

· 综 述 ·

酿酒酵母中萜类化合物的生物合成与代谢调控研究进展

邢敏钰^{1,2}, 冉淦侨¹, 谭丹^{2*}

1 陕西省生物农业研究所, 陕西 西安 710043

2 西安交通大学生命科学与技术学院, 陕西 西安 710049

邢敏钰, 冉淦侨, 谭丹. 酿酒酵母中萜类化合物的生物合成与代谢调控研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1661-1693.

XING Minyu, RAN Ganqiao, TAN Dan. Advances in the biosynthesis and metabolic regulation of terpenoids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1661-1693.

摘 要: 萜类化合物是含量最丰富的一类天然化合物, 因其种类繁多、生物活性多样, 被广泛应用于食品、医药、化工以及新型燃料等领域。萜类化合物的开发利用价值极高, 但依靠植物提取和化学合成等传统生产方式很难满足目前的市场需求。随着合成生物学和代谢工程的发展, 构建高效的微生物细胞工厂, 特别是以酵母为宿主的细胞工厂, 为萜类化合物的大规模生产提供了可能。近年来, 研究人员已成功构建出多种萜类化合物的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)工程菌株, 并通过合成生物学和代谢调控等方法有效提高了目标产物的产量。本文总结了近几年利用 *S. cerevisiae* 底盘细胞生物合成萜类化合物的具体实例, 阐述了对 *S. cerevisiae* 生产萜类化合物的调控策略: 包括代谢途径构建与优化、关键酶的挖掘与改造、辅因子再生工程、细胞区室化工程、细胞外排工程, 以及细胞耐受性改造等, 为进一步利用 *S. cerevisiae* 细胞工厂合成更多更高产量的萜类化合物提供参考。

关键词: 酿酒酵母; 萜类化合物; 生物合成; 代谢调控

资助项目: 陕西省科学院科技计划研究项目(2023k-21, 2019K-09); 国家重点研发计划(2018YFA0900200); 陕西省自然科学基金(2020JQ-027); 陕西省生物农业研究所青年基金项目(2024SY03)

This work was supported by the Science and Technology Program of Shaanxi Academy of Sciences (2023k-21, 2019K-09), the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900200), the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2020JQ-027), and the Science and Technology Program for Young Scientists of Bio-agriculture Institute of Shaanxi Province (2024SY03).

*Corresponding author. E-mail: tandan@xjtu.edu.cn

Received: 2023-10-09; Accepted: 2024-03-11; Published online: 2024-03-28

Advances in the biosynthesis and metabolic regulation of terpenoids in *Saccharomyces cerevisiae*

XING Minyu^{1,2}, RAN Ganqiao¹, TAN Dan^{2*}

1 Bio-agriculture Institute of Shaanxi, Xi'an 710043, Shaanxi, China

2 School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China

Abstract: Terpenoids are the one of most abundant natural products. With diverse varieties and biological activities, they are widely used in the food, medicine, chemical industry, and novel fuels. However, the conventional methods such as plant extraction and chemical synthesis cannot meet the current market demand for terpenoids. Efficient microbial cell factories, especially engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains, have been constructed for the industrial production of terpenoids. In recent years, researchers have constructed multiple *S. cerevisiae* strains with increased yield and productivity via approaches of synthetic biology and metabolic engineering. This paper reviews the recent progress in the biosynthesis of terpenoids in *S. cerevisiae* cells and summarizes a variety of metabolic engineering strategies for the production of terpenoids in *S. cerevisiae*. These strategies include the construction and optimization of metabolic pathways, the mining and modification of key enzymes, the regeneration of cofactors, the engineering of cell localization and cell efflux, and the improvement of cell tolerance. Our review will provide information and strategies for the effective biosynthesis of terpenoids in *S. cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; terpenoids; biosynthesis; metabolic regulation

萜类化合物种类繁多, 现已在自然界中发现超过 8 万种不同的结构, 是目前含量最丰富的一类天然化合物。天然存在的萜类化合物被广泛应用于医药、食品、化工等领域^[1-3]。例如, 青蒿素是最有效的抗疟疾药物, 紫杉醇、人参皂苷可作为抗肿瘤药物^[4-5]; 番茄红素和虾青素因其具有抗氧化活性, 被制成功能性食品^[6-10]; 香叶醇、蒎烯、柠檬烯等则是重要的香精香料, 用于日化用品^[11-15]。萜类化合物主要存在于植物和微生物中, 分布广泛, 但含量极低。目前常通过植物提取、化学合成等方法获取。然而植物提取周期长、成本高, 且提取步骤繁琐、收率低^[3,16]。化学合成也存在反应过程复杂、成本高、产率低及环境

污染等问题。因此亟须开发新的生产方法以满足萜类化合物的市场需求。

随着组学技术的发展, 大量萜类化合物的生物合成途径逐渐被解析, 通过合成生物学方法, 即利用微生物细胞工厂异源生产天然萜类化合物已成为研究热点^[17]。微生物繁殖速度快、生长周期短、发酵工艺成熟、安全性高、不受气候影响, 且产物易于提取分离, 生产成本低, 因此开发微生物细胞工厂生产天然萜类化合物是解决萜类物质稀缺的可行方法^[3,17]。近年来, 通过构建合成途径操纵微生物生产萜类化合物的方法已得到广泛应用。其中真核模式生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有遗

传操作便捷、生长所需营养物质价格低廉、培养工艺简单、抗噬菌体感染、具有真核表达修饰系统等优势,是多种天然产物高效合成的细胞工厂。此外,与大肠杆菌(*Escherichia coli*)等细菌相比,*S. cerevisiae*的甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA pathway)具有更加充足的异戊烯焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲基丙基二磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP),可用于萜类前体的合成,而且*S. cerevisiae*具有更完善的翻译后修饰能力,更利于多种萜类物质合成过程中进行氧化反应所需的细胞色素 P450 的表达;与其他真菌相比,*S. cerevisiae*是真核模式生物,遗传背景清楚、遗传操作成熟、更易进行工程化改造^[18]。因此,相较于其他工程菌,*S. cerevisiae*具有更多作为生产萜类化合物的底盘细胞的优势,现已被广泛用于研究代谢改造生产多种萜类物质^[18-20]。

本文重点介绍了利用*S. cerevisiae*细胞生产萜类化合物合成途径的构建与优化,系统阐述

了提高*S. cerevisiae*细胞中萜类化合物合成能力的策略,为*S. cerevisiae*中更多萜类化合物的高效合成提供新思路。

1 萜类化合物异源合成途径的构建

萜类化合物,又称类异戊二烯类化合物,是一类以异戊二烯五碳单元为碳骨架连接起来的碳氢化合物。如图 1 所示,所有的类异戊二烯都衍生自五碳原子(C5)的 IPP 及其异构体 DMAPP,在此基础上添加一个或多个五碳的异戊二烯单元,进而形成不同的类异戊二烯,并根据含有的异戊二烯单元数量可将萜类化合物分为单萜(C10)、倍半萜(C15)、二萜(C20)、三萜(C30)、四萜(C40)、多萜等^[5]。此外,萜类化合物不仅能够以萜烯的形式存在,还可以通过氧化反应、还原反应、环化作用、环破裂、碳重排等方式形成醇、醛、酯、酮、羧酸、甙等多种衍生物^[21]。

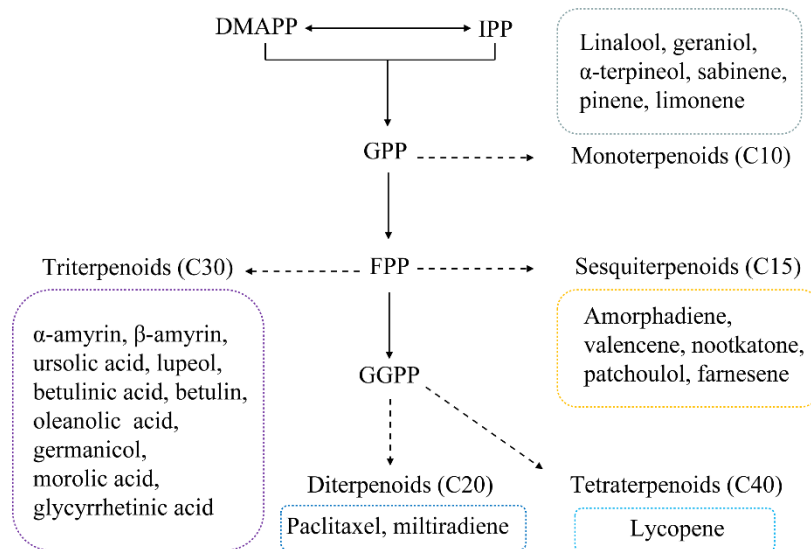


图 1 萜类化合物的形成及分类 IPP: 异戊烯焦磷酸; DMAPP: 二甲基丙基二磷酸; GPP: 牻牛儿基焦磷酸; FPP: 法尼基焦磷酸; GGPP: 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸

Figure 1 Formation and classification of terpenoids. IPP: Isopentenyl diphosphate; DMAPP: Dimethylallyl pyrophosphate; GPP: Geranyl pyrophosphate; FPP: Farnesyl pyrophosphate; GGPP: Geranylgeranyl pyrophosphate.

萜类化合物的生物合成途径较长, 从乙酰辅酶 A 出发, 经过 MVA 途径的 7 个反应可转化为 IPP 和 DMAPP^[22-23](图 2)。随后 IPP 和 DMAPP 进入麦角甾醇合成途径合成牻牛儿基焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP)、法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)、牻牛儿基牻牛

儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)、2,3-氧化鲨烯等直接前体物质, GPP、FPP、GGPP、2,3-氧化鲨烯在异源的萜类合成酶作用下生成一系列的萜类化合物。但并不是所有的三萜化合物的合成都需要经过麦角甾醇合成途径。2022 年, Tao 等^[24]首次发现丝

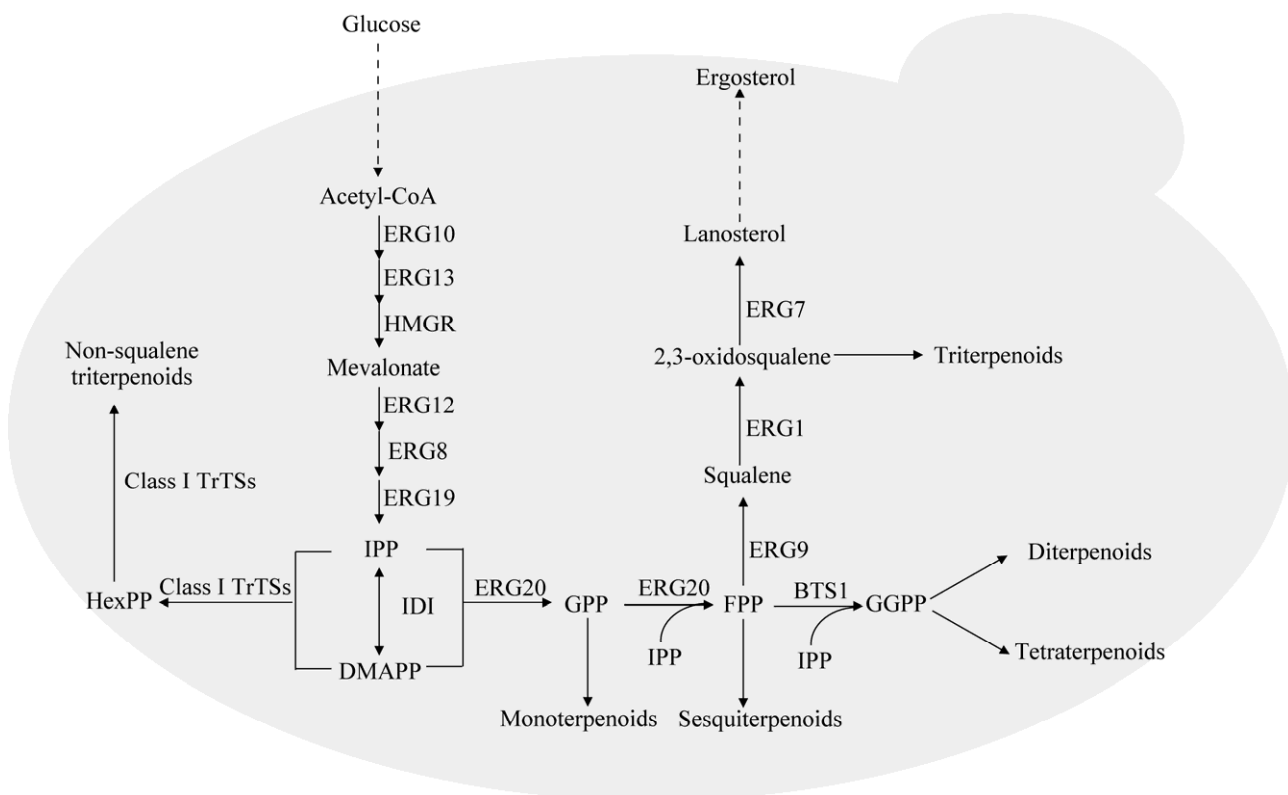


图 2 萜类化合物的生物合成途径^[5,19,24-26] IPP: 异戊烯焦磷酸; DMAPP: 二甲基丙烯基二磷酸; GPP: 牻牛儿基焦磷酸; FPP: 法尼基焦磷酸; GGPP: 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸; HexPP: 六聚异戊烯基焦磷酸; ERG10: 乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶; ERG13: HMG-CoA 合成酶; HMGR: HMG-CoA 还原酶; ERG12: 甲羟戊酸激酶; ERG8: 甲羟戊酸-5-磷酸激酶; ERG19: 甲羟戊酸-5-焦磷酸脱羧酶; IDI: 异戊烯焦磷酸异构酶; ERG20: FPP 合成酶; BTS1: 酵母内源性 GGPP 合成酶; ERG9: 角鲨烯合酶; ERG1: 鲨烯环氧化酶; ERG7: 羊毛固醇合酶; Class I TrTSs: I 型三萜合酶

Figure 2 The biosynthetic pathway of terpenoids^[5,19,24-26]. IPP: Isopentenyl diphosphate; DMAPP: Dimethylallyl pyrophosphate; GPP: Geranyl pyrophosphate; FPP: Farnesyl pyrophosphate; GGPP: Geranylgeranyl pyrophosphate; HexPP: Hexaprenyl diphosphate; ERG10: Acetoacetyl-CoA thiolase; ERG13: HMG-CoA synthase; HMGR: HMG-CoA reductase; ERG12: Mevalonate kinase; ERG8: Phosphomevalonate kinase; ERG19: Mevalonate diphosphate decarboxylase; IDI: Isopentenyl diphosphate isomerase; ERG20: FPP synthase; BTS1: Endogenous yeast GGPP synthases; ERG9: Squalene synthase; ERG1: Squalene epoxidase; ERG7: Lanosterol synthase; Class I TrTSs: Class I triterpene synthases.

状真菌来源的 I 型萜类合成酶的异戊烯基转移酶结构域能够直接催化 IPP 和 DMAPP 缩合生成六聚异戊烯基焦磷酸(hexaprenyl diphosphate, HexPP), 随后其萜类合酶结构域再催化 HexPP 环化生成非角鲨烯来源的三萜骨架。但目前关于

这种非角鲨烯来源三萜骨架合成方式的研究并不多, 因此本文主要探讨经麦角甾醇途径萜类化合物的生物合成和代谢调控, 并总结了近年来 *S. cerevisiae* 作为宿主菌合成萜类化合物的研究进展(表 1)。

表 1 酿酒酵母细胞中异源生产萜类化合物的实例及使用的工程化改造策略

Table 1 Examples of terpenoid production in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*

Classification	Researchers	Compound	Applications	Strategies	Yield	References
Monoterpenes	Zhang et al.	Linalool	Flavor and fragrance industries	(1) Mitochondrial engineering (2) Introduction of <i>LIS</i> gene from <i>Cinnamomum osmophloeum</i> (3) Overexpression of <i>LIS</i> and <i>erg20</i> ^{F96W-N127W} (4) Batch fermentation	23.45 mg/L	[27]
	Guo et al.	Geraniol	Flavor and fragrance industries	(1) Combined expression of <i>GES</i> from <i>Ocimum basilicum</i> and <i>IPK</i> from <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> (2) Overexpression of <i>idi1</i> and <i>erg20</i> ^{WW} (3) Fusion of <i>IPK</i> and <i>IDI1</i> (4) Optimization of culture medium	180.90 g/L	[28]
	Zhang et al.	α -terpineol	Cosmetic and pharmaceutical industries	(1) Introduction of the truncated α -terpineol synthase (tVvTS) from <i>Vitis vinifera</i> (2) Mutation of the native FPP synthase (ERG20) (3) Overexpression of <i>tHMG1</i> , <i>idi1</i> , <i>erg20</i> ^{F96W-N127W} and <i>erg9</i> (4) Fusion of <i>ERG20</i> ^{WW} and tVvTPS (5) Fed-batch fermentation	21.88 mg/L	[29]
	Jia et al.	Sabinene	Aviation fuel	(1) Introduction of N-truncated sabinene synthase (t34SabS1) from <i>Salvia pomifera</i> (2) Overexpression of <i>tHMG1</i> , <i>idi1</i> and <i>AIM25</i> (3) t34SabS1 carrying <i>ERG20</i> ^{WW} targeted to cytosol and mitochondria	154.90 mg/L	[30]
	Ren et al.	Pinene	Fuel	(1) Introduction of <i>Pt1</i> from <i>Pinus taeda</i> (2) Overexpression of <i>tHMG1</i> , <i>idi1</i> and <i>erg20</i> ^{WW} (3) Knock-out of <i>YPL062W</i> (4) Fusion of <i>ERG20</i> ^{WW} and tPt1 (5) Coexpressed of <i>Sil1</i> and the fusion gene	10.20 mg/L	[31]
	Kong et al.	Limonene	Food, agriculture, cosmetics, materials, and energy	(1) Introduction of truncated limonene synthase from <i>Mentha</i> (2) Regulating <i>tLimS</i> by inducible promoter <i>P_{GALI}</i> and <i>P_{GALI0}</i> (3) Overexpression of <i>tHMG1</i> , <i>idi1</i> and <i>erg10</i> , <i>erg13</i> , <i>erg12</i> , <i>erg8</i> , <i>erg19</i> , <i>erg20</i> ^{F96W-N127W} , <i>ZWF1</i> , <i>GND1</i> , <i>TAL1</i> and <i>TKL1</i> (4) Replacing the promoter of <i>erg20</i> with <i>P_{HXT1}</i> (5) Knock-out of <i>MLS1</i> , <i>CIT2</i> , <i>GDH1</i> and <i>GDH2</i> (6) Compartmentalization engineering of whole-pathway enzymes in mitochondria (7) Two-phase scale-up culture in a 3 L fermenter	2.63 g/L	[32]

