



## 专论与综述

## 代谢工程改造解脂耶氏酵母合成植物萜类化合物的研究进展

孔婧 朱坤 刘士琦 荣兰新 肖冬光 于爱群\*

天津科技大学生物工程学院 省部共建食品营养与安全国家重点实验室 工业发酵微生物教育部重点实验室  
天津市工业微生物重点实验室 天津 300457

**摘要:** 萜类化合物是一类广泛存在于植物中的天然产物, 其在食品、药品和化工等多个领域中均有广泛的用途, 市场潜力巨大。因此, 开发生产萜类化合物等植物天然产物可再生的微生物资源来补充甚至代替原有稀少和珍贵的植物资源, 具有重要的理论意义和潜在的应用价值。解脂耶氏酵母是目前使用最广泛的非常规酵母底盘细胞之一。近年来, 利用代谢工程及合成生物学技术在解脂耶氏酵母底盘细胞中重构与优化萜类化合物的合成途径以实现目标代谢产物的高效合成, 已经成为一项研究热点。本文系统总结了有关利用解脂耶氏酵母作为底盘细胞异源生产植物萜类化合物的具体实例和最新进展, 包括所涉及的宿主菌株、关键酶、代谢途径及改造策略等, 并在最后对该领域的未来发展方向进行了展望。

**关键词:** 代谢工程, 解脂耶氏酵母, 植物天然产物, 萜类

Advances in metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to synthesize plant-derived terpenoids

KONG Jing ZHU Kun LIU Shiqi RONG Lanxin XIAO Dongguang YU Aiqun\*

State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety; Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education; Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology; College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** Terpenoids are an important class of plant natural products that exhibit a broad range of biological activities. They have a wide range of applications in the food, pharmaceutical and chemical industries, which lead to a huge increase in market demand for them. It is therefore of great importance to develop alternative sources of these value-added products to supplement or even replace the scarce and precious plant resources. At present, the well-known unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* is fast becoming a promising chassis for the production of biofuels and biochemicals. In recent years, metabolic engineering of *Y. lipolytica* has provided a platform for effective production of valuable terpenoids. This review reports and summarizes some of the most interesting and promising recent progress of heterologous

**Foundation items:** Tianjin Natural Science Foundation (17JCYBJC40800); Tianjin Education Commission Scientific Research Project (2017ZD03)

\*Corresponding author: Tel: 86-22-60602723; E-mail: yuaiqun@tust.edu.cn

**Received:** 11-06-2020; **Accepted:** 12-08-2020; **Published online:** 12-10-2020

基金项目: 天津市自然科学基金(17JCYBJC40800); 天津市教委科研计划(2017ZD03)

\*通信作者: Tel: 022-60602723; E-mail: yuaiqun@tust.edu.cn

收稿日期: 2020-06-11; 接受日期: 2020-08-12; 网络首发日期: 2020-10-12

microbial production of plant terpenoids in the engineered *Y. lipolytica* strains, by elucidating the host strains, key enzymes, metabolic pathways, engineering strategies and product titers/yields. In addition, key challenges and future perspectives in this field are discussed.

**Keywords:** metabolic engineering, *Yarrowia lipolytica*, plant natural products, terpenoids

近年来,许多非常规酵母因其具有优良的生化代谢特征而受到人们的广泛关注。解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)就是一种具有典型代表性的非常规酵母。该酵母是严格好氧菌,同时也是一种“安全级”(Generally Regarded as Safe, GRAS)的微生物<sup>[1]</sup>。与常规酵母——酿酒酵母相比,解脂耶氏酵母具有一些明显不同的代谢特点,显示出更好的工业应用前景:(1) 该酵母自身具有将多种廉价生物原料快速转化为各种高附加值化学品如柠檬酸、琥珀酸的代谢能力,生产基于脂质的油性化学品的能力也较强<sup>[2]</sup>。(2) 该酵母对油脂类物质具有较强的降解能力,因此可用于对废油污染的生物修复<sup>[3]</sup>。(3) 该酵母具有更高效分泌蛋白质和有机酸(如 $\alpha$ -酮戊二酸和琥珀酸)的能力<sup>[4]</sup>。(4) 该酵母对生长条件的要求更低,在各种碳源、pH和盐度条件下均可生长<sup>[5]</sup>。(5) 该酵母并不受葡萄糖效应的影响,因此不会进行有氧酒精发酵<sup>[6]</sup>。随着解脂耶氏酵母全基因组序列的公布以及基因表达载体、遗传转化方法、合成生物学元件和基因编辑技术的快速发展,该酵母已经成为目前代谢工程及合成生物学研究中备受关注且极具潜力的非模式微生物底盘细胞之一。

植物天然产物(Plant-Derived Natural Products)是指植物体内具有生物学活性的一类次生代谢产物。植物种类和生态环境的多样性造就了植物天然产物结构和性能的丰富多样性<sup>[7]</sup>,因此,植物天然产物的种类和数量非常巨大,目前已知的种类主要包括萜类、生物碱类、甾体类、黄酮类及酚类等。其中,萜类(Terpenoids)又是植物天然产物中数量最多、分布最广的一大类物质,其是以异戊二烯为结构单元的一系列化合物的统称。多数萜类化合物具有药理学和生物学活性,也可以作为香料、药物、

色素等精细化学品的重要生产原料,因此在食品、药品和化工等多个领域应用广泛<sup>[8]</sup>。目前,萜类化合物的工业生产主要还是通过直接从植物中提取而得,但是这一生产方式存在诸多弊端,如植物资源稀缺、目标物质含量低、分离纯化效率低等。利用化学合成法也能够生产萜类化合物,但这种生产方式同样存在环境污染严重、能源消耗大、设备要求高、原料利用率低等问题。随着人们对健康、能源和环境等问题关注度的提高,利用微生物代谢工程及合成生物学技术实现萜类化合物的绿色生产就成为了一个研究热点。相比植物提取法和化学合成法,这种微生物合成法具有反应条件温和、低碳环保和可持续发展等优点,因此具有广阔的发展前景。近年来,随着微生物代谢工程及合成生物学等相关技术的突破性发展,利用微生物合成法生产萜类化合物有望成为替代植物提取法和化学合成法的一种有效策略。

解脂耶氏酵母正在成为代谢工程及合成生物学领域中一种重要的新型非模式微生物底盘细胞。而且,与大肠杆菌相比,解脂耶氏酵母具有完整的内膜系统和与植物相类似的蛋白质翻译后修饰系统,更适合植物源蛋白质的表达;除此之外,与大肠杆菌和酿酒酵母相比,解脂耶氏酵母属于典型的产油酵母,细胞内脂肪酸(Fatty Acid)、脂酰辅酶A(Fatty Acyl-CoA)以及乙酰辅酶A(Acetyl-CoA)的积累量较高<sup>[2]</sup>,因此,该酵母在生产植物萜类化合物(乙酰辅酶A衍生物,Acetyl-CoA Derived Products)方面具有明显优势,发展前景广阔。有鉴于此,本文对近年来以解脂耶氏酵母作为底盘细胞异源生产植物萜类化合物的有关实例进行了系统的总结和梳理,并对相关发展前景进行了分析,以期从事相关研究科研人员开辟新的实验思路提供依据。

