酿酒酵母代谢调控合成功能营养品:进展与挑战

刘甜甜[1,2]，徐显皓[1,2]，孔 晓[1,2]，刘延峰[1,2]，
李江华[1,2]，堵国成[1,2]，吕雪芹[1,2]，刘 龙[*1,2]
(1. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 未来食品科技中心,江苏 无锡 214122)

摘要: 综述了酿酒酵母作为底盘细胞代谢调控合成功能营养品的研究进展。首先,介绍了酿酒酵母作为细胞工厂相关的启动子调控、终止子调控、辅因子调控、转运蛋白调控及动态调控等一系列代谢调控策略,并介绍了加强产物合成的相关遗传改造工具和代谢分析技术。随后,概述了酿酒酵母合成寡糖、维生素及萜类、短链有机酸和脂肪酸等功能营养品的研究进展。最后,提出了目前面临的挑战,并结合代谢工程新兴技术展望了未来酿酒酵母代谢调控的发展趋势,以期为功能营养品在酿酒酵母中的高效合成提供参考。

关键词: 酿酒酵母;功能营养品;合成途径;代谢调控
中图分类号:Q 815　**文章编号**:1673-1689(2022)08-0010-12　**DOI**:10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.08.002

Metabolic Regulation and Synthesis of Functional Nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*: Progress and Challenges

LIU Tiantian[1,2], *XU Xianhao*[1,2], *KONG Xiao*[1,2], *LIU Yanfeng*[1,2],
LI Jianghua[1,2], *DU Guocheng*[1,2], *LYU Xueqin*[1,2], *LIU Long*[*1,2]
(1. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The research progress of *Saccharomyces cerevisiae* as a chassis cell for metabolic regulation and synthesis of functional nutrients was summarized in this review. Firstly, a series of metabolic regulation strategies related to the promoter regulation, terminator regulation, cofactor regulation, transporter regulation and dynamic regulation of *Saccharomyces cerevisiae* as a cell factory were introduced, and the related genetic transformation tools and metabolic analysis techniques to enhance product synthesis were also introduced. Secondly, the research progress on synthesis of functional nutrients, such as oligosaccharides, vitamins and terpenoids, short chain organic acids and fatty acids, by *Saccharomyces cerevisiae* was summarized. Lastly, the current challenges were put forward, and the future development trend of metabolic regulation of *Saccharomyces cerevisiae* was prospected in combination with the emerging technologies of

收稿日期: 2022-06-30
基金项目: 国家自然科学基金项目(32100439);江苏省青年基金项目(BK20210467)。
作者简介: 刘甜甜(1988—),女,博士,助理研究员,主要从事微生物生物化学方面的研究。E-mail: liutiantian@jiangnan.edu.cn
* **通信作者**: 刘 龙(1980—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物合成生物学和代谢工程方面的研究。
E-mail:longliu@jiangnan.edu.cn

metabolic engineering, in order to provide a reference for the efficient synthesis of functional nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, functional nutrition, synthetic pathway, metabolic regulation and control

随着人们对于疾病意识从被动治疗到主动预防的转变，以膳食补充剂为主的功能营养品越来越受到追捧。功能营养品含有可调节人体生理功能的营养素，具有天然物质效用等同性、安全性高和功能明确的特点。据世界卫生组织报告和《柳叶刀》报道，慢性疾病是仅次于遗传而影响人类健康的第二大因素，约 16.2%的慢性疾病负担归因于膳食[1-2]。功能营养品通过膳食改善人类的健康，对于提高人们生活质量、满足人们日益增长的美好生活愿望具有重要意义。

微生物合成具备生产周期短、成本低、发酵条件温和、安全性高和不受气候影响等诸多优势[3]，微生物发酵功能营养品常用的宿主有大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌、枯草芽孢杆菌及酿酒酵母等。其中，酿酒酵母作为模式真核生物和食品安全菌株，遗传信息背景清晰，分子操作体系完善，是合成功能营养品的理想宿主之一[4-5]。如今，酿酒酵母合成的天然产物已超过 100 种，研究者针对酿酒酵母生产不同的天然产物的代谢网络进行了系统性优化。不过，目前国内外关于酿酒酵母这一底盘细胞合成各类功能营养品的系统性介绍与总结却很少。作者从酿酒酵母作为细胞工厂的相关代谢调控策略、遗传改造工具以及代谢分析技术等方面展开介绍，列举了酿酒酵母作为细胞工厂合成母乳寡糖、有机酸、天然色素、维生素和脂肪酸等主要功能营养品的研究进展，并指明酿酒酵母生物合成功能营养品面临的挑战及未来发展方向，以期为功能营养品在酿酒酵母中的高效合成提供新思路。

1 酿酒酵母代谢调控策略

1.1 启动子调控

选用合适的启动子增强或减弱关键基因的表达量，从而增加或减少相关代谢途径的代谢通量，是代谢网络调控的常用策略之一。对现有启动子进行突变和筛选是获得不同强度启动子的重要手段。此外，启动子的理性设计也是提高启动子强度的有效策略。Curran 等对酿酒酵母的内源性启动子进行了重新设计和人工启动子的从头设计，构建了具有不同强度的合成启动子文库[6]。在质粒表达体系中，增加了 1.5~6.0 倍；在基因组表达体系中，目标蛋白质的表达量增加了 16 倍。Redden 等[7]根据启动子的组成结构，将 655 bp 的天然启动子缩短为 116 bp，再将其与最小的终止子 47 bp 串联，构建了酿酒酵母中最小的表达元件，比通用的表达元件大小缩小了 80%。

1.2 终止子调控

终止子在酿酒酵母的基因表达调控中同样发挥着重要的作用。终止子可以通过控制 mRNA 半衰期来调节基因的表达水平，从而应用于酿酒酵母的代谢工程改造。选用不同的终止子，目标基因转录水平的差异可以在 6.5~35.0 倍[8]。与合成启动子类似，Curran 等合成了一系列长度在 35~70 bp 的短终止子，其中合成终止子 Tsynth25 与天然终止子 TCYC1 相比，调控基因的转录水平提高了 4.4 倍[9]。合成终止子与天然终止子的差别在于有效核心元件的改造以及连接区序列的长短，Tsynth25 终止子在有效元件上游增加了 10 个 T 残基，有效元件 (TA)n 增加了 18 bp。

1.3 辅因子调控

除了调节相关途径的代谢通量，辅因子的平衡和供给也是代谢网络调控需要考虑的重要因素之一。辅因子例如 NADH、NADPH 和辅酶 Q 等，其作为酶中非蛋白质的部分，参与胞内许多重要的催化和生化反应。辅因子调控策略主要包括调控辅因子平衡供给和调节辅因子的特异性。Heux 等发现，NADH 氧化酶的过表达会导致细胞内 NADH 浓度和 NADH/NAD^+浓度比值大幅下降，乙醇、甘油、琥珀酸和羟基戊二酸的产量显著降低[10]。Quinn 等研究了酵母双突变体 (coq2Δ，ORFΔ) 在外源 Q6 或 Q4 的存在下，可以恢复在特定发酵的碳源上生长的能力[11]。这项研究确定了外源辅酶 Q 转运到线粒体所需的基因和途径，为酿酒酵母碳源的选择和高效利用提供了理论基础。

