

专论与综述

热带假丝酵母在合成生物学中的研究进展及应用

张豪^{1,2}, 曾婉², 李震², 林影^{*1}

1 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

2 金发科技股份有限公司企业技术中心, 广东 广州 510520

张豪, 曾婉, 李震, 林影. 热带假丝酵母在合成生物学中的研究进展及应用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2469-2486.

ZHANG Hao, ZENG Wan, LI Zhen, LIN Ying. Research progress and application of *Candida tropicalis* in synthetic biology[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2469-2486.

摘要: 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)是一种具有重要工业应用价值的非常规酵母, 因其在长链二元酸和木糖醇的工业化应用而闻名。随着合成生物学的发展, 热带假丝酵母在生物表面活性剂、单细胞油脂和高附加值化合物方面也展现出巨大的潜力, 使其成为了生物技术应用的重点对象之一。本文综述了热带假丝酵母中遗传编辑工具开发和应用的最新研究进展, 探讨了热带假丝酵母研究中的瓶颈及解决方案, 为未来的研究提供了参考和助力, 推动其在合成生物产业中的应用。

关键词: 热带假丝酵母; 基因组编辑; 生物技术; 工业应用

Research progress and application of *Candida tropicalis* in synthetic biology

ZHANG Hao^{1,2}, ZENG Wan², LI Zhen², LIN Ying^{*1}

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

2 National-certified Enterprise Technology Center, Kingfa Science and Technology Co., Ltd., Guangzhou 510520, Guangdong, China

Abstract: *Candida tropicalis*, an unconventional yeast species playing a significant role in industrial applications, is notable in the production of long-chain dicarboxylic acids and xylitol. With advancements in synthetic biology, *C. tropicalis* shows high potential as a host for producing biosurfactants, single-cell oil, and other high-value chemicals, becoming an

资助项目: 国家自然科学基金(22278160)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22278160).

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

Received: 2024-09-19; Accepted: 2025-02-04; Published online: 2025-03-06

important target in the application of biotechnology. This paper summarizes the recent progress in genome editing tools and applications in *C. tropicalis* and explores the bottlenecks and solutions in the research on *C. tropicalis*, aiming to provide reference for future research and drive forward the application of this yeast species in the industry of synthetic biology.

Keywords: *Candida tropicalis*; genome editing; biotechnology; industrial applications

随着合成生物学的发展,微生物细胞工厂在绿色生物制造和高附加值化学品的合成上发挥着越来越重要的作用,模式微生物大肠杆菌(*Escherichia coli*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是目前常用的底盘细胞,其清晰的遗传背景及成熟的遗传操作工具在产业化中发挥重要作用^[1-2]。然而,*E. coli*和*S. cerevisiae*合成部分化合物的效率不高、生物量低、培养成本高和抗逆性弱等不足,限制了其工业化应用^[3],所以发掘新的、更理想的宿主菌株是当前合成生物学的热点。非常规酵母因其较强的鲁棒性、广谱底物利用能力和高密度发酵上具有突出优势而受到越来越多的关注,热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)是一种自然界广泛存在的非常规酵母^[4],能够在 pH 4.0–11.0 和盐分浓度为 12% 的培养基中保持良好的生长活性^[5]。*C. tropicalis* 在木糖利用效率上表现突出,对木质纤维素预处理产生的酚类和醛类等生长抑制物具有较高的抗性^[6],其能利用农林废弃物水解液生产乙醇和木糖醇等生物产品^[7-9]。*C. tropicalis* 还具备强大的 ω -氧化酶系,能够将长链烷烃、长链脂肪酸或羟基脂肪酸氧化为长链二元酸^[10],已经实现了多种长链二元酸的产业化^[11]。此外,*C. tropicalis* 在生物表面活性剂、单细胞油脂和其他高价值产物的合成中也取得了重要进展^[12](图 1)。

另外,*C. tropicalis* 通常将 CUG 密码子翻译成丝氨酸而不是常规的亮氨酸,在引入外源基因表达时需要对其密码子进行特殊优化^[13]。当前,*C. tropicalis* 中基因组测序的完成和 CRISPR 基因编辑系统的建立为其天然代谢网络的理性改造提供了理论基础和技术支持,推动了相关

研究的进展。本文将重点阐述 *C. tropicalis* 中基因元件挖掘和编辑技术开发的进展和挑战,综述其应用研究的现状和优化产物合成策略,并对未来发展趋势进行展望。

1 热带假丝酵母中基因表达元件

非常规酵母中高效稳定的基因表达元件的挖掘和改造是合成生物学的重要内容^[14]。启动子是调节基因转录水平和影响基因表达的关键元件,在 *C. tropicalis* 中已有部分内源性启动子被表征,其中组成型强启动子 P_{GAP1} 最常被用于介导基因的过表达,如 Ahmad 等^[15]利用 P_{GAP1} 介导磷酸戊糖途径相关基因 *ZWF* 和 *GND* 的过表达,增强菌株 NADPH 供应,使木糖醇产量提高了 21%。张利华^[16]鉴定了包括 P_{GAP1} 在内的 8 个内源性启动子,并比较了启动子强度: $P_{GAP1} > P_{FBA1} > P_{HXT7} > P_{GPM1} > P_{ENO1} > P_{ADH2} > P_{PGK1} > P_{TEF1}$,其中最强启动子是最弱启动子的 42 倍,扩展了 *C. tropicalis* 中启动子对基因的调控范围。与组成型启动子不同,诱导型启动子能够根据研究的需求改变诱导条件,进而调控基因的转录和表达, P_{GAL1} 是常见的诱导型启动子^[17],在 *C. tropicalis* 中以 P_{GAL1} 介导外源蛋白 OsBG1 表达,在半乳糖诱导后 12 h 和 24 h OsBG1 的表达量分别提高 7.9 倍和 1.5 倍^[18]。此外,Umemura 等^[19]表征了异柠檬酸裂解酶 ICL1 启动子的活性,发现其在脂肪酸、醋酸或乙醇诱导下表达,有效提升了长链二元酸的产量。除了内源性启动子,一些外源启动子也能够在此实现基因的高效表达,在基因编辑工具的开发过程中,利用来源于季也蒙氏耶氏酵母(*Meyerozyma guilliermondii*)的 *MgTEF1* 启动子介导 Cas9 表达;来源于棉阿舒

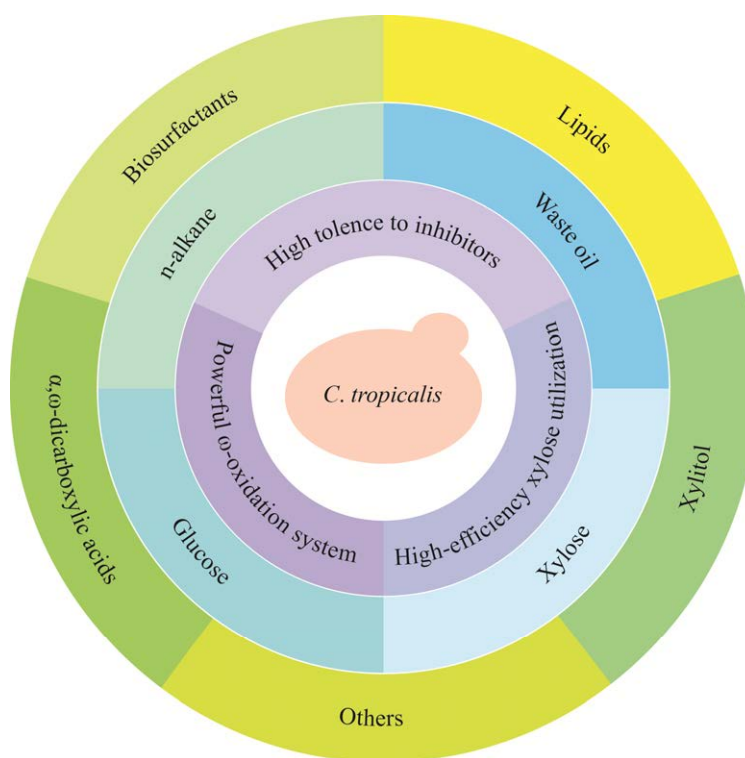


图1 热带假丝酵母的一般特性及应用 由内而外,第一圈表示 *C. tropicalis* 的特性,第二圈是 *C. tropicalis* 常用的底物,第三圈是 *C. tropicalis* 的应用方向。

Figure 1 General characteristics and application of *Candida tropicalis*. From the inside out, the first circle indicates the properties of *C. tropicalis*, the second circle is the substrate commonly used by *C. tropicalis*, and the third circle is the application of *C. tropicalis*.

囊霉(*Ashbya gossypii*)的 *AgTEF1* 启动子和近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*)的 *CptRNA^{Ala}* 融合启动子共同介导 sgRNA 表达^[20]。

终止子通过调节转录机制影响 mRNA 的稳定性,是基因转录过程中必不可少的调控元件^[21]。相较于启动子, *C. tropicalis* 中终止子的研究较少,通常使用的包括 *CYC1t*、*ENO1t*、*PGK1t*、*TEF1t* 和 *SYN7t* 等几种^[22]。Curran 等^[23]在 *S. cerevisiae* 中表征了多种终止子,发现不同的终止子对基因转录水平的影响十分明显,其中合成终止子较天然终止子序列更短、效果更好,还可以减少天然终止子重复使用导致的同源重组几率^[24]。在 *C. tropicalis* 的代谢工程改造中,终止子的挖掘和改造也逐渐受到研究者的关注。

2 热带假丝酵母的基因编辑研究进展

C. tropicalis 中已报道了多种基因编辑方式,早期主要是利用营养缺陷型标记对靶基因进行敲除。然而,该方法通常一轮只能完成一个基因的单拷贝敲除,每轮改造后都需要通过自发突变或分子改造重新获得营养缺陷型筛选标记,为实现基因改造,通常需要多轮实验。基因编辑工具的开发是推动 *C. tropicalis* 被进一步应用的关键,本文主要介绍了基于辅助序列、反向筛选和 CRISPR-Cas9 的基因编辑工具,这 3 种方法均能够在 *C. tropicalis* 中实现基因连续编辑。

