了赤藓糖醇的生产效率<sup>[44]</sup>。Cheng 等在加强前体合成模块的工程菌基础上通过强化还原力模块(ZWF1、GND1)以补充过表达 ER10、ER25 和 ER27 消耗的还原力, 获

得的发酵性能提高的工程菌株发酵周期缩短 16 h, 最高产物浓度达到 190 g/L (表 1)<sup>[52]</sup>。Jagtap 等<sup>[46]</sup>通过增加内源性 *GUT1* 和 *TKL1* 的表达以及优化发酵工艺进一步增加赤藓糖醇的产量, 赤藓糖醇最大浓度相对于野生型提升 257%, 生产时间缩短 24 h, 证实了解脂耶氏酵母在利用廉价底物生产高附加值产品的极大潜力。Zhang 等利用模块化代谢工程的理念, 研究了与赤藓糖醇合成相关的 3 个模块中的关键基因, 即甘油利用途径、赤藓糖醇前体形成途径和还原力循环。最终通过共过表达 *GUT1*、*TKL1*、*TPI1* 和 *TAL1* 有效地提高赤藓糖醇的产量(表 1), 进一步验证了甘油利用和前体转化率对赤藓糖醇合成的重要性。在此基础上, 研究者还通过敲除赤藓糖醇代谢利用模块第一个基因 *EYD1* 解除发酵后期菌株对于赤藓糖醇的降解作用, 进一步提升生产效率<sup>[22]</sup>。

近期, 江南大学的 Yang 等通过过表达 *GUT1*、*GUT2* 和 *TKL1* 以及敲除 *EYD1*, 在破坏赤藓糖醇代谢模块的基础上强化了甘油代谢模块和前体形成模块, 实现了直接利用生物柴油副产物粗甘油生产赤藓糖醇的最高产量和生产率, 分别为 150 g/L 和 0.62 g/g<sup>[45]</sup>, 为野生型解脂耶氏酵母通过代谢改造以粗甘油为原料生产高附加值产品奠定基础, 也为生物柴油副产物的高效应用提供了新方向。这些结果均表明利用基因工程技术定向改造解脂耶氏酵母对于高效赤藓糖醇细胞工厂构建的优势所在, 也为解脂耶氏酵母作为微生物底盘商业生产赤藓糖醇提供了依据。

