

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-049

酵母合成单萜类化合物的研究进展

高琪^{1,2}, 肖文海^{1,2}

(¹ 天津大学化工学院, 天津 300072; ² 天津大学合成生物学前沿科学中心和系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072)

摘要: 单萜类化合物是一类由两个异戊二烯单元缩合而成的萜类化合物, 被广泛应用于医药、食品、香料、化妆品、农业和能源等行业中。相较于植物提取和化学合成, 利用微生物异源合成单萜类化合物提供了一种高效、可持续及生态友好的可替代途径。酵母细胞由于具有短暂的生长周期、内源甲羟戊酸路径和完整的蛋白后修饰体系等优势, 成为生物合成单萜类化合物的潜在宿主。随着合成生物学关键技术的发展, 研究者们已经成功构建了合成单萜的微生物细胞工厂, 但与大规模工业化生产之间还有很大距离。本文介绍了单萜的生物合成途径, 除酵母内源甲羟戊酸途径外, 人工构建的异源异戊烯醇利用途径与醇依赖型半萜途径也可用于单萜前体香叶基二磷酸的合成, 随后围绕提高单萜前体供应、关键酶的改造和调控、区室化工程、缓解单萜的细胞毒性等几个方面阐述了利用酵母细胞合成单萜类化合物的策略和研究进展。最后基于目前单萜类化合物合成仍面临的前体供给不足与单萜及中间代谢物的细胞毒性等挑战, 对未来酵母合成单萜类化合物的发展方向进行了展望, 包括对单萜产生细胞毒性的具体机制进一步解析、更高效单萜合酶的挖掘与改造、动态调控单萜合成的代谢途径以及更稳定高效合成单萜宿主细胞的探索等, 旨在为以后利用酵母合成单萜提供一定的指导。

关键词: 单萜类化合物; 酵母; 代谢工程; 酶; 区室化工程; 细胞毒性

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

Advances in the biosynthesis of monoterpenes by yeast

GAO Qi^{1,2}, XIAO Wenhai^{1,2}

(¹School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; ²Frontier Science Center for Synthetic Biology and Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Monoterpenoids constitute a significant subclass of terpenoids, known for their volatility and strong aromatic properties. These compounds are extensively employed across multiple sectors, including pharmaceuticals, foods, flavors, cosmetics, agriculture, and energy, due to their diverse pharmacological and biological activities. Currently, monoterpenoids are primarily sourced from plant extracts or chemical synthesis. However, low yield and high cost associated with plant extracts as well as low purity and high energy consumption with chemical synthesis

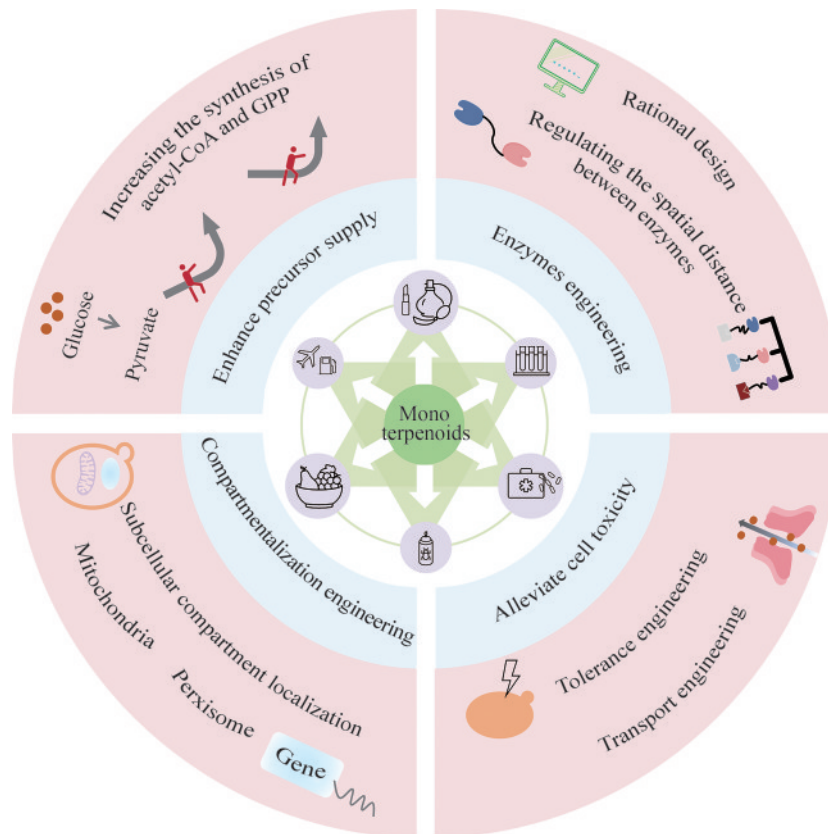
收稿日期: 2024-06-27 修回日期: 2024-08-23

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFC2101000)

引用本文: 高琪, 肖文海. 酵母合成单萜类化合物的研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6(2): 357-372

Citation: GAO Qi, XIAO Wenhai. Advances in the biosynthesis of monoterpenes by yeast[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(2): 357-372

cannot address the growing demand. As a result, the heterologous synthesis of monoterpenoids using microorganisms presents an alternative pathway that is efficient, sustainable, and eco-friendly. Yeasts show promise as hosts for monoterpenoid biosynthesis due to their fast growth, inherent mevalonate (MVA) pathway, and robust post-translational modification systems. Currently, the industrial production of the artemisinin precursor artemisinic acid and the sesquiterpene farnesene has been achieved using *Saccharomyces cerevisiae*. Advances in synthetic biology have enabled the construction of microbial cell factories for monoterpenoid synthesis. However, challenges remain in scaling up production due to limited precursor availability and monoterpene cytotoxicity. This review first introduces the foundational pathways of monoterpenoid biosynthesis in yeast, followed by discussion on engineering strategies and advancements in yeast-mediated monoterpenoid synthesis, which include enhancing the supply and utilization of acetyl coenzyme A and geranyl pyrophosphate (GPP), regulating and modifying key enzymes such as GPP synthase and monoterpene synthase, optimizing subcellular organelle localization and compartmentalization of MVA pathway genes and monoterpene synthases, and implementing exocytosis and tolerance engineering to mitigate monoterpene cytotoxicity. Future directions and strategies to overcome bottlenecks in microbial synthesis are explored to guide research in yeast synthesis of monoterpenoids.



Keywords: monoterpenoids; yeast; metabolic engineering; enzymes; compartmentalization engineering; cell toxicity

萜类化合物是以异戊二烯 (C_5) 作为基本单位, 通过多种萜类合酶催化下环化形成基本骨架, 并经过羟基化、甲基化、糖基化等后修饰后形成

的种类繁多的一大类化合物^[1]。根据所含异戊二烯单元的数量可以分为单萜、倍半萜、二萜、三萜、四萜、多萜等, 其中单萜又可分为无环单萜、

单环单萜、双环单萜以及三环单萜^[2]。

单萜类化合物大多挥发性强、香气浓郁，是许多植物精油的重要组成部分，由于其丰富的药理学和生物活性，被广泛应用于医药、食品、香料、化妆品和农业等领域中。如芳樟醇因具有强抗菌性和抗氧化活性可以用作防腐剂，延长食品的保质期，并可在茶叶中发挥调味作用^[3]。柠檬烯可以作用于害虫的多个靶点，通过抑制害虫感觉神经和运动神经的自发性动作^[4]、破坏昆虫体壁的蜡质层^[5]以及影响昆虫神经系统中的乙酰胆碱酯酶^[6]等方式发挥杀虫作用。香叶醇常被用于香料和化妆品的生产。此外，香叶醇能够抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡^[7]，以及靶向血管再生相关的基因^[8]，因此被视为一种有潜力的抗肿瘤化合物。鉴于部分单萜具有高能量密度和低凝固点，如柠檬烯和 α -蒎烯，可作为传统喷气燃料的替代品^[9]。

目前，单萜类化合物的来源主要有三种途径，包括植物提取、化学合成和生物合成。传统的直接从植物中提取单萜类化合物产量普遍较低，生产成本较高，无法满足大量的工业需求，而且可能会受到季节和地理变化的影响^[10]。而由于天然萜类化合物具有特定的结构，化学合成面临的一个关键技术挑战是合成产物往往是混合异构体，很难实现单一结构萜类化合物的合成^[11]。由于微生物有较短的生命周期与强大的生产力，利用微生物发酵合成萜类化合物提供了一种可替代的高效、可持续和生态友好的萜类化合物生产途径。此外，部分微生物仍可利用废弃食用油等丰富的廉价可回收资源生产萜类化合物，较传统方法更具有可持续性和经济性^[12]。

近年来多种微生物（如大肠杆菌、酿酒酵母等）已被设计改造为高效生产单萜类化合物的细胞工厂^[13]。其中酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）因具有鲁棒性、清晰的遗传背景以及蛋白后修饰功能等优势，成为应用广泛的工程菌。随着合成生物学的发展，越来越多的研究者们也开始利用解脂耶氏酵母与甘油假丝酵母等非常规酵母生产单萜类化合物。本文综述了酵母异源合成单萜类化合物的研究进展，对近年来代谢改造酵母合成单萜类化合物的主要策略进行总结，讨论目前仍