2.1 基于辅助序列的基因编辑工具

辅助序列在 *C. tropicalis* 中实现基因连续

编辑的主要原理是在筛选压力下,将敲除表达盒整合到靶基因上,在有丝分裂期间,基因侧翼重复序列之间的重组频率较高。以 *C. tropicalis* 中 *URA3* 缺陷型菌株为出发菌株, Zhang 等^[25]利用来源于沙门氏菌(*Salmonella*)的 *hisG* 序列辅助构建了 *PDC-hisG-URA3-hisG-PDC* 敲除表达盒,成功敲除 *PDC*。为了进一步缩短敲除表达盒的长度以提高转化效率,以 *URA3* 自身序列为敲除辅助序列,有效缩短了敲除表达盒的长度,转化效率提高了 10 倍左右,利用该方法成功敲除 *CAT*、*POX4*、*POX5* 等^[25],但该方法会导致靶基因位点残留一部分辅助序列,无法做到无痕敲除。

2.2 基于 *mazF* 反向筛选标记的基因编辑工具

使用反向筛选标记进行基因组编辑通常可以做到无痕敲除, Wang 等^[26]开发了一种以 *E. coli* 核酸内切酶 *mazF* 为筛选标记的无痕编辑方法,将靶基因的同源臂整合到含有抗性基因 *G418* 和反筛基因 *mazF* 的自杀质粒上,利用 *G418* 抗性平板筛选通过单交换将质粒整合到基因组的阳性转化子,之后通过诱导 *mazF* 表达,反向筛选发生二次单交换去除质粒序列的转化子^[26]。该方法能够在 *C. tropicalis* 中实现基因的无痕敲除和插入,为基因连续编辑提供了可靠的方法,但其也有一定的缺陷,如需额外添加诱导物、诱导物添加的量难以控制往往会造成假阳性率高,每次编辑需连续 2 轮筛选,并且只能进行单拷贝编辑,基因编辑周期较长等。

2.3 基于 CRISPR-Cas9 系统的基因编辑工具

CRISPR-Cas9 系统是当前常用的基因编辑工具,已经在多种非常规酵母中实现了高效的基因编辑和外源基因的导入,如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)^[27-28]、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)^[29-31]、库德里亚兹毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)^[32]和圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*)^[33]等。CRISPR-Cas9

系统介导基因编辑主要有 3 种关键元件:靶向目的基因的 sgRNA 序列、切割蛋白 Cas9 和修复模板。游离质粒是非常规酵母中表达 Cas9 和 sgRNA 最常见的载体,需要着丝粒序列(centromere sequence, CEN)和自主复制序列(autonomously replicating sequence, ARS)来增强其遗传稳定性^[32]。然而, *C. tropicalis* 中关于 CEN 和 ARS 序列的研究极少,为了获得在 *C. tropicalis* 中稳定遗传的质粒, Lombardi 等^[20]构建了质粒 pCT-tRNA (图 2A),其采用来源于白色念珠菌(*Candida albicans*)的 ARS2 序列来增强遗传稳定性,以诺尔斯菌素抗性基因 *SAT1* 为筛选标记时能够在 *C. tropicalis* 中稳定传代。以 pCT-tRNA 为载体表达 Cas9 和 sgRNA,对 5 株 *C. tropicalis* 的 *ADE2* 进行编辑,在无同源臂修复模板的菌株中 *ADE2* 突变率为 88%–100%,添加 60 bp 修复模板的菌株中 *ADE2* 编辑效率为 50%–100%^[20],该编辑系统为 *C. tropicalis* 的菌株改造提供了可靠的工具。

挖掘菌株自身的 CEN 和 ARS 序列能够有效提升游离质粒的遗传稳定性和拷贝数,进而提升基因编辑工具的效率^[34]。Cao 等^[35]鉴定了 *P. kudriavzevii* 中的 CEN 序列,进而构建了含有 ARS 和 CEN 序列的稳定遗传的质粒,对 *ADE2* 的编辑效率从 85%提高到了 95%。另外,在 CEN 序列上游插入强启动子能够增强质粒稳定性,有助于提升质粒拷贝数和基因表达水平^[36]。目前只有少数酵母鉴定出自身 ARS 序列,多种酵母可以利用其他物种来源的 ARS 序列增强质粒的遗传稳定性,如 *P. kudriavzevii*^[37]和 *P. pastoris*^[38]采用来源于乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)的 panARS 序列提升了其基因编辑质粒的编辑效率。

由于部分酵母菌株缺乏稳定遗传质粒, Cas9 和 sgRNA 通常被整合到基因组上以完成对靶基因的编辑。然而,该方法具有操作过程烦琐、筛选需要使用抗生素或缺陷型筛选标记等缺点,无法实现基因的连续编辑,并且 Cas9

对菌株的毒性具有不确定性^[39]。CRISPR-Cas9 瞬时表达系统以游离片段的形式表达 Cas9 和 sgRNA, 可以不依赖表达质粒或将 Cas9 和 sgRNA 整合到基因组来实现基因编辑。Zhang 等^[40]开发了针对 *C. tropicalis* 的 CRISPR-Cas9 瞬时表达系统, 将 Cas9 表达盒、sgRNA 表达盒和靶基因的同源臂一同转化到感受态细胞中(图 2A), 该方法对 *URA3* 的编辑效率达到 100%, 但对 *ADE2* 的编辑效率只有(10.5±1.2)%; 为了提高编辑效率, 将 *ADE2* 的同源臂构建到瞬时表达盒的末端后编辑效率达到了(85.0±2.7)%^[40]。瞬时表达系统还能够对多基因进行编辑, 利用 20 bp 的 DNA 融合表达 *URA3* 和 *ADE2* 的 sgRNA, 编辑效率达到(32.4±4.1)%^[40]。将同源臂融合到瞬时表达盒两端提高了 Cas9 切割系统与修复模板同时转化到感受态细胞中的概率, 从而提升了编辑效率^[41]。相较于基因编辑质粒, 瞬时表达系统的 DNA 序列更短且为线性片段, 其转化相对容易, 有助于提升阳性转化子数量。另外, 已有研究表明 CRISPR 系统的瞬时表达可能会最大限度地减少脱靶效应和细胞毒性^[41-42]。CRISPR-Cas9 瞬时表达系统虽然简单易操作, 但由于缺乏筛选标记, 不利于阳性转化子的鉴定, 尤其是多基因编辑假阳性率较高。为了进一步提高其编辑效率, Li 等^[43]开发了基于 III 型启动子的 tRNA:sgRNA 平台, 以 tRNA^{Gly} 作为启动子提高 sgRNA 表达, 提高了瞬时表达系统的基因编辑效率。

C. tropicalis 中 CRISPR-Cas9 系统的建立实现了单基因编辑和多基因编辑, 显著缩短了基因编辑时间并提高了编辑效率。但目前该系统在 *C. tropicalis* 的应用中仍有一些不足之处, 如 *C. tropicalis* 中基因修复主要依靠非同源末端重组(图 2B), 通过强化与同源重组相关的基因 *RAD52* 和 *RAD59* 表达, 或者弱化与非同源末端修复相关基因 *KU70* 和 *KU80* 的表达来提升菌株的同源重组能力, 从而进一步提升菌株的编辑效率^[20]。另外, CRISPR-Cas9 基因编辑系统对靶基因的

识别依赖于特定的间隔相邻基序(proto-spacer adjacent motif, PAM) NGG, 因而在基因编辑过程中存在一定缺陷, 而 Cas14 蛋白在识别靶基因时不依赖于 PAM 序列, 可以为基因编辑提供更多的可能性和选择性^[44]。

3 热带假丝酵母的合成生物学应用

多种非常规酵母在天然产物和精细化学品的合成上取得了巨大的进步, 如 *P. pastoris* 合成广藿香醇和番茄红素^[45-47], *Y. lipolytica* 合成丁二酸^[48-49]和角鲨烯^[50]; *P. kudriavzevii* 合成苹果酸^[51], *R. toruloides* 合成类胡萝卜素^[52]。相较于常见的非常规酵母, *C. tropicalis* 的应用研究相对较少, 随着对该菌株特性的深入了解和技术的不断进步, 其应用从二元酸和木糖醇逐渐扩展到生物表面活性剂、单细胞油脂和高附加值化合物等其他产物(表 1)。

3.1 *C. tropicalis* 合成二元酸

二元酸(dicarboxylic acid, DCA)作为合成多种高附加值化学品的原料^[86], 已广泛应用于化工、农业和医药等领域^[58]。*C. tropicalis* 中二元酸合成的代谢路径如图 3 所示, 以正烷烃或脂肪酸为底物, 通过物理或者化学诱变和代谢工程改造增强 ω -氧化途径, 弱化 β -氧化途径^[87], 其中十二碳二元酸(DCA₁₂)产量达到 180 g/L^[53], 十三碳二元酸(DCA₁₃)产量超过 150 g/L^[54], 十四碳二元酸(DCA₁₄)产量达到 190 g/L^[55], 十七碳二元酸(DCA₁₇)在 50 m³ 生物反应器中产酸量为 163 g/L^[56]。除直接利用菌株生物催化正烷烃生产二元酸外, Sahoo 等^[88]使用一种无机材料 MoS₂-CNT-Eosin-Y 与 *C. tropicalis* 进行生物混合, 构建了一种生物杂合催化剂体系, 光照射促使 MoS₂-CNT-Eosin-Y 激发电子, 菌株吸收电子并利用它们激活 P450 酶催化活性, 促进烟酰胺辅助因子 NADPH 有效再生, 使十二碳二元酸产量达到 237 g/L, 较野生型菌株高 4.01 倍。