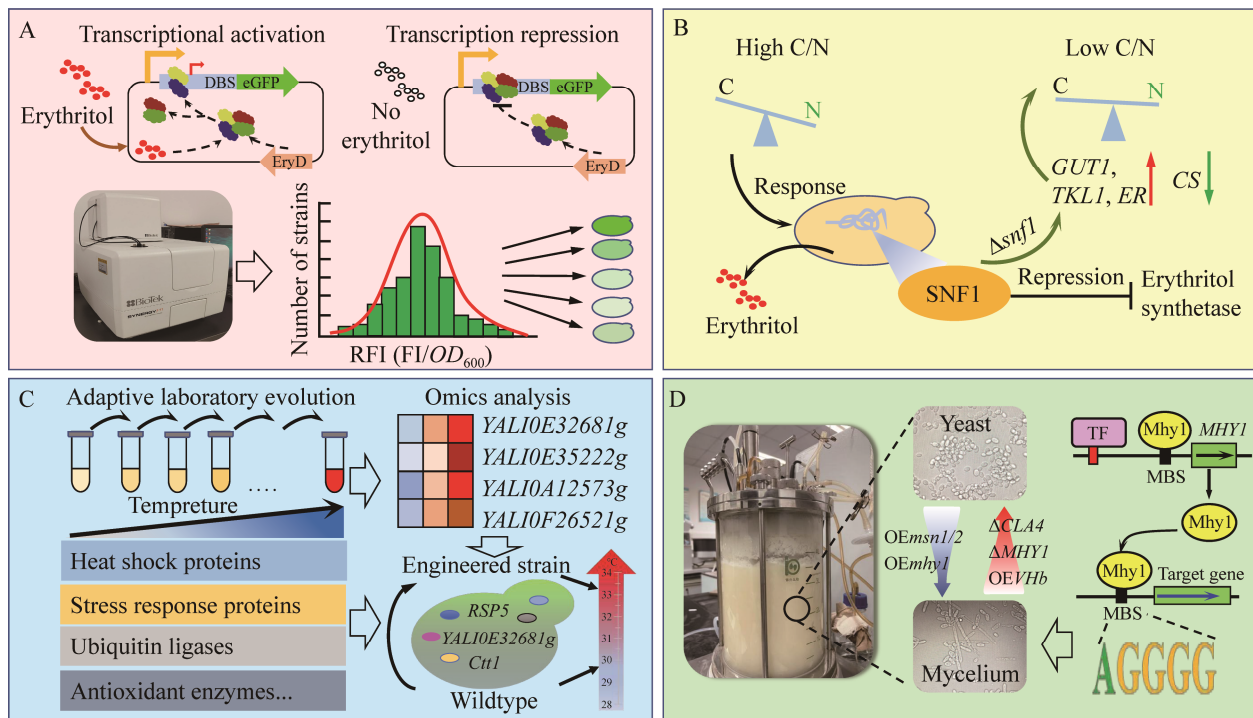
## 4 辅助策略提升底盘细胞工业属性

解脂耶氏酵母合成赤藓糖醇的限制性因素

在于合成途径中关键酶的活性和表达量, 利用模块化策略进行代谢工程理性设计和改造是提升其生产效率的有效手段。在工业生产中, 菌株对反应器的适应性也是需要考的重要因素, 比如对氮源、氧气的摄取利用等, 因此, 一些辅助提升底盘细胞工业属性的策略也被应用于赤藓糖醇细胞工厂的构建, 助力赤藓糖醇产业化应用和发展。

### 4.1 赤藓糖醇生产菌株高通量筛选

传统诱变技术获得高性能菌株常依赖于高效的筛选方法(图 2A), 现行的方法主要为化学显色法。Savergave 等利用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazole chloride, TTC)氧化还原为红色的 1,3,5-三苯基甲氮烷的特性, 采用 TTC 平板筛选还原酶活性更高的菌株, 以此初筛性能提升的菌株, 但细胞内还原酶种类和数量极多, 且大多数与赤藓糖醇的合成无关, 因此根据还原酶的活性间接筛选赤藓糖醇高产菌株存在一定挑战性<sup>[58]</sup>。Liu 等<sup>[59]</sup>采用高碘酸氧化法对赤藓糖醇高产菌株进行筛选, 可对摇瓶规模以上的赤藓糖醇发酵性能进行评估, 但该方法依赖于赤藓糖醇和葡萄糖浓度比例, 而在采用孔板进行高通量发酵条件下, 由于溶氧不足, 发酵液中赤藓糖醇与葡萄糖浓度比远低于 1:12, 结果偏差较大<sup>[60]</sup>。邱学良<sup>[17]</sup>利用 Ery 操纵子表达水平受胞内赤藓糖醇浓度的影响, 在大肠杆菌中构建了可以检测发酵液中赤藓糖醇含量的合成微生物生物传感器(synthetic microbial biosensor, SMB)荧光报告系统, 赤藓糖醇水平与荧光信号成正比。该系统大幅度提升诱变菌株的筛选效率, 研究人员可在 1 周内快速筛选和鉴定包含 1 152 个 UV 和 ARTP 联合诱变的突变体菌株库, 筛选出的最佳菌株能够在生物反应器中生产大于 148 g/L 的赤藓糖醇<sup>[61]</sup>。



**图 2** 辅助策略提升解脂耶氏酵母赤藓糖醇生产性能概述 A: 开发赤藓糖醇生物感应器, 采用 *eGFP* 作为报告基因高通量筛选高产菌株. B: 富氮条件下的 *SNF1* 蛋白敲除增强工程菌株生产性能. C: 热激蛋白挖掘并应用于生产菌株的耐热性改造. D: 二态型机制解析及控制提升生产过程菌株氧摄取能力

Figure 2 Overview of auxiliary strategies to enhance the production of erythritol in *Yarrowia lipolytica*. A: Development of erythritol biosensor for high throughput screening of high-yielding strains using *eGFP* as a reporter gene. B: Enhancing the production performance of engineered strains by knocking-out the *snf1* gene under rich nitrogen condition. C: Mining heat-response proteins and application of these proteins to modify the thermotolerance of strains. D: Resolution and control of dimorphism mechanism to enhance the oxygen uptake capacity of strains during production.