面临的一些瓶颈问题并提出可能的解决措施，以期为酵母细胞工厂高效合成单萜类化合物提供理论依据。

1 酵母单萜的生物合成途径

微生物中的单萜合成途径可以分为三个模块进行分析：①从碳源到共同前体异戊烯基二磷酸（isopentenyl diphosphate, IPP）和二甲基烯丙基二磷酸（dimethylallyl diphosphate, DMAPP）。其来源主要有两条途径：甲羟戊酸（mevalonate, MVA）途径和甲基赤藓糖醇-4-磷酸（methylerythritol-4-phosphate, MEP）途径。MEP途径存在于大多数细菌和植物细胞的叶绿体中，而MVA途径存在于真菌、动物、少数细菌以及一些植物的细胞质中^[12]。②在关键酶香叶基二磷酸合成酶（geranyl diphosphate synthase, GPPS）的催化下，1分子异戊烯基二磷酸（IPP）和1分子二甲基烯丙基二磷酸（DMAPP）立即缩合生成香叶基二磷酸（geranyl diphosphate, GPP）。③GPP作为直接前体被各种单萜合成酶（monoterpene synthase, MTS）转化为不同的单萜。GPP的顺式异构体NPP（neryl diphosphate）也可作为前体来生成环状单萜，如在酿酒酵母^[14]和解脂耶氏酵母^[15]中，NPP合成酶（NPPS）可以显著提高柠檬烯生物合成途径的效率和产量。

如图1所示，在酵母细胞中存在内源的MVA途径，乙酰乙酰辅酶A硫解酶（acetoacetyl-CoA thiolase, ERG10）催化乙酰辅酶A（acetyl-CoA）反应生成乙酰乙酰辅酶A，乙酰乙酰辅酶A在羟甲基戊二烯辅酶A合酶（hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, ERG13）与羟甲基戊二酰辅酶A还原酶（hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, HMGR）的催化作用下生成甲羟戊酸（mevalonate），随后甲羟戊酸激酶（mevalonate kinase, ERG12）、磷酸甲羟戊酸激酶（phosphomevalonate kinase, ERG8）、甲羟戊酸二磷酸脱羧酶（mevalonate diphosphate decarboxylase, ERG19）将甲羟戊酸催化生成IPP，IPP经异戊二烯基焦磷酸异构酶（isopentenyl diphosphate isomerase, IDI）作用异构化形成DMAPP^[16]。最后IPP与DMAPP以1:1的比例在

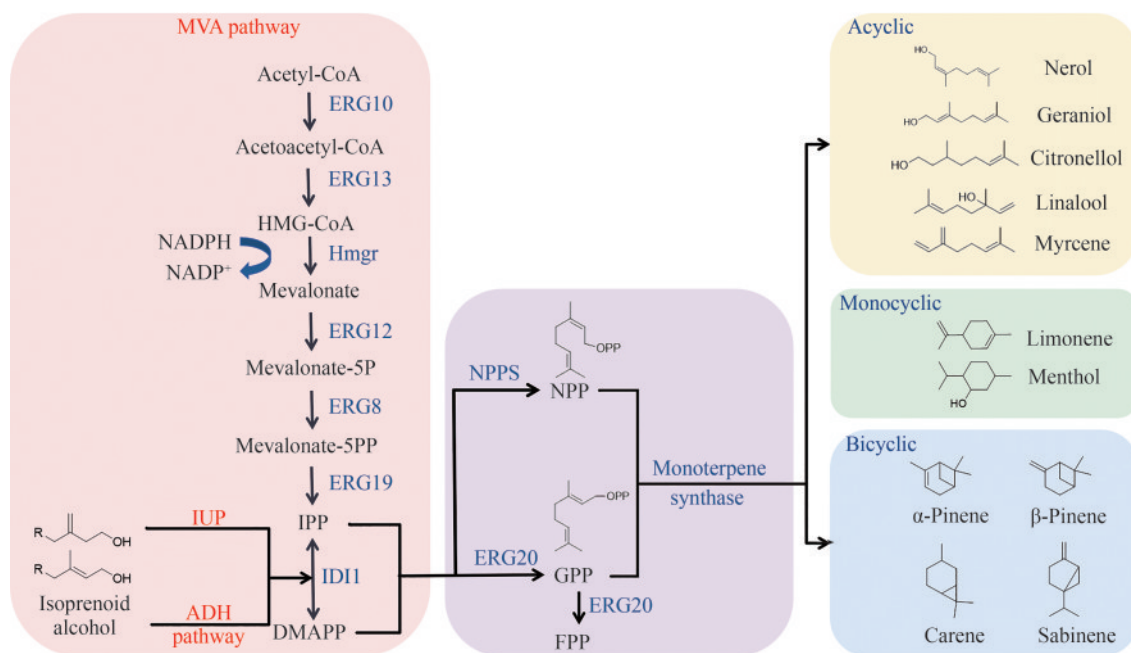


图1 酵母单萜的生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of monoterpenes in yeast

法尼基焦磷酸合成酶 (farnesyl pyrophosphate synthetase, ERG20) 催化下生成单萜的共同前体 GPP。

目前单萜前体合成除了天然的 MEP 与 MVA 途径, 构建人工生物合成途径可以有效缓解内源途径所带来的代谢负担, 且由于其不与细胞内中心代谢耦联, 可以有效减少碳通量以及辅因子的竞争。如通过构建异戊烯醇利用途径 (isopentenol utilization pathway, IUP), 表达酿酒酵母内源的胆碱激酶和拟南芥来源的异戊烯磷酸激酶 (IPK) 可以将异戊烯醇及其异构体异戊二烯醇生物转化为 IPP 或 DMAPP^[17]。而利用志贺氏菌来源的非特异性酸性磷酸酶和嗜酸热原体菌来源的 IPK 开发的一条醇依赖型半萜 (alcoholdependent hemiterpene, ADH) 途径可将外源异戊烯醇及其异构体二甲基烯丙醇转化为类异戊二烯^[18]。

2 不同酵母合成单萜的研究现状

目前国内外众多学者利用不同微生物如细菌和真菌等, 通过导入不同单萜合成酶实现多种单萜类化合物的合成。而在众多宿主中, 酵母细胞有其独特的优势: 鲁棒性强, 适合高密度发酵;

有内源 MVA 途径, 相较于 MEP 途径可以提供更丰富的萜类前体; 有完整的蛋白翻译后修饰体系, 可以更好地表达氧化还原、羟基化以及糖基化等反应所需的细胞色素 P450 酶^[19]; 有亚细胞器可以给萜类物质的生产提供更适宜的环境, 且通过区室化调控可以更高效地生产单萜^[20-21]。

酿酒酵母作为简单的模式真核生物已经实现了多种萜类物质的高效合成, 部分物质已经实现了工业化, 如青蒿素前体物质青蒿酸^[22]、化工原料法尼烯^[23]。随着生物技术的发展, 一些非常规酵母如解脂耶氏酵母、热带假丝酵母等在萜类生产中的优势越来越突出。解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 与酿酒酵母相比乙酰辅酶 A 含量更高, 且没有 Crabtree 效应, 耐盐、耐低温并能在低 pH 值的环境生长, 而且能利用葡萄糖、废弃的食用油、乙醇、甘油等多种底物^[24]。许多萜类物质 (如 β -胡萝卜素、番茄红素等) 的生物合成在解脂耶氏酵母中无需复杂改造便能获得比酿酒酵母更高的滴度^[25]。2023 年, Blenner 团队^[26] 在解脂耶氏酵母里仅进行了较为简单的代谢改造就获得了 1 g/L 的香叶醇, 是迄今为止在酵母中的最高滴度, 这充分表明了解脂耶氏酵母生产香叶醇等单萜的潜力。Wei 等^[27] 在解脂耶氏酵母中通过构建 α -蒎烯正交生物合成途径、启动子工程、优化前体途径

和提高蛋白质溶解度,在葡萄糖为唯一碳源时, α -蒎烯的产量为19.6 mg/L,比初始产量显著提高了218倍。随后在废食用油和木质纤维素水解液培养基中成功获得了33.8 mg/L和36.1 mg/L的 α -蒎烯产量,是迄今为止在酵母中报道的最高产量。

产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)是在高渗透压环境下从天然样品中分离得到的一株GRAS耐高渗工业酵母^[28],具有生长迅速、无特殊营养要求的优点,且耐高渗透压、氧化、高热和低pH等多种环境胁迫,是潜在的优良工业底盘细胞^[29]。马腾飞等^[30]最初用 α -蒎烯刺激产甘油假丝酵母可以上调MVA途径基因的表达,提高麦角甾醇的含量。随后发现产甘油假丝酵母的蒎烯耐受性是酿酒酵母的5倍,通过强化MVA路径并引入NPP合酶、过表达*Hog1*基因与外源磷酸酶、添加NaCl升高渗透压促使角鲨烯应答,最后通过优化培养基及5 L发酵罐扩大培养得到16.4 mg/L滴度的蒎烯^[31]。Zhao等^[32]利用MVA和IUP双途径,在天然启动子 P_{GAP} 的基础上,开发了癸烷响应的杂合启动子,不仅启动子的转录强度提高到了原始的3.6倍,而且有效分离了细胞生长和产物形成,最终在摇瓶水平上获得1194.6 mg/L香叶醇。