(待续)

(续表 1)

Classification	Researcher	Compound	Applications	Strategies	Yield	References
Sesquiterpene	Baadhe et al.	Amorphadiene	Pharmaceuticals industry	(1) Introduction of <i>ADS</i> (amorphadiene synthase gene from <i>Artemisia annua</i> L.) (2) Regulating gene <i>erg9</i> by methionine promoter (P_{MET3}) (3) Fusion of <i>ERG20</i> and <i>ADS</i>	25.02 mg/L	[33]
	Ye et al.	Valencene	Food and chemical industries	(1) Introduction of <i>EgVS</i> (valencene synthase gene from <i>Eryngium glaciale</i>) (2) Site-directed mutagenesis of (+)-valencene synthase (3) Overexpression of <i>tHMG1</i> and <i>EgVS</i> (4) Knockout of <i>GAL80</i> (5) Coupling cell growth and biochemical pathway induction (6) High-cell-density fermentation	16.60 g/L	[34]
	Cha et al.	Nootkatone	Flavor and fragrance industries	(1) Introduction of <i>CnVS</i> . ((+)-valencene synthase gene from <i>Callitropsis nootkatensis</i>), <i>HPO</i> (premnaspirodiene oxygenase from <i>Hyoscyamus muticus</i>), <i>AtCPR</i> (cytochrome P450 reductase from <i>Arabidopsis thaliana</i>) and <i>ADH</i> (alcohol dehydrogenase from <i>Komagataella phaffii</i>) (2) Directed evolution of the <i>HXT7</i> promoter using a high-throughput screening system (3) Tuning the expression levels of <i>HPO</i> and <i>AtCPR</i> (4) Overexpression of <i>tHMG1</i> (5) Knockout of <i>rox1</i> and <i>ICE2</i> (6) Downregulation of <i>erg9</i>	1.02 g/L	[35]
	Guo et al.	Patchoulol	Pharmaceutical and chemical industries	(1) Introduction of <i>PS</i> (patchoulol synthase gene from <i>Pogostemon cablin</i>) and <i>SynSmFPS</i> (FPP synthase gene from <i>Savia miltiorrhiza</i>) (2) Regulating gene <i>PS</i> by strong promoter <i>GAL1</i> (3) Fusion of <i>PS</i> and <i>SynSmFPS</i> (4) Optimization of the copy number of the fusion gene (5) High-density fermentation	2.10 g/L	[36]
	Wang et al.	Farnesene	Fuel	(1) Screening seven AFSs from different plant species based on their α -farnesene synthesis efficacy in the <i>S. cerevisiae</i> (2) Enhancing the metabolic flux toward α -farnesene synthesis (3) Performing site-directed mutagenesis of CsAFS; (4) Introduction of the N-terminal SKIK tag (5) Fed-batch fermentation	10.40 g/L	[37]

(待续)

(续表 1)

Classification	Researcher	Compound	Applications	Strategies	Yield	References
Diterpenoids	Santoyo-Garcia et al.	Taxadiene (the precursor of paclitaxel)	Medicine	<i>In situ</i> solid-liquid extraction	76.00 mg/L	[38]
	Hu et al.	Miltiradiene	Medicine	(1) Downregulation of <i>erg9</i> expression by knocking out the upstream activating sequence (UAS) of its promoter (2) Knock-out of <i>rox1</i> , <i>YPL062w</i> and <i>YJL064w</i> (3) Introduction of <i>Upc2.1</i> (the mutant of <i>Upc2</i>), <i>CfTPS1</i> (class II diterpene synthase gene from <i>Coleus forskohlii</i>) and SmKSL1 (class I diterpene synthase gene from <i>Salvia miltiorrhiza</i>) (4) Fusion of SmKSL1 and CfTPS1 (5) Truncation of the SmKSL1 at the N-terminus (6) Medium optimization and fed-batch fermentation	3.50 g/L	[39]
	Cao et al.	Sclareol	Flavor and fragrance industries	(1) Fusion of class I and class II diterpene synthases Tps and Lpps from <i>Salvia sclarea</i> (2) Overexpression of <i>erg20^{F96C}</i> , <i>tHMG1</i> , <i>SpHMGR</i> , <i>erg10</i> and <i>HMG2^{K6R}</i> (3) Fusion of BTS1 and PaGGPPS (4) Knockout of <i>rox1</i> , <i>dos2</i> , <i>VBA5</i> , <i>YER134C</i> , <i>YNR063W</i> and <i>YGR259C</i> (5) Downregulation of <i>erg9</i> (6) Fed-batch fermentation	11.40 g/L	[40]
	Xu et al.	Rubusoside	Food industry	(1) Introduction of <i>GfKS</i> , <i>FPS^{F112A}</i> , the genes in the P450s module (<i>KO</i> , <i>KAH</i> and <i>CRP1</i>) and rubusoside synthesis module (<i>UGT74G1</i> and <i>UGT85C2</i>) (2) Overexpression of <i>idi1</i> , <i>tHMG1</i> and <i>INO2</i> (3) Optimization of P450s module (4) Efflux pump for rubusoside (5) Knockout of GAL7	1368.60 mg/L	[41-42]
Triterpenoids	Yu et al.	α -amyrin	Medicine, health care, agriculture and industry	(1) Introduction of <i>MdOSCI</i> (oxidosqualene cyclase gene from <i>Malus domestica</i>) and <i>erg1</i> (squalene monooxygenase gene from <i>Candida albicans</i>) (2) Overexpression of <i>erg1</i> , <i>tHMG1</i> , <i>erg20</i> and <i>erg9</i> (3) Downregulation of <i>erg7</i> (4) Employing a high copy plasmid	11.97 mg/L	[43]
	Liu et al.	β -amyrin	Medicine	(1) Introduction of <i>GgbAS</i> (a plant-derived β -amyrin synthase gene) (2) Overexpression of <i>idi1</i> , <i>erg20</i> , <i>erg9</i> , <i>erg1</i> , <i>ALD6</i> , <i>ACS</i> and <i>ADH2</i> (3) Deletion of <i>MLS1</i> and <i>CIT2</i> (4) Introduction of the PK/PTA pathway and A-ALD pathway (5) Fed-batch fermentation	279.00 mg/L	[44]

(待续)

(续表 1)

Classification	Researcher	Compound	Applications	Strategies	Yield	References
	Jin et al.	Ursolic acid	Medicine	(1) Optimizing CYP-CPR pairs (2) Overexpression of <i>tHMG1</i> , <i>idi1</i> , <i>erg20</i> , <i>erg1</i> , <i>ACS</i> , <i>ALD6</i> and <i>ADH2</i> (3) Deletion of <i>MLS1</i> (4) Downregulation of <i>ERG7</i> (5) Harnessing LDs for compartmentalization of the biosynthesis pathway (6) Fed-batch fermentation	1 132.90 mg/L	[45]
	Bröker et al.	Lupeol	Medicine	(1) Introduction of <i>TkLUP</i> (lupeol synthase gene from <i>Taraxacum koksaghyz</i>) (2) Deletion of <i>rox1</i> (3) Overexpression of <i>tHMGR</i> and <i>erg13</i> (4) Downregulation of <i>erg7</i> by <i>P_{CTR3}</i> (5) Addition of Cu^{2+}	a 127-fold increase	[46]
	Gao	Betulinic acid	Medicine	(1) Introduction of <i>OeLUS</i> , <i>LjCPR</i> , and <i>CYP716A15</i> (2) Overexpression of <i>erg20</i> and <i>erg1</i>	26.70 mg/L	[47]
	Gao et al.	Germanicol	Pharmaceutical, food, agricultural, and chemical industries	Introduction of <i>MdOSC</i> (oxidosqualene cyclase gene from <i>Malus domestica</i>)	68.30 mg/L	[48]
	Gao et al.	Morolic acid	Pharmaceutical, food, agricultural, and chemical industries	(1) Introduction of <i>MdOSC</i> (oxidosqualene cyclase gene from <i>Malus domestica</i>), <i>CYP716ALI</i> (the cytochrome P450 oxidase gene from <i>Catharanthus roseus</i>) and <i>JcCPR</i> (the cytochrome P450 reductase gene from <i>Jatropha curcas</i>) (2) Coexpression of the <i>CYP716ALI</i> and <i>AtCPR</i> from <i>Arabidopsis thaliana</i> (3) Overexpression of <i>erg20</i> and <i>erg1</i>	34.10 mg/L	[48]
	Wang et al.	Glycyrrhetic acid	Medicine	(1) Introduction of <i>CYP88D6</i> , <i>CYP72A154</i> , β - <i>AS</i> (β -amyrin synthase gene), <i>AtCPR1</i> (cytochrome P450 reductase gene from <i>Arabidopsis thaliana</i>) and <i>GuCYB5</i> (cytochrome b5 gene from <i>Glycyrrhiza uralensis</i>) (2) Fusion of <i>erg20</i> and <i>erg9</i> (3) Overexpression of <i>erg20</i> , <i>erg9</i> , <i>erg1</i> , <i>tHMG1</i> , <i>erg10</i> , <i>erg8</i> , <i>erg13</i> , <i>erg12</i> , <i>erg19</i> and <i>idi1</i> (4) Deletion of <i>bts1</i> (5) Fed-batch fermentation	8.78 mg/L	[49]
Tetraterpenoids	Zhou et al.	Lycopene	Food, feed, and cosmetic industries	(1) Introduction of <i>BtCrtI</i> mutants (2) Atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) mutagenesis combined with H_2O_2 -induced adaptive laboratory evolution (ALE) (3) Fed-batch fermentation	8.15 g/L	[50]

2 合成途径优化

萜类化合物合成涉及乙酰辅酶 A 的生成, MVA 途径, GPP、FPP、GGPP 和 2,3-氧化鲨烯的合成, 萜类合成酶的环化及其他修饰等。 *S. cerevisiae* 体内虽存在乙酰辅酶 A 合成途径、MVA 途径, 以及能够提供 GPP、FPP 等前体物质的麦角甾醇合成途径, 具有合成萜类化合物的基础条件, 但细胞内存在严格的调控机制, 导致流向萜类化合物合成的代谢流量较少, 合成萜类化合物的前体不足, 极大地限制了细胞内萜类化合物的生物合成。通过代谢途径构建与优化、关键酶的挖掘与改造、辅因子再生工程、细胞区室化工程等手段优化 *S. cerevisiae* 细胞中萜类合成途径, 能够有效强化前体物质供应、增大合成途径代谢通量, 是提高萜类化合物产量很重要的方法。

2.1 强化前体物质供应

2.1.1 增加乙酰辅酶 A 供应

乙酰辅酶 A 不仅是 MVA 途径的起始反应物以及萜类化合物合成的关键前体物质, 也是 *S. cerevisiae* 整个代谢网络中的重要中间代谢物。乙酰辅酶 A 广泛存在于线粒体、细胞质、细胞核和过氧化物酶体中, 参与了甾醇和萜类合成、三羧酸循环、脂肪酸代谢等多种重要的生理代谢过程, 同时乙酰辅酶 A 的分布呈现高度区室化, 且各区室之间不能相互穿梭利用^[12]。因此, 提高 *S. cerevisiae* 中乙酰辅酶 A 供应水平, 关键在于两点: 一是改造内源的乙酰辅酶 A 合成途径和降解支路, 二是充分利用不同细胞器中的乙酰辅酶 A。

如图 3 所示, 在细胞质中, 葡萄糖经糖酵解途径生成丙酮酸, 一部分丙酮酸进入线粒体, 在丙酮酸脱氢酶复合体 (pyruvate dehydrogenase, PDH) 的催化作用下合成乙酰辅酶 A, 随后进入三羧酸循环, 并通过此过程释放能量, 为整个机体的运行提供能量^[51]。一部

分保留在细胞质中的丙酮酸进入丙酮酸脱羧酶支路, 在丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, PDC)的作用下生成乙醛, 乙醛在乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase, ALD6) 的作用下生成乙酸, 乙酸在乙酰辅酶 A 合成酶(acetyl-CoA synthetase, ACS)的催化作用下进一步形成乙酰辅酶 A^[52]。部分乙酸进入细胞核, 在 ACS 的催化作用下形成乙酰辅酶 A, 维持组蛋白乙酰化修饰, 并对 DNA 转录进行调控^[53]。而部分乙酸在过氧化物酶体中形成的乙酰辅酶 A 在柠檬酸合酶(citrate synthase, CIT)的作用下进入乙醛酸循环, 胞质溶胶的乙酰辅酶 A 也可以通过与苹果酸合成酶(malate synthase, MLS)反应进入乙醛酸循环^[54]。此外, 乙酰辅酶 A 还是脂肪酸合成的前体, 参与脂肪酸的合成, 同时也是脂肪酸 β -氧化的降解产物。

基于内源的乙酰辅酶 A 的合成途径和降解支路对 *S. cerevisiae* 进行代谢工程改造以增强乙酰辅酶 A 的合成, 是提高目标化合物的产量的重要手段。丙酮酸脱羧酶支路中丙酮酸经丙酮酸脱羧酶 PDC、乙醛脱氢酶 ALD6、乙酰辅酶 A 合成酶 ACS 的催化作用生成乙酰辅酶 A。Shiba 等^[55]过表达 ALD6, 减少乙醇的生成, 提高乙酸的合成, 从而增强了进入丙酮酸脱氢酶旁路的碳流量, 在此基础上, 过表达 *S. cerevisiae* 内源的乙酰辅酶 A 合成酶 ACS1, 将紫穗槐二烯的产量提高了 23%, 而在引入了来自肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica*)的乙酰辅酶 A 合成酶变体 SeACS 后, 过表达 ALD6 和 SeACS, 使得乙酰辅酶 A 的合成量提高 3.2 倍, 增加了进入 MVA 途径的乙酰辅酶 A, 进而将紫穗槐二烯产量提高了约 4 倍。Lian 等^[56]为了增加乙酰辅酶 A 的供应, 敲除甘油-3-磷酸脱氢酶(glycerol-3-phosphatedehydrogenase, GPDH)基因 *gpd1* 和 *gpd2* 以提高糖酵解途径丙酮酸的合成, 同时将乙醇脱氢酶 ADH1、ADH4 失活以减少乙醇的产生, 促进丙酮酸脱氢酶旁路

