

研究报告

代谢工程改造毕赤酵母艾氏途径促进糖蜜合成 2-苯乙醇

杨幸霖^{1,2}, 任晋莹^{1,2}, 陆融融^{1,2}, 阳路杭^{1,2}, 苏慧颖^{1,2}, 秦秀林^{*1,2}

1 广西大学 生命科学与技术学院 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004

2 广西大学 广西微生物与酶工程技术研究中心, 广西 南宁 530004

杨幸霖, 任晋莹, 陆融融, 阳路杭, 苏慧颖, 秦秀林. 代谢工程改造毕赤酵母艾氏途径促进糖蜜合成 2-苯乙醇[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2707-2720.

YANG Xinglin, REN Jinying, LU Rongrong, YANG Luhang, SU Huiying, QIN Xiulin. Metabolic engineering of Ehrlich pathway in *Komagataella phaffii* improves the synthesis of 2-phenylethanol from sugarcane molasses[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2707-2720.

摘要:【背景】2-苯乙醇(2-phenylethanol, 2-PE)是大宗香料之一, 已广泛应用于食品、化妆品、抗菌剂及医药产业中。【目的】通过代谢工程改造艾氏途径, 利用甘蔗糖蜜为碳源合成 2-PE, 为构建 2-PE 工业化生产的毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)菌株奠定基础。【方法】代谢工程改造毕赤酵母菌株 PD-TA 艾氏途径, 构建 2-PE 高产菌株; 优化发酵培养基, 提高产量。【结果】以糖蜜为碳源时, 重组菌 PD-TA 的生长是菌株 GS115 的 1.4 倍。以菌株 PD-TA 为出发菌, 敲除醛脱氢酶基因 *ALD3* 后 2-PE 产量显著提高了 30.7%。评估了 13 个醇脱氢酶和苯乙醛还原酶催化 2-PE 合成的效率, 过表达酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)醇脱氢酶基因 *ScADH5* 工程菌的 2-PE 合成量最高, 较对照菌提高了 29.9%。过表达苯丙酮酸脱羧酶基因 *ARO10*, 2-PE 产量提高了 19.7%。敲除 *ALD3* 并共表达 *ARO10* 和 *ScADH5* 的工程菌 P2 的 2-PE 产量较对照菌提高了 109.4%, 产量为 397 mg/L。优化发酵培养基后, 菌株 P2 经摇瓶发酵 36 h 的 2-PE 产量提高了 218.1%, 达到 1 263 mg/L。【结论】毕赤酵母具备将廉价糖蜜转化为高附加值产物 2-PE 的能力。本研究为构建包括 2-PE 在内的多种杂醇类细胞工厂提供了理论依据和技术基础。

关键词: 2-苯乙醇; 毕赤酵母; 甘蔗糖蜜; 艾氏途径; 醇脱氢酶

资助项目: 国家自然科学基金(32260010); 广西壮族自治区自然科学基金(2019GXNSFAA245001, 2018GXNSFAA281005, 2017GXNSFAA198136)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260010) and the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2019GXNSFAA245001, 2018GXNSFAA281005, 2017GXNSFAA198136).

*Corresponding author. E-mail: xiulinqin@gxu.edu.cn

Received: 2024-10-07; Accepted: 2025-01-06; Published online: 2025-02-07

Metabolic engineering of Ehrlich pathway in *Komagataella phaffii* improves the synthesis of 2-phenylethanol from sugarcane molasses

YANG Xinglin^{1,2}, REN Jinying^{1,2}, LU Rongrong^{1,2}, YANG Luhang^{1,2}, SU Huiying^{1,2}, QIN Xiulin^{*1,2}

1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 Guangxi Research Center for Microbial and Enzyme Engineering Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

Abstract: [Background] The organic compound 2-phenylethanol (2-PE) known for its attractive floral fragrance is widely utilized in the cosmetic, pharmaceutical, and food industries. [Objective] To develop an engineered *Komagataella phaffii* strain for *de novo* synthesis of 2-PE from sugarcane molasses. [Methods] The Ehrlich pathway was engineered to enhance 2-PE production in the recombinant *K. phaffii* strain PD-TA, and the fermentation medium was optimized. [Results] With sugarcane molasses as the carbon source, the cell density of PD-TA was 1.4 folds that of the original strain (GS115). The deletion of *ALD3* from PD-TA resulted in a 30.7% increase in the 2-PE titer by reducing by-product formation. Furthermore, we investigated 13 candidate genes encoding alcohol dehydrogenase (ADH) or phenylacetaldehyde reductase (PAR) to identify the optimal enzyme. The highest 2-PE titer was observed in the strain overexpressing *ScADH5*, with an increase of 29.9% compared with that of PD-TA. Additionally, the overexpression of *ARO10* led to a 19.7% increase in the 2-PE titer. The simultaneous overexpression of *ScADH5* and *ARO10*, combined with the deletion of *ALD3*, enabled the engineered strain P2 to achieve a 2-PE titer of 397 mg/L in shake flasks, representing an increase of 109.4% compared with that of PD-TA. To further improve the production of 2-PE, we optimized the fermentation medium, which achieved an increase of 218.1% in the 2-PE titer (1 263 mg/L) after fermentation in shake flasks for 36 h. [Conclusion] This study demonstrates the potential of *K. phaffii* as a chassis for the *de novo* synthesis of 2-PE from molasses. Furthermore, it offers both theoretical and technical frameworks for the establishment of microbial cell factories for the production of aromatic chemicals including 2-PE.

Keywords: 2-phenylethanol; *Komagataella phaffii*; sugarcane molasses; Ehrlich pathway; alcohol dehydrogenase

2-苯乙醇(2-phenylethanol, 2-PE)又称 β -苯乙醇，具有独特的玫瑰花香气，是最为广泛的大宗香料之一，被广泛应用于食品、化妆品等领域^[1]；同时，2-PE 还用于航空燃料助推剂和抗菌剂，在航空和医药领域具有良好发展前景^[2-4]。目前，2-PE 合成的方法主要有化学合成法、植物原料抽提法和微生物发酵法。化学合成法制备 2-PE 易形成许多毒副产物，达不到欧洲和

美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的“天然”标准。植物原料提取 2-PE 所需工艺复杂且提取效率低，无法满足市场的大规模需求。微生物合成 2-PE 具有产物天然、环境友好、纯化工艺简单等优势，是合成天然 2-PE 的工业化新趋势^[5-6]。

自然界中存在多种酵母具有合成 2-PE 的代谢途径，如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、

毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)和产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)等^[7-12]。酵母生产 2-PE 主要有两条途径^[13]: (1) 莽草酸途径, 以葡萄糖为原料, 经糖酵解途径生成的磷酸烯醇式丙酮酸和磷酸戊糖途径生成的赤藓糖-4-磷酸缩合生成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸盐(3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate, DAHP)进入莽草酸途径, 形成苯丙酮酸, 经过脱羧、脱氢作用生成 2-PE; (2) 以 L-苯丙氨酸(L-phenylalanine, L-Phe)为原料, 进入艾氏途径(Ehrlich pathway), 经过脱氨、脱羧和脱氢三步反应生成 2-PE。

