

代谢工程改造酿酒酵母合成柠檬烯及其衍生物

黄瑶, 杨海泉*, 沈微, 夏媛媛, 曹钰, 陈献忠*

江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

黄瑶, 杨海泉, 沈微, 夏媛媛, 曹钰, 陈献忠. 代谢工程改造酿酒酵母合成柠檬烯及其衍生物[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4647-4662.

HUANG Yao, YANG Haiquan, SHEN Wei, XIA Yuanyuan, CAO Yu, CHEN Xianzhong. Production of limonene and its derivative in *Saccharomyces cerevisiae* via metabolic engineering[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4647-4662.

摘要: 柠檬烯及其衍生物紫苏酸作为重要的生物活性天然产物, 广泛应用于食品、化妆品、保健品和医药等行业。然而, 低效率的植物提取与高能耗的化工合成限制了柠檬烯和紫苏酸的工业合成。本研究在酿酒酵母中通过过氧化物酶体区室化表达绿薄荷来源的柠檬烯合酶, 构建获得重组菌株, 柠檬烯产量为 0.038 mg/L。采用模块化工程分步表达参与柠檬烯合成的基因 *ERG10*、*ERG13*、*tHMGR*、*ERG12*、*ERG8*、*ID11*、*MVD1*、*ERG20_{ww}* 以及 *tLS*, 以研究其对柠檬烯产量的影响。通过增加前体模块, 柠檬烯产量增加至 1.14 mg/L。采用高拷贝数的质粒表达上述关键基因, 柠檬烯的产量显著提高, 达到 86.74 mg/L, 提高至初始菌株产量的 4 337 倍。以构建的柠檬烯生产菌株为出发菌株, 通过表达丹参来源的细胞色素 P450 酶基因, 实现了紫苏酸的生成, 其产量达 4.42 mg/L, 为利用酿酒酵母构建高产单萜类天然产物的细胞工厂奠定了基础。

关键词: 合成生物学; 酿酒酵母; 柠檬烯; 模块化工程; 紫苏酸

Production of limonene and its derivative in *Saccharomyces cerevisiae* via metabolic engineering

HUANG Yao, YANG Haiquan*, SHEN Wei, XIA Yuanyuan, CAO Yu, CHEN Xianzhong*

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Limonene and its derivative perillic acid are widely used in food, cosmetics, health products, medicine and other industries as important bioactive natural products. However, inefficient plant extraction and high energy-consuming chemical synthesis hamper the industrial production of limonene and perillic acid. In this study, limonene synthase from *Mentha spicata*

资助项目: 国家自然科学基金(32271533)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32271533).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Xianzhong, xzchen@jiangnan.edu.cn; YANG Haiquan, haiquanyang@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-03-07; Accepted: 2023-05-11

was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* by peroxisome compartmentalization, and the yield of limonene was 0.038 mg/L. The genes involved in limonene synthesis, *ERG10*, *ERG13*, *tHMGR*, *ERG12*, *ERG8*, *ID11*, *MVD1*, *ERG20_{ww}* and *tLS*, were step-wise expressed *via* modular engineering to study their effects on limonene yield. The yield of limonene increased to 1.14 mg/L by increasing the precursor module. Using the plasmid with high copy number to express the above key genes, the yield of limonene significantly increased up to 86.74 mg/L, which was 4 337 times higher than that of the original strain. Using the limonene-producing strain as the starting strain, the production of perillic acid was successfully achieved by expressing cytochrome P450 enzyme gene from *Salvia miltiorrhiza*, and the yield reached 4.42 mg/L. The results may facilitate the construction of cell factory with high yield of monoterpene products by *S. cerevisiae*.

Keywords: synthetic biology; *Saccharomyces cerevisiae*; limonene; modular engineering; perillic acid

单萜类化合物是一类以异戊二烯为骨架结构的天然产物,具有巨大的经济利用价值。柠檬烯作为一种典型的单萜类化合物,存在于300多种植物^[1]和一些细菌中^[2]。柠檬烯及其衍生物紫苏酸,因其香味宜人、生物活性独特、物理化学性质优良而被广泛应用于工业合成,涉及到药品、食品、护肤品、生物燃料和生物材料等行业^[3]。全球柠檬烯产量正在大幅增长,预计到2024年,市场规模将超过19亿美元^[4]。由于柠檬烯和紫苏酸的用途广泛,市场需求也急剧增长,但是,气候季节的变化严重影响了

从天然植物获取柠檬烯、紫苏酸^[5]。而化学合成工艺存在低效率、高能耗、环境污染大和副产物有毒等缺点,也无法进行大规模合成应用。合成生物学和代谢工程的快速发展为可持续性合成高附加值天然产物提供了另一种策略^[6]。到目前为止,研究人员已在大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酵母中实现柠檬烯的生物合成^[7-8],也已经成功利用解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)实现柠檬烯到紫苏酸的转化(表1)^[9],但目前尚未有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)从头合成紫苏酸的相关报道。

表1 不同微生物菌株合成柠檬烯及柠檬烯生物转化为紫苏酸的研究进展

Table 1 Research progress on synthesis of limonene by different microbial strains and biotransformation of limonene to perillic acid

Host	Products	Substrates	Time (h)	Cultivation mode	Titer (mg/L)	References
<i>S. cerevisiae</i> CENPK2-1C	Limonene	Glucose and ethanol	120	Bioreactor; Fed-batch	918.00	[10]
<i>S. cerevisiae</i> AY12 α	Limonene	Corn hydrolysate and ethanol	72	Shake flask; Batch	23.76	[11]
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	Limonene	Galactose and raffinose	144	Shake flask; Fed-batch	167.04	[12]
<i>Y. lipolytica</i> Po1f	Limonene	Glycerol	144	Shake flask; Batch	165.30	[13]
<i>E. coli</i> DE3	Limonene	Glucose	84	Shake flask; Fed-batch	1 290.00	[14]
<i>P. putida</i> DSM 12264	Perillic acid	Limonene	168	Shake flask; Fed-batch	31 000.00	[15]
<i>Y. lipolytica</i>	Perillic acid	Limonene	48	Shake flask; Batch	855.00	[9]

S. cerevisiae 因其具有遗传背景清晰、易于遗传操作、表达系统成熟等特点,已成为工业化合成异戊二烯的优良底盘细胞。 β -法尼烯(130 g/L)和青蒿酸(25 g/L)的高水平合成证明了 *S. cerevisiae* 作为一种优秀的类异戊二烯细胞工厂的潜力^[16-17]。与 *E. coli* 相比, *S. cerevisiae* 的优势是能够表达膜相关或细胞器特异性的酶,特别是真核细胞来源的 P450 酶^[18]。常用的提高柠檬烯合成能力的代谢工程策略包括:(1)对甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径的限速基因 *HMGR* 进行过表达或者改造^[19]; (2)对基因 *ERG20* 进行改造以减弱竞争途径促进萜类合成前体物质香叶基焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP)的积累^[20]; (3)通过引入正交途径来缓解

细胞对 MVA 途径的调控^[15],然而得到的柠檬烯滴度仍无法满足工业化合成需求。近年来,细胞器区室化已被证明是合成异戊二烯的可行方法。利用线粒体、过氧化物酶体和内质网区室化已被报道可以促进多种类异戊二烯的生成^[21-22],但鲜有关于 *S. cerevisiae* 柠檬烯合成途径区室化的报道。细胞器的利用可能会进一步提高 *S. cerevisiae* 合成柠檬烯和紫苏酸的能力。

本研究以 *S. cerevisiae* BY4741 为出发菌株,利用模块化工程实现柠檬烯的高效合成,并探究过氧化物酶体区室化对柠檬烯效价的影响。在此基础上,通过表达丹参来源的 P450 酶实现柠檬烯到紫苏酸的转化,成功构建了一株从头合成紫苏酸的 *S. cerevisiae* 菌株(图 1)。