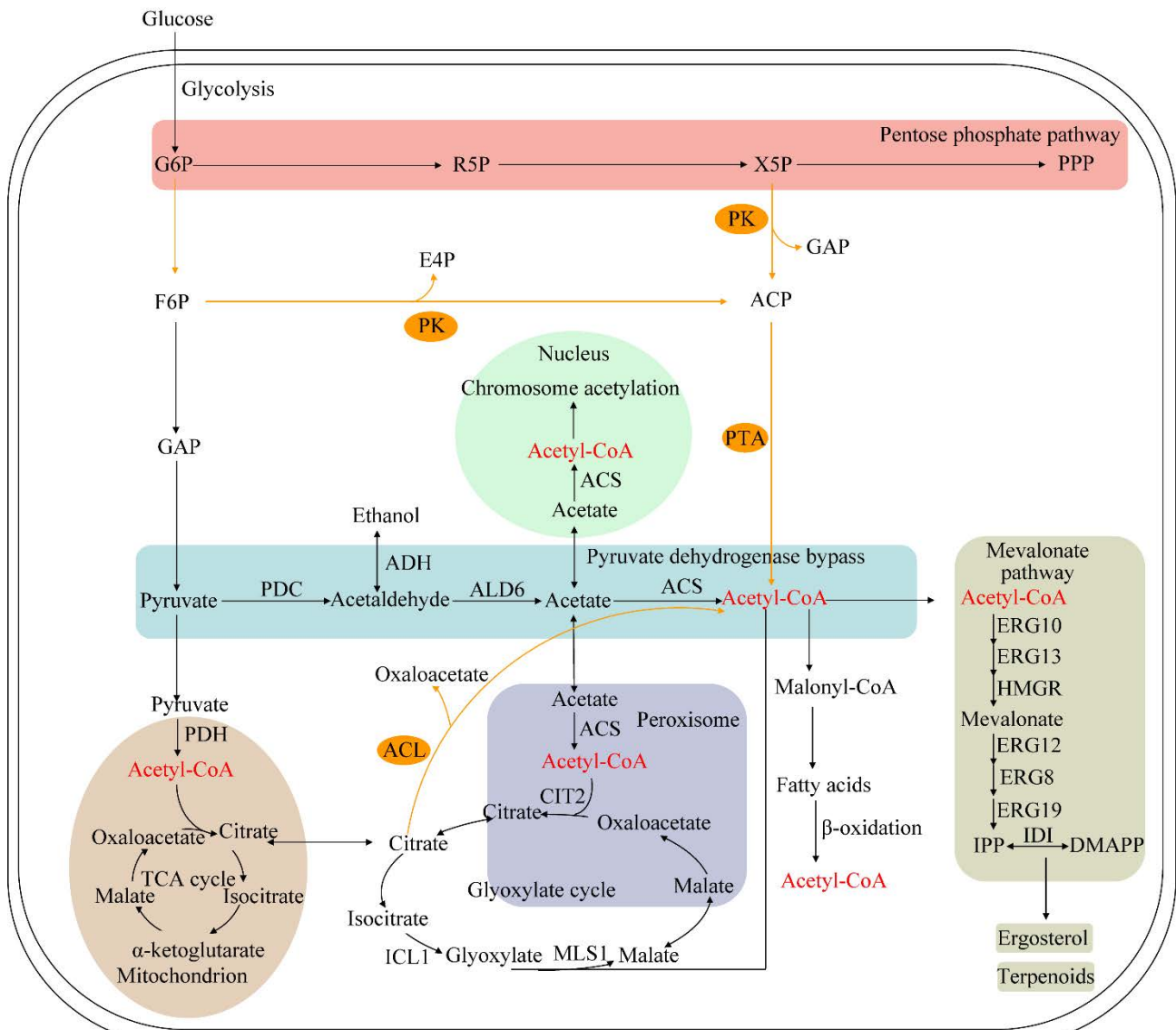


图3 酿酒酵母细胞内乙酰辅酶A的合成与代谢^[12,51-52,54,57-59] 黑线: *S. cerevisiae* 中乙酰辅酶A的内源性合成和代谢途径. 黄线: *S. cerevisiae* 中乙酰辅酶A的异源合成途径. G6P: 6-磷酸葡萄糖; F6P: 6-磷酸果糖; E4P: 4-磷酸赤藓糖; R5P: 5-磷酸核酮糖; X5P: 5-磷酸木酮糖; PDC: 丙酮酸脱羧酶; ADH: 乙醇脱氢酶; ALD6: 乙醛脱氢酶6; ACS: 乙酰辅酶A合成酶; PDH: 丙酮酸脱氢酶复合体; CIT2: 柠檬酸合酶2; ICL1: 异柠檬酸裂解酶; MLS1: 苹果酸合成酶1; ACL: ATP-柠檬酸裂解酶; PK: 磷酸转酮酶; PTA: 磷酸转乙酰酶; ACP: 乙酰磷酸; GAP: 3-磷酸甘油醛; ERG10: 乙酰乙酰辅酶A硫解酶; ERG13: HMG-CoA合成酶; HMGR: HMG-CoA还原酶; ERG12: 甲羟戊酸激酶; ERG8: 甲羟戊酸-5-磷酸激酶; ERG19: 甲羟戊酸-5-焦磷酸脱羧酶; IDI: 异戊烯焦磷酸异构酶

Figure 3 Synthesis and metabolism of acetyl-CoA in the *Saccharomyces cerevisiae*^[12,51-52,54,57-59]. Black line: Endogenous synthesis and metabolism pathway of acetyl-CoA in the *S. cerevisiae*. Yellow line: Exogenous synthesis pathway of acetyl-CoA in the *S. cerevisiae*. G6P: Glucose-6-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate; E4P: Erythrose-4-phosphate; R5P: Ribulose-5-phosphate; X5P: Xylulose 5-phosphate; PDC: Pyruvate decarboxylase; ADH: Alcohol dehydrogenase; ALD6: Acetaldehyde dehydrogenase 6; ACS: Acetyl-CoA synthase; PDH: Pyruvate dehydrogenase; CIT2: Citrate synthase 2; ICL1: Isocitrate lyase; MLS1: Malate synthase 1; ACL: ATP-citrate lyase; PK: Phosphoketolase; PTA: Phosphotransacetylase; ACP: Acetylphosphate; GAP: Glyceraldehyde-3-phosphate; ERG10: Acetoacetyl-CoA thiolase; ERG13: HMG-CoA synthase; HMGR: HMG-CoA reductase; ERG12: Mevalonate kinase; ERG8: Phosphomevalonate kinase; ERG19: Mevalonate diphosphate decarboxylase; IDI: Isopentenyl diphosphate isomerase.

乙酰辅酶 A 的合成, 进而将正丁醇产量提高了 4 倍以上。

另外, 高效利用线粒体中乙酰辅酶 A 也是提高萜类化合物产量的有效手段。在 *S. cerevisiae* 中, 乙酰辅酶 A 代谢在不同的细胞器完成, 乙酰辅酶 A 存在于细胞质、线粒体、过氧化酶体及细胞核 4 个不同的细胞器, 主要存在于细胞质和线粒体。且乙酰辅酶 A 无法自由穿梭于不同的细胞器之间, 因此线粒体中的乙酰辅酶 A 不能穿膜进入细胞质, 这就导致细胞质的乙酰辅酶 A 不能够大量积累。线粒体中的乙酰辅酶 A 不能穿梭到细胞质中, 但是线粒体中的柠檬酸可以通过柠檬酸转运系统穿过线粒体到细胞质中, 在 ATP-柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACL)的作用下与 CoA 生成乙酰辅酶 A 和草酰乙酸^[60], 间接地实现将线粒体中的乙酰辅酶 A 转运至细胞质中。

然而, *S. cerevisiae* 自身不存在 ACL。Lian 等^[56]通过引入来源于解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)的 ACL, 将柠檬酸分解为乙酰辅酶 A 和草酰乙酸, 促进细胞质中乙酰辅酶 A 积累, 进而将正丁醇的产量提高了 2 倍。Yu 等^[57]也在产脂肪酸的 *S. cerevisiae* 工程菌株中引入了构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)来源的 ACL, 重构了乙酰辅酶 A 的合成途径, 并结合亚细胞代谢运输、NADPH 和 ATP 的供应等策略, 最终将脂肪酸的产量提高至 33.4 g/L。

但是, 胞质中的柠檬酸进入乙醛酸循环, 生成乙醛酸, 乙醛酸在苹果酸合成酶 MLS1 的催化作用下和乙酰辅酶 A 进一步生成苹果酸, 并进入过氧化物酶体, 会导致乙酰辅酶 A 分流。为了减少乙酰辅酶 A 的消耗, Zhang 等^[13]敲除 CIT2、MLS1 的编码基因, 使得柠檬烯产量分别提高了 33.32% 和 140.30%。Chen 等^[61]将胞质中的苹果酸合成酶编码基因 *MLS1* 和过氧化物酶体中的柠檬酸合酶编码基因 *CIT2* 同时敲除, 使

得 α -檀香烯产量提高了 4 倍。伏贝贝^[12]引入来源于 *Y. lipolytica* 的 ACL, 并敲除了乙醛酸循环中的异柠檬酸裂解酶编码基因 *ICL1*, 发现与对照菌株相比, 香叶醇的产量和产率分别提高了 34% 和 83%。

研究人员还通过在 *S. cerevisiae* 中构建外源的磷酸转酮酶(phosphoketolase, PK)途径, 强化细胞内乙酰辅酶 A 的供应^[62]。PK 途径存在于酵母和乳酸菌中, 并参与异型乳酸发酵^[63-64]。PK 能够催化 6-磷酸果糖、5-磷酸木酮糖生成乙酰磷酸(acetylphosphate, ACP), 随后 ACP 在磷酸转乙酰酶(phosphotransacetylase, PTA)的作用下生成乙酰辅酶 A^[59,65-66]。该途径不会损失碳, 消耗 1 分子葡萄糖, 生成 3 分子的乙酰辅酶 A, 因此有望用于提高产率^[67]。Qin 等^[62]通过引入来自肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)的 PK 和来自克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)的 PTA 在 *S. cerevisiae* 中构建了 PK 途径, 优化了 *S. cerevisiae* 的乙酰辅酶 A 供应能力。Meadows 等^[58]在 *S. cerevisiae* 中在消除胞质乙酰辅酶 A 天然来源的基础上构建了一条异源的 PK 途径, 再引入乙酰化乙醛脱氢酶 ADA 和 NADH 特异性的羟甲基戊二酰辅酶 A (hydroxymethylglutaryl-CoA, HMG-CoA)还原酶, 不但强化了细胞内乙酰辅酶 A 的供应, 而且重新连接了 *S. cerevisiae* 的中心碳代谢, 改善途径氧化还原平衡, 减少 75% 氧气消耗的同时将法尼烯产量提高了 25%, 200 000 L 工业生物反应器中发酵 2 周后法尼烯浓度超过 130 g/L, 显著提高了法尼烯的工业生产效率。Dai 等^[68]利用浅绿气球菌(*Aerococcus viridans*)的丙酮酸氧化酶(pyruvate oxidase, PO)和 *S. enterica* 的 PTA 构建了一条不依赖于 ATP 的途径, 替代丙酮酸脱氢酶旁路来合成乙酰辅酶 A, 生产了 20.5 mg/L 的法尼烯。

此外, 泛酸在泛酸激酶的催化下也能生成

乙酰辅酶 A。Wegner 等^[69]通过补充泛酸并过表达泛酸激酶 CAB1 来增加乙酰辅酶 A 的生物合成,使甲羟戊酸产量增加到 3 830 mg/L,与对照相比增加了 12%。

2.1.2 强化 MVA 途径

S. cerevisiae 中 MVA 途径作为萜类合成中的第二个阶段,在引导上游的乙酰辅酶 A 流向萜类合成的同时,为后续反应提供前体物质 IPP 和 DMAPP(图 4)。因此,强化 MVA 途径对于提高萜类化合物产量十分重要。目前,强化 MVA 途径的研究主要集中在两方面:一是通过酶工程改造并过表达 MVA 途径中关键酶,尤其是限速酶 HMG-CoA 还原酶(HMG-CoA reductase, HMGR)和异戊烯焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IDI1),直接提高前体物质的合成能力,显著影响 *S. cerevisiae* 中萜类化合物的产量;二是通过辅因子工程提高 *S. cerevisiae* 中 NADPH 的供应水平,提高关键限速酶 HMGR 的催化活性,间接促进 *S. cerevisiae* 中前体物质的合成,能够有效促进细胞中萜类化合物的生成。

HMGR 能够催化 HMG-CoA 合成甲羟戊酸,是 MVA 途径的关键限速酶之一,改造并过表达 HMGR 能够有效强化 MVA 途径。研究表明, *S. cerevisiae* 中的 HMGR 是一组同工酶 HMG1 和 HMG2,尽管两者都由一个锚定跨膜结构域和一个催化结构域组成,但是 HMG1 性质稳定,而 HMG2 则容易迅速降解^[70]。因此,在 MVA 途径发挥作用的是 HMG1。研究表明,过表达截短的 HMG1 (tHMG1)可以解除 MVA 途径和麦角甾醇途径的反馈抑制^[71-72]。Amiri 等^[73]通过过表达 tHMG1 使芳樟醇的产量增加了 50%以上。Liu 等^[74]过表达 tHMG1 使香叶醇的产量增加到 1.57 mg/L,与亲本菌株相比,产量提高了 1.38 倍。Meng 等^[75]发现 tHMG1 过表达能够大大增强瓦伦烯的合成,使瓦伦烯的产量提高了 9 倍以上。此外, Lu 等^[76]还发现来源于粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) MvaE 的 HMGR 截短后的活性高于 *S. cerevisiae* 的 HMG1,是目前增强 MVA 途径通量最有效的 HMGR,能够将工业酵母菌株中角鲨烯含量提高 9 倍。

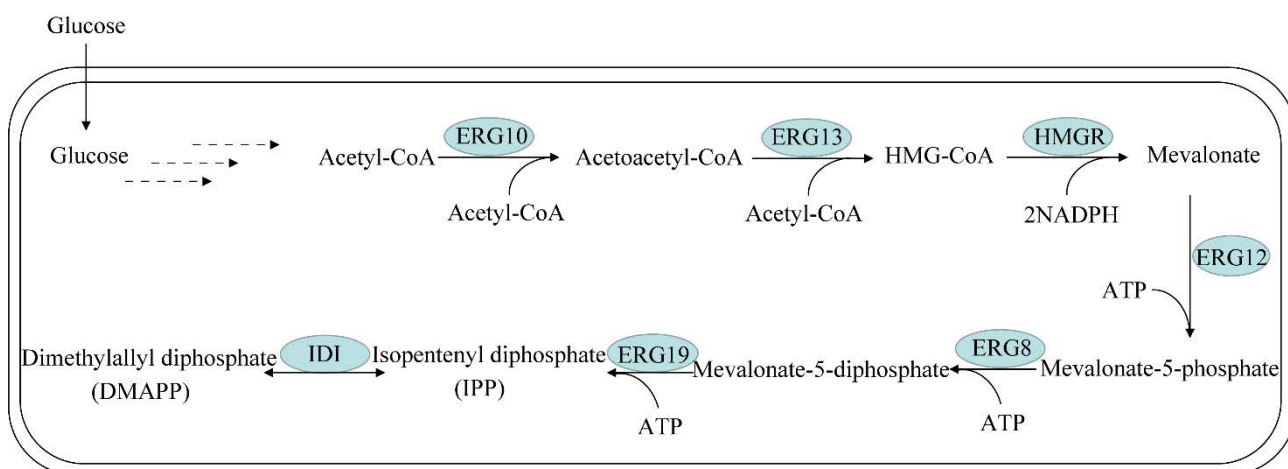


图 4 甲羟戊酸途径^[77] ERG10: 乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶; ERG13: HMG-CoA 合成酶; HMGR: HMG-CoA 还原酶; ERG12: 甲羟戊酸激酶; ERG8: 甲羟戊酸-5-磷酸激酶; ERG19: 甲羟戊酸-5-焦磷酸脱羧酶; IDI: 异戊烯焦磷酸异构酶

Figure 4 The mevalonate pathway^[77]. ERG10: Acetoacetyl-CoA thiolase; ERG13: HMG-CoA synthase; HMGR (HMG1 or HMG2): HMG-CoA reductase; ERG12: Mevalonate kinase; ERG8: Phosphomevalonate kinase; ERG19: Mevalonate diphosphate decarboxylase; IDI: Isopentenyl diphosphate isomerase.

IDI 能催化 IPP 与 DMAPP 之间互相转化, 是 MVA 途径中另一个关键的限速酶^[74]。因此, 对 IDI 进行优化也有助于强化 MVA 途径。Liu 等^[74]使用多拷贝质粒过表达 IDI 时产生 1.62 mg/L 的香叶醇, 较亲本菌株提高了 1.45 倍。Chen 等^[78]采用易错 PCR 对 *S. cerevisiae* 的 IDI 活性进行优化, 通过 3 轮 PCR 筛选出 L141H、Y195F 和 W256C 这 3 个突变位点, 突变体 IDI 的表达使得番茄红素产量增加了 1.8 倍。

过表达 tHMG1 和 IDI 突变体是强化 MVA 途径最常用的两种策略。但是 MVA 途径的其他酶, 如乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶(acetoacetyl-CoA thiolase, ERG10)、羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase, ERG13)、甲羟戊酸激酶(mevalonate kinase, ERG12)、甲羟戊酸-5-磷酸激酶(phosphomevalonate kinase, ERG8)以及甲羟戊酸-5-焦磷酸脱羧酶(mevalonate diphosphate decarboxylase, ERG19), 也是生物合成前体物质 IPP 和 DMAPP 所必需的, 过表达这 5 种酶有助于强化 MVA 途径, 增加 IPP 和 DMAPP 的供应。Wang 等^[49]通过过表达 ERG10、ERG8 和 ERG13, 使五环三萜类的甘草次酸增加了 1.5 倍。Utomo 等^[79]发现不仅 tHMG1 的过表达可以提高紫杉二烯的产量, ERG13、ERG12 和 ERG8 的过表达也可以增加萜类途径的总流量, 促进 *S. cerevisiae* 中紫杉二烯的合成。Yuan 等^[80]检测到过表达 ERG10、ERG13、tHMG1 和 ERG12 的突变株中紫杉二烯产量是亲本菌株产量的 13 倍以上。

此外, 由于 NADPH 是 MVA 途径关键限速酶 HMGR 的辅因子, 参与甲羟戊酸的合成, 其供应水平影响 HMGR 催化活性, 极大限制了 MVA 途径的代谢通量^[81]。通过辅因子工程提高细胞中 NADPH 的合成和再生也是增加 MVA 途径代谢通量和生产效率的有效策略^[20,82]。

NADPH 的合成和再生取决于 NADP⁺依赖性脱氢酶和 NADH 激酶的活性。酵母中存在多条 NADP⁺依赖性脱氢酶起作用的胞质 NADPH 再生途径, 包括异柠檬酸脱氢酶 Idp2、乙醛脱氢酶 Ald6、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 ZWF1、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 GND1 等。其中 ZWF1 和 GND1 所在的磷酸戊糖途径是 *S. cerevisiae* 中 NADPH 形成的主要途径, ZWF1 和 GND1 在磷酸戊糖途径的氧化阶段将 NADP⁺转化为 NADPH, 1 分子葡萄糖在磷酸戊糖氧化阶段能够生成 2 分子 NADPH^[83-84]。Kim 等^[84]发现过表达 ZWF1 可以将 NADPH 浓度增加 1.4 倍。Shi 等^[85]通过过表达 ZWF1 使倍半萜内酯小白菊内酯产量提高了 75.28%。Kong 等^[32]通过过表达 ZWF1 和 GND1 强化磷酸戊糖途径 NADPH 的供应, 使柠檬烯产量从 889.54 mg/L 增加到 903.86 mg/L。另外, 过表达磷酸戊糖途径中编码转醛酶的 TAL1 和编码转酮酶的 TKL1, 增加磷酸戊糖途径前体供应等策略也能够影响该途径 NADPH 的供应水平^[86]。Kong 等^[32]在过表达 ZWF1 和 GND1 的基础上, 同时过表达 TAL1 和 TKL1 以增强磷酸戊糖途径, 将柠檬烯产量从 903.86 mg/L 提高到 924.87 mg/L, 并通过敲除谷氨酸脱氢酶编码基因 GDH1、GDH2 将柠檬烯的产量进一步提高了 18.7%, 达到 1 097.43 mg/L。Kwak 等^[87]利用磷酸果糖激酶 PFK 的突变积累磷酸戊糖途径氧化阶段的前体物质葡萄糖-6-磷酸, 过表达突变的 PFK 和 ZWF1 使紫穗槐二烯的产量提高了 3.7 倍。Qin 等^[62]则是用一系列弱启动子取代糖酵解中磷酸葡萄糖异构酶 Pgi1 的天然启动子来降低 PGI1 的表达, 减弱竞争途径对葡萄糖-6-磷酸的消耗, 增加磷酸戊糖途径葡萄糖-6-磷酸的供应。Kim 等^[84]过表达 ZWF1, 并用负责合成 NADPH 的 ALD6 取代参与 NADH 生成的 ALD2 基因, 使原人参二醇的产量增加了 11 倍。