1.4 转运蛋白调控

转运蛋白是一类可以将酿酒酵母细胞所需的

营养物质转运至胞内,或将目标产物转移到胞外的膜蛋白。除一些生物小分子,大多数分子的转运都由其特异的转运蛋白完成。Wang 等对一个木糖转运蛋白进行了定向进化,极大提升了木糖的转运效率,使工程菌株具备在葡萄糖和木糖培养基中高效利用木糖的能力[12]。Lian 等进化了纤维糊精转运蛋白,工程菌株的纤维二糖摄取率提升了 4 倍[13]。Pacheco 等发现在酿酒酵母中过表达转运蛋白 ADY2 和 JEN1 可使乳酸产量提高 15%[14]。Zelle 等则通过引入转运蛋白 SpMAE1 将苹果酸转运到胞外,降低产物分泌到胞外所需的能量并解除产物积累带来的生长抑制,使苹果酸的产量提升了 6倍[15]。

1.5 动态调控策略

传统的基因表达调控策略,如过表达途径关键基因、敲除分支路径相关基因等,可使代谢通量更多的流向产物合成途径。然而,上述策略容易导致细胞生长与产物合成间的代谢流失衡,中间代谢积累,引入新的代谢瓶颈。动态调控系统是通过构建响应特定信号变化(光、温度、群体感应、半乳糖、葡萄糖、溶解氧、pH 等)的基因回路来对产物的代谢网络进行实时动态控制[16]。通过开发高效、灵敏、简便的动态调控系统,可以实时动态地平衡产物代谢网络中各个代谢流的通量,平衡细胞的生长与产物的合成,从而促进相应产物的高效合成。

Zhou 等基于半乳糖 GAL 调控系统,定向进化获得了一个温度敏感的 GAL4 突变体 GAL4M9,并在酿酒酵母(ΔGAL80)中用作蛋白质开关,成功构建了响应温度的动态调控系统,使细胞生长和产物的合成解耦合[17]。最终,酿酒酵母的生物量提高了 44%,番茄红素的产量提高了 144%。Zhao 等[18]在酿酒酵母中构建了响应蓝光的 OptoEXP 光遗传调控系统,该系统被应用于异丁醇和 2-甲基-1-丁醇代谢网络的动态调控,使它们的产量分别提高了 5 倍和 20 倍。在酿酒酵母中,响应葡萄糖浓度的 HXT1 启动子也被利用在代谢途径的调控中。当葡萄糖浓度较高时,启动子被激活,下游基因起始转录;当葡萄糖浓度较低时,下游基因表达受抑制。

2 酿酒酵母的遗传改造工具

利用酵母基因组合适的遗传改造工具,可以提升酿酒酵母代谢网络与外源基因的配适性,从而达到目标产物的高效合成,目前常用的遗传改造工具有以下 3 个系统:

1)Cre-loxP 系统 Cre 酶通过识别 loxP 位点介导 DNA 重组[19],可以实现基因组靶向改造后筛选标签的回收利用,使得多位点的多轮迭代改造成为可能。通过缺陷型标签或者抗性标签可以直接以同源重组的方式在酿酒酵母内实现基因敲除或者插入,但迭代次数受限于菌株可用的标签数目。

2)转录激活因子样效应物核酸酶系统(Transcription Activator-Like Effector Nucleases,TALENs) 利用模块化、可识别特定碱基的蛋白质序列结合至基因组特定位点,然后利用连接的核酸酶实现基因组的剪切和靶向改造。Li 等利用 TALENs 策略实现了酿酒酵母中 *Ura3*、*Ade2* 和 *Lys2* 基因的高效敲除[20]。

3)CRISPR/Cas 系统 是最新一代的基因组编辑工具,具有设计简单、操作便利、效率高等优点,是目前酿酒酵母基因组靶向改造的不二之选。酿酒酵母的高同源重组效率结合 CRISPR/Cas9 系统的高切割效率,使得基因组多位点敲除和整合更为方便高效。Jakociunas 等利用 CRISPR/Cas 技术并通过共转化多个 gRNA 和双链寡核苷酸链修复模板,实现了代谢通路上 5 个基因的 100%同时高效转化[21]。Reider 等基于 CRISPR-cas9 技术构建了一个无克隆工具包,该工具包可以解决代谢工程中常见的障碍,包括染色体整合位点的选择、启动子强度和蛋白质定位[22]。

3 酿酒酵母系统代谢分析技术

3.1 组学分析

清晰的遗传背景是对菌株进行代谢工程改造的前提条件之一,然而,酿酒酵母细胞网络复杂,许多基因的功能仍旧未知。组学(包括基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学)技术的发展,有助于从整体上、多层次、系统地认识酿酒酵母的遗传背景和代谢网络。Hou 等构建了一株能够利用木糖的酿酒酵母菌株,并利用自适应性进化获得一株木糖利用能力显著提高的突变株[23]。利用全基因组测序分析发现,分子伴侣在木糖异构酶活性调节中的重要性。Huang 等利用紫外诱变和微流体液滴分选技术得到几株 α-淀粉酶产量提高的酿酒酵母突变株,并利用 RNA-seq 对突变株进行全基因组转录分析,发现在厌氧条件下表达的与生长率有关的基因 ANB1(编码转录延伸因子)可以通过提高细胞活

性、减少氧化应激来提高 α-淀粉酶产量[24]。

Chen 等对脂肪酸积累的酿酒酵母菌株进行蛋白质组学分析，鉴定出 500 多种蛋白质，其中 82 种蛋白质的表达发生显著变化，结果有助于阐明工程菌株中脂肪酸产量增加的机制，为进一步提高酿酒酵母中脂肪酸的产量提供了改造靶点[25]。Ming 等采用代谢组学分析比较了不同浓度乙醇培养的酿酒酵母细胞中的代谢物组成和含量变化，发现总共有 36 种代谢物发生了显著变化，包括氨基酸、有机酸和脂肪酸等，其中柠檬酸循环以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径受到明显的干扰，初步揭示了酿酒酵母的乙醇耐受机制[26]。

3.2 代谢模型分析

一些产物的代谢网络十分复杂，难以人为选择合适的靶点进行代谢工程改造，极大地延长了这类产物的研发周期。基于基因组数据构建基因组规模代谢网络模型（Genome-Scale Metabolic Network Model，GSMM），对基因组、代谢反应和蛋白质三者之间的关系进行表征[27]，能够应用于复杂代谢网络改造靶点的预测。最近建立的 Yeast 8.0 模型提高了基因组覆盖率，进一步扩大了酵母代谢网络范围，并通过使用 Gecko 框架加入了酶约束，改善了模型对细胞表型的预测能力。随后，在 Yeast 8.0 的基础上通过公共数据库收集和评估酵母蛋白质的 3D 结构开发了 proYeast8DB 模型，该模型能鉴定与特定表型相关的突变点。

目前，GSMM 已经应用于多种产物的代谢网络改造靶点预测。Asadollahi 等使用 iFF708 模型和基因敲除（OptGene）算法来鉴定新的代谢工程靶点，以增强酿酒酵母中倍半萜的生物合成[28]。该模型评估了基因敲除对酿酒酵母代谢模型中通量分布的影响，并确定 *GDH1* 基因（编码 NADPH 依赖性谷氨酸脱氢酶）的缺失是提高酵母倍半萜生物合成水平的最佳改造靶点。虽然 *GDH1* 基因的删除使得倍半萜产量增加了 85%，且过表达 *GDH2*（编码 NADH 依赖性谷氨酸脱氢酶），能够在提高倍半萜合成水平的同时维持细胞的正常生长速率。Ye 等[29]提出了一个包含 15 种细胞状态和 26 种细胞过程的计算全细胞模型 WM_S288C，该模型能够综合分析酿酒酵母的生理功能。利用 WM_S288C 预测酿酒酵母表型，在 5 个水平上对 1 140 个必需基因的功能进行了表征并与表型关联。随着测序技术和组学分析技术的飞速发展，酿酒酵母代谢模型也在不断发展和完善，将系统地改善我们当前对微生物代谢网络的认识。

