

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-078

小分子生物农药及其生物合成研究进展

宋开南¹, 张礼文¹, 王超², 田平芳³, 李广悦⁴, 潘国辉⁵, 徐玉泉¹

(¹ 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; ² 国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037; ³ 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; ⁴ 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100081; ⁵ 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

摘要: 利用对环境和非靶标生物友好的小分子生物农药防治病虫害, 是一种可持续保障农作物安全生产的管理方法。然而, 小分子生物农药的研发和应用也面临一些挑战, 比如种类少、产量低等。通过合成生物学和代谢工程等方法, 构建高产特定生物农药的微生物细胞工厂可以克服这些瓶颈问题。本文总结了2000年以来在我国新登记的小分子生物农药及部分半合成农药的化学结构与作用对象, 并对代表性生物农药的生物合成机制与细胞工厂构建, 如多杀霉素、白藜芦醇等进行了综述。对这些小分子生物农药的深入理解可为解析其生物合成途径与提高产量提供理论依据, 并对新型生物农药的发现和应用提供借鉴。随着合成生物学与代谢工程等学科不断发展, 可以预见未来将设计和构建出更多高效、环保小分子生物农药的细胞工厂, 并将其广泛应用于生产。

关键词: 小分子生物农药; 合成生物学; 生物合成; 微生物细胞工厂; 可持续农业

中图分类号: Q81 文献标志码: A

Advances in small-molecule biopesticides and their biosynthesis

SONG Kainan¹, ZHANG Liwen¹, WANG Chao², TIAN Pingfang³, LI Guangyue⁴, PAN Guohui⁵, XU Yuquan¹

(¹ Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China; ³ College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; ⁴ Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ⁵ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Small-molecule biopesticides, in contrast to chemically synthesized pesticides, demonstrate superior degradability in the natural environment and exert a lesser adverse impact on non-target organisms and the overall ecosystem. Consequently, the evolution of small-molecule biopesticides represents a pivotal shift for the pesticide industry towards more sustainable and environmentally benign practices, with their significance projected to escalate in the realm of agricultural production in the years ahead. Despite their potential, these pesticides are currently constrained by a limited variety and suboptimal production yields, primarily attributable to the intricate research and manufacturing processes that demand substantial time and resource investments. Moreover, the biosynthetic pathways

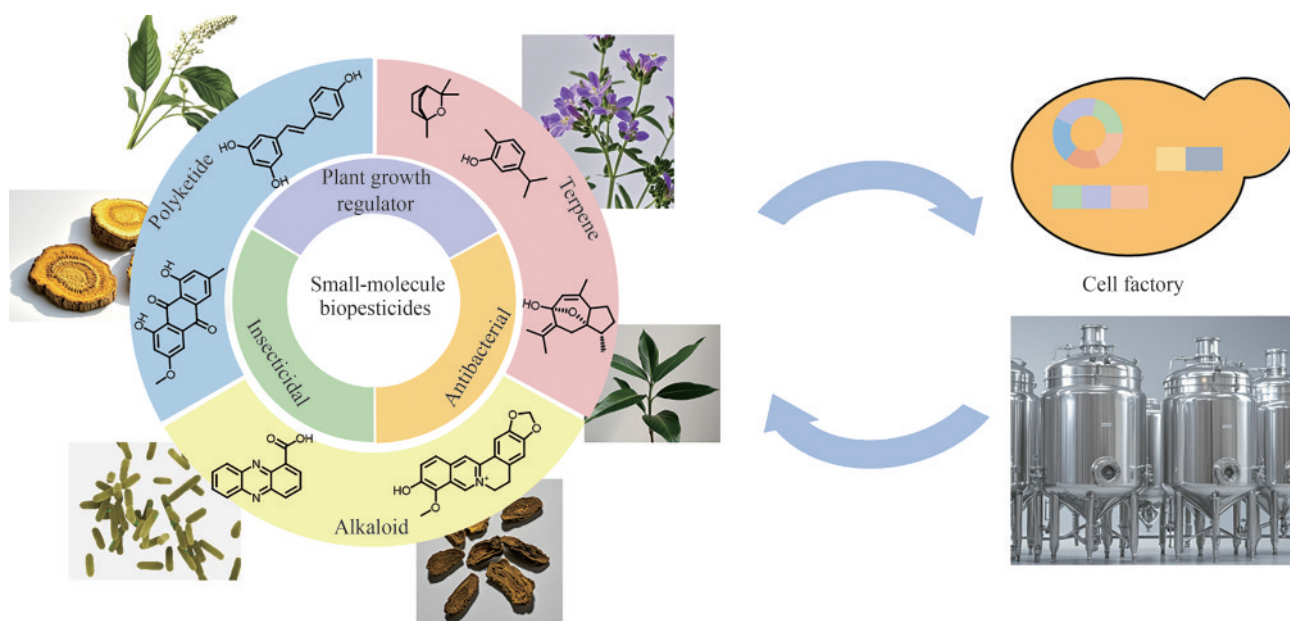
收稿日期: 2024-10-30 修回日期: 2024-12-18

基金项目: 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项(2023YFA0914700)

引用本文: 宋开南, 张礼文, 王超, 田平芳, 李广悦, 潘国辉, 徐玉泉. 小分子生物农药及其生物合成研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6(5): 1203-1223

Citation: SONG Kainan, ZHANG Liwen, WANG Chao, TIAN Pingfang, LI Guangyue, PAN Guohui, XU Yuquan. Advances in small-molecule biopesticides and their biosynthesis[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(5): 1203-1223

of the majority of these small molecules remain enigmatic, posing a significant challenge to their industrial application. However, the advent of synthetic biology and metabolic engineering offers promising solutions to these impediments. This progress is not merely instrumental in deepening our understanding of the intricate synthetic mechanisms of these bioactive compounds within biological systems, but it also paves the way for augmenting their production yields. By employing microbial cell factories, these technologies enable an efficient and targeted biosynthesis of specific biopesticides, thereby overcoming the limitations associated with traditional extraction and purification methods from natural sources. Microbial cell factories not only facilitate the cost-effective and environmentally friendly large-scale production of small-molecule biopesticides but also foster the innovation of novel biopesticide varieties. This review aims to summarize the small-molecule biopesticides and some semi-synthetic pesticides derived from natural products that were registered in China from January 2000 to December 2024, including eight polyketides, twelve terpenes, four alkaloids, and five other small-molecule biopesticides. Depending on their specific uses in agricultural practices, they can be classified into insecticides, microbicide, plant growth regulators, and so on. Furthermore, this review provides a succinct overview of the representative biosynthetic pathways and the corresponding microbial cell factories that are pivotal to the production of these biopesticides. We expect that an in-depth understanding of the biosynthesis of small-molecule biopesticides will pave solid ways for further elucidation of biosynthesis pathways, yield improvement, and the discovery and application of novel biopesticides.



Keywords: small-molecule biopesticides; synthetic biology; biosynthesis; microbial cell factory; sustainable agriculture

小分子生物农药指用于防治农林牧业病虫害或调节植物生长的微生物及植物的代谢物，具有良好的环境兼容性和安全性^[1]。其使用不仅能够降低农产品中的化学农药残留，提高食品安全性，而且还有助于延缓病原微生物及害虫对化学农药产生抗药性。此外，小分子生物农药还能保

护农田生态系统的生物多样性，是化学农药的有效替代或补充方案^[2]。近年来国家政策支持和法规保护也为生物农药的发展提供了良好环境，加快了其研发进程^[3]。

尽管小分子生物农药在现代农业中越来越受到重视，但种类少和产量低仍是其产业化应用的

瓶颈^[4-5]，主要原因在于研发和生产过程相对复杂，需要大量的时间和资源投入。小分子生物农药的有效成分通常来源于特定的微生物或植物，但是产量低，在规模化生产和应用中面临成本高等挑战^[5]。

利用细胞工厂在可控条件下生产小分子生物农药是一种先进的生产方式^[6]。相较于从天然植物或微生物中提取纯化，细胞工厂不仅能够高效大规模生产小分子生物农药，具有更大经济与环境效益，而且还有助于推动新型小分子生物农药的研发和创新。随着合成生物学的不断发展，细胞工厂在小分子生物农药领域的应用前景愈发广阔，有望为农业生产带来更多创新和变革^[7]。

本文系统总结了2000年以来在我国农业农村部新登记的小分子生物农药及部分半合成农药的主要来源、化学结构、作用对象，以及代表性化合物的生物合成机制与细胞工厂的研究进展，为

进一步提高生物农药分子产量和加快研发新型农药进程提供借鉴。

1 近年来国内登记的小分子生物农药

与化学合成农药相比，小分子生物农药在自然环境中容易降解，对非靶标生物和生态系统的负面影响较小。因此，开发小分子生物农药是农药行业向绿色、环保方向转型的重要趋势，在未来农业生产中将发挥越来越重要的作用。表1为2000—2024年在国内登记的小分子生物农药，根据化学结构，可将它们分为聚酮类、萜烯类、生物碱类等；根据用途可将其分为杀虫剂、杀菌剂、植物生长调节剂等。近年来我国登记的绝大部分小分子生物农药均是植物与微生物来源的生物活性天然产物，包含部分化学修饰的衍生物。

表1 2000年以来我国新登记的小分子生物农药

Table 1 Summary of small molecule biological pesticides registered in China between 2000 and 2024

农药名称	主要来源	结构分类	用途	原药有效成分含量	登记号 ^①
聚酮类					
多杀霉素	刺糖多孢菌 <i>Saccharopolyspora spinosa</i>	大环内酯类	杀虫	92.5%	PD20241953 LS20042235
乙基多杀菌素 (半合成)	刺糖多孢菌 <i>Saccharopolyspora spinosa</i>	大环内酯类	杀虫	81.2%	PD20181527 LS20091058
伊维菌素 (半合成)	阿维链霉菌 <i>Streptomyces avermitilis</i>	大环内酯类	杀虫	95%	PD20211308 PD20120410
甲氨基阿维菌素苯甲酸盐 (半合成)	阿维链霉菌 <i>Streptomyces avermitilis</i>	大环内酯类	杀虫	90%	PD20182180 LS20021924
大黄素甲醚	掌叶大黄 <i>Rheum palmatum</i>	蒽醌类	杀菌	8.5%	PD20190139 LS20080104
狼毒素	狼毒 <i>Stellera chamaejasme</i>	黄酮类	杀虫	9.5%	PD20120876 LS20053042
蛇床子素	蛇床花 <i>Cnidium monnieri</i>	香豆素类	杀菌/杀虫	2%	PD20183068 LS20030489
白藜芦醇	藜芦 <i>Veratrum sp.</i>	芪类	杀菌	10%	PD20212931
萜烯类					
苦皮藤素	苦皮藤 <i>Celastrus angulatus</i>	倍半萜类	杀虫	6%	PD20182273 LS20030503
甾烯醇	锦葵 <i>Malva sp.</i>	甾体类	抗病毒	0.66%	PD20181615 LS20150137
螺威	油茶 <i>Camellia oleifera</i>	三萜皂苷类	杀虫	50%	PD20131346 LS20080123
莪术醇	姜黄 <i>Curcuma zedoaria</i>	倍半萜类	杀鼠	92%	PD20101276 LS20053774

续表

农药名称	主要来源	结构分类	用途	原药有效成分含量	登记证号 ^①
桉油精	蓝桉 <i>Eucalyptus globulus</i>	单萜类	杀虫	90%	PD20101270
					LS20040664
D-柠檬烯	柠檬 <i>Citrus limon</i>	单萜类	杀虫/杀菌	92%	PD20220205
					LS20160240
香芹酚	丁香 <i>Syzygium aromaticum</i>	单萜类	杀虫/杀菌	16%	PD20200138
					LS20011820
24-表芸苔素内酯	油菜 <i>Brassica campestris</i>	甾醇类	植物生长调节剂	95%	PD20240892
					PD20100303
28-高芸苔素内酯	油菜 <i>Brassica campestris</i>	甾醇类	植物生长调节剂	95%	PD20241931
					PD20080444
28-表高芸苔素内酯	油菜 <i>Brassica campestris</i>	甾醇类	植物生长调节剂	90%	PD20241668
					PD20082793
14-羟基芸苔素甾醇	油菜 <i>Brassica campestris</i>	甾醇类	植物生长调节剂	80%	PD20242107
					PD20070289
丙酰芸苔素内酯	油菜 <i>Brassica campestris</i>	甾醇类	植物生长调节剂	80%	PD20242339
					LS20011797
生物碱类					
申嗉霉素	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	吩嗪类	杀菌	95%	PD20131515
					LS20031381
小檗碱	黄连 <i>Coptis chinensis</i>	喹啉生物碱类	杀菌	75%	PD20230660
					LS20170288
吲哚乙酸		吲哚生物碱类	植物生长调节剂	97%	PD20241437
					PD20081124
吲哚丁酸		吲哚生物碱类	植物生长调节剂	95%	PD20230592
					LS20050293
其他类					
冠菌素	丁香假单胞菌 <i>Pseudomonas syringae</i>	聚酮-非核糖体肽类	植物生长调节剂	98%	PD20211351
除虫菊素	除虫菊 <i>Tanacetum cinerariifolium</i>	杂萜类	杀虫	60%	WP20210184
					WL2001279
谷维菌素	链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp. NEAU6	核苷类	植物生长调节剂	94%	PD20241925
					PD20212929
异硫氰酸烯丙酯	羽衣甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	有机硫类	杀菌/杀线虫	70%	PD20190037
					PD20181601
大蒜素	大蒜 <i>Allium sativum</i>	有机硫类	杀菌	50%	PD20161252

