

毕赤酵母合成 β -胡萝卜素代谢重构

李艳茹, 张新颖, 梁书利*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 该研究通过毕赤酵母代谢网络重构, 实现 β -胡萝卜素的高效生物合成。将 GGPP 合酶 (CrtE)、双功能番茄红素环化酶/八氢番茄红素合成酶 (CrtYB) 和八氢番茄红素去饱和酶 (CrtI) 在毕赤酵母 GS115 异源表达, 成功构建了 β -胡萝卜素合成途径。接着, 系统筛选不同来源的功能基因并进行基因剂量优化, 获得了一株高产 β -胡萝卜素的重组合菌株 G04B, 其产量达到 309.49 mg/L (21.71 mg/g DCW)。在此基础上, 通过强化甲羟戊酸 (MVA) 途径、优化辅因子 NADPH 供给及过表达脂质合成相关基因, 显著提高了 β -胡萝卜素的合成效率。优化后的菌株在摇瓶培养条件下产量提升至 366.55 mg/L (24.34 mg/g DCW), 在 5 L 发酵罐中产量达到 6.15 g/L (49.16 mg/g DCW)。研究结果表明, 途径酶的优化、关键基因剂量优化以及脂质代谢调控是提高毕赤酵母中 β -胡萝卜素产量的有效策略, 进而为毕赤酵母合成天然萜类化合物的代谢工程改造提供了理论依据和技术参考。

关键词: 毕赤酵母; β -胡萝卜素; 代谢重构; 辅因子

文章编号: 1673-9078(2025)04-141-151

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.0476

Metabolic Reconstruction of *Pichia pastoris* for β -Carotene Biosynthesis

LI Yanru, ZHANG Xinying, LIANG Shuli*

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Efficient β -carotene biosynthesis was achieved by reconstructing the metabolic network of *Pichia pastoris*. The synthesis pathway was established through heterologous expression of geranylgeranyl diphosphate synthase (CrtE), lycopene cyclase/phytoene synthase (CrtYB), and phytoene desaturase (CrtI) in the GS115 strain. Systematic gene screening and dosage optimization led to the development of the high-yield recombinant strain G04B, which produced 309.49 mg/L (21.71 mg/g dry cell weight [DCW]) of β -carotene. Further, based on this result, β -carotene synthesis efficiency was significantly improved by enhancing the mevalonate pathway, optimizing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen supply, and overexpressing lipid synthesis-related genes. The optimized strain achieved a yield of 366.55 mg/L (24.34 mg/g DCW) under shake-flask conditions and 6.15 g/L (49.16 mg/g DCW) in a 5 L fermenter. Together, the results demonstrated that optimizing the enzyme pathway, tuning gene dosage, and regulating lipid metabolism are effective strategies for increasing β -carotene production in *P. pastoris*, providing a foundation for natural terpenoid synthesis engineering.

Key words: *Pichia pastoris*; β -carotene; metabolic reconstruction; cofactor

引文格式:

李艳茹, 张新颖, 梁书利. 毕赤酵母合成 β -胡萝卜素代谢重构[J]. 现代食品科技, 2025, 41(4): 141-151.

LI Yanru, ZHANG Xinying, LIANG Shuli. Metabolic reconstruction of *Pichia pastoris* for β -carotene biosynthesis [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 141-151.

收稿日期: 2024-04-21

基金项目: 国家重点研发计划绿色生物制造重点专项 (2021YFC2104000)

作者简介: 李艳茹 (1998), 女, 硕士, 研究方向: 合成生物学, E-mail: li_yanru_scut@163.com

通讯作者: 梁书利 (1985), 男, 博士, 教授, 研究方向: 酶学与酶工程, E-mail: shuli@scut.edu.cn

作为视黄醇的主要前体物质, β -胡萝卜素不仅具备显著的抗氧化特性, 还是一种高附加值的功能性成分, 广泛应用于食品、水产养殖、化妆品及制药等行业^[1]。在食品工业中, β -胡萝卜素主要应用于食品着色、营养强化、抗氧化及功能性食品开发等方面。作为天然色素, β -胡萝卜素可为食品提供黄色至橙色色泽, 广泛应用于饮料、乳制品及烘焙食品中, 满足消费者对天然健康成分的需求。同时, 作为维生素 A 的前体, β -胡萝卜素可在人体内转化为视黄醇, 用于营养强化, 常添加于婴幼儿食品、谷物及功能性饮料中, 以预防维生素 A 缺乏症^[2]。此外, β -胡萝卜素具有较强的抗氧化性能, 可抑制食品中脂质和蛋白质的氧化, 延长保质期并维持品质稳定性, 因此在油脂、肉类及零食等领域得到广泛应用^[3]。研究还表明, β -胡萝卜素具有潜在的抗癌及免疫调节功能, 被用于功能性食品和膳食补充剂的开发, 适量摄入有助于降低慢性疾病风险^[4]。