微生物利用葡萄糖从头合成 2-PE 代谢路径长、支路多且存在多种反馈抑制因子, 2-PE 的产量较低, 并不适合于工业化生产。艾氏途径合成 2-PE 的效率较高, 是当前微生物合成 2-PE 的研究热点^[1]。首先 L-Phe 经芳香族氨基酸转氨酶 Aro8/9 转氨后生成苯丙酮酸, 然后苯丙酮酸被苯丙酮酸脱羧酶(Aro10p, PDC1/5/6, THI3)脱羧为苯乙醛(phenylacetaldehyde, PAH), 最后被醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)还原为 2-PE^[5]。通过代谢工程手段重构或优化酵母的艾氏途径, 可以合成 0.7–6.0 g/L 的 2-PE^[13-14]。将 *S. cerevisiae* 的 ARO8 和 ARO10 基因共表达, 2-PE 产量(2.61 g/L)较野生型菌株提高了 36.8%^[15]。此外, 艾氏途径中苯丙酮酸既可以生成 PAH, 也可以转氨生成 L-Phe。通过敲除芳香族氨基酸转氨酶基因 ARO8, 阻断苯丙酮酸逆向生成 L-Phe 的步骤, 提高了 *S. cerevisiae* 的 2-PE 合成量^[16]。为了优化解脂耶氏酵母合成 2-PE 的代谢途径, 利用代谢工程引入玫瑰来源的苯乙醛还原酶(phenylacetaldehyde reductase, PAR), 从头构建 2-PE 合成途径, 利用摇瓶发酵 2-PE 产量为 2 669.54 mg/L^[17]。Kong 等^[9]在毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)中实现了葡萄糖从头合成 2-PE, 利用组成型强启动子 P_{GAP}过表达反馈抗性突变 DAHP 合酶基因 *AroG^{fbr}* 和分支酶脱水酶基因 *PheA^{fbr}*, 过表达异源芳香族转氨酶基因

ARO8、内源苯丙酮酸脱羧酶基因 *ARO10* 和乙醇脱氢酶基因 *ADH6*, 2-PE 产量达到了 1.1 g/L。

毕赤酵母因其生长密度高、蛋白翻译后修饰适度、基因编辑技术成熟、培养工艺简单等优势, 已逐渐成为最为常用的异源蛋白表达和高值化合物合成平台^[18-19]。毕赤酵母被美国食品药品监督管理局认定为公认安全(generally recognized as safe, GRAS)微生物, 并获准用于制药和食品行业。甘蔗糖蜜是甘蔗制糖过程中产生的一种副产物, 不仅含有大量的可发酵糖(总糖含量约为 60%), 还含有丰富的无机盐及蛋白质, 有助于微生物发酵利用^[20]。本课题组前期构建了分泌表达草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)来源 β-呋喃果糖苷酶(β-fructofuranosidase, β-FFase)的毕赤酵母重组菌 PD-TA^[21], 该菌株能利用蔗糖为唯一碳源生长。本研究通过代谢工程改造毕赤酵母, 促进糖蜜高效转化为 2-PE, 以期为构建 2-PE 合成的工业化生产菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品

毕赤酵母(*Komagataella phaffii*) GS115 保藏于本实验室。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 用于基因克隆。本研究所用菌株和质粒如表 1 所示。

本研究所用引物见表 2, 所有引物合成和测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 培养基

大肠杆菌培养用 LB 培养基; 毕赤酵母常规培养用 YPD 培养基^[21]、MD 培养基^[21], 发酵用 BMDY 培养基^[21]。

MN 培养基: 不含葡萄糖的 MD 培养基。

MS 培养基(g/L): 蔗糖 20.0, 酵母基础氮源(yeast nitrogen base, YNB) 13.4, 生物素 4×10⁻⁴。

MSM 培养基(g/L): 甘蔗糖蜜 40.0, YNB 13.4, 生物素 4×10⁻⁴。

BMD-N 培养基: 将 BMDY 培养基中 YNB 用 4.5% 鱼粉替换。

表 1 文中所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strain/Plasmid	特性 Characteristic	来源 Source
Strain		
GS115	Commercial <i>Komagataella phaffii</i> host strain; <i>his</i> ⁻	Invitrogen
PD-TA	GS115, P _{PD} -BF-TAOX1-ble-his4	[21]
KO-ALD3	The <i>ALD3</i> gene was deleted in PD-TA, <i>hph</i>	This work
KO-ALDH1	The <i>ALDH1</i> gene was deleted in PD-TA, <i>hph</i>	This work
KO-ALDH2	The <i>ALDH2</i> gene was deleted in PD-TA, <i>hph</i>	This work
KO-ALDH3	The <i>ALDH3</i> gene was deleted in PD-TA, <i>hph</i>	This work
OE-ADH1	The <i>ADH1</i> gene expression cassette was integrated into the Z1 site of PD-TA, <i>hph</i>	This work
OE-ADH5	The <i>ADH5</i> gene expression cassette was integrated into the Z1 site of PD-TA, <i>hph</i>	This work
OE-PAR1	The <i>PAR1</i> gene expression cassette was integrated into the Z1 site of PD-TA, <i>hph</i>	This work
OE-PAR4	The <i>PAR4</i> gene expression cassette was integrated into the Z1 site of PD-TA, <i>hph</i>	This work
OE-ScADH5	The <i>ScADH5</i> gene expression cassette was integrated into the Z1 site of PD-TA, <i>hph</i>	This work
OE-CgADH1	The <i>CgADH1</i> gene expression cassette was integrated into the Z1 site of PD-TA, <i>hph</i>	This work
OE-ARO9	The <i>ARO9</i> gene expression cassette was integrated into the Z1 site of PD-TA, <i>kan</i>	This work
OE-ARO10	The <i>ARO10</i> gene expression cassette was integrated into the Z1 site of PD-TA, <i>kan</i>	This work
P1	The <i>PAR4</i> gene expression cassette was integrated into the <i>ALD3</i> site of OE-ARO10, <i>kan</i> , <i>hph</i>	This work
P2	The <i>ScADH5</i> gene expression cassette was integrated into the <i>ALD3</i> site of OE-ARO10, <i>kan</i> , <i>hph</i>	This work
P3	The <i>CgADH1</i> gene expression cassette was integrated into the <i>ALD3</i> site of OE-ARO10, <i>kan</i> , <i>hph</i>	This work
Plasmid		
pET-32a	Cloning vector, <i>kan</i>	Novagen
pPIC9k	<i>K. phaffi</i> expression vector, <i>kan</i>	Invitrogen
pTEF-hph	Hygromycin resistance gene <i>hph</i> expression vector, P _{TEF1} - <i>hph</i> -T _{CYC1}	Our laboratory
pZ1-kan	pET-32a derivative containing integration site Z1 (PAS_chr 1-1_0407)	This work
pD-ARO9	pZ1-kan derivative containing P _{PD} - <i>ARO9</i> cassette	This work
pD-ARO10	pZ1-kan derivative containing P _{PD} - <i>ARO10</i> cassette	This work

表 2 本文所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')
PD-F	ACTAGTCGATCGCATTGGCCTCA
PD-R	TTTCGTAATCAATTGGCTATGC
TAOX1-F	GGGAGCGTCACCATCATCA
TAOX1-R	AAGCTTGACAAACGAAGGTCTCACCTAAC
ARO9-F	TAGCCCAATTGATTACGAAAGGTACCATGACCTTCCAGACTCAAACGTA
ARO9-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCCTAGCTGGATTCAAGGTCTTGGAA
ARO10-F	TAGCCCAATTGATTACGAAAGGTACCATGGCCCCAGTCCAGATATAG
ARO10-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTAACCTACGATTGGCTTGGTTGTT
ALD3L-F	AATGGCCCAAAACTGACAGTTAAACTAAAAGCGTCTTCAGAAATGT
ALD3L-R	TGAAGTGTCAAAGGGATCAACTATGCCTGGTGTCCAGAAC
ALD3R-F	TGTAGACACCTCCTTGATATTGACTAAAACAAAAGTCAACCACCAAGT
ALD3R-R	TGGAATTAGTCAAACCAATTGTCGACAATTGGTTGGCGTCCCTCA
ALDH1L-F	CAAATGGCCCAAAACTGACAGTTAAACACCAAGCAAAACAAACTGGAA
ALDH1L-R	ACTGTCGTCAAAGGGATCAATTAGCCTCGGGTACTCCGC

(待续)

(续表 2)