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)是一种二倍体非常规酵母,具有细胞生长快、环境耐受能力强、底物范围广等特点^[33],且具有较强的 ω -氧化途径、 β -氧化途径以及木糖利用途径,使其可以代谢烷烃、脂肪酸以及木糖进行生长繁殖,已经在长链二元酸^[34]和木糖醇^[35]生产中实现了工业化应用。此外,热带假丝酵母内的乙酰辅酶A水平相对较高,可在胞内积累较高含量的脂质,是萜类化合物高效生产的潜在优良底盘细胞。郭晋蓉^[36]通过亚细胞区室化、过表达*ERG20^{mv}*以及优化初糖浓度和发酵时间得到了141.48 mg/L滴度的柠檬烯,随后导入细胞色素P450酶CYP71A76获得了106.69 mg/L滴度的紫苏酸。表1为近些年利用酵母细胞合成单萜类化合物的进展。

3 代谢工程改造酵母细胞合成单萜类化合物的策略及应用实例

直接在酵母细胞中引入外源的单萜合酶往往

产量不高,主要存在前体供应不足、关键酶活性及表达水平低和单萜产生的细胞毒性等问题。针对这些问题,近年来众多研究者发展了一系列策略(图2),有效提高了酵母细胞合成单萜的能力。

3.1 提高前体供应

在植物中,单萜的重要前体物质GPP由专一性GPP合成酶催化IPP和DMAPP合成,但在酵母细胞中由于缺乏特异性的GPP合成酶,内源MVA途径只能释放很少的GPP,使得酵母细胞中GPP的含量远低于FPP,大大限制了单萜的产量^[46]。为了增加GPP的供应,研究人员采取了包括提高乙酰辅酶A的供应、增强MVA途径的通量、动态截流GPP下游代谢途径以及GPP合成酶的蛋白质工程等在内的多种策略。

3.1.1 提高乙酰辅酶A的供应

酵母细胞中乙酰辅酶A的主要合成场所为线粒体且不会被转运到细胞质中,使得乙酰辅酶A的供给成为其生物合成的限速步骤^[47]。在酿酒酵母中,若以葡萄糖为碳源,乙酰辅酶A来源于细胞质的丙酮酸脱氢酶支路(PDH bypass)以及线粒体中丙酮酸脱氢酶复合物(PDH complex)催化丙酮酸而形成^[48]。若以乙醇为碳源,乙酰辅酶A的合成路径缩短为在细胞质中合成,两个脱氢酶ADH2和ALD6催化乙酰辅酶A生成乙酸,然后乙酸在乙酰基转移酶(ACS)的催化下生成乙酰辅酶A。为了有效地将碳流重定向到胞质乙酰辅酶A,可以将异源细菌PDH引入到酿酒酵母中以充分利用胞质丙酮酸,从而提高乙酰辅酶A供应^[49]。然而,由于酿酒酵母具有Crabtree效应,乙醛也可以被乙醇脱氢酶选择性地转化为乙醇。为了最大限度地乙醇流向乙酰辅酶A,过表达ADH2、ALD6和沙门氏菌(*Salmonella enterica*)来源的ACS突变体*SeACS^{L641P}*(乙酰辅酶A合成酶)被证明是一种有效方案^[50]。然而,在某些情况下单独过表达酵母内源基因*ADH2*、*ALD6*和*ACS2*可能不足以将乙酸转化为乙酰辅酶A,反而导致乙酸溢出以及柠檬烯产量降低^[51]。除了提高乙酰辅酶A的供应外,也可以通过敲除竞争路径基因柠檬酸合酶CIT2和苹果酸合酶MLS1来阻断乙酰辅酶A的消耗,使得乙酰辅酶A更多地流向单萜合成^[52]。

表1 酵母合成单萜类化合物的研究现状

Table 1 Current status on yeast synthesis of monoterpenoids

单萜	底盘	策略	产量 (mg/L)	参考 文献
香叶醇	酿酒酵母	①过表达截短的 <i>tHMGR</i> 和 <i>IDII</i> ②利用计算机结构分析和建模来截短 CrGES 酶的 N 端转运肽 ③反向融合 <i>ERG20^{mw}</i> /t3CrGES 与另一拷贝 <i>ERG20^{mw}</i> 共表达 ④补料分批发酵	1680	[37]
	解脂耶氏酵母	①过表达截短的 <i>HMGI</i> 、 <i>IDI</i> 和 <i>tCrGES</i> ②过表达 3 拷贝的 <i>tCrGES</i> 和单拷贝的 <i>ERG10</i> 、 <i>HMGS</i> 、 <i>tHMGI</i> 、 <i>IDII</i>	1000	[26]
	甘油假丝酵母	①MVA 与 IUP 双途径 ②设计癸烷响应杂交启动子调控基因表达:将 P_{CgALK1} 的 ARR1 元件串联至 P_{GAP} 的核心启动子 ($P_{GAP}^{(core-477)}$)	1194.6	[32]
香茅醇	酿酒酵母	①表达 CrIS 还原酶并敲除 <i>ATF1</i> ②内源 <i>ERG20</i> 突变为 <i>ERG20^{F96W}</i> ③对融合蛋白、CrIS 酶、 <i>IDII</i> 使用蛋白支架 SF1(SH3 ₁ PDZ ₁ GBD ₁)	8300	[38]
芳樟醇	酿酒酵母	①对芳樟醇合成酶(<i>t67OMcLIS_M</i>)底物结合口袋的入口处氨基酸位点 F447E 突变 ②利用细胞质和过氧化物酶体促进芳樟醇合成 ③5 L 补料分批发酵	2600	[39]
月桂烯	酿酒酵母	①使用弱启动子 P_{HXT1} 替换 <i>ERG20</i> 的启动子 ②将 <i>ERG20^{F96W}</i> 与 MS/OS 进行融合表达	8.12	[40]
罗勒烯	酿酒酵母	③优化两相发酵中有机相的添加量	34.56	
柠檬烯	酿酒酵母	①动态抑制竞争性旁路 ②优化 tLimS 拷贝数 ③增加乙酰辅酶 A 和 NADPH 供应	2630	[41]
	解脂耶氏酵母	①引入额外拷贝的柠檬烯合成基因 ②甘油和柠檬酸作为碳源	165.3	[42]
薄荷醇	酿酒酵母	①薄荷醇从头合成路径的构建 ②过表达 MVA 路径基因 ③使用弱启动子 P_{HXT1} 替换 <i>ERG20</i> 的启动子 ④增加限速酶 IPDH 与 KSI 拷贝数	6.28	[43]
蒎烯	酿酒酵母	①表达 <i>ERG20^{mw}</i> + <i>tPtPS</i> ②过表达 <i>IDII</i> 和 <i>MAF1</i>	11.7	[44]
	解脂耶氏酵母	①构建非正交生物合成途径 ②利用餐厨废油和木质纤维素水解液作为碳源	36.1	[27]
	甘油假丝酵母	①强化 MVA 路径并引入 NPP 合酶 ②过表达 <i>Hog1</i> 基因与外源磷酸酶 ③对 Pt30 进行理性设计——点突变(T376R) ④添加 NaCl 升高渗透压促使角鲨烯应答 ⑤优化培养基及 5 L 发酵罐扩大	16.4	[31]
桉烯	酿酒酵母	①在细胞质和线粒体中同时表达 <i>t34SabsI</i> ②过表达线粒体相关基因 <i>AIM25</i>	154.9	[45]

但当在以乙醇为碳源的菌株里敲除两个基因时,将会严重影响菌株的生长^[53]。

在解脂耶氏酵母中,ATP-柠檬酸裂解酶(ACL1、ACL2)是胞质乙酰辅酶 A 的主要来源,因此过表达 ACL1 或 ACL2 可以增加乙酰辅酶 A 的供应。柠檬酸是线粒体 TCA 循环的代谢产物,过表达 AMP 脱氢酶 (AMPD) 抑制异柠檬酸脱氢酶

的活性,将更多的柠檬酸转运到细胞质中从而提高胞质中乙酰辅酶 A 的通量^[54]。人工引入异源磷酸酮醇酶 (PK) 和磷酸转乙酰酶 (PTA) 能够有效提高胞质乙酰辅酶 A 的供应,并且已被广泛用于提高萜类化合物的产量^[55]。