# 1 在解脂耶氏酵母底盘细胞中所构建的萜类化合物异源合成途径

如图 1 所示, 解脂耶氏酵母自身具有 MVA 途径(Mevalonate Pathway), 可将胞内的乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA)转化生成异戊烯基焦磷酸(Isopentenyl Pyrophosphate, IPP)和二甲基烯丙基

焦磷酸(Dimethylallyl Pyrophosphate, DMAPP)。IPP 和 DMAPP 又在法尼基焦磷酸合酶(Farnesyl Pyrophosphate Synthase, FPPS)/香叶基香叶基焦磷酸合酶(Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase, GGPPS)作用下缩合成了香叶基焦磷酸(Geranyl Pyrophosphate, GPP)、法尼基焦磷酸(Farnesyl

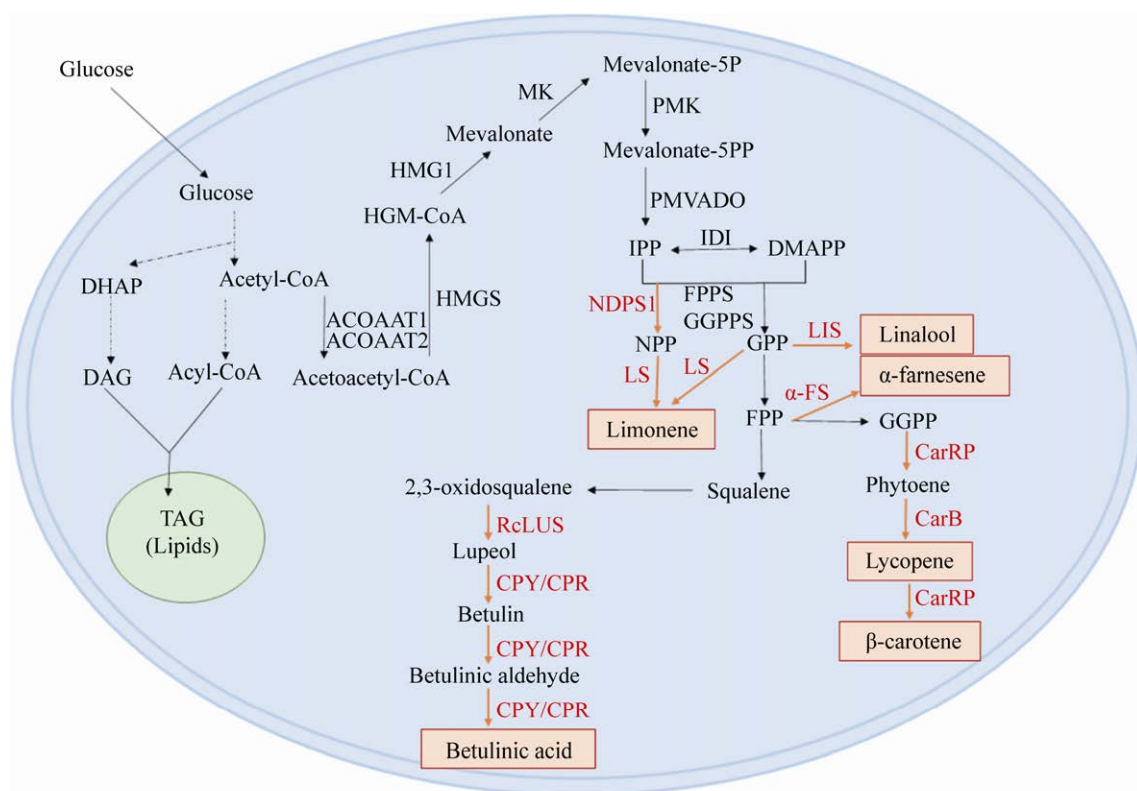


图 1 解脂耶氏酵母异源合成萜类物质的代谢途径

Figure 1 Overview of the biosynthetic pathway of terpenoids in the engineered *Y. lipolytica*

注: ACOAAT1: 乙酰-CoA C-乙酰基转移酶 I; ACOAAT2: 乙酰-CoA C-乙酰基转移酶 II; HMGS: 羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶; HMG1: 羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 I; MK: 甲羟戊酸激酶; PMK: 磷酸甲羟戊酸激酶; PMVADO: 二磷酸甲羟戊酸脱羧酶; IDI: 异戊烯基焦磷酸异构酶; FPPS: 法尼基焦磷酸合酶; GGPPS: 香叶基香叶基焦磷酸合酶; NDPS1: 橙花基焦磷酸合酶 I; LS: 柠檬烯合酶; RCLUS: 羽扇豆醇合酶; CYP: 细胞色素 P450 氧化酶; CPR: 细胞色素 P450 还原酶; LIS: 芳樟醇合酶; α-FS: α-法尼烯合酶; CarRP: 番茄红素环化酶/八氢番茄红素合酶; CarB: 八氢番茄红素脱氢酶。红色箭头表示的是在解脂耶氏酵母中引入外源酶所催化的生化反应, 黑色箭头表示的是解脂耶氏酵母内源存在的生化反应

Note: ACOAAT1: Acetyl-CoA C-acetyltransferase I; ACOAAT2: Acetyl-CoA C-acetyltransferase II; HMGS: Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase; HMG1: Hydroxy methylglutaryl CoA reductase I; MK: Mevalonate kinase; PMK: Phosphomevalonate kinase; PMVADO: Diphosphate mevalonate decarboxylase; IDI: Isopentenyl-diphosphate isomerase; FPPS: Farnesyl pyrophosphate synthase; GGPPS: Geranylgeranyl pyrophosphate synthase; NDPS1: Neryl diphosphate synthase 1; LS: Limonene synthase; RCLUS: Lupeol synthase; CYP: Cytochrome P450 oxidation enzyme; CPR: Cytochrome P450 reductase; LIS: Linalool synthase; α-FS: α-farnesene synthase; CarRP: Lycopene cyclase/phytoene synthase; CarB: Phytoene dehydrogenase. The red arrow indicates the biochemical reaction catalyzed by the introduction of exogenous enzymes into *Y. lipolytica*, and the black arrow indicates the endogenous biochemical reaction of *Y. lipolytica*

Pyrophosphate, FPP)和香叶基香叶基焦磷酸(Geranylgeranyl Pyrophosphate, GGPP)<sup>[9-10]</sup>。解脂耶氏酵母细胞内源产生的 GPP、FPP 和 GGPP 就是各种萜类化合物生物合成的重要前体物质。近年来,研究者们利用代谢工程及合成生物学技术已实现了多种萜类化合物合成途径在解脂耶氏酵母底盘细胞中的重构与优化(表 1)。例如,外源引入的橙花基焦磷酸合酶(Neryl Pyrophosphate Synthase 1, NDPS1)还可催化 IPP 和 DMAPP 转化生成橙花基焦磷酸(Nerylidiphosphate, NPP)。NPP 和 GPP 都可以作为植物源柠檬烯合酶(LS)的底物,进一步转化为单萜化合物——柠檬烯。以 GPP 为底物,异源表达的芳樟醇合酶(LIS)可将其转化生成芳樟醇(Linalool)。以 FPP 为底物,异源表达的 $\alpha$ -法尼烯合酶( $\alpha$ -FS)可将其转化为 $\alpha$ -法尼烯( $\alpha$ -Farnesene)。以 GGPP 为底物,通过引入番茄红素环化酶/八氢番茄红素合酶(CarRP)和八氢番茄红素脱氢酶(CarB),可产生番茄红素(Lycopene)和 $\beta$ -胡萝卜素( $\beta$ -Carotene)。与此同时,FPP 可在内源酶催化下转化为角鲨烯和 2,3-氧化角鲨烯,进一步引入异源羽扇豆醇合酶(RcLUS)、细胞色素 P450 氧化酶(CYP)、细胞色素 P450 还原酶(CPR)后可获