①列举了目前最新与首次原药在我国登记的登记证号。

1.1 聚酮类小分子生物农药

天然聚酮类化合物是一类由植物或微生物产生的以乙酰辅酶A、丙二酰辅酶A等为合成前体经多次聚合而形成的次级代谢产物^[8]。这类化合物在自然界中广泛存在,具有抑菌、杀虫、抗肿瘤和抗氧化等生物活性^[9-10]。2000年以来我国新登记的聚酮类生物农药主要包括多杀霉素、乙基多杀

菌素、伊维菌素和大黄素甲醚等,其化学结构如图1所示。

乙基多杀菌素(spinetoram)是一种高效、低毒、低残留的生物杀虫剂,由美国陶氏益农公司开发,属于多杀霉素类(spinosyns)第二代杀虫产品。它是由放线菌刺糖多孢菌(*Saccharopolyspora spinosa*)产生的spinosyn J和spinosyn L经化学修饰获得。与第一代产品多杀霉素(spinosad)相

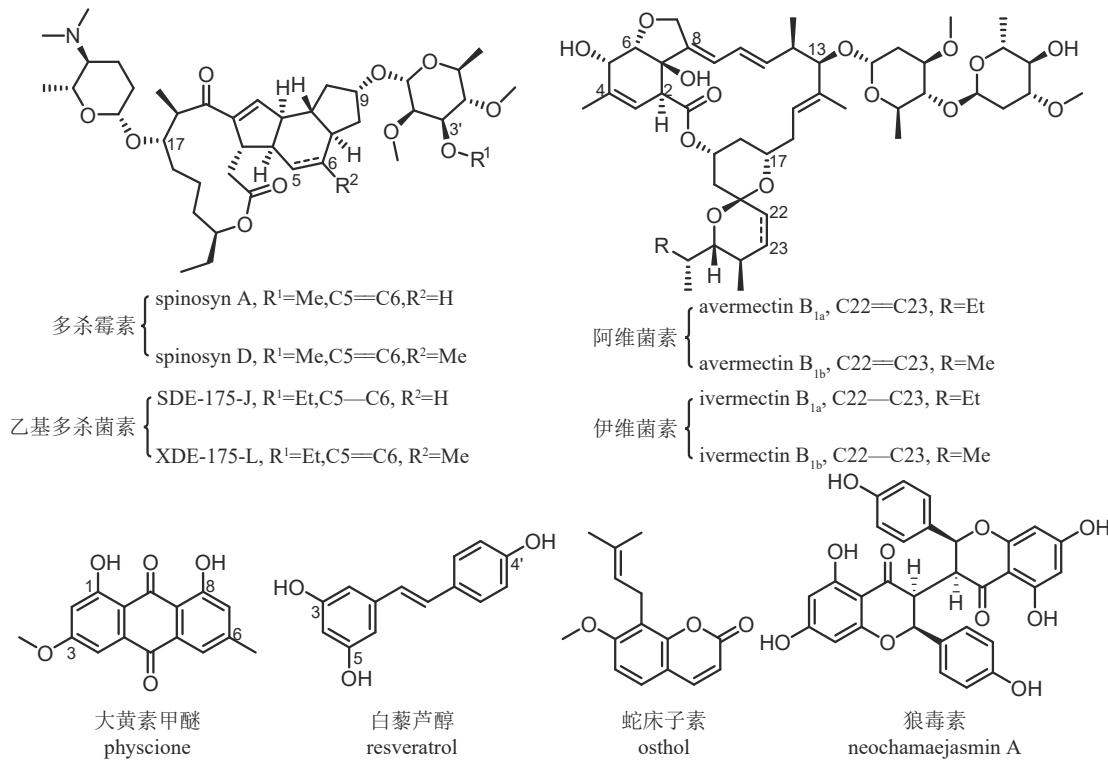


图1 聚酮类生物农药的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of polyketide biopesticides

比, 乙基多杀菌素的杀虫谱广且高效。多杀霉素类杀虫剂具有二十一元大环内酯的骨架, 在C9位通过糖苷键连接L-三氧甲基鼠李糖 (rhamnose), C17位连接D-福乐糖胺 (fornosamine)^[11]。乙基多杀菌素与多杀霉素相比, 主要区别在于鼠李糖基3位羟基的甲基被乙基所替代, 这一变化使得乙基多杀菌素对烟草芽虫的杀虫活性提高了10倍^[12]。乙基多杀菌素主要由两种组分构成, 即乙基多杀菌素-J (SDE-175-J, 占比75.5%) 和乙基多杀菌素-L (XDE-175-L, 占比20.7%), 两者生物活性并无显著差异。与传统的有机磷和拟除虫菊酯类杀虫剂的作用机理不同, 乙基多杀菌素一方面作用于烟碱乙酰胆碱受体后, 释放乙酰胆碱^[13], 另一方面作用于 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 受体, 钝化GABA受体而使神经系统过度兴奋, 进一步提高其杀虫活性^[14]。2007年乙基多杀菌素在新西兰首先获得登记, 2009年美国陶氏益农公司在国内成功登记6%乙基多杀菌素的悬浮剂作为生物杀虫剂, 防治对象主要为稻纵卷叶螟、小菜蛾、蓟马等。另外, Lewer等^[15]从须糖多孢菌 (*Saccharopobrspora pogona*) 中发现了C21位为丁

烯基的丁烯基多杀霉素 (butenyl-spinosyn), 对多杀霉素难于控制的世界性检疫性害虫苹果蠹蛾和重要农业害虫烟青虫具有更好的杀虫活性, 并且相较于多杀霉素降解速度快, 对环境的影响更小, 有望成为新一代多杀霉素类生物杀虫剂, 适合于无公害农产品的生产。

伊维菌素 (ivermectin) 是由阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 发酵产生的半合成大环内酯类多组分抗生素。最初由日本微生物学家大村智在土壤中发现的能产生抗寄生虫物质的新型链霉菌, 经过默克公司药物筛选实验室的协助, 于1975年完成了有效成分的纯化鉴定, 命名为阿维菌素 (avermectin)。美国科学家 William C. Campbell 对阿维菌素进行了化学结构修饰, 得到了更加安全高效的伊维菌素。上述两位科学家因阿维菌素和伊维菌素的发现获得了2015年诺贝尔生理学或医学奖。伊维菌素的基本结构是十六元的大环内酯和3个主要取代基团, 即C2到C8位上的六氢苯并咪唑环, C13位上的双糖基, C17到C18位上的酮基。伊维菌素的作用机制主要是高亲和力和结合无脊椎动物神经细胞与肌肉细胞中以谷

氨酸为阀门的氯离子通道，引起神经细胞或肌肉细胞超极化，进而麻痹或杀死寄生虫^[16]。2010年以来，顺毅股份有限公司、杭州颖泰生物科技有限公司等将伊维菌素作为生物杀虫剂用于防治白蚁、果蝇、红蜘蛛等。

大黄素甲醚 (physcione) 是一种从蓼科植物掌叶大黄 (*Rheum palmatum*) 根中提取的植物源农药^[17]。真菌赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus*) 也能合成大黄素甲醚^[18]。该化合物由一个蒽醌环构成，环上C1位和C8位含有两个羟基，C3位有一个甲氧基，C6位有一个甲基。大黄素甲醚是一种保护性杀菌剂，能够诱导作物产生防御反应，抑制病原菌孢子萌发、菌丝生长和吸器形成，从而保护作物免受病原菌的侵害^[19]。大黄素甲醚对白粉病、霜霉病、灰霉病、炭疽病等有很好的防治效果，尤其适合用于绿色有机蔬菜生产。2008年以来，内蒙古清源保生物科技有限公司和四川利尔作物科学有限公司将大黄素甲醚的水剂、悬浮剂和水分散粒剂登记作为生物杀菌剂。

白藜芦醇 (resveratrol) 的化学名称为3,4',5-三羟基-1,2-二苯基乙烯，属于多酚中的芪类化合物。最初于1940年从百合科藜芦属植物白藜芦中分离获得^[20-21]。白藜芦醇是植物的一种自身保护因子，在紫外线照射、机械损伤及真菌感染时其合成急剧增加^[22]。研究表明，白藜芦醇对人参黑斑病、葡萄霜霉病、黄瓜灰霉病、番茄灰霉病等病害具有防治作用。目前白藜芦醇主要从虎杖和葡萄等植物中提取，2021年内蒙古清源保生物科技有限公司登记了10%白藜芦醇母药和0.2%可溶液剂，用于防治黄瓜灰霉病。

蛇床子素 (osthol) 又称甲基欧芹酚，是一种从伞形科植物蛇床 (*Cnidium monnieri*) 成熟果实中提取的香豆素类化合物^[23]，包含苯并吡喃酮的结构骨架以及异戊烯基与甲氧基等修饰基团。该化合物具有抗肿瘤、抗诱变、抗氧化等多种药理活性^[24]。作为一种植物源农药，蛇床子素不仅对南瓜白粉病菌等病原真菌具有抑制作用，而且对菜青虫等农业害虫具有一定的毒杀作用^[25-26]。2003年以来，湖北天惠生物科技有限公司、云南南宝生物科技有限责任公司、河南一田农业发展有限公司等将蛇床子素的水乳剂、可溶液剂等登记为

生物杀菌剂与杀虫剂。

狼毒素 (neochamaejasmin A) 是一种从瑞香科植物瑞香狼毒 (*Stellera chamaejasme*) 的根中提取的双二氢黄酮类化合物，结构中包含两个通过碳碳键连接形成的苯并吡喃酮基本骨架和多位点的羟基化修饰^[27]。狼毒素对害虫和害螨具有触杀作用，主要通过接触害虫体表导致其死亡，此外还可通过害虫摄取而发挥胃毒作用^[28]。2005年甘肃国力生物科技开发有限公司首次登记狼毒素水乳剂用于防治菜青虫，2012年适用范围拓宽至蚜虫和茶尺蠖。

1.2 萜烯类小分子生物农药

萜烯类化合物以五碳原子的异戊二烯为基本结构单元，是自然界中结构最为多样化的一类天然产物。根据分子骨架中异戊二烯单元的数目可将其分类为单萜、倍半萜、二萜、三萜等。萜烯类化合物具有广泛生物活性，作为生物农药主要包括桉油精、香芹酚和D-柠檬烯等。几种代表性萜烯类生物农药的化学结构如图2所示。

桉油精 (eucalyptol) 主要从桉树属植物的叶子中提取，化学名称为1,8-桉叶油素 (1,8-cineole)，是一种单萜类化合物，环上连接有一个甲基和一个烯丙氧基。桉油精能防治铃木果蝇 (*Drosophila suzukii*) 等农业害虫^[29]。北京亚戈农生物药业有限公司于2004年登记桉油精的可溶剂用于蚜虫防治，2010年拓宽至红蜘蛛和茶小绿叶蝉。

香芹酚 (carvacrol) 主要存在于牛至、百里香等唇形科植物的精油中，具有抗菌、抗炎、抗氧化等生物活性^[30]。香芹酚是一种单萜酚类化合物，苯酚的邻位连接一个甲基，间位连接一个异丙基。香芹酚能够破坏真菌菌丝体，阻止病症的扩大与蔓延，对灰霉病、白粉病、锈病等多种真菌病害具有很好的防治效果，在农业领域得到了广泛研究和应用^[31]。2001年，大连云林碳化药业有限公司首次将用于防治番茄灰霉病的杀菌剂丁子·香芹酚在国内登记作为杀菌剂，近年来香芹酚还被用来防治烟草赤星病、枸杞白粉病、枣树锈病等。