## 4.2 氮源饥饿响应改造

解脂耶氏酵母在赤藓糖醇生产过程中, 碳氮比、温度、溶氧传质和渗透压等因素决定了赤藓糖醇的转化率和发酵成本。赤藓糖醇的合成需要氮饥饿或高碳氮比( $C/N \geq 150/1$ )条件(图 2B), 该条件下可使更多碳源流向目标产物, 因此, 赤藓糖醇生产培养基要求氮含量控制在一个很低的水平。当以富氮的农业或工业废物为底物则可能由于低  $C/N$  比, 造成高氮含量的廉价碳源无法用于赤藓糖醇的高效生产。解脂耶氏酵母对富氮培养条件的响应由蔗糖非发酵蛋白激

酶基因(*Snf1*)调控。*Snf1* 是腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 的酵母同系物, 在酵母底物利用过程中可以调节各种转录因子(如 *Mig1*、*Cat8* 和 *Sip4*) 的活性, 影响 400 多个基因的表达, 包括在富氮条件下参与了基因的转录抑制<sup>[62]</sup>。Liu 等<sup>[63]</sup>对敲除了 *Snf1* 得到的工程菌株(M53-S)进行  $C/N$  比为 20/1 培养条件下的碳源摄取率和赤藓糖醇转化率分析发现, 赤藓糖醇相较于氮限制时( $C/N=250/1$ )提高了 46%和 49%, 也消除了菌株生产赤藓糖醇对于高渗透压的依赖。进一步采用转录水平的



基因检测以及翻译水平的酶活性分析确定 M53-S 赤藓糖醇合成途径中关键基因 *TKL1*、*TAL1* 以及 *ER* 等在富氮条件(C/N=20/1)下相较于野生株 M53 发生显著上调,这一工作证实了 *Snf1* 在氮饥饿与赤藓糖醇产量耦合中的关键作用,为富氮废物的直接利用提供了可能。

### 4.3 底盘细胞耐热性改造

解脂耶氏酵母的最佳生长和生产温度约 28–30 °C,在大规模发酵过程中,需要消耗大量冷却水,尤其是在夏季,冷却能量的高运行成本也限制了生物制造的经济性,因此适应性进化和随机诱变在耐受工程中得到了广泛的应用(图 2C)。邱学良等利用适应性进化技术获得一株耐热菌株,利用转录组分析发现硫胺素合成途径中 4 个基因: *YAL10E32681g*、*YAL10E35222g*、*YAL10A12573g* 和 *YAL10F26521g* 表达水平上调,通过在解脂耶氏酵母中过表达这 4 个基因,工程菌(BBE-17T)在高于最适培养温度的 33 °C 条件下,赤藓糖醇产量由出发菌株的 11 g/L 提升至 32 g/L<sup>[64]</sup>;Liang 通过筛选和测试不同的耐热装置,8 株重组工程菌株在 35 °C 高温条件下生长性能良好,并且抗氧化性能也得到了改善。此外,菌株 FOS11-Ctt1 的赤藓糖醇滴度、产量和生产率在 8 个菌株中表现最好,分别达到 39.25 g/L、0.348 g/g 葡萄糖和 0.55 g/(L·h),与对照菌株相比分别提高了 156%、86% 和 161%<sup>[65]</sup>。Wang 等通过过表达酿酒酵母来源的泛素连接酶基因 *RSP5*,以提高细胞的耐热性,获得的工程菌可耐受 34 °C,并在 33 °C 下保持有效的赤藓糖醇生产能力(表 1)<sup>[47]</sup>。这些工作说明开发耐热性解脂耶氏酵母是当前赤藓糖醇产业发展的趋势,可进一步降低生产成本,提升企业生产的利润空间。