Huang 等^[88]引入来自变形链球菌(*Streptococcus mutans*)的 NADP⁺依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPN, 并过表达 *ZWF1* 以增加 NADPH 的供应, 将甘草次酸的产量提高了 1.4 倍。Yu 等^[89]则通过理性设计对细胞代谢网络进行重构, 在酵母细胞内构建了由磷酸戊糖循环、转氢循环和外部呼吸链 3 个模块组成的合成能量系统, 将磷酸戊糖途径的氧化阶段、非氧化阶段以及部分糖异生相结合, 使 6-磷酸葡萄糖在氧化阶段被催化为 5-磷酸核糖, 生成 2 分子 NADPH, C5 分子进入非氧化阶段后经可逆重排, 最终重构为 6-磷酸果糖和 3-磷酸甘油醛, 3-磷酸甘油醛经部分糖异生途径回到 6-磷酸葡萄糖, 再一次进入氧化阶段, 形成循环, 在这个循环中, 1 分子葡萄糖彻底氧化可以生成 12 分子 NADPH, 大大提高了 NADPH 的供应水平。NADH 激酶 POS5 是 *S. cerevisiae* 中 NADPH 的

另一个主要供应源, 在从 ATP 转化为 ADP 的过程中可以将 NADH 转化为 NADPH, 过表达 POS5 也可以改善 NADPH 供应。Wang 等^[90]单独过表达 *POS5* 将香叶醇的产量提高了 25%, 同时过表达 *POS5* 和 *ZWF1* 将香叶醇的产量提高了约 50%, 香叶醇产量从 97.00 mg/L 增加到 158.10 mg/L。除了直接过表达参与 NADPH 合成的酶的基因之外, 还可以通过调控转录因子间接影响参与 NADPH 合成的酶基因的表达。Stb5 是一种转录因子, 能够调控与 NADPH 产生相关的基因的表达^[91]。Hong 等^[6]通过 Stb5 编码基因的过表达, 合成了 41.8 mg/g 的番茄红素, 比对照菌株的番茄红素产量高出约 1.5 倍。

2.1.3 调控麦角甾醇合成途径

如图 5 所示, *S. cerevisiae* 细胞中的麦角甾醇合成途径为其合成萜类化合物提供了直接前体物质牻牛儿基焦磷酸 GPP、法尼基焦磷酸 FPP 以及

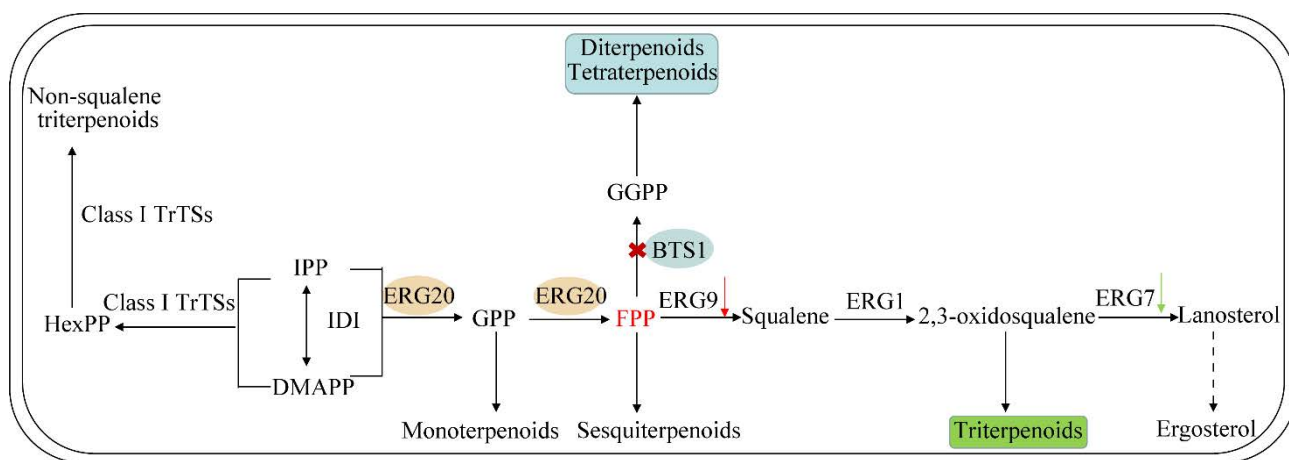


图 5 酿酒酵母中麦角甾醇合成途径的调控策略 IPP: 异戊烯焦磷酸; DMAPP: 二甲基丙烯基二磷酸; GPP: 牻牛儿基焦磷酸; FPP: 法尼基焦磷酸; GGPP: 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸; HexPP: 六聚异戊烯基焦磷酸; ERG20: FPP 合成酶; BTS1: 酵母内源性 GGPP 合成酶; ERG9: 角鲨烯合酶; ERG1: 鲨烯环氧化酶; ERG7: 羊毛固醇合酶; Class I TrTSs: I 型三萜合酶

Figure 5 Regulatory strategies for ergosterol bio-synthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. IPP: Isopentenyl diphosphate; DMAPP: Dimethylallyl pyrophosphate; GPP: Geranyl pyrophosphate; FPP: Farnesyl pyrophosphate; GGPP: Geranylgeranyl pyrophosphate; IDI: Isopentenyl diphosphate isomerase; ERG20: FPP synthase; BTS1: Endogenous yeast GGPP synthases; HexPP: Hexaprenyl diphosphate; ERG9: Squalene synthase; ERG1: Squalene epoxidase; ERG7: Lanosterol synthase; Class I TrTSs: Class I triterpene synthases.

2,3-氧化鲨烯。因此,调控麦角甾醇合成途径中 GPP、FPP、2,3-氧化鲨烯等前体物质的供应水平也是增加萜类物质产量的一个重要思路。

GPP 是合成单萜化合物的直接前体。如图 5 所示, GPP 是由法尼基焦磷酸合成酶(FPP synthase, ERG20)催化合成的。ERG20 是 *S. cerevisiae* 细胞合成麦角甾醇的关键酶,而麦角甾醇是维生素 D₂ 的前体,也是维持膜渗透性和流动性所需的细胞膜的重要成分,因此酵母细胞生长离不开 ERG20^[92]。ERG20 作为一个双功能酶,既有 GPP 合成活性又有 FPP 合成活性。在 *S. cerevisiae* 中, GPP 和 FPP 的合成均由 ERG20 催化完成,它能够在催化 IPP 与 DMAPP 生成 GPP 后,继续催化 GPP 与 IPP 生成 FPP^[22]。GPP 和 FPP 分别是合成单萜、倍半萜的直接前体,其供应量会直接影响这些萜类化合物的产量。过表达 ERG20 能够促进 FPP 的合成^[93]。但是在单萜合成过程中,由于 GPP 与 ERG20 的活性位点结合得非常紧密,大部分 GPP 在 ERG20 的作用下被进一步转化为 FPP,而不会被释放出来用于单萜的合成,这极大地限制了 GPP 的供应水平^[94]。目前,利用蛋白质工程等手段改造 *S. cerevisiae* 内源的 ERG20 是促进 GPP 的积累、增强 GPP 供应的主要策略。Fischer 等^[95]发现当 *S. cerevisiae* 的 ERG20 在 K197 位置的催化位点发生氨基酸突变时, GPP 积累显著增加。Liu 等^[74]通过过表达 ERG20^{K197G} 增强了香叶醇合酶附近的 GPP 供应,使香叶醇产量提高了 2.6 倍以上,达到 36.04 mg/L。Ignea 等^[94]发现 F96、A99、N127 也是 ERG20 的关键活性位点,并通过对这 3 个位点进行了一系列的氨基酸突变,将 ERG20 改造成 GPP 合成酶,其中 ERG20^{F96W} 和 ERG20^{N127W} 能够将桉烯产量分别提高 3.53 倍和 6.12 倍,而 F96 和 N127 双位点突变的 ERG20^{F96W-N127W} 则能使桉烯产量提高 10 倍以上,

随后该团队进一步将工程化的 ERG20 转化为显性负型,降低了内源性 ERG20 作为 FPP 合成能力,且不影响甾醇的生物合成。陈天华等^[96]在合成单萜蒎烯时,一方面表达内源 ERG20 的突变体 ERG20^W 以增加 GPP 的供应,另一方面,为了确保麦角甾醇的合成,将内源基因 *erg20* 的启动子原位替换为葡萄糖诱导型启动子 HXT1,下调 ERG20 的表达,使蒎烯的产量提高了 26.0%,并优化发酵工艺,使蒎烯产量达 11.7 mg/L。此外,Zhao 等^[15]使用 HXT1 启动子代替 ERG20 启动子,同时对碳源葡萄糖和乙醇的比例进行优化,也能够促进单萜的合成,将香叶醇的产量提高了 3.8 倍。

GPP 在 ERG20 的催化下进一步转化为 FPP,而 FPP 供应水平不仅受到 ERG20 的影响,还会受到角鲨烯合酶(squalene synthase, ERG9)和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶(GGPP synthases, GGPPS)的影响。其中,ERG9 是三萜和麦角甾醇生物合成分支途径中的第一个酶,其高表达会消耗大量的 FPP,减少了 GGPP 生产的前体供应。但是由于麦角甾醇是 *S. cerevisiae* 细胞生长所必需组分,而 ERG9 对麦角甾醇的生物合成至关重要,因此在弱化竞争途径时,多采用下调 *erg9* 基因表达,保证麦角甾醇合成的同时,下调了其代谢通量。通常用可调控的 MET3 启动子取代 *erg9* 的天然启动子,再用甲硫氨酸下调 *erg9* 的表达。Promdonkoy 等^[97]通过启动子工程下调 *erg9* 的表达,合成了 12.1 mg/L 的 α -檀香烯,将 α -檀香烯产量提高了 94%。研究表明,下调 *erg9* 的表达后,芳樟醇、紫穗槐-4,11-二烯等萜类化合物的产量也得到了明显的改善^[33,73]。Hu 等^[39]通过敲除 *erg9* 启动子的上游激活序列(upstream activation sequence, UAS)来抑制 *erg9* 的表达,从而促进二萜次丹参酮二烯的积累。此外, Peng 等^[98]开发了一种蛋白质去稳定性的方法,建立

了一种 PEST (富含 Pro、Glu/Asp、Ser 和 Thr) 序列依赖性内质网相关蛋白降解(endoplasmic reticulum-associated protein degradation, ERAD) 机制, 也能够降低 *erg9* 的表达水平, 可将反式-橙花叔醇的产量提高 86%。对倍半萜而言, 不仅麦角甾醇生物合成分支途径会消耗大量的 FPP, *S. cerevisiae* 细胞内源的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶 *BTS1* 也会减少 FPP 的积累^[79]。因此, 敲除酵母 GGPPS 的编码基因 *bts1* 也能够增加萜类化合物产量。陈和锋^[18]在合成倍半萜瓦伦烯时, 不仅下调了 *erg9* 的表达, 还敲除了 *bts1*, 大大促进了关键前体物质 FPP 的积累, 有效提高了瓦伦烯的产量。值得注意的是, FPP 具有细胞毒性, 其过度积累会抑制细胞生长, 进而影响萜类化合物的高效合成^[99]。为了平衡细胞生长和 FPP 供应, Dahl 等^[100]应用全基因组转录物阵列来识别对 FPP 的积累有反应的启动子, 将其整合到紫穗槐二烯合成途径, 通过反馈调节动态调控 FPP 的积累并将紫穗槐二烯的产量提高了 2 倍。

此外, 由图 5 可以看出, FPP 在 *ERG9* 的催化作用下还可以生成角鲨烯, 随后在鲨烯环氧化酶(squalene epoxidase, *ERG1*)的催化作用下生成 2,3-氧化鲨烯, 2,3-氧化鲨烯在萜类合成酶和修饰酶的作用下进一步形成多种多样的三萜类化合物。因此, 调控 *ERG9*、*ERG1* 的表达, 增加三萜类化合物前体物质角鲨烯和 2,3-氧化鲨烯的供应对于提高三萜类化合物的产量尤为重要。Zhang 等^[101]引入 *E. coli* 的 *IDI1*, 并通过过表达 *idi1*、*erg20*、*erg9* 的基因来提高前体角鲨烯的供应, 将 β -香树脂醇的产量提高了 49 倍。此外, 由于 *S. cerevisiae* 的 *ERG1* 活性较低, 限制了后续产物的合成^[102]。Zhang 等^[101]引入并过表达了白色念珠菌(*Candida albicans*)来源的 *ERG1*, 有效地将角鲨烯转化为 2,3-氧化鲨烯, 用于合成 β -

香树脂醇。高惠芳等^[47]通过过表达 *ERG20* 和 *ERG1* 的编码基因, 将熊果酸、白桦脂酸、摩尔酸的产量分别从 41.4、16.5、24.3 mg/L 提高到 62.5、26.7、34.1 mg/L。Wang 等^[49]综合利用强化 MVA 途径(过表达 *ERG10*、*ERG8*、*ERG13*、*tHMG1*), 过表达 *ERG20*、*ERG9*、*ERG1* 编码基因等策略, 将甘草次酸的产量提高了 5 倍。合成三萜化合物时, 下调麦角甾醇合成途径中的 *erg7*, 减少 2,3-氧化鲨烯的消耗也是常用的调控策略^[43]。Bröker 等^[46]使用 *CTR3* 启动子取代 *ERG7* 的启动子, 抑制了 *erg7* 的表达, 积累了 2,3-氧化鲨烯, 进而使羽扇豆醇含量增加 7.6 倍。Li 等^[103]利用 *MET3* 启动子下调 *erg7* 的表达, 将更多的碳流量转移到白桦脂酸的生物合成中。

2.1.4 代谢通量调控

ROX1、*MOT3*、*UPC2* 等全局转录因子能够对整个途径的代谢通量进行调控^[104]。其中转录抑制因子 *rox1* 和 *mot3* 基因能够抑制 MVA 途径和麦角甾醇合成途径中相关基因的表达^[105-106]。Özaydin 等^[107]合成倍半萜烯醇红没药烯时, 敲除 *rox1* 基因, 将红没药烯产量提高了 2 倍。Bröker 等^[46]过表达 *tHMGR* 和 *HMGS* 的同时, 敲除 *ROX1*, 使角鲨烯含量增加 8.2 倍, 羽扇豆醇的产量提高 16.5 倍。杨婷婷等^[108]敲除 *rox1*, 将瓦伦烯的产量提高了 17.4%。Hongay 等^[106]发现敲除 *mot3* 基因后, 总甾醇和总麦角甾醇的产量分别提高了 21%和 15%。焦学^[109]同时敲除 *rox1* 和 *mot3*, 所得菌株中生育三烯酚产量从 17.92 mg/g 提高到 19.24 mg/g。Hong 等^[6]敲除 *rox1* 或 *mot3* 基因, 均提高了番茄红素的产量。而过表达麦角甾醇生物合成的全局转录因子 *UPC2* 可以增强 MVA 途径^[110]。Zhang 等^[101]在过表达 MVA 途径中的关键酶基因的基础上, 加强了转录因子 *UPC2* 与启动子的结合, 强化了工程途径的定向转录调控, 将 β -香树脂醇的产量提高了 65 倍,

同时使用乙醇补料分批发酵, 最终将 β -香树脂醇产量提高到 138.80 mg/L。

敲除 *dos2*、*ypl062w*、*yjl064w* 等远端遗传基因也能够提高萜类化合物的产量。Chen 等^[111]将 *dos2* 敲除后, 番茄红素产量增加了 5.7%。Özaydin 等^[107]将 *ypl062w*、*yjl064w* 两个基因敲除后, 红没药烯的产量提高了近 3 倍。Triikka 等^[112]建立并应用了杂合缺失筛选来识别限制类胡萝卜素和二萜产量的基因, 发现敲除 *rox1*、*dos2*、*yer134c*、*vba5*、*ynr063w* 和 *ygr259c* 这 6 个基因将二萜化合物香紫苏醇的产量提高了 12 倍, 将类胡萝卜素产量提高了 40 倍。

此外, 随着组学技术的发展, 研究人员也开始通过代谢网络的计算、模拟和预测从复杂细胞代谢网络中筛选关键基因进行调控, 在确保胞内代谢通量平衡的基础上, 为萜类化合物合成途径分配最大的代谢通量^[42]。将基因组规模代谢网络 GSMM 与基因敲除预测算法 OptKnock 相结合, 快速预测了甜茶苷生产工程菌株中的基因敲除靶点, 通过优化与代谢流再分配后, 甜茶苷在摇瓶中的产量从 205.5 mg/L 提高到 302.1 mg/L。Paramasivan 等^[113]利用 GSMM 和 FOCuS 算法进行预测, 筛选出脂肪酸生物合成、氨基酸合成、核苷酸生物合成等多个途径的一些关键敲除靶点, 包括 *LYS1*、*GAP1*、*AAT1*、*AAT2*、*TH17*、*KGD-m*、*MET14*、*PDC1* 和 *ACO1*, 使用 FSEOF 等算法筛选出过表达靶标, 如 *PFK1*、*FBA1*、*ZWF1*、*TDH1*、*PYC1*、*ALD6*、*TPI1*、*PDX1* 和 *ENO1*, 并进行验证, 与对照组相比, 角鲨烯的合成量增加了 4.24 倍。

