·大家专版·

周雍进,博士,中国科学院大连化学物理研究所长聘研究员,博士生导师,合成微生物学研究组组长,张大煜优秀学者。国家自然科学基金委杰出青年基金项目与优秀青年基金项目获得者、国家引进人才青年项目入选者以及中科院人才计划入选者。2006 年于江南大学获得食品科学与工程学士学位;2008 年获得天津大学生物化工硕士学位;2012 年于大连化学物理研究所获得生物化工博士学位;2012 年至 2016 年在瑞典查尔姆斯理工大学从事博士后研究。曾在 *Cell*、*Nature Energy*、*Nature Metabolism*、*Nature Chemical Biology*、*Nature Communications*、*JACS*、*PNAS* 等期刊发表论文 100 余篇,被引用 9500 余次。曾获得中国药学会科学技术奖一等奖,国际代谢科学会议青年科学家奖,"伦世仪"基金会杰出青年学者奖,全国生物技术创新大会最具发展潜力奖以及安捷伦"ACT-UR"研究科学奖。目前担任 *Biotechnology Journal* 与 *Synthetic and Systems Biotechnology* 主编,*Trends in Biotechnology* 和 *FEMS Yeast Research* 等多个学术期刊编委。主要从事微生物合成生物学研究,以酵母作为底盘生物,发展新颖高效的代谢工程策略及合成生物学技术,对细胞进行全局优化,高效合成生物化学品、燃料分子及药物。目前已经在合成生物学工具开发、甲醇生物转化以及天然产物合成方面取得一系列重要成果,已有部分研究成果实现产业化应用。

非常规酵母细胞工厂合成天然产物的研究进展

周雍进*, 杨 松*, 高教琪

(中国科学院大连化学物理研究所 生物技术研究部, 辽宁 大连 116023)

摘 要 植物天然产物包括各种次生代谢产物,如萜类、黄酮类和生物碱等,因其具有抗癌、抗炎及抗氧化等性能,在食品、药品和化妆品等行业显示出巨大潜力。然而这些植物天然产物提取面临资源紧缺、提取效率低和产物分离难度大的问题,复杂分子结构也阻碍了全化学合成,因此使用微生物细胞工厂进行可持续的目标产物合成成为经济可行的替代选择。近年来,非常规酵母由于其环境耐受性强和底物利用谱广等性能逐渐成为微生物产物合成极具潜力的优良宿主。本文综述了几种常见非常规酵母(主要包括解脂耶氏酵母、巴斯德毕赤酵母、多形汉逊酵母和圆红冬孢酵母)的生理特征,总结了其合成天然产物(萜类、黄酮类和生物碱)的工程策略和最新研究进展,探讨了非常规酵母合成天然产物面临的挑战,并对未来研究方向进行了展望。

关键词 非常规酵母;天然产物合成;细胞工厂;代谢工程;萜类化合物;黄酮类化合物;生物碱类化合物

中图分类号 Q939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2026)03-0001-18

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2026.03.001

Current Progress on the Synthesis of Natural Products by Using Non-conventional Yeast Cell Factories

ZHOU Yong-jin*, YANG Song*, GAO Jiao-qi

(*Division of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian* 116023)

基金项目:国家自然科学基金杰出青年基金项目(22425807);中央本级名贵中药资源可持续利用能力建设项目(2060302)

作者简介:周雍进 男,研究员,博士,博士生导师。研究方向为微生物合成生物学。Tel:0411-84771060,E-mail:zhouyongjin@dicp.ac.cn

* 通讯作者。周雍进。

杨松,女,博士后,博士。主要研究方向为微生物合成生物学。E-mail:Yangs095@dicp.ac.cn

收稿日期:2026-05-18

Abstract Plant natural products comprise a diverse array of secondary metabolites, including terpenoids, flavonoids, and alkaloids. Owing to their anticancer, anti inflammatory, and antioxidant activities, these compounds exhibit great potential in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. However, the extraction of plant natural products is hindered by resource scarcity, low extraction efficiency, and difficulties in product separation. Meanwhile, their complex molecular structures also impede total chemical synthesis. Consequently, the sustainable biosynthesis of target products using microbial cell factories has emerged as an economically viable alternative. In recent years, non conventional yeasts have gradually become promising and excellent hosts for microbial product synthesis due to their strong environmental tolerance and broad substrate utilization spectrum. This paper reviews the physiological characteristics of several common non-conventional yeasts, mainly including *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Ogataea polymorpha* and *Rhodosporidium toruloides*. It summarizes the engineering strategies and latest research advances in their biosynthesis of natural products, such as terpenoids, flavonoids and alkaloids. Finally, the challenges faced by non-conventional yeasts in the synthesis of natural products are discussed, and future research directions are prospected.

Keywords non-conventional yeast; natural product biosynthesis; cell factory; metabolic engineering; terpenoids; flavonoids; alkaloids

植物天然产物是关键的植物次生代谢产物，主要包含萜类、类黄酮、生物碱等化合物(图 1)。其凭借抗病、抗虫、抗氧化等多种生物活性，在食品、医药、化妆品等领域应用广泛，具有很高的经济价值与应用前景[1-3]。近年来，全球植物天然产物产业持续快速增长，预计 2025 年至 2030 年全球植物提取物市场规模将达 475 ~ 520 亿美元，年复合增长率为 8.5% ~ 12.4%[4]。然而，植物天然产物结构复杂，传统化学全合成难以高效实现；直接从植物中提取则面临原料有限、类似物多、分离纯化难度大、效率低、成本高等瓶颈[5]。合成生物学为此提供了革新路径，通过构建微生物细胞工厂，可实现植物天然产物从传统植物提取向现代生物制造的转型与升级。

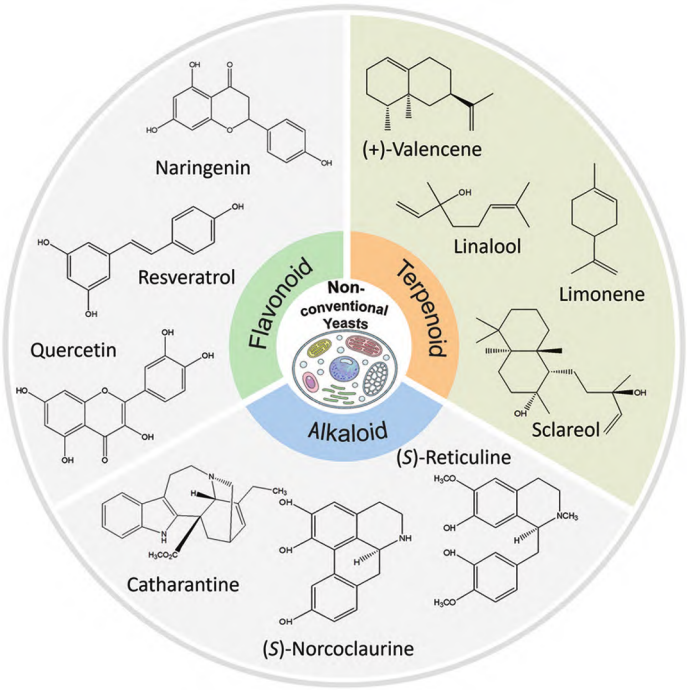


图 1 非常规酵母合成的相关天然产物

Fig. 1 Natural products synthesized by non-conventional yeasts

Flavonoid：黄酮类；Naringein：柚皮素；Resveratrol：白藜芦醇；Quercetin：槲皮素；Terpenoid：萜类；(+)-Valencene：(+)-瓦伦烯；Linalool：芳樟醇；Limonene：柠檬烯；Sclareol：香紫苏醇；Alkaloid：生物碱；(*S*)-Norcoclaurine：(*S*)-去甲乌药碱；(*S*)-Reticuline：(*S*)-牛心果碱；Catharantine：长春质碱；Non-conventional yeast：非常规酵母

1 天然产物的种类、用途及生物合成途径

1.1 萜类化合物

萜类化合物在自然界中分布广泛、种类丰富，目前已被鉴定出 80 000 种，是自然界最大的天然化合物之一[6]。萜类化合物几乎存在于所有种类的生物体中，在植物中尤其普遍。其由异戊二烯单元（C5）构成基本碳骨架，根据异戊二烯结构单元数量的不同，被分为单萜、倍半萜、二萜、三萜、四萜和多萜等[7]。其具备独特的理化性质与生物活性，可应用于食品、药品、保健品及化妆品等多个领域[8]。例如，人参皂苷用于缓解疲劳、改善记忆力和治疗心脑血管疾病[9]。青蒿中的青蒿素不仅是一种有效的抗疟疾药物，而且还具有抗癌和抗炎活性[10]。紫杉醇用于治疗卵巢癌和乳腺癌[11]。异戊烯基二磷酸（IPP）和二甲基烯丙基二磷酸（DMAPP）是萜类的基本结构单元，可通过细胞质甲羟戊酸（MVA）途径或质体甲基赤藓糖醇磷酸（MEP）途径合成[12]。其中 MVA 途径主要存在于动物、植物、真菌等生物中，该途径经 6 步酶促反应由乙酰辅酶 A 生成 IPP，羟甲基戊二酸辅酶 A 还原酶（Hmgr）为其限速酶，再由异戊烯基二磷酸异构酶（Idi）实现 IPP 与 DMAPP 的转化[13-14]。IPP 与 DMAPP 在不同合酶催化下可缩合形成各类萜类前体，如香叶基二磷酸（GPP）、法尼烷基二磷酸（FPP）、香叶基香叶二磷酸（GGPP）分别作为单萜、倍半萜、二萜的前体，三萜前体角鲨烯由两分子 FPP 缩合而成，而四萜和多萜的前体制备遵循类似的过程。这些前体最终在萜烯合酶（Tps）催化下形成多样的萜类化合物[15]。

1.2 黄酮类化合物

类黄酮是植物中一类关键的次生代谢产物，主要包含原花青素、鞣红、花青素、橙酮、异黄酮、黄酮、黄酮醇及黄烷醇等多个亚类，均由苯丙烷代谢通路衍生而来，并经由不同合成支路形成[16]。类黄酮在调控植物花色、吸引传粉昆虫与种子传播者、增强植物抗逆能力等方面均具有重要功能[17]。在医药保健领域，其具有抗氧化、抗炎、抗癌及抗骨质疏松、增强免疫等多重功效[18]。仅橙酮具有特殊的 C6-C2-C6 骨架结构，其余类黄酮均以 C6-C3-C6 为共同基本骨架，该骨架由两个芳香环（A 环、B 环）与一个含氧杂环（C 环）构成[16]。植物中，类黄酮的生物合成以苯丙氨酸途径产生的香豆酰-辅酶 A 为前体，在查尔酮合酶（CHS）、查尔酮异构酶（CHI）等酶的依次催化下生成柚皮素。在此基础上，依据中心 C 环的氧化程度、A 环与 B 环上羟基化及甲基化的修饰状态，再结合糖基化、酰基化以及聚合等后续修饰反应，最终形成结构丰富、种类繁多的类黄酮[19]。