4 酿酒酵母代谢合成多种功能营养品应用实例

酿酒酵母作为可食用菌株，在多功能营养食品的绿色生物合成中占有一席之地。代谢工程探索并表征了酿酒酵母中的一些表达元件和代谢调控机制，发展了稳定可靠的基因组操作方法，成功实现了一系列高附加值化合物在酿酒酵母中的从头合成。表 1 列举了近年来酿酒酵母生产各类功能营养品的策略及产量。

4.1 酿酒酵母合成母乳寡糖

母乳寡糖（Human Milk Oligosaccharides，HMOs）由于其来源稀缺且对于人体尤其是婴幼儿的健康至关重要，是目前的研究热点。HMOs 可以选择性地刺激双歧杆菌的生长从而抑制致病菌生长，维持肠道微生态平衡，保护婴儿免受肠道致病菌感染。HMOs 目前应用最广的是由 FDA（Food and Drug Administration）和 EFSA（European Food Safety Authority）批准的 2'-岩藻糖基乳糖（2'-fucosyllactose，2'-FL）和乳酰-N-新四糖（lacto-N-neotetraose，LNnT）。图 1 为酿酒酵母合成 HMOs 的代谢途径。

Liu 等人以葡萄糖和乳糖作为混合碳源，通过异源引入 GDP-甘露糖-4，6-脱水酶 Gmd、GDP-L-岩藻糖合酶 WcaG 和岩藻糖基转移酶 FucT2，实现了 2'-FL 在酿酒酵母中的从头合成[55]。经分批发酵，2'-FL 的产量达到 0.51 g/L。Lee 等人以木糖和乳糖为混合碳源[31]，首先引入了一个克鲁维酵母来源的乳糖转运蛋白 Lac12；随后引入一条大肠杆菌来源的由 Gmd、WcaG 和 α-1，2-岩藻糖转移酶 WbgL 组成的 2'-FL 生物合成途径，得到的工程酵母能够合成 25.5 g/L 的 2'-FL。

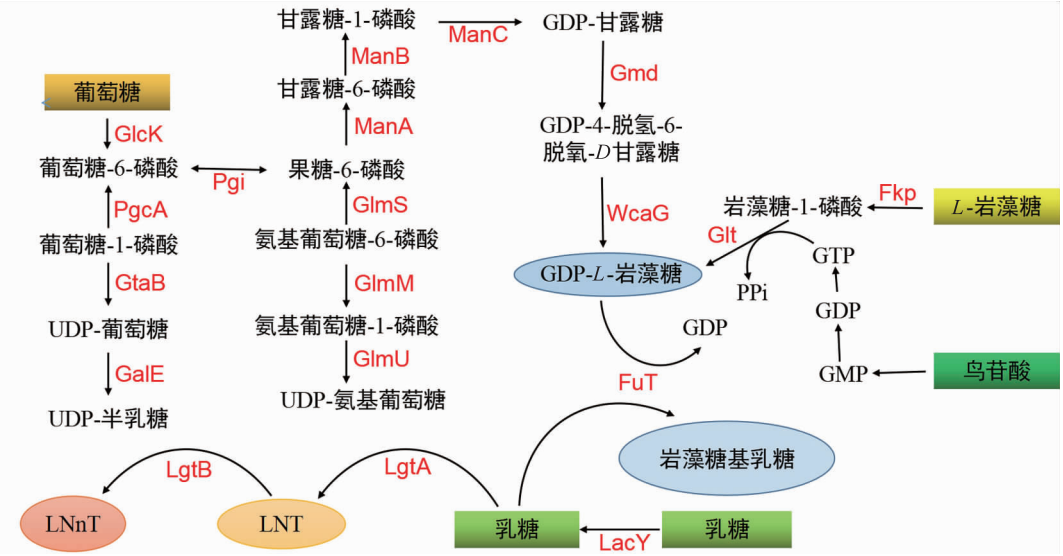
4.2 酿酒酵母合成维生素

维生素是机体正常代谢必不可少的微量营养元素。维生素不会为细胞生长提供能量，但参与生物的代谢调控，缺乏维生素将导致代谢紊乱，进而引发严重的健康问题[56]。目前，酿酒酵母合成的维生素主要包含 3 种：维生素 A（二萜）、维生素 D 和维生素 E。图 2 为酿酒酵母生物合成维生素和萜类的

表 1　酿酒酵母代谢合成多功能营养品

Table 1　Metabolic synthesis of multi-functional nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*