2.2 萜类合成酶的优化

2.2.1 不同来源萜类合成酶筛选

尽管 *S. cerevisiae* 细胞内存在的 MVA 途径和麦角甾醇途径为萜类化合物的合成提供了可能, 但由于缺乏萜类合成相关酶, 无法合成相应

的萜类化合物, 因而需要人为引入相应的外源萜类合成酶。Amiri 等^[73]通过引入薰衣草 (*Lavandula angustifolia*) 来源的芳樟醇合成酶基因 *LIS*, 实现了芳樟醇在工程 *S. cerevisiae* 中的生产, 产量最高可达 95 μ g/L。Baadhe 等^[33]在构建产紫穗槐-4,11-二烯的工程 *S. cerevisiae* 时, 利用来源于 *Artemisia annua* L. 的紫穗槐二烯合酶 ADS 将 FPP 转化为紫穗槐二烯。Yu 等^[43]将苹果 (*Malus domestica*) 来源的 α -香树脂醇合酶 MdOSC1 引入 *S. cerevisiae* 中, 并在此基础上增强 2,3-氧化鲨烯的供应, 将 α -香树脂醇的产量提高到 11.97 mg/L, 是之前报道的最高产量的 5.8 倍。

萜类合成酶的来源广泛, 其催化性能与酵母细胞中萜类化合物的生产效率息息相关。一方面, 不同来源的萜类合成酶会合成对映体特异性不同的产物^[114]。来源于紫苏 (*Perilla frutescens*) 的柠檬烯合成酶主要生产 (-)-柠檬烯^[115], 而来源于 *L. angustifolia* 的柠檬烯合成酶主要生产 (+)-柠檬烯^[116]。另一方面, 不同来源的萜类合成酶的催化效率也存在差异。付闻文等^[117-118]比较了甜橙、木豆、大豆 3 种不同来源的法尼烯合成酶, 发现表达不同来源的法尼烯合成酶后, 法尼烯产量差异较大, 最高可达 148.34 mg/L, 最低的仅为 46.39 mg/L。因此, 选择合适的萜类合成酶对于萜类物质的合成十分关键。

2.2.2 萜类合成酶的改造

当异源的萜类合成酶在 *S. cerevisiae* 中表达时, 使用增加拷贝数、使用强启动子等常用手段来提高萜类合成酶的表达效率并不能从根本上解决酶催化效率低、特异性差等问题, 通过定向进化、半理性设计、理性设计对酶活性位点进行改造, 可能是进一步增强其催化效率的有效途径。Tashiro 等^[119]通过单轮诱变和筛选获得了蒎烯合成酶的突变体, 与野生型的蒎烯合成酶相

比, 突变后的蒎烯合成酶将蒎烯产量提高了 60%。Zhou 等^[120]以番茄红素为指示剂, 开发了一种用于芳樟醇合成酶定向进化的高通量筛选方法, 筛选的 t67OMcLIS^{E343D/E352H} 将芳樟醇的产量提高了 52.7%。Zhang 等^[121]将多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) 的 AvGAS、念珠藻 (*Nostoc carneum*) 的 NcGAS、念珠藻 (*Nostoc sp.*) PCC 7120 的 NsGAS 的序列进行比对, 筛选出可能提高催化活性的位点进行突变, 其中 AvGAS-F23W 和 AvGAS-F33V 突变分别将吉玛烯 A 产量提高了 35.2% 和 21.8%。

另外, 超微结构相关性研究、特异性标记和亚细胞分级研究表明, 单萜生物合成的早期步骤发生在质体中。单萜合成酶前体蛋白的 N 端存在转运肽, 可以将翻译后的蛋白质靶向质体^[122]。单萜合成酶转入质体后, N 端转运肽会被水解去除^[123-124]。然而当单萜合成酶在微生物中进行表达时, N 端转运肽不能被正确水解, 导致酶定位混乱, 干扰酶的正确折叠, 进而影响酶的催化功能。因此, 在 *S. cerevisiae* 中表达单萜合成酶时, 截短其 N 端转运肽能够有效提高单萜合成酶的活性。Jiang 等^[11]从 9 种不同的香叶醇合酶 (geraniol synthase, GES) 中筛选出最优的香叶醇合酶 GrGES (来源于长春花 *Catharanthus roseus*), 在 *S. cerevisiae* 中实现了香叶醇的合成, 香叶醇产量为 43.19 mg/L, 再通过截短 CrGES 的 N 端转运肽, 进一步将香叶醇产量提高至 191.61 mg/L。陈天华等^[96]在 *S. cerevisiae* 中表达了 ERG20 的突变体 ERG20^{ww}, 并引入来自火炬松 (*Pinus taeda*) 的蒎烯合酶 PtPS, 构建了蒎烯的合成途径, 在此基础上通过截短 PtPS N 端 2-51 位的氨基酸残基, 将蒎烯产量提高了 2.23 倍。

2.2.3 蛋白融合

蛋白融合也是调控代谢通量的有效策略。研

究表明, 蛋白融合可以保持酶高催化活性, 且不会影响酶的生物合成^[125-126]。此外, 利用蛋白融合还能够增加关键中间体的有效浓度, 减少竞争路径对于中间体的消耗, 进而优化产物的生产水平^[127-128]。Albertsen 等^[129]将 ERG20 与广藜香合成酶 PTS 偶联, 融合蛋白在 *S. cerevisiae* 中的表达使广藜香醇的产量增加了 2 倍。Ignea 等^[94]通过 ERG20 突变体与蒎烯合酶融合, 降低酵母细胞内野生型 *erg20* 表达水平等策略, 使桉烯的产量比起始菌株提高了 340 倍。Baadhe 等^[33]采用融合蛋白技术, 将 ERG20 与紫穗槐二烯合成酶 ADS 偶联, 使 *S. cerevisiae* 中紫穗槐二烯的产量提高了 4 倍。Jiang 等^[11]在截短香叶醇合酶 CrGES 的 N 端转运肽基础上, 将截短的 CrGES 和 ERG20^{ww} 进行融合表达, 进一步将香叶醇产量从 191.61 mg/L 提高到 523.96 mg/L。陈天华等^[96]将 ERG20^{ww} 和截短的蒎烯合酶融合表达, 使蒎烯产量提高了 5.16 倍。

蛋白融合表达时, 通常需要加入 linker 控制酶与酶之间的空间距离, 减少不同酶在催化过程中的相互干扰^[130-131]。Promdonkoy 等^[97]使用 GGGGS 作为 linker 将 FPPS 和蒎烯合成酶 CITPS2 进行融合表达, 相较于单独过表达 FPPS 和 CITPS2, 增加 25.8%。Zhang 等^[29]应用 GSGSGSGSGS 接头将 ERG20^{F96W-N127W} 与 tVvTS 融合, 与亲本菌株相比, 融合蛋白使 α -蒎品醇的产生增加了 2.87 倍, 达到 2.39 mg/L。值得注意的是, 在使用 GS 连接肽时, 蛋白融合的顺序对融合酶的表达有显著影响。Jiang 等^[11]对截短的香叶醇合酶 CrGES 和 ERG20^{ww} 分别进行了正向融合和反向融合, 发现反向融合可以增强 CrGES 对前体 GPP 的可及性, 促进香叶醇的合成。Hu 等^[39]在将毛喉鞘蕊花 (*Coleus forskohlii*) 来源的 CfTPS1 和丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 来源的 SmKSL1 融合表达, 并通过该融合二萜合酶

催化 GGPP 生成次丹参酮二烯时,也发现蛋白融合的顺序对产物的生成影响显著,表达融合模块 CfTPS1-SmKSL1 的菌株次丹参酮二烯产量为 70.5 mg/L,而表达融合模块 SmKSL1-CfTPS1 的菌株次丹参酮二烯产量达到 313.4 mg/L。

除了常用的 GS 连接肽,也可以通过短肽标签 RIAD 和 RIDD 来构造无支架融合蛋白,使两种融合的酶自发形成 1:2 的复合物,从而优化融合蛋白中两种酶的比例,Kang 等^[132]以 RIAD 和 RIDD 这一对短肽标签创建了无支架的融合蛋白,使工程 *S. cerevisiae* 中番茄红素产量增加了 58%。近期,Sun 等^[133]受到 I 型模块化聚酮合酶 (polyketone synthase, PKS) 的启发,模拟了天然模块聚酮合酶的有序组装,开发了一种名为“模拟 PKS 酶流水线(mimic PKS enzyme assembly line, mPKSeal)”的多酶组装策略,利用 I 型顺式-AT 聚酮合酶对接域将虾青素生物合成途径酶进行多酶组装,使虾青素产量提高 2.4 倍,产量达 16.9 mg/g DCW,有效提高人工细胞工厂的合成效率。

2.3 细胞色素 P450 酶的表达和优化

细胞色素 P450 (CYPs 或 P450)的修饰是造成萜类化合物结构多样的主要原因之一。P450 能够催化多种代谢反应,包括 C-C 键断裂、C=C 双键的环氧化、环修饰、脱氨基、脱烷基、脱羧,以及重排反应等^[134]。Guo 等^[135]利用 CYP76AH3 和 CYP76AK1 两个酶介导的氧化、杂环化、芳构化和去甲基化等多种反应将次丹参酮二烯进一步催化生成 6 种丹参酮单体。因此,P450 在 *S. cerevisiae* 细胞中的高效表达是异源合成萜类化合物的重要环节。

与 *E. coli* 相比,*S. cerevisiae* 良好的翻译后修饰能力和完整的细胞器系统为 P450 酶的表达和催化反应提供了很好的环境。目前,*S. cerevisiae* 已经成功表达了多种具有功能活性的异源 P450

酶。例如,Li 等^[136]在产 β -香树脂醇的 *S. cerevisiae* 细胞中引入来自光果甘草(*Glycyrrhiza glabra*)的 CYP93E3 和 CYP72A566,合成了 8.36 mg/L 三萜类化合物大豆皂醇 B。Wong 等^[137]通过表达缬草-4,7(11)-二烯合酶 VDS,将 FPP 转化为缬草-4,7(11)-二烯,进一步筛选并引入 P450 酶 VoCYP71DJ1,成功合成了倍半萜缬草酸。此外,由于 P450 的催化反应是在来源于 NADPH 的电子当量驱动下激活的,同时还需要氧化还原伴侣 CPR 接收并传递电子,而不同来源的 CPR 与 P450 酶之间的适配性能够影响电子传递效率,限制 P450 酶的催化效率^[138]。因此,在表达 P450 时还需要同时表达合适的 CPR。高惠芳等^[48]比较了来源于 *C. roseus* 的 P450 酶 CYP716AL1 和来源于麻风树(*Jatropha curcas*)的 JcCPR、来源于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 AtCPR、来源于百脉根(*Lotus japonicas*)的 LjCPR、来源于甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)的 GuCPR 以及来源于苜蓿(*Medicago truncatula*)的 MtCPR 等不同来源的 CPR 的适配性,发现 CYP716AL1 和 AtCPR 共表达时摩尔酸产量最高,可达到 24.3 mg/L。Zhao 等^[139]通过在产 β -香树脂醇的 *S. cerevisiae* 细胞中引入来自 *M. truncatula* 的齐墩果酸合成酶 MtCYP716A12 和细胞色素还原酶 MtCPR,构建了产齐墩果酸的工程菌株,并对其生物合成途径进行优化,产量最终可达 606.9 mg/L。

蛋白质工程是提高 P450/AtCPR 催化效率的主要手段。Urlacher 等^[140]通过两轮易错 PCR 对野生型 CYP102A1 进行随机突变,产生的三重突变体 A74E F87V P386S 对 β -紫罗兰酮的羟基化活性增加了 300 倍(与野生型相比)。Sun 等^[141]通过同源性建模和分子对接确定了影响酶与底物疏水相互作用的关键残基,基于合理选择的残基进行计算指导突变,将混杂的 CYP72A63 重塑为可控的催化剂突变体 CYP72A63 (T338S),实现

了甘草次酸的特异性生产。Zhao 等^[142]在异源合成原人参二醇时,将来自人参(*Panax ginseng*)细胞色素 P450 型原人参二醇合酶 PPDS 与 *A. thaliana* 的 P450 还原酶 ATR1 进行融合,与 PPDS 和 ATR1 共表达相比,融合酶的催化活性增加了约 4.5 倍,原人参二醇的产生增加了 71.1%。

P450/AtCPR 通常定位在内质网上,这也是导致其低催化效率的原因之一。Xu 等^[41]在合成二萜酸甜菊醇时发现 *A. thaliana* 的 P450 酶 KAH 和来自甜叶菊(*Stevia rebaudiana*)的 CPR1 是通过跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)共定位在酵母内质网上的,截去 CPR1 的 TMD 使 P450 模块进行细胞质表达,能够有效解决膜结构溶解性差产生的酶低催化效率问题,将甜菊醇的产量增加了 231.2%。Cha 等^[35]截短 AtCPR 的 N-末端,圆柚酮产量提高了 2 倍以上。

2.4 区室化工程

S. cerevisiae 中存在很多重要的细胞器,如线粒体、过氧化物酶体、内质网等。这些细胞器的结构和功能各有不同,却广泛分布着合成萜类化合物所需要的前体、酶和辅因子。合理开发和改造 *S. cerevisiae* 的细胞器,将代谢途径区室化,不但可以增加酶和底物的局部浓度,提高细胞内萜类化合物的合成效率,还可以减少萜类化合物对细胞的毒性,对于提高 *S. cerevisiae* 萜类化合物合成能力具有良好的应用前景^[143]。

2.4.1 关键酶线粒体定位

在线粒体中,TCA 循环能够产生大量的乙酰辅酶 A 和 ATP 可用于萜类化合物合成,而且线粒体膜的存在避免了中间体流向竞争途径^[144]。这就为利用线粒体区室从线粒体乙酰辅酶 A 合成萜类化合物奠定了良好的基础。Yuan 等^[144]将 ERG10、ERG13、HMG1/2、ERG12、ERG8、ERG19、IDI1 和 ERG20 等酶的编码基因定位到

线粒体内,在线粒体中构建了 FPP 的生物合成途径,并引入紫穗槐-4,11-二烯合成酶 ADS 的编码基因,首次在线粒体内合成了萜类化合物,生产了 427 mg/L 的紫穗槐-4,11-二烯。Yee 等^[145]将 MVA 途径定位到了 *S. cerevisiae* 的线粒体中,并在线粒体中构建香叶醇的生物合成途径,实现了香叶醇在线粒体内生产,其产量是细胞质生产香叶醇的 6 倍。Lv 等^[146]开发了同时利用细胞质和线粒体乙酰辅酶 A 合成异戊二烯的双重代谢工程,与仅包含线粒体或细胞质工程改造的重组 *S. cerevisiae* 相比,该策略将异戊二烯产量分别提高 2.1 倍和 1.6 倍,充分表明利用线粒体合成萜类化合物具有巨大潜力。然而,IPP 具有细胞毒性,在细胞质中可以通过角鲨烯合成等自然途径对 IPP 解毒,而线粒体缺乏消耗 IPP 的分支途径,其过度积累会导致细胞生长抑制^[99]。为了缓解线粒体工程菌株的生长抑制,Yao 等^[147]在细胞质和线粒体乙酰辅酶 A 合成异戊二烯的双重代谢工程改造的基础上,将 *erg19* 和 *idi1* 引入细胞质和线粒体工程菌株中,使 *erg19* 和 *idi1* 以合理的拷贝数共表达,重建代谢平衡,在不损害细胞生长的情况下显著提高异戊二烯的产量,再结合异戊二烯合酶诱变等策略,将异戊二烯产量进一步提高到 11.9 g/L。

2.4.2 内质网优化

内质网与蛋白质的合成、折叠有关,同时也定位着多种与萜类合成相关的酶。内质网的体积空间影响其蛋白质折叠能力,当折叠能力不能满足蛋白质的合成需求时,细胞通过扩张内质网、增大内质网体积空间以满足其蛋白质折叠能力。Kim 等^[148]通过过表达一种脂质生物合成的转录因子 INO2 扩大 *S. cerevisiae* 的内质网,增强内质网蛋白的合成和折叠能力,将角鲨烯和原人参二醇的产量分别增加了 71 倍和 8 倍。Arendt 等^[149]

发现通过 CRISPR/Cas9 破坏磷脂酸磷酸酶的编码基因 *PAH1* 会导致内质网的急剧扩张,影响三萜合成酶的生成,进而促进三萜类化合物的积累。Arendt 等^[149]利用该策略对内质网结构进行修饰,使三萜皂苷的产量提高了 16 倍,从而大大超过了先前报道的产量。

2.4.3 脂滴的开发利用

脂滴主要由三酰甘油 (triacylglycerols, TAGs)和甾酯(steryl ester, SE)组成,具有中性脂质的亲脂性核心,是脂质储存、脂类代谢的关键细胞器^[150]。研究表明,*S. cerevisiae* 的脂滴能够被开发成亲脂性化合物的储存细胞器,储存 α -香树脂醇、番茄红素、 β -胡萝卜素、人参皂苷等萜类化合物,有效缓解 *S. cerevisiae* 中萜类化合物生物合成中的表达瓶颈,减轻萜类化合物对 *S. cerevisiae* 的细胞毒性^[7,143,151-154]。