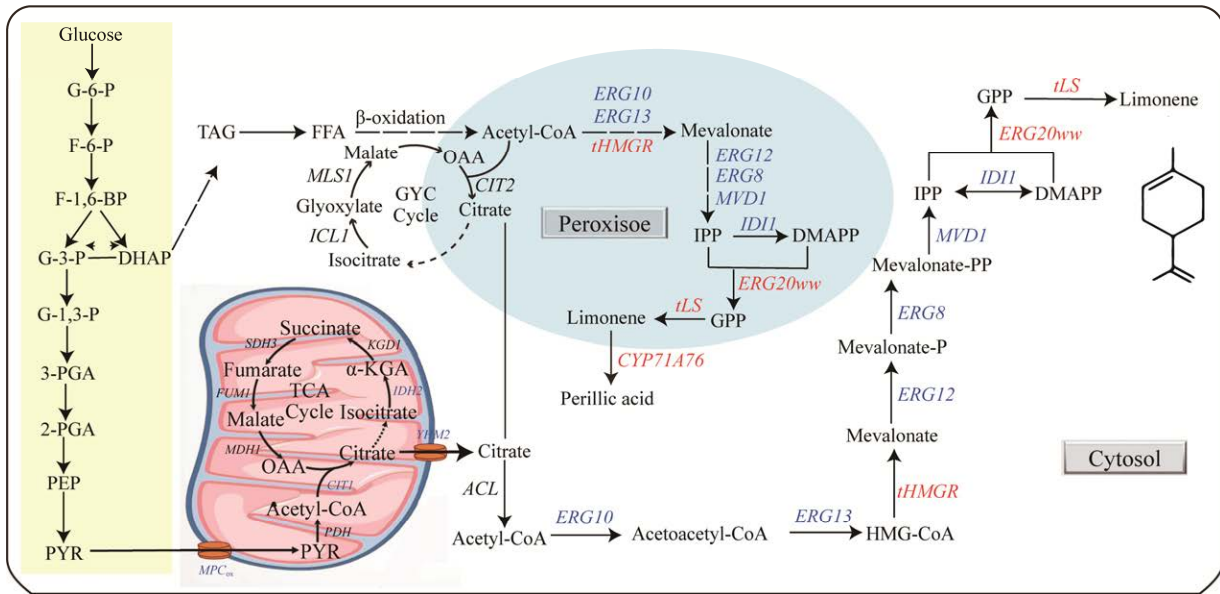


图 1 *Saccharomyces cerevisiae* 中柠檬烯及紫苏酸的合成途径示意图 *ERG10*: 乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶基因; *ERG13*: HMG-CoA 合成酶基因; *HMGR*: HMG-CoA 还原酶基因; *ERG12*: 甲羟戊酸激酶基因; *ERG8*: 磷酸甲羟戊酸激酶基因; *VD1*: 二磷酸甲羟戊酸激酶基因; *ID11*: 异戊烯基焦磷酸异构酶基因; *ERG20*: 香叶基焦磷酸合酶基因; *tLS*: 柠檬烯合酶基因; *CYP71A76*: 紫苏酸合酶基因

Figure 1 Synthetic pathway of limonene and perillidic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *ERG10*: Acetoacetyl-CoA thiolase gene; *ERG13*: HMG-CoA synthase gene; *tHMGR*: HMG-CoA reductase gene; *ERG12*: Mevalonate kinase gene; *ERG8*: MVAP kinase gene; *MVD1*: MVAPP decarboxylase gene; *ID11*: Isopentenyl-diphosphate isomerase gene; *ERG20*: GPP synthase gene; *LS*: Limonene synthase gene; *CYP71A76*: Perillidic acid synthase gene.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

S. cerevisiae BY4741、*E. coli* JM109 由本实验室保存;pESC系列质粒购自 Agilent Technologies 公司;pMD19-T (Simple)购自 TaKaRa 公司;质粒 pUC57-*ERG20_{ww}*、pUC57-*tLS* 由苏州金唯智生物科技有限公司构建。研究中使用及构建的菌株和质粒如附表 1 和 2 (文中附表已上传至国家微生物科学数据中心, 编号为: NMDCX 0000234)所示;基因克隆和质粒构建所用引物如附表 3 所示。

1.1.2 主要试剂和工具酶类

本研究中所使用的 PrimeSTAR 聚合酶、限制性内切酶以及 Solution I Ligase 连接酶均购买于 TaKaRa 公司;一步克隆试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司;实验中所需要的酵母粉和酵母氮碱(yeast nitrogen base, YNB)购自 OXOID 公司;氨苄青霉素购自 Sigma-aldrich 有限公司;常规试剂(如硫酸铵)等从麦克林试剂购买。

1.1.3 培养基

Luria-Bertani (LB) (g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10。

酵母提取物蛋白胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD) (g/L): 酵母粉 10, 葡萄糖 20, 胰蛋白胨 20。固体培养基添加 2% (质量体积分数)琼脂粉。

基础培养基(minimal medium, MM) (g/L): 硫酸铵 10, YNB 6.7, 葡萄糖 20, 琼脂粉 20。

选择培养基(selective media, SM) (g/L): 硫酸铵 10, YNB 6.7, 葡萄糖 20, 琼脂粉 20, 尿嘧啶 0.06。

合成半乳糖基础培养基(synthetic galactose minimal medium, SG) (g/L): (NH₄)₂SO₄ 10, YNB 6.7, 半乳糖 20; 氨基酸补充剂 10 mL/L。

氨基酸补充剂(g/L): 亮氨酸 10, 组氨酸 10, 甲硫氨酸 10, 色氨酸 10。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

种子液培养: 从甘油保藏管中挑取一环菌液在 YPD 固体培养基上划线活化, 置于 30 °C 培养箱中培养 2 d; 待单菌落长出后, 挑取单菌落接种至 10 mL 的 YPD 液体培养基中, 于 30 °C、200 r/min 摇床中培养 1 d。

柠檬烯的摇瓶发酵: 将种子液转接到 30 mL YPD 培养基中, 使其初始 OD₆₀₀ 为 0.5, 加入 10% 体积的十二烷作为有机萃取相, 开始两相摇瓶发酵; 30 °C、200 r/min 下培养 5 d 以产生柠檬烯。每组做 3 个平行并进行重复试验。

紫苏酸的摇瓶发酵: 将种子液转接到 30 mL YPD 培养基中, 初始 OD₆₀₀ 为 0.5, 在 30 °C、200 r/min 的培养条件下培养 5 d 以产生紫苏酸。每组 3 个平行并进行重复实验。

1.2.2 柠檬烯的检测

对于柠檬烯的检测, 将发酵液以 5 000 r/min 离心 10 min 获取有机层。添加无水硫酸钠后静置 1-2 h 除水, 用注射器吸取 1 mL 上层十二烷有机相经滤膜过滤后用于气相色谱质谱联用(gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS)分析。GC-MS 检测条件为: 气相色谱柱为 TG-5MS 柱, 氦气作为载气。采用升温程序: 50 °C 保持 1 min 后, 以 6 °C/min 的速度升温至 100 °C, 再以 20 °C/min 的速度升温至 280 °C, 工作 5 min。

1.2.3 紫苏酸的检测

对于紫苏酸的检测, 取 5 mL 发酵液于离心管中, 加入 5 mL 的乙酸乙酯, 通过振荡器将混合液充分振荡混匀, 再通过 5 000 r/min 的高速离心机进行离心 10 min。离心结束后, 吸取 3 mL 上层有机相于离心管中, 添加无水硫酸钠静置 1-2 h 除水, 通过注射器吸取 1 mL 上层乙酸乙

酯相经有机滤膜过滤后用于气相色谱分析。

1.2.4 不同模块整合框的构建

(1) 过氧化物酶体定位信号肽验证表达盒构建

以柠檬烯合酶(*tLS*)的过氧化物酶体信号肽表达盒的构建为例。信号肽 *ePTS* 是一个长度为 27 bp 的 DNA 片段, 在基因 *tLS* 的下游引物设计时, 在其终止密码子前添加 *ePTS* 片段得到引物 *tLS*-R2。利用引物 *tLS*-F1 和 *tLS*-R2, 以 pUC57-*tLS* 为模板 PCR 扩增得到片段 *tLS*-*ePTS*。

选择 *S. cerevisiae* BY4741 中基因 *LPP1* (编码脂肪磷酸酶)、*DPP1* (编码二酰基甘油焦磷酸酶) 和 *HO* (编码同源开关内切酶) 作为整合位点, 构建各模块整合表达盒。

(2) 模块 I 基因表达盒的构建(包括 *ERG10*、*ERG13* 和 *tHMGR*)

以 *S. cerevisiae* BY4741 基因组 DNA 为模板, *ERG10*-F1 和 *ERG10*-R1 为引物, 通过 PCR 扩增 *ERG10* 基因, 然后插入到质粒 pHO1 中的 *Not I* 和 *Sac I* 酶切位点处, 获得重组质粒 pHO1-*ERG10*;

参考(1)中的策略, *ERG10*-F1 和 *ERG10*-R2 为引物, 在 *ERG10* 基因的 3'端添加信号肽基因 *ePTS*, 参照质粒 pHO1-*ERG10* 的构建方法, 获得重组质粒 pHO1-*ERG10_ePTS*;

以 *S. cerevisiae* BY4741 基因组 DNA 为模板, *tHMGR*-F1 和 *tHMGR*-R1 为引物, 通过 PCR 扩增 *tHMGR* 基因, 然后插入到质粒 pHO1-*ERG10* 中的 *BamH I* 和 *Xho I* 酶切位点处, 获得重组质粒 pHO1-*ERG10-tHMGR*;