类别	产品	功效	策略	产量/(g/L)	参考文献
寡糖	2'-FL	益生元,促进肠道有益微生物生长、抑制病原菌感染、增强宿主免疫系统	构建具有 l-岩藻糖激酶和鸟苷 5'-二磷酸-l-聚焦磷酸化酶的双功能酶;引入乳糖透酶 LAC12	0.50	2018[30]
			引入乳糖转运蛋白 LAC12、GMD、WCAG 和 WBGL	25.5	2020[31]
	新琼脂糖四糖 NeoDP4		采用质粒载体系统和聚类规则间隔短回文重复(CRISPR)-Cas9 系统	1.86	2021[32]
多糖	β-葡聚糖	增强免疫,改善血脂和肠道、抗辐射功能	表达 β-1,6-葡聚糖合酶 Gsma;过表达 *Pgm2* 和 *Rho1*	0.37	2019[33]
维生素	维生素 D	促进骨骼钙化,促进肠道对磷和钙的吸收,促进肠黏膜细胞的分化;调节免疫	过表达 7 个必需基因,构建基因组尺度的代谢模型,敲除 5 个基因靶点,Δ*gdh1*	1.32	2021[34]
	生育三烯酚(维生素 E)	抗癌、抗心血管疾病、抗衰老等	过表达 GGPP 合酶和 NADH 激酶;Δ*mot3*,Δ*rox1*	0.82	2022[35]
	维生素 C	清除自由基、抗毒素、抗癌	异源表达维生素 C 合成的反应催化酶;利用诱导型启动子、多拷贝质粒方式过表达外源基因,融合表达关键酶	0.19	2019[36]
单萜	柠檬烯	防腐保鲜、抑菌、抗氧化;抗肿瘤、祛痰平喘、利胆溶石	设计 PDH 旁路简化 MVA 途径;弱化竞争旁路,增加胞质乙酰辅酶 A 含量	2.23	2021[37]
	橙花醇	抗氧化、抗痉挛、驱虫、平衡心律、保肝、神经保护等	替换 *ERG20* 的启动子为 pERG1,引入 *ERG20* 突变体和 NPP 合成酶	8.30×10^{-3}	2022[38]
倍半萜	青蒿酸	治疗疟疾青蒿素的重要前体	*Pctr3::pmet3*,下调 *ERG9*;引入 *CYB5*、*CYP7*、*AV1*、*CPR1*、*ADH1* 和 *ALDH1*	25.00	2013[39]
二萜	香紫苏醇	抗菌性	筛选基因缺失(*rox1*、*dos2*、*yer134c*、*vba5*、*ynr063w* 和 *ygr259c*)突变菌株	0.75	2015[40]
	维生素 A	在视觉、生殖、免疫系统和皮肤健康等方面发挥重要作用	以木糖为底物,引入 15,15'-双加氧酶基因 *Bcmo*	3.35	2019[41]
三萜	角鲨烯	抗肿瘤、耐缺氧和细胞保护等活性	引入 HMG-CoA 还原酶并逐步过表达角鲨烯生成过程中酶,过表达 *ADH2* 和 *ADA*	9.47	2020[42]
	α-香树脂醇	抗菌消炎、抗血栓、保肝等生物学活性	通过半理性设计和定点突变,构建 α-amyrin 合酶工程;过表达 *DGA1*	1.11	2020[44]
	β-香树脂醇		引入几种外源性乙酰辅酶 A 合成途径与内源途径相结合	0.28	2019[45]
四萜	虾青素	具有较强的抗氧化活性	结合 ARTP 物理诱变和 H_2O_2 驱动适应性进化的组合策略	0.40	2020[46]
有机酸	乳酸	抑菌、保鲜、酸味剂	过表达基因 *LDHA*、Δ*dld1*、Δ*jen1*、Δ*pdc1*、Δ*adh1*、Δ*gpd1*、Δ*gpd2*	112.00	2016[47]
	苹果酸	酸味剂,在生物体内的有效循环与代谢起着调节作用	过表达丙酮酸羧化酶(PYC)、苹果酸脱氢酶(MDH)以及羧酸转运蛋白	59.00	2008[48]
	富马酸		分别过表达来自米根酶的 *RoPYC*, *RoMDH*, *RoFUM1*	5.64	2013[49]
	木糖酸		表达 D-木内酯内酯酶 XylC	43.00	2012[50]
	柠檬酸		棕榈酒样品中分离出酿酒酵母菌株	31.20	2013[51]
脂肪酸	C16-C18	提供和储存能量,促进儿童生长和智力发育,降血脂、防治冠心病等治疗作用	异源表达 *RtME*、*MDH3*、*CTP1*、*MmACL*、*RtFAS*、*ACC1*、*TESA*、Δ*pox1*、Δ*faa1,4*、Δ*hfd1*	10.40	2016[52]
	C14,C16,C18		Δ*ScfabF*	0.85	2015[53]
	C7-C10		β-氧化逆反应, *SeACS*	8.30×10^{-3}	2014[54]



GlcK：葡萄糖激酶；PgcA：葡萄糖磷酸变位酶；GtaB：UTP–葡萄糖–1–磷酸尿苷酰转移酶；GalE：UDP–葡萄糖–4–异构酶；Pgi：葡萄糖–6–磷酸异构酶；ManA：甘露糖–6–磷酸异构酶；ManB：磷酸甘露糖变异酶；ManC：甘露糖–1–磷酸鸟苷酸转移酶；Gmd：GDP–甘露糖–4，6–脱水酶；WcaG：GDP–*L*–岩藻糖合酶；FuT：岩藻糖基转移酶；Fkp：岩藻糖激酶；Glt：鸟苷酸转移酶；GlmS：谷氨酰胺–果糖–6–磷酸氨基转移酶；GlmM：磷酸氨基葡萄糖变位酶；GlmU：双功能 UDP–N–乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶；LgtA：β–1，3–N–乙酰氨基葡萄糖氨基转移酶；LgtB：β–1，4–半乳糖基转移酶；LacY：乳糖渗透酶；GMP：单磷酸鸟苷；GDP：鸟苷二磷酸；GTP：鸟苷三磷酸；UDP：二磷酸尿苷；UTP：三磷酸尿苷；LNT：乳酰–N–四糖；LNnT：乳酰–N–新四糖。

图 1　酿酒酵母合成 HMOs 代谢途径

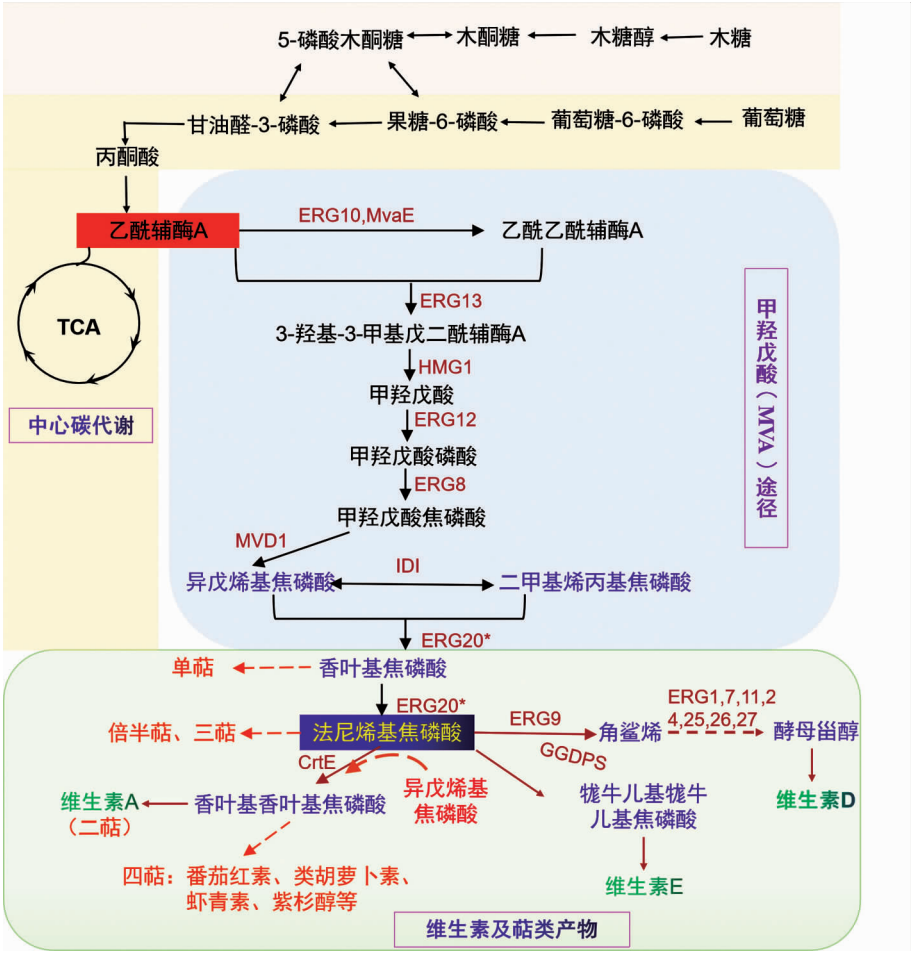
Fig. 1　HMOs' metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*

代谢路径：以中心代谢物乙酰辅酶 A 为前体，经甲羟戊酸（mevalonate，MVA）途径，转化成为维生素合成的关键前体法尼烯基焦磷酸，其在不同酶的催化下形成维生素和萜类。