1.3 生物碱类化合物

生物碱是自然界中广泛存在的含氮次生代谢产物，其结构复杂、生物活性多样。植物、细菌和真菌通过各自特有的生物合成途径产生这类化合物，它们通常以异环结构为核心，如喹啉、吲哚、托品烷等骨架[20]。生物碱具有抗癌、镇痛、止咳、降压、抗菌、抗炎及免疫抑制等多种生物活性。临床上已应用的相关药物包括镇痛药吗啡、可待因，止咳药海罂粟碱、诺司卡品，肌肉松弛剂罂粟碱以及用于治疗帕金森病的阿扑吗啡等[21]。生物碱的生物合成以酪氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等氨基酸或者萜类为起始前体，经多步生化反应生成吲哚、嘌呤、喹啉等关键中间体，再通过环合、裂解、重排、甲基化等多酶级联反应，逐步形成结构复杂多样的生物碱[22]。

目前，黄酮类、萜类以及生物碱类三大类典型天然产物均已在非常规酵母细胞工厂中实现合成，相关研究成果日趋丰富（图 1）。

2 常见的非常规酵母

酵母作为高效的细胞工厂，已在天然产物合成领域实现广泛应用。酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）与粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）凭借成熟的应用体系、清晰的基因组背景与完善的代谢调控机制，成为业界公认的模式酵母，而所有其他类型的酵母（约 1 500 种）都被认为是非常规酵母[23-24]。一些非常规酵母具有独特的特性，使其在工业应用中极具吸引力，进而成为燃料、化学品和药品生产的新潜在主力，包括对生物过程引起压力（如低 pH 值、高温和渗透压）的高耐受性、对抑制性有毒化合物的抗性，以及利用非常规原料和合成大量代谢物和蛋白质的能力[25]。非常规酵母代谢非常规底物（如木质纤维素水解物、废油和甲醇）的能力提供了巨大的工

业效益。这些基质通常来自低成本、可再生的资源,如农业残留物和基于二氧化碳的工业废物,进而支持更可持续和经济可行的生物制造过程[26-27]。

目前研究最为广泛的非常规酵母为解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*),其遗传背景相对清晰、基因编辑工具完备,因而更便于开展基因编辑与遗传操作。此外,解脂耶氏酵母具有高通量的三羧酸循环,可提供充足的乙酰辅酶 A 前体;较高的磷酸戊糖途径通量还能满足辅因子需求;其胞内丰富的脂滴能储存疏水性产物如萜类等,是优良的底盘菌株[28-29]。比较常见的非常规酵母除解脂耶氏酵母以外,还包括甲醇酵母如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和多形汉逊酵母(*Ogataea polymorpha*)等。这两种酵母可利用甲醇作为唯一碳源,而甲醇同化过程依赖木酮糖-5-磷酸(Xu5P)循环,进而使其磷酸戊糖途径(PPP)代谢效率显著提升,可提供更丰富的 PPP 中间产物与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH),从而有利于黄酮类等天然产物的生物合成[30]。这类酵母也是常用的工业外源蛋白表达宿主,具备更接近高等生物的蛋白翻译后修饰能力,利于外源酶高效表达[31]。此外,汉逊酵母可耐受 40 ℃以上的高温,能降低工业发酵过程中的冷却能耗[32-33]。除以上三种非常规酵母外,圆红冬孢酵母(*Rhodotorula toruloides*)拥有较宽的底物利用谱(包括单糖、低聚糖、有机酸和醇类等)和产物合成谱(包括油脂、有机酸、脂肪酸衍生物、萜类和其他有价值化合物等),表现出良好的鲁棒性,已成为高附加值化合物生物合成的理想底盘微生物[34]。其自身具备类胡萝卜素和脂质合成能力,在提升类胡萝卜素和单萜的合成水平、实现白藜芦醇等苯丙烷类产物的高效合成方面表现优异[35]。

3 非常规酵母合成萜类相关改造策略

目前,以解脂耶氏酵母、巴斯德毕赤酵母、多形汉逊酵母和圆红冬孢酵母为代表的非常规酵母已被广泛开发为天然产物工厂。其中萜类细胞工厂研究较广泛,涉及单萜、倍半萜、二萜、多萜等,并且部分产物的产量可观(表 1)。

表 1 非常规酵母合成萜类化合物

Table 1 Terpenoids biosynthesis by non-conventional yeasts

菌株	产物	产量	发酵条件	培养基	参考文献
解脂耶氏酵母	D-柠檬烯	91.24 mg/L	摇瓶补料	废食用油	[36]
(*Yarrowia lipolytica*)	L-柠檬烯	83.06 mg/L	摇瓶补料	废食用油	[36]
	芳樟醇	0.11 g/L	摇瓶	丰富培养基 + 蔗糖	[37]
	百里酚和香芹酚	0.061 g/L	5 L 发酵罐	丰富培养基 + 葡萄糖	[38]
	β-紫罗兰酮	4 g/L	2.5 L 发酵罐	厨余垃圾水解液	[39]
	α-法尼烯	25.6 g/L	1.5 L 发酵罐	YPD	[40]
	β-法尼烯	28.9 g/L	2 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖	[41]
	α-红没药烯	15.5 g/L	5 L 发酵罐	废食用油	[42]
	α-葎草烯	21.7 g/L	5 L 发酵罐	丰富培养基 + 葡萄糖	[43]
	β-榄香烯	3.08 g/L	摇瓶	YPD	[44]
	广藿香醇	2.86 g/L	5 L 发酵罐	YPD	[45]
	(+)-诺卡酮	0.978 mg/L	摇瓶	YPD	[46]
	紫穗槐二烯	0.17 g/L	摇瓶	YPD	[47]
	角鲨烯	4.53 g/L	2.4 L 发酵罐	YPD	[48]
	角鲨烯	51.2 g/L	5 L 发酵罐	YPD	[49]
	羽扇豆醇	0.41 g/L	摇瓶	YPD	[50]
	香紫苏醇	12.9 g/L	5 L 发酵罐	丰富培养基 + 葡萄糖	[51]
	番茄红素	4.2 g/L	3 L 发酵罐	丰富培养基 + 异戊烯醇	[52]
	番茄红素	17.6 g/L	3 L 发酵罐	丰富培养基 + 葡萄糖	[53]
	β-胡萝卜素	39.5 g/L	3 L 发酵罐	丰富培养基 + 葡萄糖	[53]
	β-胡萝卜素	6.5 g/L	5 L 发酵罐	YPD	[54]

续表 1

菌株	产物	产量	发酵条件	培养基	参考文献
	叶黄素	0.68 g/L	5 L 发酵罐	YPD	[55]
	虾青素	3.3 g/L	5 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖	[56]
巴斯德毕赤酵母	桧烯	6.38 g/L	3 L 发酵罐	基本培养基 + 甲醇	[57]
(*Pichia pastoris*)	荆芥醇	4.43 g/L	5 L 发酵罐	丰富培养基 + 甘油 + 葡萄糖	[58]
	β-法尼烯	0.34/0.24 g/L	摇瓶	基本培养基 + 甲醇/葡萄糖	[59]
	α-法尼烯	3.28 g/L	5 L 发酵罐	YNB 培养基 + 甲醇	[60]
	α-法尼烯	3.09 g/L	摇瓶	YPD	[61]
	α-红没药烯	1.1 g/L	摇瓶补料	基本培养基 + 甲醇	[62]
	吉马烯 A	1.9 g/L	1 L 发酵罐	YP2D	[63]
	α-檀香烯	21.5 g/L	1 L 发酵罐	YPD	[64]
	广藿香醇	2.47 g/L	5 L 发酵罐	基本培养基 + 甘油 + 甲醇	[65]
	(+)-诺卡酮	0.208 g/L	1 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖 + 甲醇	[66]
	角鲨烯	20.8 g/L	5 L 发酵罐	丰富培养基 + 甲醇	[67]
	达玛烯二醇-Ⅱ	0.736 mg/g DCW	摇瓶补料	丰富培养基 + 甲醇	[68]
	番茄红素	0.714 g/L	3 L 发酵罐	基本培养基 + 甘油	[69]
	番茄红素	7.24 g/L	5 L 发酵罐	基本培养基 + 甘油 + 甲醇	[70]
	β-胡萝卜素	0.339 mg/g	摇瓶	YPD	[71]
	ZealexinA1	0.103 g/L	5 L 发酵罐	基本培养基 + 甲醇	[72]
多形汉逊酵母	香叶醇	1.03 g/L	摇瓶补料	基本培养基 + 葡萄糖	[73]
(*Ogataea polymorpha*)	(+)-冰片	0.12 g/L	摇瓶补料	基本培养基 + 葡萄糖	[73]
	β-月桂烯	0.047 g/L	摇瓶补料	基本培养基 + 葡萄糖	[73]
	β-榄香烯	5.2 g/L	摇瓶补料	基本培养基 + 葡萄糖	[74]
	β-法尼烯	14.7 g/L	5 L 发酵罐	基本培养基 + 甲醇	[75]
	(+)-瓦伦烯	2 g/L	摇瓶补料	基本培养基 + 葡萄糖	[76]
圆红冬孢酵母	柠檬烯	0.39 g/L	摇瓶	YPD	[77]
(*Rhodotorula toruloides*)	柠檬烯	1.05 g/L	摇瓶	YPD	[78]
	芳樟醇	2.59 g/L	3 L 发酵罐	YPD	[79]
	桉叶油醇	1.4 g/L	2 L 发酵罐	木质纤维素水解液	[80]
	prespatane	1.17 g/L	2 L 发酵罐	杨树水解液	[81]
	红没药烯	7.76 g/L	0.25 L 发酵罐	丰富培养基 + 有机酸	[82]
	红没药烯	0.68 g/L	2 L 发酵罐	玉米秸秆水解液	[83]
	(E)-α-红没药烯	19.3 g/L	2 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖	[84]
	广藿香醇	1.31 g/L	3 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖	[85]
	贝壳杉烯	1.44 g/L	2 L 发酵罐	玉米秸秆水解液	[86]
	虾青素	0.93 mg/L	摇瓶	丰富培养基 + 葡萄糖	[87]

3.1 萜类合成代谢途径的构建和优化

3.1.1 萜类合酶的筛选 酵母通过 MVA 途径合成萜类,并且酵母内源不存在单萜合酶和倍半萜合酶等萜类合酶。因此通过引入其他物种来源,如植物的萜类合酶合成目标萜类化合物。而不同物种来源的萜类合酶催化效率不同,通过比较其在宿主中的产量,选择最优的萜类合酶进行后续目标萜类生产。如在多形汉逊酵母中,引入 4 个 β-法尼烯合酶基因,*AaFS*、*MpFS*、*CjFS* 和 *PmFS* 并与 *ERG20* 融合表达,其中来源于黄花蒿的 *AaFS* 产量最高[75]。β-胡萝卜素是虾青素生产的关键前体,*CrtW* 和 *CrtZ* 催化 β-胡萝卜素合成虾青素。在解脂耶氏酵母合成虾青素的研究中,研究人员在 9 种细菌和微藻中选择 8 种 *CrtW* 和 7 种 *CrtZ* 进行组合实验,筛选到 *PspCrtW* 和 *HpCrtZ*$^{\#}$整合菌株虾青素产量最高,用于后续改造[88]。