参考(1)中的策略, *tHMGR*-F1 和 *tHMGR*-R2 为引物, 在 *tHMGR* 基因的 3'端添加信号肽基因 *ePTS*, 参照质粒 pHO1-*ERG10-tHMGR* 的构建方法, 获得重组质粒 pHO1-*ERG10_ePTS-tHMGR_ePTS*;

用引物 *ADH1*-F0、*CYC1*-F0 分别对重组质粒 pHO1-*ERG10-tHMGR*、pHO1-*ERG10_ePTS-tHMGR_ePTS* 进行 PCR 扩增, 获得片段 P_{TEF1} -*ERG10*- T_{ADH1} - P_{TDH3} -*tHMGR*- T_{CYC1} 与 P_{TEF1} -*ERG10_ePTS*- T_{ADH1} - P_{TDH3} -*tHMGR_ePTS*- T_{CYC1} ;

利用引物 PHXT7-F1 与 PHXT7-R1、*PDC1*-F 与 *PDC1*-R 以及 *ERG13*-F1 与 *ERG13*-R1/R2 分别对 *S. cerevisiae* BY4741 基因组 DNA 进行扩增得到启动子 P_{HXT7} 、终止子 T_{PDC1} 及基因 *ERG13*、*ERG13_ePTS*, 对其进行融合 PCR 得到片段 P_{HXT7} -*ERG13*- T_{PDC1} 、 P_{HXT7} -*ERG13_ePTS*- T_{PDC1} ;

以 *S. cerevisiae* BY4741 基因组 DNA 为模板, *LPP*-F1 和 *LPP*-R1 为引物, 通过 PCR 扩增 *LPP1* 基因, 与 pMD19 (Simple) 进行连接, 得到质粒 pMD19-*LPP1*。利用引物 Re-*LPP*-F、Re-*LPP*-R 进行 PCR 扩增得到片段 *LPP1*-ampr-*LPP1* 作为载体。利用 *Xba I* 酶切片段 *LPP1*-ampr-*LPP1*, 与 *gda-ura3* 片段进行连接, 获得重组质粒 pMD19-*LPP1-gda-ura3* (整合基因位点为 *LPP1*);

继续利用 *Hind III* 单酶切重组质粒 pMD19-*LPP1-gda-ura3*, 分别与片段 P_{HXT7} -*ERG13*- T_{PDC1} 、 P_{HXT7} -*ERG13_ePTS*- T_{PDC1} 进行连接, 得到重组质粒 pMD19-*LPP1-gda-ura3-ERG13*、pMD19-*LPP1-gda-ura3-ERG13_ePTS*。将新获得的质粒用 *BssH II* 进行酶切, 然后分别与片段 P_{TEF1} -*ERG10*- T_{ADH1} - P_{TDH3} -*tHMGR*- T_{CYC1} 、 P_{TEF1} -*ERG10_ePTS*- T_{ADH1} - P_{TDH3} -*tHMGR_ePTS*- T_{CYC1} 进行连接, 得到目的质粒 pMD19-*LPP1-gda-ura3-ERG13-ERG10-tHMGR*、pMD19-*LPP1-gda-ura3-ERG13_ePTS-ERG10_ePTS-tHMGR_ePTS*;

利用 *Sal I* 和 *Spe I* 对目的质粒 pMD19-*LPP1-gda-ura3-ERG13-ERG10-tHMGR*、pMD19-*LPP1-gda-ura3-ERG13_ePTS-ERG10_ePTS-tHMGR*-

ePTS 进行双酶切得到整合框 *LPP1-gda-ura3-P_{TEFI}-ERG10-T_{ADHI}-P_{TDH3}-tHMGR-T_{CYCI}-P_{HXT7}-ERG13-T_{PDCI}-LPP1* 与 *LPP1-gda-ura3-P_{TEFI}-ERG10_ePTS-T_{ADHI}-P_{TDH3}-tHMGR_ePTS-T_{CYCI}-P_{HXT7}-ERG13_ePTS-T_{PDCI}-LPP1*。

(3) 模块II基因表达盒的构建(包括 *ERG12*、*ERG8*、*MVD1* 和 *IDII*)

以 *S. cerevisiae* BY4741 基因组 DNA 为模板, *ERG8*-F1 和 *ERG8*-R1、*IDII*-F1 和 *IDII*-R1 为引物, 通过 PCR 扩增 *ERG8* 与 *IDII* 基因, 然后分别插入到质粒 pHO1 中的 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点处, 获得重组质粒 pHO1-*ERG8* 与 pHO1-*IDII*;

以 *S. cerevisiae* BY4741 基因组 DNA 为模板, *ERG12*-F1 和 *ERG12*-R1、*MVD1*-F1 和 *MVD1*-R1 为引物, 通过 PCR 扩增 *ERG12* 和 *MVD1* 基因, 然后分别插入到质粒 pHO1-*ERG8* 与 pHO1-*IDII* 中的 *Sac* I 和 *Not* I 酶切位点处, 获得重组质粒 pHO1-*ERG8-ERG12* 与 pHO1-*IDII-MVD1*;

参考(1)中的策略, 分别在 pHO1-*ERG8-ERG12* 质粒中 *ERG8* 和 *ERG12* 基因的 3'端添加信号肽基因 *ePTS*, 构建重组质粒 pHO1-*ERG8_ePTS-ERG12_ePTS*; 分别在 pHO1-*IDII-MVD1* 质粒中 *IDII* 和 *MVD1* 基因的 3'端添加信号肽基因 *ePTS*, 构建重组质粒 pHO1-*IDII_ePTS-MVD1_ePTS*;

参考质粒 pMD19-*LPP1-gda-ura3* 的构建方法, 获得重组质粒 pMD19-*DPP1-gda-ura3* (整合基因位点为 *DPP1*);

先用 *Sal* I 酶切 pMD19-*DPP1-gda-ura3*, 酶切充分后经 PCR 清洁试剂盒回收, 再利用 *Spe* I 进行酶切, 得到片段 *DPP1-gda-ura3*。利用引物 ADH-F1、CYC1-R1 分别对质粒 pHO1-*ERG8-ERG12*、pHO1-*ERG8_ePTS-ERG12_ePTS* 进行

PCR 扩增, 获得片段 *P_{TEFI}-ERG12-T_{ADHI}-P_{TDH3}-ERG8-T_{CYCI}* 与 *P_{TEFI}-ERG12_ePTS-T_{ADHI}-P_{TDH3}-ERG8_ePTS-T_{CYCI}*。利用 *Sal* I、*Spe* I 对片段进行酶切, 与片段 *DPP1-gda-ura3* 连接, 构建质粒 pMD19-*DPP1-gda-ura3-ERG8-ERG12*、pMD19-*DPP1-gda-ura3-ERG8_ePTS-ERG12_ePTS*;

先用 *Apa* I 分别酶切质粒 pMD19-*DPP1-gda-ura3-ERG8-ERG12*、pMD19-*DPP1-gda-ura3-ERG8_ePTS-ERG12_ePTS*, 酶切充分后经 PCR 清洁试剂盒回收, 再利用 *Bln* I 进行酶切, 得到片段 *DPP1-gda-ura3-P_{TEFI}-ERG12-T_{ADHI}-P_{TDH3}-ERG8-T_{CYCI}* 与 *DPP1-gda-ura3-P_{TEFI}-ERG12_ePTS-T_{ADHI}-P_{TDH3}-ERG8_ePTS-T_{CYCI}* 作为载体;

利用引物 ADH-R1、CYC1-F1 分别对质粒 pHO1-*IDII-MVD1*、pHO1-*IDII_ePTS-MVD1_ePTS* 进行 PCR 扩增, 获得片段 *P_{TEFI}-MVD1-T_{ADHI}-P_{TDH3}-IDII-T_{CYCI}* 与 *P_{TEFI}-MVD1_ePTS-T_{ADHI}-P_{TDH3}-IDII_ePTS-T_{CYCI}*。利用 *Apa* I、*Bln* I 对片段进行酶切后, 分别与片段 *DPP1-gda-ura3-P_{TEFI}-ERG12-T_{ADHI}-P_{TDH3}-ERG8-T_{CYCI}* 与 *DPP1-gda-ura3-P_{TEFI}-ERG12_ePTS-T_{ADHI}-P_{TDH3}-ERG8_ePTS-T_{CYCI}* 连接, 获得目的质粒 pMD19-*DPP1-gda-ura3-ERG8-ERG12-IDII-MVD1* 与 pMD19-*DPP1-gda-ura3-ERG8_ePTS-ERG12_ePTS-IDII-MVD1*;

通过 *Bss*H II 对目的质粒进行酶切, 获得整合框 *DPP1-gda-ura3-P_{TEFI}-ERG12-T_{ADHI}-P_{TDH3}-ERG8-T_{CYCI}-T_{CYCI}-IDII-P_{TDH3}-T_{ADHI}-MVD1-P_{TEFI}-DPP1* 与 *DPP1-gda-ura3-P_{TEFI}-ERG12_ePTS-T_{ADHI}-P_{TDH3}-ERG8_ePTS-T_{CYCI}-T_{CYCI}-ePTS-IDII-P_{TDH3}-T_{ADHI}-ePTS-MVD1-P_{TEFI}-DPP1*。