构建微生物细胞工厂高效合成 β -胡萝卜素逐渐成为研究热点。在重组大肠杆菌中, 通过改善 ATP 和 NADPH 供应, 重组大肠杆菌中 β -胡萝卜素产量为 2.1 g/L^[5]。红法夫酵母通过诱变处理产生积累 β -胡萝卜素的突变株, 进而引入 β -胡萝卜素羟化酶可得到 0.5 mg/g DCW 的玉米黄质^[6]。在解脂耶氏酵母中采用强启动子和多基因拷贝的方法强化 β -胡萝卜素合成途径, 分批补料发酵时可产生 4 g/L 的 β -胡萝卜素^[7]。进一步采用 Golden Gate 组合方法优化异源 crt 通路启动子基因对, 最佳菌株的 β -胡萝卜素产量为 90 mg/g DCW, 效价达 6.5 g/L^[8]。工程毕赤酵母也已经成功异源合成 β -胡萝卜素。为实现毕赤酵母中异源 β -胡萝卜素的生物合成, 关键在于高效表达 β -胡萝卜素合成途径中的三个关键酶: 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶 (CrtE)、八氢番茄红素合成酶 / 八氢番茄红素脱氢酶 (CrtYB) 以及番茄红素环化酶 (CrtI)。这些酶的催化活性及其适配性对目标产物的代谢通量具有决定性影响, 是高效 β -胡萝卜素的关键。在类胡萝卜素代谢工程研究中, 通过筛选不同物种来源的 Crt 基因组合以实现产量提升是一种广泛采用的策略^[9]。此外, 有研究在大肠杆菌中将 *Pantoea ananatis* 来源的 *CrtE/B/I* 基因替换为 *Pantoea agglomerans* 同源基因后, 番茄红素产量可提升近 100%^[10]。然而, 微生物细胞工厂合成 β -胡萝卜素的产量仍有待提高。

毕赤酵母具有营养要求低、发酵密度高、甲羟戊酸 (MVA) 途径通量大等特点, 成为合成胡萝卜素等萜类化合物的理想底盘细胞。通过产物合成途径酶的筛选及剂量优化、前体物质供给增强及辅因子循环强化、脂质工程改善类胡萝卜素贮存^[11]等策略, 往往能有效提高萜类物质的产量。基于此, 本研究以毕赤酵母为底盘细胞, 引入 β -胡萝卜素合成途径关键基因, 系统筛选不同物种来源的 β -胡萝卜素合成途径基因 (*CrtE*、*CrtYB*、*CrtI*), 并结合基因剂量调控策略, 对合成途径进行代谢优化, 成功获得 β -胡萝卜素合成菌株。为进一步提升产量, 从代谢通量平衡角度出发, 采用多维度优化策略: (1) 通过 MVA 途径关键基因的调控, 增强前体物质 IPP 和 DMAPP 的供给; (2) 优化辅因子 NADPH 的再生系统; (3) 引入脂质合成相关基因, 改善 β -胡萝卜素的储存能力。通过上述系统性代谢工程改造, 实现了毕赤酵母中 β -胡萝卜素的高效合成。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒

所用菌株为本实验室保存的毕赤酵母 *Pichia Pastoris* GS115 和大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10。pHKA、pPICZA 和 pZACH 载体为本实验室保存。 β -胡萝卜素合成酶 (*CrtE/CrtYB/CrtI*)、*HMGR*、*IDI*、*POS5*、*ZWF1*、*Sre* 和 *OLE2* 基因经毕赤酵母的密码子后, 由擎科生物科技有限公司合成于 pPICZA 载体上。

所用到的菌株具体信息见表 1。

1.1.2 工具酶与试剂

Bgl II、*Bam* H I 等限制性内切酶购自加拿大 Fermentas 公司; KOD 高保真聚合酶购自日本东洋纺公司; PCR Mix 购自北京庄盟国际生物公司; PCR 产物回收试剂盒、GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 质粒小量抽提试剂盒购自天根生物; Yeast DNAiso Kit 购自大连宝生物工程有限公司; DNA Marker 购自东盛生物; 博来霉素、卡那霉素、灭瘟素购自美国 Invitrogen 公司; Yeast extract、Tryptone、YNB 购自 Oxoid 公司; β -胡萝卜素标品购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 其它试剂为国产分析纯试剂。