3.1.2 MVA 途径基因表达常规强化 对 MVA 途径基因的表达优化能增加萜类合成通量,也是最常规和有效的改造策略。巴斯德毕赤酵母中通过增加 3 个香叶醇合酶基因拷贝,以及过表达其

他内源 MVA 途径基因增加香叶醇产量[58]。通过增加单萜合成途径基因的表达,圆红冬孢酵母芳樟醇的产量增加上千倍[79]。*HMGR* 为 MVA 途径限速基因,因此通过整合多个拷贝增加其表达水平有助于促进萜类化合物积累。如前所述,解脂耶氏酵母广藿香醇合成中,整合 3 个 *HMGR*[45]。然而汉逊酵母中整合 2 个拷贝 *tHMGR* 菌株 XG15,香叶醇积累反而下降,这表明 MVA 通路基因的过度表达也可能导致代谢失衡[73]。因此使用不同强度启动子精确控制基因表达水平,优化代谢途径适配生长和产物合成。通过应用启动子工程精确调节细胞代谢,整合三个萜类合酶模块(Erg20 ~ Lsltc2 融合),在多形汉逊酵母中实现 β-榄香烯高效生产[89]。

3.1.3 MVA 途径基因融合表达 蛋白质融合是一种常见的策略,通过减少两种酶之间的空间接近距离,避免代谢物泄漏并加速中间体转移,将底物引导至目标产物。尤其在倍半萜合成过程,*ERG20* 与倍半萜合酶基因融合效果明显,并且融合蛋白之间的接头序列可能会影响产物合成[90]。巴斯德毕赤酵母合成吉马烯 A 过程,尝试使用四种不同的连接体 GGS、GGGGS、(PT)4P 和(PA)5 将 *ERG20* 与 *GAS* 融合。其中 GGS 和 GGGGS 是柔性连接体,(PT)4P 和(PA)5 代表刚性连接体,表达融合蛋白(*ERG20*-(PT)4P-*GAS*)的菌株达到了 76.6 mg/L 的最高滴度[63]。此外,融合蛋白的顺序不同也会影响产物产量。巴斯德毕赤酵母广藿香醇合酶基因 *PTS* 和 *ERG20* 以不同的顺序与三种不同的柔性连接体 GSG、GGGS 和 GSGGGGS 融合表达,发现 *ERG20-PTS* 融合效果明显优于 *PTS-ERG20*。进一步的蛋白质 3D 结构模拟揭示 *ERG20-PTS* 融合形式中 *ERG20* 和 *PTS* 的两个活性位点之间的距离比 *PTS-ERG20* 短,活性位点的更紧密排列可能会导致中间体 GPP 和 FPP 的局部浓度更高,从而提高广藿香醇的生物合成效率[65]。

3.2 前体和辅因子供应优化

3.2.1 前体供应优化 乙酰辅酶 A 作为细胞代谢的枢纽分子,也是萜类合成的前体,其供应水平直接影响萜类的合成和积累情况(图 2A、2B)[91]。磷酸酮醇酶(Pk)催化果糖 6-磷酸(F6P)为赤藓糖-4-磷酸(E4P)和乙酰磷酸(Ac-P),后者可被磷酸转乙酰化酶(Pta)转化为乙酰辅酶 A。在多形汉逊酵母中,通过引入肠膜明串珠菌的 *PK* 和克鲁维氏梭菌的 *PTA*(PK-PTA 途径)增强乙酰辅酶 A 的供应,显著提高 β-榄香烯滴度[74]。此外,解脂耶氏酵母中油脂丰富,通过过表达 *POT1* 强化脂肪酸 β-氧化过程,促进酰基辅酶 A 分解生成乙酰辅酶 A,并且显著上调 β-榄香烯的合成。来自肠沙门氏菌(*Salmonella enterica*)的乙酰辅酶 A 合成酶 $SeACS^{L641P}$ 催化乙酸转化为乙酰辅酶 A,也显著促进了 β-榄香烯产量增加[44]。同样,在解脂耶氏酵母中过表达 *POT1* 也显著增加了(-)-α-红没药醇的产量[92]。为了加强圆红冬孢酵母中的柠檬烯合成,Gao 等[78]将内源 ATP 依赖性柠檬酸裂解酶基因 *RtACL* 和链霉菌的乙酰乙酰辅酶 A 合酶 *NphT7* 靶向到过氧化物酶体内,获得工程菌株的柠檬烯产量增加 1.7 倍。萜类合成的 MVA 途径依赖多种辅因子及中心碳代谢前体以合成 IPP,易与其他细胞过程竞争资源,内源性基因与异源通路的过表达受宿主固有调控网络及代谢竞争影响。单纯过表达内源 MVA 途径基因仅能有限提升产量,难以突破其内在调控限制,导致途径通量改造难度较大。因此,研究人员通过引入胆碱激酶(Ck)和异戊烯磷酸激酶(Ipk)构建异戊醇利用途径(IUP),该途径直接从异戊烯醇或异戊二烯醇产生异戊二烯前体 IPP 和 DMAPP。其途径短,并将萜类生物合成与中央碳代谢解耦[93]。Ma 等[53]将 IUP 途径引入解脂耶氏酵母,使其能够使用异戊二醇作为底物产生 IPP 和 DMAPP,从而使 β-胡萝卜素产量增加 23%。Liu 等[94]将拟南芥的 *IPK* 与酿酒酵母的 *CK* 基因靶向到巴斯德毕赤酵母过氧化物酶体中,成功构建 IUP 途径,工程菌株的 IPP 和 DMAPP 胞内水平增加了 7.8 倍,α-法尼烯产量增加了 2.5 倍。

3.2.2 辅因子工程策略 除合成前体外,萜类生物合成需要足够量的辅因子 NADPH 作为驱动力。Ye 等[74]通过过表达果糖-1,6-二磷酸酶(*FBP1*)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*ZWF1*)和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(*GND1*)来增强 PPP,多形汉逊酵母 β-榄香烯产量增加了 21%。相似地,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*NAGPD*)和 *GND1* 的联合过表达显著促进了圆红冬孢酵母广藿香醇合成,使其增加

606.8%。而过表达 *ZWF1* 后,工程菌株的广藿香醇产量下降[85]。通过合理修饰巴斯德毕赤酵母中的 NADPH 和 ATP 再生途径,也实现 α-法尼烯高效生产。通过过表达 *ZWF1* 和 6-葡萄糖酸内酯酶(*SOL3*)改善 NADPH 供应,腺嘌呤磷酸核糖转移酶(*APRT*)的过表达和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)依赖性二羟丙酮磷酸还原酶(*GPD1*)的敲除增加了 ATP,最终菌株在摇瓶发酵中产生(3.09 ±0.37) g/L 的 α-法尼烯[61]。同样的,过表达 NADH 激酶(*POS5*)和 *ZWF* 强化巴斯德毕赤酵母细胞内 NADPH 供应,促进了番茄红素的生物合成,并且发现其 *POS5* 的过表达比 *ZWF* 更有效[70]。萜类合成需要大量的 NADPH,特别是当 P450 酶参与氧化反应时,NADPH 需求量更高。Niu 等[72]通过过表达基因 *FBP1* 强化磷酸戊糖途径,提升 NADPH 供应,巴斯德毕赤酵母合成的玉米抗毒素 A1 产量增加 2 倍。虽然一些改造策略在不同底盘菌株效果类似,但是仍然存在差异,只有实现菌株与改造途径的精准适配,才能真正提升合成效率。

3.3 亚细胞区室化策略

亚细胞区室化已成为解决胞质内代谢流竞争、底物毒性及反应环境不佳等问题的核心手段。利用线粒体和过氧化物酶体中充足的乙酰辅酶 A 有助于提升萜类化合物的产量[95-96]。多形汉逊酵母由于其丰富的过氧化物酶体,也被视为过氧化物酶类研究的模式生物。Xie 等[73]将过氧化物酶体改造成细胞器工厂,随着前体 GPP 供应的增加,过氧化物酶体高效生产了各种单萜,包括香叶醇(1 030 mg/L)、β-月桂烯(47 mg/L)和(+)-冰片(120 mg/L)。Gao 等[78]对圆红冬孢酵母过氧化物酶体靶向信号(PTS1/PTS2)进行了表征,并将柠檬烯生物合成途径靶向过氧化物酶体,在细胞质和过氧化物酶体中进行双重代谢调节后,柠檬烯滴度进一步提高到 1.05 g/L。Gao 等通过优化甲羟戊酸途径和过氧化物酶体区室化,对巴斯德毕赤酵母进行了工程改造,使其高效生产倍半萜 α-红没药烯,并通过蛋白质组学分析确定了过氧化物酶体靶向途径的关键瓶颈,过表达限制酶 *EfmvaE* 显著提高了过氧化物酶途径的α-红没药烯产量。优化过氧化物酶体途径的工程菌株α-红没药烯产量比细胞质途径提高了 69%[62]。

为了减轻中间体积累,Zhu 等[97]将二酰基甘油酰基转移酶基因(*ScDGAT2-1*)靶向解脂耶氏酵母脂滴,使虾青素生物合成与酯化在空间上解耦,将虾青素的比例提高到总类胡萝卜素的 64%。各类中间体积累量均下降 10% ~40%,脂滴定位提高了底物通道效率,减轻了中间产物反馈抑制。

细胞核作为真核细胞遗传信息的储存与转录调控中心,拥有独立的膜结构、丰富的乙酰辅酶 A 储备以及维持有丝分裂期间核膜完整性的独特能力。最近,细胞核的区室化策略也被应用到酿酒酵母和巴斯德毕赤酵母单萜细胞工厂。Wang 等[98]将所有途径酶编码基因融合细胞核定位信号(NLS)整合到巴斯德毕赤酵母基因组中,成功生产 23.28 mg/L 的(R)-(+)-柠檬烯,而不影响最终生物量。

3.4 全局调控因子改造

部分转录因子可同时调控多个基因的表达,高效调控萜类产物合成。目前,在模式微生物酿酒酵母中有部分研究,但在非常规酵母中有效的相关靶点报道较少。酵母中的固醇调节元件结合蛋白 SREBP(Sre)是甾醇合成途径的保守转录调节因子,Zhang 等[70]在巴斯德毕赤酵母中过表达内源 *SRE* 基因,促进了番茄红素合成。有些看似无关的基因可能对某些途径产生显著影响,这些参与的代谢途径与细胞代谢的其余部分高度互连并受到严格调控[99]。中科院大连化学物理研究所合成微生物学研究组(本课题组)前期通过加权共表达网络分析(WGCNA)挖掘得到两个多形汉逊酵母中萜类生物合成的相关调控基因,为磷酸盐转运调控基因(*NUC-2*)和染色质重塑亚基(*RSC9*)。这两个基因通过加速糖酵解来增加乙酰辅酶 A 的供应,从而增加萜类合成的 MVA 途径通量和生物量。此外,这两个基因增强了高温和氧化胁迫下工程菌株代谢的鲁棒性,从而增加细胞活力,进一步促进了萜类合成,(+)-瓦伦烯和(+)-冰片的产量均增加[76]。