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
ALDH1R-F	AGACACCTCCTGATATTGATCATGAGTGAAAATCTTATTATTAGTCG
ALDH1R-R	TGGAATTAGTCAAACCAATTGTCGACCAACCCTTAATGGAAGATGGATT
ALDH2L-F	CCAAAACGTACAGTTAACATGTATCTTAGCTCCACCGAAG
ALDH2L-R	ACTGTCGCAAAGGGATCAAGTGAGTGAAATTGCCAATTG
ALDH2R-F	AGACACCTCCTGATATTGATACCAAGCATCGGTTGGACTAGA
ALDH2R-R	TAGTCAAACCAATTGTCGACATGGCACTGTCTCAAGAGATCT
ALDH3L-F	CCAAAACGTACAGTTAACAAAGACTGGTTGTCTCCCAGAG
ALDH3L-R	ACTGTCGCAAAGGGATCAACTATATGCCCTCTCGTTCTGTATT
ALDH3R-F	AGACACCTCCTGATATTGATTAGAACCCACATTGATTGGATAC
ALDH3R-R	TGGAATTAGTCAAACCAATTGTCGACTTTAATTACCAAGAGAGATCGCTAACG
ADH1-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGGCTTACCCAGACACTTTGA
ADH1-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCCTATTCAAACACTGTTTCCGTATTAGTA
ADH2-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGGAAAAAAAGCTCCAGTG
ADH2-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTCACCTACCAAATTCTTAGTTCA
ADH3-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGACTACAATTCCAAAACCC
ADH3-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTCATTGAGGGATCTGAGAGTC
ADH4-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGACCACAGTTTCGCTTACG
ADH4-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCCTACCCCCCTGACTTTACTTAGACTCT
ADH5-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGTCACCGAAGGTCAAGTAAGTT
ADH5-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTTAGTGCATAGTAATCACAGCACG
ADH6-F	ATAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGTTCAAACACTCAATTCCAATATAATC
ADH6-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTCACTCGTATAACAATAAGACTCTTACCAT
ADH7-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGGCGTACCCAGACACCTT
ADH7-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCCTATTGAATGCCTTATCGTAACCG
ADH8-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGTCGCTTACAAACTGATATCG
ADH8-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTAACGTCCGAGTATTTCAGC
ScADH5-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGCCTTCGCAAGTCATTCC
ScADH5-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTCATTAGAAGTCTAACACATATCTAC
CgADH1-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGCCTTCGCAAGTCATTCC
CgADH1-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTCATTAGAAGTCTAACACATATCTAC
PAR1-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGCCAGGAGAAAGAGTTTACTTA
PAR1-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTTATTGCAAGGATTG
PAR3-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGGTTCAAAGGTTATTGACA
PAR3-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTTACTTGGTTGCTCGCAATATCT
PAR4-F	TAGCCCATTGATTACGAAAGGTACCATGGTTCTAACGTTTATTGACAG
PAR4-R	TGATGATGGTGAACGCTCCGGATCCTTATTGACCGCAATAT
hph-F	ATCAGTGACCGACCATATAATTGATCCCTTGACCGACAGTTC
hph-R	TTGAGGCCAAATGCGATCGGTCGACTCAATATCAAGGAGGTGTCTACAAG
kan-F	ATCAGTGACCGACCATATAATTGATCCCTTGACCGACAGTT
kan-R	TTGAGGCCAAATGCGATCGGTCGACTCAATATCAAGGAGGTGTCTACAAG
Z1L-F	TGGTGGTGGTGCCTGAGTGCAGGCCGCTCTACAATCGAACATCGC
Z1L-R	ACTGTCGCAAAGGGATCAATTATATGGTCGGTCACTGATGAAC
Z1R-F	AGTGAGACCTTCGTTGTGCAAGCTTACGTTGAGAATGTTATTCTCCTC
Z1R-R	AACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTTATTGGCGTGTATTCGTT
Z1-F	GATCCCCACAATCTATTCTTATCAC
Z1-R	ACTAAACAGAGAAATTGGAAAGG

BMY-M 培养基：将 BMDY 培养基中葡萄糖用 4% 糖蜜替换。

BMY-MN：将 BMDY 的葡萄糖和 YNB 分别用 4% 糖蜜和 4.5% 鱼粉替换。

BMY-MNP 培养基：在 BMY-MN 培养基中添加 5.0 g/L L-Phe。

1.3 主要试剂和仪器

质粒小规模提取试剂盒、通用型 DNA 纯化回收试剂盒、酵母基因组 DNA 提取试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司；2×Phanta Max Master Mix、2×Taq Plus Master Mix、Exnase II 工具酶，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；限制性内切酶和 DNA marker，Thermo Fisher Scientific 公司；T4 DNA Ligase，TaKaRa 公司；YNB、生物素(biotin)、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)和遗传霉素 G418，北京索莱宝科技有限公司；ZeocinTM，Invitrogen 公司；潮霉素 B (hygromycin B)，上海懋康生物科技有限公司；2-PE 标品，上海麦克林生化科技股份有限公司；苯乙酸标品，国药集团化学试剂有限公司。C18 色谱柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm)，北京绿百草科技发展有限公司。高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪为岛津公司的 20A 系统。

磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS) (g/L)：NaCl 8.0, KCl 0.20, Na₂HPO₄ 1.42, KH₂PO₄ 0.27, 调节 pH 至 7.4。

1.4 毕赤酵母工程菌的构建

毕赤酵母来源基因以 GS115 的总 DNA 为模板，通过 PCR 扩增获得。总 DNA 采用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取。PCR 反应体系(25 μL)：DNA 模板 1.0 μL, 正向引物(10 μmol/L) 1.0 μL, 反向引物(10 μmol/L) 1.0 μL, 2×Phanta Max Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件：95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 58 °C 15 s, 72 °C 1 min, 30 个循环；72 °C 7 min。

ALD3 基因敲除毕赤酵母重组菌的构建过程：用引物 ALD3L-F/ALD3L-R 和 ALD3R-F/ALD3R-R

分别扩增 *ALD3* 的左、右同源臂；以含有潮霉素抗性基因 *hph* 的质粒 pTEF-hph 为模板，用引物 *hph*-F/*hph*-R 扩增 *hph* 基因；利用重叠延伸 PCR 将 *ALD3* 左同源臂、*hph* 表达框和 *ALD3* 右同源臂进行片段融合；最后以融合产物为模板，用引物 ALD3L-F/ALD3R-R 扩增 *ALD3* 基因敲除盒。敲除盒电转化菌株 PD-TA^[21]，获得工程菌 KO-ALD3。*ALDH1*、*ALDH2*、*ALDH3* 基因敲除菌株的构建方式与此相同。

首先，以菌株 GS115 总 DNA 为模板，用引物 Z1L-F/Z1L-R 和 Z1R-F/Z1R-R 分别扩增整合位点 Z1 (PAS_chr 1-1_0407) 的左、右同源臂；以 pPIC9k 质粒为模板，用引物 *kan*-F/*kan*-R 扩增 G418 抗性基因 *kan*；将 Z1 左同源臂、*kan* 和 Z1 右同源臂进行融合，并克隆到 pET-32a 的 *Not* I 和 *Bgl* II 位点，获得含整合位点的质粒 pZ1-kan。利用重叠延伸 PCR 将启动子 P_{PD}^[21]、*ARO9* 基因和终止子 T_{AOX1} 进行片段融合，获得 *ARO9* 表达盒。*ARO9* 表达盒克隆到质粒 pZ1-kan 的 *Hind* III/*Sal* I 酶切位点，构建 *ARO9* 过表达质粒 pD-*ARO9*，质粒经 *Not* I 和 *Bgl* II 线性化电转化菌株 PD-TA，构建工程菌 OE-*ARO9*。工程菌 OE-*ARO10* 的构建方式与此相同。

酿酒酵母和产甘油假丝酵母的醇脱氢酶基因 *ScADH5* (Gene ID: 852442) 和 *CgADH1* (GenBank: MT733521.1) 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。利用重叠延伸 PCR 将 Z1 左同源臂、*hph* 基因和 Z1 右同源臂进行融合，并克隆到 pET-32a 的 *Not* I 和 *Bgl* II 位点，构建含整合位点 Z1 的质粒 pZ1-*hph*。利用重叠延伸 PCR 将 P_{PD}、*ScADH5* 基因和 T_{AOX1} 进行片段融合，获得 *ScADH5* 表达盒并克隆到质粒 pZ1-*hph* 的 *Sal* I/*Hind* III 酶切位点，构建 *ScADH5* 过表达质粒 pD-*ScADH5*。表达质粒经 *Not* I 和 *Bgl* II 线性化后，电转化菌株 PD-TA，构建工程菌 OE-*ScADH5*。其他醇脱氢酶基因过表达工程菌构建方式与此相同。