### 4.4 形态工程改善发酵过程氧摄取

解脂耶氏酵母大规模发酵过程中,氧气的

需求量大,而解脂耶氏酵母存在二态型,可通过响应环境条件以酵母、假菌丝体或菌丝体形式生长,发酵过程中发现形态变化可通过降低溶氧和传质效率从而影响赤藓糖醇的合成效率。解脂耶氏酵母的二态型存在复杂的调控网络,Pomraning 等证实了解脂耶氏酵母 *Msn2* (*Ylmsn2*)直系同源物是菌丝生长所必需的,并发现 *Ylmsn1* 的过表达能够使其以菌丝形态生长<sup>[66]</sup>。Wu 等采用转录组研究了 *Mhy1* (*Msn2/Msn4* 样蛋白)敲除和过表达菌株的胞内基因表达谱,发现  $\Delta$ *MHY1* 突变体中下调的最显著的基因为编码细胞壁蛋白或参与细胞壁合成的酶,并进一步证实 *Mhy1* 通过识别 5'-WNAGGGG-3'保守型结合基序控制这些细胞壁基因来调节二态型转化<sup>[67]</sup>。Liu 等将形态工程改造应用于  $\beta$ -胡萝卜素生产,通过敲除 *CLA4* 和 *MHY1* 基因将菌丝体转化回酵母形式,从而增加 139%的  $\beta$ -胡萝卜素产量<sup>[68]</sup>。Mironczuk 等则通过过表达来自透明颤菌(*Vitreoscilla stercoraria*)的血红蛋白 VHb,使得工程菌株发酵过程显示出酵母型细胞形态,改善了菌株生产过程低溶氧条件下的摄取能力,与对照菌株相比[ $Q_{ERY}=0.30$  g/(L·h),  $Y_{ERY}=0.29$  g/g],工程菌株在反应器中显示出更高的赤藓糖醇生产率[ $Q_{ERY}=0.38$  g/(L·h)]和产量( $Y_{ERY}=0.37$  g/g)<sup>[69]</sup>。这些研究进展为形态工程策略改善菌体发酵生产赤藓糖醇的性能提供了思路(图 2D)。

## 5 讨论与展望

赤藓糖醇作为发酵法生产的功能性糖醇,主要应用于食品添加剂领域。赤藓糖醇作为食品添加剂的一个主要前提是其生物安全性。目前国际食品法典委员会、欧盟、美国和我国都把赤藓糖醇列为可受监管使用的食品添加剂,其中国际食品法典委员会和我国 GB 2760—2014

均规定可按生产需要适量使用而未设定具体限量值, 欧盟则要求仅限作为风味增强剂用于低能或无添加糖调味饮料, 使用限量为 16 g/kg。近期, 美国克利夫兰医学中心 Hazen 团队采用靶向代谢组学研究跟踪记录了 1 200 余名有心脏病风险的患者血液中糖醇类甜味剂的浓度, 认为高浓度摄入赤藓糖醇可能增加不良心血管事件风险<sup>[70]</sup>。虽然其安全性已得到了国内外权威机构认可, 但仍需进一步加强其生产和应用方面的科学研究, 推动科学认知。近年来, 赤藓糖醇下游应用的场景也在不断拓展, 包括动物饲料、化妆品以及化工原料等。随着淀粉质原料市场价格的上涨, 使得生产企业迫切将目光聚焦在使用基因工程技术提升底盘细胞生产性能的研究上。本综述系统梳理了赤藓糖醇生物合成、竞争和降解途径以及代谢工程改造策略, 为后续的工业菌株改造提供研究方向。

解脂耶氏酵母是目前工业生产赤藓糖醇的主要菌株, 更高时空产率、更高转化率以及更好的耐热性是其生产性能全面提升的标志。通过对赤藓糖醇代谢合成途径以及调控网络系统分析, 找出关键节点, 采用基因编辑等技术手段对目标基因进行组合强化, 可以实现赤藓糖醇产量的理性提升, 并尽可能减少或消除副产物积累, 也为下游分离提纯降低成本。基因编辑工具开发、多组学数据积累以及对解脂耶氏酵母遗传代谢网络挖掘、菌体形态控制分子机制的理解将进一步推动解脂耶氏酵母底盘细胞性能改良。未来将从转录、翻译、翻译后修饰及代谢水平对赤藓糖醇生产菌株进行多层次剖析, 对赤藓糖醇生产菌所有节点进行全局分析, 结合转录组学、蛋白组学、代谢组学以及计算机代谢网络模拟等现代生物技术系统改良, 一定会通过理性设计构建出稳定性好、副产物少, 更适合工业化生产的赤藓糖醇生产菌株。