4 非常规酵母合成黄酮类相关研究

目前以非常规酵母为底盘合成黄酮类化合物的研究也取得丰硕进展,其中柚皮素和白藜芦醇等产物的研究较为深入(表 2)。

表 2 非常规酵母合成黄酮类化合物

Table 2 Flavonoids biosynthesis by non-conventional yeasts

菌株	产物	产量	发酵条件	培养基	参考文献
解脂耶氏酵母	柚皮素	0.72 g/L	摇瓶	YPD + 木糖	[100]
	柚皮素	8.3 g/L	5 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖	[101]
	白藜芦醇	22.5 g/L	5 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖	[102]
	二氢槲皮素	4.2 g/L	5 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖	[103]
	槲皮素	0.28 g/L	摇瓶补料	YPD	[104]
	山柰酚	0.19 g/L	摇瓶补料	YPD	[104]
	芹菜素	0.64 g/L	摇瓶	YPD	[105]
	金合欢素	1.1 g/L	摇瓶补料	YPD	[105]
	淫羊藿素	0.25 g/L	摇瓶	YPD	[106]
	樱花素	0.69 g/L	摇瓶	YPD	[107]
	葛根素	0.48 g/L	5 L 发酵罐	YPD	[108]
	灯盏乙素	0.703 g/L	摇瓶	YPD	[109]
	虎杖甙	6.88 g/L	摇瓶	YPD	[110]
	甘草素	0.062 g/L	摇瓶	基本培养基 + 葡萄糖	[111]
	(2S)-橙皮素	0.18 g/L	5 L 发酵罐	YPD	[112]
巴斯德毕赤酵母	柚皮素	1.07 g/L	0.25 L 发酵罐	丰富培养基 + 甘油	[113]
	白藜芦醇	1.83 g/L	0.25 L 发酵罐	丰富培养基 + 甘油	[113]
	2″-氧-牡荆素半乳糖苷	26.9 g/L	3 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖 + 乙醇	[114]
	2″-氧-荭草素半乳糖苷	26.4 g/L	3 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖 + 乙醇	[114]
	牡荆素	8.5 g/L	3 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖 + 乙醇	[114]
	荭草素	12.1 g/L	3 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖 + 乙醇	[114]
	黄芩素	0.40 g/L	摇瓶	丰富培养基 + 葡萄糖 + 乙醇	[115]
	千层纸素 A	0.34 g/L	摇瓶	丰富培养基 + 葡萄糖 + 乙醇	[115]
	黄芩苷	1.29 g/L	3 L 发酵罐	基本培养基 + 葡萄糖 + 乙醇	[116]
	3-羟基染料木素	0.023 g/L	摇瓶	YPD	[117]
多形汉逊酵母	龙胆苦苷	8.41 mg/g	摇瓶	YPD	[118]
	白藜芦醇	97.2 mg/L	摇瓶	YPD + 酪氨酸	[119]
圆红冬孢酵母	柚皮素	0.038 mg/L	摇瓶	丰富培养基 + 半乳糖 + 酪氨酸	[120]
	白藜芦醇	125.2 mg/L	摇瓶	YPD	[121]
	大豆苷元	6.92 mg/L	摇瓶	丰富培养基 + 葡萄糖 + 木糖	[122]
	染料木素	3.55 mg/L	摇瓶	丰富培养基 + 葡萄糖 + 木糖	[122]

4.1 黄酮类化合物的前体供应优化

对香豆酸为类黄酮化合物合成直接前体,其生物合成主要有两条路径:L-苯丙氨酸(L-Phe)经脱氨与羟化生成,或 L-酪氨酸(L-Tyr)在酪氨酸解氨酶(TAL)催化下直接合成。由于苯丙氨酸途径中的 4-肉桂酸羟化酶(C4H)在异源宿主中表达与活性较弱,严重限制了合成效率,因此以酪氨酸为前体的途径成为研究主流(图 2C、2D)。L-Tyr 主要来源于莽草酸(SA)途径,合成前体来自于中心碳代谢的磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和赤藓糖醇-4-磷酸(E4P)。L-Tyr 合成途径受多重反馈调控限制,需通过解除相关抑制以实现高效过量积累。Park 等[105]通过过表达对 L-Tyr 反馈抑制不敏感的 3-脱氧-D-阿拉伯庚糖酸-7-磷酸合酶(*Aro4*^{K221L})和分支酸变位酶(*Aro7*^{G139S})以及 *Aro2* 增加解脂耶氏酵母 L-Tyr 含量,同时过表达转酮醇酶 1(*TKL1*)提高 E4P 含量,促进从头生物合成芹菜素和金合欢素。类似地,*ARO4*^{K229L}和 *ARO7*^{G141S}的过表达提高了巴斯德毕赤酵母中的 L-Tyr 滴度,白藜芦醇、柚皮素的滴度分别提高了 258% 和 244%[113]。解脂耶氏酵母中 E4P 的有效碳通量比 PEP 低至少一个数量级。重新连接酵母中的中心碳代谢可以有效提供 E4P,并引导更多的流量进入氨基酸生物合

成途径。PK-PTA 的引入不仅能增加芳香族化合物 E4P,还增加了前体乙酰辅酶 A 的供应,后者可转化为丙二酰辅酶 A,从而提供了足够合成前体。Shang 等[110]在解脂耶氏酵母虎杖苷细胞工厂中引入 PK-PTA 途径使虎杖苷前体白藜芦醇的产量增加 21.8%。

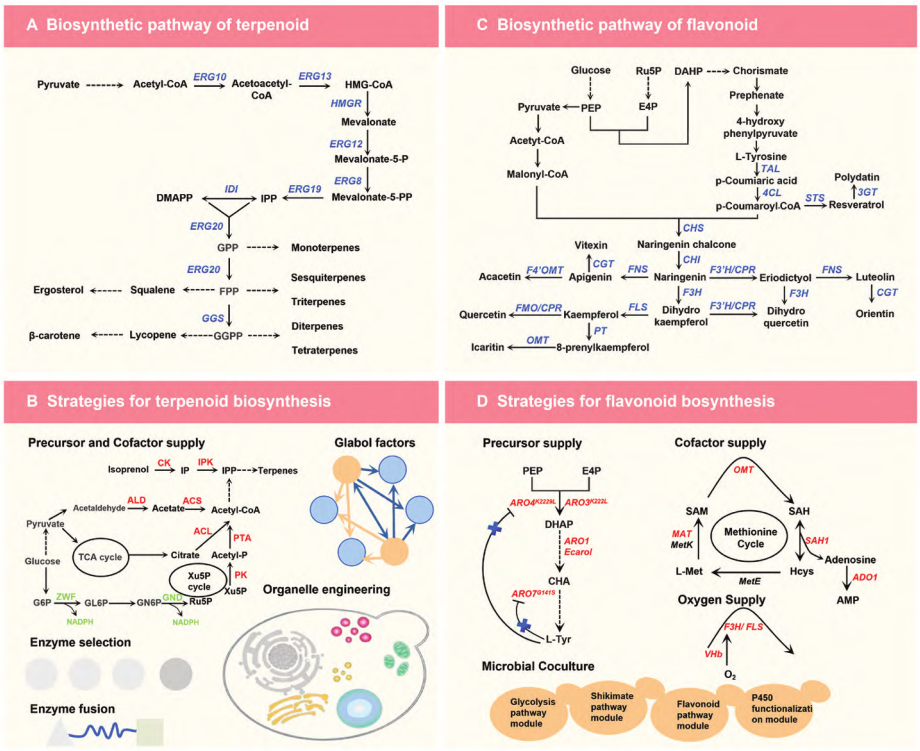


图 2 非常规酵母合成萜类和类黄酮的改造策略

Fig. 2 Metabolic engineering strategies for terpenoid and flavonoid production by non-conventional yeasts

A:萜类合成途径;B:非常规酵母合成萜类改造策略;C:黄酮类化合物合成途径;D:非常规酵母合成黄酮类化合物改造策略

A:Biosynthesis pathway of terpenoid;B:Metabolic engineering strategies for terpenoid by non-conventional yeasts;C:Biosynthesis pathway of flavonoid;D:Metabolic engineering strategies for flavonoid production by non-conventional yeasts

4.2 黄酮类化合物的辅因子供应及摄氧能力优化

4.2.1 辅因子供应优化 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)是多种甲基化反应中的甲基供体,因此增强 SAM 供应是提高甲基化产物产量的有效策略。提高 SAM 合成主要有两种途径,一是过表达参与甲硫氨酸循环的酶,二是增加甲硫氨酸前体的供应。关于甲硫氨酸循环,增强甲硫氨酸腺苷转移酶(Mat)的表达是增加 SAM 供应的主要策略。此外,SAM 在甲基捐赠后被代谢为 S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)。SAH 积累可能导致负反馈抑制,降低甲基转移酶活性进而限制产物的合成。S-腺苷同型半胱氨酸水解酶(Sah1)催化 SAH 水解为同型半胱氨酸和腺苷,而腺苷激酶(Ado1)进一步将腺苷代谢为 AMP,从而驱动 SAH 的水解过程。过表达 *ADO1* 和 *SAH1* 解除了对甲氧基转移酶(*OMT*)的抑制,使解脂耶氏酵母淫羊藿素产量提高了 25%[106]。类似地,Xu 等[107]过表达 *MAT* 与 *SAH1* 使樱花素的产量提高了 48.58%。同样,NADPH 是类黄酮合成的关键辅因子,它为细胞色素 P450 等酶提供了还原能力。黄烷酮-6-羟化酶(F6H)催化的反应需要两个分子的 NADPH 提供还原力,增强 NADPH 再生通常有助于提高 P450 酶介导的产物合成的产量。Zhang 等[109]通过增强 *ZWF1* 和 *GND1* 的表达促进解脂耶氏酵母 NADPH 再生,并增加灯盏乙素产量。Qian 等[114]在巴斯德毕赤酵母细胞工厂中过表达酿酒酵母的 *ScZWF1* 和 *ScGND1* 促进了 NADPH 的产生,并有效地促进了 2″-O-半乳糖基牡荆素和 2″-O-荭草素的合成。