利用重叠延伸 PCR 将 *ALD3* 的左同源臂、

PAR4 基因表达盒和 *ALD3* 右同源臂融合，融合片段电转化 OE-ARO10 获得共表达 *ARO10* 和 *PAR4* 并敲除 *ALD3* 的工程菌 P1。工程菌 P2 和 P3 构建方式与此相同。

1.5 毕赤酵母工程菌摇瓶发酵产 2-PE

将 MD 平板上单菌落接种至 3 mL YPD 培养基中，28 °C、250 r/min 培养过夜；将菌液接种至含有 50 mL 发酵培养基(BMDY, BMY-M, BMY-MN, BMY-MNP)的 500 mL 三角瓶中，各摇瓶中的初始菌液浓度 OD_{600} 为 1.0, 250 r/min、28 °C 发酵 60 h。每间隔 12 h 取样测定 OD_{600} 和 2-PE 产量。从 24 h 开始每隔 12 h 补加 1% 葡萄糖或 2% 糖蜜，用 5 mol/L 氢氧化钾调节 pH 值为 5.5–6.0。菌体密度用分光光度计于波长 600 nm 处测定吸光度值。

1.6 全细胞生物催化法合成 2-PE

重组菌在 BMDY 培养基，于 28 °C、250 r/min 摆瓶发酵 36 h，取菌体用 PBS 缓冲液洗 2 次，随后用 PBS 重悬菌体至 OD_{600} 为 10.0，该菌体悬液即为全细胞催化剂。取菌体悬液和 PAH 溶液(2 g/L PAH)各 1 mL 到玻璃试管中，于 30 °C、220 r/min 进行全细胞生物催化，催化底物 PAH 转化为 2-PE，反应 4 h，利用 HPLC 测定反应体系中的 2-PE 含量。

1.7 HPLC 检测 2-PE

取发酵液 1 mL，常温下 12 000 r/min 离心 10 min，上清液经 0.22 μm 滤膜过滤即可进行样品检测。2-PE 利用 HPLC 进行检测。利用 Waters 2489 HPLC 系统，C18 色谱柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm)。分离条件为：柱温 40 °C，流动相为 30% 乙腈，流速为 0.5 mL/min。2-PE 检测波长为 210 nm，出峰时间约为 17 min。

2 结果与分析

2.1 毕赤酵母重组菌 PD-TA 合成 2-PE

2.1.1 重组菌 PD-TA 利用糖蜜为碳源生长

毕赤酵母 GS115 基因组中缺少蔗糖酶基因，不能代谢蔗糖^[22]；我们前期构建的毕赤酵母重

组菌 PD-TA 能以蔗糖作为碳源生长，因其分泌表达的 β-呋喃果糖苷酶能将蔗糖水解为可利用的葡萄糖和果糖^[21]。用 HPLC 检测了甘蔗糖蜜中发酵总糖为 60.0%，其中果糖、葡萄糖和蔗糖含量分别为 8.5%、4.3% 和 47.2%。检测了出发菌 GS115 和 PD-TA 在不同碳源中的生长情况，结果表明：在无碳源的 MN 培养基中，菌株 PD-TA 与对照菌 GS115 均不能生长(图 1A)；在葡萄糖为碳源的 MD 培养基中，二者生长情况一致(图 1B)；在蔗糖为碳源的 MS 培养基中，对照菌不能生长，菌株 PD-TA 可以利用蔗糖生长(图 1C)；在糖蜜为碳源的 MSM 培养基中，培养 15 h 后，菌株 PD-TA 的细胞密度是菌株 GS115 的 1.4 倍(图 1D)，这是因为菌株 GS115 只能利用糖蜜中的单糖生长，菌株 PD-TA 能利用糖蜜中的蔗糖和单糖为碳源生长。因此，以糖蜜为碳源时，菌株 PD-TA 生长比菌株 GS115 更具优势。

2.1.2 毕赤酵母菌株合成 2-PE 浓度检测

将菌株 PD-TA 和对照菌 GS115 接种到 BMDY 培养基，28 °C、250 r/min 发酵 48 h 检测其生长和 2-PE 产量。结果表明，相较于菌株 GS115，菌株 PD-TA 的生长和 2-PE 产量无显著差异(图 2A、2B)；但发酵到 36 h，随着时间推移，菌株 PD-TA 的 2-PE 产量未提高但副产物苯乙酸浓度增加(图 2C)。

2.2 阻断苯乙酸生成支路对 2-PE 合成的影响

艾氏途径中醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)催化 PAH 生成苯乙酸，是 2-PE 的合成支路^[13]。为减少苯乙酸的形成，本文选择对毕赤酵母编码醛脱氢酶基因(*ALD3*, *ALDH1*, *ALDH2*, *ALDH3*)分别进行敲除(图 3A)，构建相应的基因敲除重组菌 KO-ALD3、KO-ALDH1、KO-ALDH2 和 KO-ALDH3。重组菌经 BMDY 培养基摇瓶发酵 48 h 后测定各重组菌的生长情况和 2-PE 产量。结果表明，相较于出发菌株 PD-TA，重组菌 KO-ALDH1 生长显著降低了 22.3%，其余重组菌的生长无显著差异(图 3B)；重组菌 KO-ALD3 的

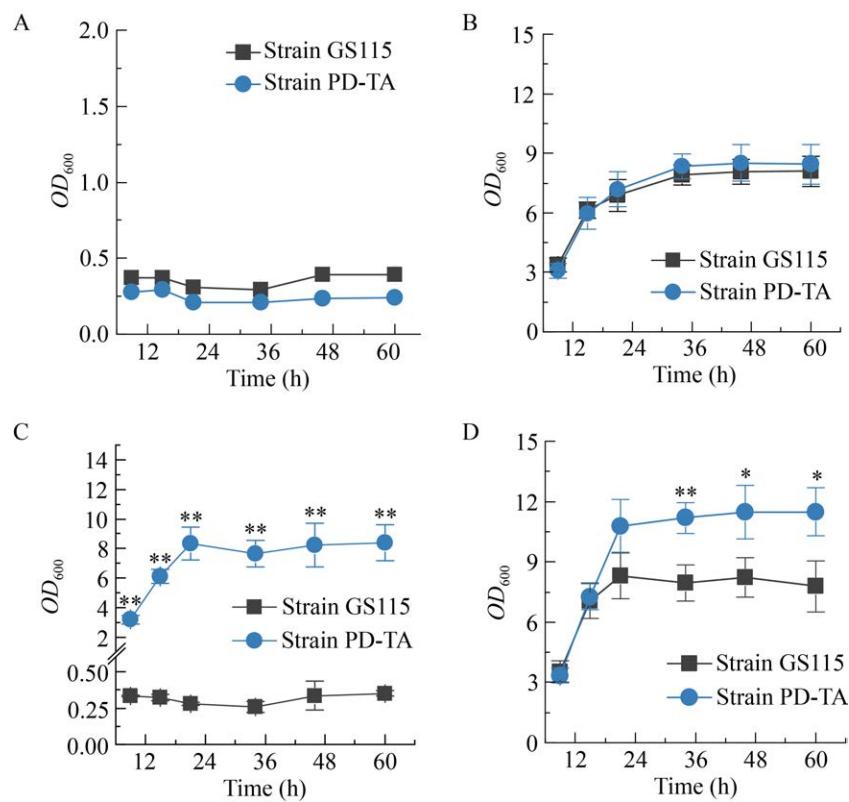


图 1 毕赤酵母菌株在 MN (A)、MD (B)、MS (C) 和 MSM (D) 培养基中的生长

Figure 1 Cell growth of *Komagataella phaffii* strains in MN medium (A), MD medium (B), MS medium (C), and MSM medium (D). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