表 1 本研究所用菌株
Table 1 Strains used in this study

菌株	来源	描述
大肠杆菌 TOP10 F'	本课题组保存	载体克隆宿主菌
毕赤酵母 GS115	本课题组保存	毕赤酵母宿主菌
GEBI1	本文构建	pHKA- <i>XdCrtE-XdCrtYB-XdCrtI</i> -GS115
GEBI2	本文构建	pHKA- <i>XdCrtE-XdCrtYB-BtCrtI</i> -GS115
GEBI3	本文构建	pHKA- <i>XdCrtE-SpCrtYB-XdCrtI</i> -GS115
GEBI4	本文构建	pHKA- <i>XdCrtE-SpCrtYB-BtCrtI</i> -GS115
GEBI5	本文构建	pHKA- <i>TmCrtE-XdCrtYB-XdCrtI</i> -GS115
GEBI6	本文构建	pHKA- <i>TmCrtE-XdCrtYB-BtCrtI</i> -GS115
GEBI7	本文构建	pHKA- <i>TmCrtE-SpCrtYB-XdCrtI</i> -GS115
GEBI8	本文构建	pHKA- <i>TmCrtE-SpCrtYB-BtCrtI</i> -GS115
GEBI9	本文构建	pHKA- <i>PaCrtE-XdCrtYB-XdCrtI</i> -GS115
GEBI10	本文构建	pHKA- <i>PaCrtE-XdCrtYB-BtCrtI</i> -GS115
GEBI11	本文构建	pHKA- <i>PaCrtE-SpCrtYB-XdCrtI</i> -GS115
GEBI12	本文构建	pHKA- <i>PaCrtE-SpCrtYB-BtCrtI</i> -GS115
G04E	本文构建	pZACH- <i>XdCrtE</i> -GEBI4
G04B	本文构建	pZACH- <i>SpCrtYB</i> -GEBI4
G04I	本文构建	pZACH- <i>BtCrtI</i> -GEBI4
G04EBI	本文构建	pZACH- <i>XdCrtE-SpCrtYB-BtCrtI</i> -GEBI4
G04BH	本文构建	pZACH- <i>HMGR</i> -G04B
G04BI	本文构建	pZACH- <i>IDI</i> -G04B
G04BHI	本文构建	pZACH- <i>HMGR-IDI</i> -G04B
G04BP	本文构建	pZACH- <i>POS5</i> -G04B
G04BZ	本文构建	pZACH- <i>ZWF1</i> -G04B
G04BPZ	本文构建	pZACH- <i>POS5-ZWF1</i> -G04B
G04BS	本文构建	pZACB- <i>Sre</i> -G04B
G04BO	本文构建	pZACB- <i>OLE2</i> -G04B
G04BSO	本文构建	pZACB- <i>Sre-OLE2</i> -G04B

1.1.3 培养基

LB、YPD、MD、BMGY、BMMY 等培养基及其配制方法参考美国 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。LBK 抗性筛选平板：在 LB 培养基里加入 2% (m/V) 琼脂粉和终质量浓度为 100 µg/mL 的卡那霉素，摇晃均匀后倒平板；LBLZ 抗性筛选平板：LB 培养基中 NaCl 减半，并加入 2% (m/V) 琼脂粉和终质量浓度为 25 µg/mL 的博来霉素，摇晃均匀后倒平板；LBLB 抗性筛选平板：LB 培养基中 NaCl 减半，并加入 2% (m/V) 琼脂粉和终质量浓度为 100 µg/mL 的灭瘟素，摇晃均匀后倒平板；YPDZ 固体平板培养基：在 YPD 培养基里加入 2% (m/V) 琼脂粉和终质量浓度为 100 µg/mL 的博来霉素，摇晃均匀后倒平板。

1.1.4 主要仪器设备

Waters 2689-2489 高效液相色谱仪，Waters 公司；JJ200A 电子分析天平，美国双杰 G&G 电子天平有限公司；DNP-9082 电热恒温培养箱，上海精宏实验设备有限公司；MSC-3000 恒温混匀仪，杭州奥盛仪器有限公司；ZQZY-CF8V 摇床，上海知楚仪器有限公司；Mini-PROTEAN 电泳槽，Bio-Rad 公司；EPS 300 电泳仪，上海天能科技有限公司；电穿孔仪，Bio-Rad 公司；NanoDrop 1000 微型紫外分光光度计，Thermo 公司；Tanon 1600 全自动数码凝胶成像分析仪，Eppendorf 公司；ETC811 基因扩增仪，上海桑晒生物科技有限公司；DK-8D 恒温水浴锅，上海精宏实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 不同基因来源β-胡萝卜素合成表达载体构建

在 NCBI 数据库中获得 3 种 *CrtE* 酶 (*XdCrtE*、*PaCrtE*、*TmCrtE*)；2 种 *CrtYB* 酶 (*XdCrtYB*、*SpCrtYB*)；2 种 *CrtI* 酶 (*XdCrtI*、*BtCrtI*) 的氨基酸序列（具体物种信息来源见表 2），将序列送往擎科生物科技有限公司，经过毕赤密码子优化后整合到 pPICZA 上，分别形成 pPICZA-*CrtE*、pPICZA-*CrtYB* 和 pPICZA-*CrtI* 质粒。

以 pHKA-*XdCrtE*-*XdCrtYB*-*XdCrtI* 质粒构建为例。先构建单表达盒质粒：用 *Bgl*II 和 *Bam*HI 对 pPICZA-*XdCrtE*，pPICZA-*XdCrtYB*，pPICZA-*XdCrtI* 质粒进行双酶切，得到 *XdCrtE*、*XdCrtYB* 和 *XdCrtI* 基因表达盒片段，同时用这两个酶对载体质粒 pHKA-*VIP* 进行双酶切。将目的片段 *XdCrtE* 基因表达盒与载体进行连接，得到表达载体 pHKA-*XdCrtE*。然后构建双表达盒质粒：将 *XdCrtYB* 基因表达盒与经 *Bam*H I 酶切后的 pHKA-*XdCrtE* 连接，得到载体 pHKA-*XdCrtE*-*XdCrtYB*。最后是三单表达盒质粒的构建：将 *XdCrtI* 基因表达盒与经 *Bam*H I 酶切后的 pHKA-*XdCrtE*-*XdCrtYB* 连接，得到载体 pHKA-*XdCrtE*-*XdCrtYB*-*XdCrtI*。剩下 11 个组合的重组质粒的构建方法与 pHKA-*XdCrtE*-*XdCrtYB*-*XdCrtI* 构建方法相同。