脂滴的工程化改造能够显著提高萜类化合物的生产水平。例如原人参二醇合酶 PPDS 将达玛烯二醇 II (damene glycol II, DD)转化为原人参二醇(protoginseng glycol, PPD)是人参皂苷合成途径中的关键步骤。PPDS 是一种细胞色素 P450 酶,位于酵母的内质网中,而 PPDS 的底物 DD 则储存在脂滴中。酶及其底物的区室化导致细胞的 DD 转化能力受限。Shi 等^[143]使用酵母 PLN1 蛋白将正常内质网定位的 PPDS 靶向脂滴,将 DD 转化为 PPD 的效率显著提高了 394.0%, DD 的转化率也从 17.4%提高到 86.0%。角鲨烯是三萜类化合物合成的关键前体,与三酰甘油、甾酯一起储存在脂滴中^[151-152]。Wei 等^[153]发现过表达脂滴调控因子二酰甘油酰基转移酶 DGA1,增强脂质的生物合成,提高角鲨烯的储存能力,可以进一步增加角鲨烯的产量。饶攀^[155]通过过表达 DGA1,增加了 *S. cerevisiae* 内的脂滴数量和大小,增强了 *S. cerevisiae* 对萜类化合物的存储能力,将原人参二醇产量提高了 25%。赵一瑾^[156]

过表达甾醇酰基转移酶 ARE1 和 ARE2,增加细胞内 SE 的合成通量,增加脂滴的大小,将 β -胡萝卜素产量高了 54%,合成了 5.67 mg/g β -胡萝卜素。

此外, α -香树脂醇、番茄红素等亲脂性萜类化合物,在高浓度下对细胞有毒,将其储存在脂滴中,能够有效缓解亲脂性萜类化合物对 *S. cerevisiae* 的细胞毒性,增加其的细胞内积累。Ma 等^[7]通过过表达与脂肪酸合成和 TAG 产生相关的关键基因、过表达脂肪酸去饱和酶基因以及敲除 *Seipin* 蛋白编码基因等策略,调节 TAG 组成和脂滴大小,将番茄红素储存在脂滴中,以避免其相关的毒性,增加了番茄红素在细胞内积累,使得细胞内番茄红素产量提高了 25%,达到 70.5 mg/g。Yu 等^[154]基于建模分析获得的 α -香树脂醇合酶三重突变体 MdsOSC1^{N11T/P250H/P373A},将 α -香树脂醇的产量提高了 11 倍,在此基础上,过表达 DGA1 以扩大细胞内 α -香树脂醇的储存能力,在补料分批发酵中生产了 1 107.9 mg/L 的 α -香树脂醇,比原始菌株提高了 106 倍。

3 提高 *S. cerevisiae* 对萜类化合物的耐受性

S. cerevisiae 对萜类化合物的耐受性差是限制其高产的另一个关键因素^[12]。Brennan 等^[157]研究 β -蒎烯、柠檬烯、月桂烯、萜品烯、 γ -萜品烯等萜类对 *S. cerevisiae* 的最低抑制浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)时发现,这些萜类化合物的 MIC 都很低,仅 0.44 mmol/L 的柠檬烯就能够显著抑制 *S. cerevisiae* 的细胞生长。

萜类化合物对细胞造成毒性的原因可能有以下 4 个方面:(1) 破坏细胞壁的完整性,抑制菌体生长。Brennan 等^[158]用抑制量的 D-柠檬烯

处理 *S. cerevisiae* 细胞后,发现麦角固醇和脂肪酸生物合成途径的基因并未上调,细胞膜流动性、结构膜完整性、脂肪酸组成也未发生改变,但是细胞壁完整性信号通路的相关基因过表达,细胞壁的结构和功能发生改变,细胞分裂受到抑制,且柠檬烯处理后的细胞对细胞壁降解酶的敏感性增加。(2) 细胞膜功能受损。紫苏醇、D-柠檬烯等萜类,能够抑制 *S. cerevisiae* MVA 途径中 HMG-CoA 还原酶的活性,进而影响细胞膜的合成^[159]。萜类不仅会影响细胞膜合成,还会损坏细胞膜功能,引发细胞凋亡。Liu 等^[160]用亚致死剂量的 D-柠檬烯处理 *S. cerevisiae* 细胞,2 h 后,发现 *S. cerevisiae* 细胞膜的膜流动性、渗透性和饱和脂肪酸比率增加,细胞存活率急剧下降。(3) 引发细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累,导致细胞死亡。Bakkali 等^[161]在考察药用植物精油对 *S. cerevisiae* 细胞毒性时发现,使用精油处理 *S. cerevisiae* 后,OH[·]和 O₂^{·-}自由基以及 H₂O₂ 等大量 ROS 在细胞内积累,严重影响细胞壁和细胞膜,并损害线粒体 DNA,导致线粒体功能障碍,进而引起细胞凋亡。(4) 抑制细胞内的能量代谢。Uribe 等^[162]研究了 β-蒎烯对 *S. cerevisiae* 的影响,发现 β-蒎烯能够抑制细胞呼吸和 H⁺、K⁺的转运,阻碍 *S. cerevisiae* 线粒体内 ATP 的生成。

为了降低萜类化合物的细胞毒性,减少萜类化合物与酵母细胞的接触,研究人员不仅利用脂滴包裹亲脂性萜类化合物^[7,154],还采用了两相溶剂萃取、离子交换等分离方法。Brennan 等^[157]通过两相溶剂萃取将 D-柠檬烯等 5 种单萜转移至有机相,其中与无溶剂系统中的单萜相比,邻苯二甲酸二丁酯中 D-柠檬烯的 MIC 提高了 702 倍,同时 *S. cerevisiae* 细胞活力保持在 90% 以上,减轻发酵过程中的萜类化合物毒性。Alonso-Gutierrez 等^[163]则采用阴离子交换树脂进

行原位产物回收,及时去除发酵过程中的萜类。

通过外排工程开发对细胞毒性具有更好耐受性的优良底盘,这也是减轻萜类化合物对细胞毒性的有效策略^[164]。外排工程是将异源合成过程中的有毒物质排出宿主,微生物中存在的天然的外排系统能够将细胞内的产物泵出细胞,以减轻产物对细胞的毒性^[165]。通过引入异源的外排转运蛋白实现 *S. cerevisiae* 内萜类化合物的外排是最常见的策略之一。Wang 等^[166]在 *S. cerevisiae* 中引入子囊菌 *Grosmannia clavigera* 的转运蛋白 GcABC-G1,并用 D-柠檬烯、3-萜烯、β-蒎烯等单萜对 *S. cerevisiae* 进行处理,发现 GcABC-G1 的异源表达增加了重组 *S. cerevisiae* 对单萜的耐受性,提高了重组 *S. cerevisiae* 的存活率。Chen 等^[167]在 *S. cerevisiae* 中分别表达了 *Y. lipolytica* 的 ABC 转运蛋白 ABC2 和 ABC3,用一系列烷烃处理后,发现重组 *S. cerevisiae* 中 ABC2 和 ABC3 转运蛋白的转录增加,*S. cerevisiae* 对烷烃的耐受性显著提高,其中 ABC2 转运蛋白的表达使 *S. cerevisiae* 对癸烷的耐受限提高了约 80 倍。Demissie 等^[168]将薰衣草的 ABC 转运蛋白 LaABC1 导入酵母细胞中,发现 LaABC1 的表达增强了酵母对香叶醇的耐受性。利用内源性质膜 ABC 转运蛋白也是 *S. cerevisiae* 中萜类化合物外排的有效策略。通过转录组分析发现单萜会显著诱导 4 个质膜外排泵基因(*YOR1*、*SNQ2*、*PDR5*、*PDR15*)的表达,质膜外排泵可以识别并排出对细胞具有毒性的物质。在过表达 *SNQ2*、*PDR5* 后,*S. cerevisiae* 细胞内的单萜含量明显下降^[169]。Bu 等^[170]通过比较蛋白质组学分析和转录组分析,确定了 Pdr5、Pdr10、Snq2、Yor1、Yol075c 等 5 种潜在的 β-胡萝卜素外排的 ABC 转运蛋白,采用了诱导型 GAL 启动子过表达候选转运蛋白,增强了 β-胡萝卜素的分泌和细胞内生产,其中 Snq2 的转运能力最好,将菌株 β-

胡萝卜素的分泌量增加了 4.04 倍, 细胞内的 β -胡萝卜素产量也增加了 1.33 倍。近期, 江南大学刘龙团队开发了一种萜类化合物转运蛋白预测和挖掘框架, 可用于识别萜类化合物的转运蛋白, 他们利用 *in-silico* 预测和挖掘 *S. cerevisiae* 中萜类化合物的转运蛋白, 通过“挖掘-对接-构建-验证”, 发现 ABC 转运蛋白 Pdr5 和氧固醇结合同源蛋白 Osh3 能够促进角鲨烯的外排, 过表达 Pdr5 和 Osh3 的编码基因可以使角鲨烯的分泌量达 86.10 mg/L, 是对照菌株的 141.1 倍, 过表达 Pdr10 的编码基因可以使 β -胡萝卜素分泌量增加到对照菌株的 3.3 倍, 达 41.05 mg/L, 与基于转录组分析的传统研究方法相比, 该方法更加省时、低成本^[171]。刘龙团队还使用 AutoDock Vina 通过批量分子对接计算了 39 个萜类化合物的结合亲和力, 探索 Prd11 对 39 个萜类化合物的运输潜力, 并以角鲨烯、番茄红素和 β -胡萝卜素为例进行实验验证计算机预测结果的准确性, 证明结合亲和力是筛选转运蛋白底物的可靠参数, 能够快速筛选萜类化合物的转运蛋白, 为解决细胞内过量积累引起的萜类化合物生产瓶颈提供了新思路^[172]。

除了可以利用外排系统将异源合成过程中的有毒物质排出, 通过耐受工程提高宿主对有毒物质的抗性也是缓解单萜细胞毒性的有效方法。Chubukov 等^[173]在耐柠檬烯的 *E. coli* 中发现了一个烷基氢过氧化物酶的突变体 AhpC^{L177Q}, 它能够将氢过氧化物还原为毒性相对较小的化合物, 减轻了柠檬烯对细胞的毒性。Brennan 等^[174]则在柠檬烯胁迫下, 采用连续分批转移的适应性进化成功地分离出了柠檬烯耐受表型的 *S. cerevisiae*, 并对其测序, 结果显示 Tcb2p 和 Tcb3p 的编码基因发生突变, 进一步进行耐柠檬烯表型的基因组重建, 发现截短的 Tcb3p (tTcb3p¹⁻⁹⁸⁹) 能够将细胞对柠檬烯的耐受性提高

9 倍, 对 β -蒎烯和月桂烯的耐受性分别提高 11 倍和 8 倍。Godara 等^[175]发现在氧化胁迫下, *S. cerevisiae* 的 STE6 基因发生突变, 突变体中双环倍半萜 β -石竹烯的产量提高了 3.7 倍, 达到 12.6 mg/g 细胞干重, 过表达突变的 STE6 (STE6 T1025N) 可使 β -石竹烯的产量增加 4 倍, 达到 13.8 mg/g DCW。Reyes 等^[176]也在氧化胁迫下将 β -胡萝卜素的产量增加了 3 倍, 达到 18 mg/g DCW。Jiang 等^[177]将快速常压室温等离子体 (atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 诱变与氧化胁迫相结合, 使虾青素产量从 13.25 mg/L 提高到 65.93 mg/L, 与亲本菌株相比提高了近 4 倍。

4 展望

近年来, 随着合成生物学的迅猛发展, *S. cerevisiae* 作为萜类化合物的生产平台取得了巨大进展, 现已成功合成香叶醇、法尼烯、紫杉二烯、甘草次酸、番茄红素等多种萜类化合物。研究人员采用代谢途径构建与优化、关键酶的挖掘与改造、辅因子再生工程、细胞区室化工程、细胞外排工程以及细胞耐受性改造等多种策略改造 *S. cerevisiae* 细胞, 以提高其萜类化合物的生产能力, 这些调控策略是通用的, 不局限于特定的萜类化合物, 将不同的策略组合运用, 可进一步实现 *S. cerevisiae* 体内萜类化合物的高效表达, 推动萜类化合物的工业化生产。然而, 要实现萜类化合物的工业化生产, 生产菌株的开发只是第一步, 在后续摇瓶优化、实验室和中试发酵罐研究、工业规模扩大的过程中仍存在诸多挑战, 包括底物选择、能源消耗、生产工艺的连续性和再现性等^[178]。目前大多数萜类化合物离工业化的生产还有一定差距, 亟需在总结前人经验和成果的基础上, 通过深入挖掘更多萜类化合物合成途径, 结合基因工程、蛋白质工程、代谢工程、合成生物学、

发酵工程等多学科手段构建高效、稳定、可控、低成本的产萜类产物 *S. cerevisiae* 细胞工厂, 以实现更多复杂萜类化合物的完整合成和规模化生产。

REFERENCES

- [1] DAVID B, WOLFENDER JL, DIAS DA. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2015, 14(2): 299-315.
- [2] 毕慧萍, 刘晓楠, 李清艳, 程健, 庄以彬, 王冬, 戴住波, 江会锋, 刘涛, 张学礼. 植物天然产物微生物重组合成研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(11): 4263-4282.
BI HP, LIU XN, LI QY, CHENG J, ZHUANG YB, WANG D, DAI ZB, JIANG HF, LIU T, ZHANG XL. Advances in microbial synthesis of plant natural products[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(11): 4263-4282 (in Chinese).
- [3] 姜逢霖, 巩婷, 陈晶晶, 陈天娇, 杨金玲, 朱平. 植物来源药用天然产物的合成生物学研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1931-1951.
JIANG FL, GONG T, CHEN JJ, CHEN TJ, YANG JL, ZHU P. Synthetic biology of plants-derived medicinal natural products[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(6): 1931-1951 (in Chinese).
- [4] 罗林明, 石雅宁, 姜懿纳, 詹济华, 覃丽, 陈乃宏. 人参抗肿瘤作用的有效成分及其机制研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(3): 582-596.
LUO LM, SHI YN, JIANG YN, ZHAN JH, QIN L, CHEN NH. Advance in components with antitumor effect of *Panax ginseng* and their mechanisms[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, 48(3): 582-596 (in Chinese).
- [5] WITHERS ST, KEASLING JD. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 73(5): 980-990.
- [6] HONG J, PARK SH, KIM S, KIM SW, HAHN JS. Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by enzyme engineering and increasing membrane flexibility and NAPDH production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(1): 211-223.
- [7] MA T, SHI B, YE ZL, LI XW, LIU M, CHEN Y, XIA J, NIELSEN J, DENG ZX, LIU TG. Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 134-142.
- [8] 李方迪. 代谢改造酿酒酵母生产番茄红素[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2022.
LI FD. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lycopene production[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2022 (in Chinese).
- [9] 高扬乐, 谢梦斯, 李力. 利用不同底盘细胞开展生物合成萜类化合物的研究进展[J]. *药物生物技术*, 2022, 29(1): 95-101.
GAO YL, XIE MS, LI L. Research progress in biosynthesis of terpenoids using different chassis cells[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2022, 29(1): 95-101 (in Chinese).
- [10] CHEN RB, YANG S, ZHANG L, ZHOU YJ. Advanced strategies for production of natural products in yeast[J]. *iScience*, 2020, 23(3): 100879.
- [11] JIANG GZ, YAO MD, WANG Y, ZHOU L, SONG TQ, LIU H, XIAO WH, YUAN YJ. Manipulation of GES and ERG20 for geraniol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 57-66.
- [12] 伏贝贝. 改造酿酒酵母乙酰辅酶 A 合成途径及其在香叶醇生产中的应用[D]. 济南: 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2018.
FU BB. Engineering acetyl-CoA synthetic pathway and its application in geraniol production in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Jinan: Master's Thesis of Qilu University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [13] ZHANG X, LIU X, MENG YH, ZHANG LJ, QIAO JJ, ZHAO GR. Combinatorial engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improving limonene production[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 176: 108155.
- [14] 任全路. 代谢改造酿酒酵母合成蒎烯[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2021.
REN QL. Metabolic modification of *Saccharomyces cerevisiae* to synthesize pinene[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [15] ZHAO JZ, LI C, ZHANG Y, SHEN Y, HOU J, BAO XM. Dynamic control of ERG20 expression combined with minimized endogenous downstream metabolism contributes to the improvement of geraniol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 17.
- [16] HIDALGO D, SANCHEZ R, LALALEO L, BONFILL M, CORCHETE P, PALAZON J. Biotechnological production of pharmaceuticals and biopharmaceuticals in plant cell and organ cultures[J]. *Current Medicinal*