视黄醇是一种脂溶性维生素 A。Lee 等人通过在一株能够生产类维生素 A 混合物（视黄醇、视黄酸和视黄醛）的酿酒酵母基因组中异源整合视黄醇脱氢酶基因 *RDH12*，同时引入乳酸乳球菌的 *noxE* 基因（编码 NADH 氧化酶）来缓解氧化还原失衡，最终使视黄醇的产量提升了 30%，达到 97.09 mg/L[57]。维生素 E 包括生育酚和生育三烯醇两类，Jiao 等通过敲除低氧基因的转录抑制因子 *MOT3* 和血红素依赖的缺氧抑制基因 *ROX1*，优化了生育三烯醇的合成途径[35]；其次，过表达 GGPP 合酶和 NADH 激酶，加强了前体和 NADPH 的供应；随后通过过表达内源 PDR 转运蛋白 Pdr11p 和 Yol075cp，增强了生育三烯醇的外排；最后以橄榄油作为萃取剂，通过双相发酵获得 82.68 mg/L 的生育三烯醇。

4.3　酿酒酵母合成萜类

萜类化合物在食品添加剂、药物、香料等领域具有巨大的经济价值和良好的市场前景。酿酒酵母作为细胞工厂，在萜类化合物的合成中具有较大优势，除自身拥有良好的鲁棒性外，酿酒酵母相比于大肠杆菌等原核生物，具有与植物一致的 MVA 途径，不仅为萜类产物提供前体，且拥有内质网、高尔基体和过氧化物酶体等合成萜类化合物所需的关键细胞器和翻译后修饰系统，能够表达大多数萜类合成所必需的 cytochrome P450 酶[58]。MVA 途径除了可以合成维生素外，也是萜类化合物合成的重要合成途径，见图 2。根据所含 C5 基本结构单元的数量，萜类化合物可分为半萜（C5）、单萜（C10）、倍半萜（C15）和二萜（C20）等。绝大多数萜类化合物的烯烃骨架由特定的萜类合成酶催化：异戊烯基焦磷酸（isopentenyl diphosphate，IPP）、二甲基烯丙基焦磷酸（dimethylallyl diphosphate，DMAPP）、香叶基焦磷酸（geraniyl pyrophosphate，GPP）、法尼烯基焦磷酸（farnesyl pyrophosphate，FPP）或香叶基香叶基焦磷酸（geranylgeranyl pyrophosphate，GGPP）等产生，这类酶的结构高度保守且多数不存在于酵母中，因此



橙色线条表示外源途径的引入，绿色字体表示维生素类，橙色字体表示天然产物萜类。

ERG10：乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶；MvaE：乙酰乙酰辅酶 A 连接酶；ERG13：3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA 合酶；HMG1：3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶；ERG12：甲羟戊酸激酶；ERG8：磷酸甲羟戊酸激酶；MVD1：焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶；IDI：异戊烯基焦磷酸异构酶；ERG20：法尼基焦磷酸合酶（* 可异源增强表达）；ERG9：角鲨烯合酶；ERG1：角鲨烯环氧酶；ERG7：羊毛甾醇合酶；ERG11：甾醇 14-α-去甲基化酶；ERG24：C-14 甾醇还原酶；ERG25：C-4 固醇甲基氧化酶；ERG26：C-3 甾醇脱氢酶；ERG27：C3-酮基还原酶；CrtE：香叶基香叶基焦磷酸合成酶；GGDPS：牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶。

图 2 酿酒酵母生物合成维生素和萜类代谢路径

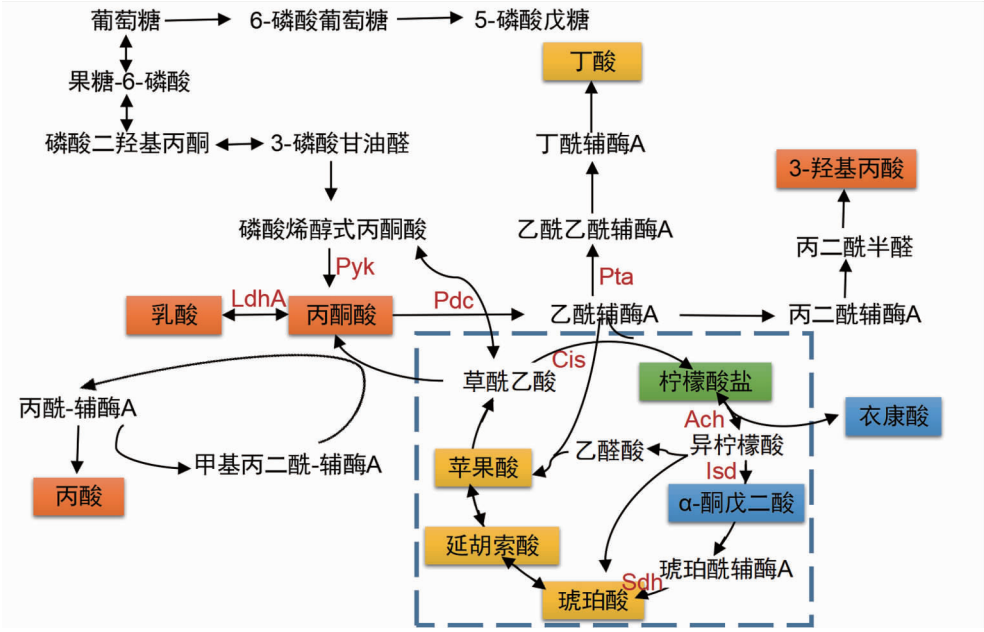
Fig. 2 Biosynthetic pathway of vitamins and terpenoids in *Saccharomyces cerevisiae*

需要在酿酒酵母中异源表达植物或者其他生物来源的萜类合成酶。

酿酒酵母自身的角鲨烯合酶（ERG9）可催化 FPP 合成三萜角鲨烯。Li 等[42]通过逐步过表达角鲨烯合成途径的相关酶类，加强了乙酰辅酶 A 到角鲨烯的转化。随后，引入了来源于 *Silicibacter pomeroyi* 的 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶（NADH-HMGR），过表达 *Dickeya zeae* 来源的天然乙醇脱氢酶 ADH2 和乙醛脱氢酶 ADA，增强了细胞利用乙醇合成角鲨烯的能力。最终，通过补料分批发酵，酿酒酵母菌株 SE7 的角鲨烯产量达到了 9 472 mg/L。Yu 等[44]通过半理性设计和定点突变，优化了 α-香树脂醇合酶的催化活性，随后通过过表达二酰基甘油酰基转移酶 DGA1（参与三酰基甘油的生物合成），扩大了工程酵母对 α-香树脂醇合成的储存量，使 α-香树脂醇的产量达到 107.9 mg/L。

4.4 酿酒酵母合成短链有机酸

有机酸作为天然代谢物，在食品、制药、生物基材料等行业有着广泛的应用。特别是短链有机酸，它们大多数是细胞的中间代谢物，也是一些商业化学品的替代品，可以通过微生物发酵生产，见图 3。酿酒酵母生长的最适 pH 在 4.5~5.5，在一定程度上



蓝色虚线框表示 TCA 循环;橙色框表示 C3 化合物:丙酮酸、乳酸和 3-羟基丙酸;黄色框表示 C4 化合物:苹果酸、延胡索酸、琥珀酸和丁酸;蓝色框表示 C5 化合物:衣康酸和 α-酮戊二酸;绿色框表示 C6 化合物:柠檬酸;Pyk:丙酮酸激酶;Pdc:丙酮酸脱羧酶;LdhA:乳酸脱氢酶;Pta:磷酸乙酰转移酶;Cis:柠檬酸合成酶;Ach:乌头酸水合酶;Isd:异柠檬酸脱氢酶;Sdh:琥珀酸脱氢酶。