得终产物桦木酸(Betulinic Acid)。

2 代谢工程改造解脂耶氏酵母异源合成萜类化合物的实例

2.1 柠檬烯的生产

柠檬烯(Limonene)是具有柑橘香味的一种功能性单萜,也是被美国 FDA 鉴定为安全的化合物<sup>[21]</sup>,化学式为 C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>。柠檬烯是一种广泛存在于植物中的天然产物,目前已在 300 多种植物中发现有柠檬烯的存在<sup>[22]</sup>。柠檬烯具有多种多样的应用价值,因此每年全世界的产量超过 5 万 t<sup>[23]</sup>。其应用价值主要体现在以下几个方面:(1) 柠檬烯是一种环状烃,被评估为最有生物燃料潜力的物质<sup>[24]</sup>;(2) 柠檬烯是紫苏醇、香芹醇和薄荷醇等物质的重要前体化合物<sup>[25]</sup>,这些产物不仅可以用作高级香精香料,还有很高的药用价值<sup>[11]</sup>。(3) 柠檬烯本身也是最有希望可以被开发为抗癌药剂的单萜类化合物,尤其是用于乳腺癌的治疗<sup>[26]</sup>。正是因为柠檬烯具有的巨大应用潜力,众多研究者近年来纷纷利用解脂耶氏酵母作为底盘细胞进行异源生产柠檬烯的研究,并取得了诸多成果。

表 1 解脂耶氏酵母底盘细胞中异源生产萜类化合物的一些代表性实例

Table 1 Representative examples of terpenoid production in the engineered *Y. lipolytica*

亲本 Parent strain	萜类 Terpenoid	工程策略 Engineering strategy	发酵条件 Fermentation condition	基质 Substrate	滴度/产率/生产率 Titer/Yield/Productivity	参考文献 References
Po1f	d-柠檬烯 d-limonene	(1) 异源表达 <i>NDPS1</i> 和 <i>dLS</i> 基因 Heterologous expression of <i>NDPS1</i> and <i>dLS</i> genes (2) 过表达 <i>HMG1</i> 和 <i>MK</i> 基因 Overexpression of <i>HMG1</i> and <i>MK</i> genes	摇瓶发酵 Shake flask	葡萄糖 Glucose	23.56 mg/L (1.36 mg/g-DCW)	[11]
Po1f	d-柠檬烯 d-limonene	(1) 过表达 <i>tNDPS1</i> 、 <i>tdLS</i> 、 <i>HMG1</i> 和 <i>MK</i> 基因 Overexpression of <i>tNDPS1</i> , <i>tdLS</i> , <i>HMG1</i> and <i>MK</i> genes (2) <i>tdLS</i> 基因的多拷贝表达 Multi-copy expression of <i>tdLS</i> gene	补料分批生物反应器发酵 Fed-batch fermentation	甘油 Glycerol	165.3 mg/L	[12]
Po1g KU70Δ	d-柠檬烯 l-柠檬烯 d-limonene l-limonene	(1) 异源整合 <i>dLS</i> 和 <i>ILS</i> 基因 Heterologous integration of <i>dLS</i> and <i>ILS</i> genes (2) 过表达 <i>HMGR</i> 基因 Overexpression of <i>HMGR</i> gene	摇瓶发酵 Shake flask	废弃食用油 Waste cooking oil	d-柠檬烯 2.514 mg/L; l-柠檬烯 2.723 mg/L; d-limonene 2.514 mg/L; l-limonene 2.723 mg/L	[13]

(待续)

(续表 1)

ATCC 201249	$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -carotene	(1) 异源整合 <i>carS</i> 基因 Heterologous integration of <i>carS</i> gene (2) 设计了 pGPD- <i>carS</i> ORF-lip2t 的基因表达盒 The gene expression cassette of pGPD- <i>carS</i> ORF-lip2t was designed	摇瓶发酵 Shake flask	葡萄糖 Glucose	0.41 mg/g-DCW	[14]
wt-C	$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -carotene	(1) 在 TEF1 启动子的控制下过表达 <i>GGPPS</i> 基因、 <i>CarB</i> 基因和 <i>CarRP</i> 基因 Overexpression of <i>GGPPS</i> gene, <i>CarB</i> gene and <i>CarRP</i> gene under the control of TEF1 promoter (2) <i>GGSI</i> 基因、 <i>CarB</i> 基因和 <i>CarRP</i> 基因的多拷贝表达 Multi-copy expression of <i>GGSI</i> gene, <i>CarB</i> gene and <i>CarRP</i> gene	补料分批生物反应器发酵 Fed-batch fermentation	葡萄糖 Glucose	6.5 g/L (90 mg/g-DCW)	[15]
ATCC 201249	桦木酸 Betulinic acid	(1) 异源整合 <i>RcLUS</i> 基因 Heterologous integration of <i>RcLUS</i> gene (2) 过表达 <i>MFE1</i> 基因、 <i>HMG1</i> 基因、 <i>ERG9</i> 基因、 <i>ERG1</i> 基因、 <i>LJCPR</i> 基因和 <i>BPLO</i> 基因 Overexpression of <i>MFE1</i> gene, <i>HMG1</i> gene, <i>ERG9</i> gene, <i>ERG1</i> gene, <i>LJCPR</i> gene and <i>BPLO</i> gene	补料分批生物反应器发酵 Fed-batch fermentation	葡萄糖 Glucose	48.58 mg/L	[16]
H222 (DSM 27185)	番茄红素 Lycopene	(1) 整合异源基因 <i>CarRP</i> 和 <i>CarB</i> Integrate the heterologous genes <i>CarRP</i> and <i>CarB</i> (2) 过表达 <i>HMG1</i> 和 <i>GGPPS</i> 基因 Overexpression of <i>HMG1</i> and <i>GGPPS</i> genes (3) 敲除 <i>POX1-POX6</i> 基因和 <i>GUT2</i> 基因 Knock out the <i>POX1-POX6</i> gene and <i>GUT2</i> gene	补料分批生物反应器发酵 Fed-batch fermentation	葡萄糖 Glucose	16 mg/g-DCW	[17]
Po1f	番茄红素 Lycopene	(1) 恢复了营养缺陷基因 <i>LEU2</i> 和 <i>URA3</i> The auxotroph genes <i>LEU2</i> and <i>URA3</i> were restored (2) 过表达两个拷贝的 <i>HMG1</i> 基因、 <i>CarB</i> 基因和单个拷贝的 <i>CarRP</i> 基因、 <i>MK</i> 基因、 <i>PMVADO</i> 基因和 <i>GGPPS</i> 基因 Overexpressing two copies of <i>HMG1</i> gene, <i>CarB</i> gene and a single copy of <i>CarRP</i> gene, <i>MK</i> gene, <i>PMVADO</i> gene and <i>GGPPS</i> gene	补料分批生物反应器发酵 Fed-batch fermentation	葡萄糖 Glucose	21.1 mg/g-DCW	[18]
CXY36	芳樟醇 Linalool	(1) 异源整合 <i>LIS</i> 基因 Heterologous integration of <i>LIS</i> gene (2) 过表达 <i>LIS</i> 基因、 <i>HMG1</i> 基因和 <i>ERG20<sup>F88W-N119</sup></i> 基因 Overexpression of <i>LIS</i> gene, <i>HMG1</i> gene and <i>ERG20<sup>F88W-N119</sup></i> gene	摇瓶发酵 Shake flask	葡萄糖 Glucose	6.96 mg/L (939 $\mu$ g/g-DCW)	[19]
Po1f	$\alpha$ -法尼烯 $\alpha$ -farnesene	(1) NHEJ 介导的基因组整合策略 NHEJ-mediated genome integration strategy (2) 基因过表达文库的构建 Construction of gene overexpression library (3) 过表达 <i>MK</i> 基因、 <i>PMK</i> 基因、 <i>PMVADO</i> 基因、 <i>GGPPS</i> 基因和 <i>FSEERG20</i> 基因 Overexpression of <i>MK</i> gene, <i>PMK</i> gene, <i>PMVADO</i> gene, <i>GGPPS</i> gene and <i>FSEERG20</i> gene	补料分批生物反应器发酵 Fed-batch fermentation	葡萄糖 Glucose	25.55 g/L	[20]