4.2.2 摄氧能力优化 黄酮类化合物合成途径

涉及很多加氧酶,其在反应过程中需要消耗氧分子,提高工程菌株的摄氧能力有利于改善有氧反应和细胞生长效率[123]。透明颤菌血红蛋白(VHb)是一种特殊形式的血红蛋白,可以提高菌株在缺氧条件下的摄氧能力,促进细胞生长并促进产物形成[124]。He 等[103]将 VHb 引入解脂耶氏酵母,从而将二氢槲皮素(DHQ)的滴度提高,发酵过程中氧气的可用性对黄烷酮三羟化酶(F3H)的催化活性至关重要,VHb 的过表达是提高吸氧能力和加速 DHQ 积累的有效策略。SbF6H 是一种需要氧分子参与反应的 P450 酶,其参与催化灯盏乙素合成的倒数第二步。同样 VHb 的引入也增加了解脂耶氏酵母灯盏乙素的产量[109]。

4.3 黄酮类化合物的合成途径关键酶的筛选与优化

4.3.1 *关键酶筛选* 甲基转移酶是甲基化黄酮类化合物,如(2S)-橙皮素生物合成的关键酶。(2S)-橙皮素由柚皮素经羟基化和甲基化两步反应生成。现有的黄酮 4′-O-甲基转移酶(F4′omt)通常表现出较低的底物特异性和催化效率。Wang 等[112]从网纹柑橘(CZG 和 HZY)中筛选并鉴定了两种新的 *F4′OMT-CrcOMT-2* 和 *CgtOMT-3*,它们对其底物圣草酚显出高度的特异性,工程菌株实现了从头合成(2S)-橙皮素(130.2 mg/L)。L-苯丙氨酸/L-酪氨酸可在 5 个基因(*PAL*、*4CL*、*CHS*、*CHR* 和 *CHI*)连续催化下被转化为甘草素。Akram 等[111]在解脂耶氏酵母中评估并筛选了多种植物来源的 25 个基因(5 个 *PALs*、5 个 *4CLs*、7 个 *CHSs*、3 个 *CHRs* 和 5 个 *CHIs*),发现 5 个基因 *ZmPAL*、*Pc4CL*、*PhCHS*、*MsCHR* 和 *MsCHI* 最适合甘草素的生产。Liu 等[102]将三种植物来源的 *TAL* 和两种 *4CL* 与葡萄的白藜芦醇合酶基因(*VvSTS*)组合表达,其中 *FjTAL*、*Pc4CL1* 和 *VvSTS* 的组合在解脂耶氏酵母中获得了最佳的白藜芦醇滴度。Qian 等[114]将不同来源的 7 种氨裂解酶整合到巴斯德毕赤酵母菌株中,*FjTAL* 因其高特异性和最高的 *p*-香豆酸产量而被选择用来合成莰草素和牡荆素。

4.3.2 *酶融合和模块化酶组装策略* 酶融合能有效减少不稳定中间产物的潜在损耗,从而提高产物合成效率,因此在黄酮类化合物生产中也是常用策略。Liu 等采用 *Pc4CL1* 与 *VvSTS* 的融合蛋白策略提高解脂耶氏酵母白藜芦醇产量。在刚性连接肽(TPTP、TPTPx2、EAAAK、EAAAKx2)或柔性连接肽(GGGGS、GGGGSx2、GSG、GSGx2)的介导下,将 *VvSTS* 融合至 *Pc4CL1* 的 C 末端。部分连接肽能有效提升白藜芦醇产量,其中表达 E3AK 融合蛋白的菌株白藜芦醇产量最高[102]。两酶催化中心之间的相互作用高度依赖于二者间距。刚性连接肽既能完全隔离融合酶并保持其独立功能,又因使活性位点相互靠近而提升了双酶间的催化效率。Dong 等[104]将多拷贝融合酶表达模块 F3H-(GGGGGGS)2-FLS 整合到解脂耶氏酵母基因组中,并使用优化的接头(GGGGGS)2 增强柚皮素生产山奈酚。在解脂耶氏酵母中,*CHS* 与 *CHR* 的融合有效地将甘草素产量提高了 75%[111]。巴斯德毕赤酵母 4′-脱氧黄酮合成途径被分为五个途径模块。使用合成转录装置微调整个途径,大大减少副产物积累,实现黄芩素和千层纸素 A 高水平生产[115]。

4.3.3 *启动子工程* 启动子对酶催化效率具有重要影响,在代谢途径工程中合理选择和优化启动子有助于产物高效合成。在解脂耶氏酵母槲皮素细胞工厂,Dong 等[104]使用不同的启动子(*p*EXP、*p*hp4d 和 *p*FBAin)分别控制 *FMOCPR* 的表达,其中 *p*FBAin 表现最优,槲皮素的滴度达到(85.31±3.25) mg/L。Akram 等[111]通过启动子工程精确操纵甘草素和柚皮素的比例构建了两株菌,分别产生 62.4 mg/L 的甘草素和 171 mg/L 的柚皮素。Qian 等[108]通过替换不同强启动子优化了细胞色素 P450 酶 *HIS* 及其氧化还原伴侣 *CPR* 的表达,获得 9 种组合菌,使异黄酮大豆苷元滴度提升至 86 mg/L。

4.4 微生物共培养技术生产黄酮类化合物

传统微生物代谢工程多采用单一菌株纯培养体系制备化学品,需兼顾该菌株对合成路径各环节的适配性。然而,合成过程各步骤所需的底物、辅助因子往往存在差异,单一菌株难以兼顾;且当生物合成途径趋于冗长、复杂时,菌株的代谢负荷会显著加剧。为提升生物合成效率,共培养策略得以提出并应用[125]。Kang 等在巴斯德毕赤酵母菌株中使用模块化的“即插即用”策略,开发了一种与黄芩素生产酵母和将黄芩素转化为黄芩苷的酵母共培养系统。将上游黄酮合成模块细胞与下

游糖苷转化模块细胞共培养,减轻了 4′-脱氧黄酮的毒性,并实现了 4′-脱氧黄酮苷(黄芩苷)的高水平从头合成。黄芩苷在生物反应器中滴度达到 1 290 mg/ L[116] 微生物共培养通过多菌株协同提供酶系、辅因子等适宜环境,可有效降低代谢负担,高效合成目标产物,在黄酮类化合物以及其他复杂天然产物合成体系优化中具有良好的应用前景。

5 非常规酵母合成生物碱相关研究进展

生物碱因具备多样且重要的生理活性,已成为微生物合成领域极具研究价值的目标分子。随着生物碱的天然生物合成途径的逐步解析以及各类酶学元件不断被发掘,微生物细胞工厂合成生物碱已被陆续报道。然而目前生物碱细胞工厂主要使用大肠埃希菌和酿酒酵母等模式微生物作为宿主,在非常规酵母中涉及较少,巴斯德毕赤酵母几种生物碱的合成情况见表 3。

5.1 单萜吲哚生物碱(MIA)

长春质碱是一种单萜吲哚生物碱,其与文多灵可合成临床应用最为有效的抗癌药物长春碱,因此备受关注。Gao 等建立了巴斯德毕赤酵母作为从头生物合成长春碱单体长春质碱的底盘。作者团队首先通过全基因组分析稳定的整合位点,用于构建和稳定维护多基因生物合成途径。然后,以模块化的方式整合和优化了完整的长春质碱生物合成途径。长春质碱以单萜香叶醇为骨架,生物合成途径经过荆芥醇和异胡豆苷等中间代谢物,共涉及 25 个以上的异源基因,被分为三个功能模块。①CAN 模块:从异胡豆苷到长春质碱;②STR 模块:从荆芥醇到异胡豆苷;③NPT 模块:从碳源到荆芥醇(图 3A)。最后,通过组合代谢途径工程改进了长春质碱的生产,包括基因拷贝数增加以消除长春质碱代谢通量的瓶颈,选择具有高活性和/或特异性的合适植物酶,信号肽工程用于关键途径酶的正确定位,蛋白质融合表达以促进底物运输和去除竞争代谢途径,从而实现了巴斯德毕赤酵母长春质碱的从头生物合成,其滴度高达 2.57 mg/L,这也代表了在非模式微生物中合成的最复杂异源分子[126]。

5.2 苄基异喹啉生物碱(BIA)

BIA 是一类具有重要研究和药用价值的次生代谢产物,主要包含七大类,表 3 中的去甲乌药碱和牛心果碱属于 BIA 共性合成途径的中间代谢物,(*S*)-刺罂粟碱属于原小檗碱和小檗碱类。其源自 L-酪氨酸骨架,经由多巴胺或 4-羟基-苯乙醛生成去甲乌药碱,再经过 3 步甲基化及 1 步羟基化反应生成牛心果碱。牛心果碱经过 3 步反应生成(*S*)-刺罂粟碱(图 3B)。Kumokita 等在巴斯德毕赤酵母中通过过表达 *Aro4*^{K229L} 和 *Aro7*^{G141S} 提高了巴斯德毕赤酵母中甘油的 L-酪氨酸滴度。通过引入 *BvCYP*$^{W13L,\ F309L}$、*PpDODC* 和 *ΔN-CjNCS*,摇瓶中去甲乌药碱滴度达到 9.7 mg/L。最后将罂粟的 3 个甲基转移酶基因 *Ps6OMT*、*PsCNMT*、*Ps4OMT* 和花菱草的 *EcNMCH* 引入到上述去甲乌药碱合成菌株中,该菌株产生的牛心果碱滴度为 0.29 mg/L[113]。

Urui 等建立了大肠埃希菌和巴斯德毕赤酵母的共培养系统,以生产(*S*)-刺罂粟碱。通过向上游菌株大肠埃希菌中引入了四个携带 14 个基因的载体,产生 BIA 的重要中间体,以生产(*S*)-牛心果碱。在下游巴斯德毕赤酵母中引入花菱草的 *BBE*、*CYP719A5* 和 *CYP719A2* 三个基因,生成(*S*)-刺罂粟碱。工程大肠埃希菌和巴斯德毕赤酵母的共培养系统成功用于从头合成生物碱类化合物。共培养系统有助于增加复杂植物天然产物的异源生物合成产量[127-128]。

表 3 巴斯德毕赤酵母合成生物碱类化合物

Table 3 Alkaloids biosynthesis by *Pichia pastoris*

产物	产量/(mg·L^{-1})	发酵条件	培养基	参考文献
长春质碱(catharanthine)	2.57	1 L 发酵罐	丰富培养基 + 甲醇 + 甘露醇	[126]
	0.62	1 L 发酵罐	丰富培养基 + 甲醇	[126]
去甲乌药碱(Norcoclaurine)	9.70	0.25 L 发酵罐	丰富培养基 + 甘油	[113]
牛心果碱(Reticuline)	0.29	0.25 L 发酵罐	丰富培养基 + 甘油	[113]
(*S*)-刺罂粟碱[(*S*)-stylopine](与大肠埃希菌共培养)	0.78	摇瓶补料	丰富培养基 + 甲醇 + 甘油	[127-128]