## REFERENCES

- [1] RZETCHONEK DA, DOBROWOLSKI A, RYMOWICZ W, MIROŃCZUK AM. Recent advances in biological production of erythritol[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(4): 620-633.
- [2] 刘芳美, 赵学群, 沙如意, 夏凯, 黄俊. 赤藓糖醇微生物合成研究进展[J]. *生物加工过程*, 2022, 20(2): 195-205.  
LIU FM, ZHAO XQ, SHA RY, XIA K, HUANG J. Advances in microbial production of erythritol[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2022, 20(2): 195-205 (in Chinese).
- [3] 隋松森, 王松江, 郭传庄, 王建彬, 李春芳, 李俊霖. 微生物发酵法产赤藓糖醇的研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(6): 125-131.  
SUI SS, WANG SJ, GUO CZ, WANG JB, LI CF, LI JL. Research progress in erythritol production by microbial fermentation[J]. *China Food Additives*, 2021, 32(6): 125-131 (in Chinese).
- [4] REGNAT K, MACH RL, MACH-AIGNER AR. Erythritol as sweetener—wherefrom and whereto?[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(2): 587-595.
- [5] DAZA-SERNA L, SERNA-LOAIZA S, MASI A, MACH RL, MACH-AIGNER AR, FRIEDL A. From the culture broth to the erythritol crystals: an opportunity for circular economy[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(11): 4467-4486.
- [6] European Food Safety Authority. Scientific opinion on the safety of the proposed extension of use of erythritol (E 968) as a food additive[J]. *EFSA Journal*, 2015, 13(3): 4033.
- [7] 王城, 李冬阳. 《健康中国饮料食品减糖行动白皮书(2021)》发布我国无糖饮料市场规模将在 2027 年达到 276.6 亿元[J]. *中国食品*, 2021(18): 156-157.  
WANG C, LI DY. Healthy China Beverage Food Sugar Reduction Initiative (2021) published China's sugar-free beverage market size will reach RMB 276.6 billion in 2027[J]. *China Food*, 2021(18): 156-157 (in Chinese).
- [8] SIVARAMAN B, BADLE SS, RANGASWAMY V. Production of 1,3-butadiene from erythritol[J]. *Chemistryselect*, 2016, 1: 4630-4632.
- [9] SUZUKI M, KITAGAWA M, YAMAMOTO S, SOGABE A, KITAMOTO D, MORITA T, FUKUOKA T, IMURA T. Activator including biosurfactant as

- active ingredient, mannosyl erythritol lipid, and production method thereof: US20100168405[P]. 2010-07-01.
- [10] NAKAGAWA Y, KASUMI T, OGIHARA J, TAMURA M, ARAI T, TOMISHIGE K. Erythritol: another C4 platform chemical in biomass refinery[J]. ACS Omega, 2020, 5(6): 2520-2530.
- [11] AMADA Y, WATANABE H, HIRAI Y, KAJIKAWA Y, NAKAGAWA Y, TOMISHIGE K. Production of biobutanediols by the hydrogenolysis of erythritol[J]. ChemSusChem, 2012, 5(10): 1991-1999.
- [12] 李坤, 牟志勇, 严鑫, 艾连中, 夏永军, 宋馨, 田延军, 张辉, 倪斌, 杨映津. 解脂耶氏酵母产赤藓糖醇研究进展[EB/OL]. [2023-04-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20221110.2124.036.html>.  
LI S, MU ZY, YAN X, AI LZ, XIA YJ, SONG X, TIAN YJ, ZHANG H, NI B, YANG YJ. Research progress on erythritol production from *Yarrowia lipolytica*[EB/OL]. [2023-04-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20221110.2124.036.html> (in Chinese).
- [13] van der WOUDE AD, PEREZ GALLEGO R, VREUGDENHIL A, PUTHAN VEETIL V, CHROUMPI T, HELLINGWERF KJ. Genetic engineering of *Synechocystis* PCC6803 for the photoautotrophic production of the sweetener erythritol[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 60-71.
- [14] TYLER CA, KOPIT L, DOYLE C, YU AO, HUGENHOLTZ J, MARCO ML. Polyol production during heterofermentative growth of the plant isolate *Lactobacillus florum* 2F[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(5): 1336-1345.
- [15] YUILL JL. Production of i-erythritol by *Aspergillus niger*[J]. Nature, 1948, 162(4121): 652.
- [16] LEE KJ, LIM JY. Optimized conditions for high erythritol production by *Penicillium* sp. KJ-UV29, mutant of *Penicillium* sp. KJ81[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2003, 8(3): 173-178.
- [17] 邱学良. 产赤藓糖醇亚罗解脂酵母的耐热机制分析及组合策略改造[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2020.  
QIU XL. Thermotolerance mechanism analysis and combination strategy transformation of erythritol producing *Yarrowia lipolytica*[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [18] GROENEWALD M, BOEKHOUT T, NEUVÉGLISE C, GAILLARDIN C, van DIJCK PWM, WYSS M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2014, 40(3): 187-206.
- [19] 李运清. 解脂耶氏酵母研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2015, 38(1): 8-13.  
LI YQ. Advances in studies of *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Jining Medical University, 2015, 38(1): 8-13 (in Chinese).
- [20] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品添加剂 赤藓糖醇: GB 26404—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. The national food safety standard food additive erythritol: GB 26404—2011[S]. Beijing: Standards Press of China, 2011 (in Chinese).
- [21] MIROŃCZUK AM, BIEGALSKA A, DOBROWOLSKI A. Functional overexpression of genes involved in erythritol synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 77-88.
- [22] ZHANG L, NIE MY, LIU F, CHEN J, WEI LJ, HUA Q. Multiple gene integration to promote erythritol production on glycerol in *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology Letters, 2021, 43(7): 1277-1287.
- [23] HAPETA P, SZCZEPAŃSKA P, WITKOWSKI T, NICAUD JM, CRUTZ-LE COQ AM, LAZAR Z. The role of hexokinase and hexose transporters in preferential use of glucose over fructose and downstream metabolic pathways in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(17): 9282-9301.
- [24] RZETCHONEK DA, SZCZEPAŃCZYK M, WANG GK, BORODINA I, MIROŃCZUK AM. HOG-independent osmoprotection by erythritol in yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Genes, 2020, 11(12): 1424-1438.
- [25] YANG L, KONG W, YANG W, LI D, ZHAO S, WU YC, ZHENG SY. High D-arabitol production with osmotic pressure control fed-batch fermentation by *Yarrowia lipolytica* and proteomic analysis under nitrogen source perturbation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 152: 109936-109943.
- [26] RAVIKUMAR Y, RAZACK SA, PONPANDIAN LN, ZHANG GY, YUN JH, HUANG JQ, LEE DH, LI XL, DOU Y, QI XH. Microbial hosts for production of D-arabitol: current state-of-art and future prospects[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 120: 100-110.
- [27] DULERMO T, LAZAR Z, DULERMO R, RAKICKA M, HADDOUCHE R, NICAUD JM. Analysis of ATP-citrate lyase and malic enzyme mutants of *Yarrowia lipolytica* points out the importance of