3.1.2 过表达 MVA 路径关键酶

HMGR 是 MVA 途径的关键限速酶,其包含两

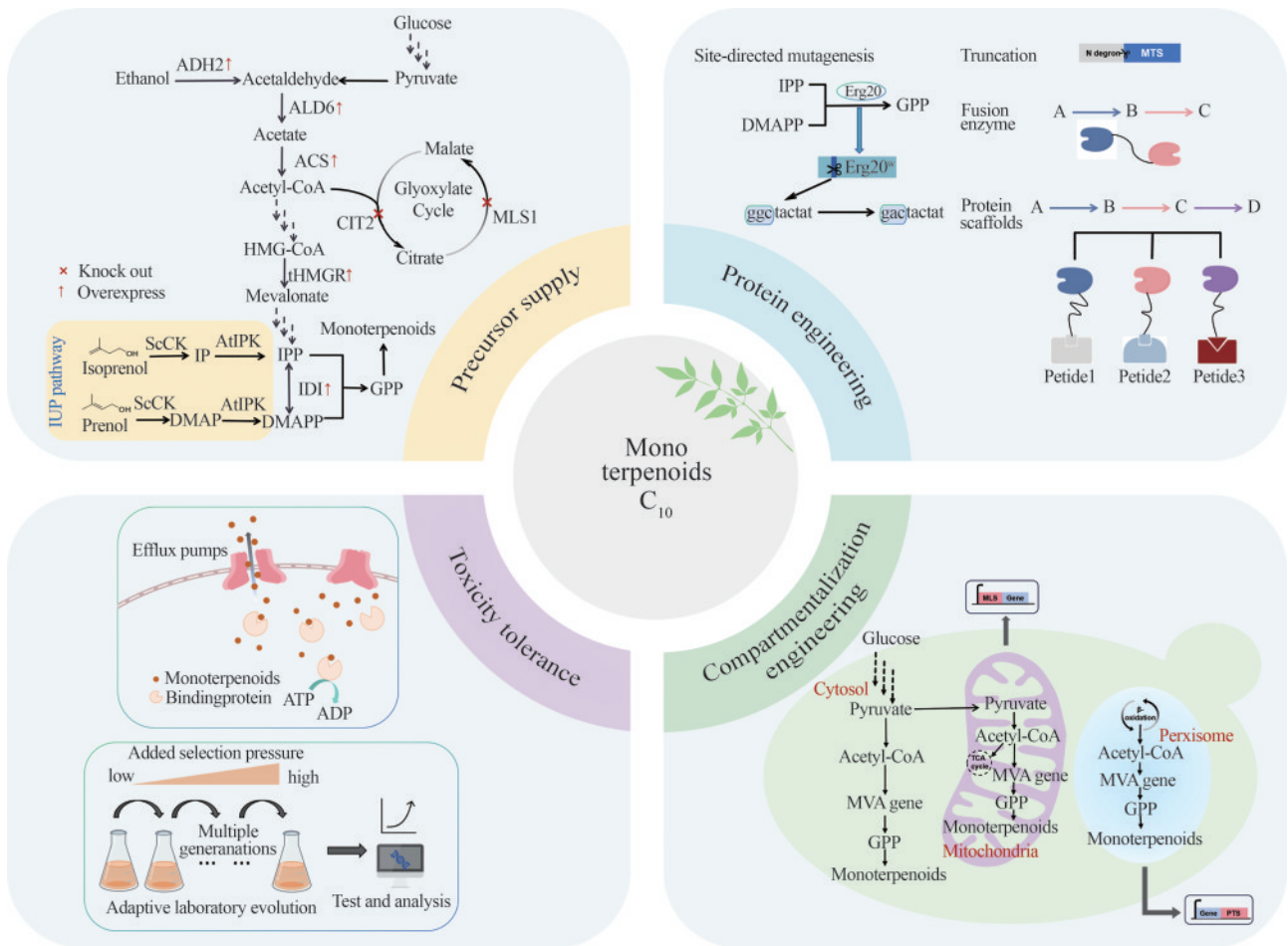


图2 酵母合成单萜的工程化策略

Fig. 2 Engineering strategies for the synthesis of monoterpenoids in yeast

个同工酶 HMG1 和 HMG2, 其中 HMG1 较稳定, HMG2 易被细胞降解, 两个酶都受不同机制的负反馈调控^[56]。目前过表达截短的 HMR1 (tHMG1) 已经成为萜类化合物生产中增强前体供应的通用手段。Cao 等^[15] 在解脂耶氏酵母中单独过表达 *tHMG1* 使柠檬烯产量比对照菌株提高了约 18 倍, 而同时过表达 *ERG12* 和 *HMG1* 柠檬烯产量提高了 112 倍。Wei 等^[27] 过表达 *HMGGR*、*ERG8* 与 *ERG12*, α -蒎烯产量提高了 13.5 倍。由于 MVA 路径只能产生 IPP 而不能产生 DMAPP, *IDI1* 催化 IPP 和 DMAPP 之间的异构化, 这使得 *IDI1* 酶在单萜的生产中是必不可少的。Ignea 等在酿酒酵母中过表达 *IDI1* 分别使桉烯和桉脑产量提高了 3 倍^[57] 和 5 倍^[58]。当在香叶醇生产中采用相同的策略时, 其产量提高了 1.45 倍^[59]。

除了过表达已知的 MVA 路径限速酶外, 有研

究通过机器学习指导的建模定量揭示了每个酶对产物产量的贡献, 发现 *ERG12* 也是 MVA 路径关键酶^[60]。Zhou 等^[61] 在酿酒酵母中过表达整个 MVA 途径基因提高了前体 GPP 的产量, 使得芳樟醇产量提高到 36.48 mg/L。除了过表达关键酶外, 一些基因的敲除也可以提高单萜产量, 如敲除 *YPL062W* 会刺激一些 MVA 途径基因的上调, 将碳流导向单萜前体乙酰辅酶 A 和 MVA, 从而提高 MVA 和香叶醇的产量^[62]。

3.1.3 引入异源 IUP/IPU 途径

内源性基因和异源通路的过表达常常受到宿主自身固有调控网络与代谢竞争的影响, 在酵母中过表达内源 MVA 途径相关基因仅能一定程度提高产量, 仍无法摆脱内在调控机制的限制。为了突破这一瓶颈, 有研究者通过在酿酒酵母中引入胆碱激酶 (CK) 和异戊烯磷酸激酶 (IPK) 基

因组成两步磷酸化途径 (IUP), 大大缩短了萜类合成前体 IPP 和 DMAPP 的合成步骤, 且 IUP 途径独立于天然途径^[17]。通过异源表达 IUP 途径, IPP/DMAPP 池相对于原生 MVA 途径提高了 147 倍, 这表明 IUP 为萜烯合成提供充足的关键前体^[63]。Zhao 等^[32]通过在甘油假丝酵母中引入与中心碳代谢脱钩的 IUP 途径使得菌株的 IPP/DMAPP 池提高了 4.2 倍, 香叶醇产量提高了 99.8%。

3.2 关键酶的改造和调控

3.2.1 GPP 合酶的改造

充足的 GPP 供应对于单萜类化合物的合成至关重要, 但大多数微生物中缺乏特异性的 GPPS, 而是由 ERG20 催化 IPP 和 DMAPP 而得到, 随后 GPP 继续与 1 分子 IPP 生成 FPP, 由于 GPP 与 ERG20 的活性位点结合紧密, GPP 大部分进一步合成 FPP, 少部分处于游离状态, 这大大限制了单萜的产量^[64]。Zhao 等^[65]在酿酒酵母中表达 *Abies grandis*、*Picea abies* 和 *Catharanthus roseus* 三种来源的 GPP 合酶 *AgPPS2*、*PaPPS2* 和 *CrGPPS* 并将其截短, 香叶醇的产量不仅没有提高, 反而有所下降。推测在酵母体内异源 GPP 合酶的活性较难表达, 因此对 ERG20 进行蛋白质工程改造是增强 GPP 供应的主要策略。

Fischer 等^[46]对 ERG20 的 K197 位点进行定点突变, 发现 K197G/A/L/C/S/T/R/D/E/N 突变体可以提高香叶醇、芳樟醇和香茅醇的产量。Ignea 等^[57]通过对 ERG20 同源建模分析, 发现其主要通过 F96、A99、N127 氨基酸位点抑制 FPP 合酶活性且不会影响 GPP 的合成, 随后对其进行一系列定点突变, 发现突变 *ERG20^{F96W}* 和 *ERG20^{N127W}* 后, 桉烯产量分别提高了 3.21 倍和 5.57 倍。对 *ERG20* 进行 F96W 和 N127W 双突变后, 桉烯产量增加到 10.32 倍。Zhang 等^[66]在线粒体和细胞质中同时表达 F96W 和 N127W 组成的 ERG20 高效双突变酶, 使芳樟醇产量提高到 2.69 mg/L, 比对照菌株提高了 2 倍。Jiang 等^[37]通过过表达 ERG20 的 F96W 和 N127W 双突变酶, 香叶醇的滴度提高了 34%。

3.2.2 单萜合酶的挖掘与改造调控

筛选合适的异源单萜合酶并提高其功能性表

达, 是单萜类产物高效合成的关键和主要挑战。目前已经有大量的单萜合酶被成功挖掘并在酵母细胞中成功表达, 如香叶醇合酶、柠檬烯合酶、芳樟醇合酶、蒎烯合酶等。Jiang 等^[37]在酿酒酵母中表达了 9 种不同植物来源的香叶醇合酶 (geraniol synthases, GES), 发现长春花来源的 *CrGES* 所产生的香叶醇产量最高。

大多数植物来源的单萜合酶 N 端含有转运肽, 用于将酶定位至质体, 未成熟的酶在到达目标部位后其转运肽被切进一步形成成熟的酶^[67]。但酵母细胞中缺乏清除质体转运肽的机制, N 末端转运肽的存在可能会影响酶的活性, 进一步影响单萜的合成。故通过信号肽截短可以在一定程度上提高酶的异源表达活性且防止其错误定位。Zhao 等^[65]通过表达截短的缬草 (*Valeriana officinalis*) 来源香叶醇合成酶 (*tVoGE*), 发现香叶醇的产量是全长 *VoGES* 的产量的 3 倍。确定合适的截短位置对于酶的高效表达是必要的, Jiang 等^[37]利用计算机预测长春花来源的香叶醇合酶 *CrGES* 的信号肽结构, 在 *CrGES* 酶 N 端的 4 个不同位置进行截短 (S14、L28、S43 和 S52), 发现 S43 处截短的 *CrGES* 酶较另外三种截短酶的二级结构稳定性更高且表现出最高的香叶醇产量 (191.61 mg/L), 是未截短菌株的 4.45 倍。Denby 等^[68]发现薄荷柠檬 (*Mentha citrata*) 来源的芳樟醇合成酶在 67 位 (*t67McLIS*) 截短后的活性最佳, 芳樟醇产量达到 16 mg/L。