(4) 模块 III 基因表达盒的构建(包括 *ERG20_{ww}* 和 *iLS*)

以质粒 pUC57-*ERG20_{ww}* 为模板, *ERG20*-F1、*ERG20*-R1/R2 为引物 PCR 扩增得到基因 *ERG20_{ww}*、*ERG20_{ww_ePTS}*。然后分别

插入到质粒 pHO1 中的 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点处, 获得重组质粒 pHO1-*ERG20_{ww}* 与 pHO1-*ERG20_{ww}_ePTS*;

以质粒 pUC57-*tLS* 为模板, *tLS*-F1、*tLS*-R1/R2 为引物 PCR 扩增得到基因 *tLS*、*tLS-ePTS*。然后分别插入到质粒 pHO1-*ERG20_{ww}* 与 pHO1-*ERG20_{ww}_ePTS* 中的 *Not* I 和 *Sac* I 酶切位点处, 获得重组质粒 pHO1-*ERG20_{ww}-tLS* 与 pHO1-*ERG20_{ww}_ePTS-tLS_ePTS*;

以重组质粒 pHO1-*ERG20_{ww}-tLS* 与 pHO1-*ERG20_{ww}_ePTS-tLS_ePTS* 为模板, HO-F1、HO-R1 为引物经 PCR 扩增后得到整合框 *HO-gda-ura3-P_{TEFI}-tLS-T_{ADHI}-P_{TDH3}-ERG20_{ww}-T_{CYCI}-HO* 与 *HO-gda-ura3-P_{TEFI}-tLS_ePTS-T_{ADHI}-P_{TDH3}-ERG20_{ww}_ePTS-T_{CYCI}-HO*。

1.2.5 游离质粒的构建

以质粒 pESC-*IDI-MVD1* 的构建为例, 用 *Not* I、*Sac* I 分别酶切 pESC-*leu2* 质粒和基因 *IDII*, 利用 Solution I 将其进行连接, 然后转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 构建质粒 pESC-*IDII*。利用 *Bam*H I、*Xho* I 分别双酶切质粒 pESC-*IDII* 和基因 *MVD1*, 利用 Solution I 将其进行连接, 转化 *E. coli* JM109 筛选后得到目的质粒 pESC-*IDI-MVD1*。参考 1.2.4 所述方法, 添加信号肽基因 *ePTS* 构建质粒 pESC-*IDI_ePTS-MVD1_ePTS*。

1.2.6 *S. cerevisiae* 的醋酸锂转化

S. cerevisiae 在 20 mL YPD 培养基中 30 °C 培养 20–24 h, 然后吸取 0.5–1.0 mL 至 50 mL YPD 培养基中, 30 °C 培养至 $OD_{600}=0.6-0.8$ 。收集细胞, 悬浮在 1 mL 的 100 mmol/L 醋酸锂中。取 50 μ L 的细胞悬浮液于离心管中, 经离心沉淀后, 去除醋酸锂。按顺序加入转化混合液: 240 μ L 的 PEG (50%, 质量体积分数)、36 μ L 的 1.0 mol/L LiAc、25 μ L 的单链载体 DNA、50 μ L

的整合框, 剧烈振荡离心管至细胞完全混匀。置 30 °C 保温 30 min 后, 42 °C 热激 20–25 min, 用 100 μ L 转化混合液涂布 MM 平板。

2 结果与分析

2.1 *S. cerevisiae* 菌株中柠檬烯合成途径重构

虽然 *S. cerevisiae* 中具有 MVA 路径, 能合成柠檬烯的前体物香叶基焦磷酸 GPP, 但是体内缺乏相应的柠檬烯合成酶^[23], 因此野生型 *S. cerevisiae* 不具有合成柠檬烯的能力。为了实现 *S. cerevisiae* 异源合成柠檬烯的目标, 需要引入外源的柠檬烯合成酶。本研究采用绿薄荷来源的柠檬烯合酶(limonene synthase, LS)基因^[24], 该柠檬烯合酶催化产物具有高度特异性, 仅生成 L-柠檬烯。已有研究表明截短单萜合酶 N 端的细胞质靶向序列是提高单萜合酶的底物转化效率的有效手段^[25]。与此同时, 基因 *ERG20* 作为催化异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)与二甲基丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)合成 GPP 和法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)的关键酶, 已被证明通过对基因 *ERG20* 进行 F95W 和 N126W 位点的双重突变可以减弱 FPP 合成途径, 在此基础上不影响 IPP 和 DMAPP 合成 GPP 的途径^[26]。因此, 本文克隆 *ERG20_{ww}* 和 *tLS* 基因构建整合模块 III 转化至 *S. cerevisiae* BY4741, 获得重组 *S. cerevisiae* Lim01。与出发菌株相比, 菌株 *S. cerevisiae* Lim01 的生长速度和最终生物量没有显著变化(图 2A), 但是具有了柠檬烯合成能力, 滴度仅有 0.02 mg/L (图 2B)。下一步, 将通过优化代谢途径进一步提高柠檬烯的合成能力。

2.2 柠檬烯合成模块在过氧化物酶体中表达对柠檬烯生物合成的影响

S. cerevisiae 具有多种不同的亚细胞器, 不同的细胞器之间的物理化学环境各不相同, 代

谢产物、酶、辅因子等物质也存在一定的差异。利用亚细胞器的区室化以实现代谢工程产物的高效合成已受到越来越多的关注^[27]。除了利用不同的细胞器属性外,细胞器与细胞质的物理分离还有可能消除代谢串扰,提高分隔途径的效率。过氧化物酶体作为酵母菌的一种亚细胞器,参与过氧化氢的产生和清除,以及脂肪酸 β -氧化过程,而后者为细胞器提供乙酰辅酶A。乙酰辅酶A作为MVA途径的关键底物,对柠檬烯的生成起着重要作用^[28]。蛋白质靶向信

号肽 *ePTS* 可以使酶蛋白定位至过氧化物酶体中^[29]。研究中在基因 *ERG20_{ww}* 和 *tLS* 的 C 端分别融合了蛋白质靶向信号肽 *ePTS*, 构建重组菌株 *S. cerevisiae* Lim02。菌株 *S. cerevisiae* Lim02 最大菌浓 OD_{600} 与对照菌株 *S. cerevisiae* Lim01 基本一致(图 3A), 而柠檬烯产量由对照菌株 *S. cerevisiae* Lim01 的 0.02 mg/L 提高至 0.038 mg/L (图 3B), 提高了 1.9 倍。由此说明,过氧化物酶体区室化表达基因 *ERG20_{ww}* 和 *tLS* 对柠檬烯在 *S. cerevisiae* 中的合成具有促进作用。

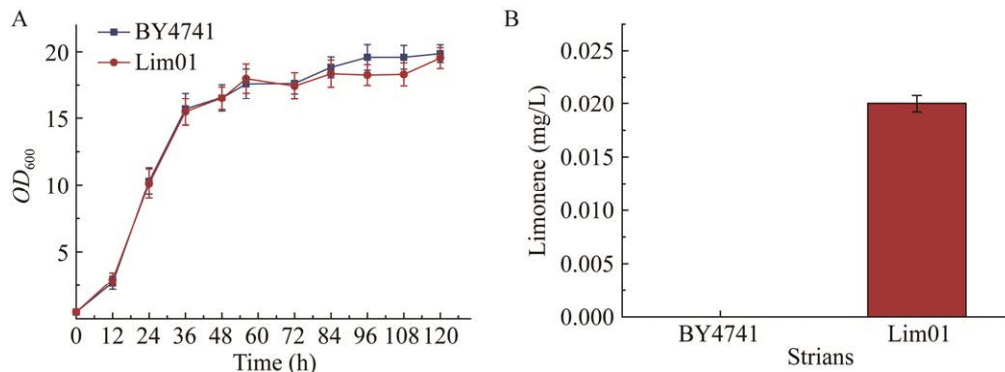


图 2 模块 III 在酵母细胞质中表达合成柠檬烯 A: 菌株生长曲线. B: 重组菌株柠檬烯产量

Figure 2 Module III was expressed in yeast cytoplasm to synthesize limonene. A: Strain growth curve. B: Limonene yield of recombinant strain.