表 2 本研究中使用的异源模块*CrtE*、*CrtYB*和*CrtI*
Table 2 Heterologous modules *CrtE*, *CrtYB* and *CrtI* used in this study

Name of <i>CrtE/CrtYB/CrtI</i>	Microbial source	Called in this study
<i>XdCrtE</i>	<i>X.dendrorhous</i>	<i>CrtE1</i>
<i>TmCrtE</i>	<i>Taxus X media</i>	<i>CrtE2</i>
<i>PaCrtE</i>	<i>P.ananatis</i>	<i>CrtE3</i>
<i>XdCrtYB</i>	<i>X.dendrorhous</i>	<i>CrtYB1</i>
<i>SpCrtYB</i>	<i>S.pararoseus</i>	<i>CrtYB2</i>
<i>XdCrtI</i>	<i>X.dendrorhous</i>	<i>CrtI1</i>
<i>BtCrtI</i>	<i>B.trispora</i>	<i>CrtI2</i>

1.2.2 多拷贝β-胡萝卜素合成途径基因载体及代谢调控优化载体构建

1.2.2.1 多拷贝β-胡萝卜素合成途径基因载体的构建

使用博来霉素抗性筛选标记的循环质粒 pZACH 作为载体。先构建单表达盒质粒：用限制性内切酶 *Eco*72 I、*Not* I 同时对载体 pZACH 和含有目的基

因片段 *XdCrtE*、*SpCrtYB* 和 *BtCrtI* 的质粒 pPICZA-*XdCrtE*、pPICZA-*SpCrtYB* 和 pPICZA-*BtCrtI* 进行双酶切，酶切产物回收后后接，得到表达载体 pZACH-*XdCrtE*、pZACH-*SpCrtYB* 和 pZACH-*BtCrtI*。再构建双表达盒质粒：用限制性内切酶 *Bgl* II 对载体 pZACH-*XdCrtE* 质粒进行单酶切，酶切产物去磷酸化。使用限制性内切酶 *Bgl*II 和 *Bam*HI 对 pPICZA-*SpCrtYB* 质粒进行双酶切，胶回收得到 *SpCrtYB* 基因表达盒片段。将回收的载体与片段进行连接，得到表达 pZACH-*XdCrtE*-*SpCrtYB*。最后是表达盒质粒的构建：用限制性内切酶 *Bgl*II 对载体 pZACH-*XdCrtE*-*SpCrtYB* 质粒进行单酶切，酶切产物去磷酸化。用 *Bgl*II 和 *Bam*HI 酶对 pPICZA-*BtCrtI* 质粒进行双酶切，胶回收得到 *BtCrtI* 基因表达盒片段，将回收的载体与片段进行连接，得到载体 pZACH-*XdCrtE*-*SpCrtYB*-*BtCrtI*。构建获得的载体可进行抗性筛选标记循环利用，从而能够进行多拷贝 β-胡萝卜素合成途径基因的导入。

1.2.2.2 代谢调控优化载体的构建

类似地，在 NCBI 数据库中获得 HMGR、IDI、*POS5*、*ZWF1*、*Sre* 和 *OLE2* 酶的氨基酸序列，将序列送往擎科生物科技有限公司，经过毕赤密码子优化后整合到 pPICZA 上，分别形成 pPICZA-*HMGR*、pPICZA-*IDI*、pPICZA-*POS5*、pPICZA-*ZWF1*、pPICZA-*Sre* 和 pPICZA-*OLE2* 质粒。与 pZACH-*XdCrtE*-*SpCrtYB* 质粒构建方法类似，使用博来霉素抗性筛选标记的循环质粒 pZACH 作为载体，首先使用 *Eco*72I 和 *Not*I 双酶切获得目的基因的表达盒，然后再通过构建单表达盒质粒到双表达盒质粒的顺序逐步串联，得到表达载体 pZACH-*HMGR*、pZACH-*IDI*、pZACH-*HMGR*-*IDI*、pZACH-*POS5*、pZACH-*ZWF1* 和 pZACH-*POS5*-*ZWF1*。使用灭瘟素抗性筛选标记质粒 pZACB 作为载体，通过构建单表达盒质粒到双表达盒质粒的顺序逐步串联，得到表达载体 pZACB-*Sre*、pZACB-*OLE2* 和 pZACB-*Sre*-*OLE2*。

1.2.3 重组酵母工程菌株构建及摇瓶发酵培养

1.2.3.1 不同基因来源β-胡萝卜素合成菌株构建及摇瓶发酵培养

用 *Kpn*2I 将 12 个不同组合的重组质粒 pHKA-*CrtE*-*CrtYB*-*CrtI* 线性化，电转至 GS115 酵母感受态细胞，涂布于相应的 MD 筛选平板，平板倒置于 30 ℃ 培养箱中培养 2~4 d。然后对平板上的酵母转

化子进行菌落 PCR 鉴定, 获得重组酵母工程菌株 GEBI2~GEBI12。挑取阳性转化子接种于装液量为 5 mL 的 BMGY 培养基中, 置于温度 30 ℃, 转速 250 r/min 摇床中培养 24 h 左右, 以 OD_{600} 为 1 转接至 25 mL BMMY 中, 置于温度 30 ℃, 转速 250 r/min 摇床中培养, 每间隔 24 h 流加 $\phi=1\%$ 的甲醇。