利用蛋白质间的相互作用理论, 通过一段短肽连接序列将两个酶进行融合, 可以增强底物隧道效应、提高酶的底物浓度和减少底物的消耗。连接 linker 的长度和蛋白的融合方向是影响融合酶催化活性的关键因素。Wang 等^[69-70]通过调节 GSG linker 的数量, 构建了 5 个不同 linker 长度的融合蛋白 CS(cineole synthase)-P450_{cin}, 这些融合蛋白在生产水平、生产速率和总生产比率上表现出明显的差异。Jiang 等^[37]利用短柔性连接肽 GSG 分别从正向和反向连接 *t43CrGES* 与 *Erg20^{mw}*, 根据对 *t43CrGES* 和 *Erg20^{mw}* 表面电荷分布的分析以及基于静电吸引作用的设计, 在反向融合蛋白 *t43CrGES-ERG20^{mw}* 的基础上表达 *ERG20^{mw}* 的另一份拷贝, 使香叶醇产量提升了 30%, 达到 523.96 mg/L。Deng

等^[71]用3个不同长度的连接肽将 *Actinidia arguta* 来源的芳樟醇合成酶 (*AaLS1*) 与 FPPS 融合, 发现表达(GGGGS)₃融合后的蛋白复合物相比于表达两个游离酶芳樟醇产量提高了 69.7%。Zhao 等^[65]发现 t1%GES-GGGS-ERG20^W的融合方式使得香叶醇产量提高了 1.7 倍, 反向融合以及其他两种更长的 linker 产量无明显变化甚至有所降低。

与融合蛋白相比, 蛋白支架可以组装连续催化的多个酶, 拉进不同酶之间的空间距离, 提高酶的底物浓度, 减少底物损失。这一策略主要依赖于蛋白结构域和配体间的相互作用, 可以通过调节蛋白支架上的配体数量和顺序进一步优化蛋白复合体的表达和活性。Jiang 等^[38]选择 SH3 (来自于小鼠 Crk 的 SH3 结构域)、GBD (大鼠神经-维斯科特-奥尔德里奇综合征蛋白的 GTPase 结合结构域) 和 PDZ (来自小鼠 α -合酶蛋白的 PDZ 结构域) 构建合成蛋白支架, 使用 GSG 短肽将 SH3、GBD、PDZ 的配体分别与融合蛋白 tCrGES-ERG20^{F96W/N127W}、CrIS、IDI1 的 C 末端融合, 调整不同种酶的配体数量后发现 SF1 (SH3₁PDZ₁GBD₁) 是最佳的配体比例支架, 香茅醇的产量提高了 21% 达到 655.20 mg/L。Zhou 等^[72]利用短肽标签 RIAD 和 RIDD 以 1:2 的化学计量比模块化组装芳樟醇合成酶突变体 t670McLIS^{E343D/E352H} 和 ERG20^{F96W/N127W}, 使得芳樟醇产量提高了约 42%。

3.3 区室化工程

目前酵母内大量的代谢反应发生在细胞质中, 单萜合成的代谢工程主要集中在细胞质代谢途径的重组上, 利用线粒体、过氧化物酶体、内质网等亚细胞器优化单萜生产的研究受到越来越多的关注。亚细胞器不仅具有异于胞质的理化环境, 还具有独特的代谢产物、酶、辅因子等物质, 是构建高效合成途径的潜在场所^[73]。如过氧化物酶体作为脂肪酸 β 氧化的场所, 可以提供充足的乙酰辅酶 A。线粒体中的乙酰辅酶 A 含量比细胞质中的高近 20~30 倍^[74]。故合理的细胞器区室化可以极大地提高乙酰辅酶 A 的利用率。细胞器的膜结构还可以将酶、底物和辅因子在细胞内局部浓缩, 改善底物通道, 提高产物的合成效率, 并且可以

减少竞争途径或代谢串扰对底物的消耗, 在一定程度上可以减轻有毒中间产物或蛋白对宿主的毒性。目前单萜类化合物亚细胞器定位多为线粒体和过氧化物酶体, 内质网和脂滴的细胞器工程尚未应用到单萜的合成中, 但角鲨烯^[75]、原人参二醇^[75]、 β -胡萝卜素^[76]和番茄红素^[77]的合成结果表明这种策略对于单萜类化合物的合成也是可行的。

Kong 等^[41]将 MVA 途径和柠檬烯合成途径中的酶整合至线粒体中, 以调节柠檬烯的细胞质和线粒体的合成途径, 柠檬烯滴度由 1097.43 mg/L 提高到 1586 mg/L。Jia 等^[45]将 N 末端截短的桉烯合酶 (t34SabS1) 分别定位到不同组合的双亚细胞器中 (CP/CM/PM/CC/MM), 发现在细胞质和线粒体中同时表达时, 桉烯的产量最高提升了 1.53 倍, 而在此基础上继续在过氧化物酶体中引入 t34SabS1 桉烯产量有所下降, 因此合适的细胞器定位对单萜合成是重要的。Kampranis 团队发现酵母的过氧化物酶体膜对 GPP 具有一定的阻隔作用, 通过在酿酒酵母的过氧化物酶体中引入 MVA 途径相关酶、ERG20^{N127W} 和单萜合酶来构建单萜合成途径, 可以避免细胞质内代谢对单萜合成的干扰。对于其测试的所有单萜类化合物, 过氧化物酶体定位后的单萜产量比细胞质中的总产量增加了 15~125 倍, 在半连续补料-分批培养条件下, 得到 5.5 g/L 的香叶醇和 2.6 g/L 的 D-柠檬烯^[78]。

有研究发现基因 *PEX30-32* (编码过氧化物酶体生物发生因子) 和基因 *ATG36* (编码过氧化物酶体自噬受体) 的单敲除和多敲除可以获得持续高数量的过氧化物酶体用于单萜的生产^[79]。此外, 区室化工程仍面临一些挑战需要克服, 如细胞器内代谢通量不平衡造成细胞代谢负担, 细胞器定位标签对酶的负面影响以及细胞器中蛋白丰度的积累限制。

3.4 缓解单萜毒性

大多数单萜对微生物细胞有较强的毒性, 有研究表明其产生毒性的机制可能有以下几个方面: ①改变细胞膜流动性、结构等, 导致细胞死亡。Parveen 等^[80]用 α -蒎烯胁迫酿酒酵母, 利用转录组

学方法发现酿酒酵母在萜烯胁迫下磷脂合成相关基因显著上调,因此可以推测细胞膜在酿酒酵母抵御单萜胁迫过程中可能发挥关键作用。②细胞壁结构受到损伤从而影响细胞生长。Brennan等^[81]发现在柠檬烯刺激下细胞膜未发生变化,细胞对细胞壁降解相关酶的敏感性增加4倍,说明细胞壁结构受到严重破坏,并通过转录组测序发现与细胞壁完整性相关的基因上调。③单萜会破坏细胞内活性氧ROS产生与清除间的平衡,从而使得ROS不断积累,破坏细胞内生物膜、脂质、蛋白质等。Bakkali等^[82]研究发现,不同单萜类化合物处理下的酿酒酵母体内积累了不同类型的ROS。④抑制细胞呼吸而影响能量代谢。Uribe等^[83]发现, β -蒎烯的积累会抑制以葡萄糖或乙醇为底物的酵母细胞的正常呼吸,也会抑制细胞中质子泵和钾离子的转运,干扰线粒体膜的完整性进而影响ATP的产生。当单萜达到一定浓度时可能会对细胞产生永久损伤甚至死亡,因此缓解单萜类化合物的细胞毒性是构建单萜高效生产菌株的重要方向。

为缓解单萜化合物对细胞产生的毒性,最常用且简单有效的方法为采用两相发酵体系对产物进行原位抽提,不仅可以降低细胞内单萜含量,减缓细胞代谢压力,也可以有效防止目标产物的挥发,从而提高产量^[84]。常用有机溶剂有十二烷、十四酸异丙酯、正十烷等。Liu等^[85]将十四酸异丙酯添加到培养基中形成两相培养系统,有效防止了香叶醇的挥发。但这种策略的效果十分有限,目前研究者提高细胞单萜耐受性的方法主要有两种:减少单萜与细胞接触的外排工程和提高底盘细胞对单萜的耐受性工程。

3.4.1 外排工程

外排工程是指外排泵(主要是外排蛋白)识别并利用质子动力将有毒物质排出细胞外,减少胞内有毒物质的积累,从而减轻有毒物质积累所造成的毒性。大肠杆菌中含天然的外排系统AcrAB-TolC,该系统主要有三个部分:膜融合蛋白(AcrA)、外排转运蛋白(AcrB)和外膜通道蛋白(TolC),可以将细胞内的溶剂、抗生素和其他药物分子等外排到培养基中^[86]。在酵母细胞中,还没有发现单萜的天然外排蛋白,因此引入异源转运蛋白来转运单萜是有益的。Wang等^[87]在酿酒