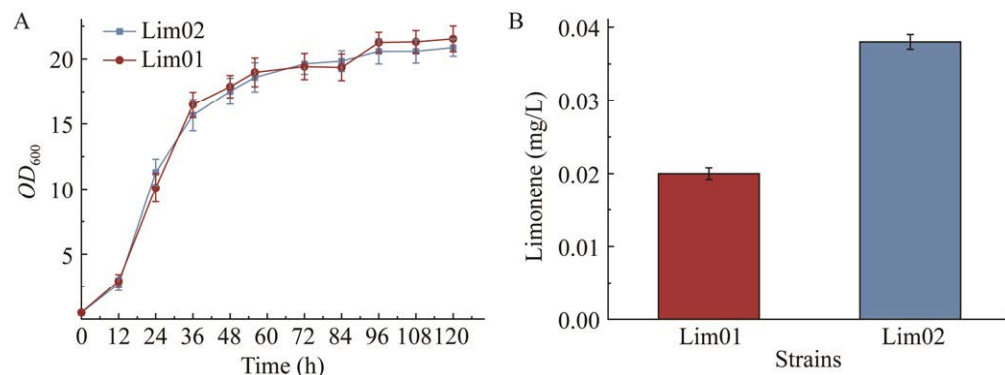


图 3 柠檬烯合成模块过氧化物酶体表达对柠檬烯生物合成的影响 A: 菌株生长曲线. B: 柠檬烯合成模块过氧化物酶体表达菌株柠檬烯的产量

Figure 3 Effect of peroxidase expression of limonene synthesis module on limonene biosynthesis. A: Strain growth curve. B: Limonene production of limonene synthesis module peroxisome expression strain.

2.3 前体模块的过表达对柠檬烯生物合成的影响

为了构建一株稳定的柠檬烯高产菌株,本文表达柠檬烯合成的前体模块即 IPP 和 DMAPP 合成模块,该模块又可细分为模块I(即乙酰 CoA 至甲羟戊酸合成模块)和模块II(即甲羟戊酸至 IPP 和 DMAPP 合成模块)(图 4A-4B)。选择基因 *DPP1* 和 *LPP1* 作为整合位点^[21],以 *S. cerevisiae* Lim01 为出发菌株,在胞质中过表达模块I获得重组菌株 *S. cerevisiae* Lim03;过表达模块II得到菌株 *S. cerevisiae* Lim05;同时过表达模块I和模块II获得重组菌株 *S. cerevisiae* Lim07。以 *S. cerevisiae* Lim02 为出发菌株,在过氧化物酶体中过表达模块I获得重组菌株 *S. cerevisiae* Lim04;过表达模块II得到菌株 *S. cerevisiae* Lim06;同时过表达模块I和模块II获得重组菌株 *S. cerevisiae* Lim08,获得的这几株重组菌株的最大生物量没有显著差异(图 4C)。

模块I的过表达使菌株 *S. cerevisiae* Lim03 的柠檬烯产量较对照菌株 *S. cerevisiae* Lim01 提高了 13 倍,菌株 *S. cerevisiae* Lim04 的柠檬烯产量较对照菌株 *S. cerevisiae* Lim02 提高了 16.78 倍。模块II的过表达使菌株 *S. cerevisiae* Lim05 的柠檬烯产量较对照菌株 *S. cerevisiae* Lim01 提高了 6.80 倍,菌株 *S. cerevisiae* Lim06 的柠檬烯产量较对照菌株 *S. cerevisiae* Lim02 提高了 11.47 倍。同时,过表达模块I和模块II使菌株 *S. cerevisiae* Lim07 的柠檬烯产量较对照菌株 *S. cerevisiae* Lim01 提高了 22 倍。菌株 *S. cerevisiae* Lim08 的柠檬烯产量达 1.14 mg/L,较对照菌株 *S. cerevisiae* Lim02 提高了 30 倍(图 4D)。由此说明,模块I、模块II的表达均对柠檬烯产量提高有促进效果,但模块I的促进作用优于模块II。可能是因为内源基因 *HMGR* 作为 MVA 途径的限速步骤,通过表达截短的

3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶还原酶(基因 *tHMGR*)能够有效地提高前体香叶基焦磷酸 GPP 的合成^[30]。

2.4 多酶过量表达对柠檬烯合成的影响

为进一步提高柠檬烯的产量,考察基于游离质粒表达合成途径关键酶对柠檬烯合成的影响,采用 4 个 pESC 系列质粒分别对基因 *ERG10*、*ERG13*、*tHMGR*、*ERG12*、*ERG8*、*MVD1*、*ID11*、*ERG20ww*、*tLS* 进行过量表达。已有文献报道,蛋白质融合是提高序列反应多酶体系性能的有效策略,它能缩短底物间的通道,减少中间体的损失^[31]。这种策略已成功地用于提高倍半萜法尼烯和二萜马兜铃烯等萜类化合物的产量^[32-33]。在蛋白质融合时,经常使用像 GGS 这样的柔性接头(linker)来缓解蛋白质之间的折叠干扰,并使被操纵的蛋白质保持其天然活性。本文将基因 *ERG13* 和 *ERG10* 通过 GGS Linker 进行融合^[12],采用 *ePTS* 信号肽基因与融合基因 *ERG13-ERG10* 进行融合使其在过氧化物酶体中区室化表达,同时基因 *tHMGR*、*ERG12*、*ERG8*、*MVD1*、*ID11*、*ERG20ww*、*tLS* 在其 C 端分别融合蛋白质靶向信号肽 *ePTS*,按照 1.2.5 所述游离质粒构建方法,构建 pESC 游离质粒后转入 *S. cerevisiae* BY4741 中,获得重组菌株 *S. cerevisiae* HY-PER-02。由于 pESC 游离质粒具有双向启动子 P_{GALI} 和 P_{GAL10} ,均为半乳糖诱导性启动子。当以 20 g/L 半乳糖为碳源进行发酵时,由于 *S. cerevisiae* 对碳源半乳糖的利用率低,其最大菌浓 OD_{600} 为 16.23,与对照菌株 *S. cerevisiae* Lim08 最大菌浓没有显著差异(图 5A)。菌株 *S. cerevisiae* HY-PER-02 的柠檬烯产量达 20.85 mg/L(图 5B),提高至对照菌株 *S. cerevisiae* Lim08 的 20.12 倍。这表明柠檬烯合成途径关键酶的过量表达对其高效合成具有积极作用。

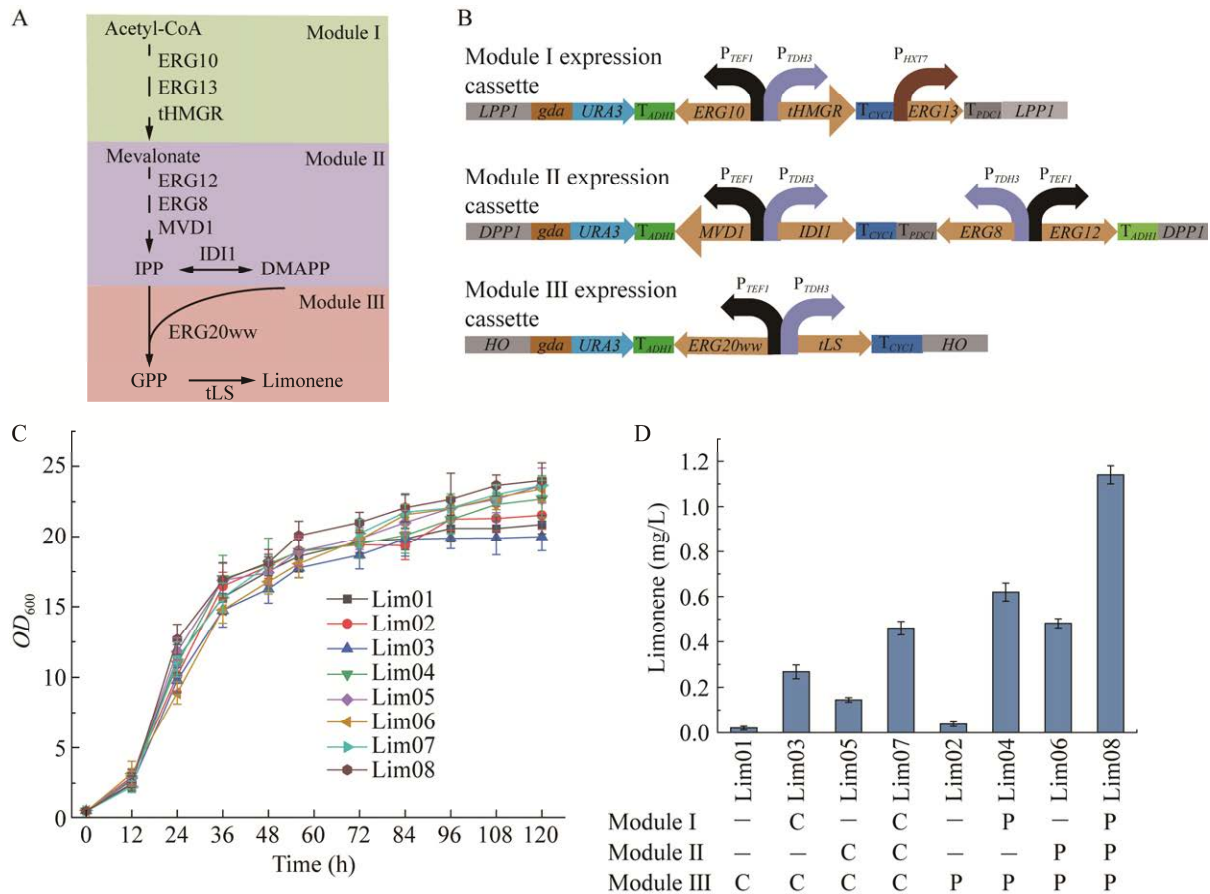


图4 前体模块的过表达对柠檬烯合成的影响 A: 柠檬烯合成途径模块化. B: 模块I、II和III的表达盒构建. C: 不同菌株生长曲线. D: 不同模块过表达对柠檬烯合成的影响

Figure 4 Effect of overexpression of precursor modules on synthesis of limonene. A: Modularization of limonene synthesis pathway. B: Construction of expression cassette of module I, II and III. C: Growth curve of different strains. D: Effects of overexpression of different modules on limonene synthesis.