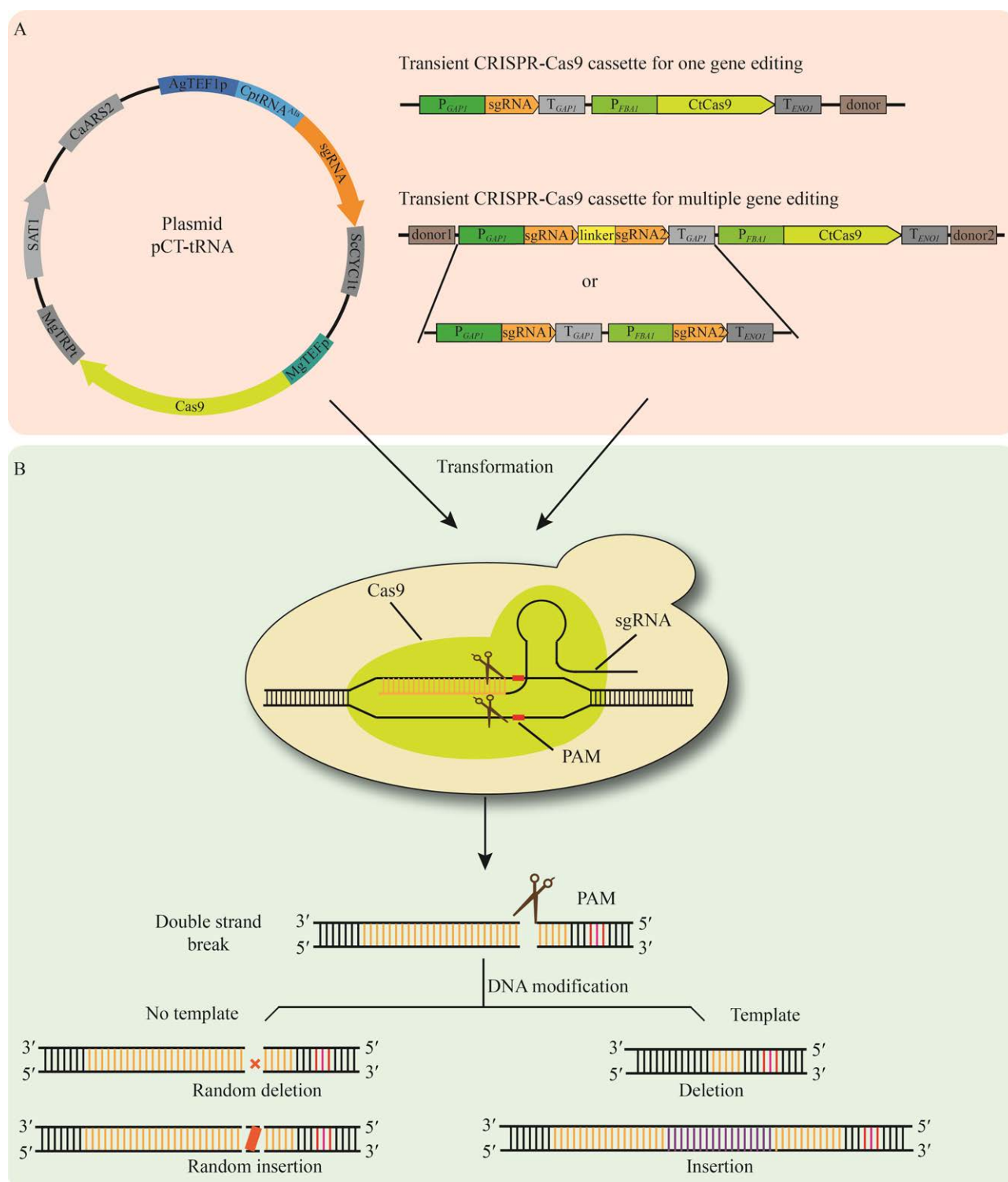


图 2 热带假丝酵母中 CRISPR-Cas9 基因组编辑示意图 A: CRISPR-Cas9 相关编辑工具; B: CRISPR-Cas9 介导 DNA 裂解后的修复。

Figure 2 Diagram of CRISPR-Cas9 system in *C. tropicalis* and schematic of genetic constructs. A: CRISPR-Cas9 related genome-editing tools; B: Repair after CRISPR-Cas9 mediated DNA cleavage.

表 1 热带假丝酵母的主要应用

Table 1 Main applications of *Candida tropicalis*

Product	Strain	Titer	Substrate	Reference
DCA ₁₂	ES4-6-5	180 g/L	Dodecane	[53]
DCA ₁₃	CGMCC 356	153 g/L	Tridecane	[54]
DCA ₁₄	ES4-6-5	190 g/L	Tetradecane	[55]
DCA ₁₇	ly-7	163 g/L	Heptadecane	[56]
Azelaic acid	ATCC 20962	30.10 g/L	Oleic acid	[10]
Sebacic acid	ATCC 20962	(34.50±1.10) g/L	Methyl decanoate	[57]
Sebacic acid	ATCC 20962	98.30 g/L	Methyl decanoate	[58]
Adipic acid	KCTC 7212	12.10 g/L	Methyl laurate	[59]
Xylitol	MTCC 6192	35 g/L	Corn cob hydrolysate	[60]
Xylitol	JA2	109.5 g/L	Sugarcane biomass hydrolysate	[61]
Xylitol	K2	90 g/L	Xylose and glycerol	[9]
Xylitol	ATCC 13803	41.50 g/L	Xylose and glycerol	[7]
Xylitol	GS18	34.21 g/L	Rice straw hydrolysate	[8]
Biodiesel	MF510172	13 mL/L	6% pineapple waste	[62]
Lipid	SY005	0.25 g/g	Glucose and xylose	[63]
Lipid	SY005	0.370 g/g	Galactose	[17]
Biodiesel	ASY2	2.68 g/L	Sago processing wastewater	[64]
Lipid	ATCC 750	8 g/L	Olive mill wastewater	[65]
Biodiesel	CBW-5	8.62 g/L	Corn cob hydrolysate	[66]
Biosurfactant	UCP 1613	4.90 g/L	Soybean post frying oil	[67]
Biosurfactant	UCP0996	7.36 g/L	Waste frying oil	[68]
Biosurfactant	RA1	31 g/L	Soya oil	[69]
Biosurfactant	NN4	10 g/L	Glucose	[70]
Phytase	NCIM 3321	6.08 U/mL	Glucose	[71]
Xylanase	MK-160	23.60 U/mL	Xylan	[72]
L-ribulose	ATCC 20336	9 g/L	Glucose and arabinose	[73]
Citric acid	KKU-L42	50.53 g/L	Glucose	[74]
Cellulase	YES3	34.20 U/mL	Napier grass biomass	[75]
Xylose reductase	IFO 0618	11.16 U/mL	Sawdust hydrolysate	[76]
Polyhydroxybutyrate	BPU1	0.39 g/g	Starch	[77]
Pectinase	13B	13.90 U/mL	Glucose	[78]
Phenylacetylcarbinol	TISTR 5306	(10.50±0.20) mmol/L	Pyruvate and benzaldehyde	[79]
α-humulene	CU-206	4 115.42 mg/L	Glucose	[80]
Cembratriene-ol	CU-208	1 425.76 mg/L	Glucose	[81]
Squalene	DC03	433.06 mg/L	Glucose	[82]
1,2,4-butanetriol	BT	3.42 g/L	Corn cob hydrolysate	[83]
β-carotene	ATCC 20336	(0.42±0.02) mg/g	Glucose	[43]
β-ionone	ATCC 20336	730 mg/L	Glucose	[22]
Perillic acid	ATCC 20336	106.69 mg/L	Glucose	[84]
Arabitol	ATCC 20336	26.65 g/L	Glucose	[85]

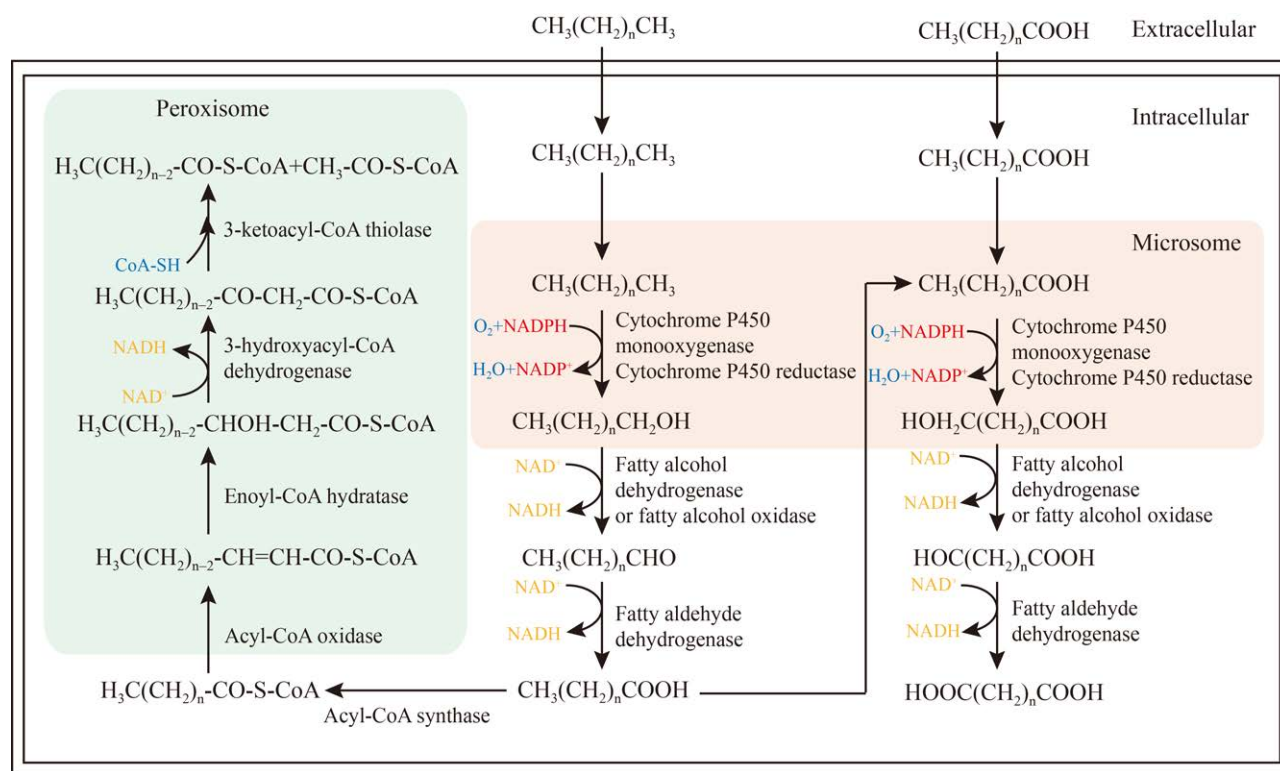


图 3 热带假丝酵母中烷烃和脂肪酸的代谢途径

Figure 3 Metabolic pathway of alkane and fatty acid in *C. tropicalis*.