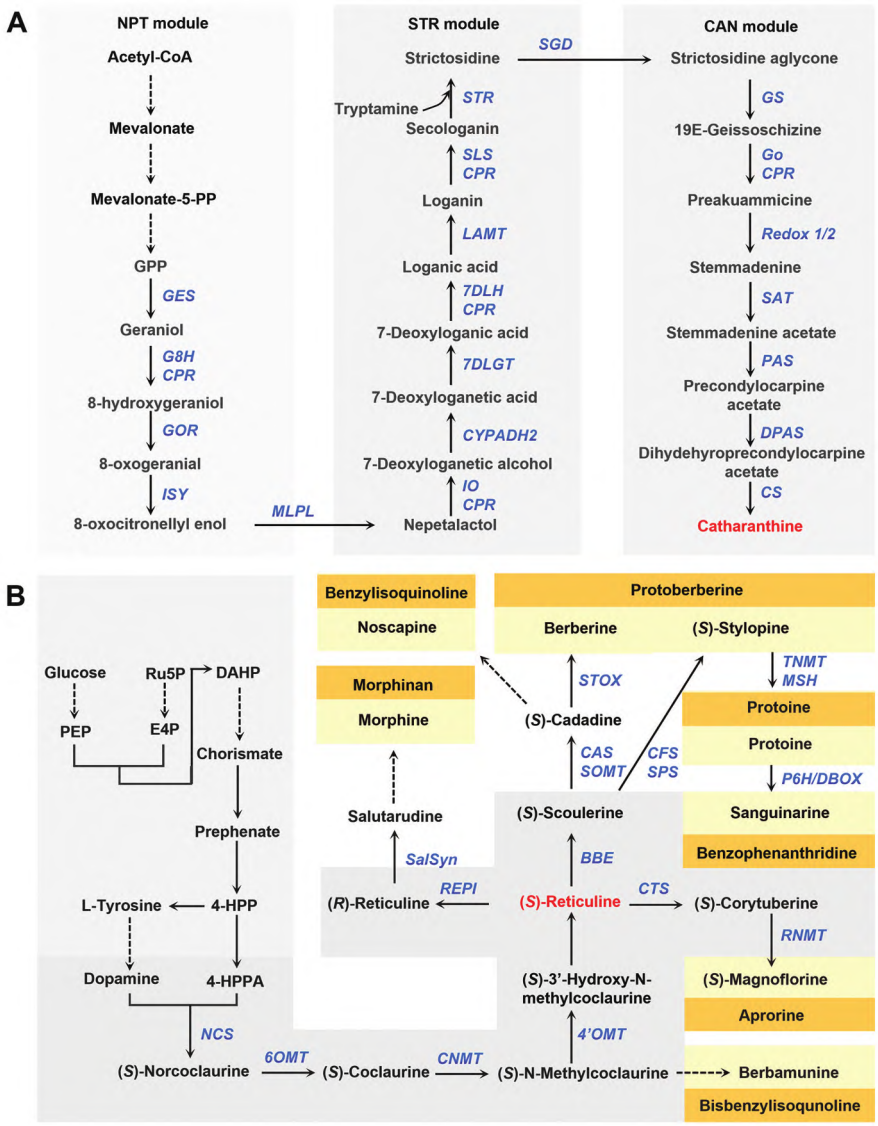


图 3　非常规酵母合成生物碱代谢途径

Fig. 3　Biosynthetic pathways of alkaloids in non-conventional yeasts

A：巴斯德毕赤酵母 MIA（长春质碱）合成途径；B：七类 BIAs 生物合成途径

A: Biosynthetic pathway of MIA (catharanthine) in *Pichia pastoris*; B: Biosynthetic pathways of seven types of BIAs

6　展　望

非常规酵母因其独特的生理特性，已广泛应用于多种化合物的工业化生产。甲基营养型酵母独特的甲醇利用能力、产油酵母的废弃碳源利用特性以及其强大的环境耐受性，使其成为许多不同工业生物过程的理想宿主[129-130]。随着微生物工程技术的快速发展，如 CRISPR 技术的应用、基因组测序速度的提升，以及新型微生物的分离与注释不断加快，如今对这些非常规微生物进行设计、进而扩展产物谱并提高产量已变得更为简便。然而，相较于模式微生物，非常规酵母合成的产物在种类与产量上仍存在较大差距，基因编辑工具、基因表达元件及基础代谢机制研究的不足是其中一方面原因。

尽管 CRISPR/Cas9 基因组工程工具已在一些非常规酵母中建立，但其效率仍需提高[131-132]。解脂耶氏酵母中开发了两种多拷贝集成工具 Yal-

iCMulti 和 YaliHMulti[101]。然而,用于同时编辑多个靶标的工具和用于微调或扰动非常规酵母中靶基因的特定工具仍然有限。需要开发合成生物学工具箱,包括新的启动子元件、高效的 DNA 组装方法和多基因的染色体整合策略。此外,非常规酵母表现出不同的特征和不同的染色体数目。尽管已经对几种非常规酵母的基因组进行了测序,但关于基因组信息与细胞功能之间的关系,目前可用的信息有限。对未知通路和功能酶的解析大多依赖酿酒酵母的研究基础,这会阻碍对非常规酵母代谢机制的认知,限制其在天然产物合成调控的应用。需要完善基因组信息与细胞功能之间的关联机制,解析基因序列、调控网络与表型性状的对应关系,为非常规酵母的理性设计、全局代谢优化与高效合成应用提供理论依据,从而实现天然产物的高效合成。

天然产物的微生物合成过程离不开对合成途径的深度解析和改造,而关键酶则是实现体系优化的重要支点。天然产物合成途径中普遍存在的酶活性低、底物选择性差等问题,常导致代谢流失衡、产率不理想,这仍是当前亟待攻克的技术瓶颈。传统的酶改造与设计主要依靠定向进化和理性设计,既存在序列空间呈指数级扩张导致的探索盲区,也难以实现多目标属性(酶活性、热稳定性和底物选择性)的协同优化。近年来,随着人工智能(artificial intelligence, AI)技术的飞速发展,其在酶工程尤其是酶分子定向进化中发挥着关键作用。机器学习与深度学习算法已应用于酶的设计与优化,提升了酶分子改造的效率与精准度[133-134]。此外,机器学习在预测代谢工程靶点方面也有重大突破,酶约束模型预测的基因工程靶点提升了酿酒酵母 103 种高价值化学品产量[135]。在 AI 先进算法的持续驱动下,酶改造与设计在天然产物合成领域蕴藏着极为广阔的发展潜力。未来 AI 辅助酶工程的研究将被广泛应用于天然产物合成途径,通过研发高效算法、搭建完整数据库以及增强模型泛化能力,精准改造酶功能,进而推动天然产物的高效合成。

一些复杂天然产物如长春花碱、紫杉醇和龙胆苦苷等天然存在于多个亚细胞区室(如线粒体、过氧化物酶体、内质网、脂滴和液泡)中[136]。酵母具有复杂的细胞器系统,过氧化物酶体、脂滴、线粒体等结构发达且代谢功能分化明显,可为外源代谢途径提供多样化的天然区室骨架。过氧化物酶体应用相对较多,其功能容量(能够定位于该细胞器内的活性蛋白数量)是影响复杂异源代谢途径区室化可行性的关键因素。非常规酵母的底物谱广,一些非糖碳源会刺激过氧化物酶体增殖与重塑,导致其大小和数量显著增加,可富集疏水性前体与中间产物,降低胞质毒性,适合作为乙酰辅酶 A 衍生的高价值化合物的合成区室[137,31]。此外,产油酵母解脂耶氏酵母具有以脂滴形式积累大量细胞内脂质的独特能力,将代谢途径靶向至能高效发挥生物合成功能的亚细胞区室——脂滴、内质网和过氧化物酶体,利于亲脂性代谢物高效合成[138, 97]。尽管细胞器工程具有这些优势,其在非常规酵母中的全部潜力在很大程度上尚未被发掘。未来的研究中,细胞器膜通透性、代谢物转运规则、细胞器内辅因子的可用性等方面可被进一步优化以促进非常规酵母细胞器工程的发展。

参考文献:

[1] Peter H Winegar, Maria CT Astolfi, Sara F Holm, et al. Advances in the microbial biosynthesis of therapeutic terpenoids [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2025, 96: 103374.

[2] Qin KZ, Liu F, Zhang CB, et al. Systems and synthetic biology for plant natural product pathway elucidation[J]. Cell Reports, 2025, 44(6): 2211-1247.

[3] Yu Z, Wei Y, Ji B, et al. Editorial: Plant natural products: Biosynthesis, regulation, and function[J]. Frontiers in Plant Science, 2025, 16: 1661170.

[4] Rohan Salgarkar. Plant Extracts Market worth $85.28 billion by 2030[R]. Delray Beach, FL 33445 USA: MarketsandMarkets™ Inc., 2025.

[5] Ye LD. Fine-tuning and dynamic control of microbial cell factories for the biosynthesis of plant-derived bioactive compounds [M]. Amsterdam: Elsevier Inc., 2024: 227-255.

[6] Christianson DW. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases[J]. Chemical Reviews, 2017, 117: 11570-11648.

[7] Stephen AA, Ganiyu O, Odunayo OO. Food bioactives: The food image behind the curtain of health promotion and prevention against several degenerative diseases[M]. Elsevier, 2022, Chapter 11: 391-421.

[8] Wang XY, Lv R, Jiang G, et al. Plant terpenoids biosynthesis and transcriptional regulation[J]. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 2025, 94: 1-10.