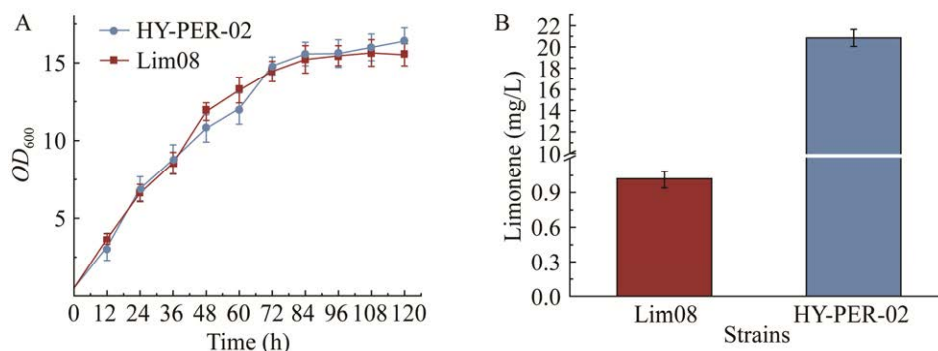


图5 多酶过量表达对柠檬烯合成的影响 A: 利用SG培养基进行摇瓶发酵的菌株生长曲线. B: 多酶过量表达菌株柠檬烯的产量

Figure 5 Effect of over-expression of key enzymes on limonene synthesis. A: Strain growth curve in shake flask with SG medium. B: Yield of limonene from strain with overexpression of key enzymes.

2.5 基因 *ERG10* 和 *ERG13* 不同融合表达顺序及其区室化表达对柠檬烯合成的影响

本研究比较了 *ERG13* 和 *ERG10* 基因融合时, 其前后顺序对柠檬烯合成的影响。将基因 *ERG10* 置于基因 *ERG13* 的 N 端, 构建获得融合基因 *ERG10-ERG13* (图 6A), 采用 *ePTS* 信号肽基因与融合基因 *ERG10-ERG13* 进行融合使其在过氧化物酶体中区室化表达, 同时基因 *tHMGR*、*ERG12*、*ERG8*、*MVD1*、*ID11*、*ERG20_{ww}*、*tLS* 在其 C 端分别融合蛋白质靶向信号肽 *ePTS*, 构建重组质粒后转入 *S. cerevisiae* BY4741 中, 获得重组菌株 *S. cerevisiae* HY-PER-01。该菌株的柠檬烯产量由 *S. cerevisiae* HY-PER-02 的 20.85 mg/L 提高至 24.60 mg/L (图 6C)。通过 *ERG10-ERG13* 的顺序进行融合表达, 柠檬烯产量较以 *ERG13-ERG10* 的顺序融合表达提高了 1.18 倍。结果表明, 与融合蛋白基因 *ERG13-ERG10* 相比较, 过量表达融合蛋白基因 *ERG10-ERG13*, 更有利于柠檬烯的合成。Hu 等^[11]在 *S. cerevisiae* AY12 α 通过对基因 *tLS* 和橙花基二磷酸合酶 (neroli-based diphosphate synthase, *tNDPS1*) 的不同融合顺序进行了比较, 得到融合顺序为 *tLS-tNDPS1* 的最优菌株, 其柠檬烯产量为 9.8 mg/L, 较表达融合基因 *tNDPS1-tLS* 的菌株提高 1.09 倍。由此说明, 基因 *ERG10-ERG13* 融合表达策略具有一定的优势, 对酵母菌利用 MVA 途径合成萜类化合物具有借鉴意义。

同时, 本文考察了在胞质中过表达融合蛋白基因对柠檬烯合成的影响。在 *S. cerevisiae* BY4741 胞质中游离表达 *ERG10-ERG13* 融合基因以及 *tHMGR*、*ERG12*、*ERG8*、*MVD1*、*ID11*、*ERG20_{ww}*、*tLS* 这 7 个关键基因, 获得重组菌株 *S. cerevisiae* HY-CYT-01。相似地, 在出发菌株胞质中表达 *ERG13-ERG10* 融合基因和同样 7 个基因, 获得重组 *S. cerevisiae* HY-CYT-02。结果表

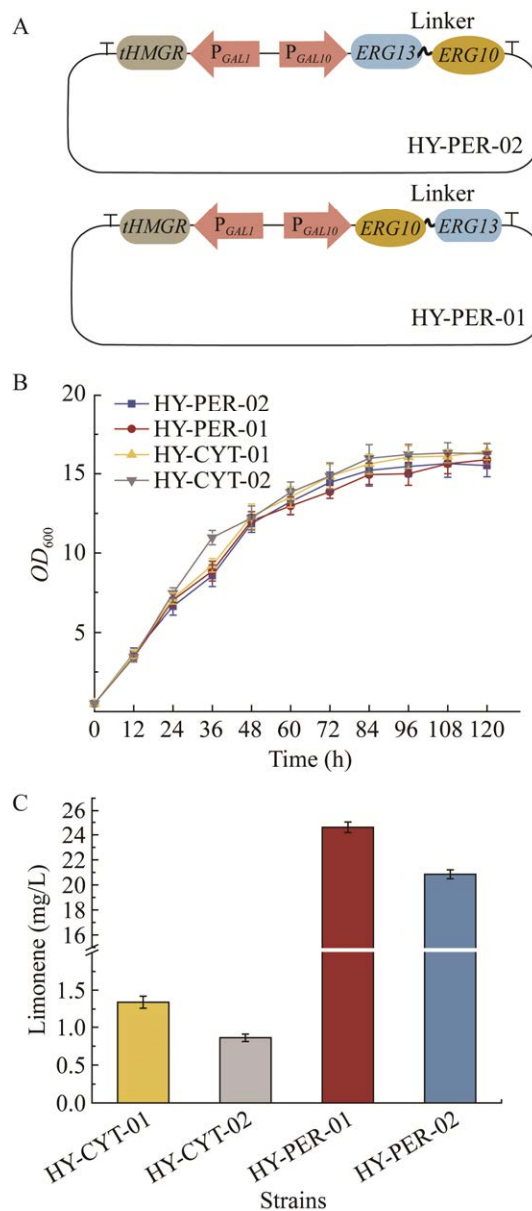


图 6 不同融合表达顺序及其区室化表达对柠檬烯合成的影响 A: 不同融合顺序质粒的构建示意图. B: 菌株生长曲线图. C: 融合顺序及其区室化表达对柠檬烯产量的影响

Figure 6 Effect of different fusion expression sequences and their compartmentalized expression on limonene synthesis. A: Schematic diagram of the construction of plasmids with different fusion sequence. B: Strain growth curve. C: The effect of fusion sequence and its compartmentalized expression on limonene production.