2016年, Cao等<sup>[11]</sup>将经密码子优化的人工 *dLS* 基因(编码 d-柠檬烯合酶)整合到解脂耶氏酵母原始菌株 Po1f 中, 但并未发现有柠檬烯的产生, 因此推断这是由于缺少前体物质 NPP 的缘故。为了解决该问题, 他们又将经过密码子优化的 *NDPS1* 基因(编码橙花基焦磷酸合酶)整合到 Po1f 菌株中, 通过 *NDPS1* 基因和 *dLS* 基因的同时表达最终得到了能够成功生产 d-柠檬烯的解脂耶氏酵母工程菌株, 这是解脂耶氏酵母中异源生产柠檬烯的首次报道, 这一成果也为后续科研人员利用解脂耶氏酵母生产各类柠檬烯衍生物奠定了基础; 为了进一步提高柠檬烯的产量, Cao 等发现过表达 MVA 途径中的 *HMG1* 基因(编码羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶)和 *MK* 基因(编码甲羟戊酸激酶)时可以大幅度增加柠檬烯的产量, 因此这 2 个基因被认定是解脂耶氏酵母中柠檬烯合成路径中的关键限速酶基因; 他们对工程菌株的发酵条件进行优化的结果发现: 在添加 4 g/L 丙酮酸、8% 十二烷的 YPD 培养基中, d-柠檬烯产量达到最高(23.56 mg/L、1.36 mg/g-DCW)<sup>[11]</sup>。

2019年, Cheng等<sup>[12]</sup>发现 MVA 途径的优化和柠檬烯生物合成途径的重新设计能够进一步提高解脂耶氏酵母异源生产柠檬烯的能力, 通过在解脂耶氏酵母 Po1f 菌株中共同过量表达 *tNDPS1* 基因(编码截短的橙花基焦磷酸合酶)、*tdLS* 基因(编码截短的 d-柠檬烯合酶)、*HMG1* 基因和 *MK* 基因并额外增加 *tdLS* 基因的拷贝数, 成功提高了 d-柠檬烯的产量; 紧接着, 通过筛选解脂耶氏酵母生产柠檬烯的最适碳源和辅助碳源, 发现在以甘油为主要碳源、柠檬酸盐为辅助碳源的培养基中, d-柠檬烯的产量达到最高; 最后, 在优化后的培养基中进行补料分批发酵, 解脂耶氏酵母工程菌株最终产生了 165.3 mg/L d-柠檬烯, 这也是迄今为止在解脂耶氏酵母中合成 d-柠檬烯的最高产量<sup>[12]</sup>。

2019年, Pang等<sup>[13]</sup>将经密码子优化的 *dLS* 基因(编码 d-柠檬烯合酶)和 *ILS* 基因(编码 l-柠檬烯合

酶)分别整合到解脂耶氏酵母 Po1g KU70Δ 亲本菌株(该菌株中的同源重组效率较高)的染色体上, 从而同时实现了 d-柠檬烯和 l-柠檬烯的合成, 这是第一次在解脂耶氏酵母中证实了植物源 l-柠檬烯合酶的功能。紧接着, 利用强启动子 hp4d 分别对 Po1g KU70Δ 菌株 MVA 途径中的 *ACOAT1*、*ACOAT2* 基因(编码乙酰-CoA C-乙酰基转移酶)、*HMGS* 基因(编码羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶)、*HMG1* 基因(编码羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶)、*MK* 基因(编码甲羟戊酸激酶)、*PMK* 基因(编码磷酸甲羟戊酸激酶)、*PMVADO* 基因(编码二磷酸甲戊酸脱羧酶)、*IDI* 基因(编码异戊烯基焦磷酸异构酶)、*FPPS* 基因(编码法尼基焦磷酸合酶)和 *GGPPS* 基因(编码香叶基香叶基焦磷酸合酶)进行了单独过表达(图 1), 结果发现在这 10 个途径基因过表达的工程菌株中, 过表达 *HMG1* 的菌株产生 d/l-柠檬烯的产量为最高, 说明 *HMG1* 可能是柠檬烯合成路径中最主要的限速酶, 这与 Cao 等<sup>[11]</sup>的结果是一致的; 接着, Pang 等首次对柠檬烯产量最高的工程菌株的发酵条件进行了优化, 最终确定了最佳温度 20 °C、转速 250 r/min、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2%、pH 5.74、培养基体积 50 mL、正十二烷添加量 10%、初始 OD<sub>600</sub> 为 2.0 的最佳发酵条件; 在此最佳发酵条件下, 以废弃食用油代替葡萄糖作唯一碳源进行发酵, 工程菌株最终成功产生了 2.514 mg/L 的 d-柠檬烯和 2.723 mg/L 的 l-柠檬烯<sup>[13]</sup>。该项研究的亮点是创新性地实现了将废弃食用油转变成高值产品——柠檬烯, 该研究结果也为利用解脂耶氏酵母工程菌株转化废弃食用油生产各种有工业价值的产品奠定了基础。

虽然在解脂耶氏酵母中生产柠檬烯的产量比大肠杆菌中低(大肠杆菌底盘细胞异源合成柠檬烯的最高产量为 1.29 g/L<sup>[27]</sup>), 但与大肠杆菌底盘相比, 以解脂耶氏酵母作为底盘细胞, 未来通过微生物发酵法工业化生产植物萜类化合物的生物安全性更高; 同时, 解脂耶氏酵母能够将废弃油脂转变