D-柠檬烯 (D-limonene) 是一种广泛存在于柑橘类精油中的天然单环单萜类化合物，化学名称

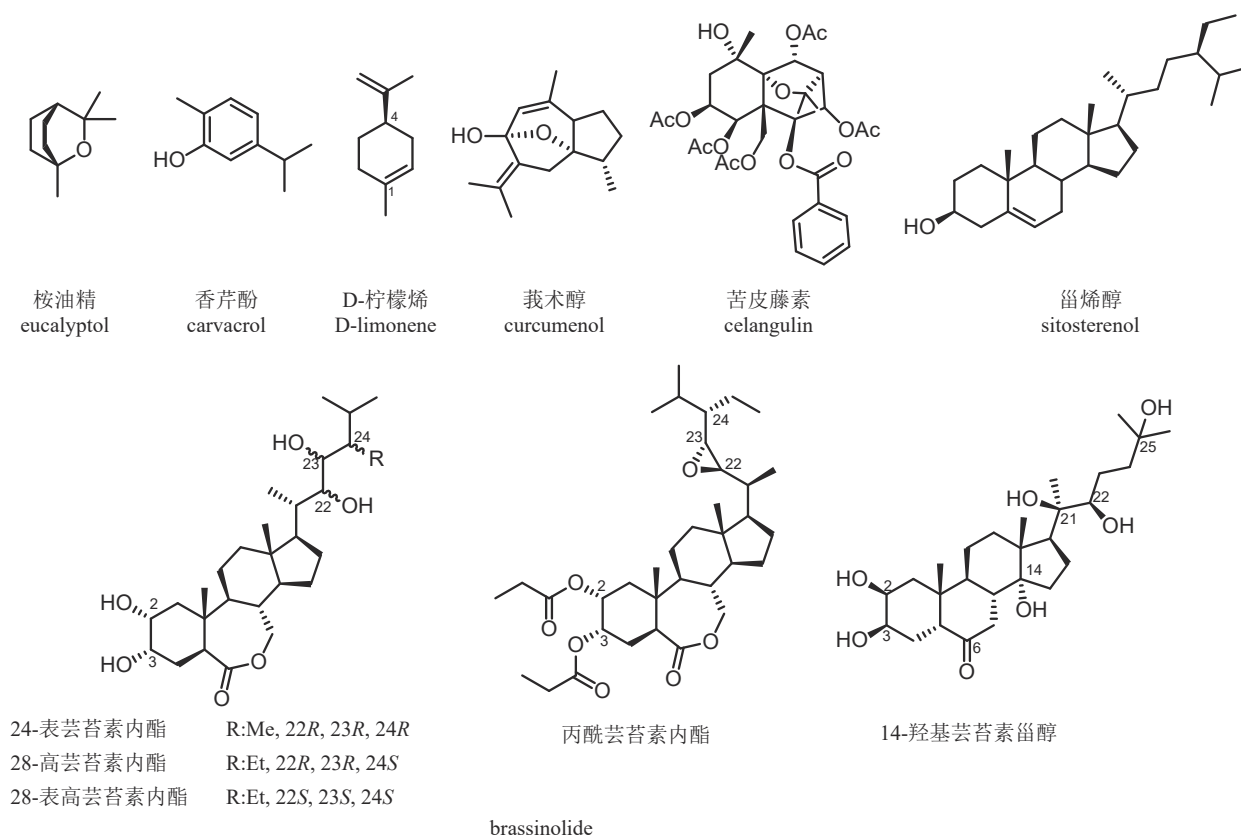


图2 萜烯类生物农药的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of terpene biopesticides

为1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)环己烯。研究表明，D-柠檬烯通过渗透和破坏昆虫体壁蜡质层，导致水分流失和体液排泄，使昆虫窒息死亡^[32]，此外还具有抗菌活性，在农业病虫害防控中显示出了巨大的应用潜力和发展前景^[33]。2001年美国佛罗里达柑橘有限公司在我国将D-柠檬烯登记作为卫生杀虫剂，2016年，奥罗阿格瑞国际有限公司将其作为杀虫/杀菌剂用于防治红蜘蛛、烟粉虱、黄瓜白粉病、人参灰霉病等病虫害。

莪术醇 (curcumenol) 是从莪术 (*Curcuma zedoaria*) 中提取的倍半萜类化合物，包含一个五元环和一个七元环，这两个环通过氧桥连接形成一个半缩酮结构，对害鼠 (特别是雌性) 具有显著的适口性和抗生育作用，是一种环保型鼠用不育剂。2005年吉林延边天保生物制剂有限公司将莪术醇饵剂登记为生物杀鼠剂。

苦皮藤素 (celangulin) 是从卫矛科植物苦皮藤 (*Celastrus angulatus Maxim.*) 的根皮和茎皮中分离的一系列具有杀虫活性的次级代谢产物^[34]。

该类化合物是以二氢沉香呋喃为骨架的多元醇酯化合物，具有胃毒、触杀、趋避和拒食作用，对稻纵卷叶螟、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾等害虫表现出良好的防治效果^[35]。初步研究表明^[36]，以苦皮藤素V为代表的毒杀成分主要作用于昆虫肠细胞的质膜及其内膜系统；以苦皮藤素IV为代表的麻醉成分可能作用于昆虫的神经-肌肉接点，而谷氨酸脱羧酶可能是其主要作用靶标。2000年以来，陕西秦丰农化有限公司、山东惠民中联生物科技有限公司等多家企业将苦皮藤素登记作为生物杀虫剂。

螺威 (tea-seed distilled saponins, TDS) 是一种从茶籽饼中提取的生物农药，其有效成分为五环三萜皂苷类物质。螺威对福寿螺等螺类具有显著毒杀活性^[37-38]，可作为控制螺害的生物农药使用。2008年湖北金海潮科技有限公司将螺威粉剂登记为生物杀螺剂。

甾烯醇 (sitosterenol) 是从大豆、油菜等多种植物或其种子中分离的一种植物甾醇类化合物，能够抑制病毒复制，具有钝化病毒的作用，同时

还能通过诱导寄主产生抗性, 间接阻止病毒侵染, 对多种水稻黑条矮缩病、小麦黄花叶病毒病、烟草花叶病毒病等作物病毒病具有良好预防作用^[39-40]。2015年陕西上格之路生物科学有限公司将0.06% 甾烯醇微乳剂登记为生物农药。

芸苔素内酯 (brassinolide) 于1979年发现于油菜花粉中, 是除生长素、脱落酸、赤霉素等之外的第六大类植物激素^[41]。芸苔素内酯具有促进细胞分裂、果实膨大、延缓叶片衰老、增强抗逆性等多种生理作用, 对提高作物产量和改善品质具有重要意义^[42]。该类化合物属于植物甾醇类化合物, 并含有七元B环内酯。目前实现产业化的化合物包括24-表芸苔素内酯、28-高芸苔素内酯、28-表高芸苔素内酯、丙酰芸苔素内酯、14-羟基芸苔素甾醇 (不含七元B环内酯)。这些物质的C23、C24位的取代基存在差异, 导致它们的生物活性各有不同。2003年日本三菱化学食品株式会社在我国将丙酰芸苔素内酯登记为植物生长调节剂, 用于提高烟草、葡萄、黄瓜的产量。2007年成都新朝阳作物科学股份有限公司将14-羟基芸苔素甾醇登记作为生物农药用于调节水稻的生长。

1.3 生物碱类小分子生物农药

生物碱类化合物是一类存在于生物体内的含氮有机化合物, 主要以酪氨酸、色氨酸、鸟氨酸等氨基酸为关键合成砌块经多步修饰合成。基于杂环系统将其分为吡咯类、喹啉类、吲哚类等。生物碱具有广泛的生物学活性, 已开发的生物农药主要包括申嗉霉素、小檗碱和吲哚乙酸等 (图3)。

申嗉霉素 (shenqinmycin) 是由荧光假单胞菌株 M18 (*Pseudomonas fluorescens*) 产生的次级代谢产物, 主要成分是吩嗪-1-羧酸^[43]。它能使病原菌产生有毒的超氧离子和过氧化氢, 氧化谷胱甘肽和转铁蛋白, 产生具有高细胞毒性的羟自由基, 对多种农作物病原真菌和细菌产生抑制作用。另外, 吩嗪类化合物可被NADH还原, 成为电子传递的中间体, 扰乱细胞内正常的氧化还原平衡, 影响能量产生, 从而抑制微生物的生长^[44]。2011年上海农乐生物制品股份有限公司登记了1% 申嗉霉素悬浮剂, 用于防治小麦全蚀病、水稻纹枯病、黄瓜灰霉病等。

小檗碱 (berberine) 又称黄连素, 是主要从中草药黄连等药用植物中分离的一种季铵型异喹啉

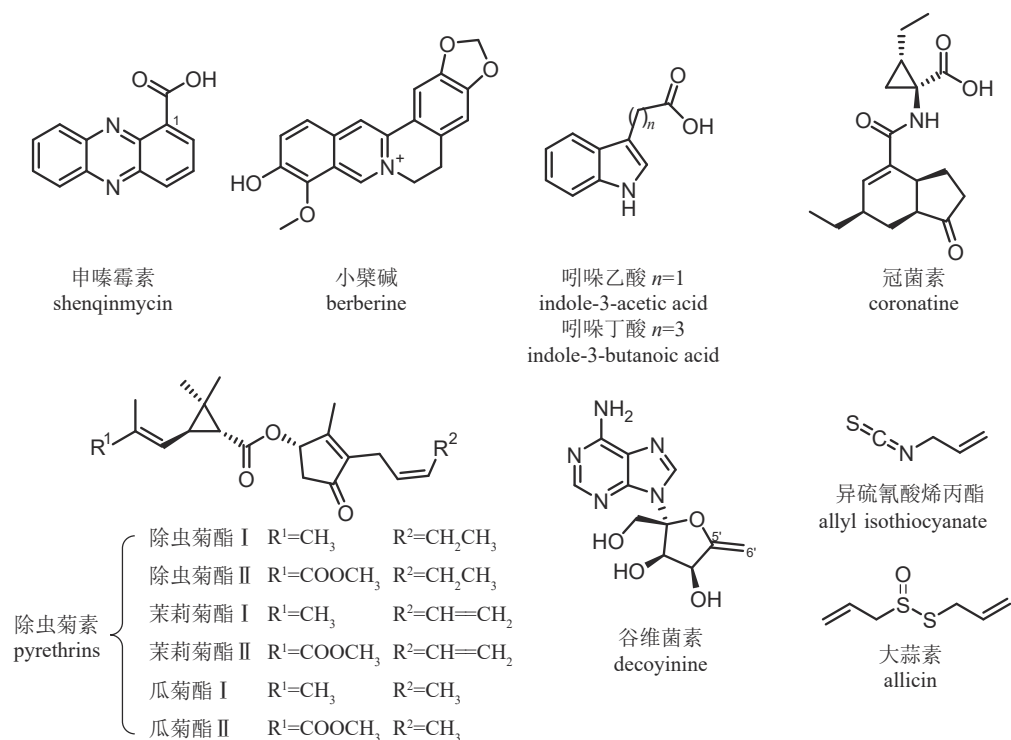


图3 生物碱类和其他小分子生物农药的化学结构

Fig. 3 Chemical structures of alkaloid and other small-molecule biopesticides

生物碱。小檗碱通过抑制细胞分裂蛋白、改变细胞膜的完整性和功能、抑制呼吸链等方面起到杀菌作用，对桃褐腐病（病原菌 *Monilinia fructicola*）、苹果轮纹病（病原菌 *Botryosphaeria dothidea*）、白粉病（病原菌 *Erysiphe* spp.）、马铃薯疫病、黄瓜霜霉病等病害具有良好防治效果。2001年以来，天津绿源生物药业有限公司、杨凌馥稷生物科技有限公司、潍坊奥丰作物病害防治有限公司等多家企业将小檗碱登记作为生物杀菌剂。

吲哚乙酸（indole-3-acetic acid）和吲哚丁酸（indole-3-butyric acid）在植物生长发育的各个方面起着关键作用，是植物最重要的内源激素之一^[45]。两者化学结构相似，分子中烷基链的长度不同。吲哚丁酸的结构更加稳定，半衰期更长。目前发现芽孢杆菌、农杆菌、假单胞菌等多种细菌也能合成吲哚乙酸^[46]。2005年重庆依尔双丰科技有限公司首次在我国将吲哚丁酸登记作为植物生长调节剂，2010年上海农乐生物制品股份有限公司将吲哚乙酸登记用于大豆、小麦、水稻等作物的促进生长和增产。

1.4 其他类小分子生物农药

除聚酮类、萜类、生物碱类小分子生物农药，其他类主要包括多种途径杂合、核苷类、含硫类等（图3）。

冠菌素（coronatone）是由丁香假单胞菌（*Pseudomonas syringae*）产生的一种次级代谢产物，由聚酮化合物冠菌酸和亮氨酸衍生物冠烷酸以酰胺键连接而成^[47-48]。冠菌素在低浓度时与植物激素脱落酸和茉莉酸具有类似的生物调节功能，是茉莉酸的 $10^2 \sim 10^4$ 倍^[49]。2021年成都新朝阳作物科学股份有限公司在国内将冠菌素登记作为植物生长调节剂，用于调节小麦、棉花、水稻等的生长。