酵母中异源表达子囊菌(*Grossmannia clavigera*)来源的多效耐药(PDR)转运蛋白GcABC-G1,其以ATP水解为能量来促进(+)-3-萜烯、D-柠檬烯和 β -蒎烯的外排。Demissie等^[88]表达薰衣草来源的多药耐药(MDR)型ABC转运蛋白LaABC1,增强了酵母对香叶醇的耐受性。Chang等^[89]在蝴蝶兰中通过双链RNA干扰和基因沉默来下调ABC亚家族G基因PbABC1和PbABC2,发现香叶醇的释放有所减少,由此在酵母细胞中异源表达这两个转运蛋白是促进香叶醇外排的一种有效策略。Rafiei等^[90]过表达来自长孢轮枝菌的多效性药物转运蛋白旁系同源基因(*ITAbcG1a*)增强了酿酒酵母对 β -蒎烯的抗性。陈天华^[91]在表达桉烯合酶t34SabS1的基础上异源表达外排蛋白GcABC1,桉烯产量提高了1.04倍。

除了引入异源转运蛋白外,部分酵母内源ABC转运蛋白相关基因也会促进产物分泌。Hu等^[92]选择了多种酵母内源ABC转运蛋白(Pdr5p、Pdr10p、Pdr15p、Ste6p、Yor1p、Pdr18p、Pdr11p、Aus1p、Pdr3p和Tpo1p)来评估其对酵母细胞内D-柠檬烯转运的影响,发现只有转运体Pdr5p和Pdr15p可以提高细胞对D-柠檬烯的耐受能力。Gerke等^[79]发现在酿酒酵母中截短后的Bull基因(编码 α -Arrestin-Like Adaptor蛋白)香叶醇的产量提高了63%。但某些单萜可能通过扩散比与外排的转运蛋白结合更快地穿过细胞膜,因此,过表达某些转运体不仅不能提高菌株性能,甚至会对细胞活性产生副作用。

3.4.2 耐受性工程

与外排工程不同,耐受性工程的最终目标不是将单萜类物质运出细胞,而是直接调节对细胞进行改造,增强菌株自身对有毒产物的耐受性。传统的实验室进化(adaptive laboratory evolution, ALE)能够在一定的胁迫条件(高温、低pH、高盐度或特定化学物质)下筛选出理想的表型,快速进化出细胞对有毒物质的耐受性。Brennan等^[93]用不同浓度柠檬烯对酿酒酵母进行驯化,经过200代的进化培养得到了6株柠檬烯耐受性显著提高的菌株,通过基因组全测序发现Tcb3p蛋白发生突变,随后通过过表达tTcb3p¹⁻⁹⁸⁹蛋白验证其功能,发现菌株对柠檬烯的耐受性提高了9倍,并且也显

著提高了细胞对包括 β -蒎烯和月桂烯在内的其他单萜的耐受性。Li等^[94]通过短期的ALE策略,得到了一株耐受1 g/L柠檬烯的解脂耶氏酵母菌株,其柠檬烯产量提高了52%。同时通过转录组学分析发现了8个候选基因有助于提高解脂耶氏酵母对柠檬烯的耐受性,通过形态学和细胞质膜的完整性分析,阐明了柠檬烯对该酵母细胞毒性的潜在机制。李言等^[95]用不同浓度的芳樟醇对酿酒酵母进行适应性驯化,筛选得到两株耐受性提高的突变株。通过全基因组重测序分析,发现这两株突变株都含有YBR074W^{T838N}、YBR172C^{K404Q}、YHR007C^{G466R}、YMR275C^{F384}4个基因突变,并进一步确定了其对芳樟醇耐受性的提高有协同作用。

目前研究者们已经采取了多种策略来提高细胞的单萜耐受性,但单萜对细胞产生毒性的具体机制尚未解析,且单萜毒性仍然是限制单萜产量的重要因素。因此,需继续探索单萜产生细胞毒性的具体机理从而采取相对应的策略以提高细胞的单萜耐受性,从而提高单萜产量。

3.5 其他策略

除以上常用策略外,还有很多可以提高单萜产量的方法,如减少单萜内源性转化及弱化单萜的下游途径。Zhao等^[96]通过敲除老黄酶OYE2和乙酰转移酶ATF1,减少香叶醇向香茅醇和乙酸香叶酯的转化,香叶醇的产量分别提高了1.7倍和1.6倍。Amiri等^[97]用受蛋氨酸抑制的MET3启动子替换鲨烯合成酶ERG9的天然启动子,可有效下调鲨烯合成酶的表达,使酿酒酵母中芳樟醇的积累量达到78 μ g/L,是对照菌株的2倍多。酵母细胞的单萜合成途径中涉及到多步氧化还原反应,在提高MVA途径代谢通量后往往会造成胞内辅因子供应不足进而损害细胞内的氧化还原平衡,因此协调细胞内的氧化还原平衡可以在一定程度上增强单萜的合成。目前已利用多种酶促进酵母胞质NADPH的再生,如山梨醇脱氢酶(MnDH1和MnDH2)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(ZWF)、胞质异柠檬酸脱氢酶(IDP)、琥珀酸半醛脱氢酶(UGA2)和谷氨酸脱氢酶(GDH)等^[98]。Kong等^[41]通过在酿酒酵母中过表达磷酸戊糖途径相关基因ZWF1、GND1、

TAL1和TKL1增加NADPH的生成并敲除GDH1和GDH2减少NADPH的消耗,使得柠檬烯产量由889.54 mg/L增加到1097.43 mg/L。

随着研究者们对启动子核心元件和上游激活序列认识的深入,启动子工程也被应用于代谢流的微调。Li等^[99]在酿酒酵母中用启动子ERG7替换ERG20的天然启动子,然后异源表达ObGES与OYE2,使香茅醇的产量提高了4450%。Zhao等^[100]基于Upc2介导的麦角固醇反馈机制,在甘油假丝酵母中构建了一个系统来自主调节麦角固醇代谢并激活香叶醇合成,以响应细胞内麦角固醇水平的降低。tCrGES在P_{ERG2}调控下,该菌株香叶醇产量提高了39.6%。随后进一步在启动子P_{ERG2}的上游融合了不同数量的麦角固醇调节元件(SRE),发现杂合启动子P_{ERG2:(SREs*3)}的活性最高,是原始启动子P_{ERG2}的1.8倍,且优化后的香叶醇产量提高了25.5%,达到667.2 mg/L。

优化培养基对促进菌株生长和发酵过程中产物生成具有基础性作用。培养基中不同种类和比例的碳氮源对菌株有不同的影响,当初始葡萄糖浓度改变时,细胞的生长状况也会受到影响,适当的碳氮比可以显著提高细胞的活性^[101]。Wei等^[27]利用厨房废油(WCO)作为碳源在解脂耶氏酵母中成功地实现了合成33.8 mg/L滴度的 α -蒎烯,为微生物利用廉价碳源生产单萜类化合物奠定了基础。添加辅助碳源在一定程度上可以促进单萜合成,Cheng等^[42]发现当解脂耶氏酵母以甘油为初级碳源、柠檬酸为辅助碳源时,柠檬烯的产量高于以葡萄糖为初级碳源时的产量,柠檬烯产量达到最大值165.3 mg/L。适当的金属离子浓度能够提高酶活,Zhang等^[102]研究了在工程菌中添加不同浓度的Mg²⁺对芳樟醇产量的影响,当在培养基中添加10 mmol/L Mg²⁺时,芳樟醇产量提高了27%。

4 总结与展望

近年来,随着合成生物学的迅速发展,利用不同微生物构建细胞工厂合成单萜类化合物已经取得了很大进展。但不同微生物底盘对单萜产量有着明显的影响,其中酵母细胞相对于大肠杆菌

有着明显的优势,除自身良好的鲁棒性外,还有着完整的翻译后修饰体系,能够高效表达植物来源的酶,且有细胞器利于区室化调控。除了模式菌株酿酒酵母外,越来越多的非常规酵母由于其较强的环境耐受性也被用来生产单萜类化合物,如解脂耶氏酵母、甘油假丝酵母等。

本文综述了酵母细胞合成单萜类化合物的工程化策略,利用代谢工程和合成生物学的方法,包括提高前体乙酰辅酶A及GPP的供应、关键酶的改造和调控、区室化工程及通过外排工程和耐受性工程来缓解单萜的细胞毒性成功提高了酵母合成单萜的产量。然而,目前单萜类化合物的产业化生产仍处于初步阶段,产量大多处于百毫克到克级别的水平,与大规模工业化生产之间还有很大距离。前体GPP供给不足与单萜以及中间代谢物的细胞毒性是目前阻碍单萜类化合物高效微生物合成的主要瓶颈与挑战。为了进一步提高酵母细胞合成单萜的能力,未来可以从以下几个方面展开研究:

①单萜对细胞的毒性会严重限制其积累,但目前对于单萜产生毒性的具体机制尚不明确。通过选择具有更强耐受性能的微生物底盘或对已有微生物底盘进行诱变,结合基因组学、蛋白组学、代谢组学等方法对底盘细胞基因组进行分析,从而获得高产单萜且耐受性强的工程菌。同时深入研究单萜类化合物在酵母中合成后的储存和转运机制,探索与酵母细胞适配的特异性转运蛋白以促进单萜外排,减小细胞的代谢压力,促进生产的可持续性。