当前二元酸的生产主要以石油来源的烷烃为底物，为了缓解石油资源短缺的现状，利用植物油生产二元酸的研究在近年来备受关注。*C. tropicalis* ATCC 20962 可以在壬酸乙酯加入后立即将壬酸乙酯裂解为壬酸，通过连续流加壬酸乙酯进行分批生物转化，壬二酸产量为 30.10 g/L，摩尔产率为 90%^[10]。*C. tropicalis* 以油脂为底物产二元酸时，脂肪酸对 *C. tropicalis* 有较强的毒性^[57]，而利用烷烃诱导激活 α,ω -氧化途径可以有效降低脂肪酸毒性，在 *C. tropicalis* ATCC 20962 利用癸酸甲酯向癸二酸的生物转化之前，利用癸烷诱导激活 α,ω -氧化途径，癸二酸的产率[(34.5±1.10) g/L]提高了 28%^[57]。此外，通过优化工艺参数也可显著提升油脂转化为二元酸的效率，Funk 等^[89]利用 *C. tropicalis* 转化椰子油脂来源的月桂酸甲酯，优化通气、补料速度和 pH 精细调控，十二碳二元酸的浓度从 28.9 g/L 提高到 66.0 g/L。除长链二元酸外，

C. tropicalis 还具有产中长链二元酸的潜力，*C. tropicalis* KCTC 7212 以月桂酸甲酯为底物，在最佳搅拌速率、最佳 pH 和敲除脂酰辅酶 A 氧化酶基因等条件下，获得 12.10 g/L 的己二酸，生产效率为 0.1 g/(L·h)，是目前酵母中报道的最高水平^[59]。虽然 *C. tropicalis* 可以利用可再生的油脂生产长链二元酸，但其二元酸的产量仍然较低，应进一步提升 *C. tropicalis* 对脂肪酸毒性的耐受性和生产过程中工艺的稳定性，推动以可再生资源生产长链二元酸的发展。

3.2 *C. tropicalis* 合成木糖醇

木糖醇是美国能源部认定的十二种平台化合物之一^[9]。相较于蔗糖，木糖醇具有更高的甜度和更低的热量，主要作为代糖应用于食品行业，其全球市场规模达到 22.6 万 t^[90]。可再生的木质纤维素水解液中因含有大量的木糖而成为木糖醇工业化生产的首选原料。*C. tropicalis* MTCC 6192 利用经活性炭法、膜法和离子交换

树脂法处理的玉米芯水解产物,木糖醇的产率达到 62%^[60]。预处理部分脱除了水解过程中产生的糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸等抑制物,增强了菌株对底物的利用率^[61]。随着对 *C. tropicalis* 的研究增多,发现其对未解毒的木质纤维素水解物具有较强的利用能力^[7,91-92]。Morais 等^[61]筛选了 218 种非 *S. cerevisiae* 菌株,其中 *C. tropicalis* JA2 对未脱毒的甘蔗渣水解液的转化效率最高,木糖转化率达到 0.47 g/g;进一步对发酵培养基进行调整优化,菌株 JA2 产木糖醇 109.5 g/L,木糖的转化率为 0.86 g/g^[61]。在木糖醇的生产过程中,微生物细胞内 NAD(P)H 供应不足是限制产量的关键因素,甘油较常见的木糖、蔗糖和葡萄糖可以提供更好的 NAD(P)H 供应^[9],从而有助于木糖还原酶将木糖还原为木糖醇,增加木糖醇的生成。Singh 等^[9]筛选到高产木糖醇的菌株 *C. tropicalis* K2,以未解毒的玉米芯木糖醇转化率为 0.62 g/g,以 20 g/L 甘油为共底物,木糖醇转化率为 0.90 g/g,产量达到 90 g/L。*C. tropicalis* 是最重要的木糖醇生产菌株之一,提高其对廉价农林废弃物的利用率,可以有效降低木糖醇的生产成本。

3.3 *C. tropicalis* 合成生物表面活性剂

表面活性剂是最重要的大宗化学品之一,广泛应用于人类日常生活中的所有产品和活动,如清洁产品、化妆品、食品和工业生产等^[93]。生物表面活性剂具有原料可再生、较好的环境相容性和稳定性等特性,被认为是以化石资源合成表面活性剂的重要替代品^[94]。*C. tropicalis* 具有较强的碳氢化合物代谢能力,能够在水油不混溶的培养基中生产生物表面活性剂。*C. tropicalis* UCP0996 以 2.5%废煎炸油为主要底物,其生物表面活性剂产量达到 4.19 g/L;在 2 L 和 50 L 的生物反应器中进行了放大生产,表面活性剂的产量分别为 5.87 g/L 和 7.36 g/L^[68]。高产菌株主要从石油储藏、石油泄漏的海水和海洋沉积物中筛选获得,原因是 *C. tropicalis* 能通过产生生物表面活性剂来乳化环境中的油类,进而吸收

利用。Ankulkar 等^[69]从被石油污染的炼油厂土壤中分离到 *C. tropicalis* RA1,菌株 RA1 在以大豆油为底物的发酵条件下,240 h 内产生 31 g/L 的槐糖脂。在表面活性剂的生产过程中培养基成分和发酵条件对产量有显著的影响,根据 Batista 等^[95]的研究,在限制氮源的情况下,可以增加 *C. tropicalis* 中生物表面活性剂的产量。除了优化发酵培养基外,进行相应的代谢路径重建能够有效提升表面活性剂产量^[96]。此外,生物表面活性剂的提取及纯化成本占总生产成本的 60%–80%^[97],所以开发成本更低及损耗更低的分离纯化方法能够推动其商业化发展。

3.4 *C. tropicalis* 合成单细胞油脂

单细胞油脂因与植物油脂相似的成分而被认为是植物油脂潜在的替代者^[98]。利用微生物生产油脂具有生长周期短、培养条件简单、不受季节和场地限制,以及可利用廉价的工农副产品等优点。*C. tropicalis* 不仅可以利用木糖、正构烷烃、脂肪酸、葡萄糖、乳糖、果糖和蔗糖等多种碳源,并且因其强大的脂肪酸合成途径,已成为生产脂质和特定脂肪酸的重要微生物^[99]。研究者对 *C. tropicalis* 产单细胞油脂的研究主要集中在廉价原料的利用及发酵条件优化,如 Thangavelu 等^[64]筛选的 *C. tropicalis* ASY2 利用木薯加工产生的副产品和西米加工产生的废水生产单细胞油脂,通过培养条件优化,油脂产量为 2.68 g/L。发酵培养基中合适的 C/N 可以提高脂质的产量,*C. tropicalis* ATCC 750 以橄榄油废水为底物,C/N 比为 19 时,其脂质产量最高,能够达到 8 g/L^[65]。

代谢改造也是提升 *C. tropicalis* 油脂产量的有效手段,过表达油脂合成相关基因脂肪酸合酶、乙酰-CoA 羧化酶、硬脂酰-ACP 去饱和酶和甘油二酯乙酰转移酶能够有效提升 *C. tropicalis* 中油脂的含量^[63,100]。此外,过表达转录因子激活油脂合成通路相关基因也能够有效提升细胞干重中的油脂含量。在 *C. tropicalis* SY005 中过表达自身转录因子 *CtRAP1*,促进脂肪酸合酶、

磷脂酸磷酸酯酶和甘油二酯乙酰转移酶表达上调,使得 SY005 分别以葡萄糖和半乳糖为碳源的发酵中,细胞干重中的油脂含量由 0.238 g/g 和 0.211 g/g 分别提升到 0.327 g/g 和 0.370 g/g^[17]。*CtRAP1* 在其他酵母菌中过表达也有类似效果,如在 *S. cerevisiae* 中过表达 *CtRAP1* 使其油脂产量提高了 4 倍左右^[101]。

将合成的油脂分泌到胞外也可以显著提升微生物油脂产量。当前促进油脂分泌主要有 2 种策略^[102]: (1) 通过敲除脂肪酸酰化和降解相关基因来促进脂肪酸分泌; (2) 通过敲除脂肪酸降解和脂质体形成的相关基因来促进脂肪酸分泌。以上 2 种策略在 *Y. lipolytica* 分泌油脂的研究中取得显著成效,但目前尚未应用于 *C. tropicalis*。另外,开发高效环保的提取方法也是推动微生物油脂商业化进程的重要策略之一。

3.5 *C. tropicalis* 合成其他产物

除上述各种产物以外,根据 *C. tropicalis* 的特性,很多研究人员还将其应用于其他方向研究,比如生产植酸酶、木聚糖酶、纤维素酶和 L-核酮糖等。植酸酶能够有效降解土壤中抗营养因子植酸,提升土壤中磷元素的利用率,具有重大商业价值。*C. tropicalis* NCIM 3321 在优化培养基及 10 L 生物反应器中,其胞外植酸酶的活性达到 6.08 U/mL^[71],是优良的植酸酶生产菌株。纤维素和半纤维素是农林废弃物的两大主要成分,纤维素酶和木聚糖酶可以有效提高农林废弃物的利用率^[72]。*C. tropicalis* MTCC 25057 在 42 °C,以纤维素和小麦秸秆水解液的混合物为底物,产纤维素酶活为 114.1 U/g,木聚糖酶活为 689.3 U/g^[103],其水解纤维素和木聚糖得到的葡萄糖和木糖还可以被 *C. tropicalis* 用来产生物乙醇和木糖醇,能够有效促进农林废弃物的水解和发酵协同进行。在半纤维素中还含有 L-阿拉伯糖,为了提高半纤维素的利用率,Bevilaqua 等^[73]通过在 *C. tropicalis* ATCC 20336 中表达异源 L-阿拉伯糖转运蛋白和 L-阿

拉伯糖异构酶基因构建了生产 L-核酮糖的工程菌,能够将 30 g/L 的 L-阿拉伯糖转化为 9 g/L 的 L-核酮糖,转化率为 30%。综上所述,*C. tropicalis* 在多个应用方向上具有广阔的前景,尤其是在提高农林废弃物的利用率方面。

4 *C. tropicalis* 产物合成优化策略

4.1 代谢工程改造

途径优化是代谢工程中的经典策略(图 4A),在 *C. tropicalis* 合成萜类化合物的研究中有广泛的应用。如甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA)可以合成萜类化合物的前体,对参与 MVA 途径关键限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGR)进行过表达,可以有效强化萜类产物的合成。Zhang 等^[80]利用葡萄糖中从头合成 α -蛇麻烯,提高 NADH 依赖性 HMGR、 α -蛇麻烯合酶和乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶的表达量,解决了 α -蛇麻烯合成途径的瓶颈,在 30 L 生物反应器中产量达到 4 115.42 mg/L,比初始产量增加 5 345 倍。弱化萜类化合物的合成途径中的支路途径是增强目的化合物代谢通量的有效策略,Li 等^[43]通过抑制 β -胡萝卜素竞争途径中的 *ERG9* 和过表达限速酶 HMGR,最终 β -胡萝卜素产量从 (0.23 $\pm$ 0.02) mg/g 提高到 (0.42 $\pm$ 0.02) mg/g。此外,抑制目的产物的降解或者转化为其他物质的相关酶,也可以显著提升目的产物浓度。Wei 等^[82]过表达来自 *S. cerevisiae* 的角鲨烯合酶基因 *ScERG9*,抑制角鲨烯环氧酶 *ERG1* 的表达,在 30 L 生物反应器中,角鲨烯浓度达到 433.06 mg/L。