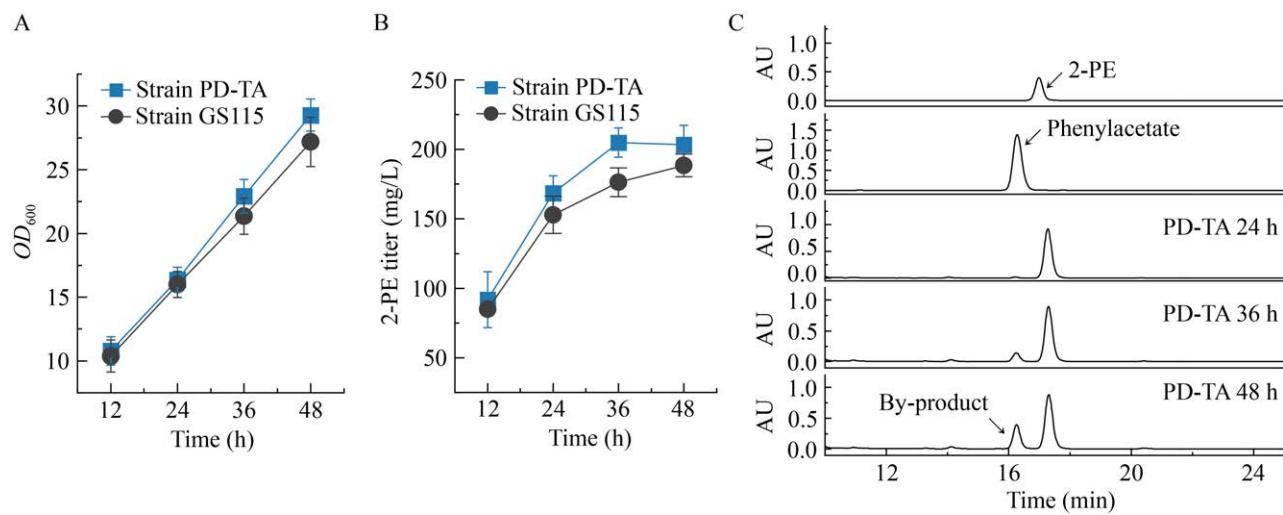


图 2 毕赤酵母菌株 GS115 和 PD-TA 发酵产 2-苯乙醇 A: 生长曲线; B: 2-PE 产量; C: HPLC 检测发酵产物。

Figure 2 Production of 2-phenylethanol by *K. phaffii* strains GS115 and PD-TA. A: Cell growth; B: 2-PE production; C: The fermentation products analyzed by HPLC.

2-PE 产量显著提高了 30.7%，其余重组菌的 2-PE 产量无显著差异(图 3C)；重组菌 KO-ALD3 和 KO-ALDH2 的苯乙酸浓度分别减少了 12.5% 和 16.0%，其余重组菌的苯乙酸浓度无显著变化(图 3C)。因此，敲除 ALD3 基因能减少副产物苯乙酸的形成，促进 2-PE 的合成。

2.3 ADH 和 PAR 的催化效率评估

艾氏途径合成 2-PE 最后一步，是 PAH 被 ADH 或 PAR 以 NADH 作为辅因子还原为 2-PE。因此，为获得高效催化 PAH 合成 2-PE 的 ADH 或 PAR，本文筛选内、外源的 ADH 和 PAR 基因。这些基因包括：(1) 与酿酒酵母 ADH 同源的毕赤酵母 ADH 编码基因：*ADH1* (PAS_chrl-1_0357)、*ADH2* (PAS_chrl-3_0153)、*ADH3* (PAS_chr2-1_0333)、*ADH4* (PAS_chr3_0006)、*ADH5* (PAS_chr3_1028)、*ADH6* (PAS_chr4_0311)、*ADH7* (PAS_chr4_0576) 和 *ADH8* (PAS_chr4_0514)；(2) 与解脂耶氏酵母

PAR 同源的毕赤酵母 PAR 编码基因：*PAR1* (PAS_chr4_0336)、*PAR3* (PAS_chr3_0446) 和 *PAR4* (PAS_chr3_0447)；(3) 来源于酿酒酵母和产甘油假丝酵母的 ADH 基因 *ScADH5* 和 *CgADH1*。

以 PD-TA 为出发菌，分别对这 13 个酶的编码基因进行过表达，构建对应毕赤酵母工程菌。然后，以 PAH 为底物，利用这些工程菌进行全细胞生物催化法合成 2-PE (图 4A)，检测反应体系中 2-PE 的浓度，以评估这些酶催化 PAH 合成 2-PE 的效率。工程菌在 BMDY 培养基中摇瓶发酵 36 h，细胞密度(OD_{600})无显著差异(图 4B)。取发酵 36 h 的工程菌与 2 g/L PAH 孵育 4 h，检测反应体系中合成的 2-PE 浓度。结果发现，*ADH1*、*ADH4*、*ADH5*、*PAR1*、*PAR4*、*ScADH5* 和 *CgADH1* 编码的酶催化效率较高，反应 4 h 催化生成的 2-PE 浓度较对照分别显著提高了 14.6%、13.8%、18.5%、21.2%、23.8%、29.9% 和 28.3% (图 4C)。

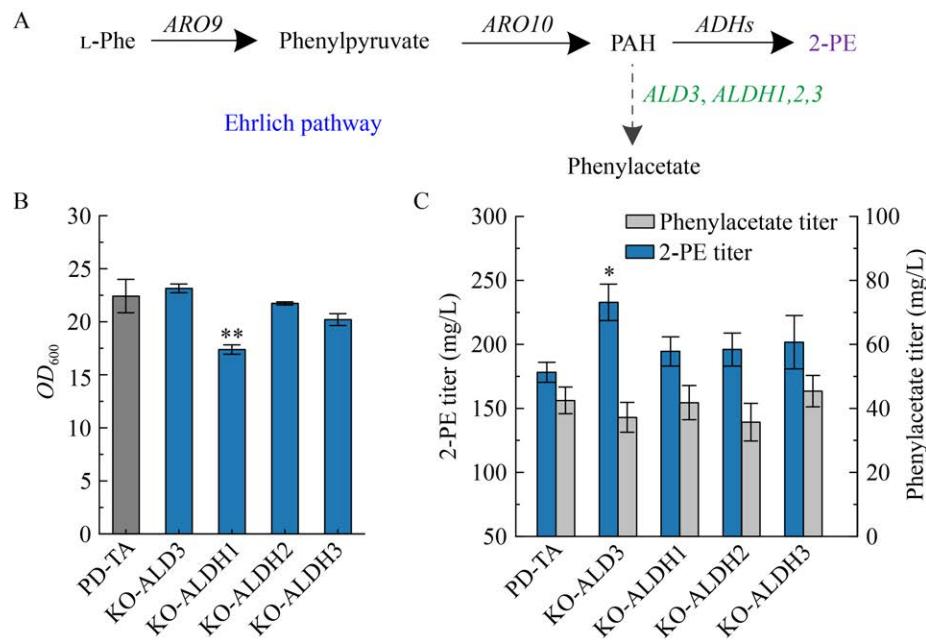


图 3 阻断苯乙酸合成支路重组菌对生长和 2-苯乙醇合成的影响 A：敲除艾氏途径苯乙酸合成相关基因；B：阻断苯乙酸合成支路重组菌对生长的影响；C：重组菌 2-PE 产量和苯乙酸浓度。

Figure 3 Effects of blocking phenylacetate synthesis branch on growth and 2-phenylethanol synthesis. A: Ehrlich pathway in *K. phaffii*; B: Cell growth; C: 2-PE and phenylacetate titer. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