②目前对单萜合酶的改造较少,未来可以通过计算机辅助蛋白设计的策略对单萜合酶进行理性或半理性设计以获得高催化活性的酶,也可通过计算机模拟对代谢网络进行分析,对参与单萜合成的途径进行改造以优化代谢流向,从而增强单萜合成。

③采用动态调控的策略,使代谢途径根据发酵等环境条件的变化自动调节代谢通量,达到目标产物的高效生产。如Voigt课题组^[103]通过在酿酒酵母中构建了一个正交的四小分子诱导传感器阵列,测试了四种关键酶的表达强度及表达时机对于芳樟醇合成的影响,以此来实现生物合成的

多重调节和控制,从而实现合成芳樟醇的最优化。

④利用解脂耶氏酵母、热带假丝酵母等高产油脂的非模式酵母生产单萜受到越来越多的关注,但由于对其的研究起步较晚,基因表达调控效率、CRISPR/Cas9等基因编辑技术不够完善,研究者们可以利用生物信息学等技术优化基因编辑体系,拓展其应用范围,构建高效稳定的更适合单萜合成的潜在宿主细胞。

总之,随着生物合成途径、蛋白质工程改造及代谢工程等方面的深入研究,利用合成生物学相关技术持续优化微生物细胞工厂高效合成单萜,不断缩小与工业化生产间的距离,生物合成单萜必将为人类的可持续发展作出贡献。

参 考 文 献

- [1] 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 Y L, XIE M S, LI L. Research progress in biosynthesis of terpenoids using different chassis cells[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Biotechnology, 2022, 29(1): 95-101.
- [2] KABIR A, CACCIAGRANO F, TARTAGLIA A, et al. Analysis of monoterpenes and monoterpenoids[M/OL]//Recent advances in natural products analysis. Amsterdam: Elsevier, 2020: 274-286. (2020-03-20) [2024-06-01]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00007-X>.
- [3] ORTH A M, POPLACEAN I, FASTOWSKI O, et al. Assessment of dietary exposure to flavouring substances via consumption of flavoured teas. Part II: transfer rates of linalool and linalyl esters into Earl Grey tea infusions[J]. Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2014, 31(2): 207-217.
- [4] KARABÖRKLÜ S, AYVAZ A. A comprehensive review of effective essential oil components in stored-product pest management[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2023, 130(3): 449-481.
- [5] DASSANAYAKE M K, CHONG C H, KHOO T J, et al. Synergistic field crop pest management properties of plant-derived essential oils in combination with synthetic pesticides and bioactive molecules: a review[J]. Foods, 2021, 10(9): 2016.
- [6] MARRS T C, MAYNARD R L. Neurotransmission systems as targets for toxicants: a review[J]. Cell Biology and Toxicology, 2013, 29(6): 381-396.
- [7] KIM S H, BAE H C, PARK E J, et al. Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways[J]. Biochemical and Biophysical Research

- Communications, 2011, 407(1): 129-134.
- [8] WITTIG C, SCHEUER C, PARAKENINGS J, et al. Geraniol suppresses angiogenesis by downregulating vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGFR-2 signaling[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0131946.
- [9] GUPTA P, PHULARA S C. Metabolic engineering for isoprenoid-based biofuel production[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(3): 605-619.
- [10] CIRIMINNA R, LOMELI-RODRIGUEZ M, DEMMA CARÀ P, et al. Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy[J]. Chemical Communications, 2014, 50(97): 15288-15296.
- [11] AJIKUMAR P K, XIAO W H, TYO K E, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. Science, 2010, 330(6000): 70-74.
- [12] CHANDRAN S S, KEALEY J T, REEVES C D. Microbial production of isoprenoids[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(9): 1703-1710.
- [13] KIM J, SALVADOR M, SAUNDERS E, et al. Properties of alternative microbial hosts used in synthetic biology: towards the design of a modular chassis[J]. Essays in Biochemistry, 2016, 60(4): 303-313.
- [14] IGNEA C, RAADAM M H, MOTAWIA M S, et al. Orthogonal monoterpenoid biosynthesis in yeast constructed on an isomeric substrate[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 3799.
- [15] CAO X, LV Y B, CHEN J, et al. Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2016, 9: 214.
- [16] SARRIA S, WONG B, GARCIA MARTIN H, et al. Microbial synthesis of pinene[J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(7): 466-475.
- [17] CHATZIVASILEIOU A O, WARD V, EDGAR S M, et al. Two-step pathway for isoprenoid synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(2): 506-511.
- [18] LUND S, HALL R, WILLIAMS G J. An artificial pathway for isoprenoid biosynthesis decoupled from native hemiterpene metabolism[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(2): 232-238.
- [19] MUHAMMAD A, FENG X D, RASOOL A, et al. Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology Advances, 2020, 43: 107555.
- [20] LIU G S, LI T, ZHOU W, et al. The yeast peroxisome: a dynamic storage depot and subcellular factory for squalene overproduction[J]. Metabolic Engineering, 2020, 57: 151-161.
- [21] ZHU Z T, DU M M, GAO B, et al. Metabolic compartmentalization in yeast mitochondria: burden and solution for squalene overproduction[J]. Metabolic Engineering, 2021, 68: 232-245.
- [22] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. Nature, 2013, 496(7446): 528-532.
- [23] MEADOWS A L, HAWKINS K M, TSEGAYE Y, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production[J]. Nature, 2016, 537(7622): 694-697.
- [24] LI Z J, WANG Y Z, WANG L R, et al. Advanced strategies for the synthesis of terpenoids in *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(8): 2367-2381.
- [25] LARROUDE M, CELINSKA E, BACK A, et al. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(2): 464-472.
- [26] AGRAWAL A, YANG Z L, BLENNER M. Engineering *Yarrowia lipolytica* for the biosynthesis of geraniol[J]. Metabolic Engineering Communications, 2023, 17: e00228.
- [27] WEI L J, ZHONG Y T, NIE M Y, et al. Biosynthesis of α -pinene by genetically engineered *Yarrowia lipolytica* from low-cost renewable feedstocks[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(1): 275-285.
- [28] ZHUGE J, FANG H Y, WANG Z X, et al. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(6): 686-692.
- [29] QIAO Y M, LI C L, LU X Y, et al. Identification of key residues for efficient glucose transport by the hexose transporter CgHxt4 in high sugar fermentation yeast *Candida glycerinogenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(19): 7295-7307.
- [30] MA T F, CAI H W, ZONG H, et al. Effects of trehalose and ergosterol on pinene stress of *Candida glycerinogenes*[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2023, 70(1): 403-414.
- [31] 马腾飞. *Candida glycerinogenes* 萜烯耐受性及其生物合成研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- MA T F. Cell tolerance and biosynthesis of pinene in *Candida glycerinogenes*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.
- [32] ZHAO C, WANG X H, LU X Y, et al. Tuning geraniol biosynthesis via a novel decane-responsive promoter in *Candida glycerinogenes*[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(5): 1835-1844.
- [33] ZHANG L H, CHEN X Z, CHEN Z, et al. Development of an efficient genetic manipulation strategy for sequential gene disruption and expression of different heterologous GFP genes in *Candida tropicalis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(22): 9567-9580.
- [34] 陈远童. 十二碳二元酸工业生产试验研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 244.
- CHEN Y T. Experimental study on industrial production of dodecanedioic acid[J]. Microbiology, 1998, 25(4): 244.