利用信号肽将代谢途径相关酶定位到特定区室可以有效促进功能酶对底物的催化,降低产物积累对细胞的抑制和支路损耗,最终实现产物合成效率提升(图 4B)。Zhang 等^[81]通过重新设计樟树烯醇的合成途径,将 MVA 合成相关的酶在细胞质中表达,其他与樟树烯醇合成相关的酶定位在过氧化物酶体中表达,增加限速

酶的表达量,最终在 *C. tropicalis* 中合成樟树烯醇,5 L 生物反应器中其产量达到 1 425.76 mg/L,是目前已知微生物合成樟树烯醇的最高产量。由于不同细胞器内部环境与功能的差异,各细胞器之间的协作和物质交流有利于区室化改造。Yang 等^[84]合成紫苏酸前体物 L-柠檬烯的研究中,相关途径酶 *ERG10*、*ERG13*、*tHMGR*、*ERG12*、*ERG18*、*ERG19* 和 *IDI* 分别定位于不同细胞区室中,为了提升合成过程中物质交流,分别将相关酶共同定位在细胞质、线粒体和过氧化物酶体中表达,其 L-柠檬烯产量较原始菌株分别提高 31.7、8.91 和 12.1 倍,表明在同一细胞区室能够降低物质交流的难度,进而提升催化效率,但不同区室对底物转运和产物耐受能力不同,也导致了最终产量的差异。此外,挖掘新的信号肽有利于酶的区室化表达,Xu 等^[22]合成 β -紫罗兰酮时,挖掘了 *C. tropicalis* 中 4 条定位到脂滴的信号肽,利用信号肽将类胡萝卜素裂解双加氧酶 *phCCD1* 定位于脂滴进行过表达, β -紫罗兰酮产量从 125.4 mg/L 提升到 152.4 mg/L。

辅因子参与细胞内多种生化反应,是维持细胞正常生长的重要影响因素(图 4C),优化细胞内关键辅因子 NAD(P)H/NAD(P)⁺、乙酰-CoA 和 ATP/ADP 的浓度可以实现代谢流的最大化,有效提升目标代谢物的产量^[104]。Li 等^[83]在以玉米芯水解液为底物合成 1,2,4-丁三醇时,还原力不足限制了其产量的进一步提升,过表达磷酸戊糖途径中关键酶,使 NADPH/NADP⁺ 由 0.45 提升至 1.28,有效促进了 NADPH 再生,1,2,4-丁三醇产量达到 3.42 g/L。虽然 NADH 和 NADPH 具有相似的结构,但是参与的代谢途径有明显差异,NADH 和 NADPH 的相互转化可以促进细胞内代谢平衡^[104]。Li 等^[105]表达来自 *E. coli* 的 *PntAB* 促进胞内 NADPH 转化为 NADH,使胞内 RNA 积累量提升 5.5%。乙酰-CoA 作为合成异戊二烯类、脂肪酸、萜类化合物、类黄酮和聚酮等化合物的前体,提升乙酰-CoA 供给

可以有效提升相关化合物合成,Chen 等^[106]在 *Y. lipolytica* 中过表达乙酰-CoA 合酶,使其脂质含量提升了 25.7%。目前,非常规酵母中已开发多种辅因子平衡和再生的策略,但在 *C. tropicalis* 中应用较少,推动辅因子工程在 *C. tropicalis* 中的研究有助于提升目标化合物产量。

除了以上策略外,关键酶的挖掘、细胞外排工程和细胞耐受性工程均能有效提升目的产物的浓度^[107-108],但是需要根据不同产物生物合成机制合理选择改造策略。当前 *C. tropicalis* 在代谢工程改造方面主要集中在单条代谢通路或代谢模块的改造,相较于模式微生物 *S. cerevisiae*,*C. tropicalis* 中未知功能的代谢途径挖掘不充分,全局的调控及机理研究相对较少,限制了其应用范围,导致了产物产量仍然存在较大的差距。

4.2 诱变与适应性实验室进化

对于遗传背景不清晰和改造工具缺乏的非常规酵母,诱变是一种传统且有效地提升菌株性能的方法(图 4D)。Zhang 等^[109]利用常压和室温等离子体诱变,得到 200 多个突变体,从中筛选出木糖醇产量最高的菌株 T31,其产量为 0.61 g/g,较原始菌株提高 22%。然而诱变通常存在不确定性和优良表型菌株回复突变的风险,相比之下,适应性实验室进化更能得到稳定表型菌株。适应性实验室进化不仅加速了自然进化的过程,并且不需要考虑菌体内错综复杂、相互交叉的代谢网络,可以根据目的设计对应的压力,有利于发现新机制和实现表型优化,因此在提升菌株耐受性和底物利用方面具有广泛的应用(图 4E)。Wang 等^[110]通过对亲本菌株 Y-3 的不断进化,获得了对糠醛高耐受性的 Y31-N,其木糖醇转化率提高了 84.8%,糠醛消耗量提高了约 5 倍,并验证了与菌株耐受糠醛相关的基因,为进一步研究糠醛耐受性的机制提供了更广泛的认识。Phommachan 等^[111]通过高浓度葡萄糖的条件下逐渐升温培养,最终得到在高温下对乙醇、糠醛和羟甲基糠醛的耐受

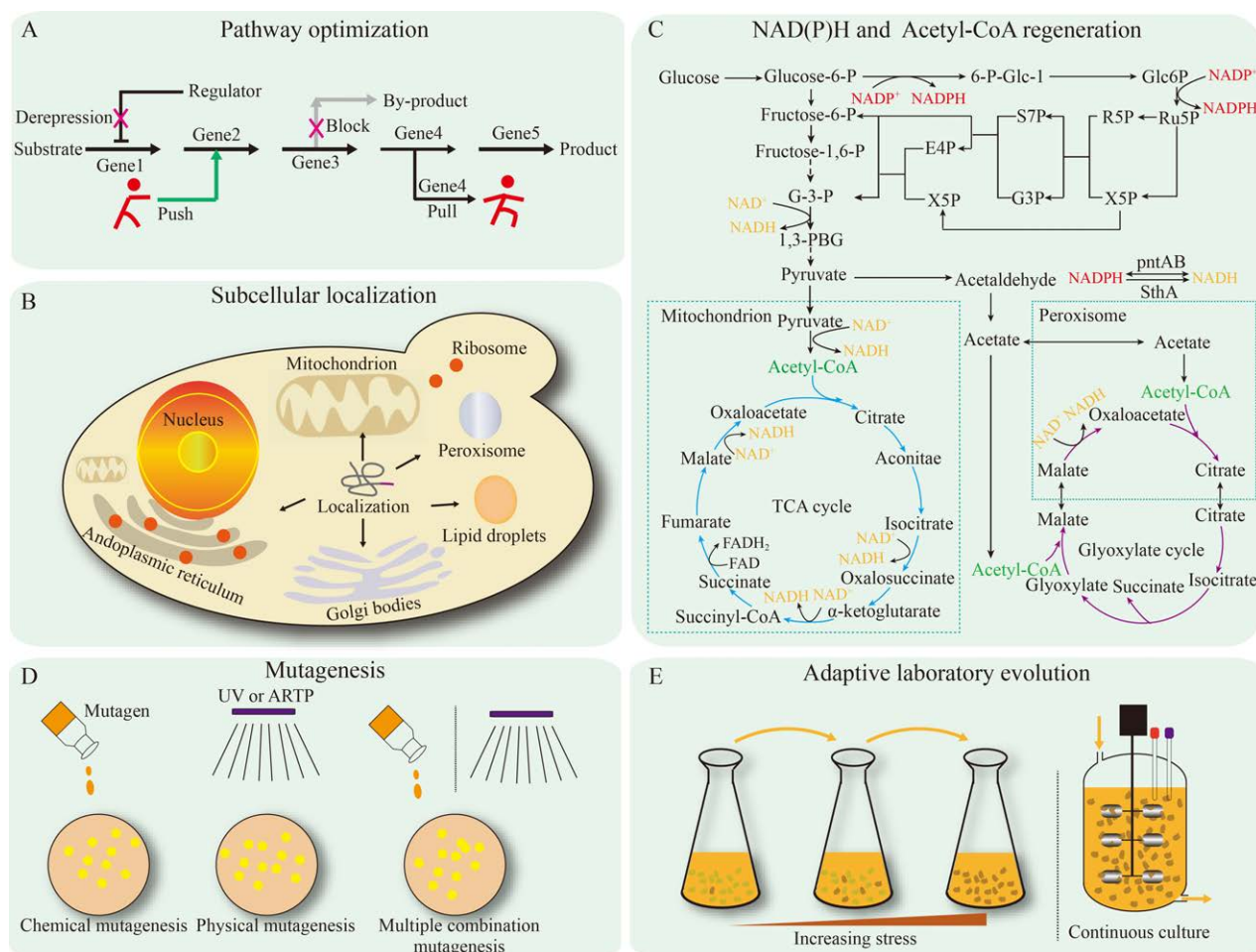


图 4 热带假丝酵母中产物合成的优化策略

Figure 4 Optimization strategies for products synthesis in *C. tropicalis*.