- mannitol metabolism in fatty acid synthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2015, 1851(9): 1107-1117.
- [28] ZHANG Y, ZHANG XY, XU YR, XU S, BILAL M, CHENG HR. Engineering thermotolerant *Yarrowia lipolytica* for sustainable biosynthesis of mannitol and fructooligosaccharides[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 187: 108604-108615.
- [29] CARLY F, GAMBOA-MELENDEZ H, VANDERMIES M, DAMBLON C, NICAUD JM, FICKERS P. Identification and characterization of *EYK1*, a key gene for erythritol catabolism in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(17): 6587-6596.
- [30] CARLY F, STEELS S, TELEK S, VANDERMIES M, NICAUD JM, FICKERS P. Identification and characterization of *EYD1*, encoding an erythritol dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* and its application to bioconvert erythritol into erythrulose[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 963-969.
- [31] MIROŃCZUK AM, BIEGALSKA A, ZUGAJ K, RZETCHONEK DA, DOBROWOLSKI A. A role of a newly identified isomerase from *Yarrowia lipolytica* in erythritol catabolism[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1122-1133.
- [32] NIANG PM, ARGUELLES-ARIAS A, STEELS S, DENIES O, NICAUD JM, FICKERS P. In *Yarrowia lipolytica* erythritol catabolism ends with erythrose phosphate[J]. *Cell Biology International*, 2020, 44(2): 651-660.
- [33] RZETCHONEK DA, NEUVÉGLISE C, DEVILLERS H, RYMOWICZ W, MIROŃCZUK AM. *EUF1*-a newly identified gene involved in erythritol utilization in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 12507-12514.
- [34] 庞庆霄, 韩昊, 祁庆生, 王倩. 微生物模块化共培养工程的应用及控制策略[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(4): 1421-1431.
- PANG QX, HAN H, QI QS, WANG Q. Application and population control strategy of microbial modular co-culture engineering[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(4): 1421-1431 (in Chinese).
- [35] LU YP, YANG QY, LIN ZL, YANG XF. A modular pathway engineering strategy for the high-level production of  $\beta$ -ionone in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 49-61.
- [36] LU HY, VILLADA JC, LEE PKH. Modular metabolic engineering for biobased chemical production[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(2): 152-166.
- [37] LAZAR Z, NEUVÉGLISE C, ROSSIGNOL T, DEVILLERS H, MORIN N, ROBAK M, NICAUD JM, CRUTZ-LE COQ AM. Characterization of hexose transporters in *Yarrowia lipolytica* reveals new groups of sugar porters involved in yeast growth[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2017, 100: 1-12.
- [38] GOOSSENS J, GONZE M. Nutritional and application properties of erythritol: a unique combination? Part I: nutritional and functional properties[J]. *Agro Food Industry Hi Tech*, 1997, 8(4): 3-9.
- [39] QIANG S, WANG J, XIONG XC, QU YL, LIU L, HU CY, MENG YH. Promoting the synthesis of precursor substances by overexpressing hexokinase (hvk) and hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (*Erg13*) to elevate  $\beta$ -carotene production in engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1346-1355.
- [40] HAPETA P, SZCZEPAŃSKA P, NEUVÉGLISE C, LAZAR Z. A 37-amino acid loop in the *Yarrowia lipolytica* hexokinase impacts its activity and affinity and modulates gene expression[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 6412-6425.
- [41] ERIAN AM, EGERMEIER M, MARX H, SAUER M. Insights into the glycerol transport of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Yeast (Chichester, England)*, 2022, 39(5): 323-336.
- [42] MIROŃCZUK AM, RZETCHONEK DA, BIEGALSKA A, RAKICKA M, DOBROWOLSKI A. A novel strain of *Yarrowia lipolytica* as a platform for value-added product synthesis from glycerol[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 180-191.
- [43] DULERMO T, NICAUD JM. Involvement of the G3P shuttle and  $\beta$ -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(5): 482-491.
- [44] CARLY F, VANDERMIES M, TELEK S, STEELS S, THOMAS S, NICAUD JM, FICKERS P. Enhancing erythritol productivity in *Yarrowia lipolytica* using metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 19-24.
- [45] YANG SL, PAN XW, WANG Q, LV QL, ZHANG X, ZHANG RZ, RAO ZM. Enhancing erythritol production from crude glycerol in a wild-type *Yarrowia lipolytica* by metabolic engineering[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1054243-1054256.
- [46] JAGTAP SS, BEDEKAR AA, SINGH V, JIN YS, RAO