1.2.3.2 多拷贝 β -胡萝卜素合成菌株和代谢调控优化菌株构建及摇瓶发酵培养

参照 1.2.3.1 的方法, 将重组质粒 pZACH-*XdCrtE*、pZACH-*SpCrtYB*、pZACH-*BtCrtI* 和 pZACH-*XdCrtE-SpCrtYB-BtCrtI* 电转至 GEBI4 中, 得到 G04E、G04B、G04I 和 G04EBI 菌株。将重组质粒 pZACH-*HMGR*、pZACH-*IDI*、pZACH-*HMGR-IDI*、pZACH-*POS5*、pZACH-*ZWF1*、pZACH-*POS5-ZWF1*、pZACB-*Sre*、pZACB-*OLE2* 和 pZACB-*Sre-OLE2* 电转至 G04B 中, 得到 G04BH、G04BI、G04BHI、G04BP、G04BZ、G04BPZ、G04BS、G04BO 和 G04BSO 菌株。挑取鉴定正确的阳性转化子进行 120 h 的摇瓶发酵。

1.2.4 β -胡萝卜素提取与检测分析

1.2.4.1 β -胡萝卜素的提取

采用有机溶剂萃取法提取毕赤酵母中的 β -胡萝卜素, 具体方法为: (1) 取 2 mL 的发酵液于 2 mL 离心管中, 常温离心 2 min 后弃上清; (2) 将细胞沉淀重新悬浮在 1 mL 的 3N (3 mol/L) HCl 中, 在沸水浴中加热 3 min, 然后在冰浴中冷却 3 min, 常温条件下 10 000 r/min 离心 2 min 后弃上清; (3) 加入 1 mL 蒸馏水洗涤破裂细胞一次, 常温条件下 10 000 r/min 离心 2 min 后弃上清; (4) 将细胞重新悬浮在 1 mL 丙酮中, 并涡旋 5 min。常温条件下 10 000 r/min 离心 2 min 后, 将上清液转移至 2 mL 的 Eppendorf 管中。在通风橱的恒定气流条件将上清液在 40 ℃ 下挥发; (5) 上述步骤 (3) 和 (4) 重复三至四次, 直到破碎的菌体样品为无色; 并将萃取液挥发至干, 用 1 mL 丙酮将样品重新溶解, 然后用 0.22 μ m 的有机滤膜过滤样品, 并将过滤的样品上清液转移至棕色 2 mL 螺旋盖玻璃进样瓶中, 避光条件下储存 -20 ℃ 不超过两天或直接进行 HPLC 检测分析。

1.2.4.2 β -胡萝卜素的检测分析

在 Waters 2695 系列 HPLC 系统上进行类胡萝卜素的定性及定量分析, 使用 Amethyst C18-H 柱 (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, Sepax Technologies, Inc.) 的反相高效液相色谱 (SHIMADZU LC-20 AT), 并用

UV/VIS 检测器在 470 nm 处检测信号。流动相为溶剂 A : 90% (V/V) 乙腈水溶液 (HPLC 级); 溶剂 B : 甲醇 - 异丙醇 (3:2, V/V, HPLC 级)。梯度洗脱程序为: (1) 0~15 min : 100% (V/V) 至 10% (V/V) 的甲缓冲液和 0% (V/V) 至 90% (V/V) 的乙缓冲液; (2) 16~30 min : 10% (V/V) 的甲缓冲液和 90% (V/V) 的乙缓冲液; (3) 31~35 min : 10% (V/V) 至 100% (V/V) 的甲缓冲液和 90% (V/V) 至 0% (V/V) 的乙缓冲液。以 1.0 mL/min 的流速, 柱温 40 ℃ 条件下洗脱样品。进样体积设定为 20 μ L。

1.2.4.3 β -胡萝卜素标准曲线的制作

用分析天平称取 2.4 mg 的 β -胡萝卜素标品溶于 10 mL 丙酮, 超声处理使其完全溶解, 用容量瓶定容至 20 mL, 标品母液质量浓度为 120 μ g/mL; 将标品母液分别进行 2、4、8、16 倍的梯度稀释, 然后根据 HPLC 等度洗脱方法确定标品吸收峰与标品浓度之间的关系, 拟合线性回归方程 $y=53\ 846+26\ 123\ 200x$, $R^2=0.999\ 85$, y 代表峰面积, x 代表标品 β -胡萝卜素的质量浓度 (图 1)。具体液相条件及操作方法按照 1.2.4.2 所述。

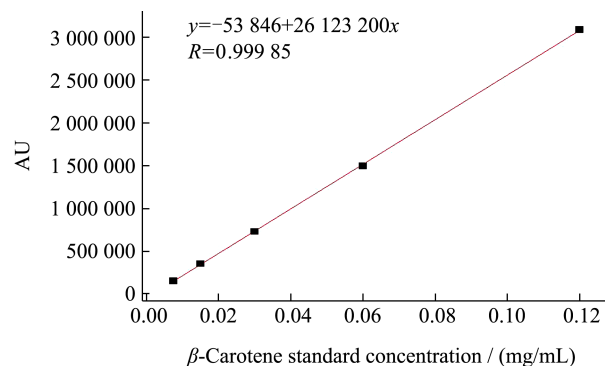


图 1 β -胡萝卜素的标准曲线

Fig.1 Standard curve of β -carotene

1.2.5 重组 β -胡萝卜素酵母工程菌株 5 L 发酵罐高密度发酵

1.2.5.1 发酵种子液的制备

挑取 YPD 平板上划线活化并生长良好的酵母单菌落, 接种至装有灭菌的 25 mL YPD 中, 并置于 30 ℃ 摇床中, 250 r/min 条件下培养 36 h, 将 YPD 活化的酵母种子液菌液按 5% 的比例转接至装有 160 mL YPD 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 并置于 30 ℃ 摇床中, 250 r/min 条件下培养 20 h, 作为 5 L 发酵罐发酵的种子液。