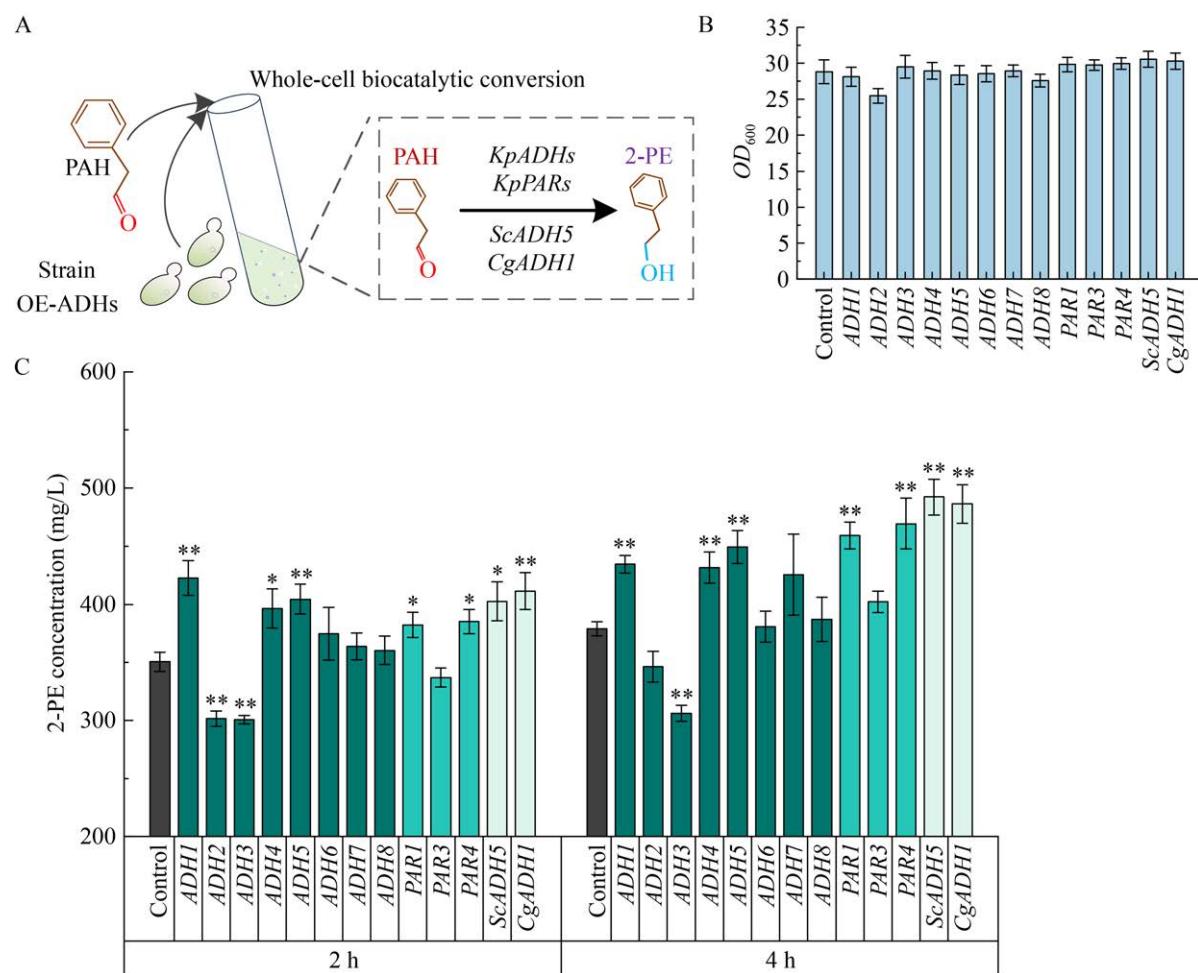


图 4 内、外源醇脱氢酶对 2-苯乙醇合成的影响
A: 利用全细胞催化合成 2-PE; B: 工程菌的生长; C: 工程菌的 2-PE 产量。

Figure 4 Effects of endogenous and heterologous alcohol dehydrogenases on 2-phenylethanol synthesis. A: Production of 2-PE by whole-cell biocatalytic conversion of phenylacetaldehyde; B: Cell growth; C: 2-PE titer. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

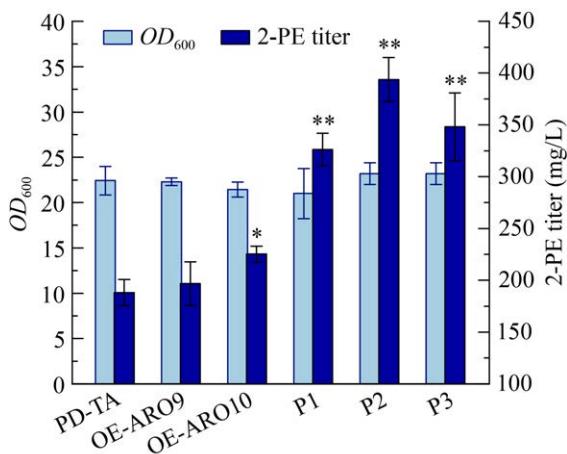
2.4 改造艾氏途径提高 2-PE 产量

艾氏途径以 L-Phe 为底物, 经芳香族氨基酸转氨酶 Aro9p 转氨形成苯丙酮酸, 再经苯丙酮酸脱羧酶 Aro10p 脱羧生成 PAH, 最后脱氢生成 2-PE。以 PD-TA 为出发菌, 对艾氏途径关键酶基因 *ARO9* (PAS_chr1-3_0154)、*ARO10* (PAS_chr3_0095) 进行单基因过表达, 分别构建毕赤酵母重组菌 OE-ARO9 和 OE-ARO10。*ARO9*、*ARO10* 单基因过表达不影响工程菌的生长, *ARO10* 单基因过表达 2-PE 产量提高了 19.7% (图 5)。为进一步提高 2-PE 产量, 将艾

氏途径最后一步催化效率较高的酶编码基因 *PAR4*、*ScADH5* 和 *CgADH1* 表达框分别整合到 OE-ARO10 重组菌的 *ALD3* 基因位点, 构建敲除 *ALD3* 基因并共表达 *ARO10* 和 *ADH* 基因的工程菌 P1、P2 和 P3。相较于对照菌, 工程菌 P1、P2 和 P3 的 2-PE 产量分别提高了 73.4%、109.4% 和 85.1%, 其中 P2 的产量最高, 达到了 397 mg/L (图 5)。

2.5 优化 2-PE 发酵培养基

为确定适合工程菌 P2 合成 2-PE 的廉价高效的碳、氮源, 分别用甘蔗糖蜜和鱼粉替换



ARO9	+				
ARO10		+	+	+	+
ALD3			Δ	Δ	Δ
PAR4			+		
ScADH5				+	
CgADH1					+

图 5 改造艾氏途径工程菌的生长和 2-苯乙醇产量
+: 过表达基因；Δ: 敲除基因。

Figure 5 Cell growth and 2-PE titer of Ehrlich pathway engineered strains. +: Overexpressed gene; Δ: Knockout gene. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$.