- CV. Metabolic engineering of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* PO1f for production of erythritol from glycerol[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 188-204.
- [47] WANG N, CHI P, ZOU YW, XU YR, XU S, BILAL M, FICKERS P, CHENG HR. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for thermoresistance and enhanced erythritol productivity[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 176-195.
- [48] BILAL M, XU S, IQBAL HMN, CHENG HR. *Yarrowia lipolytica* as an emerging biotechnological chassis for functional sugars biosynthesis[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(4): 535-552.
- [49] LI LZ, YANG TY, GUO WQ, JU X, HU CY, TANG BY, FU JL, GU JS, ZHANG HY. Construction of an efficient mutant strain of *Trichosporonoides oedocephalis* with *HOG1* gene deletion for production of erythritol[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(4): 700-709.
- [50] YUZBASHEVA EY, MOSTOVA EB, ANDREEVA NI, YUZBASHEV TV, LAPTEV IA, SOBOLEVSKAYA TI, SINEOKY SP. Co-expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and acyl-CoA binding protein enhances lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *New Biotechnology*, 2017, 39: 18-21.
- [51] ABDEL-MAWGOUD AM, MARKHAM KA, PALMER CM, LIU N, STEPHANOPOULOS G, ALPER HS. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 192-208.
- [52] CHENG HL, WANG SQ, BILAL M, GE XM, ZHANG C, FICKERS P, CHENG HR. Identification, characterization of two NADPH-dependent erythrose reductases in the yeast *Yarrowia lipolytica* and improvement of erythritol productivity using metabolic engineering[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 133-144.
- [53] MASI A, MACH RL, MACH-AIGNER AR. The pentose phosphate pathway in industrially relevant fungi: crucial insights for bioprocessing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(10): 4017-4031.
- [54] KUZNETSOVA E, PROUDFOOT M, GONZALEZ CF, BROWN G, OMELCHENKO MV, BOROZAN I, CARMEL L, WOLF YI, MORI H, SAVCHENKO AV, ARROWSMITH CH, KOONIN EV, EDWARDS AM, YAKUNIN AF. Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(47): 36149-36161.
- [55] JANEK T, DOBROWOLSKI A, BIEGALSKA A, MIROŃCZUK AM. Characterization of erythrose reductase from *Yarrowia lipolytica* and its influence on erythritol synthesis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 118-130.
- [56] SZCZEPAŃCZYK M, RZETCHONEK DA, DOBROWOLSKI A, MIROŃCZUK AM. The overexpression of YALI0B07117g results in enhanced erythritol synthesis from glycerol by the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Molecules*, 2021, 26(24): 7549-7560.
- [57] XU YF, LU WY, CHEN JC, JOHNSON SA, GIBNEY PA, THOMAS DG, BROWN G, MAY AL, CAMPAGNA SR, YAKUNIN AF, BOTSTEIN D, RABINOWITZ JD. Discovery and functional characterization of a yeast sugar alcohol phosphatase[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(10): 3011-3020.
- [58] SAVERGAVE LS, GADRE RV, VAIDYA BK, NARAYANAN K. Strain improvement and statistical media optimization for enhanced erythritol production with minimal by-products from *Candida magnoliae* mutant R23[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 55(2): 92-100.
- [59] LIU P, WANG ZN, SU Y, LI Y, ZHANG QZ, WU HY. Screening and identification of erythritol-producing strains[J]. *Food Science*, 2010, 31(21): 308-311.
- [60] 袁野, 应向贤, 范光先, 诸葛健. 高碘酸氧化法直接测定发酵液中赤藓糖醇[J]. *无锡轻工大学学报*, 2000, 19(1): 72-75.
- YUAN Y, YING XX, FAN GX, ZHUGE J. Quantitative analysis in erythritol in fermentation supernatant by periodate oxidation[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2000, 19(1): 72-75 (in Chinese).
- [61] QIU XL, XU P, ZHAO XR, DU GC, ZHANG J, LI JH. Combining genetically-encoded biosensors with high throughput strain screening to maximize erythritol production in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 60: 66-76.
- [62] USAITE R, JEWETT MC, OLIVEIRA AP, YATES JR, OLSSON L, NIELSEN J. Reconstruction of the yeast Snf1 kinase regulatory network reveals its role as a global energy regulator[J]. *Molecular Systems Biology*,