1.2.5.2 重组酵母菌株 5 L 发酵罐中高密度培养

将培养的酵母种子液按 8% (V/V) 的接种量接

种至 5 L 全自动机械搅拌通风发酵罐中, 开始甘油批次培养(初始培养基体积为 2 L)。甘油批次培养阶段条件如下: 使用 25% (m/V) 的浓氨水将其 pH 值控制在 5.5, 溶氧 (DO) 维持在 30%~60% 空气饱和度, 温度控制为 30 °C, 设置 DO 与搅拌转速联动, 搅拌转速下限设为 200 r/min, 上限设为 1 200 r/min, 通气量设置为 $2 \text{ m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$, 罐压控制在 0~0.025 MPa。待 DO 骤升至 80% 空气饱和度以上, 开始流加 50% (m/V) 甘油。随后进入甘油分批补料阶段, 条件如下: 使用 25% (m/V) 的浓氨水将其 pH 值控制在 5.5, 通过调节甘油的流速使溶氧 (DO) 维持在 30%~40% 空气饱和度, 温度控制为 30 °C, 搅拌转速设置为 1 000~1 200 r/min, 通气量设置为 $2 \text{ m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$, 罐压控制在 0~0.025 MPa。当细胞密度 OD_{600} 达到 230~250, 停止流加甘油, 待 DO 再次骤升至 80% 空气饱和度以上时, 先饥饿处理 1 h, 然后开始甲醇补料诱导发酵。甲醇诱导阶段条件控制如下: 使用 25% (m/V) 的浓氨水将其 pH 值控制在 6.0, 调节甲醇的流速使溶氧 (DO) 维持在 20%~30% 空气饱和度, 温度控制为 25 °C, 搅拌转速设置为 1 000~1 200 r/min, 通气量设置为 2 vvm, 罐压控制在 0.05~0.10 MPa。甲醇诱导 120 h 后结束发酵。

1.2.6 数据统计分析

每个重组酵母菌株重复发酵三次, 每次 OD_{600} 测定和 β -胡萝卜素产量测定设置三个平行, 数据值为平行样品的平均值, 用误差线表示标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 β -胡萝卜素异源合成途径构建

将来源于红法夫酵母的 β -胡萝卜素合成基因 *XdCrtE*、*XdCrtYB*、*XdCrtI*, 通过分子克隆方法获得重组质粒 pHKA-*XdCrtE-XdCrtYB-XdCrtI*。用限制性内切酶 *Kpn2I* 线性化重组质粒 pHKA-*XdCrtE-XdCrtYB-XdCrtI* 并将 β -胡萝卜素合成基因整合到毕赤酵母 *HIS* 位点, 获得导入 β -胡萝卜素异源合成途径的 GEB11 菌株。

挑取阳性转化子进行摇瓶培养, 如图 2a 所示, 发酵 120 h 后, 对照菌 GS115-9K (野生型 GS115 菌株里转入 pPIC9K 质粒) 为乳白色, GEB11 菌株为橙色, 因此初步判定重组酵母菌株可能有 β -胡萝卜素合成。如图 2b 所示, 样品通过液相分析检测出 β -胡萝卜素产物, 发酵 120 h 时重组菌株 β -胡萝卜素的产量为 91.38 mg/L (7.72 mg/g DCW)。结合

图 2c 产物测定结果及图 2d 的生长曲线, 红法夫酵母来源的 β -胡萝卜素合成基因成功在毕赤酵母中异源表达, 且表达 β -胡萝卜素基本没有影响毕赤酵母的正常生长, 但 β -胡萝卜素产量有待提高。