图 3　酿酒酵母短链有机酸合成途径

Fig. 3　Synthetic pathway of short chain organic acid in *Saccharomyces cerevisiae*

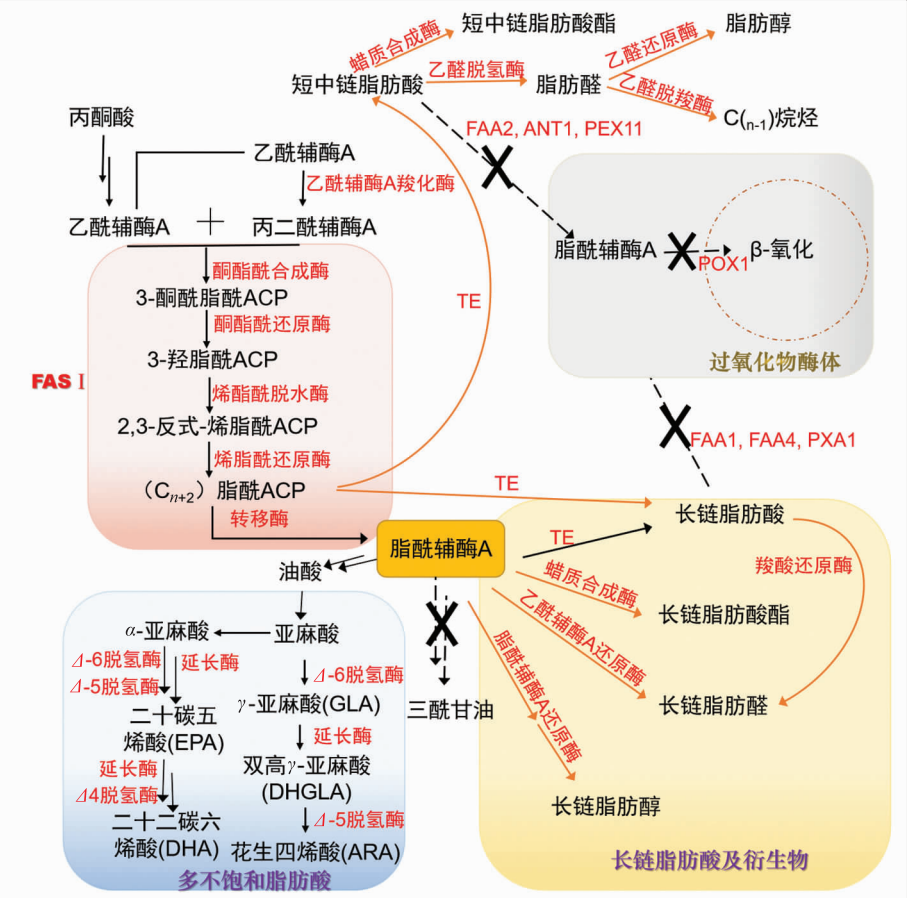
可抵抗有机酸发酵过程中发酵液逐渐酸化对细胞生长的抑制作用,从而减少中和剂的添加量。同时,当 pH 低于 3.0 时,酵母能够生长,而许多细菌不能生长,这也缓减了杂菌污染问题。因此,酿酒酵母是合成有机酸的理想宿主之一。

苹果酸是人体循环系统的重要中间产物,易被人体吸收,因此可作为食品添加剂和功能性食品应用于食品、化妆品、医疗和保健品等领域。Zelle 等[48]通过在酿酒酵母中过表达丙酮酸羧化酶 PYC、苹果酸脱氢酶 MDH 以及羧酸转运蛋白基因 SpMAE1,使苹果酸的产量达到 59 g/L,产率为 0.42 g/g。富马酸是一种常用的酸度调节剂、酸化剂、抗氧化剂和香料,其作为食品酸味剂时具有显著的抑菌和防腐功效。Xu 等[49]以胞内丙酮酸积累的酿酒酵母菌株 FMME003 作为出发菌株,分别过表达来源于米根霉 *Rhizopus oryzae* 的丙酮酸羧化酶 RoPYC、苹果酸脱氢酶 RoMDH 和延胡索酸酶 RoFUM1,使富马酸的产量达到 5.64 g/L。柠檬酸是一种重要的多功能有机酸,在工业、食品业和化妆品业等领域具有多种用途[59]。Victor 等[51]从变质的棕榈酒样品中分离出一株酿酒酵母,优化了该菌株在啤酒废谷粒中深层发酵生产柠檬酸的工艺,使柠檬酸的产量达到 31.2 g/L。

4.5　酿酒酵母合成脂肪酸

脂肪酸是中性脂肪、磷脂和糖脂的主要成分,在氧气充足的情况下可被脂酰辅酶 A 合酶和脂肪酸氧化酶氧化分解为 H_2O 和 CO_2,并释放大量能量,因此,脂肪酸是机体的主要能量来源之一。必需脂肪酸(Essential Fatty Acid,EFA)为人体健康和生命所必需,但机体自身不能合成,必须依赖食物供应,分为 ω-3 族的 α-亚麻酸(C18:3)和 ω-6 族的亚油酸(C18:2),属于多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids,PUFA)[60-61]。PUFA 具有促进身体、智力和视力发育的重要生理功能,尤其对婴幼儿的发育至关重要[62]。在酿酒酵母中,乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 在脂肪酸合酶 Ⅰ(fatty acid synthase Ⅰ,FAS Ⅰ)的催化下,合成能够以脂酰辅酶 A 作为前体的一系列脂肪酸及其衍生物,见图 4。

在脂肪酸的合成途径中,乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC1 负责催化乙酰辅酶 A 合成丙二酰辅酶 A,是脂肪酸在酿酒酵母中合成的限速步骤。过表达 ACC1 提高其表达量和突变 ACC1 提高其催化效率



黑色实线表示酿酒酵母自身代谢通路,橙色实线表示异源代谢通路,黑色虚线表示抑制的代谢通路。

ACP:酰基载体蛋白;TE:硫脂酶;FAA1/2/4:脂酰辅酶 A 合成酶;POX1:脂酰辅酶 A 氧化酶1;ANT1:腺嘌呤核苷酸转运蛋白 1;PEX11:过氧化物酶体膜蛋白 11;PXA1:过氧化物酶体 ABC 转运蛋白;FAS Ⅰ:Ⅰ型脂肪酸合酶。