[9] Ratan ZA, Haidere MF, Hong YH, et al. Pharmacological po-

tential of ginseng and its major component ginsenosides[J]. Journal of Ginseng Research, 2021, 45: 199-210.
[10] Wright CW. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 100: 67-71.
[11] Sabzehzari M, Zeinali M, Naghavi MR. Alternative sources and metabolic engineering of Taxol: Advances and future perspectives[J]. Biotechnology Advances, 2020, 43: 1075.
[12] Lipko A, Pączkowski C, Perez-Fons L, et al. Divergent contribution of the MVA and MEP pathways to the formation of polyprenols and dolichols in *Arabidopsis*[J]. Biochemical Journal, 2023, 480: 495-520.
[13] Liao P, Hemmerlin A, Bach TJ, et al. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production[J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(5): 697-713.
[14] Vranová E, Coman D, Gruissem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 665-700.
[15] Yang S, Wang N, Kimani S, et al. Characterization of terpene synthase variation in flowers of wild *Aquilegia* species from northeastern Asia[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhab020.
[16] Liu W, Feng Y, Yu S, et al. The flavonoid biosynthesis network in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23): 12824-12824.
[17] Parveen Z, Zaidi S, Bajguz A, et al. Comprehensive insights into flavonoids: Biosynthesis, stress modulation, and plant growth regulation[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2025, 44: 6333-6352.
[18] Liu Y, Jiao A. Flavonoids as immunoregulators: Molecular mechanisms in regulating immune cells and their therapeutic applications in inflammatory diseases[J]. Frontiers in Immunology, 2025, 16:1703672.
[19] Mao Y, Luo J, Cai Z. Biosynthesis and regulatory mechanisms of plant flavonoids: A review[J]. Plants, 2025, 14(12): 1847.
[20] Erdogan-Kablan S, Yayla S, Hurkul MM, et al. Recent advancements in the bioactive alkaloids analysis in plant and biological specimen: From the perspective of activity, sample preparation, and analytical method selection[J]. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2025, 1258: 124592.
[21] Sirin S, Nigdelioglu Dolanbay S, Aslim B. Role of plant derived alkaloids as antioxidant agents for neurodegenerative diseases[J]. Health Sciences Review, 2023, 6: 100071.
[22] Lichman BR. The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis[J]. Natural Product Reports, 2021, 38(1): 103-129.
[23] Wang Y, Wang Y, Cui J, et al. Non-conventional yeasts: Promising cell factories for organic acid bioproduction[J]. Trends in Biotechnology, 2025, 43(7): 1609-1626.
[24] Sibirny, A. Metabolic engineering of non-conventional yeasts for construction of the advanced producers of biofuels and high-value chemicals[J]. BBA Advance, 2022, 3: 100071.
[25] Moon SY, An NY, Lee JY. Transforming non-conventional yeasts into key players in biotechnology: Advances in synthetic biology applications[J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16: 1600187.
[26] Cotton CA, Claassens NJ, Benito-Vaquerizo S, et al. Renewable methanol and formate as microbial feedstocks[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 62: 168-180.
[27] Park YK, Ledesma-Amaro R. What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry[J]. Trends in Biotechnology, 2022, 41(2): 242-254.
[28] Cui Z, Zhong Y, Sun Z, et al. Reconfiguration of the reductive TCA cycle enables high-level succinic acid production by *Yarrowia lipolytica*[J]. Nature Communications, 2023, 14: 8480.
[29] 叶敏, 高教琪, 周雍进. 非常规酵母细胞工厂合成天然产物[J]. 生物技术通报, 2021, 37(8): 12-24.
[30] Tarallo M, Hayhurst M, Loo TS, et al. Heterologous expression of secreted proteins from phytophthora in *Pichia pastoris* followed by protein purification by immobilized metal Ion affinity (IMAC)[J]. Methods in Molecular Biology, 2025, 2892: 233-248.
[31] Xie LX, Yu W, Gao JQ, et al. *Ogataea polymorpha* as a next-generation chassis for industrial biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2024, 42(11): 1363-1378.
[32] Rebello S, Abraham A, Madhavan A, et al. Non-conventional yeast cell factories for sustainable bioprocesses[J]. FEMS Microbiology Letters, 2018, 365: fny222.
[33] Thorwall S, Schwartz C, Chartronet JW, et al. Stress-tolerant non-conventional microbes enable next-generation chemical biosynthesis[J]. Nature Chemical Biology, 2020, 16: 113-121.
[34] Gong GP, Wu B, Liu LP, et al. Engineering oleaginous red yeasts as versatile chassis for the production of oleochemicals and valuable compounds: Current advances and perspectives[J]. Biotechnology Advances, 2024, 76: 108432.
[35] Zhang TT, Wu AH, Aslam M, et al. Developing *Rhodotorula* as microbial cell factories for the production of lipids and carotenoids[J]. Green Carbon, 2024, 2: 409-420.
[36] Li S, Rong L, Wang S, et al. Enhanced limonene production by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica* from cheap carbon sources[J]. Chemical Engineering Science, 2022, 249: 117342.
[37] Taratynova MO, Tikhonova EE, Fedyaeva IM, et al. Boosting geranyl diphosphate synthesis for linalool production in engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023, 196(3): 1304-1315.
[38] Zhu J, Zhang Y, Jiang H, et al. Engineering the oleaginous

yeast Yarrowia lipolytica for co-production of phenolic monoterpenes thymol and carvacrol [J]. Microbial Cell Factories, 2025, 24: 208.

[39] Chen S, Lu Y, Wang W, et al. Efficient production of the β-iononearoma compound from organic waste hydrolysates using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 960558.

[40] Liu Y, Jiang X, Cui Z, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for production of α-farnesene [J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 296.

[41] Bi H, Xu C, Bao Y, et al. Enhancing precursor supply and modulating metabolism to achieve high-level production of β-farnesene in *Yarrowia lipolytica* [J]. Bioresource Technology, 2023, 382: 129171.

[42] Zhao B, Zhang Y, Wang Y, et al. Biosynthesis of α-bisabolene from low-cost renewable feedstocks by peroxisome engineering and systems metabolic engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. Green Chemistry, 2023, 25(20): 8145-8159.

[43] Guo Q, Li Y, Yan F, et al. Dual cytoplasmic-peroxisomal engineering for high-yield production of sesquiterpene α-humulene in *Yarrowia lipolytica* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(10): 2819-2830.

[44] Dai M, Cao Q, Jia S, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for high-level β-elemene production via combinatorial metabolic strategies [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2025, 10:1172-1179.

[45] Peng QQ, Guo Q, Chen C, et al. High-level production of patchoulol in *Yarrowia lipolytica* via systematic engineering strategies [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(11): 4638-4645.

[46] Guo X, Sun J, Li D, et al. Heterologous biosynthesis of (+)-nootkatone in unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 137: 125-131.

[47] Marsafari M, Xu P. Debottlenecking mevalonate pathway for antimalarial drug precursor amorphadiene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica* [J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 10: e00121.

[48] Zhao QQ, Hu PC, Zhang CJ, et al. Metabolic engineering and adaptive laboratory evolution enhance squalene production in *Yarrowia lipolytica* [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2026, 13: 86-97.

[49] Ning Y, Liu M, Ru Z, et al. Efficient synthesis of squalene by cytoplasmic-peroxisomal engineering and regulating lipid metabolism in *Yarrowia lipolytica* [J]. Bioresource Technology, 2024, 395: 130379.

[50] Zhang JL, Bai QY, Peng YZ, et al. High production of triterpenoids in *Yarrowia lipolytica* through manipulation of lipid components [J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 133.

[51] Sun ML, Han Y, Yu X, et al. Constructing a green oleaginous yeast cell factory for sustainable production of the plant-derived diterpenoid sclareol [J]. Green Chemistry, 2024, 26(9): 5202-5210.

[52] Luo Z, Liu N, Lazar Z, et al. Enhancing isoprenoid synthesis in *Yarrowia lipolytica* by expressing the isopentenol utilization pathway and modulating intracellular hydrophobicity [J]. Metabolic Engineering, 2020, 61: 344-351.

[53] Ma Y, Liu N, Greisen P, et al. Removal of lycopene substrate inhibition enables high carotenoid productivity in *Yarrowia lipolytica* [J]. Nature Communications, 2022, 13: 572.

[54] 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, 2017, 115(2): 464-472.

[55] Qin Z, Liu M, Ren X, et al. De novo biosynthesis of lutein in *Yarrowia lipolytica* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(10): 5348-5357.

[56] Zhu HZ, Jiang S, Wu JJ, et al. Production of high levels of 3S, 3′S-Astaxanthin in *Yarrowia lipolytica* via iterative metabolic engineering [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(8): 2673-2683.

[57] Nan C, Guo X, Cheng J, et al. De Novo biosynthesis of sabinene from methanol by multiple engineered *Pichia pastoris* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2026, 74(6): 5405-5416.

[58] Ye C, Li M, Gao J, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for overproduction of cis-trans nepetalactol [J]. Metabolic Engineering, 2024, 84: 83-94.

[59] Gao L, Zhang K, Shen Y, et al. Engineering a versatile yeast platform for sesquiterpene production from glucose or methanol [J]. Biotechnology Journal, 2024, 19(8): e2400261.

[60] Gu Z, Chai T, Chen X, et al. Evolutionary engineering of *Pichia pastoris* for α-farnesene biosynthesis from methanol [J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2025, 5: 1039-1049.

[61] Chen SL, Liu TS, Zhang WG, et al. Cofactor engineering for efficient production of α-farnesene by rational modification of NADPH and ATP regeneration pathway in *Pichia pastoris* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1767.

[62] Gao L, Hou R, Cai P, et al. Engineering yeast peroxisomes for α-bisabolene production from sole methanol with the aid of proteomic analysis [J]. JACS Au, 2024, 4(7): 2474-2483.

[63] Cheng J, Zuo Y, Liu G, et al. Development of a *Pichia pastoris* cell factory for efficient production of germacrene A: A precursor of β-elemene [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2023, 10: 38.

[64] Zuo Y, Xiao F, Gao J, et al. Establishing *Komagataella phaffii* as a cell factory for efficient production of sesquiterpenoid α-santalene [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(26): 8024-8031.

[65] Luo G, Lin Y, Chen S, et al. Overproduction of patchoulol in metabolically engineered *Komagataella phaffii*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(4): 2049-2058.

[66] Wriessnegger T, Augustin P, Engleder M, et al. Production of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone by metabolic engineering of *Pichia pastoris*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 24: 18-29.

[67] Zhang X, Yang Y, Chen S, et al. Engineering *Pichia pastoris* for high-level biosynthesis of squalene[J]. Biochemical Engineering Journal, 2025, 217: 109677.

[68] Liu XB, Liu M, Tao XY, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for the production of dammarenediol-II[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 216: 47-55.

[69] Zhang X, Wang D, Duan Y, et al. Production of lycopene by metabolically engineered *Pichia pastoris*[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2020, 84(3): 463-470.

[70] Zhang X, Chen S, Lin Y, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for high-level production of lycopene[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(10): 2961-2972.

[71] Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Rosa-dos-Santos F, et al. Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and β-carotene[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 93(6): 2483-2492.

[72] Niu T, Yan X, Wang J, et al. Engineering of *Pichia pastoris* for the De novo synthesis of the sesquiterpene Zealexin A1 from methanol[J]. ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 2024, 12(34): 12786-12794.

[73] Xie LF, Ye M, Zhang H, et al. Transforming peroxisomes into organelle factories for monoterpene production in yeast *Ogataea polymorpha*[J]. Engineering, 2025, doi: 10.1016/j.eng.2025.07.030.

[74] Ye M, Gao J, Zhou YJ. Global metabolic rewiring of the non-conventional yeast *Ogataea polymorpha* for biosynthesis of the sesquiterpenoid β-elemene[J]. Metabolic Engineering, 2023, 76: 225-231.

[75] Li J, Gao J, Ye M, et al. Engineering yeast for high-level production of β-farnesene from sole methanol[J]. Metabolic Engineering, 2024, 85: 194-200.

[76] Yang S, Zhou Y, Gao J. Stress-driven regulation of cellular robustness for improving terpenoid production in *Ogataea polymorpha*[J]. Bioresource Technology, 2026, 439: 133297.

[77] Liu S, Zhang M, Ren Y, et al. Engineering *Rhodosporidium toruloides* for limonene production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14: 243.

[78] Gao Q, Dong Y, Huang Y, et al. Dual-regulation in peroxisome and cytoplasm toward efficient limonene biosynthesis with *Rhodotorula toruloides*[J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(8): 2545-2554.

[79] Zheng X, Li Y, Che C, et al. Metabolic engineering of *Rhodotorula toruloides* for the production of linalool[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73: 5395-5404.

[80] Kirby J, Geiselman GM, Yaegashi J, et al. Further engineering of *R. toruloides* for the production of terpenes from lignocellulosic biomass[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14: 101.