BMDY 培养基中的葡萄糖和 YNB, 以检测其对 2-PE 产量的影响。以 BMDY 培养基作为对照, 检测了工程菌 P2 在这些培养基中的生长和 2-PE 产量。结果显示: 以鱼粉为氮源和糖蜜为碳源时 (BMY-MN), P2 能快速生长且在 36–48 h 时达到平稳期(图 6A); 在 36 h 时 2-PE 产量达到最高, 相较于对照培养基中的 2-PE 产量(397 mg/L), BMY-MN 和 BMY-MNP 中的产量分别提高了 18.6% 和 218.1% (图 6B)。在 BMY-MNP 中, P2 工程菌的 2-PE 产量显著高于对照培养基, 36 h 时 2-PE 产量达到了 1 263 mg/L; BMY-MNP 中培养 36–48 h 时, P2 生长显著低于对照培养基, 这可能是高浓度的 2-PE 对细胞生长的抑制作用。

3 讨论

在大多数酵母细胞中, 艾氏途径(Ehrlich pathway)以 L-Phe 为底物, 经转氨、脱羧、还

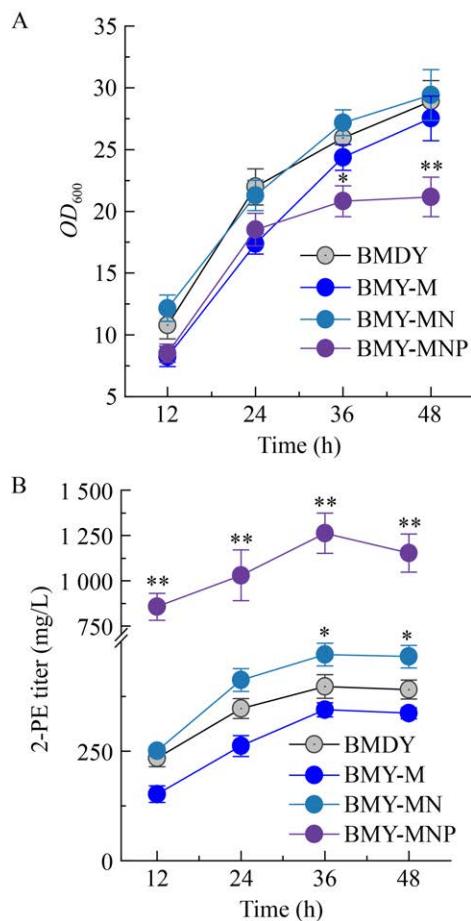


图 6 工程菌 P2 在不同发酵培养基中的生长(A)和 2-苯乙醇产量(B)

Figure 6 Growth (A) and 2-phenylethanol production (B) of engineered strain P2 in different fermentation media. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$.

原三步反应后可合成 2-PE, 艾氏途径是合成 2-PE 效率较高的途径, 所以也是目前研究的热点^[14,23]。艾氏途径中 ALDH 催化 PAH 生成副产物苯乙酸, 是 2-PE 的合成支路^[13]。在 *Y. lipolytica* 中, 过表达艾氏途径关键基因(*ARO8*, *ARO10*, *PAR3*, *GapY3*)的菌株敲除醛脱氢酶基因 *ALD2* 和 *ALD3*, 副产物苯乙酸浓度减少了, 但 2-PE 产量没有增加^[17]。在 *S. cerevisiae* 中, 过表达 *ARO9* 和 *ARO10* 基因的菌株中敲除 *ALD3* 基因可显著增加 2-PE 产量^[13]。本研究发现, 毕赤酵母重组菌 PD-TA 在 BMDY 培养基发酵到 36 h, 2-PE 产量没有提高并伴随着苯乙酸浓度增加。

为减少副产物苯乙酸的形成，将 PD-TA 的醛脱氢酶基因 *ALD3*、*ALDH1*、*ALDH2* 和 *ALDH3* 分别进行敲除，*ALD3* 敲除后 2-PE 产量显著增加了 30.7% (图 3)。这说明艾氏途径中副产物(如苯乙酸)的形成很可能是 2-PE 合成的限制因素之一。

L-Phe 进入艾氏途径经 Aro9p 脱氨基生成苯丙酮酸，苯丙酮酸经 Aro10p 脱羧为 PAH。艾氏途径的前两步反应的机制已基本清楚，但合成 2-PE 的最后一步(即 PAH 被 ADH 或 PAR 还原为 2-PE)的相关研究较少，而 ADH 或 PAR 的高效催化对于提高 2-PE 产量至关重要。Gu 等^[17]利用代谢工程，在 *Y. lipolytica* 中评估了内、外源的 ADH 和 PAR 的催化效率，发现过表达内源 *PAR4* 的菌株 2-PE 产量最高。本研究筛选了 13 个候选基因，包括 8 个内源 *ADH* 基因、3 个内源 *PAR* 基因和 2 个外源 *ADH* 基因，用全细胞生物催化法评估了这些酶的催化效率。结果发现，在 *K. phaffii* 菌株 PD-TA 中，来自酿酒酵母的 *ScADH5* 基因比内源 *ADH* 基因编码的酶催化 2-PE 合成的效率更高。因此，不同酵母菌株，由于遗传背景的差异，适于催化 2-PE 合成的 *ADH* 基因或 *PAR* 基因也不同。

Kong 等^[9]首次在 *K. phaffii* 中实现了以葡萄糖为碳源从头合成 2-PE，通过表达异源 DAHP 合酶基因 *AroG^{fbr}* 和分支酶脱水酶基因 *PheA^{fbr}*，以解除反馈抑制，并过表达 *ARO8*、*ARO10* 和 *ADH6* 基因，2-PE 产量达到了 1.1 g/L，证明毕赤酵母具有合成芳香族化合物的潜力。为获得 2-PE 高产菌株，本研究针对艾氏途径的限速步骤敲除了 *ALD3* 基因，以减少副产物的形成，过表达 *ARO10* 和异源的 *ScADH5* 基因，构建基因工程菌 P2。相较于对照菌 PD-TA，工程菌的 2-PE 产量为 397 mg/L，提高了 109.4%。

为进一步提高产量并减少发酵成本，对 P2 发酵培养基进行了优化。发酵培养基以葡萄糖为碳源的成本偏高，选择廉价的糖蜜为碳源发

酵 2-PE 更具市场前景。甘蔗糖蜜是制糖行业的副产物，不仅含有大量的可发酵糖，还含有丰富的无机盐，有助于微生物发酵利用^[20]。甘蔗糖蜜中的氮含量相对较低，通常不足以支持大多数微生物的生长和发酵，需要额外添加氮源。在 2-PE 发酵过程中，氮源不仅作为细胞正常生长和代谢的氮元素，还调控氨基酸转运蛋白基因的表达，引起氮代谢阻遏效应^[24]，甚至影响一些可能与耐受性相关的氨基酸(如谷胱甘肽)的合成。因此，廉价高效的碳源和氮源不仅可以提高 2-PE 产量，还能大幅降低发酵成本。L-Phe 是酵母通过艾氏途径生物合成 2-PE 的前体物质，浓度过低可能造成前体供应不足，而浓度过高可能引起反馈抑制，导致 2-PE 的合成效率降低。因此，发酵培养基中 L-Phe 的含量直接影响 2-PE 的合成。在优化培养基(BMY-MNP)中，分别用甘蔗糖蜜和鱼粉替换 BMDY 培养基中的葡萄糖和 YNB，并添加 5 g/L 的 L-Phe。优化培养基后，工程菌 P2 的 2-PE 产量提高了 218.1%，达到 1 263 mg/L (图 6)，*K. phaffii* 工程菌利用葡萄糖从头合成 2-PE 产量达到 1.1 g/L^[9]。马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) CBS 600 利用甜菜糖蜜为碳源并添加 7 g/L L-Phe，可合成 0.89 g/L 2-PE^[25]。微生物混合培养物利用甘蔗糖蜜废水为碳源并添加 6 g/L L-Phe，在 2 L 发酵罐中可产生 1 g/L 2-PE^[26]。因此，本研究构建的毕赤酵母工程菌 P2 能利用廉价培养基高效合成 2-PE，具备较好的工业生产潜力。

在 BMY-MNP 中培养 24–48 h 时，P2 的产量维持在 1.0–1.3 g/L 范围，生长显著低于对照培养基，这可能是高浓度的 2-PE 对细胞生长的抑制作用。2-PE 对酵母细胞的分解代谢能力、细胞膜渗透性、活性氧含量等会造成一定的影响^[27]。高浓度的 2-PE 会破坏细胞膜的完整性以及线粒体呼吸，抑制 DNA、RNA 和蛋白质的合成，导致细胞生长被抑制。