除虫菊素（pyrethrin）是从菊科植物除虫菊（*Pyrethrum cinerifolium*）中分离的一类具有杀虫活性的天然物质，由两种异型萜类酸配体和茉莉酸合成途径来源的三种醇配体缩合而成，主要成分包括除虫菊酯 I - II（pyrethrin I - II）、瓜菊酯 I - II（cinerin I - II）、茉莉菊酯 I - II（jasmolin I - II）

六种不同的物质^[50]。除虫菊素通过攻击昆虫的外周神经系统，特异性作用于神经膜上的电压敏感钠通道，导致钠离子通道非正常激活，破坏了正常的神经信号传递，最终引起昆虫的过度兴奋、肌肉痉挛及瘫痪死亡^[51]。2001年云南中植生物科技开发有限公司、创森实业有限公司等开始将除虫菊素登记作为生物杀虫剂用于防治菜青虫、蚜虫、叶蝉等害虫。

谷维菌素（decoyinine）也称为德夸霉素，是一种主要从链霉菌（*Streptomyces* sp. NEAU6）分离的核苷类植物生长调节剂，由一个非常规的C5'-C6'脱水糖基与腺嘌呤通过糖苷键相连^[52]。该化合物能够抑制细菌中鸟嘌呤合成关键酶（GMP）^[53]，对水稻白叶枯病、番茄青枯病、猕猴桃溃疡病等细菌性病害具有防治作用。除此以外，谷维菌素对水稻等作物具有显著促生作用^[54]。2021年东北农业大学将谷维菌素登记为种子处理液剂，用于调节水稻生长。

异硫氰酸烯丙酯（allyl isothiocyanate）又名辣根素，是从十字花科植物中的芥子（*Sinapis alba*）分离的具有刺激性气味的有机硫类化合物。该化合物结构上以异硫氰酸基和烯丙基为特征，具有抗菌杀虫功能^[55]。2018年江苏腾龙生物药业有限公司将异硫氰酸烯丙酯水乳剂登记为杀线虫剂，2019年北京亚戈农生物药业有限公司将其可溶液剂登记为杀菌剂应用于大棚熏蒸。中国农业大学曹永松教授已通过化学法合成异硫氰酸烯丙酯并转让江苏腾龙公司生产。

大蒜素（allicin）的化学名称为二烯丙基硫代亚磺酸酯，是从大蒜（*Allium sativum*）鳞茎部分分离的一种有机硫化合物，包含两个烯丙基基团^[56]。大蒜素通过竞争性抑制菌体巯基酶和损伤菌体膜系统等方式，对多种革兰氏阳性和阴性细菌具有抑制作用^[57]。此外大蒜素对 *Trichosporon asahii* 等真菌也显示抑菌活性^[58]。2004年贵阳十力生物技术有限公司将0.05%大蒜素浓乳剂登记为生物杀菌剂。

2 小分子生物农药的生物合成途径

大部分小分子生物农药的化学结构复杂，化学合成困难。阐明其生物合成途径是构建细胞工

厂提高产量和合成新型生物农药分子的前提。目前,生物合成研究主要集中在聚酮类、萜烯类、生物碱类等小分子生物农药。阿维菌素^[59]、芸苔素内酯^[41]、冠菌素^[47]的生物合成有较为完整的综述,因此本文仅对多杀霉素、小檗碱、除虫菊素等的生物合成途径进行综述。

2.1 聚酮类的生物合成

聚酮类化合物的生物合成通常涉及聚酮合酶(polyketide synthase)复合体,由不同的结构域负责催化聚酮骨架的形成和修饰。聚酮合酶的三个基本结构域为酰基转移酶(acyltransferase, AT)、酮酰合成酶(ketoacylsynthase, KS)和酰基载体蛋白(acylcarrier protein, ACP)。除基本结构域外,聚酮合酶还可能含有 β -酮基还原酶(ketoreductase, KR)、脱水酶(dehydratase, DH)、烯醇还原酶(enoylreductase, ER)、硫酯酶(thioesterase, TE)等。在生物合成聚酮化合物的过程中,聚酮合酶的每个结构域相互合作。一般情况下,AT选择乙酰辅酶A等为起始单元,将其转移到KS上,AT再选择一个延伸单元丙二酰辅酶A,将其连接到ACP

上,然后KS将这两个底物催化缩合为二酮,并连接在ACP上。经过AT、KS和ACP的多次催化,聚酮链不断延伸。在聚酮链延伸的过程中,其他结构域对聚酮中间产物进行选择性的还原和环化等反应,从而合成结构多样的产物。

多杀霉素生物合成基因簇全长79 kb,共包括23个合成基因(其中鼠李糖合成相关基因还参与细胞壁的合成,因此不在基因簇内部)。在多杀霉素生物合成过程中,首先是聚酮骨架的合成,由I型聚酮合酶SpnA~SpnE催化[图4(a)],将起始单元丙酰辅酶A等逐步缩合和修饰形成聚酮链^[60]。整个聚酮合酶包括1个装载模块和10个延伸模块,由 $spnA$ 、 $spnB$ 、 $spnC$ 、 $spnD$ 和 $spnE$ 基因编码,全长约56 kb。聚酮合酶的第1个基因 $spnA$ 编码装载模块和第1个延伸模块,延伸模块包括:KS、AT、KR和ACP;第2个延伸模块由基因 $spnB$ 编码,具有KS、AT、DH、ER、KR和ACP结构域;模块3、4由 $spnC$ 基因编码,这2个模块包括KS、AT、KR和ACP结构域;延伸模块5~7由 $spnD$ 基因编码,模块5包括KS、AT、DH、KR和ACP结构域,模块6、7包括KS、AT、KR和

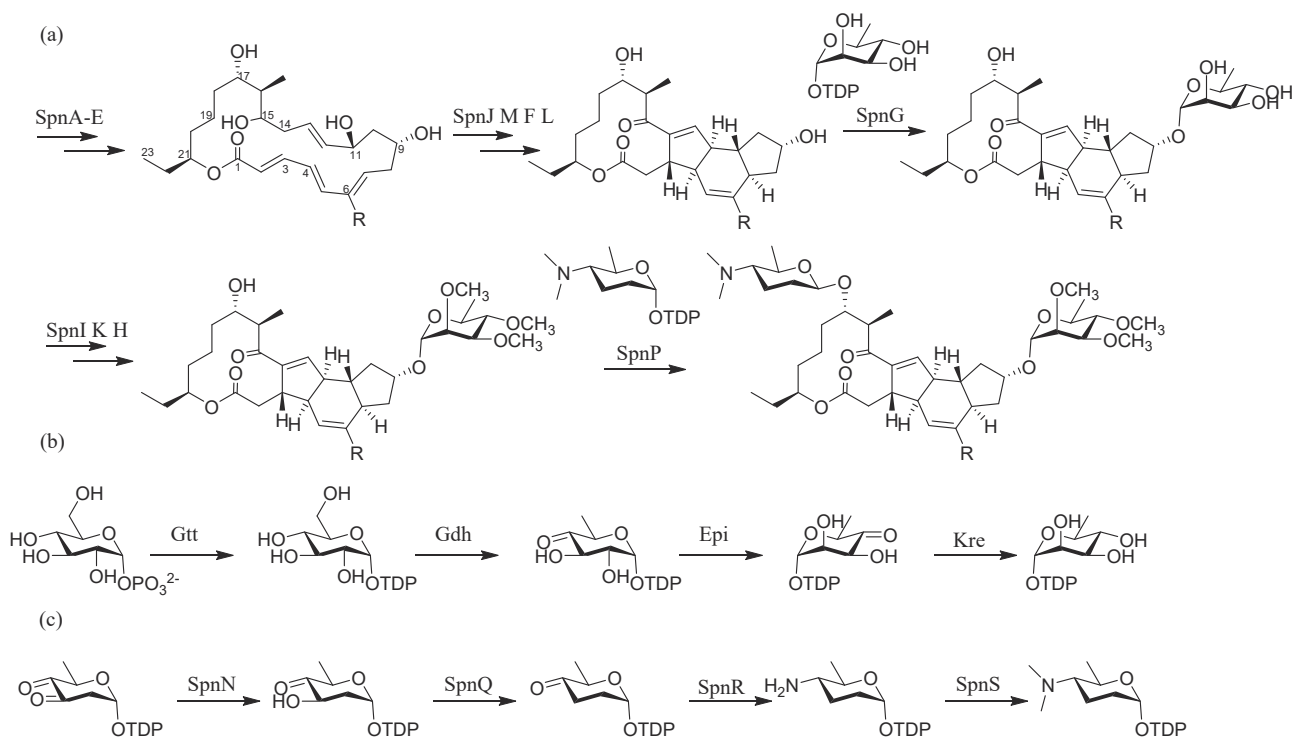


图4 多杀霉素类杀虫剂的生物合成通路

Fig. 4 Biosynthetic pathway of spinosyn

ACP 结构域；延伸模块 8~10 由 *spnE* 基因编码，这 3 个模块均包含 KS、AT、DH、KR 和 ACP 结构域。*spnE* 还编码负责将聚酮链解离并环化的 TE。然后在交联酶 SpnF、SpnJ、SpnL 和 SpnM 的修饰下形成大环内酯糖苷配基。刘鸿文课题组研究发现 SpnJ 催化 C15 的羟基脱氢变为酮基^[61]。而后 SpnM 催化 C11 发生 1,4-脱水反应，SpnF 催化跨环 [4+2]-环化加成反应^[62]。SpnL 催化 C3 和 C14 之间形成第 2 个闭合五元环，从而形成大环内酯骨架。葡萄糖-1-磷酸经 Gtt、Gdh、Epi 和 Kre 蛋白共同作用下转化为 TDP-L-鼠李糖 [图 4(b)]，由 SpnG 催化与聚酮骨架相连^[63]。随后经甲基转移酶 SpnH、SpnI 和 SpnK 催化形成假糖苷配基 [图 4(a)]。D-福乐糖胺的生物合成的前两步与鼠李糖合成的前两步相同，SpnO、SpnN、SpnQ、SpnR 和 SpnS 逐步将中间体 TDP-4-酮-6-脱氧葡萄糖转化为 TDP-D-福乐糖胺，再由 SpnS 催化发生甲基化合成二甲基福乐糖胺 [图 4(c)]。最终 SpnP 将二甲基福乐糖胺转移到假糖苷配基上形成多杀霉素 [图 4(a)]。

白藜芦醇的生物合成如图 5 所示，属于植物苯丙烷途径，其关键中间体是对香豆酸，可以通过两条途径生成。第一条途径是从 L-酪氨酸出发，经酪氨酸解氨酶 (tyrosine ammonia lyase, TAL) 脱去氨基，生成对香豆酸。第二条途径是从苯丙氨酸出发，但相对较长且复杂。苯丙氨酸通过苯丙氨酸羟化酶 (phenylalanine hydroxylase, PAH) 形成酪氨酸，再经 TAL 催化生成对香豆酸，或通过苯丙氨酸氨解酶 (phenylalanine ammonia lyase,

PAL) 脱去氨基形成肉桂酸，然后肉桂酸经过肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamate-4-hydroxylase, C4H) 形成对香豆酸。对香豆酸继而经过对香豆酰辅酶 A 连接酶 (4-coumaroyl-CoA ligase, 4CL) 与一分子乙酰辅酶 A 结合，形成对香豆酰辅酶 A。接下来在芪合酶 (stilbene synthase, STS) 的催化下，一分子对香豆酰辅酶 A 与三分子丙二酰辅酶 A 缩合生成白藜芦醇。

2.2 萜烯类的生物合成

目前萜烯类生物农药主要来源于植物，其生物合成可以通过两种不同的类异戊二烯合成途径进行，分别为甲基赤藓醇磷酸途径 (MEP) 和甲羟戊酸途径 (MVA)，提供萜类化合物的合成砌块异戊烯二磷酸 (IPP) 及其异构体二甲基烯丙基二磷酸 (DMAPP)^[64-66]。IPP 和 DMAPP 在焦磷酸香叶酯合酶 (GPPS) 的作用下，头-尾相接缩合为焦磷酸香叶酯 (GPP)，之后在不同单萜合酶及修饰酶的作用下，衍生为香芹酚、桉油精、D-柠檬烯等单萜类生物农药 [图 6(a)]。在焦磷酸金合欢酯合酶 (FPPS) 的催化下，GPP 继续与一分子 IPP 缩合成焦磷酸金合欢酯 (FPP)，进一步衍生成为苦皮藤素、莪术醇等倍半萜类生物农药。两分子的 FPP 经鲨烯合酶 (SQS) 作用尾-尾缩合生成鲨烯，再经 β -香树脂醇合酶以及一系列氧化酶与糖基转移酶作用，最终形成三萜皂苷螺威。