图 4　酿酒酵母脂肪酸代谢合成途径

Fig. 4　Synthetic pathway of short chain fatty acid in *Saccharomyces cerevisiae*

是解除该限速步骤的常用方法。脂肪酸合酶 Ⅰ(fatty acid synthase Ⅰ,FAS Ⅰ)是一个复杂的复合酶系,包含了 6 个酶活性中心(酮脂酰合成酶、酮脂酰还原酶、烯脂酰脱水酶、烯脂酰还原酶、乙酰基转移酶和丙二酰/棕榈酰转移酶)。由于酵母中的 FAS Ⅰ结构复杂、不易进行编辑,异源表达其他物种的 FAS 可提升脂肪酸合酶的催化活性,有利于脂肪酸的合成。Leber 等利用人来源的Ⅰ型脂肪酸合酶 hFAS 合成短链羧酸(C6~C10)构建了 CpFatB1ΔTE 连锁突变体,最终,SCFA 的总产量比天然酵母提高了 52 倍(68 mg/L)[63]。此外,对 FAS Ⅰ的结构进行蛋白质工程改造,调整其对底物的偏好性,可以获得不同碳链长度的脂肪酸[64]。最后,敲除 β-氧化途径及竞争途径中的关键酶也能够促进脂肪酸的合成。通过敲除在 β-氧化过程中起关键作用的酶 POX1、FAA2 和 PXA1,可以显著提高长链脂肪酸的产量,而敲除酰基载体蛋白基因 FAA2、腺嘌呤核苷酸转运蛋白基因 ANT1 和过氧化物酶体膜蛋白基因 PEX11 则可以明显提高中链脂肪酸的产量[65]。

5　挑战与展望

随着的国民经济的发展和人民生活水平的提高以及能源和环境的紧迫需求,以微生物代谢生产功能营养品的生物技术体系正在迅猛发展。近年来,基于对酿酒酵母遗传基因背景的深入了解和合成生物学工具的开发,酿酒酵母已经作为底盘细胞用于多种功能营养品的工业生产。例如,Amyris 公司(2016 年)利用酿酒酵母生产萜类的前体物——法尼烯,生产规模已达到 200 m^3 发酵体系[66]。传统的代谢调控策略虽然在酿酒酵母中实现了一系列

高附加值功能营养品的从头合成，但是酿酒酵母中固有的代谢调控网络总是会将有限的资源流向细胞生长，导致异源合成途径的代谢通量较低，相应产物的产量普遍不高。传统代谢调控策略只能实现局部调控细胞的代谢网络，容易导致代谢失衡，从而降低产物的合成效率。如何在现有研究技术方法上进一步平衡生长和生产的关系以及扩展合成目标范围是目前面临的挑战和未来研究的重要方向。

随着组学技术和计算机学的发展，基因组、转录组、蛋白质组和代谢组学分析结合计算机代谢模型预测，可为代谢网络关键改造靶点的鉴定和系统性优化提供理论指导。同时，以 CRISPR 技术为主的一系列基因组编辑技术的开发和利用可以实现对酿酒酵母基因组的高效改造和精准调控[61]。另外，高通量筛选平台[43]和微流体液滴系统[2]的建立极大提高了目标菌株的筛选效率。这些新型技术的兴起，为酿酒酵母的代谢工程改造拓展了新方向。将代谢工程与合成生物学、系统生物学、信息生物学、基因编辑技术及计算机学相结合，为酿酒酵母中其他功能营养品的高效合成提供新技术与新思路。

参考文献：

[1] MATURA S，PRVULOVIC D，MOHADJER N，et al. Association of dietary fat composition with cognitive performance and brain morphology in cognitively healthy individuals[J]. **Acta Neuropsychiatrica**，2021，33(3)：134-140.

[2] MAIR P，GIELEN F，HOLLFELDER F. Exploring sequence space in search of functional enzymes using microfluidic droplets[J]. **Current Opinion in Chemical Biology**，2017，37：137-144.

[3] SICILIANO R A，REALE A，MAZZEO M F，et al. Paraprobiotics：a new perspective for functional foods and nutraceuticals[J]. **Nutrients**，2021，13(4)：1225.

[4] CHEN M T，WEISS R. Artificial cell-cell communication in yeast Saccharomyces cerevisiae using signaling elements from *Arabidopsis thaliana*[J]. **Nature Biotechnology**，2005，23(12)：1551-1555.

[5] LAIRON-PERIS M，ROUTLEDGE S J，LINNEY J A，et al. Lipid composition analysis reveals mechanisms of ethanol tolerance in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2021，87(12)：e44021.

[6] CURRAN K A，CROOK NC，KARIM A S，et al. Design of synthetic yeast promoters via tuning of nucleosome architecture[J]. **Nature Communications**，2014，5：4002.

[7] REDDEN H，ALPER H S. The development and characterization of synthetic minimal yeast promoters[J]. **Nature Communications**，2015，6：7810.

[8] YAMANISHI M，ITO Y，KINTAKA R，et al. A genome-wide activity assessment of terminator regions in *Saccharomyces cerevisiae* provides a "terminatome"[J]. **Acs Synthetic Biology**，2013，2(6)：337-347.

[9] CURRAN K A，MORSE N J，MARKHAM K A，et al. Short synthetic terminators for improved heterologous gene expression in yeast[J]. **Acs Synthetic Biology**，2015，4(7)：824-832.

[10] HEUX S，CACHON R，DEQUIN S. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*：expression of a H_2O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism[J]. **Metabolic Engineering**，2006，8(4)：303-314.

[11] QUINN K，JAMES A，MURPHY M，et al. Identification of pathways for the uptake of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **The FASEB Journal**，2015，29(S1)：715-744.

[12] WANG M，YU C，ZHAO H. Directed evolution of xylose specific transporters to facilitate glucose-xylose co-utilization [J]. **Biotechnology and Bioengineering**，2016，113(3)：484-491.

[13] LIAN J，LI Y，HAMEDIRAD M，et al. Directed evolution of a cellodextrin transporter for improved biofuel production under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**，2014，111(8)：1521-1531.

[14] PACHECO A，TALAIA G，SA-PESSOA J，et al. Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by expression of the monocarboxylate transporters Jen1 and Ady2[J]. **FEMS Yeast Research**，2012，12(3)：375-381.

[15] ZELLE R M，DE HULSTER E，VAN WINDEN W A，et al. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*：engineering of pyruvate carboxylation，oxaloacetate reduction，and malate export[J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2008，74(9)：2766-2777.

[16] HWANG H J，JIN W K，JU S Y，et al. Application of an oxygen-inducible nar promoter system in metabolic engineering for production of biochemicals in *Escherichia coli*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**，2017，114(2)：468-773.

[17] ZHOU P，XIE W，YAO Z，et al. Development of a temperature-responsive yeast cell factory using engineered Gal4 as a protein

switch[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2018,115(5):1321-1330.

[18] ZHAO E M,ZHANG Y,MEHL J,et al. Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production[J]. **Nature**,2018,555(7698):683-687.

[19] YANG Y J,SINGH R P,LAN X,et al. Genome editing in model strain myxococcus xanthus DK1622 by a site-specific cre/loxp recombination system[J]. **Biomolecules**,2018,8(4):137-145.

[20] LI T,HUANG S,ZHAO X,et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes[J]. **Nucleic Acids Research**,2011,39(14):6315-6325.

[21] JAKOCIUNAS T,BONDE I,HERRGARD M,et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Metabolic Engineering**,2015,28:213-222.

[22] REIDER A A,D'ESPAUX L,WEHRS M,et al. A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Nucleic Acids Research**,2017,45(1):496-508.

[23] HOU J,JIAO C,PENG B,SHEN Y,et al. Mutation of a regulator Ask10p improves xylose isomerase activity through up-regulation of molecular chaperones in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Metabolic Engineering**,2016,38:241-250.

[24] HUANG M,BAO J,HALLSTROM B M,et al. Efficient protein production by yeast requires global tuning of metabolism[J]. **Nature Communications**,2017,8(1):1131.

[25] CHEN L,LEE J,ZHANG J,et al. Comparative proteomic analysis of engineered *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced free fatty acid accumulation[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2016,100(3):1407-1420.