成有价值的植物天然产物,从而实现废弃物再利用和“变废为宝”的双重目的,也对创建环境友好型与资源节约型社会的意义重大。

## 2.2 $\beta$ -胡萝卜素的生产

$\beta$ -胡萝卜素( $\beta$ -Carotene)是一种橘黄色脂溶性四萜类化合物,与番茄红素、角黄素、虾青素等同属于类胡萝卜素,是自然界中最普遍存在的天然色素之一。 $\beta$ -胡萝卜素不仅具有抗氧化的性质<sup>[28]</sup>,而且据研究表明 $\beta$ -胡萝卜素也是维生素 A 的前体物质<sup>[29]</sup>,因此其逐渐成为一种十分重要的工业化合物并在多种微生物中实现了异源合成。现今解脂耶氏酵母已经被开发作为生产 $\beta$ -胡萝卜素的主要宿主,生成物质主要由全反式 $\beta$ -胡萝卜素和少量其他天然存在的类胡萝卜素组成。

2014 年, Grenfell-Lee 等为了验证解脂耶氏酵母所生产 $\beta$ -胡萝卜素的毒性作用进行了大鼠口服毒性研究,实验结果证实了解脂耶氏酵母产生的 $\beta$ -胡萝卜素其遗传毒性潜力为亚慢性,是一种安全且可以作为食品成分的化合物<sup>[30]</sup>。同时, Wang 等通过对解脂耶氏酵母全局转录因子进行调控,最终成功获得了 $\beta$ -胡萝卜素“强化”型和“弱化”型的菌株,这也为后续利用解脂耶氏酵母高效生产 $\beta$ -胡萝卜素或者其他类型萜类物质的生产提供了一个新的思路<sup>[31]</sup>。

2017 年, Gao 等选取来自海洋生物裂殖壶菌的多功能胡萝卜素合酶基因 *carS*,用于解脂耶氏酵母异源合成 $\beta$ -胡萝卜素的研究(图 1)。该项研究使用了高效 DNA 组装方法将 *carS* 基因的表达盒(GPD 启动子-*carS* 开放阅读框-*lip2* 终止子)组装并整合到解脂耶氏酵母的染色体中;同时,通过下调解脂耶氏酵母的非同源末端连接机制(NHEJ)显著提高了目的片段正确重组的效率,通过该方法构建获得的工程菌株最终经过摇瓶发酵产生了 0.41 mg/g-DCW 的 $\beta$ -胡萝卜素<sup>[14]</sup>。通过定向进化策略来进一步改善这种多功能胡萝卜素合酶的活性,成功实现了 $\beta$ -胡萝卜素产量的提高<sup>[32]</sup>。

2018 年, Larroude 等<sup>[15]</sup>在解脂耶氏酵母中构建了一个由 PGM 启动子控制的 *GGPPS* 基因、由 GAPDH 启动子控制的 *CarB* 基因(八氢番茄红素脱氢酶)、由 TEF1 启动子控制的 *CarRP* 基因(番茄红素环化酶/八氢番茄红素合酶)这 3 个基因表达框组成的 $\beta$ -胡萝卜素合成途径,成功实现了 $\beta$ -胡萝卜素的异源微生物合成(图 1);为了增加前体物质的供应量,又在组成型 TEF 启动子控制下过表达了截短版本的 *HMG1* 基因(*tHMG1*),从而有效提高了 $\beta$ -胡萝卜素产量。该研究也探索了启动子强弱变化对 $\beta$ -胡萝卜素产量的影响,研究者使用 Golden Gate 方法对启动子进行改组并找到了用于高产 $\beta$ -胡萝卜素的最佳启动子集 *car*<sup>TEF</sup>,即当 *GGPPS*、*CarB* 和 *CarRP* 这 3 个基因均处于 TEF1 启动子的控制下时,该启动子集可以最大限度地增强目标基因的转录效率,进而增加了各中间产物的产量,终产物 $\beta$ -胡萝卜素的产量也随之增加;然后,研究者又将 3 个基因表达盒的拷贝数增加了 1 倍, $\beta$ -胡萝卜素的产量得以进一步提高;最后,他们设计了一种含有 2 倍量酵母提取物和蛋白胨的培养基(命名为 Y20P40D),并且以葡萄糖作为补料分批的碳源,在 122 h 后,工程菌株中 $\beta$ -胡萝卜素的总产量达到了 6.5 g/L (90 mg/g-DCW),这也是迄今为止解脂耶氏酵母异源合成 $\beta$ -胡萝卜素的最高产量<sup>[15]</sup>。该研究证实了增加途径基因拷贝数以及利用最有利的启动子集来调控多基因的表达量有助于增强目标基因的转录,从而实现了前体物质供应的增加,最终促使解脂耶氏酵母合成 $\beta$ -胡萝卜素产量大大提高。

总之,在利用解脂耶氏酵母生产 $\beta$ -胡萝卜素的研究中,研究者将传统的代谢工程策略与新颖的合成生物学工具在解脂耶氏酵母底盘中进行了结合使用,最终得到的终产物产量明显高于大肠杆菌和酿酒酵母等其他微生物,这使得解脂耶氏酵母成为了截至目前最具竞争力的 $\beta$ -胡萝卜素微生物生产宿主。

### 2.3 桦木酸的生产

桦木酸(Betulinic Acid)又称为白桦脂酸, 是一种五环戊烷型三萜, 分子式为  $C_{30}H_{48}O_3$ , 其广泛存在于多种植物比如荆条叶子、木瓜果实和桉树叶中, 但在白桦树中该物质的含量最多<sup>[33]</sup>。研究表明, 桦木酸具有多种药理活性, 例如抗病毒特性(主要是 HIV 病毒)<sup>[34]</sup>以及抗癌、抗炎、抗血管生成和免疫调节作用等<sup>[35]</sup>。因为桦木酸具有诸多药理活性, 因此医学应用价值较高, 这也吸引着研究者们纷纷尝试利用微生物对其进行合成。

Jin 等<sup>[16]</sup>在 2019 年将在 TEFin 启动子控制下的外源基因 *RcLUS* (编码羽扇豆醇合酶)整合到解脂耶氏酵母染色体的 *Ku70* 基因座上, 实现了羽扇豆醇在解脂耶氏酵母中的首次合成。由于解脂耶氏酵母本身并不存在能够催化羽扇豆醇转化为桦木酸的天然细胞色素 P450 酶, 所以研究者通过筛选不同来源的细胞色素 P450 氧化酶(CYP)和细胞色素 P450 还原酶(CPR)进行两两组合, 最终选出了来自白桦的 CYP 编码基因 *BPLO* 与来自莲花的 CPR 编码基因 *LjCPR* 或来自紫花苜蓿的 CPR 编码基因 *MTR* 进行组合时可以最有效地生成桦木酸(图 1); 为了进一步提高桦木酸产量, Jin 等首先设计了具有结构基因 *ERG1* (编码角鲨烯单加氧酶)、*ERG9* (编码角鲨烯合酶)和 *HMG1* 的不同模块组合, 并将其整合到解脂耶氏酵母染色体 rDNA 位点中; 然后, 再通过直接生成过表达乙酰辅酶 A 生成途径基因、增强  $\beta$ -氧化途径和促进辅因子再生等手段, 进一步提高了目的产物的产量; 通过这些代谢工程改造策略的组合使用, 三萜类化合物(由 65.44%桦木素、23.71%桦木酸和 10.85%桦木醛组成)在摇瓶培养下的总产量达到了 204.89 mg/L, 这也是在微生物中报道过的桦木酸的最高产量<sup>[16]</sup>。在该项工作中, 多模块组合化的系统代谢工程策略的使用有效地解决了由仅操纵内源基因和引入异源基因引起的途径流量不平衡、模块不相容等扰动, 从而增加了三萜类化合物桦木酸的产量。虽然与酿酒酵母相比, 目前解脂耶氏酵母异源生产桦木