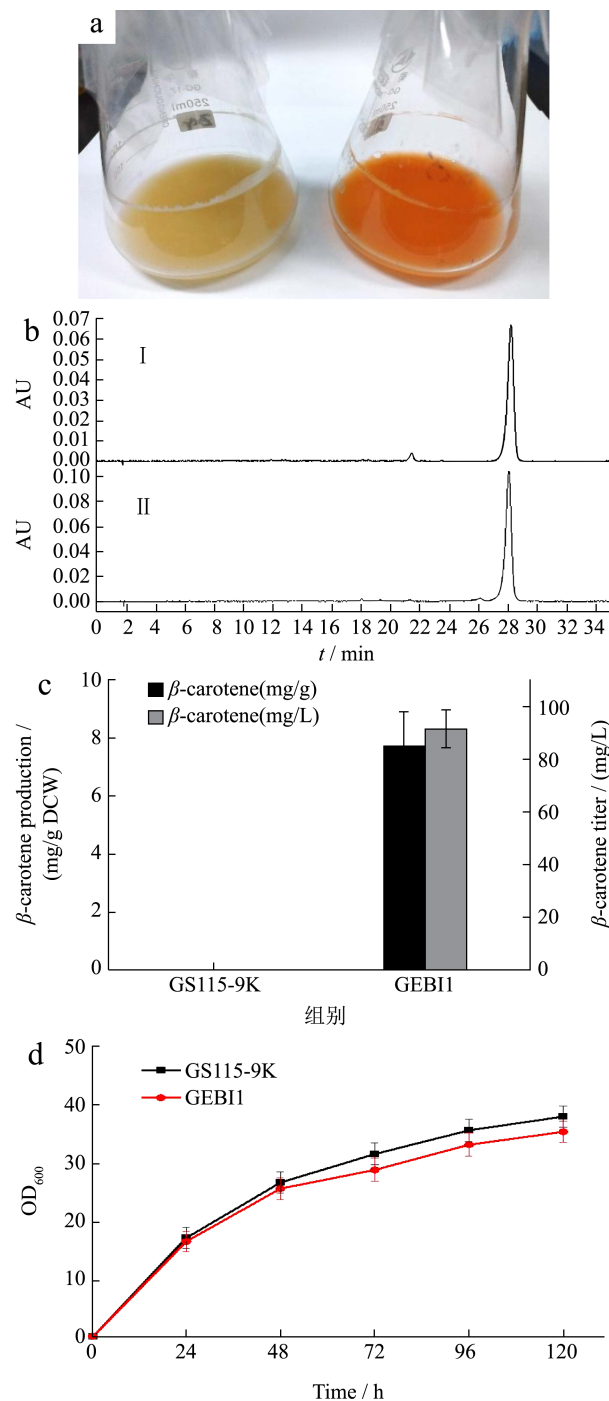


图 2 重组酵母工程菌株 GEB11 的表型鉴定

Fig.2 Phenotype identification of recombinant yeast strain GEB11

注: a: 重组工程菌株的摇瓶培养菌体图片; b: 重组菌株 GEB11 提取产物的 HPLC 分析 (I: GEB11 类胡萝卜素提取物; II: β -胡萝卜素标准品); c: 重组工程菌株 β -胡萝卜素产量; d: 重组工程菌株生长曲线。

2.2 β-胡萝卜素合成途径基因筛选

研究表明，异源合成途径中 *CrtE*、*CrtB* 和 *CrtI* 等关键酶的催化活性是限制底盘细胞合成效率的重要因素^[12]。本研究拟通过系统筛选不同物种来源的 *Crt* 基因组合来优化 β-胡萝卜素合成途径。具体而言，选取以下基因来源进行组合优化：*CrtE* 酶包括红法夫酵母（*Xanthophyllomyces dendrorhous*）来源的 *XdCrtE*、嗜夏孢欧文氏菌（*Pantoea ananatis*）来源的 *PaCrtE* 以及曼地亚红豆杉（*Taxus X media*）来源的 *TmCrtE*；*CrtYB* 酶包括红法夫酵母来源的 *XdCrtYB* 和 掷孢酵母（*Sporidiobolus pararoseus*）来源的 *SpCrtYB*；*CrtI* 酶包括红法夫酵母来源的 *XdCrtI* 和三孢布拉氏霉菌（*Blakeslea trispora*）来源的 *BtCrtI*，由此共获得 12 种不同的基因组合方案。各重组质粒的构建参照 pHKA-*XdCrtE*-*XdCrtYB*-*XdCrtI* 载体的构建方法，将 11 种重组质粒经 *Kpn2I* 限制性内切酶酶切线性化后，通过电穿孔法分别转化至毕赤酵母 GS115 中，最终获得重组工程菌株 GEBI2~GEBI12。

对重组工程酵母菌株摇瓶发酵及 β-胡萝卜素产量分析，12 株不同 *CrtEBI* 重组菌株的 β-胡萝卜素产量如图 3 所示。其中菌株 GEBI4 的 *XdCrtE*、*SpCrtB* 和 *BtCrtI* 组合的 β-胡萝卜素产量最高（215.70 mg/L，17.90 mg/g DCW），提高到初始菌株（91.38 mg/L，7.72 mg/g DCW）的 2.32 倍，效价提高到原来的 2.36 倍。研究结果表明，β-胡萝卜素关键酶合成基因的来源显著影响毕赤酵母异源合成 β-胡萝卜素的产量，异源基因筛选是提高 β-胡萝卜素表达量的有效手段。

同时可以看出，相较于 *CrtE* 和 *CrtI*，双功能八氢番茄红素合酶（*CrtYB*）对 β-胡萝卜素产量影响更为显著。如图 3 所示，来源于掷孢酵母的 *CrtYB2* 明显比来源于红法夫酵母的 *CrtYB1* 能产生更高产量的 β-胡萝卜素。这可能和 *CrtYB* 既具有八氢番茄红素合成酶活性，又具有番茄红素环化酶活性有关。*CrtYB* 蛋白质分子的 N-端包含六个跨膜区域，具有番茄红素环化酶的特征；C-端具有八氢番茄红素合成酶的特征^[13]。类胡萝卜素合成途径的第一步，*CrtYB* 的八氢番茄红素合成酶活性催化两个 GGPP 分子缩合形成八氢番茄红素，在类胡萝卜素合成途径的最后，由 *CrtYB* 的番茄红素环化酶活性催化的两个环化反应使番茄红素生成 β-胡萝卜素，因此一个酶影响了 β-胡萝卜素合成的两个关键步骤。后续