Croteau 等^[67]从鼠尾草 (*Salvia officinalis*) 的腺毛分泌细胞中分离并部分纯化了 1,8-桉叶油素

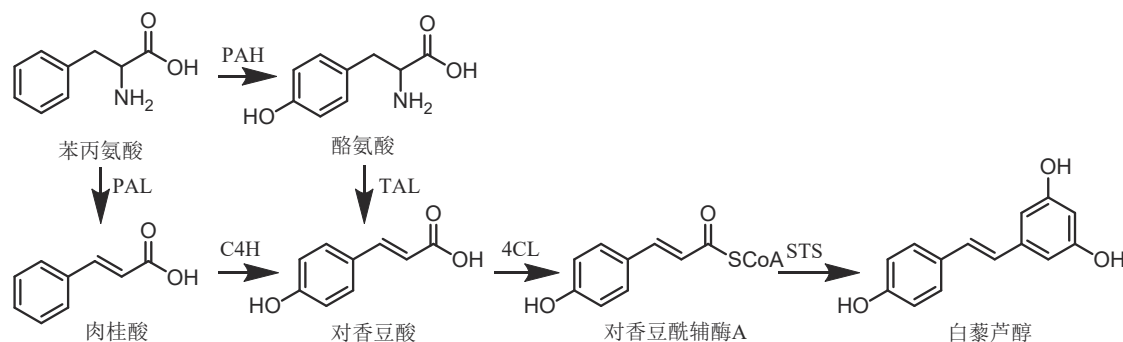


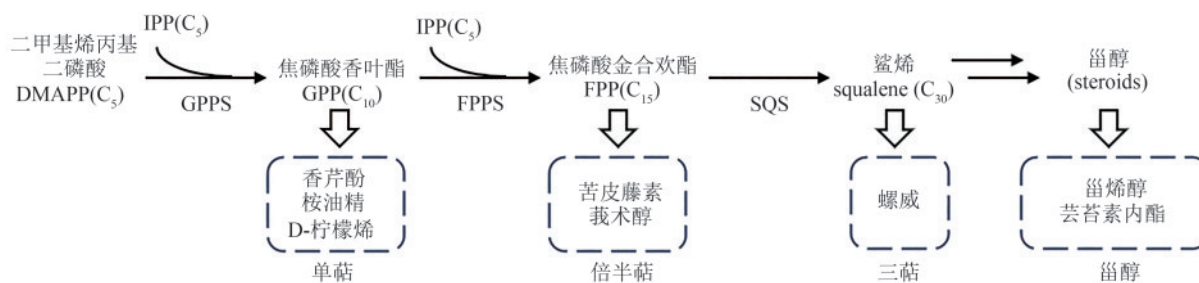
图5 白藜芦醇的生物合成通路

(PAH—苯丙氨酸羟化酶；PAL—苯丙氨酸氨解酶；C4H—肉桂酸-4-羟化酶；TAL—酪氨酸氨解酶；4CL—对香豆酰辅酶 A 连接酶；STS—芪合酶)

Fig. 5 Biosynthetic pathway of resveratrol

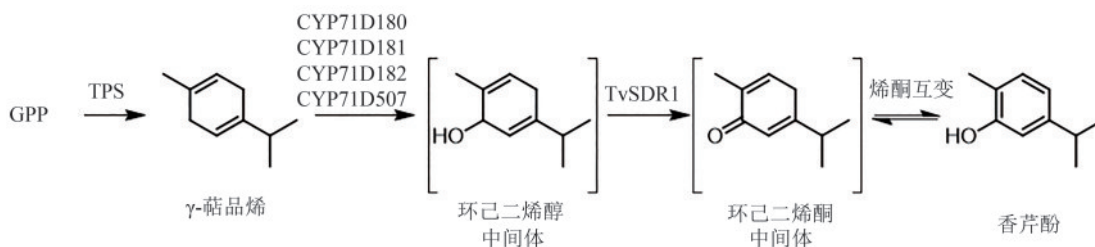
(PAH—phenylalanine hydroxylase; PAL—phenylalanine ammonia lyase; C4H—cinnamate-4-hydroxylase;

TAL—tyrosine ammonia lyase; 4CL—4-coumarate CoA ligase; STS—stilbene synthase)



(a) 萜烯类生物农药的生物合成

(a) Biosynthesis of terpene-based biopesticides



(b) 香芹酚的生物合成通路

(b) Biosynthetic pathway of carvacrol

图6 萜烯类农药

(TPS— γ -萜品烯合酶; CYP71D180等—P450单加氧酶; TvSDR1—短链还原酶1)

Fig. 6 Terpenes-based biopesticides

(TPS— γ -terpinene synthase; CYP71D180, etc—cytochrome P450 monooxygenase; TvSDR1—short-chain dehydrogenase/reductase 1)

环化酶 (1,8-cineole cyclase), 并研究了该单萜环化酶的底物利用率、分子量、pH最佳值等。Lücker等^[68]报道柠檬烯是由柠檬烯合酶 (limonene synthase) 催化底物 GPP 而成。柠檬烯合酶通常由两个结构域组成, 一个C端活性位点结构域表现出 I 类萜烯环化酶折叠功能, 另一个N端转运结构域, 可以将柠檬烯合酶靶向到植物物质体中, 进行折叠和成熟^[69]。

Krause等^[70]阐明了香芹酚的完整生物合成途径 [图6(b)]: GPP 通过 γ -萜品烯合酶 (γ -terpinene synthase, TPS) 环化形成 γ -萜品烯 (γ -terpinene), 接下来在 CYP71D 亚家族的 P450 单加氧酶的催化

下合成不稳定的环己二烯醇中间体, 再经短链还原酶 (TvSDR1) 将羟基脱氢还原成酮基合成烯丙酮中间体, 最后经烯酮互变异构形成香芹酚。

2.3 生物碱类的生物合成

生物碱的生物合成主要源于氨基酸途径和 MVA 途径。目前生物碱类生物农药主要源于氨基酸途径 (苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸等), 其生物合成机制研究较为深入, 本文综述了申嗉霉素和小檗碱的生物合成途径。

申嗉霉素的生物合成如图7所示, 通过吩嗪生物合成基因 (*phzB*、*phzD*、*phzE*、*phzF*、*phzG*)

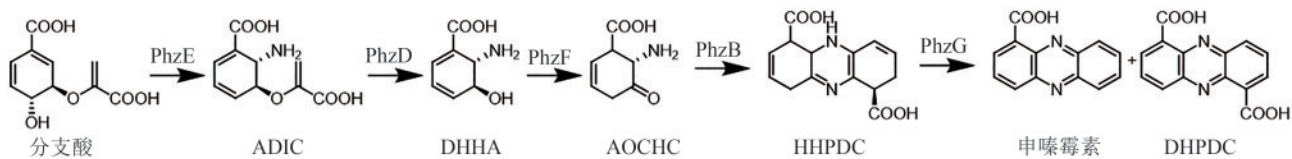


图7 申嗉霉素的生物合成途径

(PhzE—2-氨基脱氧分支酸合酶; PhzD—异分支酸酶; PhzF—DHHA 异构酶; PhzB—3-类固醇异构酶; PhzG—FMN 依赖氧化酶)

Fig. 7 Biosynthetic pathway of shenqinmycin

(PhzE—2-amino-2-desoxyisochorismate synthase; PhzD—ischorismatase; PhzF—DHHA isomerase;

PhzB— Δ 5-3-ketosteroid isomerase; PhzG—FMN-dependent oxidase)

编码的5个蛋白的催化逐步合成吩嗪-1-羧酸。首先2-氨基脱氧分支酸合酶(PhzE)催化分支酸合成2-氨基脱氧分支酸(ADIC)^[71]。异分支酸酶(PhzD)催化ADIC生成反式-2,3-二氢-3-羟基-2-氨基苯甲酸(DHHA)^[72]。DHHA异构酶(PhzF)进一步将DHHA异构化,生成不稳定的6-氨基-5-环己酮-烯-1-羧酸(AOCHC)^[73]。两分子的AOCHC经3-类固醇异构酶(PhzB)缩合生成六氢吩嗪-1,6-二羧酸(HHPDC),其催化机理仍未探明^[74]。 Δ^5 -3-酮基固醇异构酶(PhzA)与PhzB相似性达到70%,但它不能催化AOCHC的缩合反应。可能的原因是在PhzB的H73和S77相对应的位置,PhzA都突变成亮氨酸。核心吩嗪生物合成的最后一步由FMN依赖氧化酶(PhzG)催化HHPDC生成申嗪霉素(DHPCA)和二氢吩嗪-1,6-二羧酸(DHPDC)^[75]。

小檗碱在生物体内以L-酪氨酸为起始底物(图8),经多步反应生成多巴胺与4-羟基苯乙醛,后经去甲乌药碱合酶(NCS)通过Pictet-Spengler反应催化缩合形成第一个中间体去甲乌药碱^[76]。根据多种植物细胞培养物和整株植物的示踪研究,确定了异喹啉类生物碱合成前几步反应的顺序,由去甲乌药碱-6-O-甲基转移酶(6-OMT)催化形成乌药碱,接着乌药碱-N-甲基转移酶(CNMT)催化形成N-甲基乌药碱,然后N-甲基乌药碱-3'-羟化酶(CYP80B3)催化产生3'-羟基-N-甲基乌药

碱,最后由3'-羟基-N-甲基乌药碱-4'-O-甲基转移酶(4'-OMT)催化形成另一个关键分支点的中间体网状番荔枝碱^[77]。网状番荔枝碱在小檗碱桥酶(BBE)催化下闭环生成金黄紫堇碱,从而形成小檗碱的基本母核结构。之后,金黄紫堇碱由金黄紫堇碱-9-O-甲基转移酶(SMT)催化形成四氢非洲防己碱,Muemmler等^[78]考察了SMT的底物特异性,发现除金黄紫堇碱外,其他类似物不能在SMT催化下甲基化,说明SMT具有高度的立体和区域选择性。在黄连(*Coptis chinensis*)中,四氢非洲防己碱首先经氢化小檗碱合酶CYP719A1氢化形成氢化小檗碱^[79],最后由四氢小檗碱氧化酶(THBO)催化形成小檗碱。

2.4 其他类生物农药的生物合成

除虫菊素由六种酯类化合物组成,每一种酯类均由单萜类酸片段偶联到rethrolone型氧化脂醇(图9)。它们在除虫菊中的生物合成^[80]涉及两种核心的植物代谢途径:MEP单萜途径合成环丙烷单萜(菊酸和第二菊酸);十八烷酸途径合成环戊酮(茉莉醇酮、除虫菊醇酮和瓜菊醇酮)。菊基二磷酸合成酶(chrysanthemyl diphosphate synthase, CDS)是除虫菊酯合成路径中的第一个关键酶,催化两分子DMAPP进行不寻常的头-中部缩合生成菊醇。而后菊醇被乙醇脱氢酶2(ADH2)和醛脱

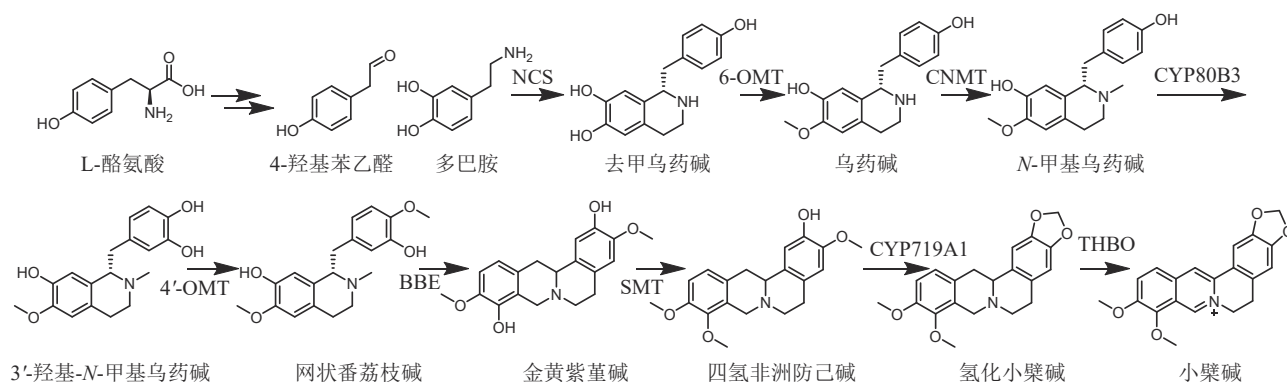


图8 小檗碱的生物合成途径

(NCS—去甲乌药碱合酶; 6-OMT—去甲乌药碱-6-O-甲基转移酶; CNMT—乌药碱-N-甲基转移酶; CYP80B3—N-甲基乌药碱-3'-羟化酶; 4'-OMT—3'-羟基-N-甲基乌药碱-4'-O-甲基转移酶; BBE—小檗碱桥酶; SMT—金黄紫堇碱-9-O-甲基转移酶; CYP719A1—氢化小檗碱合酶; THBO—四氢小檗碱氧化酶)