性大大增强的菌株，其高葡萄糖浓度下的发酵能力和利用木糖发酵能力均有所提高。

Luo 等^[66]通过常压和室温等离子体诱变和适应性实验室进化，获得能够在 45 °C 生长的耐热菌株，其脂质积累能力较原始菌株提高了 16.8%。随着低成本、高通量测序技术的普及，适应性实验室进化和生物信息学技术的有效结合，加快了适应性实验室进化过程中关键有益突变的鉴定和筛选^[112]，Ayepa 等^[113]先用甲基磺酸乙酯诱变使 SHC-03 逐步适应玉米秸秆水解物，再经过 60 轮适应性实验室进化，得到的菌株 GB-60 对玉米秸秆水解抑制物具有较高的耐受性；结合转录组和基因组测序分析发现，菌

株 GB-60 耐受性的提高与氧化应激反应、线粒体应激反应、内质网应激反应、DNA 修复、染色质保护、液泡应激反应和自噬等相关的基因功能得到增强相关。虽然诱变和适应性实验室进化能够获得具有特定生理性状和代谢能力的菌株，但菌株筛选通量大大增加，需要开发与其相对应的高通量筛选和检测技术。

5 总结与展望

C. tropicalis 因其独特的优势已经在长链二元酸和木糖醇等的商业化上取得成功，在合成高附加值的化合物方面也表现出巨大潜力，但 *C. tropicalis* 中基因表达相关的元件匮乏、基因

编辑效率还不够高、全基因组范围内基因整合位点研究较少等缺陷限制了其在合成生物学中的广泛应用。因此,需要进一步开发其工具包和相关技术,如研究不同生理状态下的转录组学,挖掘高效且特异性强的启动子和终止子元件,进一步开发杂合启动子,扩大基因表达的元件库;开发体内多片段的自组装技术,以减少重组菌株构建的难度;利用生物信息学挖掘基因组上的中性位点,为外源基因的导入提供更多选择位点;此外,由于直接敲除代谢通路和调控网络中的必需基因会影响菌株的生长活性,甚至致死。因此,需要开发转录后修饰的RNAi干扰工具,以实现必需基因表达更精细的调控。通过逐渐完善 *C. tropicalis* 的工具包,使其成为细胞工厂的优秀底盘细胞。

农林废弃物的高值化利用对于合成生物学的可持续发展具有重要意义,但农林废弃物水解液中含有的糠醛、苯酚和乙酸等抑制物的脱毒处理过程复杂烦琐,成本较高。提升 *C. tropicalis* 对抑制物的抗性有利于木质纤维素的高值化生产,但是 *C. tropicalis* 的耐受性提升主要是针对单一抑制物进行诱变和适应性实验室进化,关于水解产物中不同种类的抑制性化合物的组合对 *C. tropicalis* 影响的研究较少,不利于 *C. tropicalis* 对木质纤维素水解液抗逆性机制的解析^[13]。将诱变或适应性实验室进化与转录组学、代谢组学、蛋白质组学和基因组学等结合,从机理角度解析 *C. tropicalis* 的抗逆性机制,挖掘更多与抗性相关的基因和通路,再通过代谢工程改造以更大幅度提高其抗逆性甚至能够降解利用抑制物。

作者贡献声明

张豪:论文的构思、撰写;曾婉:*C. tropicalis* 基因编辑研发进展部分内容的文献调研与逻辑讨论;李震:*C. tropicalis* 合成生物学应用研究进展内容的文献调研与逻辑讨论;林影:论文整体构架的设计。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

本文作者及署名单位无经济利益冲突,且该稿件未一稿多投,亦未在其他地方公开发表。

REFERENCES

- [1] İNCİR İ, KAPLAN Ö. *Escherichia coli* as a versatile cell factory: advances and challenges in recombinant protein production[J]. Protein Expression and Purification, 2024, 219: 106463.
- [2] YIN MQ, XU K, LUAN T, KANG XL, YANG XY, LI HX, HOU YH, ZHAO JZ, BAO XM. Metabolic engineering for compartmentalized biosynthesis of the valuable compounds in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiological Research, 2024, 286: 127815.
- [3] PATRA P, DAS M, KUNDU P, GHOSH A. Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts[J]. Biotechnology Advances, 2021, 47: 107695.
- [4] O'BRIEN CE, OLIVEIRA-PACHECO J, CINNEIDE EÓ, HAASE MAB, HITTINGER CT, ROGERS TR, ZARAGOZA O, BOND U, BUTLER G. Population genomics of the pathogenic yeast *Candida tropicalis* identifies hybrid isolates in environmental samples[J]. PLoS Pathogens, 2021, 17(3): e1009138.
- [5] HEGAZY GE, SOLIMAN NA, FARAG S, EL-HELOW ER, YUSEF HY, ABDEL-FATTAH YR. Isolation and characterization of *Candida tropicalis* B: a promising yeast strain for biodegradation of petroleum oil in marine environments[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 20.
- [6] OKTAVIANI M, MANGUNWARDYO W, HERMIATI E. Characteristics of adapted and non-adapted *Candida tropicalis* InaCC Y799 during fermentation of detoxified and undetoxified hemicellulosic hydrolysate from sugarcane trash for xylitol production[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2023, 13(14): 12947-12959.
- [7] JAIN V, GHOSH S. Xylitol biosynthesis enhancement by *Candida tropicalis* via medium, process parameter optimization, and co-substrate supplementation[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2024, 54(2): 207-217.
- [8] KAUR S, GULERIA P, SIDANA A, YADAV SK. Efficient process for xylitol production from nitric acid pretreated rice straw derived pentosans by *Candida tropicalis* GS18[J]. Biomass and Bioenergy, 2022, 166: 106618.
- [9] SINGH AK, PANDEY AK, KUMAR M, PAUL T, GAUR NA. Improved xylitol production by the novel inhibitor-tolerant yeast *Candida tropicalis* K2[J]. Environmental Technology, 2024, 45(1): 1-15.
- [10] KIM JY, JUN MW, SEONG YJ, PARK H, AHN J, PARK YC. Direct biotransformation of nonanoic acid and its esters to azelaic acid by whole cell biocatalyst of *Candida tropicalis*[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019, 7(21): 17958-17966.
- [11] HUF S, KRÜGENER S, HIRTH T, RUPP S, ZIBEK S.

- Biotechnological synthesis of long-chain dicarboxylic acids as building blocks for polymers[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011, 113(5): 548-561.
- [12] de SOUZA QUEIROZ S, JOFRE FM, de ANDRADE BIANCHINI I, Da SILVA BOAES T, BORDINI FW, CHANDEL AK, DAS GRAÇAS de ALMEIDA FELIPE M. Current advances in *Candida tropicalis*: yeast overview and biotechnological applications[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2023, 70(6): 2069-2087.
- [13] HARA A, UEDA M, MISAWA S, MATSUI T, FURUHASHI K, TANAKA A. A mutated hygromycin resistance gene is functional in the n-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2000, 173(3): 187-192.
- [14] MARTINS-SANTANA L, NORA LC, SANCHES-MEDEIROS A, LOVATE GL, CASSIANO MHA, SILVA-ROCHA R. Systems and synthetic biology approaches to engineer fungi for fine chemical production[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018, 6: 117.
- [15] AHMAD I, SHIM WY, JEON WY, YOON BH, KIM JH. Enhancement of xylitol production in *Candida tropicalis* by co-expression of two genes involved in pentose phosphate pathway[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(1): 199-204.
- [16] 张利华. 热带假丝酵母遗传操作系统的建立及在二元酸合成中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [17] ZHANG LH. Development of the genetic manipulation system for *Candida tropicalis* and its application in dicarboxylic acid production[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016 (in Chinese).
- [18] CHATTOPADHYAY A, GUPTA A, MAITI MK. Engineering an oleaginous yeast *Candida tropicalis* SY005 for enhanced lipid production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(19): 8399-8411.
- [19] EKTA, BISWAS D, MUKHERJEE G, MAITI MK. Rice Big Grain1 enhances biomass and plant growth-promoting traits in rhizospheric yeast *Candida tropicalis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(21): 6553-6571.
- [20] UMEMURA K, ATOMI H, KANAI T, TERANISHI Y, UEDA M, TANAKA A. A novel promoter, derived from the isocitrate lyase gene of *Candida tropicalis*, inducible with acetate in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 43(3): 489-492.
- [21] LOMBARDI L, OLIVEIRA-PACHECO J, BUTLER G. Plasmid-based CRISPR-Cas9 gene editing in multiple *Candida* species[J]. *mSphere*, 2019, 4(2): e00125-19.
- [22] GEISBERG JV, MOQTADERI Z, FAN XC, OZSOLAK F, STRUHL K. Global analysis of mRNA isoform half-lives reveals stabilizing and destabilizing elements in yeast[J]. *Cell*, 2014, 156(4): 812-824.
- [23] XU J, XIA YY, SHI YB, ZHU MZ, ZHANG HB, GUI XY, SHEN W, YANG HQ, CHEN XZ. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the *De novo* synthesis of β -ionone[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(8): 2533-2544.
- [24] CURRAN KA, KARIM AS, GUPTA A, ALPER HS. Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 88-97.
- [25] CURRAN KA, MORSE NJ, MARKHAM KA, WAGMAN AM, GUPTA A, ALPER HS. Short synthetic terminators for improved heterologous gene expression in yeast[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(7): 824-832.
- [26] ZHANG LH, CHEN XZ, CHEN Z, WANG ZZ, JIANG S, LI L, PÖTTER M, SHEN W, FAN Y. Development of an efficient genetic manipulation strategy for sequential gene disruption and expression of different heterologous GFP genes in *Candida tropicalis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(22): 9567-9580.
- [27] WANG JQ, PENG J, FAN H, XIU X, XUE L, WANG L, SU J, YANG XH, WANG RM. Development of mazF-based markerless genome editing system and metabolic pathway engineering in *Candida tropicalis* for producing long-chain dicarboxylic acids[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(11): 971-981.
- [28] RUAN SP, YANG YX, ZHANG XY, LUO GJ, LIN Y, LIANG SL. Screening and characterization of integration sites based on CRISPR-Cpf1 in *Pichia pastoris*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2024, 9(4): 759-765.
- [29] ZHANG XY, GU SJ, ZHENG XY, PENG SQ, LI YR, LIN Y, LIANG SL. A novel and efficient genome editing tool assisted by CRISPR-Cas12a/Cpf1 for *Pichia pastoris*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(11): 2927-2937.
- [30] BAISYA D, RAMESH A, SCHWARTZ C, LONARDI S, WHEELDON I. Genome-wide functional screens enable the prediction of high activity CRISPR-Cas9 and-Cas12a guides in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 922.
- [31] CUI ZY, ZHENG HH, ZHANG JH, JIANG ZN, ZHU ZW, LIU XQ, QI QS, HOU J. A CRISPR/Cas9-mediated, homology-independent tool developed for targeted genome integration in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(6): e02666-20.
- [32] ROBERTSON NR, TRIVEDI V, LUPISH B, RAMESH A, AGUILAR Y, CARRERA S, LEE S, ARTEAGA A, NGUYEN A, LENERT-MONDOU C, HARLAND-DUNAWAY M, JINKERSON R, WHEELDON I. Optimized genome-wide CRISPR screening enables rapid engineering of growth-based phenotypes in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 86: 55-65.
- [33] TRAN VG, CAO MF, FATMA Z, SONG XF, ZHAO HM. Development of a CRISPR/Cas9-based tool for gene deletion in *Issatchenkia orientalis*[J]. *mSphere*, 2019, 4(3): e00345-19.
- [34] JIAO X, LYU LT, ZHANG Y, HUANG QT, ZHOU RH, WANG SA, WANG S, ZHANG SF, ZHAO ZK. Reduction of lipid-accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* through CRISPR/Cas9-mediated inactivation of lipid droplet structural proteins[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2021, 368(16): fnab111.