- [35] DE ALBUQUERQUE T L, DA SILVA I J, DE MACEDO G R, et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: a review[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(11): 1779-1789.
- [36] 郭晋蓉. 代谢工程改造热带假丝酵母生产柠檬烯及其衍生物紫苏酸[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
GUO J R. Production of limonene and its derivative perillidic acid in *Candida tropicalis* via metabolic engineering[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [37] JIANG G Z, YAO M D, WANG Y, et al. Manipulation of GES and ERG20 for geraniol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 57-66.
- [38] JIANG G X, YAO M D, WANG Y, et al. A “push-pull-restrain” strategy to improve citronellol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 66: 51-59.
- [39] ZHOU P P, ZHOU X Q, YUAN D D, et al. Combining protein and organelle engineering for linalool overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(26): 10133-10143.
- [40] ZENG W Z, JIANG Y K, SHAN X Y, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for synthesis of β -myrcene and (*E*)- β -ocimene[J]. *3 Biotech*, 2023, 13(12): 384.
- [41] KONG X, WU Y K, YU W W, et al. Efficient synthesis of limonene in *Saccharomyces cerevisiae* using combinatorial metabolic engineering strategies[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(20): 7752-7764.
- [42] CHENG B Q, WEI L J, LV Y B, et al. 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.
- [43] LV X Q, ZHOU X, MA J, et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* for the *de novo* biosynthesis of (–)-menthol[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(9): 982.
- [44] 陈天华, 张若思, 姜国珍, 等. 产萜烯人工酵母细胞的构建[J]. *化工学报*, 2019, 70(1): 179-188.
CHEN T H, ZHANG R S, JIANG G Z, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for pinene production[J]. *CIESC Journal*, 2019, 70(1): 179-188.
- [45] JIA H J, CHEN T H, QU J Z, et al. Collaborative subcellular compartmentalization to improve GPP utilization and boost sabinene accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 164: 107768.
- [46] FISCHER M J, MEYER S, CLAUDEL P, et al. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(8): 1883-1892.
- [47] STRIJBIS K, DISTEL B. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism[J]. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9(12): 1809-1815.
- [48] ZHANG Q, ZENG W Z, XU S, et al. Metabolism and strategies for enhanced supply of acetyl-CoA in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 125978.
- [49] CARDENAS J, DA SILVA N A. Engineering cofactor and transport mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced acetyl-CoA and polyketide biosynthesis[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 36: 80-89.
- [50] CHEN Y, DAVIET L, SCHALK M, et al. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 48-54.
- [51] ZHANG X, LIU X, MENG Y H, et al. Combinatorial engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improving limonene production[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 176: 108155.
- [52] LIAN J Z, SI T, NAIR N U, et al. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 139-149.
- [53] CHEN Y, SIEWERS V, NIELSEN J. Profiling of cytosolic and peroxisomal acetyl-CoA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42475.
- [54] ZHANG X K, NIE M Y, CHEN J, et al. Multicopy integrants of crt genes and co-expression of AMP deaminase improve lycopene production in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 289: 46-54.
- [55] JIANG D H, YANG M Q, CHEN K, et al. Exploiting synthetic biology platforms for enhanced biosynthesis of natural products in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 399: 130614.
- [56] BURG J S, ESPENSHADE P J. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast[J]. *Progress in Lipid Research*, 2011, 50(4): 403-410.
- [57] IGNEA C, PONTINI M, MAFFEI M E, et al. Engineering monoterpene production in yeast using a synthetic dominant negative geranyl diphosphate synthase[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(5): 298-306.
- [58] IGNEA C, CVETKOVIC I, LOUPASSAKI S, et al. Improving yeast strains using recyclable integration cassettes, for the production of plant terpenoids[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10: 4.
- [59] LIU J D, ZHANG W P, DU G C, et al. Overproduction of geraniol by enhanced precursor supply in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 168(4): 446-451.
- [60] MUKHERJEE M, BLAIR R H, WANG Z Q. Machine-learning guided elucidation of contribution of individual steps in the mevalonate pathway and construction of a yeast platform strain for terpenoid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 74: 139-149.
- [61] ZHOU P P, DU Y, XU N N, et al. 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.
- [62] CHEN Y, WANG Y, LIU M, et al. Primary and secondary metabolic effects of a key gene deletion ($\Delta YPL062W$) in metabolically engineered terpenoid-producing *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(7): e01990-18.
- [63] MA Y S, ZU Y X, HUANG S W, et al. Engineering a universal and efficient platform for terpenoid synthesis in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(1): e2207680120.
- [64] 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.
- [65] ZHAO J Z, BAO X M, LI C, et al. Improving monoterpene geraniol production through geranyl diphosphate synthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(10): 4561-4571.
- [66] ZHANG Y Y, WANG J, CAO X S, et al. 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.
- [67] 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.
- [68] DENBY C M, LI R A, VU V T, et al. Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 965.
- [69] WANG X, PEREIRA J H, TSUTAKAWA S, et al. Efficient production of oxidized terpenoids via engineering fusion proteins of terpene synthase and cytochrome P450[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 64: 41-51.
- [70] WANG Y C, TONG R B, YU J Z. Chemical synthesis of multifunctional air pollutants: terpene-derived nitrooxy organosulfates[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(13): 8573-8582.
- [71] DENG Y, SUN M X, XU S, et al. 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.
- [72] ZHOU P P, DU Y, FANG X, et al. Combinatorial modulation of linalool synthase and farnesyl diphosphate synthase for linalool overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(3): 1003-1010.
- [73] AYER A, SANWALD J, PILLAY B A, et al. Distinct redox regulation in sub-cellular compartments in response to various stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65240.
- [74] WEINERT B T, IESMANTAVICIUS V, MOUSTAFA T, et al. Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2014, 10 (1): 716.
- [75] KIM J E, JANG I S, SON S H, et al. Tailoring the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum for functional assembly of terpene synthesis pathway[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 50-59.
- [76] GAO S L, TONG Y Y, ZHU L, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 192-201.
- [77] MA T, SHI B, YE Z L, et al. Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 134-142.
- [78] DUSSÉAUX S, WAJN W T, LIU Y X, et al. 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.
- [79] GERKE J, FRAUENDORF H, SCHNEIDER D, et al. Production of the fragrance geraniol in peroxisomes of a product-tolerant baker's yeast[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 582052.
- [80] PARVEEN M, HASAN M K, TAKAHASHI J, et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 54(1): 46-55.
- [81] BRENNAN T C R, KRÖMER J O, NIELSEN L K. 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.
- [82] BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, et al. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mutation Research*, 2005, 585(1-2): 1-13.
- [83] URIBE S, RAMIREZ J, PEÑA A. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions[J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 161(3): 1195-1200.
- [84] 田宁, 咸漠, 胡仰栋, 等. 产香叶醇重组大肠杆菌发酵培养基的优化[J]. *林产化学与工业*, 2015, 35(4): 131-137.
- TIAN N, XIAN M, HU Y D, et al. Optimization of medium for production of geraniol by the recombinant *Escherichia coli*[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2015, 35(4): 131-137.

- [85] LIU W, XU X, ZHANG R B, et al. Engineering *Escherichia coli* for high-yield geraniol production with biotransformation of geranyl acetate to geraniol under fed-batch culture[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 58.
- [86] DUNLOP M J, DOSSANI Z Y, SZMIDT H L, et al. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps[J]. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7: 487.
- [87] WANG Y, LIM L, DIGUISTINI S, et al. A specialized ABC efflux transporter *GcABC-G1* confers monoterpene resistance to *Grosmannia clavigera*, a bark beetle-associated fungal pathogen of pine trees[J]. *New Phytologist*, 2013, 197(3): 886-898.
- [88] DEMISSIE Z A, TARNOWYCZ M, ADAL A M, et al. A lavender ABC transporter confers resistance to monoterpene toxicity in yeast[J]. *Planta*, 2019, 249(1): 139-144.
- [89] CHANG Y L, HUANG L M, KUO X Z, et al. *PbABC1* and *PbABC2* transporters are required for the emission of floral monoterpenes in *Phalaenopsis bellina*[J]. *The Plant Journal*, 2023, 114(2): 279-292.
- [90] RAFIEI V, RUFFINO A, PERSSON HODÉN K, et al. A *Verticillium longisporum* pleiotropic drug transporter determines tolerance to the plant host β -pinene monoterpene [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(2): 291-303.
- [91] 陈天华. 高产桉烯酿酒酵母的构建与优化[D]. 天津: 天津大学, 2019.
CHEN T H. Construction and optimization of *Saccharomyces cerevisiae* for sabinene overproduction[D]. Tianjin: Tianjin University, 2019.
- [92] HU Z H, LI H X, WENG Y R, et al. Improve the production of D-limonene by regulating the mevalonate pathway of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic beverage fermentation [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(12): 1083-1097.
- [93] BRENNAN T C, WILLIAMS T C, SCHULZ B L, et al. Evolutionary engineering improves tolerance for replacement jet fuels in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(10): 3316-3325.
- [94] LI J, ZHU K, MIAO L, et al. Simultaneous improvement of limonene production and tolerance in *Yarrowia lipolytica* through tolerance engineering and evolutionary engineering[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(4): 884-896.
- [95] 李言, 笕心怡, 张雨晨, 等. 酿酒酵母芳樟醇耐受性的工程改造[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(8): 3062-3078.
LI Y, DA X Y, ZHANG Y C, et al. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved tolerance to linalool [J]. *Microbiology China*, 2022, 49(8): 3062-3078.
- [96] ZHAO J Z, LI C, ZHANG Y, et al. 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.
- [97] AMIRI P, SHAHPURI A, ASADOLLAHI M A, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for linalool production[J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(3): 503-508.
- [98] LIU H, MARSAFARI M, DENG L, et al. Understanding lipogenesis by dynamically profiling transcriptional activity of lipogenic promoters in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(7): 3167-3179.
- [99] LI R S, WANG K, WANG D, et al. Production of plant volatile terpenoids (rose oil) by yeast cell factories[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(14): 5088-5096.
- [100] ZHAO C, WANG X H, LU X Y, et al. Metabolic engineering of *Candida glycerinogenes* for sustainable production of geraniol[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(6): 1836-1844.
- [101] KOIVURANTA K, CASTILLO S, JOUHTEN P, et al. Enhanced triacylglycerol production with genetically modified *Trichosporon oleaginosus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1337.
- [102] ZHANG Y Y, CAO X S, WANG J, et al. Enhancement of linalool production in *Saccharomyces cerevisiae* by utilizing isopentenol utilization pathway[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 212.
- [103] PARK J H, BASSALO M C, LIN G M, et al. Design of four small-molecule-inducible systems in the yeast chromosome, applied to optimize terpene biosynthesis[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(4): 1119-1132.



通讯作者: 肖文海(1982—),男,教授,博士生导师。研究方向为复杂结构药物、高附加值化学品的高效微生物制造;代谢工程、合成生物学、人工细胞工厂设计与构建;发酵过程设计与优化。
E-mail: wenhai.xiao@tju.edu.cn



第一作者: 高琪(2000—),女,硕士研究生。研究方向为酿酒酵母里单萜类化合物的合成。
E-mail: gaoqi@tju.edu.cn