- 2009, 5: 319-330.
- [63] LIU XY, YU XJ, WANG ZP, XIA J, YAN YB, HU L, WANG XY, XU JX, HE AY, ZHAO PS. Enhanced erythritol production by a Snf1-deficient *Yarrowia lipolytica* strain under nitrogen-enriched fermentation condition[J]. Food and Bioproducts Processing, 2020, 119: 306-316.
- [64] QIU XL, GU Y, DU GC, ZHANG J, XU P, LI JH. Conferring thermotolerant phenotype to wild-type *Yarrowia lipolytica* improves cell growth and erythritol production[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(8): 3117-3127.
- [65] LIANG PX, LI J, WANG QH, DAI ZJ. Enhancing the thermotolerance and erythritol production of *Yarrowia lipolytica* by introducing heat-resistant devices[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1108653-1108661.
- [66] POMRANING KR, BREDEWEG EL, KERKHOVEN EJ, BARRY K, HARIDAS S, HUNDLEY H, LABUTTI K, LIPZEN A, YAN M, MAGNUSON JK, SIMMONS BA, GRIGORIEV IV, NIELSEN J, BAKER SE. Regulation of yeast-to-hyphae transition in *Yarrowia lipolytica*[J]. mSphere, 2018, 3(6): e00541-18.
- [67] WU H, SHU T, MAO YS, GAO XD. Characterization of the promoter, downstream target genes and recognition DNA sequence of Mhy1, a key filamentation-promoting transcription factor in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Current Genetics, 2020, 66(1): 245-261.
- [68] LIU MM, ZHANG J, YE JR, QI QS, HOU J. Morphological and metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to increase  $\beta$ -carotene production[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(12): 3551-3560.
- [69] MIROŃCZUK AM, KOSIOROWSKA KE, BIEGALSKA A, RAKICKA-PUSTUŁKA M, SZCZEPAŃCZYK M, DOBROWOLSKI A. Heterologous overexpression of bacterial hemoglobin VHb improves erythritol biosynthesis by yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 176-183.
- [70] WITKOWSKI M, NEMET I, ALAMRI H, WILCOX J, GUPTA N, NIMER N, HAGHIKIA A, LI XS, WU YP, SAHA PP, DEMUTH I, KÖNIG M, STEINHAGEN-THIESSEN E, CAJKA T, FIEHN O, LANDMESSER U, TANG WHW, HAZEN SL. The artificial sweetener erythritol and cardiovascular event risk[J]. Nature Medicine, 2023, 29(3): 710-718.

(本文责编 陈宏宇)