- Chemistry, 2018, 25(30): 3577-3596.
- [17] 高欣, 柳羽哲, 江泽沅, 曾琦, 刘诗梦, 刘晓婷, 闵伟红. 合成生物学构建微生物工程菌研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(15): 256-264.
GAO X, LIU YZ, JIANG ZY, ZENG Q, LIU SM, LIU XT, MIN WH. Progress in the research of synthetic biology in construction of engineered microorganisms[J]. Food Science, 2022, 43(15): 256-264 (in Chinese).
- [18] 陈和锋. 瓦伦西亚烯细胞工厂的构建及代谢工程改造[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2019.
CHEN HF. The construction and metabolic engineering of valencene cell factory[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [19] 张永涛, 赵净沙, 蒋雁冰, 赵丹, 王昌涛, 李萌. 代谢工程改造酵母生产香料的研究进展[J]. 日用化学工业, 2022, 52(6): 645-655.
ZHANG YT, ZHAO JS, JIANG YB, ZHAO D, WANG CT, LI M. Research progress in yeast metabolic engineering to produce natural product flavors[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2022, 52(6): 645-655 (in Chinese).
- [20] 刘甜甜, 徐显皓, 孔晓, 刘延峰, 李江华, 堵国成, 吕雪芹, 刘龙. 酿酒酵母代谢调控合成功能营养品: 进展与挑战[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(8): 10-21.
LIU TT, XU XH, KONG X, LIU YF, LI JH, DU GC, LYU XQ, LIU L. Metabolic regulation and synthesis of functional nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*: progress and challenges[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(8): 10-21 (in Chinese).
- [21] 付佳, 王洋, 阎秀峰. 萜类化合物的生理生态功能及经济价值[J]. 东北林业大学学报, 2003, 31(6): 59-62.
FU J, WANG Y, YAN XF. The eco-physiological function and economic value of terpenoids[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2003, 31(6): 59-62 (in Chinese).
- [22] 张帆, 王颖, 李春. 单萜类化合物的微生物合成[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 427-442.
ZHANG F, WANG Y, LI C. Microbial synthesis of monoterpenoids: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 427-442 (in Chinese).
- [23] 孙博文. 高产多环倍半萜酿酒酵母基因工程菌构建[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2022.
SUN BW. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* genetically engineered bacteria for high-yielding polycyclic sesquiterpenes[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2022 (in Chinese).
- [24] TAO H, LAUTERBACH L, BIAN GK, CHEN R, HOU AW, MORI T, CHENG S, HU B, LU L, MU X, LI M, ADACHI N, KAWASAKI M, MORIYA T, SENDA T, WANG XH, DENG ZX, ABE I, DICKSCHAT JS, LIU TG. Discovery of non-squalene triterpenes[J]. Nature, 2022, 606(7913): 414-419.
- [25] 常鹏程, 于洋, 王颖, 李春. 酿酒酵母高效合成萜类化合物的组合调控策略[J]. 化工进展, 2019, 38(1): 598-605.
CHANG PC, YU Y, WANG Y, LI C. Combinatorial regulation strategies for efficient synthesis of terpenoids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2019, 38(1): 598-605 (in Chinese).
- [26] 薛海洁, 孙文涛, 赵雨佳, 王颖, 李春. 微生物合成植物三萜及其皂苷化合物[J]. 生物产业技术, 2019(1): 19-26.
XUE HJ, SUN WT, ZHAO YJ, WANG Y, LI C. Synthesis of plant triterpenoids and saponins by microorganisms[J]. Biotechnology & Business, 2019(1): 19-26 (in Chinese).
- [27] ZHANG YY, WANG J, CAO XS, LIU W, YU HW, YE LD. High-level production of linalool by engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring dual mevalonate pathways in mitochondria and cytoplasm[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 134: 109462.
- [28] GUO Y, LI FX, ZHAO JY, WEI X, WANG ZQ, LIU JD. Diverting mevalonate pathway metabolic flux leakage in *Saccharomyces cerevisiae* for monoterpene geraniol production from cane molasses[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 181: 108398.
- [29] ZHANG CB, LI M, ZHAO GR, LU WY. Alpha-terpineol production from an engineered *Saccharomyces cerevisiae* cell factory[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 160.
- [30] JIA HJ, CHEN TH, QU JZ, YAO MD, XIAO WH, WANG Y, LI C, YUAN YJ. Collaborative subcellular compartmentalization to improve GPP utilization and boost sabinene accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2020, 164: 107768.
- [31] REN QL, HE YX, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Improved pinene production in a recombinant yeast by fusion linker optimization and chaperon coexpression[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2022, 2(1): 208-216.
- [32] KONG X, WU YK, YU WW, LIU YF, LI JH, DU GC, LV XQ, LIU L. Efficient synthesis of limonene in

- Saccharomyces cerevisiae* using combinatorial metabolic engineering strategies[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(20): 7752-7764.
- [33] BAADHE RR, MEKALA NK, PARCHA SR, DEVI YP. Combination of ERG9 repression and enzyme fusion technology for improved production of amorphaadiene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 2013: 140469.
- [34] YE ZL, HUANG YL, SHI B, XIANG ZL, TIAN Z, HUANG M, WU LL, DENG ZX, SHEN K, LIU TG. Coupling cell growth and biochemical pathway induction in *Saccharomyces cerevisiae* for production of (+)-valencene and its chemical conversion to (+)-nootkatone[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 72: 107-115.
- [35] CHA YP, LI W, WU T, YOU X, CHEN HF, ZHU CY, ZHUO M, CHEN B, LI S. Probing the synergistic ratio of P450/CPR to improve (+)-nootkatone production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(3): 815-825.
- [36] 郭爽, 王冬, 杨婷婷, 李文豪, 李荣生, 张国伟, 张学礼, 戴住波. 创建酿酒酵母细胞工厂发酵生产广藿香醇[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(9): 2316-2324.
GUO S, WANG D, YANG TT, LI WH, LI RS, ZHANG GW, ZHANG XL, DAI ZB. Construction of cell factories for production of patchoulol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2023, 48(9): 2316-2324 (in Chinese).
- [37] WANG SL, ZHAN CL, NIE SX, TIAN DG, LU JE, WEN MZ, QIAO JJ, ZHU HJ, CAIYIN Q. Enzyme and metabolic engineering strategies for biosynthesis of α -farnesene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(33): 12452-12461.
- [38] SANTOYO-GARCIA JH, WALLS LE, NOWROUZI B, GALINDO-RODRIGUEZ GR, OCHOA-VILLARREAL M, LOAKE GJ, DIMARTINO S, RIOS-SOLIS L. *In situ* solid-liquid extraction enhances recovery of taxadiene from engineered *Saccharomyces cerevisiae* cell factories[J]. *Separation and Purification Technology*, 2022, 290: 120880.
- [39] HU TY, ZHOU JW, TONG YR, SU P, LI XL, LIU Y, LIU N, WU XY, ZHANG YF, WANG JD, GAO LH, TU LC, LU Y, JIANG ZQ, ZHOU YJ, GAO W, HUANG LQ. Engineering chimeric diterpene synthases and isoprenoid biosynthetic pathways enables high-level production of miltiradiene in yeast[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 60: 87-96.
- [40] CAO X, YU W, CHEN Y, YANG S, ZHAO ZK, NIELSEN J, LUAN HW, ZHOU YJ. Engineering yeast for high-level production of diterpenoid sclareol[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 75: 19-28.
- [41] XU YM, WANG XL, ZHANG CY, ZHOU X, XU XH, HAN LY, LV XQ, LIU YF, LIU S, LI JH, DU GC, CHEN J, LEDESMA-AMARO R, LIU L. *De novo* biosynthesis of rubusoside and rebaudiosides in engineered yeasts[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3040.
- [42] 徐雅梦. 代谢工程改造酿酒酵母从头合成甜茶苷及其衍生物莱鲍迪苷 M[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2022.
XU YM. *Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for de novo biosynthesis of rubusoside and rebaudioside M*[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2022 (in Chinese).
- [43] YU Y, CHANG PC, YU H, REN HY, HONG DN, LI ZY, WANG Y, SONG H, HUO YX, LI C. Productive amyirin synthases for efficient α -amyirin synthesis in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(10): 2391-2402.
- [44] LIU H, FAN JJ, WANG C, LI C, ZHOU XH. Enhanced β -amyirin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by coupling an optimal acetyl-CoA supply pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(13): 3723-3732.
- [45] JIN K, SHI X, LIU JH, YU WW, LIU YF, LI JH, DU GC, LV XQ, LIU L. Combinatorial metabolic engineering enables the efficient production of ursolic acid and oleanolic acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 374: 128819.
- [46] BRÖKER JN, MÜLLER B, van DEENEN N, PRÜFER D, SCHULZE GRONOVER C. Upregulating the mevalonate pathway and repressing sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* enhances the production of triterpenes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(16): 6923-6934.
- [47] 高惠芳. 合成五环三萜化合物酿酒酵母细胞工厂的构建[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2021.
GAO HF. *Construction of cell factories for production of pentacyclic triterpenoids in Saccharomyces cerevisiae*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [48] 高惠芳, 邵明龙, 周武林, 张显, 杨套伟, 徐美娟, 高晓冬, 饶志明. 构建酿酒酵母细胞工厂高效合成摩尔酸[J]. *微生物学报*, 2021, 61(11): 3506-3519.
GAO HF, SHAO ML, ZHOU WL, ZHANG X, YANG

- TW, XU MJ, GAO XD, RAO ZM. Efficient biosynthesis of morolic acid in *Saccharomyces cerevisiae* cell factories[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(11): 3506-3519 (in Chinese).
- [49] WANG CX, SU XY, SUN MC, ZHANG MT, WU JJ, XING JM, WANG Y, XUE JP, LIU X, SUN W, CHEN SL. Efficient production of glycyrrhetic acid in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* via an integrated strategy[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 95.
- [50] ZHOU K, YU C, LIANG N, XIAO WH, WANG Y, YAO MD, YUAN YJ. Adaptive evolution and metabolic engineering boost lycopene production in *Saccharomyces cerevisiae* via enhanced precursors supply and utilization[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(8): 3821-3831.
- [51] WEINERT BT, IESMANTAVICIUS V, MOUSTAFA T, SCHÖLZ C, WAGNER SA, MAGNES C, ZECHNER R, CHOUDHARY C. Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2014, 10(1): 716.
- [52] TAKAHASHI H, McCAFFERY JM, IRIZARRY RA, BOEKE JD. Nucleocytoplasmic acetyl-coenzyme A synthetase is required for histone acetylation and global transcription[J]. *Molecular Cell*, 2006, 23(2): 207-217.
- [53] BULUSU V, TUMANOV S, MICHALOPOULOU E, van den BROEK NJ, MacKAY G, NIXON C, DHAYADE S, SCHUG ZT, VANDE VOORDE J, BLYTH K, GOTTLIEB E, VAZQUEZ A, KAMPHORST JJ. Acetate recapturing by nuclear acetyl-CoA synthetase 2 prevents loss of histone acetylation during oxygen and serum limitation[J]. *Cell Reports*, 2017, 18(3): 647-658.
- [54] NIELSEN J. Synthetic biology for engineering acetyl coenzyme A metabolism in yeast[J]. *mBio*, 2014, 5(6): e02153.
- [55] SHIBA Y, PARADISE EM, KIRBY J, RO DK, KEASLING JD. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids[J]. *Metabolic Engineering*, 2007, 9(2): 160-168.
- [56] LIAN JZ, SI T, NAIR NU, ZHAO HM. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 139-149.
- [57] YU T, ZHOU YJ, HUANG MT, LIU QL, PEREIRA R, DAVID F, NIELSEN J. Reprogramming yeast metabolism from alcoholic fermentation to lipogenesis[J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1549-1558.e14.
- [58] MEADOWS AL, HAWKINS KM, TSEGAYE Y, ANTIPOV E, KIM Y, RAETZ L, DAHL RH, TAI AN, MAHATDEJKUL-MEADOWS T, XU L, ZHAO LS, DASIKA MS, MURARKA A, LENIHAN J, ENG DA, LENG JS, LIU CL, WENGER JW, JIANG HX, CHAO L, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production[J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 694-697.
- [59] BERGMAN A, HELLGREN J, MORITZ T, SIEWERS V, NIELSEN J, CHEN Y. Heterologous phosphoketolase expression redirects flux towards acetate, perturbs sugar phosphate pools and increases respiratory demand in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 25.
- [60] FATLAND BL, NIKOLAU BJ, WURTELE ES. Reverse genetic characterization of cytosolic acetyl-CoA generation by ATP-citrate lyase in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(1): 182-203.
- [61] CHEN Y, DAVIET L, SCHALK M, SIEWERS V, NIELSEN J. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 48-54.
- [62] QIN N, LI LY, JI X, LI XW, ZHANG YM, LARSSON C, CHEN Y, NIELSEN J, LIU ZH. Rewiring central carbon metabolism ensures increased provision of acetyl-CoA and NADPH required for 3-OH-propionic acid production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(12): 3236-3244.
- [63] KANDLER O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1983, 49(3): 209-224.
- [64] EVANS CT, RATLEDGE C. Induction of xylulose-5-phosphate phosphoketolase in a variety of yeasts grown on D-xylose: the key to efficient xylose metabolism[J]. *Archives of Microbiology*, 1984, 139(1): 48-52.
- [65] 季旭. 磷酸转酮酶定向进化及3-羟基丙酸生产应用[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2021.
- JI X. Directed evolution of phosphotransketolase and application of 3-hydroxypropionic acid production[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2021 (in Chinese).
- [66] de JONG BW, SHI SB, SIEWERS V, NIELSEN J. Improved production of fatty acid ethyl esters in *Saccharomyces cerevisiae* through up-regulation of the ethanol degradation pathway and expression of the heterologous phosphoketolase pathway[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 39.

- [67] HELLGREN J, GODINA A, NIELSEN J, SIEWERS V. Promiscuous phosphoketolase and metabolic rewiring enables novel non-oxidative glycolysis in yeast for high-yield production of acetyl-CoA derived products[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 150-160.
- [68] DAI ZJ, HUANG MT, CHEN Y, SIEWERS V, NIELSEN J. Global rewiring of cellular metabolism renders *Saccharomyces cerevisiae* Crabtree negative[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3059.
- [69] WEGNER SA, CHEN JM, IP SS, ZHANG YF, DUGAR D, AVALOS JL. Engineering acetyl-CoA supply and ERG9 repression to enhance mevalonate production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2021, 48(9-10): kuab050.
- [70] HAMPTON RY, RINE J. Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1994, 125(2): 299-312.
- [71] VEEN M, STAHL U, LANG C. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2003, 4(1): 87-95.
- [72] DONALD KA, HAMPTON RY, FRITZ IB. Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9): 3341-3344.
- [73] AMIRI P, SHAHPURI A, ALI ASADOLLAHI M, MOMENBEIK F, PARTOW S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for linalool production[J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(3): 503-508.
- [74] LIU JD, ZHANG WP, DU GC, CHEN J, ZHOU JW. Overproduction of geraniol by enhanced precursor supply in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 168(4): 446-451.
- [75] MENG XF, LIU H, XU WQ, ZHANG WX, WANG Z, LIU WF. Metabolic engineering *Saccharomyces cerevisiae* for *de novo* production of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 21.
- [76] LU SR, ZHOU CY, GUO XN, DU ZD, CHENG YF, WANG ZY, HE XP. Enhancing fluxes through the mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by engineering the HMGR and β -alanine metabolism[J]. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(8): 2292-2306.
- [77] CHANDRAN SS, KEALEY JT, REEVES CD. Microbial production of isoprenoids[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(9): 1703-1710.
- [78] CHEN HL, LI MJ, LIU CQ, ZHANG HB, XIAN M, LIU HZ. Enhancement of the catalytic activity of isopentenyl diphosphate isomerase (IDI) from *Saccharomyces cerevisiae* through random and site-directed mutagenesis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 65.
- [79] UTOMO JC, CHAVES FC, BAUCHART P, MARTIN VJJ, RO DK. Developing a yeast platform strain for an enhanced taxadiene biosynthesis by CRISPR/Cas9[J]. *Metabolites*, 2021, 11(3): 147.
- [80] YUAN JF, CHING CB. Combinatorial engineering of mevalonate pathway for improved amorpho-4,11-diene production in budding yeast[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(3): 608-617.
- [81] HU QY, ZHANG TL, YU HW, YE LD. Selective biosynthesis of retinol in *S. cerevisiae*[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 22.
- [82] LIAN JZ, MISHRA S, ZHAO HM. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: new tools and their applications[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 85-108.
- [83] YANG JZ, LIANG JC, SHAO L, LIU LH, GAO K, ZHANG JL, SUN ZJ, XU WD, LIN PC, YU RM, ZI JC. Green production of silybin and isosilybin by merging metabolic engineering approaches and enzymatic catalysis[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 59: 44-52.
- [84] KIM JE, JANG IS, SUNG BH, KIM SC, LEE JY. Rerouting of NADPH synthetic pathways for increased protopanaxadiol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 15820.
- [85] SHI YT, DONG TY, ZENG BX, YAO MD, WANG Y, XIE ZX, XIAO WH, YUAN YJ. Production of plant sesquiterpene lactone parthenolide in the yeast cell factory[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(7): 2473-2483.
- [86] CHEN RB, GAO JQ, YU W, CHEN XH, ZHAI XX, CHEN Y, ZHANG L, ZHOU YJ. Engineering cofactor supply and recycling to drive phenolic acid biosynthesis in yeast[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18: 520-529.
- [87] KWAK S, YUN EJ, LANE S, OH EJ, KIM KH, JIN YS. Redirection of the glycolytic flux enhances isoprenoid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Journal*, 2020, 15(2): 1900173.
- [88] HUANG Y, JIANG D, REN GX, YIN Y, SUN YF, LIU TF, LIU CS. *De novo* production of glycyrrhetic acid