明, 四株重组菌株的最大菌浓 OD_{600} 没有显著差异(图 6B)。重组菌株 *S. cerevisiae* HY-CYT-01 和 *S. cerevisiae* HY-CYT-02 的柠檬烯产量分别仅为 1.34 mg/L 和 0.86 mg/L (图 6C)。进一步证明, 融合蛋白基因 *ERG10-ERG13* 的过量表达, 更有利于柠檬烯的合成。更重要的是, 重组菌株 *S. cerevisiae* HY-CYT-01 和 *S. cerevisiae* HY-CYT-02 的柠檬烯产量显著低于 *S. cerevisiae* HY-PER-01 和 *S. cerevisiae* HY-PER-02 的产量。目前利用微生物合成高价值天然产物的方法, 大多使用细胞质作为反应容器。然而, 代谢途径间的相互竞争与代谢串扰对胞质中目标化合物的高效合成存在一定的阻碍作用。真核细胞可以利用细胞器隔离生化途径来控制其代谢的复杂性。本研究在过氧化物酶体中引入了一个完整的甲羟戊酸途径, 将乙酰辅酶 A 成功转化为柠檬烯, 并实现了较胞质产量高达 24.24 倍的增长。进一步证明了过氧化物酶体区室化是提高萜类合成滴度的有效策略。

2.6 不同碳源对柠檬烯合成的影响

本研究针对菌株 *S. cerevisiae* HY-PER-01 进行碳源发酵优化。当以 20 g/L 半乳糖作为碳源发酵 120 h 时, 细胞浓度 OD_{600} 为 13.40 (图 7A)。由于 *S. cerevisiae* 对半乳糖的利用率低, 柠檬烯产量仅为 24.61 mg/L。当在 20 g/L 半乳糖的基础上, 添加 10 g/L 棉子糖来提高 *S. cerevisiae* 细胞的生长, 最大细胞浓度 OD_{600} 提高至 17.60, 说明 10 g/L 棉子糖的补加增强了 *S. cerevisiae* 细胞的生长, 柠檬烯产量达 48.86 mg/L, 提高至仅用 20 g/L 半乳糖时的 1.98 倍。为进一步提高柠檬烯的产量, 以 40 g/L 半乳糖和 20 g/L 棉子糖为碳源, 细胞生长显著增强, 最大菌株浓度 OD_{600} 达 26.20, 柠檬烯产量达 62.20 mg/L (图 7B), 提高至仅用 20 g/L 半乳糖时的 2.52 倍。上述结果表明, 高浓度的碳源可显著提高菌株

S. cerevisiae HY-PER-01 细胞的生长, 同时显著增强柠檬烯的合成。然而, 以半乳糖及棉子糖为碳源进行发酵不具备经济优势。因此, 本研究进一步敲除基因 *GAL80* 以解除高浓度葡萄糖对 *GAL* 启动子的抑制, 获得重组菌株 *S. cerevisiae* HY-PER-01 Δ *GAL80*。如图 7C 所示, 当以 60 g/L 的葡萄糖作为碳源时, 柠檬烯产量达 86.74 mg/L, 提高至仅用 20 g/L 半乳糖时的 3.53 倍。由此表明, 过氧化物酶体区室化策略同样适用于以葡萄糖为发酵碳源合成萜类物质。

2.7 柠檬烯衍生物紫苏酸的生成

天然植物中紫苏酸的含量较低, 通过植物提取法生产紫苏酸效率低、成本高, 而利用化学方法合成紫苏酸也存在诸多问题, 涉及多个低产率的反应以及有毒试剂的使用, 副产物占比大^[34]。在天然植物中, 紫苏酸可以由柠檬烯为前体, 通过细胞色素 P450 酶的生物氧化生成紫苏酸(图 8A)。然而, 文献中报道的大多数用于柠檬烯生物转化的 P450 酶和其他加氧酶只对 D-柠檬烯有效。在已报道的几种氧化 L-柠檬烯为紫苏酸的酶中, 选择了来源丹参的细胞色素 P450 酶(*CYP71A76*)基因^[35]和拟南芥来源 P450 还原酶(*CPR*)基因, 将这 2 个酶基因整合至菌株 *S. cerevisiae* HY-PER-01 基因组上的 *ROX1* 位点, 构建获得重组菌株 *S. cerevisiae* HY-PA-01。如图 8B 所示, 重组菌株 *S. cerevisiae* HY-PA-01 可合成紫苏酸, 其产量为 4.42 mg/L, 表明在酿酒酵母中成功构建了紫苏酸合成途径。Mirata 等^[15]利用恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) DSM 12264, 采用流加分批补料的方式, 利用基于阴离子交换的原位产物回收技术(*in situ* product recovery, ISPR), 以柠檬烯为原料合成了 31 g/L 的紫苏酸。Ferrara 等^[9]利用 *Y. lipolytica* ATCC 18942 在 pH 为 7.1 的缓冲介质中, 25 °C 培养 48 h, 通过补加柠檬烯可使紫苏酸浓度达

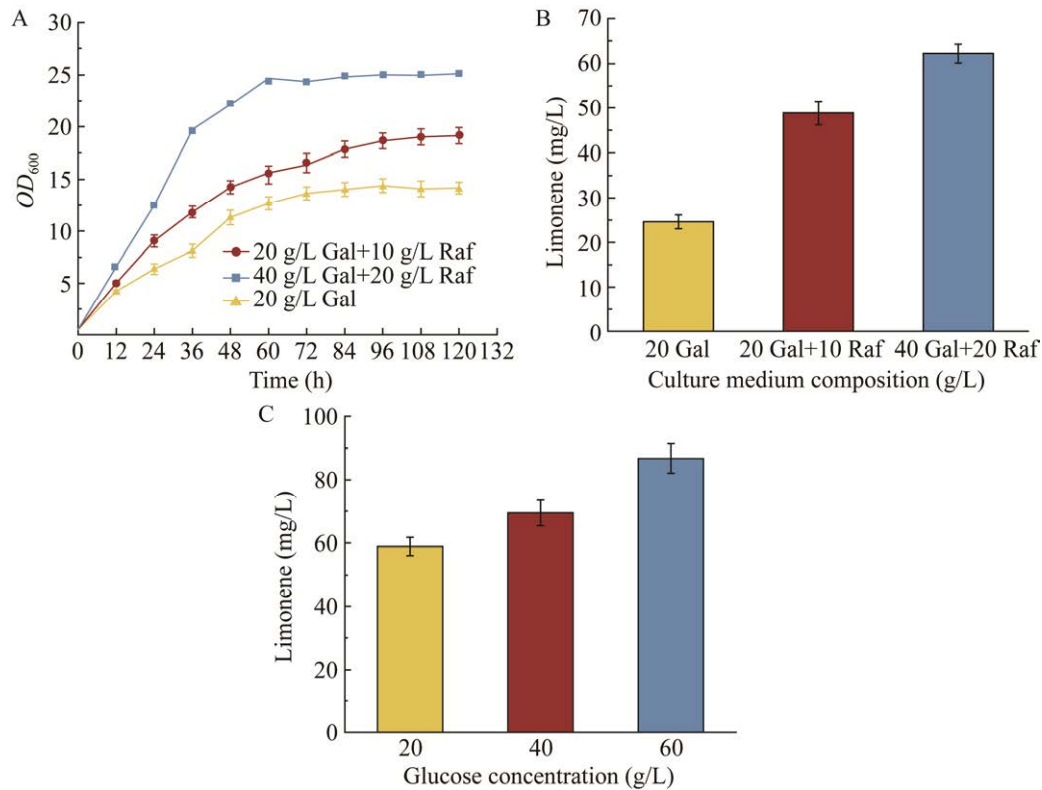


图7 不同碳源对柠檬烯合成的影响 A: 细胞生长曲线. B: 菌株 *Saccharomyces cerevisiae* HY-PER-01 以不同浓度的半乳糖和棉子糖为碳源摇瓶发酵柠檬烯的产量. C: 菌株 *S. cerevisiae* HY-PER-01 Δ GAL80 以不同浓度的葡萄糖为碳源摇瓶发酵柠檬烯的产量. Gal: 半乳糖; Raf: 棉子糖

Figure 7 Effects of different carbon sources on limonene synthesis. A: Cell growth curve. B: Production of limonene by shaking fermentation of strain *Saccharomyces cerevisiae* HY-PER-01 with different concentrations of galactose and raffinose as carbon sources. C: Production of limonene from strain *S. cerevisiae* HY-PER-01 Δ GAL80 by shaking flask fermentation with different concentrations of glucose as carbon source. Gal: Galactose; Raf: Raffinose.

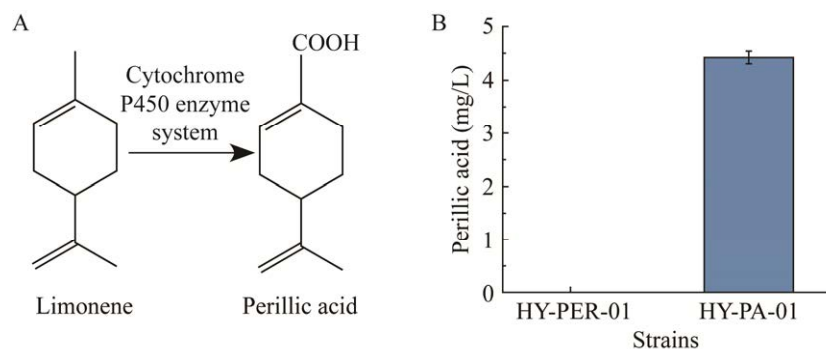


图8 柠檬烯衍生物紫苏酸的合成 A: 柠檬烯氧化为紫苏酸示意图. B: 菌株 *Saccharomyces cerevisiae* HY-PA-01 的紫苏酸产量

Figure 8 Synthesis of limonene derivative perillaric acid. A: Schematic diagram of oxidation of limonene to perillaric acid. B: Perillaric acid yield of strain *Saccharomyces cerevisiae* HY-PA-01.