酸的最高产量并没有明显优势, 但系统代谢工程技术还尚未在解脂耶氏酵母底盘中得到深入应用, 预示着解脂耶氏酵母底盘具有较高的桦木酸增产潜力。

### 2.4 番茄红素的生产

番茄红素(Lycopene)属于四萜类的类胡萝卜素, 是脂肪族 C40 分子的重要组成部分之一。番茄红素可以在许多果蔬中找到, 但主要存在番茄或者番茄制品中, 并占人体吸收番茄红素总摄入量的 80%<sup>[36]</sup>。近些年, 随着人们对膳食营养的关注, 人们开始把番茄定义为一种可以减肥的健康食品, 因此番茄红素的功效也受到了越来越多的关注。比如 2015 年番茄红素被认定具有抑制 NF- $\kappa$ B 的活性来阻止乳腺癌、前列腺癌和子宫内膜癌细胞生长的特性<sup>[37]</sup>, 2017 年 Costa-Rodrigues 等证实了番茄红素能给心脏和血管功能等带来益处<sup>[38]</sup>。因为番茄红素在医疗和健康领域中具有良好的应用前景, 所以研究者们越来越重视利用微生物发酵生产该化合物的尝试<sup>[39]</sup>。

2013 年, Matthäus 等<sup>[17]</sup>在解脂耶氏酵母中首次建立了不需要 Zeta 序列或干扰 rRNA 编码基因的基因单拷贝整合平台, 在这项工作中, 研究者首先构建了一个中央带有 *Not I* 限制性酶切位点的序列 IntB 和 IntF 作为后续的基因单拷贝整合平台, 研究结果表明该平台的使用可实现目标基因快速、高效、单拷贝整合到宿主基因组中; 利用该平台, 在解脂耶氏酵母的 TEF1 启动子的控制下, 实现了番茄红素合成途径多功能基因 *CarRP* 和 *CarB* 的成功异源表达(图 1); 此后在过表达限速基因 *HMG1* 和 *GGPPS* 后, 菌体生长速度发生下降, 但更有利于番茄红素的积累。番茄红素的合成主要发生在解脂耶氏酵母中的脂质体内, 所以在该研究中尝试对 *POX1-POX6* 基因(编码丙酮酸氧化酶)和 *GUT2* 基因(编码线粒体甘油 3-磷酸脱氢酶)进行了敲除, 最终引起了  $\beta$ -氧化作用和 3-磷酸甘油的缺失, 结果明显增加了脂质体的形成, 进而增加了番茄红素的产量。补料分批培养后, 番茄红素的产量达到了

16 mg/g-DCW<sup>[17]</sup>。在该项研究中,新构建的单拷贝整合平台具有可与不同解脂耶氏酵母菌株一起使用但又不改变天然序列的优点;同时,重复使用相同的整合平台进一步提高了转化子稳定性并且减少了工作量、增加了工作效率,值得广泛应用于解脂耶氏酵母基因的染色体整合工作中。

2017年, Schwartz 等为了研究最初产生番茄红素的菌株 HEBI-LU 中存在的 *URA3* (尿嘧啶)和 *LEU2* (亮氨酸)营养缺陷对番茄红素产量的影响,通过对 *URA3* 和 *LEU2* 基因的功能恢复,结果发现番茄红素的产量提升了2倍;为了进一步提高番茄红素的产量,过表达了包括2个拷贝的 *HMG1*、*CarB* 和单个拷贝的 *CarRP*、*MK*、*PMVADO*、*GGPPS* 基因,在补料分批发酵10 d后,工程菌株中番茄红素的终产量达到了21.1 mg/g-DCW<sup>[18]</sup>。该项研究结果有助于让其他研究者注意到营养缺陷型对萜类化合物产量可能带来的影响,为今后生产相关研究提供了新思路。

虽然解脂耶氏酵母合成番茄红素的产量还低于其他宿主如酿酒酵母,但上述这些研究已经为构建生产番茄红素的微生物细胞工厂提供了新的菌种资源,而且通过深入研究影响解脂耶氏酵母底盘中番茄红素合成的关键因素,并在此基础上对番茄红素合成途径进行进一步优化,将有助于番茄红素产量的进一步提高。

## 2.5 芳樟醇的生产

芳樟醇(Linalool)又称为沉香醇、伽罗木醇、里那醇等,其分子式为  $C_{10}H_{18}O$ ,属于链状萜烯醇类,有 $\alpha$ 和 $\beta$ 2种异构体,一般为铃兰香味。芳樟醇一方面具有清新怡人的香气,另一方面具有抗微生物活性、抗病毒活性、降压、消炎等特性,因此成为药用精油的主要功能成分之一<sup>[40]</sup>。此外,芳樟醇还因为具有防腐性而被广泛应用在日常家用产品、化妆品等中<sup>[41]</sup>。目前利用代谢工程及合成生物学技术生产芳樟醇的研究主要集中在酿酒酵母这一常规微生物底盘中,如:2015年

Amiri 等将薰衣草 *LIS* 基因(编码芳樟醇合酶)引入酿酒酵母底盘中成功实现了芳樟醇的异源微生物合成,再通过用 *MET3* 启动子代替其天然启动子以下调编码角鲨烯合酶的 *ERG9* 基因的表达式,成功提高了芳樟醇的产量(78  $\mu$ g/L);然后又过表达了 *tHMG1* 基因(截短的 *HMG1* 基因),终产量提高到了95  $\mu$ g/L<sup>[42]</sup>;2016年, Deng 等则通过构建 *FPPS* 和 *LIS* 融合蛋白的方式成功将酿酒酵母产芳樟醇产量提高至240.64  $\mu$ g/L<sup>[43]</sup>。这些成功的例子也为在解脂耶氏酵母底盘中生产芳樟醇提供了十分有价值的参考。

2017年, Cao 等<sup>[19]</sup>通过将经密码子优化的 *LIS* 基因整合到解脂耶氏酵母的基因组中,首次成功实现了芳樟醇在解脂耶氏酵母底盘细胞中的合成(图1)。为了增加芳樟醇的产量,进一步过表达了 *HMG1* 基因和 *IDI* 基因。然后又对工程菌株的发酵条件进行了优化,结果发现在以柠檬酸盐为碳源、丙酮酸作为补充碳源时可以产生最大量的芳樟醇;前期研究已证明了对酿酒酵母 *ERG20* 基因编码的 *ERG20p* 酶(法尼基焦磷酸合酶)进行的修饰而产生的突变体对 *GPP* 的亲合力要高于 *FPP*,这样更有利于 *GPP* 的合成,进而弱化了 *GPP* 到 *FPP* 的分流(图1),最终严重影响了酿酒酵母中芳樟醇的生产表型<sup>[44]</sup>。因此,研究者们使用类似的策略对解脂耶氏酵母中的 *ERG20* 基因(即 *FPPS* 基因)也进行了修饰,命名为 *ERG20<sup>F88W-N119W</sup>* 基因;然后,在解脂耶氏酵母中同时过表达 *HMG1* 基因、*IDI* 基因和 *ERG20<sup>F88W-N119W</sup>* 基因,芳樟醇产量达到6.96 mg/L (939  $\mu$ g/g-DCW),这是截至目前所报道的微生物异源生产芳樟醇的最高产量<sup>[19]</sup>。该研究的明显创新性在于首次对解脂耶氏酵母的 *ERG20* 基因进行了位点修饰并成功增加了前体物质 *GPP* 的供应量,这也是在利用解脂耶氏酵母中合成萜类化合物的所有案例中产量明显高于其他微生物底盘细胞的成功案例,显示出了较好的应用潜力。