- [34] TAN XY, WU XL, HAN MZ, WANG L, XU L, LI BZ, YUAN YJ. Yeast autonomously replicating sequence (ARS): identification, function, and modification[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2021, 21(7): 464-474.
- [35] CAO MF, FATMA Z, SONG XF, HSIEH PH, TRAN VG, LYON WL, SAYADI M, SHAO ZY, YOSHIKUNI Y, ZHAO HM. A genetic toolbox for metabolic engineering of *Issatchenkia orientalis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 59: 87-97.
- [36] LIU LQ, OTOPAL P, PAN A, ALPER HS. Increasing expression level and copy number of a *Yarrowia lipolytica* plasmid through regulated centromere function[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(7): 1124-1127.
- [37] LEE YG, KIM C, KUANYASHEV N, KANG NK, FATMA Z, WU ZY, CHENG MH, SINGH V, YOSHIKUNI Y, ZHAO HM, JIN YS. Cas9-based metabolic engineering of *Issatchenkia orientalis* for enhanced utilization of cellulosic hydrolysates[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(38): 12085-12094.
- [38] GU Y, GAO JC, CAO MF, DONG C, LIAN JZ, HUANG L, CAI J, XU ZN. Construction of a series of episomal plasmids and their application in the development of an efficient CRISPR/Cas9 system in *Pichia pastoris*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(6): 79.
- [39] SCHULTZ JC, CAO MF, ZHAO HM. Development of a CRISPR/Cas9 system for high efficiency multiplexed gene deletion in *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(8): 2103-2109.
- [40] ZHANG LH, ZHANG HB, LIU YF, ZHOU JY, SHEN W, LIU LM, LI Q, CHEN XZ. A CRISPR-Cas9 system for multiple genome editing and pathway assembly in *Candida tropicalis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(2): 531-542.
- [41] DiCARLO JE, NORVILLE JE, MALI P, RIOS X, AACH J, CHURCH GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): 4336-4343.
- [42] TSAI SQ, ZHENG ZL, NGUYEN NT, LIEBERS M, TOPKAR VV, THAPAR V, WYVEKENS N, KHAYTER C, IAFRATE AJ, LE LP, ARYEE MJ, JOUNG JK. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 33(2): 187-197.
- [43] LI YJ, ZHANG LH, YANG HQ, XIA YY, LIU LM, CHEN XZ, SHEN W. Development of a gRNA expression and processing platform for efficient CRISPR-Cas9-based gene editing and gene silencing in *Candida tropicalis*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(3): e0005922.
- [44] HARRINGTON LB, BURSTEIN D, CHEN JS, PAEZ-ESPINO D, MA EB, WITTE IP, COFSKY JC, KYRPIDES NC, BANFIELD JF, DOUDNA JA. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.
- [45] LUO GJ, LIN Y, CHEN ST, XIAO RM, ZHANG JX, LI C, SINSKEY AJ, YE L, LIANG SL. Overproduction of patchoulol in metabolically engineered *Komagataella phaffii*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(4): 2049-2058.
- [46] LUO GJ, LIN Y, RUAN SP, XIAO RM, ZHANG XY, LIANG SL. Dual cytoplasmic-mitochondrial engineering for improved patchoulol production in *Komagataella phaffii*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2024, 206: 109286.
- [47] ZHANG XY, CHEN ST, LIN Y, LI WJ, WANG DG, RUAN SP, YANG YX, LIANG SL. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for high-level production of lycopene[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(10): 2961-2972.
- [48] CUI ZY, ZHONG YT, SUN ZJ, JIANG ZN, DENG JY, WANG Q, NIELSEN J, HOU J, QI QS. Reconfiguration of the reductive TCA cycle enables high-level succinic acid production by *Yarrowia lipolytica*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 8480.
- [49] ZHONG YT, GU JH, SHANG CY, DENG JY, LIU YH, CUI ZY, LU XM, QI QS. Sustainable succinic acid production from lignocellulosic hydrolysates by engineered strains of *Yarrowia lipolytica* at low pH[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 408: 131166.
- [50] NING Y, LIU MS, RU ZY, ZENG WZ, LIU S, ZHOU JW. Efficient synthesis of squalene by cytoplasmic-peroxisomal engineering and regulating lipid metabolism in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 395: 130379.
- [51] XI YY, XU HT, ZHAN T, QIN Y, FAN FY, ZHANG XL. Metabolic engineering of the acid-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* for efficient L-malic acid production at low pH[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 75: 170-180.
- [52] YU Y, SHI SB. Development and perspective of *Rhodotorula toruloides* as an efficient cell factory[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(4): 1802-1819.
- [53] 徐敏, 郝英利, 杨晨, 李乃强, 刘修才. 一种发酵法生产的十二碳二元酸产品及其制备方法: CN201810734139[P]. 2018-07-06.
- XU M, HAO YL, YANG S, LI NQ, LIU XC. Dodecanedioic acid product produced by fermentation method and preparation method: CN201810734139[P]. 2018-07-06 (in Chinese).
- [54] LIU SC, LI C, FANG XC, CAO ZA. Optimal pH control strategy for high-level production of long-chain α,ω -dicarboxylic acid by *Candida tropicalis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(1): 73-77.
- [55] 陈远童, 衷金生, 刘文凤, 李乃强, 陈建康, 邱勇隼. 一种利用微生物发酵高产 α,ω -正长链十四碳二元酸的方法: CN1502700[P]. 2004-06-09.
- CHEN YT, ZHONG JS, LIU WF, LI NQ, CHEN JK, QIU YJ. Method for high-yield α,ω -normal long-chain tetradecane dicarboxylic acid by microbial fermentation: CN1502700[P]. 2004-06-09 (in Chinese).
- [56] 曹芳波, 陈远童, 曹荀梅子. 一种发酵转化正十七烷生产十七碳二元酸的方法: CN200910256586[P]. 2009-12-30.
- CAO WB, CHEN YT, CAO XUN MZ. Method for producing heptadecanedioic acid by fermenting and converting n-heptadecane: CN200910256586[P]. 2009-12-30 (in Chinese).
- [57] SUGIHARTO YEC, LEE H, FITRIANA AD, LEE H,

- JEON W, PARK K, AHN J, LEE H. Effect of decanoic acid and 10-hydroxydecanoic acid on the biotransformation of methyl decanoate to sebacic acid[J]. *AMB Express*, 2018, 8(1): 75.
- [58] JEON WY, JANG MJ, PARK GY, LEE HJ, SEO SH, LEE HS, HAN C, KWON H, LEE HC, LEE JH, HWANG YT, LEE MO, LEE JG, LEE HW, AHN JO. Microbial production of sebacic acid from a renewable source: production, purification, and polymerization[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(23): 6491-6501.
- [59] JU JH, OH BR, HEO SY, LEE YU, SHON JH, KIM CH, KIM YM, SEO JW, HONG WK. Production of adipic acid by short- and long-chain fatty acid acyl-CoA oxidase engineered in yeast *Candida tropicalis*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(1): 33-43.
- [60] KUMAR V, KRISHANIA M, PREET SANDHU P, AHLUWALIA V, GNANSOUNOU E, SANGWAN RS. Efficient detoxification of corn cob hydrolysate with ion-exchange resins for enhanced xylitol production by *Candida tropicalis* MTCC 6192[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 251: 416-419.
- [61] MORAIS JUNIOR WG, PACHECO TF, TRICHEZ D, ALMEIDA JRM, GONÇALVES SB. Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain[J]. *Yeast*, 2019, 36(5): 349-361.
- [62] KANAKDANDE A, AGRWAL D, KHOBRAGADE C. Pineapple waste and wastewater: route for biodiesel production from *Candida tropicalis* (MF510172)[J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2019, 62: e19180499.
- [63] CHATTOPADHYAY A, MAITI MK. Efficient xylose utilization leads to highest lipid productivity in *Candida tropicalis* SY005 among six yeast strains grown in mixed sugar medium[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(7): 3133-3144.
- [64] THANGAVELU K, SUNDARARAJU P, SRINIVASAN N, MUNIRAJ I, UTHANDI S. Simultaneous lipid production for biodiesel feedstock and decontamination of sago processing wastewater using *Candida tropicalis* ASY2[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 35.
- [65] DIAS B, LOPES M, RAMÔA R, PEREIRA AS, BELO I. *Candida tropicalis* as a promising oleaginous yeast for olive mill wastewater bioconversion[J]. *Energies*, 2021, 14(3): 640.
- [66] LUO H, ZHAO ZJ, HUANG R, WANG ZB, LIN JQ, CHEN LX. High-temperature fermentation of corn stover for biodiesel production using *Candida tropicalis* with enhanced lipid accumulation: a new strategy for breeding thermotolerant biodiesel-production strains[J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, 206: 117542.
- [67] DAYLIN RR, Da SILVA ANDRADE ROSILEIDE F, Da SILVA GORETTI S, de HOLANDA RODRIGO A, MILAGRE AP, PATRICIA N, JOSE CV, de RESENDE-STOIANOFF MARIA A, CAMPOS-TAKAKI GM. Promising biosurfactant produced by a new *Candida tropicalis* UCP 1613 strain using substrates from renewable-resources[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2017, 11(23): 981-991.
- [68] ALMEIDA DG, de CÁSSIA F SOARES Da SILVA R, LUNA JM, RUFINO RD, SANTOS VA, SARUBBO LA. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 157.
- [69] ANKULKAR R, CHAVAN M. Characterisation and application studies of sophorolipid biosurfactant by *Candida tropicalis* RA1[J]. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2019, 13(3): 1653-1665.
- [70] OJHA N, MANDAL SK, DAS N. Enhanced degradation of indeno(1, 2, 3-cd)Pyrene using *Candida tropicalis* NN4 in presence of iron nanoparticles and produced biosurfactant: a statistical approach[J]. *3 Biotech*, 2019, 9(3): 86.
- [71] PUPPALA KR, NAIK T, SHAIK A, DASTAGER S, KUMAR V R, KHIRI J, DHARNE M. Evaluation of *Candida tropicalis* (NCIM 3321) extracellular phytase having plant growth promoting potential and process development[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018, 13: 225-235.
- [72] SHARIQ M, SOHAIL M. Application of *Candida tropicalis* MK-160 for the production of xylanase and ethanol[J]. *Journal of King Saud University - Science*, 2019, 31(4): 1189-1194.
- [73] YEO IS, SHIM WY, KIM JH. Construction of genetically engineered *Candida tropicalis* for conversion of L-arabinose to L-ribulose[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 274: 9-14.
- [74] HESHAM AE, MOSTAFA YS, AISHARQI LEO. Optimization of citric acid production by immobilized cells of novel yeast isolates[J]. *Mycobiology*, 2020, 48(2): 122-132.
- [75] VALLIAMMAI MG, GOPAL NO, ANANDHAM R. Mining the prospective of *Candida tropicalis* YES3 in Napier biomass saccharification[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2021, 11(6): 2509-2519.
- [76] RAFIQUUL ISM, SAKINAH AMM. Production of xylose reductase from adapted *Candida tropicalis* grown in sawdust hydrolysate[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2014, 3(4): 227-235.
- [77] PRIJI P, SAJITH S, SREEDEVI S, UNNI KN, KUMAR S, BENJAMIN S. *Candida tropicalis* BPU1 produces polyhydroxybutyrate on raw starchy substrates[J]. *Starch - Stärke*, 2016, 68(1/2): 57-66.
- [78] PAULDAS K, JIAN A. Optimization of pectinase production kinetics by *Candida tropicalis* and its applications in fruit juice clarification[J]. *International Journal of Pharmacy and Biological Science*, 2018, 8(3): 946-958.
- [79] KUMAR A, TECHAPUN C, SOMMANEE S, MAHAKUNTHA C, FENG J, HTIKE SL, KHEMACHEEWAKUL J, PORNINTA K, PHIMOLSIRIPOL Y, WANG W, ZHUANG XS, QI W, JANTANASAKULWONG K, NUNTA R, LEKSAWASDI N. Production of phenylacetylcarbinol via biotransformation using the co-culture of *Candida tropicalis* TISTR 5306 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5606 as the biocatalyst[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(9): 928.
- [80] ZHANG LH, YANG HQ, XIA YY, SHEN W, LIU LM, LI Q, CHEN XZ. Engineering the oleaginous yeast *Candida tropicalis* for α -humulene overproduction[J].

- Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2022, 15(1): 59.
- [81] ZHANG LH, FAN C, YANG HQ, XIA YY, SHEN W, CHEN XZ. Biosynthetic pathway redesign in non-conventional yeast for enhanced production of cembratriene-ol[J]. Bioresource Technology, 2024, 399: 130596.
- [82] WEI CL, ZHANG LH, SHEN W, ZOU W, XIA YY, CHEN XZ, YANG HQ. Enhancement of squalene synthesis in *Candida tropicalis* via combinatorial metabolic engineering strategies to rebuild pathways[J]. Biochemical Engineering Journal, 2024, 208: 109348.
- [83] LI JY, XIA YY, WEI B, SHEN W, YANG HQ, CHEN XZ. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for efficient 1, 2, 4-butanetriol production[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024, 710: 149876.
- [84] YANG HQ, GUO JR, ZHANG LH, SHEN W, XIA YY, CHEN XZ. Systematic metabolic engineering for improved synthesis of perillic acid in *Candida tropicalis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 447.
- [85] BEVILAQUA GC, MAUGERI FILHO F, FORTE MBS. Simultaneous production of xylitol and arabitol by *Candida tropicalis* fermentation improving agro-industrial wastes valorization[J]. Food and Bioproducts Processing, 2023, 140: 29-45.
- [86] GU SN, ZHU FZ, ZHANG L, WEN JP. Mid-long chain dicarboxylic acid production via systems metabolic engineering: progress and prospects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(11): 5555-5573.
- [87] 张全, 文志琼, 张霖, 樊亚超, 李福利. 长链二元酸发酵菌种创制和工艺研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4420-4431.
- ZHANG Q, WEN ZQ, ZHANG L, FAN YC, LI FL. Strain engineering and fermentation technology for production of long-chain dicarboxylic acid: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4420-4431 (in Chinese).
- [88] SAHOO PC, SINGH A, KUMAR M, GUPTA RP, BHATTACHARYYA D, RAMAKUMAR SSV. Photosensitized biohybrid for terminal oxygenation of n-alkane to α,ω -dicarboxylic acids[J]. Molecular Catalysis, 2023, 535: 112889.
- [89] FUNK I, RIMMEL N, SCHORSCH C, SIEBER V, SCHMID J. Production of dodecanedioic acid via biotransformation of low cost plant-oil derivatives using *Candida tropicalis*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(10): 1491-1502.
- [90] ERASO LM, CUASPUD O, ARIAS M. Optimization of xylitol production through *Candida tropicalis* in xylose hydrolysate from rice husk[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2024: 1-11.
- [91] de ANDRADE BIANCHINI I, JOFRE FM, LACERDA TM, DAS GRAÇAS de ALMEIDA FELIPE M. Xylitol production by *Candida tropicalis* from sugarcane bagasse and straw: an adaptive approach to improve fermentative performance[J]. BioEnergy Research, 2024, 17(2): 1041-1054.
- [92] VARDHAN H, SASAMAL S, MOHANTY K. Xylitol production by *Candida tropicalis* from *Areca* nut husk enzymatic hydrolysate and crystallization[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023, 195(12): 7298-7321.
- [93] SINGH P, PATIL Y, RALE V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(1): 2-13.
- [94] ALMEIDA DG, de CÁSSIA FREIRE SOARES Da SILVA R, MEIRA HM, BRASILEIRO PPF, SILVA EJ, LUNA JM, RUFINO RD, SARUBBO LA. Production, characterization and commercial formulation of a biosurfactant from *Candida tropicalis* UCP0996 and its application in decontamination of petroleum pollutants[J]. Processes, 2021, 9(5): 885.
- [95] BATISTA RM, RUFINO RD, LUNA JM, de SOUZA JEG, SARUBBO LA. Effect of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil[J]. Water Environment Research, 2010, 82(5): 418-425.
- [96] JIAO S, LI X, YU HM, YANG H, LI X, SHEN ZY. *In situ* enhancement of surfactin biosynthesis in *Bacillus subtilis* using novel artificial inducible promoters[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(4): 832-842.
- [97] ROELANTS S, SOLAIMAN DKY, ASHBY RD, LODENS S, van RENTERGHEM L, SOETAERT W. Production and applications of sophorolipids[M]// Biobased Surfactants. Amsterdam: Elsevier, 2019: 65-119.
- [98] SUNDARAMAHALINGAM MA, SIVASHANMUGAM P, RAJESHBANU J, ASHOKKUMAR M. A review on contemporary approaches in enhancing the innate lipid content of yeast cell[J]. Chemosphere, 2022, 293: 133616.
- [99] CHATTOPADHYAY A, SINGH R, MITRA M, DAS AK, MAITI MK. Identification and functional characterization of a lipid droplet protein CtLDP1 from an oleaginous yeast *Candida tropicalis* SY005[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2020, 1865(8): 158725.
- [100] DEY P, MAITI MK. Molecular characterization of a novel isolate of *Candida tropicalis* for enhanced lipid production[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(5): 1357-1368.
- [101] CHATTOPADHYAY A, DEY P, BARIK A, BAHADUR RP, MAITI MK. A repressor activator protein homologous from an oleaginous strain of *Candida tropicalis* increases storage lipid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2015, 15(4): fov013.
- [102] LEDESMA-AMARO R, DULERMO R, NIEHUS X, NICAUD JM. Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 38-46.
- [103] MATTAM AJ, KUILA A, SURALIKERIMATH N, CHOUDARY N, RAO PVC, VELANKAR HR. Cellulolytic enzyme expression and simultaneous conversion of lignocellulosic sugars into ethanol and xylitol by a new *Candida tropicalis* strain[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 157.
- [104] SUN Y, ZHANG T, LU BQ, LI XF, JIANG L. Application of cofactors in the regulation of microbial

- metabolism: a state of the art review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1145784.
- [105] LI BB, LIU Y, WANG LZ, HONG J, CHEN Y, YING HJ. RNA accumulation in *Candida tropicalis* based on cofactor engineering[J]. *FEMS Yeast Research*, 2019, 19(3): foz028.
- [106] CHEN L, YAN W, QIAN XJ, CHEN MJ, ZHANG XY, XIN FX, ZHANG WM, JIANG M, OCHSENREITHER K. Increased lipid production in *Yarrowia lipolytica* from acetate through metabolic engineering and cosubstrate fermentation[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(11): 3129-3138.
- [107] YU Y, RASOOL A, LIU HR, LV B, CHANG PC, SONG H, WANG Y, LI C. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for high yield production of α -amyrin via synergistic remodeling of α -amyrin synthase and expanding the storage pool[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 72-83.
- [108] DEMISSIE ZA, TARNOWYCZ M, ADAL AM, SARKER LS, MAHMOUD SS. A lavender ABC transporter confers resistance to monoterpene toxicity in yeast[J]. *Planta*, 2019, 249(1): 139-144.
- [109] ZHANG C, QIN JF, DAI YW, MU WM, ZHANG T. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis enables xylitol over-production with yeast *Candida tropicalis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 296: 7-13.
- [110] WANG L, QI AD, LIU JG, SHEN Y, WANG JS. Comparative metabolic analysis of the adaptive *Candida tropicalis* to furfural stress response[J]. *Chemical Engineering Science*, 2023, 267: 118348.
- [111] PHOMMACHAN K, KEO-UDONE C, NURCHOLIS M, VONGVILAISAK N, CHANHMINH M, SAVANHNALY V, BOUNPHANMY S, MATSUTANI M, KOSAKA T, LIMTONG S, YAMADA M. Adaptive laboratory evolution for multistress tolerance, including fermentability at high glucose concentrations in thermotolerant *Candida tropicalis*[J]. *Energies*, 2022, 15(2): 561.
- [112] SHENDURE J, BALASUBRAMANIAN S, CHURCH GM, GILBERT W, ROGERS J, SCHLOSS JA, WATERSTON RH. DNA sequencing at 40: past, present and future[J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 345-353.
- [113] AYEPA E, LI Q, ZHANG ZY, WANG HY, HERMAN RA, OUYANG YD, KUANG XL, TAFERE GA, MA MG. Molecular mechanism of tolerance evolution in *Candida tropicalis* to inhibitory compounds derived from corn stover hydrolysis[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2024, 181: 107031.