Fig. 8 Biosynthetic pathway of berberine

(NCS—noraconitine synthase; 6-OMT—noraconitine 6-O-methyltransferase; CNMT—coclaurine N-methyltransferase; CYP80B3—N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase; 4'-OMT—3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase; BBE—berberine bridge enzyme; SMT—scoulerine-9-O-methyltransferase; CYP719A1—canadine synthase; THBO—tetrahydroberberine oxidase)

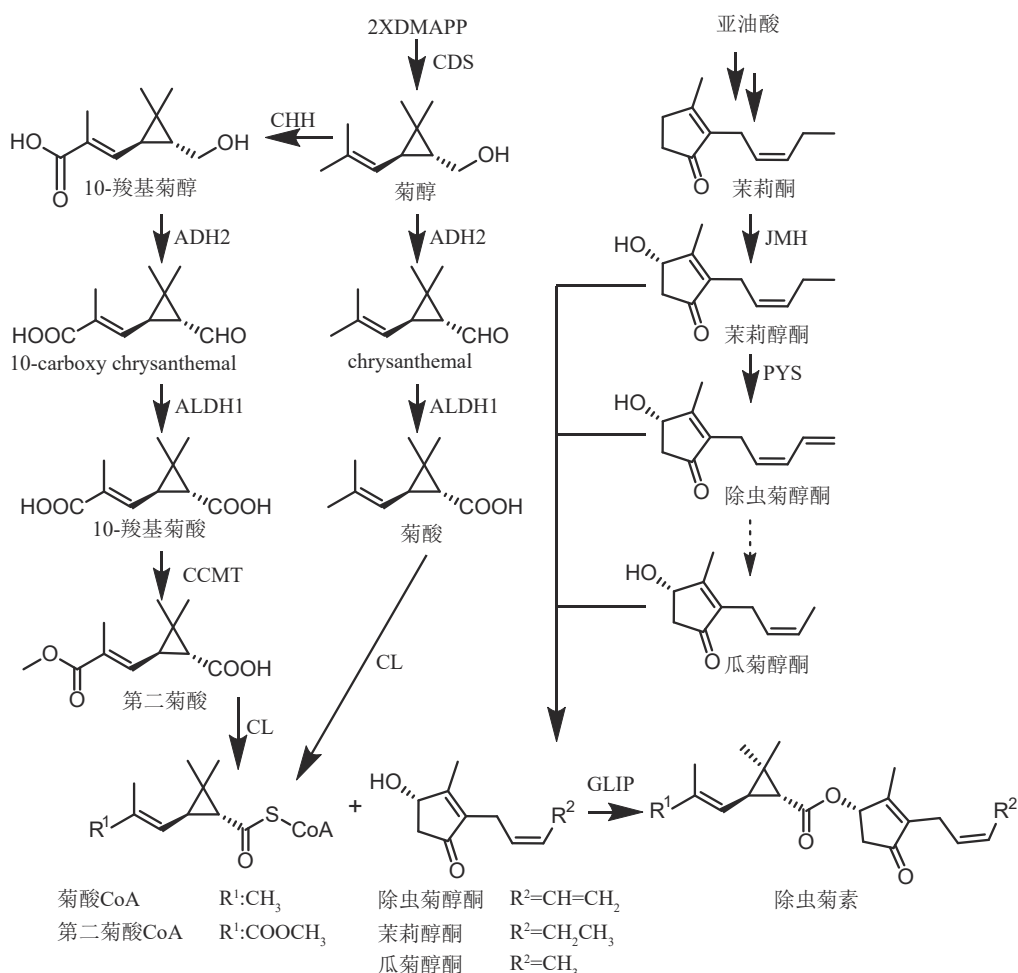


图9 除虫菊素的生物合成途径

(CDS—菊基二磷酸合成酶；CHH—chrysanthemol羟化酶；ADH2—乙醇脱氢酶2；ALDH1—醛脱氢酶1；CCMT—10-羧基菊酸10-甲基转移酶；CL—辅酶A连接酶；JMH—茉莉酮羟化酶；PYS—除虫菊醇酮合酶；GLIP—GDSL脂肪酶)

Fig. 9 Biosynthetic pathway of pyrethrins

(CDS—chrysanthemyl diphosphate synthase; CHH—chrysanthemol 10-hydroxylase; ADH2—alcohol dehydrogenase 2; ALDH1—aldehyde dehydrogenase 1; CCMT—10-carboxychrysanthemic acid 10-methyltransferase; CL—CoA ligase; JMH—jasmone hydroxylase; PYS—pyrethrolone synthase; GLIP—GDSL lipase)

氢酶1 (ALDH1) 两种氧化还原酶修饰生成菊酸^[81-82]。chrysanthemol羟化酶 (chrysanthemol 10-hydroxylase, CHH) 可以将部分菊醇的C10位羟基化, 再进一步氧化为羧基, 接着经ADH2和ALDH1氧化生成10-羧基菊酸^[83]。最后, 10-羧基菊酸被SABATH家族的10-羧基菊酸10-甲基转移酶 (10-carboxychrysanthemic acid 10-methyltransferase, CCMT) 甲基化, 生成第二菊酸。而三个环戊酮的合成途径仍不明晰。Matsuda等^[80]通过同位素饲喂试验发现, 茉莉醇酮、除虫菊醇酮和瓜菊醇酮具有共同的合成前体亚油酸。目前尚未发现能合成茉莉酮的酶, 但细胞色素P450CYP71AT148作

为茉莉酮羟化酶 (jasmone hydroxylase, JMH) 催化C3位羟基化合成茉莉醇酮^[84]。Li等^[85]研究发现另一种P450酶CYP82Q3作为除虫菊醇酮合酶 (pyrethrolone synthase, PYS) 能催化茉莉醇酮碳链末端的脱氢氧化生成除虫菊醇酮。而第三种环戊酮瓜菊醇酮的生物合成途径尚不清楚, 可能通过侧链末端碳的进一步氧化和脱羧合成^[86]。

3 小分子生物农药的微生物细胞工厂

小分子生物农药生物合成途径的解析为细胞工厂构建提供了理论基础。细胞工厂具有生产效

率高、可持续性良好、环境影响小等优点，能够实现复杂化合物的精确合成。目前对于微生物细胞工厂的研究仍集中在医药与化工领域，主要因为对于小分子生物农药的研究起步较晚，部分化合物的结构复杂同时合成途径仍不明晰。近年来多杀霉素、白藜芦醇、D-柠檬烯等小分子生物农药细胞工厂的研究取得了显著进展。

3.1 多杀霉素

近年来国内外研究者利用理化诱变和分子育种^[87]、发酵条件优化^[88-91]、基因组工程^[92-93]、代谢工程^[94-97]等策略提高多杀霉素产量。刘天罡课题组^[98]在异源产多杀霉素的白色链霉菌 (*Streptomyces albus*) J1074 中利用组成型启动子过表达多杀霉素聚酮合酶基因 (*spnA*、*spnB*、*spnC*、*spnD* 和 *spnE*)，并优化了发酵条件，最终的多杀霉素产量约 70 mg/L。Huang 等^[99]将多杀霉素的生物合成基因簇在红色糖多孢菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 中进行异源表达，通过过表达鼠李糖基转移酶与 [4+2] 环化酶、引入 *Sfp* 基因、紫外诱变等方法，最终菌株 AT-ES04PS-3007 的多杀霉素产量达 830 mg/L。谭在高课题组^[100]设计了一种“C3(丙酮酸)-C3(3-氧代丙酸)-C3(丙二酰辅酶A)”的新途径，摆脱了碳源浪费和能量消耗等弊端，并将该途径引入刺糖多孢菌之中，多杀霉素摇瓶产量达 4.6 g/L。国内齐鲁制药有限公司、山东鲁抗医药股份有限公司、浙江升华拜克生物股份有限公司、河南三浦百草生物工程有限公司等已实现规模化生产。

3.2 白藜芦醇

随着对白藜芦醇需求的增加，许多研究集中在使用代谢工程菌株生产白藜芦醇，包括大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌^[101-102]等原核生物以及酿酒酵母、解脂耶氏酵母、圆红酵母^[103]等真核生物。Shrestha 等^[104]在大肠杆菌中采用模块化构建策略合成白藜芦醇及其邻羟基化衍生物。其生物合成途径被分为三个不同的模块：模块 I 包括聚酮合酶基因；模块 II 基因包括来自三种不同生物的乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A 池增强基因；模块 III 基因是

区域特异性 3'-羟基化酶。模块 I 与两种不同的模块 II 基因的组合，并在补充醋酸钠和二钠丙二酸盐后，产生了 137 mg/L 的白藜芦醇。Lim 等^[105]通过基因工程技术，研究了表达芪合酶的不同启动子、构建设计和宿主菌株等构建环境，并同时过表达乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 和生物素连接酶 (BirA)，提高了细胞内白藜芦醇前体丙二酰辅酶 A 的含量，最终使白藜芦醇产量在大肠杆菌中提高达到 2.3 g/L。

在真核代谢工程菌株中，Meng 等^[106]在酿酒酵母中引入来自圆红酵母的双功能苯丙氨酸/酪氨酸氨解酶、整合多拷贝生物合成途径基因、改善芳香族氨基酸和丙二酰辅酶 A 的代谢通量以及删除旁路途径基因，最终使白藜芦醇的产量达到 4.1 g/L。Sáez-Sáez 等^[107]在解脂耶氏酵母中通过过表达莽草酸途径中对反馈不敏感的等位基因 *YLARO4^{K221L}* 和 *YLARO7^{G139S}*，利用连续进料批式反应器可生产 12.4 g/L 的白藜芦醇，是迄今为止报道的白藜芦醇从头合成的最高产量。

3.3 D-柠檬烯

传统的 D-柠檬烯来源于柑橘工业生产中的副产品柑橘精油，其中含有 70%~98% 的 D-柠檬烯^[108]，但是柑橘产量降低、提取物中农药含量高等问题限制了柠檬烯的生产^[109]。而细胞工厂生产则可减少对柑橘产业的依赖，将葡萄糖或甘油等原料转化为柠檬烯。Dunlop 等^[110]将异源 MVA 途径引入大肠杆菌用于柠檬烯的生物合成，产量约 60 mg/L，与天然 MEP 途径相比增加了近 12 倍。Alonso-Gutierrez 等^[111]同样设计了具有异源 MVA 途径和柠檬烯合成酶的大肠杆菌工程菌株，并利用密码子优化、替代操纵子等技术减少细胞代谢负担，利用不同浓度诱导物最大限度生产柠檬烯，产量达 400 mg/L。Wu 等^[112]采用系统优化的策略，将异源 MVA 途径分为三个模块并分别优化，最终代谢工程菌株 ELIM78 通过补料发酵产生高达 1.29 g/L 的柠檬烯。Rolf 等^[113]使用大肠杆菌工程菌 BL21(DE3)pJBEI-6410 在生物反应器规模上开发了柠檬烯的生产工艺，将甘油作为细胞生长和柠檬烯合成的唯一碳源，产量达 3.63 g/L。此外酿

酒酵母也是生产 D-柠檬烯的可选宿主。Zhang 等^[114]通过构建丙酮酸脱氢酶旁途径 (pyruvate dehydrogenase bypass, PDH) 促进乙酰辅酶 A 进入 MVA 途径, 并且删除 MVA 途径外的靶基因, 协同增加柠檬烯的合成, 最终补料摇瓶发酵合成柠檬烯达目前酿酒酵母中最高产量 2.58 g/L。

4 挑战与展望

小分子生物农药是农业可持续发展的重要组成部分, 种类少和产量低是影响其广泛应用的瓶颈问题, 主要表现在:

(1) 我国小分子生物农药的种类较少, 不能满足市场的多元化需求, 特别是在重磅农药品种和原创性靶标开发方面相较于国际知名农药公司仍存在一定差距。目前国内普遍应用的小分子生物农药仍局限在阿维菌素、井冈霉素、赤霉酸、苦参碱等, 这些产品多数自 20 世纪以来便已开始使用, 其应用在一定程度上受到了国外专利的限制, 此外在抗药性管理方面也面临挑战。

(2) 多数小分子生物农药的生物合成途径仍不明晰。例如除虫菊素中的片段瓜菊醇酮的合成途径仍未完全解析, 参与芸苔素内酯类生物合成途径中 C3 位酮基还原与 C2 位羟基化的酶催化机制仍不清楚, 这些都影响了小分子生物农药高效细胞工厂的设计和构建。