## 2.6 $\alpha$ -法尼烯的生产

法尼烯(Farnesene)又称为金合欢烯, 是一种倍半萜类化合物, 分子式  $C_{15}H_{24}$ , 在医药、化妆品、生物能源等多个领域中均有应用价值<sup>[45]</sup>。例如, 法尼烯具有良好的低温特性并且几乎不产生温室效应气体, 因此被公认为是喷气机的重要替代燃料<sup>[46]</sup>。因此大量研究者开始尝试利用微生物对其进行合成。

2019年, Liu等<sup>[20]</sup>首先通过 NHEJ 介导的方法将 *Te* 质粒线性化并随机整合到解脂耶氏酵母的基因组中, 以此构建基因过表达文库并得到了高产 FPP 的工程菌株; 而后又在工程菌株中导入了经过密码子优化的  *$\alpha$ FS* 基因(编码  $\alpha$ -法尼烯合酶), 实现了  $\alpha$ -法尼烯的合成(图 1); 紧接着, 将 MVA 途径中的 *MK* 基因、*PMK* 基因、*PMVADO* 基因、*GGPPS* 基因和 *FSEGR20* 基因(由 *ERG20* 基因与  *$\alpha$ FS* 基因融合而成)进行了共过表达, 结果  $\alpha$ -法尼烯的产量提高了 13 倍(与仅表达  *$\alpha$ FS* 基因的菌株相比), 达到 1.70 g/L; 最后对工程菌株的发酵条件进行了优化, 结果在 pH 5.5、空气流量 1.5 vvm、搅拌速度 500 r/min 条件下,  $\alpha$ -法尼烯的产量达到了 25.55 g/L<sup>[20]</sup>。在该研究中, NHEJ 介导的基因组整合、基因过表达文库的构建、多个途径基因的共同过表达显著增加了中间代谢产物的代谢通量, 而构建融合蛋白的方法可在空间上缩短酶与酶、酶与底物之间的距离, 增加酶与底物的碰撞几率, 从而提高了酶的催化效率, 这些可能是导致目标产物高水平合成的关键因素。这也是截至目前在解脂耶氏酵母中报道过的异源萜类化合物合成的最高产量。虽然目前  $\alpha$ -法尼烯在解脂耶氏酵母底盘细胞中的产量仍然低于大肠杆菌和酿酒酵母, 但是我们认为通过系统代谢工程及合成生物学等技术相结合的理念, 深入研究解脂耶氏酵母底盘细胞中  $\alpha$ -法尼烯的合成潜力和限制其高产率异源合成的代谢瓶颈, 将有助于促进  $\alpha$ -法尼烯产量的大幅提高。

## 3 结论与展望

由于萜类植物天然产物在众多领域中均具有较高的开发利用价值, 这使得其需求量日益增长。解脂耶氏酵母是一种新兴的微生物底盘细胞, 同时也是一种产油酵母, 体内含有含量比较丰富的乙酰辅酶 A<sup>[2]</sup>。因为乙酰辅酶 A 正好是解脂耶氏酵母经 MVA 途径合成 GPP、FPP 和 GGPP 等(萜类化合物合成的直接底物)的起始物质(图 1), 因此利用代谢工程技术对解脂耶氏酵母的 MVA 途径进行改造有望为萜类化合物的合成积累含量更为丰富的直接底物; 同时, 解脂耶氏酵母能够利用众多廉价疏水性底物进行生长繁殖, 这对于降低萜类化合物的生产成本具有重要意义。因此, 解脂耶氏酵母成为了异源合成萜类化合物潜在理想的微生物细胞工厂。

虽然目前利用代谢工程技术所构建的解脂耶氏酵母细胞工厂已经实现了多种萜类化合物的生物合成, 但是该酵母固有的一些特性也在一定程度上限制了萜类化合物的产量, 距离大规模工业化生产还有较大差距。因此, 为实现萜类化合物在解脂耶氏酵母底盘细胞中的进一步增产, 需要不断地对其中的核心机制和关键技术进行创新性的探索和研究。我们认为有几个问题亟待突破, 具体如下:

(1) 解脂耶氏酵母本身并不含有可自主复制的游离质粒, 因此在对其进行基因编辑时往往需要首先构建人工合成质粒作为过渡载体, 操作烦琐、工作量大。

(2) 非同源末端连接(NHEJ)是解脂耶氏酵母完成 DNA 双链断裂修复的主要形式, 因此该酵母胞内的非同源重组效率极高(与酿酒酵母明显不同), 导致基因定点敲除和敲入都非常困难<sup>[2]</sup>。近年来的研究发现 CRISPR-Cas9 介导的基因整合技术将解脂耶氏酵母中同源重组的成功率提高到了 50%–70%, 显示出良好的应用前景<sup>[47]</sup>。但是, 该技术也仍未完全解决解脂耶氏酵母更倾向于进

行非同源重组的问题。

(3) 解脂耶氏酵母是严格需氧的非发酵酵母,只有在氧气充足时才能实现最佳的生长状况,这就可能成为工业发酵生产萜类化合物过程中潜在的制约因素。

(4) 目前提高解脂耶氏酵母合成萜类化合物产量的主要方式仍然局限于通过增强途径关键酶基因的表达量来增加前体物质的供应量。与大肠杆菌和酿酒酵母相比,新的代谢工程策略和合成生物学技术尚未在解脂耶氏酵母中得以广泛应用,这就需要研究者们开发出更多适用于解脂耶氏酵母的创新工具和技术。