到 855 mg/L。相较于生物转化反应,本研究实现了从半乳糖到高附加值产物紫苏酸的合成,尽管目前紫苏酸的产量水平仍远未达到工业生产的水平,但进一步证明了柠檬烯合成平台可用于从简单碳源中合成紫苏酸以及其他高附加值的柠檬烯衍生物如薄荷醇和香芹酮的可能性。

3 结论

论文将基因 *ERG20_{ww}* 和 *tLS* 整合至 *S. cerevisiae* BY4741, 成功构建柠檬烯合成菌株。采用区室化方式在过氧化物酶体中表达基因 *ERG20_{ww}* 和 *tLS* 时,其柠檬烯产量是胞质中表达时的 1.9 倍。通过过表达柠檬烯合成的前体模块,显著提高了柠檬烯的合成。分别过表达基因 *ERG10*、*ERG13*、*tHMGR*、*ERG12*、*ERG8*、*MVD1*、*IDH1*、*ERG20_{ww}* 和 *tLS*, 同时将基因 *ERG13* 和 *ERG10* 通过 GGGS Linker 进行融合并使其在过氧化物酶体中区室化表达,构建获得菌株 *S. cerevisiae* HY-PER-02 的柠檬烯产量达 20.85 mg/L。关键基因 *ERG10-ERG13* 的融合表达顺序影响目的产物的形成;而在过氧化物酶体中区室化表达融合基因更有利于柠檬烯的合成。高浓度的碳源可显著提高菌株 *S. cerevisiae* HY-PER-01 细胞的生长和柠檬烯的合成,其产量可达 86.74 mg/L。通过表达丹参来源的细胞色素 P450 酶基因和拟南芥来源 CPR 基因,成功构建合成紫苏酸的重组菌株,其产量达 4.42 mg/L。上述研究方法对于柠檬烯和紫苏酸等萜类化合物的微生物合成具有一定的借鉴意义。

REFERENCES

- [1] JONGEDIJK E, CANKAR K, BUCHHAUPT M, SCHRADER J, BOUWMEESTER H, BEEKWILDER J. Biotechnological production of limonene in microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(7): 2927-2938.
- [2] GUNESER O, DEMIRKOL A, YUCEER YK, TOGAY SO, HOSOGLU MI, ELIBOL M. Production of flavor compounds from olive mill waste by *Rhizopus oryzae* and *Candida tropicalis*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2017, 48(2): 275-285.
- [3] THOMSETT MR, MOORE JC, BUCHARD A, STOCKMAN RA, HOWDLE SM. New renewably-sourced polyesters from limonene-derived monomers[J]. Green Chemistry, 2019, 21(1): 149-156.
- [4] REN YY, LIU SS, JIN GJ, YANG XB, ZHOU YJ. Microbial production of limonene and its derivatives: achievements and perspectives[J]. Biotechnology Advances, 2020, 44: 107628.
- [5] CIRIMINNA R, LOMELI-RODRIGUEZ M, DEMMA CARÀ P, LOPEZ-SANCHEZ JA, PAGLIARO M. Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy[J]. Chemical Communications (Cambridge, England), 2014, 50(97): 15288-15296.
- [6] CHANDRAN SS, KEALEY JT, REEVES CD. Microbial production of isoprenoids[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(9): 1703-1710.
- [7] MOSER S, PICHLER H. Identifying and engineering the ideal microbial terpenoid production host[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(14): 5501-5516.
- [8] SHIN JONGHYEON, SOUTH ERIC J, DUNLOP MARY J. Transcriptional tuning of mevalonate pathway enzymes to identify the impact on limonene production in *Escherichia coli*[J]. ACS Omega, 2022, 7(22): 18331-18338.
- [9] FERRARA MA, ALMEIDA DS, SIANI AC, LUCCHETTI L, LACERDA PSB, FREITAS A, TAPPIN MRR, BON EPS. Bioconversion of R-(+)-limonene to perillic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(4): 1075-1080.
- [10] CHENG S, LIU X, JIANG GZ, WU JH, ZHANG JL, LEI DW, YUAN YJ, QIAO JJ, ZHAO GR. Orthogonal engineering of biosynthetic pathway for efficient production of limonene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(5): 968-975.
- [11] HU ZH, LIN LC, LI HX, LI P, WENG YR, ZHANG CY, YU AQ, XIAO DG. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for production of the valuable monoterpene D-limonene during Chinese Baijiu fermentation[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2020, 47(6/7): 511-523.

- [12] IGNEA C, RAADAM MH, MOTAWIA MS, MAKRIS AM, VICKERS CE, KAMPRANIS SC. Orthogonal monoterpene biosynthesis in yeast constructed on an isomeric substrate[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3799.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] MIRATA MA, HEERD D, SCHRADER J. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillaldehyde with *Pseudomonas putida* DSM 12264[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(7): 764-771.
- [16] 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 DIANA, 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.
- [17] PADDON CJ, WESTFALL PJ, PITERA DJ, BENJAMIN K, FISHER K, MCPHEE D, LEAVELL MD, TAI A, MAIN A, ENG D, POLICHUK DR, TEOH KH, REED DW, TREYNOR T, LENIHAN J, JIANG H, FLECK M, BAJAD S, DANG G, DENGROVE D, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.
- [18] YIFENG WEI, EE LUI ANG, HUIMIN ZHAO. Recent developments in the application of P450 based biocatalysts[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 43: 1-7.
- [19] BINGYIN PENG, LARS K. NIELSEN, SOTIRIOS C. KAMPRANIS, CLAUDIA E. VICKERS. Engineered protein degradation of farnesyl pyrophosphate synthase is an effective regulatory mechanism to increase monoterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 83-93.
- [20] 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.
- [21] LIU GS, LI T, ZHOU W, JIANG M, TAO XY, LIU M, ZHAO M, REN YH, GAO B, WANG FQ, WEI DZ. The yeast peroxisome: a dynamic storage depot and subcellular factory for squalene overproduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 57: 151-161.
- [22] 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.
- [23] 胡智慧, 谌柄旭, 于爱群, 肖冬光. 代谢工程改造酿酒酵母合成植物萜类 D-柠檬烯的策略[J]. *微生物学报*, 2018, 58(9): 1542-1550.
- [23] HU ZH, CHEN BX, YU AQ, XIAO DG. Strategies of metabolic engineering *Saccharomyces cerevisiae* to produce plant-derived D-limonene[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(9): 1542-1550 (in Chinese).
- [24] DAVIES FK, WORK VH, BELIAEV AS, POSEWITZ MC. Engineering limonene and bisabolene production in wild type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2014, 2: 21.
- [25] CHUANBO ZHANG, JINGJING LIU, FANGLONG ZHAO, CHUNZHE LU, GUANG-RONG ZHAO, WENYU LU. Production of sesquiterpenoid zerumbone from metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 28-35.
- [26] 郭晋蓉, 杨海泉, 张利华, 夏媛媛, 沈微, 曹钰, 陈献忠. 代谢工程改造热带假丝酵母合成 L-柠檬烯 [EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线 [2022-03-10]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/202203-110>.
- [26] GUO JR, YANG HQ, ZHANG LH, XIA YY, SHEN W, CAO Y, CHEN XZ. Synthesis of L-limonene by *Candida tropicalis* modified by metabolic engineering[EB/OL]. *Sciencepaper Online* [2022-03-10]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/202203-110> (in Chinese).
- [27] HAMMER SK, AVALOS JL. Harnessing yeast organelles for metabolic engineering[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(8): 823-832.
- [28] DUSSÉAUX S, WAJN WT, LIU YX, IGNEA C, KAMPRANIS SC. Transforming yeast peroxisomes into microfactories for the efficient production of high-value isoprenoids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

2020, 117(50): 31789-31799.

- [29] DELOACHE WC, RUSS ZN, DUEBER JE. Towards repurposing the yeast peroxisome for compartmentalizing heterologous metabolic pathways[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11152.
- [30] 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.
- [31] KANG W, MA T, LIU M, QU JL, LIU ZJ, ZHANG HW, SHI B, FU S, MA JC, LAI LTF, HE SC, QU JN, WING-NGOR AU S, HO KANG B, 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.
- [32] ZHANG Y, BIAN SQ, LIU XF, FANG N, WANG CK, LIU YH, DU YM, TIMKO MP, ZHANG ZF, ZHANG HB. Synthesis of cembratriene-ol and cembratriene-diol in yeast via the MVA pathway[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 1-9.
- [33] 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.
- [34] VANDAMME EJ, SOETAERT W. Bioflavours and fragrances *via* fermentation and biocatalysis[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2002, 77(12): 1323-1332.
- [35] DUETZ WA, BOUWMEESTER H, BEILEN JB, WITHOLT B. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(4): 269-277.

(本文责编 陈宏宇)