小分子生物农药主要来源于天然产物。未来, 基于天然产物的活性化合物库的构建, 将为发掘小分子生物农药的先导化合物提供丰富资源。通过人工智能和计算机辅助药物设计等先进技术, 结合基因组挖掘、组合生物合成、化学修饰等策略, 有望显著增加小分子生物农药的品种。合成生物学和代谢工程的快速发展, 将推动更多小分子生物农药生物合成途径的阐明。这不仅有助于理解这些活性成分在生物体内的合成机制, 而且为通过代谢工程等手段提高其产量提供了支撑。随着这些技术的不断进步, 可以预见, 未来将设计和构建出更多高效、环保小分子生物农药的细胞工厂, 并将其广泛应用于生产。目前国家重点研发计划项目“生物农药微生物细胞工厂的设计构建”已经启动, 该项目旨在推动合成生物学在

生物农药领域的应用, 团队在已有的生物合成途径解析与生产菌高产改造^[115-119]的工作基础上, 对丁烯基多杀菌素、龟裂霉素、灰瘟素、福莱菌肽、多节孢酸等 12 种小分子生物农药进行生物合成途径解析与细胞工厂构建, 为农业提供更多高效生物农药产品, 保障农业健康可持续发展。

参 考 文 献

- [1] FENIBO E O, IJOMA G N, MATAMBO T. Biopesticides in sustainable agriculture: current status and future prospects[M/OL]/MANDAL S D, RAMKUMAR G, KARTHI S, et al. New and future development in biopesticide research: biotechnological exploration. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022: 1-53. (2022-05-04)[2024-12-01]. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3989-0_1.
- [2] AIOUB A A A, GHOSH S, AL-FARGA A, et al. Back to the origins: biopesticides as promising alternatives to conventional agrochemicals[J]. European Journal of Plant Pathology, 2024, 169(4): 697-713.
- [3] ARORA N K, VERMA M, PRAKASH J, et al. Regulation of biopesticides: global concerns and policies[M/OL]/ARORA N K, MEHNAZ S, BALESTRINI R. Bioformulations: for sustainable agriculture. New Delhi: Springer India, 2016: 283-299. (2016-06-07) [2024-12-01]. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3_16.
- [4] WANG Q, WANG Z S. Chapter 10 - Biopesticides in China: development, commercialization, and regulation [M/OL]/KOUL O. Development and commercialization of biopesticides. New York: Academic Press, 2023: 203-12. (2023-04-21)[2024-12-01]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95290-3.00011-X>.
- [5] FENIBO E O, IJOMA G N, MATAMBO T. Biopesticides in sustainable agriculture: a critical sustainable development driver governed by green chemistry principles[J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2021, 5: 619058.
- [6] LI J, RONG L X, ZHAO Y, et al. Next-generation metabolic engineering of non-conventional microbial cell factories for carboxylic acid platform chemicals[J]. Biotechnology Advances, 2020, 43: 107605.
- [7] LÜBECK M, LÜBECK P S. Fungal cell factories for efficient and sustainable production of proteins and peptides[J]. Microorganisms, 2022, 10(4): 753.
- [8] GAYEN A K, NICHOLS L, WILLIAMS G J. An artificial pathway for polyketide biosynthesis[J]. Nature Catalysis, 2020, 3(7): 536-538.
- [9] JANAS A, PRZYBYLSKI P. 14- and 15-Membered lactone macrolides and their analogues and hybrids: structure,

- molecular mechanism of action and biological activity[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 182: 111662.
- [10] WANG R L, LIU S X, MA Z Y. Recent development of versatile polyphenol platforms in fertilizers and pesticides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(25): 9599-9608.
- [11] SPARKS T C, CROUSE G D, BENKO Z, et al. The spinosyns, spinosad, spinetoram, and synthetic spinosyn mimics-discovery, exploration, and evolution of a natural product chemistry and the impact of computational tools[J]. *Pest Management Science*, 2021, 77(8): 3637-3649.
- [12] GALM U, SPARKS T C. Natural product derived insecticides: discovery and development of spinetoram[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(2): 185-193.
- [13] TANG J L, ZHU Z R, HE H C, et al. Bacterioferritin: a key iron storage modulator that affects strain growth and butenyl-spinosyn biosynthesis in *Saccharopolyspora pogona*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 157.
- [14] WATSON G B. Actions of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2001, 71(1): 20-28.
- [15] LEWER P, HAHN D R, KARR L L, et al. Discovery of the butenyl-spinosyn insecticides: novel macrolides from the new bacterial strain *Saccharopolyspora pogona*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17(12): 4185-4196.
- [16] JOHNSON-ARBOR K. Ivermectin: a mini-review[J]. *Clinical Toxicology*, 2022, 60(5): 571-575.
- [17] GHORBANI A, AMIRI M S, HOSSEINI A. Pharmacological properties of *Rheum turkestanicum* janisch[J]. *Heliyon*, 2019, 5(6): e01986.
- [18] HAREERI R H, ALDURDUNJI M M, ABDALLAH H M, et al. *Aspergillus ochraceus*: metabolites, bioactivities, biosynthesis, and biotechnological potential[J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6759.
- [19] LI X, LIU Y J, CHU S F, et al. Physcion and physcion 8-*O*- β -glucopyranoside: a review of their pharmacology, toxicities and pharmacokinetics[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 310: 108722.
- [20] VIKAL A, MAURYA R, BHOWMIK S, et al. Resveratrol: a comprehensive review of its multifaceted health benefits, mechanisms of action, and potential therapeutic applications in chronic disease[J]. *Pharmacological Research-Natural Products*, 2024, 3: 100047.
- [21] SHARIFI-RAD J, QUISPE C, DURAZZO A, et al. Resveratrol' biotechnological applications: enlightening its antimicrobial and antioxidant properties[J]. *Journal of Herbal Medicine*, 2022, 32: 100550.
- [22] KANG J E, YOO N, JEON B J, et al. Resveratrol oligomers, plant-produced natural products with anti-virulence and plant immune-priming roles[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 885625.
- [23] CHEN J C, LIAO X F, GAN J W. Review on the protective activity of osthole against the pathogenesis of osteoporosis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 1236893.
- [24] SUN M N, SUN M J, ZHANG J Y. Osthole: an overview of its sources, biological activities, and modification development[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2021, 30(10): 1767-1794.
- [25] 石志琦, 沈寿国, 徐朗莱, 等. 蛇床子素对植物病原真菌抑制机制的初步研究[J]. *农药学报*, 2004, 6(4): 28-32.
- SHI Z Q, SHEN S G, XU L L, et al. Inhibition mechanism of osthole to plant fungus pathogens[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2004, 6(4): 28-32.
- [26] 阴旗俊, 孙海峰. 蛇床子素的药理作用和作为生物农药的研究[J]. *中医药信息*, 2009, 26(2): 13-15, 93.
- YIN Q J, SUN H F. Pharmacological effects and research of osthole as a biological pesticide[J]. *Information on Traditional Chinese Medicine*, 2009, 26(2): 13-15, 93.
- [27] YANG G H, LIAO Z X, XU Z Y, et al. Antimitotic and antifungal C-3/C-3"-biflavanones from *Stellera chamaejasme* [J]. *ChemInform*, 2005, 36(52): 200552196.
- [28] 宋丽雯, 张新虎, 沈慧敏. 1.6%瑞香狼毒素水乳剂对4种蔬菜害虫的作用方式比较[J]. *植物保护*, 2017, 43(1): 218-223.
- SONG L W, ZHANG X H, SHEN H M. Comparison of different actions of 1.6% daphneantoxin EW on four vegetable pests[J]. *Plant Protection*, 2017, 43(1): 218-223.
- [29] ZHOU C M, ZHOU J Y, WU Y J, et al. Mugwort essential oil and its major constituent, eucalyptol, elicits oviposition avoidance of *Drosophila sukukii*[J]. *Entomologia Generalis*, 2024, 44(3): 673-683.
- [30] MAĆZKA W, TWARDAWSKA M, GRABARCZYK M, et al. Carvacrol - a natural phenolic compound with antimicrobial properties[J]. *Antibiotics*, 2023, 12(5): 824.
- [31] SILVA E R, DE CARVALHO F O, TEIXEIRA L G B, et al. Pharmacological effects of carvacrol in *in vitro* studies: a review[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24(29): 3454-3465.
- [32] 李焯青, 张昌朋, 方楠, 等. 柠檬烯在农业病虫害防控中的应用研究进展[J]. *农药学报*, 2023, 25(5): 1004-1016.
- LI Y Q, ZHANG C P, FANG N, et al. Research progress of limonene in the prevention and control of agricultural diseases, pests and weeds[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2023, 25(5): 1004-1016.
- [33] DENKOVA-KOSTOVA R, TENEVA D, TOMOVA T, et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and

- cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) [J]. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 2021, 76(5-6): 175-185.
- [34] QIAN H, HU Y K, WANG Z Y, et al. In-depth structural simplification of celangulin V: design, synthesis, and biological activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(27): 15142-15150.
- [35] ROY G, CHAKRABORTY K, NANDY P, et al. Pros and cons of curcumin as bioactive phyto- compound for effective management of insect pests[J]. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 2014, 7(1): 31-43.
- [36] FU Y S, CHEN T H, WENG L B, et al. Pharmacological properties and underlying mechanisms of curcumin and prospects in medicinal potential[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 141: 111888.
- [37] 官威, 洪青标, 吕山, 等. 钉螺控制技术研究进展[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2017, 29(2): 246-251.
GUAN W, HONG Q B, LÜ S, et al. Research progress of control techniques on *Oncomelania hupensis*[J]. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2017, 29(2): 246-251.
- [38] 吴洪初, 马玉才, 张正球, 等. 3种常用灭螺药大规模现场应用效果与费用评价[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2018, 30(6): 619-624.
WU H C, MA Y C, ZHANG Z Q, et al. Effect and cost-effectiveness of three commonly used molluscicides in largescale field application[J]. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2018, 30(6): 619-624.
- [39] 曹磊, 顾爱国, 王莉. 高效液相色谱法测定0.06%甾萜醇微乳剂中有效成分含量方法研究[J]. *现代农业科技*, 2018(2): 125-126.
CAO L, GU A G, WANG L. Determination of active component content in 0.06% β -sitosterol ME by HPLC[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2018(2): 125-126.
- [40] 张上林, 毕艳, 张祝华, 等. 0.06%甾萜醇微乳剂防治番茄病毒病田间药效试验[J]. *天津农林科技*, 2019(5): 25-26.
ZHANG S L, BI Y, ZHANG Z H, et al. Field efficacy of 0.06% sterol microemulsion against tomato virus disease[J]. *Science and Technology of Tianjin Agriculture and Forestry*, 2019(5): 25-26.
- [41] BAJGUZ A, CHMUR M, GRUSZKA D. Comprehensive overview of the brassinosteroid biosynthesis pathways: substrates, products, inhibitors, and connections[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 1034.
- [42] MÜSSIG C. Brassinosteroid-promoted growth[J]. *Plant Biology*, 2005, 7(2): 110-117.
- [43] JIANG H X, WANG J, ZHOU L, et al. Coenzyme Q biosynthesis in the biopesticide Shenqinmycin-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain M18[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(7): 1025-1038.
- [44] ZHAO X Z, CHEN Z, YU L, et al. Investigating the antifungal activity and mechanism of a microbial pesticide Shenqinmycin against *Phoma* sp[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018, 147: 46-50.
- [45] TANG J T, LI Y K, ZHANG L L, et al. Biosynthetic pathways and functions of indole-3-acetic acid in microorganisms[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(8): 2077.
- [46] FU S F, WEI J Y, CHEN H W, et al. Indole-3-acetic acid: a widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2015, 10(8): e1048052.
- [47] GENG X Q, JIN L, SHIMADA M, et al. The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*[J]. *Planta*, 2014, 240(6): 1149-1165.
- [48] YOUNG S A, PARK S K, RODGERS C, et al. Physical and functional characterization of the gene cluster encoding the polyketide phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(6): 1837-1843.
- [49] GAO M, ZHANG C, LU H. Coronatine is more potent than jasmonates in regulating Arabidopsis circadian clock[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 12862.
- [50] HODOŞAN C, GÎRD C E, GHICA M V, et al. Pyrethrins and pyrethroids: a comprehensive review of natural occurring compounds and their synthetic derivatives[J]. *Plants*, 2023, 12(23): 4022.
- [51] VALENTINE W M. Pyrethrin and pyrethroid insecticides[J]. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 1990, 20(2): 375-382.
- [52] YU L, ZHOU W T, SHE Y X, et al. Efficient biosynthesis of nucleoside cytokinin angustmycin A containing an unusual sugar system[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 6633.
- [53] MITANI T, HEINZE J E, FREESE E. Induction of sporulation in *Bacillus subtilis* by decoyinine or hadacidin[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1977, 77(3): 1118-1125.
- [54] 王龙, 刘悦, 邹子玉, 等. 1%谷维菌素可溶液剂对水稻生长和产量的影响[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(14): 83-89.
WANG L, LIU Y, ZOU Z Y, et al. Effects of guvermectin 1% SL on growth and yield of rice[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2023, 51(14): 83-89.
- [55] PATIL P B, PATEL J K. Chemopreventive aspects, investigational anticancer applications and current perspectives on allyl isothiocyanate (AITC): a review[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2023, 478(12): 2763-2777.
- [56] DENG Y P, HO C T, LAN Y Q, et al. Bioavailability, health benefits, and delivery systems of allicin: a review[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(49): 19207-19220.