4 结论

本研究以毕赤酵母重组菌 PD-TA 为出发菌株, 通过代谢工程改造艾氏途径, 解除 2-PE 合成途径的限制步骤。通过敲除 *ALD3* 基因、过表达 *ARO10* 和异源 *ScADH5* 基因, 构建工程菌 P2, 相较于出发菌, 2-PE 产量提高了 109.4%。优化发酵培养基后, 分别以廉价甘蔗糖蜜和鱼粉为碳源和氮源, P2 经摇瓶发酵 36 h 的 2-PE 产量达到 1 263 mg/L, 比优化前提高了 218.1%。因此, 本研究构建的工程菌 P2 具备将廉价糖蜜转化为高附加值产物 2-PE 的能力, 这为构建 2-PE 合成的工业化生产菌株奠定了基础, 也为构建包括 2-PE 在内的多种杂醇类细胞工厂提供理论依据和技术基础。

为了进一步提高工程菌的 2-PE 产量, 后续的研究可从以下 4 个方面进行探索: (1) 增强细胞外 L-Phe 的转运能力, 以提高 L-Phe 到 2-PE 的转化率; (2) 解除 L-Phe 对 2-PE 合成途径关键酶的反馈抑制; (3) 提高毕赤酵母菌株的 2-PE 耐受性; (4) 优化工程菌利用甘蔗糖蜜合成 2-PE 的发酵条件。

作者贡献声明

杨幸霖: 构建工程菌及发酵实验, 撰写论文初稿; 任晋莹: 检测发酵产物; 陆融融、阳路杭和苏慧颖: 全细胞催化法合成 2-PE; 秦秀林: 设计实验、分析数据和修改论文。

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。

REFERENCES

- [1] MARTÍNEZ-AVILA O, SÁNCHEZ A, FONT X, BARRENA R. Bioprocesses for 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate production: current state and perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(23): 9991-10004.
- [2] ATSUMI S, HANAI T, LIAO JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels[J]. Nature, 2008, 451(7174): 86-89.
- [3] JIN DF, GU BT, XIONG DW, HUANG GC, HUANG XP, LIU L, XIAO J. A transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under the stress of 2-phenylethanol[J]. Current Microbiology, 2018, 75(8): 1068-1076.
- [4] ZHANG HX, DU H, XU Y. Volatile organic compound-mediated antifungal activity of *Pichia* spp. and its effect on the metabolic profiles of fermentation communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(9): e02992-20.
- [5] WANG YQ, ZHANG H, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Advances in 2-phenylethanol production from engineered microorganisms[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(3): 403-409.
- [6] 朱灵桓, 徐沙, 李由然, 张梁, 石贵阳. 微生物法从头合成 2-苯乙醇的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 271-277.
ZHU LH, XU S, LI YR, ZHANG L, SHI GY. Recent advances on *de novo* biosynthesis of 2-phenylethanol[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(16): 271-277 (in Chinese).
- [7] WANG ZY, JIANG MY, GUO XN, LIU ZZ, HE XP. Reconstruction of metabolic module with improved promoter strength increases the productivity of 2-phenylethanol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 60.
- [8] LU XY, WANG YQ, ZONG H, JI H, ZHUGE B, DONG ZL. Bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by the novel stress-tolerant yeast *Candida glycerinogenes* WL2002-5[J]. Bioengineered, 2016, 7(6): 418-423.
- [9] KONG SJ, PAN H, LIU XY, LI X, GUO DY. *De novo* biosynthesis of 2-phenylethanol in engineered *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 133: 109459.
- [10] KIM TY, LEE SW, OH MK. Biosynthesis of 2-phenylethanol from glucose with genetically engineered *Kluyveromyces marxianus*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 61: 44-47.
- [11] CELIŃSKA E, KUBIAK P, BIAŁAS W, DZIADAS M, GRAJEK W. *Yarrowia lipolytica*: the novel and promising 2-phenylethanol producer[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(3): 389-392.
- [12] 林路成, 徐志伟, 张建泽, 单玉栋, 肖峰, 徐浩, 李芬萍, 易蒲红, 汪琨, 朱廷恒. 原生质体融合结合基因编辑技术显著提高酿酒酵母 2-苯乙醇产量[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(5): 18-28.
LIN LC, XU ZW, ZHANG JZ, SHAN YD, XIAO F, XU H, LI QP, YI PH, WANG K, ZHU TH. Protoplast fusion combined with gene editing technology significantly improves the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to produce 2-phenylethanol[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(5): 18-28 (in Chinese).
- [13] KIM B, CHO BR, HAHN JS. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2014, 111(1): 115-124.
- [14] CELIŃSKA E, BORKOWSKA M, BIAŁAS W, KUBIAK M, KORPYŚ P, ARCHACKA M, LEDESMĀ-AMARO R, NICAUD JM. Genetic engineering of Ehrlich pathway modulates production

- of higher alcohols in engineered *Yarrowia lipolytica*[J/OL]. FEMS Yeast Research, 2019. DOI: 10.1093/femsyr/foy122.
- [15] YIN S, ZHOU H, XIAO X, LANG TD, LIANG JR, WANG CT. Improving 2-phenylethanol production via Ehrlich pathway using genetic engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Current Microbiology, 2015, 70(5): 762-767.
- [16] ROMAGNOLI G, KNIJNENBURG TA, LITI G, LOUIS EJ, PRONK JT, DARAN JM. Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 gene, encoding an aromatic amino acid transaminase, enhances phenylethanol production from glucose[J]. Yeast, 2015, 32(1): 29-45.
- [17] GU Y, MA JB, ZHU YL, XU P. Refactoring Ehrlich pathway for high-yield 2-phenylethanol production in *Yarrowia lipolytica*[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(3): 623-633.
- [18] VIJAYAKUMAR VE, VENKATARAMAN K. A systematic review of the potential of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as an alternative host for biologics production[J]. Molecular Biotechnology, 2024, 66(7): 1621-1639.
- [19] GUO F, QIAO YY, XIN FX, ZHANG WM, JIANG M. Bioconversion of C1 feedstocks for chemical production using *Pichia pastoris*[J]. Trends in Biotechnology, 2023, 41(8): 1066-1079.
- [20] SUN YQ, XU ZZ, ZHENG YF, ZHOU JJ, XIU ZL. Efficient production of lactic acid from sugarcane molasses by a newly microbial consortium CEE-DL15[J]. Process Biochemistry, 2019, 81: 132-138.
- [21] 张慧杰, 廖思敏, 凌小翠, 冯家勋, 秦秀林. 毕赤酵母截短 PGK1 启动子与不同终止子组合调控外源基因表达[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2642-2657.
ZHANG HJ, LIAO SM, LING XC, FENG JX, QIN XL. Truncated *PGK1* promoter is paired with varied terminators to regulate heterologous gene expression in *Pichia pastoris*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2642-2657 (in Chinese).
- [22] TOMÁS-GAMISANS M, FERRER P, ALBIOL J. Integration and validation of the genome-scale metabolic models of *Pichia pastoris*: a comprehensive update of protein glycosylation pathways, lipid and energy metabolism[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0148031.
- [23] DAI J, XIA HL, YANG CL, CHEN X. Sensing, uptake and catabolism of L-phenylalanine during 2-phenylethanol biosynthesis via the Ehrlich pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 601963.
- [24] ZHANG P, DU GC, ZOU HJ, XIE GF, CHEN J, SHI ZP, ZHOU JW. Genome-wide mapping of nucleosome positions in *Saccharomyces cerevisiae* in response to different nitrogen conditions[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 33970.
- [25] ETSCHMANN MMW, SELL D, SCHRADER J. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(7): 531-536.
- [26] PAN XR, QI HS, MU L, WEN JP, JIA XQ. Comparative metabolomic-based metabolic mechanism hypothesis for microbial mixed cultures utilizing cane molasses wastewater for higher 2-phenylethanol production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(40): 9927-9935.
- [27] BALBINO TR, Da SILVEIRA FA, VENTORIM RZ, DO NASCIMENTO AG, de OLIVEIRA LL, Da SILVEIRA WB. Adaptive responses of *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 to 2-phenylethanol stress: alterations in membrane fatty-acid composition, ergosterol content, exopolysaccharide production and reduction in reactive oxygen species[J]. Fungal Genetics and Biology, 2021, 151: 103561.