- 3-O-mono- β -D-glucuronide in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 709120.
- [89] YU T, LIU QL, WANG X, LIU XJ, CHEN Y, NIELSEN J. Metabolic reconfiguration enables synthetic reductive metabolism in yeast[J]. *Nature Metabolism*, 2022, 4(11): 1551-1559.
- [90] WANG HR, JIANG GZ, LIANG N, DONG TY, SHAN MY, YAO MD, WANG Y, XIAO WH, YUAN YJ. Systematic engineering to enhance 8-hydroxygeraniol production in yeast[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(10): 4319-4327.
- [91] LAROCHELLE M, DROUIN S, ROBERT F, TURCOTTE B. Oxidative stress-activated zinc cluster protein Stb5 has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(17): 6690-6701.
- [92] ANDERSON MS, YARGER JG, BURCK CL, POULTER CD. Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(32): 19176-19184.
- [93] 王征. 倍半萜吉马烯 A 在酿酒酵母中的高效合成[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2019.
WANG Z. High-efficiency biosynthesis of the sesquiterpene gemmaene A in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2019 (in Chinese).
- [94] IGNEA C, PONTINI M, MAFFEI ME, MAKRIS AM, KAMPRANIS SC. Engineering monoterpene production in yeast using a synthetic dominant negative geranyl diphosphate synthase[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(5): 298-306.
- [95] FISCHER MJC, MEYER S, CLAUDEL P, BERGDOLL M, KARST F. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(8): 1883-1892.
- [96] 陈天华, 张若思, 姜国珍, 姚明东, 刘宏, 王颖, 肖文海, 元英进. 产蒎烯人工酵母细胞的构建[J]. *化工学报*, 2019, 70(1): 179-188.
CHEN TH, ZHANG RS, JIANG GZ, YAO MD, LIU H, WANG Y, XIAO WH, YUAN YJ. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for pinene production[J]. *CIESC Journal*, 2019, 70(1): 179-188 (in Chinese).
- [97] PROMDONKOY P, SORNLEK W, PREECHAKUL T, TANAPONGPIPAT S, RUNGUPHAN W. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fragrant terpenoids from agarwood and sandalwood[J]. *Fermentation*, 2022, 8(9): 429.
- [98] PENG BY, PLAN MR, CHRYSANTHOPOULOS P, HODSON MP, NIELSEN LK, VICKERS CE. A squalene synthase protein degradation method for improved sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 209-219.
- [99] MARTIN VJJ, PITERA DJ, WITHERS ST, NEWMAN JD, KEASLING JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(7): 796-802.
- [100] DAHL RH, ZHANG FZ, ALONSO-GUTIERREZ J, BAIDOO E, BATH TS, REDDING-JOHANSON AM, PETZOLD CJ, MUKHOPADHYAY A, LEE TS, ADAMS PD, KEASLING JD. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(11): 1039-1046.
- [101] ZHANG GL, CAO Q, LIU JZ, LIU BY, LI J, LI C. Refactoring β -amyrin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *AIChE Journal*, 2015, 61(10): 3172-3179.
- [102] LEBER R, ZENZ R, SCHRÖTTNER K, FUCHSBICHLER S, PÜHRINGER B, TURNOWSKY F. A novel sequence element is involved in the transcriptional regulation of expression of the ERG1 (squalene epoxidase) gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(4): 914-924.
- [103] LI J, ZHANG YS. Increase of betulinic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by balancing fatty acids and betulinic acid forming pathways[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(7): 3081-3089.
- [104] MONTAÑÉS FM, PASCUAL-AHUIR A, PROFT M. Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(4): 1008-1023.
- [105] HENRY KW, NICKELS JT, EDLIND TD. ROX1 and ERG regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for antifungal susceptibility[J]. *Eukaryotic Cell*, 2002, 1(6): 1041-1044.
- [106] HONGAY C, JIA N, BARD M, WINSTON F. Mot3 is a transcriptional repressor of ergosterol biosynthetic genes and is required for normal vacuolar function in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The EMBO Journal*,

- 2002, 21(15): 4114-4124.
- [107] ÖZAYDİN B, BURD H, LEE TS, KEASLING JD. Carotenoid-based phenotypic screen of the yeast deletion collection reveals new genes with roles in isoprenoid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 174-183.
- [108] 杨婷婷, 王冬, 李文豪, 石玉松, 李荣生, 马文建, 戴住波, 张学礼. 创建酿酒酵母细胞工厂发酵生产芳香精油瓦伦烯[J]. *药学学报*, 2023, 58(6): 1619-1628. YANG TT, WANG D, LI WH, SHI YS, LI RS, MA WJ, DAI ZB, ZHANG XL. Construction of cell factories for production of valencene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2023, 58(6): 1619-1628 (in Chinese).
- [109] 焦学. 代谢改造酿酒酵母分泌合成生育三烯酚的研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2022. JIAO X. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for secretory production of tocotrienols[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2022 (in Chinese).
- [110] BRANCO J, OLA M, SILVA RM, FONSECA E, GOMES NC, MARTINS-CRUZ C, SILVA AP, SILVA-DIAS A, PINA-VAZ C, ERRAUGHT C, BRENNAN L, RODRIGUES AG, BUTLER G, MIRANDA IM. Impact of *ERG3* mutations and expression of ergosterol genes controlled by *UPC2* and *NDT80* in *Candida parapsilosis* azole resistance[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2017, 23(8): 575.e1-575.e8.
- [111] CHEN Y, XIAO WH, WANG Y, LIU H, LI X, YUAN YJ. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 113.
- [112] TRIKKA FA, NIKOLAIDIS A, ATHANASAKOGLU A, ANDREADELLI A, IGNEA C, KOTTA K, ARGIRIOU A, KAMPRANIS SC, MAKRIS AM. Iterative carotenogenic screens identify combinations of yeast gene deletions that enhance sclareol production[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 60.
- [113] PARAMASIVAN K, ABDULLA A, GUPTA N, MUTTURI S. *In silico* target-based strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for terpene precursor improvement[J]. *Integrative Biology*, 2022, 14(2): 25-36.
- [114] LÜCKER J, EL TAMER MK, SCHWAB W, VERSTAPPEN FWA, van der PLAS LHW, BOUWMEESTER HJ, VERHOEVEN HA. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*). cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(13): 3160-3171.
- [115] JONGEDIJK E, CANKAR K, RANZIEN J, van der KROL S, BOUWMEESTER H, BEEKWILDER J. Capturing of the monoterpene olefin limonene produced in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 2015, 32(1): 159-171.
- [116] LANDMANN C, FINK B, FESTNER M, DREGUS M, ENGEL KH, SCHWAB W. Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*)[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 465(2): 417-429.
- [117] 付闻文. 法尼烯合成酶性质研究及酿酒酵母法尼烯合成[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2021. FU WW. Characteristics of farnesene synthase and farnesene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [118] 付闻文, 王均华, 李由然, 石贵阳. 甜橙来源法尼烯合成酶的异源表达及酶学性质研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(21): 79-85. FU WW, WANG JH, LI YR, SHI GY. Heterologous expression and enzymatic properties of farnesene synthase from *Citrus sinensis*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(21): 79-85 (in Chinese).
- [119] TASHIRO M, KIYOTA H, KAWAI-NOMA S, SAITO K, IKEUCHI M, IJIMA Y, UMENO D. Bacterial production of pinene by a laboratory-evolved pinene-synthase[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(9): 1011-1020.
- [120] ZHOU PP, DU Y, XU NN, YUE CL, YE LD. Improved linalool production in *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution of linalool synthase and overexpression of the complete mevalonate pathway[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 161: 107655.
- [121] ZHANG WX, GUO JQ, WANG Z, LI YW, MENG XF, SHEN Y, LIU WF. Improved production of germacrene A, a direct precursor of β -elemene, in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by expressing a cyanobacterial germacrene A synthase[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 7.
- [122] WILLIAMS DC, McGARVEY DJ, KATAHIRA EJ, CROTEAU R. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(35): 12213-12220.

- [123] TURNER G, GERSHENZON J, NIELSON EE, FROEHLICH JE, CROTEAU R. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(3): 879-886.
- [124] BOHLMANN J, MEYER-GAUEN G, CROTEAU R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(8): 4126-4133.
- [125] RAN GQ, TAN D, DAI WE, ZHU XL, ZHAO JP, MA Q, LU XY. Immobilization of alkaline polygalacturonate lyase from *Bacillus subtilis* on the surface of bacterial polyhydroxyalkanoate nano-granules[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(8): 3247-3258.
- [126] RAN GQ, TAN D, ZHAO JP, FAN F, ZHANG Q, WU XJ, FAN PY, FANG XL, LU XY. Functionalized polyhydroxyalkanoate nano-beads as a stable biocatalyst for cost-effective production of the rare sugar D-allulose[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289: 121673.
- [127] SIDDIQUI MS, THODEY K, TRENCHARD I, SMOLKE CD. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools[J]. *FEMS Yeast Research*, 2012, 12(2): 144-170.
- [128] DUEBER JE, WU GC, MALMIRCHEGINI GR, MOON TS, PETZOLD CJ, ULLAL AV, PRATHER KLJ, KEASLING JD. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(8): 753-759.
- [129] ALBERTSEN L, CHEN Y, BACH LS, RATTLEFF S, MAURY J, BRIX S, NIELSEN J, MORTENSEN UH. Diversion of flux toward sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* by fusion of host and heterologous enzymes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(3): 1033-1040.
- [130] GOKHALE RS, KHOSLA C. Role of linkers in communication between protein modules[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4(1): 22-27.
- [131] ARAI R, UEDA H, KITAYAMA A, KAMIYA N, NAGAMUNE T. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein[J]. *Protein Engineering*, 2001, 14(8): 529-532.
- [132] KANG W, MA T, LIU M, QU JL, LIU ZJ, ZHANG HW, SHI B, FU S, MA JC, LAI LTF, HE SC, QU JN, AU SWN, KANG BH, YU LAU WC, DENG ZX, XIA J, LIU TG. Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4248.
- [133] SUN XX, YUAN YJ, CHEN QT, NIE SQ, GUO JX, OU ZT, HUANG M, DENG ZX, LIU TG, MA T. Metabolic pathway assembly using docking domains from type I *cis*-AT polyketide synthases[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5541.
- [134] URLACHER VB, GIRHARD M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application[J]. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30(1): 26-36.
- [135] GUO J, MA XH, CAI Y, MA Y, ZHAN ZL, ZHOU YJ, LIU WJ, GUAN MX, YANG J, CUI GH, KANG LP, YANG L, SHEN Y, TANG JF, LIN HX, MA XJ, JIN BL, LIU ZM, PETERS RJ, ZHAO ZK, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones[J]. *New Phytologist*, 2016, 210(2): 525-534.
- [136] LI M, ZHAO MY, WEI PP, ZHANG CB, LU WY. Biosynthesis of soyasapogenol B by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(10): 3202-3213.
- [137] WONG J, D'ESPAUX L, DEV I, van der HORST C, KEASLING J. *De novo* synthesis of the sedative valerenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 94-101.
- [138] CHEN CC, MIN J, ZHANG LL, YANG Y, YU XJ, GUO RT. Advanced understanding of the electron transfer pathway of cytochrome P450s[J]. *Chembiochem*, 2021, 22(8): 1317-1328.
- [139] ZHAO YJ, FAN JJ, WANG C, FENG XD, LI C. Enhancing oleanolic acid production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 257: 339-343.
- [140] URLACHER VB, MAKHSUMKHANOV A, SCHMID RD. Biotransformation of β -ionone by engineered cytochrome P450 BM-3[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(1): 53-59.
- [141] SUN WT, XUE HJ, LIU H, LV B, YU Y, WANG Y, HUANG ML, LI C. Controlling chemo- and regioselectivity of a plant P450 in yeast cell toward rare licorice triterpenoid biosynthesis[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(7): 4253-4260.
- [142] ZHAO FL, BAI P, LIU T, LI DS, ZHANG XM, LU WY, YUAN YJ. Optimization of a cytochrome P450 oxidation system for enhancing protopanaxadiol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(8): 1787-1795.

- [143] SHI YS, WANG D, LI RS, HUANG LQ, DAI ZB, ZHANG XL. Engineering yeast subcellular compartments for increased production of the lipophilic natural products ginsenosides[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67: 104-111.
- [144] YUAN JF, CHING CB. Mitochondrial acetyl-CoA utilization pathway for terpenoid productions[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 303-309.
- [145] YEE DA, DeNICOLA AB, BILLINGSLEY JM, CRESO JG, SUBRAHMANYAM V, TANG Y. Engineered mitochondrial production of monoterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 76-84.
- [146] LV XM, WANG F, ZHOU PP, YE LD, XIE WP, XU HM, YU HW. Dual regulation of cytoplasmic and mitochondrial acetyl-CoA utilization for improved isoprene production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12851.
- [147] YAO Z, ZHOU PP, SU BM, SU SS, YE LD, YU HW. Enhanced isoprene production by reconstruction of metabolic balance between strengthened precursor supply and improved isoprene synthase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(9): 2308-2316.
- [148] KIM JE, JANG IS, SON SH, KO YJ, CHO BK, KIM SC, LEE JY. Tailoring the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum for functional assembly of terpene synthesis pathway[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 50-59.
- [149] ARENDT P, MIETTINEN K, POLLIER J, de RYCKE R, CALLEWAERT N, GOOSSENS A. An endoplasmic reticulum-engineered yeast platform for overproduction of triterpenoids[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 165-175.
- [150] MURPHY S, MARTIN S, PARTON RG. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2009, 1791(6): 441-447.
- [151] SPANOVA M, CZABANY T, ZELLNIG G, LEITNER E, HAPALA I, DAUM G. Effect of lipid particle biogenesis on the subcellular distribution of squalene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(9): 6127-6133.
- [152] SPANOVA M, ZWEYTICK D, LOHNER K, KLUG L, LEITNER E, HERMETTER A, DAUM G. Influence of squalene on lipid particle/droplet and membrane organization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2012, 1821(4): 647-653.
- [153] WEI LJ, KWAK S, LIU JJ, LANE S, HUA Q, KWEON DH, JIN YS. Improved squalene production through increasing lipid contents in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(7): 1793-1800.
- [154] 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.
- [155] 饶攀. 通过细胞器工程技术改造优化酿酒酵母合成原人参二醇[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2022.
RAO P. Modification and optimization of protopanaxadiol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* through organelle engineering[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2022 (in Chinese).
- [156] 赵一瑾. 代谢工程改造酿酒酵母生产萜类化合物[D]. 北京: 北京化工大学博士学位论文, 2021.
ZHAO YJ. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for terpenoids production[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing University of Chemical Technology, 2021 (in Chinese).
- [157] BRENNAN TCR, TURNER CD, KRÖMER JO, NIELSEN LK. Alleviating monoterpene toxicity using a two-phase extractive fermentation for the bioproduction of jet fuel mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(10): 2513-2522.
- [158] BRENNAN TCR, KRÖMER JO, NIELSEN LK. Physiological and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to D-limonene show changes to the cell wall but not to the plasma membrane[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(12): 3590-3600.
- [159] MO HB, ELSON CE. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2004, 229(7): 567-585.
- [160] LIU J, ZHU Y, DU G, ZHOU J, CHEN J. Exogenous ergosterol protects *Saccharomyces cerevisiae* from D-limonene stress[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(2): 482-491.
- [161] BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, ZHIRI A, IDAOMAR M. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces*

- cerevisiae*[J]. Mutation Research, 2005, 585(1/2): 1-13.
- [162] URIBE S, RAMIREZ J, PEÑA A. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions[J]. Journal of Bacteriology, 1985, 161(3): 1195-1200.
- [163] ALONSO-GUTIERREZ J, CHAN R, BATH TS, ADAMS PD, KEASLING JD, PETZOLD CJ, LEE TS. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production[J]. Metabolic Engineering, 2013, 19: 33-41.
- [164] ZHANG L, XIAO WH, WANG Y, YAO MD, JIANG GZ, ZENG BX, ZHANG RS, YUAN YJ. Chassis and key enzymes engineering for monoterpenes production[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(8): 1022-1031.
- [165] DUNLOP MJ, DOSSANI ZY, SZMIDT HL, CHU HC, LEE TS, KEASLING JD, HADI MZ, MUKHOPADHYAY A. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps[J]. Molecular Systems Biology, 2011, 7: 487.
- [166] WANG Y, LIM L, DiGIUSTINI S, ROBERTSON G, BOHLMANN J, BREUIL C. A specialized ABC efflux transporter GcABC-G1 confers monoterpene resistance to *Grossmannia clavigera*, a bark beetle-associated fungal pathogen of pine trees[J]. New Phytologist, 2013, 197(3): 886-898.
- [167] CHEN BB, LING H, CHANG MW. Transporter engineering for improved tolerance against alkane biofuels in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 21.
- [168] 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.
- [169] LING H, CHEN BB, KANG A, LEE JM, CHANG MW. Transcriptome response to alkane biofuels in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of efflux pumps involved in alkane tolerance[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 95.
- [170] BU X, LIN JY, CHENG J, YANG D, DUAN CQ, KOFFAS M, YAN GL. Engineering endogenous ABC transporter with improving ATP supply and membrane flexibility enhances the secretion of β -carotene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 168.
- [171] LIU JH, WANG XL, JIN K, LIU YF, LI JH, DU GC, LV XQ, LIU L. *In silico* prediction and mining of exporters for secretory bioproduction of terpenoids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(3): 863-876.
- [172] XU YM, HAN LY, CHENG Y, ZHANG YL, WU YK, LIU YF, LI JH, DU GC, LV XQ, LIU L. ATP-binding cassette exporter PDR11-mediated terpenoid secretion in engineered yeast[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(4): 1146-1153.
- [173] CHUBUKOV V, MINGARDON F, SCHACKWITZ W, BAIDOO EEK, ALONSO-GUTIERREZ J, HU QJ, LEE TS, KEASLING JD, MUKHOPADHYAY A. Acute limonene toxicity in *Escherichia coli* is caused by limonene hydroperoxide and alleviated by a point mutation in alkyl hydroperoxidase AhpC[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(14): 4690-4696.
- [174] BRENNAN TCR, WILLIAMS TC, SCHULZ BL, PALFREYMAN RW, KRÖMER JO, NIELSEN LK. Evolutionary engineering improves tolerance for replacement jet fuels in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(10): 3316-3325.
- [175] GODARA A, KAO KC. Adaptive laboratory evolution of β -caryophyllene producing *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 106.
- [176] REYES LH, KAO KC. Growth-coupled carotenoids production using adaptive laboratory evolution[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1671: 319-330.
- [177] JIANG GZ, YANG ZM, WANG Y, YAO MD, CHEN Y, XIAO WH, YUAN YJ. Enhanced astaxanthin production in yeast *via* combined mutagenesis and evolution[J]. Biochemical Engineering Journal, 2020, 156: 107519.
- [178] TAN D, WANG Y, TONG Y, CHEN GQ. Grand challenges for industrializing polyhydroxyalkanoates (PHAs)[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(9): 953-963.

(本文责编 郝丽芳)