- [57] CHOO S, CHIN V K, WONG E H, et al. Review: antimicrobial properties of allicin used alone or in combination with other medications[J]. *Folia Microbiologica*, 2020, 65(3): 451-465.
- [58] YANG X, BAI S, WU J M, et al. Antifungal activity and potential action mechanism of allicin against *Trichosporon asahii*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e00907-23.
- [59] YI J S, KIM J M, BAN Y H, et al. Modular polyketide synthase-derived insecticidal agents: from biosynthesis and metabolic engineering to combinatorial biosynthesis for their production[J]. *Natural Product Reports*, 2023, 40(5): 972-987.
- [60] HUANG K X, XIA L Q, ZHANG Y M, et al. Recent advances in the biochemistry of spinosyns[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(1): 13-23.
- [61] KIM H J, PONGDEE R, WU Q Q, et al. The biosynthesis of spinosyn in *Saccharopolyspora spinosa*: synthesis of the cross-bridging precursor and identification of the function of SpnJ[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(47): 14582-14584.
- [62] GORDEEV E G, ANANIKOV V P. Computational study of a model system of enzyme-mediated [4+2] cycloaddition reaction [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0119984.
- [63] ISIORHO E A, LIU H W, KEATINGE-CLAY A T. Structural studies of the spinosyn rhamnosyltransferase, SpnG[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(6): 1213-1222.
- [64] BANERJEE A, SHARKEY T D. Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(8): 1043-1055.
- [65] RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN M, BORONAT A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. a metabolic milestone achieved through genomics[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(3): 1079-1089.
- [66] MIZIORKO H M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 505(2): 131-143.
- [67] CROTEAU R, ALONSO W R, KOEPP A E, et al. Biosynthesis of monoterpenes: partial purification, characterization, and mechanism of action of 1,8-cineole synthase[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1994, 309(1): 184-192.
- [68] LÜCKER J, EL TAMER M K, SCHWAB W, et al. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(13): 3160-3171.
- [69] JONGEDIJK E, CANKAR K, BUCHHAUPT M, et al. Biotechnological production of limonene in microorganisms [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(7): 2927-2938.
- [70] KRAUSE S T, LIAO P, CROCOLL C, et al. The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds *via* cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(52): e2110092118.
- [71] LI Q A, MAVRODI D V, THOMASHOW L S, et al. Ligand binding induces an ammonia channel in 2-amino-2-desoxyisochorismate (ADIC) synthase PhzE[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(20): 18213-18221.
- [72] PARSONS J F, CALABRESE K, EISENSTEIN E, et al. Structure and mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* PhzD, an isochorismatase from the phenazine biosynthetic pathway [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(19): 5684-5693.
- [73] BLANKENFELDT W, KUZIN A P, SKARINA T, et al. Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(47): 16431-16436.
- [74] AHUJA E G, JANNING P, MENDEL M, et al. PhzA/B catalyzes the formation of the tricycle in phenazine biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(50): 17053-17061.
- [75] XU N N, AHUJA E G, JANNING P, et al. Trapped intermediates in crystals of the FMN-dependent oxidase PhzG provide insight into the final steps of phenazine biosynthesis [J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2013, 69(Pt 8): 1403-1413.
- [76] SAMANANI N, FACCHINI P J. Purification and characterization of norcochlorine synthase. The first committed enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in plants [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(37): 33878-33883.
- [77] MINAMI H, KIM J S, IKEZAWA N. Microbial production of plant benzyloquinoline alkaloids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(21): 7393-7398.
- [78] MUEMLER S, RUEFFER M, NAGAKURA N, et al. *S*-adenosyl-L-methionine: (*S*)-scoulerine 9-*O*-methyltransferase, a highly stereo- and regio-specific enzyme in tetrahydroprotoberberine biosynthesis[J]. *Plant Cell Reports*, 1985, 4(1): 36-39.
- [79] IKEZAWA N, IWASA K, SATO F. CYP719A subfamily of cytochrome P450 oxygenases and isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*[J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(1): 123-133.
- [80] MATSUDA K, KIKUTA Y, HABA A, et al. Biosynthesis of pyrethrin I in seedlings of *Chrysanthemum cinerariaefolium* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(13): 1529-1535.
- [81] XU H Y, MOGHE G D, WIEGERT-RININGER K, et al. Coexpression analysis identifies two oxidoreductases involved in the biosynthesis of the monoterpene acid moiety of natural

- pyrethrin insecticides in *Tanacetum cinerariifolium*[J]. Plant Physiology, 2018, 176(1): 524-537.
- [82] XU H Y, LYBRAND D, BENNEWITZ S, et al. Production of *trans*-chrysanthemic acid, the monoterpene acid moiety of natural pyrethrin insecticides, in tomato fruit[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 271-278.
- [83] XU H Y, LI W, SCHILMILLER A L, et al. Pyrethric acid of natural pyrethrin insecticide: complete pathway elucidation and reconstitution in *Nicotiana benthamiana*[J]. New Phytologist, 2019, 223(2): 751-765.
- [84] LI W, ZHOU F, PICHERSKY E. Jasmone hydroxylase, a key enzyme in the synthesis of the alcohol moiety of pyrethrin insecticides[J]. Plant Physiology, 2018, 177(4): 1498-1509.
- [85] LI W, LYBRAND D B, ZHOU F, et al. Pyrethrin biosynthesis: the cytochrome P450 oxidoreductase CYP82Q3 converts jasmolone to pyrethrolone[J]. Plant Physiology, 2019, 181(3): 934-944.
- [86] LYBRAND D B, XU H Y, LAST R L, et al. How plants synthesize pyrethrins: safe and biodegradable insecticides[J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(12): 1240-1251.
- [87] LIANG Y, LU W Y, WEN J P. Improvement of *Saccharopolyspora spinosa* and the kinetic analysis for spinosad production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 152(3): 440-448.
- [88] ZHANG X M, XUE C Y, ZHAO F L, et al. Suitable extracellular oxidoreduction potential inhibit rex regulation and effect central carbon and energy metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 98.
- [89] ZHAO F L, ZHANG C B, YIN J, et al. Coupling of spinosad fermentation and separation process *via* two-step macroporous resin adsorption method[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(8): 2144-2156.
- [90] LAN Z, ZHAO C, GUO W Q, et al. Optimization of culture medium for maximal production of spinosad using an artificial neural network - genetic algorithm modeling[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(4): 253-261.
- [91] BAI Y, ZHOU P P, FAN P, et al. Four-stage dissolved oxygen strategy based on multi-scale analysis for improving spinosad yield by *Saccharopolyspora spinosa* ATCC49460[J]. Microbial Biotechnology, 2015, 8(3): 561-568.
- [92] WANG C, ZHANG X L, CHEN Z, et al. Strain construction for enhanced production of spinosad *via* intergeneric protoplast fusion[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(9): 1070-1075.
- [93] JIN Z H, XU B, LIN S Z, et al. Enhanced production of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* by genome shuffling [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 159(3): 655-663.
- [94] LUO Y S, KOU X X, DING X Z, et al. Promotion of spinosad biosynthesis by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Saccharopolyspora spinosa*[J]. Science China Life Sciences, 2012, 55(2): 172-180.
- [95] PAN H X, LI J, HE N J, et al. Improvement of spinosad production by overexpression of *gtt* and *gdh* controlled by promoter *PermE** in *Saccharopolyspora spinosa* SIPI-A2090 [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(4): 733-739.
- [96] JHA A K, POKHREL A R, CHAUDHARY A K, et al. Metabolic engineering of rational screened *Saccharopolyspora spinosa* for the enhancement of spinosyns A and D production [J]. Molecules and Cells, 2014, 37(10): 727-733.
- [97] WANG X Y, ZHANG C B, WANG M L, et al. Genome-scale metabolic network reconstruction of *Saccharopolyspora spinosa* for spinosad production improvement[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 41.
- [98] AN Z H, TAO H, WANG Y, et al. Increasing the heterologous production of spinosad in *Streptomyces albus* J1074 by regulating biosynthesis of its polyketide skeleton[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2021, 6(4): 292-301.
- [99] HUANG J, YU Z, LI M H, et al. High level of spinosad production in the heterologous host *Saccharopolyspora erythraea*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(18): 5603-5611.
- [100] LI J, MU X, DONG W Y, et al. A non-carboxylative route for the efficient synthesis of central metabolite malonyl-CoA and its derived products[J]. Nature Catalysis, 2024, 7(4): 361-374.
- [101] KALLSCHEUER N, VOGT M, STENZEL A, et al. Construction of a *Corynebacterium glutamicum* platform strain for the production of stilbenes and (2S) -flavanones[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 47-55.
- [102] BRAGA A, OLIVEIRA J, SILVA R, et al. Impact of the cultivation strategy on resveratrol production from glucose in engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 265: 70-75.
- [103] ZHANG M Y, GAO Q D, LIU Y J, et al. Metabolic engineering of *Rhodotorula toruloides* for resveratrol production[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 270.
- [104] SHRESTHA A, PANDEY R P, POKHREL A R, et al. Modular pathway engineering for resveratrol and piceatannol production in engineered *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(22): 9691-9706.
- [105] LIM C G, FOWLER Z L, HUELLER T, et al. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10): 3451-3460.
- [106] MENG L J, DIAO M X, WANG Q Y, et al. Efficient biosynthesis of resveratrol *via* combining phenylalanine and tyrosine pathways in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial

- Cell Factories, 2023, 22(1): 46.
- [107] SÁEZ-SÁEZ J, WANG G K, MARELLA E R, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for high-level resveratrol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 51-61.
- [108] TRANCHIDA P Q, ZOCCALI M, BONACCORSI I, et al. The off-line combination of high performance liquid chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: a powerful approach for highly detailed essential oil analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1305: 276-284.
- [109] NICHKOVA M, FU X, YANG Z, et al. Immunochemical screening of pesticides (simazine and cypermethrin) in orange oil[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(13): 5673-5679.
- [110] 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.
- [111] ALONSO-GUTIERREZ J, CHAN R, BATH T S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 33-41.
- [112] WU J H, CHENG S, CAO J Y, et al. Systematic optimization of limonene production in engineered *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(25): 7087-7097.
- [113] ROLF J, JULSING M K, ROSENTHAL K, et al. A gram-scale limonene production process with engineered *Escherichia coli* [J]. *Molecules*, 2020, 25(8): 1881.
- [114] 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.
- [115] 王靖楠, 庞建, 秦磊, 等. 丁烯基多杀菌素高产菌株的选育和改造策略[J]. *化工学报*, 2022, 73(2): 566-576.
WANG J N, PANG J, QIN L, et al. Breeding and modification strategies of butenyl-spinosyn high-yield strains[J]. *CIESC Journal*, 2022, 73(2): 566-576.
- [116] 徐周钦, 郭超, 李金萍, 等. ⁶⁰Co-NTG 复合诱变选育丁烯基多杀菌素高产菌株及其杀虫活性[J]. *中国生物防治学报*, 2024, 40(2): 299-309.
XU Z Q, GUO C, LI J P, et al. Breeding of butenyl-spinosyns high yielding strain by ⁶⁰Co-NTG compound mutation and its insecticidal activity[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2024, 40(2): 299-309.
- [117] 曹浩榄, 王立军, 冯颖赢, 等. 龟裂霉素新产生菌株的鉴定及其产量优化[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(8): 3133-3147.
CAO H L, WANG L J, FENG Y Y, et al. Identification and yield improvement of a new rimocidin-producing strain[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(8): 3133-3147.
- [118] WANG J Y, LI Z L, WANG W S, et al. Dynamic control strategy to produce riboflavin with lignocellulose hydrolysate in the thermophile *Geobacillus thermoglucosidasius*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(6): 2163-2174.
- [119] YIN M M, XIE L N, CHEN K, et al. Re-engineering fungal nonribosomal peptide synthetases by module dissection and duplicated thiolation domains[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(33): e202406360.



通讯作者: 徐玉泉(1971—),男,研究员,博士生导师。研究方向为发明新技术发现在临床和农业生产中有重要应用价值的微生物天然产物,阐明聚酮和非核糖体多肽天然产物生物合成和合成后修饰机制,利用合成生物技术合成“非天然”聚酮化合物和非核糖体多肽等。
E-mail: xuyuquan@caas.cn



第一作者: 宋开南(1996—),男,博士研究生。研究方向为真菌次级代谢产物的挖掘与生物合成研究。
E-mail: s15850653283@126.com