## REFERENCES

- [1] Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, Gaillardin C, Van Dijck PWM, Wyss M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2014, 40(3): 187-206
- [2] Abdel-Mawgoud AM, Markham KA, Palmer CM, Liu N, Stephanopoulos G, Alper HS. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 192-208
- [3] Ng TK, Yu AQ, Ling H, Juwono NKP, Choi WJ, Leong SSJ, Chang MW. Engineering *Yarrowia lipolytica* towards food waste bioremediation: production of fatty acid ethyl esters from vegetable cooking oil[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 129(1): 31-40
- [4] Kavšček M, Bhutada G, Madl T, Natter K. Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*[J]. BMC Systems Biology, 2015, 9: 72
- [5] Michely S, Gaillardin C, Nicaud JM, Neuvéglise C. Comparative physiology of oleaginous species from the *Yarrowia* clade[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63356
- [6] Christen S, Sauer U. Intracellular characterization of aerobic glucose metabolism in seven yeast species by  $^{13}\text{C}$  flux analysis and metabolomics[J]. FEMS Yeast Research, 2011, 11(3): 263-272
- [7] Xue HJ, Wang Y, Li C. Microbial synthesis and transformation of plant-derived natural products[J]. CIESC Journal, 2019, 70(10): 3825-3835 (in Chinese)  
薛海洁, 王颖, 李春. 植物天然产物的微生物合成与转化[J]. 化工学报, 2019, 70(10): 3825-3835
- [8] Feng GR, Xie J, Deng LL, Zeng KF, Yao SX. Progress on terpenoid volatiles in citrus fruits[J]. Food and Machinery, 2017, 33(10): 200-204 (in Chinese)  
冯桂蓉, 谢皎, 邓丽莉, 曾凯芳, 姚世响. 柑橘果实萜烯类挥发性物质研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(10): 200-204
- [9] Sun PL, Schuurink RC, Caissard JC, Hugueney P, Baudino S. My way: noncanonical biosynthesis pathways for plant volatiles[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(10): 884-894
- [10] Abbas F, Ke YG, Yu RC, Yue YC, Amanullah S, Jahangir MM, Fan YP. Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering[J]. Planta, 2017, 246(5): 803-816
- [11] Cao X, Lv YB, Chen J, Imanaka T, Wei LJ, Hua Q. Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 214
- [12] Cheng BQ, Wei LJ, Lv YB, Chen J, Hua Q. Elevating limonene production in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* via genetic engineering of limonene biosynthesis pathway and optimization of medium composition[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2019, 24(3): 500-506
- [13] Pang YR, Zhao YK, Li SL, Zhao Y, Li J, Hu ZH, Zhang CY, Xiao DG, Yu AQ. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 241
- [14] Gao SL, Tong YY, Zhu L, Ge M, Jiang Y, Chen DJ, Yang S. Production of  $\beta$ -carotene by expressing a heterologous multifunctional carotene synthase in *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(6): 921-927
- [15] Larroude M, Celinska E, Back A, Thomas S, Nicaud JM, Ledesma-Amaro R. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of  $\beta$ -carotene[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(2): 464-472
- [16] Jin CC, Zhang JL, Song H, Cao YX. Boosting the biosynthesis of betulinic acid and related triterpenoids in *Yarrowia lipolytica* via multimodular metabolic engineering[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 77
- [17] Matthäus F, Ketelhot M, Gatter M, Barth G. Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(5): 1660-1669
- [18] Schwartz C, Frogue K, Misa J, Wheeldon I. Host and pathway engineering for enhanced lycopene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2233
- [19] Cao X, Wei LJ, Lin JY, Hua Q. Enhancing linalool production by engineering oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1641-1644
- [20] Liu YH, Jiang X, Cui ZY, Wang ZX, Qi QS, Hou J. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for production of  $\alpha$ -farnesene[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 296
- [21] Sun JD. D-limonene: safety and clinical applications[J].

- Alternative Medicine Review, 2007, 12(3): 259-264
- [22] Zhang LL, Fan G, He J, Huang W, Ren JN, Pan SY. Advances on limonene microbial biotransformation and its related enzymes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(12): 317-325,330 (in Chinese)  
张璐璐, 范刚, 何进, 黄文, 任婧楠, 潘思轶. 柠檬烯微生物转化及其相关酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(12): 317-325,330
- [23] Molina G, Bution ML, Bicas JL, Dolder MAH, Pastore GM. Comparative study of the bioconversion process using *R*-(+)- and *S*-(-)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B[J]. Food Chemistry, 2015, 174: 606-613
- [24] Jongedijk E, Cankar K, Ranzijn 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
- [25] Johnson TJ, Jahandideh A, Johnson MD, Fields KH, Richardson JW, Muthukumarappan K, Cao YH, Gu ZR, Halfmann C, Zhou RB, et al. Producing next-generation biofuels from filamentous cyanobacteria: an economic feasibility analysis[J]. Algal Research, 2016, 20: 218-228
- [26] Miller JA, Thompson PA, Hakim IA, Chow HHS, Thomson CA. *d*-Limonene: a bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment[J]. Oncology Reviews, 2011, 5(1): 31-42
- [27] Wu JH, Cheng S, Cao JY, Qiao JJ, Zhao GR. Systematic optimization of limonene production in engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(25): 7087-7097
- [28] Gao SL, Tong YY, Zhu L, Ge M, Zhang YA, Chen DJ, Jiang Y, Yang S. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous  $\beta$ -carotene production[J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 192-201
- [29] Nzamwita M, Duodu KG, Minnaar A. Stability of  $\beta$ -carotene during baking of orange-fleshed sweet potato-wheat composite bread and estimated contribution to vitamin a requirements[J]. Food Chemistry, 2017, 228: 85-90
- [30] Grenfell-Lee D, Zeller S, Cardoso R, Pucaj K. The safety of  $\beta$ -carotene from *Yarrowia lipolytica*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 65: 1-11
- [31] Wang M, Liu GN, Liu H, Zhang L, Li BZ, Li X, Liu D, Yuan YJ. Engineering global transcription to tune lipophilic properties in *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1): 115
- [32] Packer MS, Liu DR. Methods for the directed evolution of proteins[J]. Nature Reviews Genetics, 2015, 16(7): 379-394
- [33] Zhang DM, Xu HG, Wang L, Li YJ, Sun PH, Wu XM, Wang GJ, Chen WM, Ye WC. Betulinic acid and its derivatives as potential antitumor agents[J]. Medicinal Research Reviews, 2015, 35(6): 1127-1155
- [34] An TY, Zha WL, Zi JC. Biotechnological production of betulinic acid and derivatives and their applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(8): 3339-3348
- [35] Zhang X, Hu JY, Chen Y. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression (Review)[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 14(5): 4489-4495
- [36] Böhm V. Lycopene and heart health[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2012, 56(2): 296-303
- [37] Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, Marino M, Martinez-Chantar ML, Nawroth R, Sanchez-Garcia I, et al. Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets[J]. Seminars in Cancer Biology, 2015, 35(Suppl 1): S25-S54
- [38] Costa-Rodrigues J, Pinho O, Monteiro PRR. Can lycopene be considered an effective protection against cardiovascular disease?[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 1148-1153
- [39] Liu R, Zhu XQ. Progress on physiological health functions and application of lycopene[J]. Food and Drug, 2013, 15(5): 364-366 (in Chinese)  
刘蕊, 朱希强. 番茄红素的生理保健功能及应用研究进展[J]. 食品与药品, 2013, 15(5): 364-366
- [40] Herman A, Tambor K, Herman A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils[J]. Current Microbiology, 2016, 72(2): 165-172
- [41] Pardo E, Rico J, Gil JV, Orejas M. *De novo* production of six key grape aroma monoterpenes by a geraniol synthase-engineered *S. cerevisiae* wine strain[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 136
- [42] Amiri P, Shahpiri A, Asadollahi MA, Momenbeik F, Partow S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for linalool production[J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(3): 503-508
- [43] Deng Y, Sun MX, Xu S, Zhou JW. Enhanced (*S*)-linalool production by fusion expression of farnesyl diphosphate synthase and linalool synthase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(1): 187-195
- [44] 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
- [45] Singh B, Sharma RA. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications[J]. 3 Biotech, 2015, 5(2): 129-151
- [46] Leavell MD, McPhee DJ, Paddon CJ. Developing fermentative terpenoid production for commercial usage[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 37: 114-119
- [47] Larroude M, Rossignol T, Nicaud JM, Ledesma-Amaro R. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(8): 2150-2164