[81] Geiselman GM, Kirby J, Landera A, et al. Conversion of poplar biomass into high-energy density tricyclic sesquiterpene jet fuel blendstocks[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19: 208.

[82] Walls LE, Otoupal P, Ledesma-Amaro R, et al. Bioconversion of cellulose into bisabolene using *Ruminococcus flavefaciens* and *Rhodosporidium toruloides*[J]. Bioresource Technology, 2022, 368: 128216.

[83] Yaegashi J, Kirby J, Ito M, et al. *Rhodosporidium toruloides*: A new platform organism for conversion of lignocellulose into terpene biofuels and bioproducts[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 241.

[84] Adamczyk PA, Hwang HJ, Chang TH, et al. The oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* engineered for biomass hydrolysate-derived (E)-α-bisabolene production[J]. Metabolic Engineering, 2025, 90: 92-105.

[85] Zheng X, Li Y, Liu Z, et al. Biosynthesis of patchoulol via metabolic engineering the oleaginous red yeast *Rhodotorula toruloides*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2026, 12: 293-300.

[86] Geiselman GM, Zhuang X, Kirby J, et al. Production of ent-kaurene from lignocellulosic hydrolysate in *Rhodosporidium toruloides*[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19: 24.

[87] Tran TN, Tran QV, Huynh HT, et al. Astaxanthin production by newly isolated *Rhodosporidium toruloides*: Optimization of medium compositions by response surface methodology[J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2019, 47(2): 320-327.

[88] Wang DN, Feng J, Yu CX, et al. Integrated pathway engineering and transcriptome analysis for improved astaxanthin biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 7(4): 1133-1141.

[89] Ye M, Gao J, Li J, et al. Promoter engineering enables precise metabolic regulation towards efficient β-elemene production in *Ogataea polymorpha*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2024, 9(2): 234-241.

[90] Hu Y, Zhou YJ, Bao J, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of germacrene A, a precursor of beta-elemene[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017, 44(7): 1065-1072.

[91] Jiang D, Yang M, Chen K, et al. Exploiting synthetic biology platforms for enhanced biosynthesis of natural products in *Yarrowia lipolytica*[J]. Bioresource Technology, 2024, 399: 130614.

[92] Ma Y, Li W, Mai J, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for sustainable production of the chamomile sesquiterpene (-)-α-bisabolol[J]. Green Chemistry, 2021, 23(2): 780-787.

[93] Chatzivasileiou AO, Ward V, Edgar SM, et al. Two-step pathway for isoprenoid synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 116(2): 506-511.

[94] Liu H, Chen SL, Xu JZ, et al. Dual regulation of cytoplasm and peroxisomes for improved α-farnesene production in recombinant *Pichia pastoris*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(6): 1563-1573.

[95] Ayer A, Sanwald J, Pillay BA, 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.

[96] Weinert BT, Iesmantavicius V, Moustafa T, et al. Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular Systems Biology, 2014, 10: 716.

[97] Zhu MH, Zhou HZ, Liu Z, et al. Reprogramming lipid metabolism and morphology engineering in *Yarrowia lipolytica* for algae-free, high-titer production of esterified astaxanthin[J]. Chemical Engineering Journal, 2026, 532: 174273.

[98] Wang J, Cao W, Zheng Z, et al. Harnessing the yeast nucleus for the efficient production of valuable monoterpenes[J]. Metabolic Engineering, 2026, 96: 1-12.

[99] Szappanos B, Kovács K, Szamecz B, et al. An integrated approach to characterize genetic interaction networks in yeast metabolism[J]. Nature Genetics, 2011, 43: 656-662.

[100] Wei W, Zhang P, Shang Y, et al. Metabolically engineering of *Yarrowia lipolytica* for the biosynthesis of naringenin from a mixture of glucose and xylose[J]. Bioresource Technology, 2020, 314: 123726.

[101] Liu M, Wu J, Yue M, et al. YaliCMulti and YaliHMulti: Stable, efficient multi-copy integration tools for engineering *Yarrowia lipolytica*[J]. Metabolic Engineering, 2024, 82: 29-40.

[102] Liu M, Wang C, Ren X, et al. Remodelling metabolism for high-level resveratrol production in *Yarrowia lipolytica*[J]. Bioresource Technology, 2022, 365: 128178.

[103] He Q, Yue M, Liu M, et al. De novo biosynthesis of dihydroquercetin in an engineered *Yarrowia lipolytica* with enhanced (2S)-eriodictyol[J]. Food Bioscience, 2025, 64: 105912.

[104] Dong Y, Wei W, Li M, et al. De novo biosynthesis of quercetin in *Yarrowia lipolytica* through systematic metabolic engineering for enhanced yield[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2025, 12: 5.

[105] Park N, Ham Y, Cha S, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for enhanced production of naringenin-derived flavonoids: Apigenin and acacetin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73: 14420-14431.

[106] Sun WZ, Wang X, Fu MY, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for enhanced de novo biosynthesis of icaritin[J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14: 1142-1151.

[107] Xu J, Wei W, Cai G, et al. De novo biosynthesis of sakuranetin in *Yarrowia lipolytica* through systemic metabolic engineering[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2025, 0: 1-12.

[108] Qian T, Wei W, Xu J, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a green yeast cell factory for de novo biosynthesis of daidzein and purein[J]. Green Chemistry, 2025, 27: 6067-6076.

[109] Zhang P, Wei W, Shang Y, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for high-level production of scutellarin[J]. Bioresource Technology, 2023, 385: 129421.

[110] Shang Y, Zhang P, Wei W, et al. Metabolic engineering for the high-yield production of polydatin in *Yarrowia lipolytica*[J]. Bioresource Technology, 2023, 381: 129129.

[111] Akram M, Rasool A, An T, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for liquiritigenin production[J]. Chemical Engineering Science, 2021, 230: 116177.

[112] Wang Y, Huang R, Gao S, et al. Identification of two new flavone 4′-O-methyltransferases and their application in de novo biosynthesis of (2S)-hesperetin in *Yarrowia lipolytica*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2025, 10: 728-736.

[113] Kumokita R, Bamba T, Inokuma K, et al. Construction of an L-tyrosine chassis in *Pichia pastoris* enhances aromatic secondary metabolite production from glycerol[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(6): 2098-2107.

[114] Qian Z, Yu H, Song C, et al. Biosynthesis of plant vitexin-derived flavonoid glycosides in yeast[J]. Nature Synthesis, 2025, 5:335-348.

[115] Qian Z, Yu J, Chen X, et al. De novo production of plant 4′-deoxyflavones baicalein and oroxylin A from ethanol in crabtree-negative yeast[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(4): 1600-1612.

[116] Kang Y, Qian Z, Yu H, et al. Programmable biosynthesis of plant-derived 4′-deoxyflavone glycosides by an unconventional yeast consortium[J]. Small Methods, 2024, 8(8): 2301371.

[117] Wang TY, Tsai YH, Yu IZ, et al. Improving 3′-Hydroxygenistein production in recombinant *Pichia pastoris* using periodic hydrogen peroxide-shocking strategy[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(3): 498-502.

[118] Wang T, Qian W, Fu Y, et al. Engineering of gentiopicroside-producing yeast strain using low-energy ion implantation mediated synthetic biology[J]. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2016, 30(4): 805-812.

[119] Wang L, Deng A, Zhang Y, et al. Efficient CRISPR-Cas9 mediated multiplex genome editing in yeasts[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 277.

[120] Lee JJL, Ng KR, Liang J, et al. Engineering the phenylpropanoid pathway in *Rhodosporidium toruloides* for naringenin production from tyrosine by leveraging on its native PAL gene[J].

ACS Food Science and Technology, 2022, 3(1): 92-99.

[121] Zhang M, Gao Q, Liu Y, et al. Metabolic engineering of *Rhodotorula toruloides* for resveratrol production[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21: 270.

[122] Huang Y, Gao Q, Dong Y, et al. Engineering the biosynthesis of daidzein and genistein with the red oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides*[J]. ACS Omega, 2025, 10(28): 31153-31160.

[123] Mirończuk AM, Kosiorowska KE, Biegalska A, et al. Heterologous overexpression of bacterial hemoglobin VHb improves erythritol biosynthesis by yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18: 176.

[124] Webster DA, Dikshitvc KL, Pagilla KR, et al. The discovery of vitreoscilla hemoglobin and early studies on its biochemical functions, the control of its expression, and its use in practical applications[J]. Microorganisms, 2021, 9: 1637.

[125] Xu P, Marsafari M, Zha J, et al. Microbial coculture for flavonoid synthesis[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(7): 686-688.

[126] Gao J, Zuo Y, Xiao F, et al. Biosynthesis of catharanthine in engineered *Pichia pastoris*[J]. Nature Synthesis, 2023, 2(3): 231-242.

[127] Urui M, Yamada Y, Ikeda Y, et al. Establishment of a co-culture system using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) for valuable alkaloid production[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20: 200.

[128] Urui M, Yamada Y, Nakagawa A, et al. Enhanced co-culture system using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) for improved microbial production of valuable plant alkaloids[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2023, 46(10): 1494-1497.

[129] 钱芷兰, 宋丽丽, 刘启,等. 非常规酵母天然产物合成[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2284-2312.

[130] Navarrete C, Martínez JL. Non-conventional yeasts as superior production platforms for sustainable fermentation based biomanufacturing processes[J]. AIMS Bioengineering, 2020, 7(4): 289-305.

[131] Shan L, Dai Z, Wang Q. Advances and opportunities of CRISPR/Cas technology in bioengineering non-conventional yeasts[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 765396.

[132] Malcı K, Watts E, Roberts TM, et al. Standardization of synthetic biology tools and assembly methods for *Saccharomyces cerevisiae* and emerging yeast species[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(8): 2527-2547.

[133] Greenhalgh JC, Fahlberg SA, Pfleger BF, et al. Machine learning-guided acyl-ACP reductase engineering for improved *in vivo* fatty alcohol production[J]. Nature Communications, 2021, 12: 5825.

[134] Vázquez TS, Leung PJY, Venkatesh P, et al. De novo design of high-affinity binders of bioactive helical peptides[J]. Nature, 2023, 626(7998): 435-442.

[135] Domenzain I, Lu Y, Wang HY, et al. Computational biology predicts metabolic engineering targets for increased production of 103 valuable chemicals in yeast[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2025, 122(9): e2417322122.

[136] Ye C, Li X, Liu T, et al. Peroxisome engineering in yeast: Advances, challenges, and prospects[J]. Biotechnology Advances, 2026, 86: 108747.

[137] Yurimoto H, Oku M, Sakai Y. Yeast methylotrophy: Metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis[J]. International Journal of Microbiology, 2011, 2011: 101298.

[138] Ma Y, Li J, Huang S, et al. Targeting pathway expression to subcellular organelles improves astaxanthin synthesis in *Yarrowia lipolytica*[J]. Metabolic Engineering, 2021, 68: 152-161.