[26] MING M,WANG X,LIAN L,et al. Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol stress using gas chromatography-mass spectrometry[J]. **Molecular Omics**,2019,15(3):216-221.

[27] THIELE I,PALSSON B O. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction[J]. **Nature Protocols**,2010,5(1):93-121.

[28] ASADOLLAHI MA,MAURY J,PATIL KR,et al. Enhancing sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* through in silico driven metabolic engineering[J]. **Metabolic Engineering**,2009,11(6):328-334.

[29] YE C,XU N,GAO C,et al. Comprehensive understanding of *Saccharomyces cerevisiae* phenotypes with whole-cell model WM_S288C[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2020,117(5):1562-1574.

[30] YU S,LIU J J,YUN E J,et al. Production of a human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Microbial Cell Factories**,2018,17(1):101-111.

[31] LEE J W,KWAK S,LIU J J,et al. Enhanced 2'-Fucosyllactose production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* using xylose as a co-substrate[J]. **Metabolic Engineering**,2020,62:322-329.

[32] JIN Y,YU S,LIU J J,et al. Production of neoagarooligosaccharides by probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. boulardii engineered as a microbial cell factory[J]. **Microbial Cell Factories**,2021,20(1):160-169.

[33] ZHOU X,HE J,WANG L,et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to improve glucan biosynthesis[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**,2019,29(5):758-764.

[34] QU L,XIU X,SUN G,et al. Engineered yeast for efficient de novo synthesis of 7-dehydrocholesterol[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2022,119(5):1278-1289.

[35] JIAO X,SHEN B,LI M,et al. Secretory production of tocotrienols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Acs Synthetic Biology**,2022,11(2):788-799.

[36] 毕彦慧. 合成维生素 C 酿酒酵母菌株的构建及优化[D]. 天津:天津大学,2019.

[37] ZHANG X,LIU X,MENG Y,et al. Combinatorial engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improving limonene production [J]. **Biochemical Engineering Journal**,2021,176:108155.

[38] 李荣生,王冬,石玉松,等. 动态调控酿酒酵母 ERG20 基因表达提高单萜化合物的生产[J]. 中国中药杂志,2022,47(4):897-905.

[39] PADDON C J,WESTFALL P J,PITERA D J,et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. **Nature**,2013,496(7446):528-532.

[40] TRIKKA F A,NIKOLAIDIS A,ATHANASAKOGLOU A,,et al. Iterative carotenogenic screens identify combinations of yeast gene deletions that enhance sclareol production[J]. **Microbial Cell Factories**,2015,14:60-66.

[41] LIANG S,KWAK S,JIN Y S. Vitamin a production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* from xylose via two-phase in situ extraction[J]. **ACS Synthetic Biology**,2019,8(9):2131-2140.

[42] LI T,LIU GS,ZHOU W,et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to overproduce squalene[J]. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry，2020，68(7)：2132-2138.
[43] DORR M，FIBINGER M P，LAST D，et al. Fully automatized high-throughput enzyme library screening using a robotic platform [J]. **Biotechnology and Bioengineering**，2016，113(7)：1421-1432.
[44] YU Y，RASOOL A，LIU H，et al. 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.
[45] LIU H，FAN J，WANG C，et al. Enhanced beta-amyrin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by coupling an optimal acetyl-coa supply pathway[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2019，67(13)：3723-3732.
[46] JIANG G Z，YANG Z M，WANG Y，et al. Enhanced astaxanthin production in yeast via combined mutagenesis and evolution[J]. **Biochemical Engineering Journal**，2020，156(1)：107519.
[47] BAEK S H，KWON E Y，KIM Y H，et al. Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of *D*-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2016，100(6)：2737-2748.
[48] ZELLE R M，HULSTER E D，WINDEN W，et al. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*：engineering of pyruvate carboxylation，oxaloacetate reduction，and malate export [J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2008，74 (9)：2766-2777.
[49] XU G，CHEN X，LIU L，et al. Fumaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneous use of oxidative and reductive routes[J]. **Bioresource Technology**，2013，148：91-96.
[50] TOIVARI M，NYGARD Y，KUMPULA E P，et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate[J]. **Metabolic Engineering**，2012，14(4)：427-436.
[51] VICTOR A，TITILAYO F O. Citric acid production from brewers spent grain by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **International Journal of Research in BioSciences**，2013，2(1)：30-36.
[52] ZHOU Y J，BUIJS N A，ZHU Z，et al. Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories [J]. **Nature Communications**，2016，7：11709.
[53] YEONTAE J，SANGWOO K，SUNHEE L，et al. Effect of heterologous expression of genes involved in the elongation cycle of fatty acid synthesis on fatty acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biotechnology & Bioprocess Engineering**，2015，20 (1)：1-9.
[54] LIAN J，ZHAO H. Reversal of the β-oxidation cycle in Saccharomyces cerevisiae for production of fuels and chemicals[J]. **ACS Synthetic Biology**，2015，4(3)：332-341.
[55] LIU JJ，KWAK S，PATHANIBUL P，et al. Biosynthesis of a functional human milk oligosaccharide，2'-fucosyllactose，and L-fucose using engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **ACS Synthetic Biology**，2018，7(11)：2529-2536.
[56] CAMARENA V，WANG G. The epigenetic role of vitamin C in health and disease[J]. **Cellular and Molecular Life Sciences**，2016，73(8)：1645-1658.
[57] LEE Y G，KIM C，SUN L，et al. Selective production of retinol by engineered *Saccharomyces cerevisiae* through the expression of retinol dehydrogenase[J]. **Biotechnology and Bioengineering**，2022，119(2)：399-410.
[58] JAE-EUNG K，IN-SEUNG J，SO-HEE S，et al. Tailoring the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum for functional assembly of terpene synthesis pathway[J]. **Metabolic Engineering**，2019，56：50-59.
[59] YIN X，LI J，SHIN H D，et al. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms：Advances and prospects[J]. **Biotechnology Advances**，2015，33(6)：830-841.
[60] DAS U N. Essential fatty acids and their metabolites in the pathobiology of inflammation and its resolution[J]. **Biomolecules**，2021，11(12)：3390.
[61] 李宏彪，梁晓琳，周景文. 酿酒酵母基因编辑技术研究进展[J]. 生物工程学报，2021，37(3)：950-965.
[62] LEHNER A，STAUB K，ALDAKAK L，et al. Impact of omega-3 fatty acid DHA and EPA supplementation in pregnant or breast-feeding women on cognitive performance of children：systematic review and meta-analysis[J]. **Nutrition Reviews**，2020，79(5)：585-598.
[63] LEBER C，DA S N A. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of short chain fatty acids[J]. **Biotechnology and Bioengineering**，2014，111(2)：347-358.
[64] GAJEWSKI J，PAVLOVIC R，FISCHER M，et al. Engineering fungal de novo fatty acid synthesis for short chain fatty acid production[J]. **Nature Communications**，2017，8：146-150.
[65] CHRISTOPHER L，BRIAN P，RUBEN F，et al. Overproduction and secretion of free fatty acids through disrupted neutral lipid recycle in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Metabolic Engineering**，2015，28：54-62.
[66] 张云丰，何丹，卢欢等. 代谢工程改造酿酒酵母底盘细胞[J]. 科学通报，2021，66(3)：310-318.