研究在最高产的重组酵母工程菌株 GEBI4 上进行。

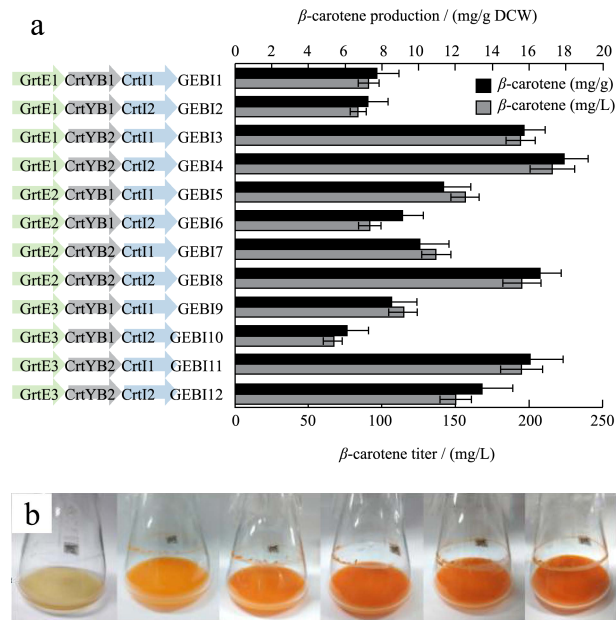


图 3 不同重组菌株 β-胡萝卜素产量比较

Fig.3 The comparison of β-carotene production of different recombinant yeast strain

注：a：重组菌株的 β-胡萝卜素产量（mg/g DCW）和滴度（mg/L）；b：重组菌株摇瓶 0、24、48、72、96、120 h 时的菌体图片。

2.3 β-胡萝卜素合成途径基因剂量优化

提高类胡萝卜素产量的其中一种策略是增加关键酶的基因拷贝数^[14]，为探究 β-胡萝卜素合成基因 *CrtE*、*CrtB*、*CrtI* 基因剂量对毕赤酵母 β-胡萝卜素合成产量的影响，分别对 β-胡萝卜素合成基因 *CrtE*、*CrtB*、*CrtI* 进行过表达，构建一系列含有不同 β-胡萝卜素基因拷贝数的重组酵母工程菌株。

表 3 不同基因拷贝数菌株构建

Table 3 Construction of strains with different gene copy numbers

Strains	Overexpressed genes
GEBI4	<i>CrtE</i> + <i>CrtYB</i> + <i>CrtI</i>
G04E	<i>CrtE</i> + <i>CrtYB</i> + <i>CrtI</i> + <i>CrtE</i>
G04B	<i>CrtE</i> + <i>CrtYB</i> + <i>CrtI</i> + <i>CrtYB</i>
G04I	<i>CrtE</i> + <i>CrtYB</i> + <i>CrtI</i> + <i>CrtI</i>
G04EBI(2copies-EBI)	<i>CrtE</i> + <i>CrtYB</i> + <i>CrtI</i> + <i>CrtE</i> + <i>CrtYB</i> + <i>CrtI</i>

利用课题组构建的抗性筛选标记循环质粒整合策略在 GEBI4 的基础上增加 β-胡萝卜素合成基因剂量。以 G04E 菌株构建为例，在重组质粒 pZACH 的基础上构建重组质粒 pZACH-*XdCrtE*，将其线性

化后电转至重组酵母菌株 GEBI4, 获得具有二拷贝 *XdCrtE* 表达盒的重组酵母菌株 G04E。按照上述同样的方法获得一系列不同 β -胡萝卜素的 β -胡萝卜素合成酵母工程菌株 G04B、G04I 和 G04EBI, 如表 3 所示为不同基因拷贝数菌株的构建。

在 GEBI4 菌株的基础上分别增加一个拷贝的 *XdCrtE*、*SpCrtYB*、*BtCrtI*、*XdrtE-SpCrtYB-BtCrtI* 得到 G04E、G04B、G04I 和 G04EBI 菌株。如图 4 所示, 所有四株菌株的 β -胡萝卜素产量较出发菌株 GEBI4 均有所提高, 最高产量的菌株 G04B 的 β -胡萝卜素产量提高了 21.32% (21.72 mg/g DCW), 效价提高了 43.48% (309.49 mg/L)。可见, 增加 β -胡萝卜素关键酶基因剂量可促进 β -胡萝卜素的合成, 其中增加了一份 *SpCrtYB* 拷贝的重组菌株 G04B 的 β -胡萝卜素产量提高幅度最大。宋佳^[13]在对掷孢酵母野生型 NGR 与黄化突变株 Y9 的类胡萝卜素合成关键酶基因进行差异表达分析时发现, 突变株与野生菌相比, 基因 *CrtYB* 显著上调, 基因 *CrtI* 和 *CrtE* 基因表达差异不显著^[13]。此外, 结果显示 *XdrtE*、*SpCrtYB*、*BtCrtI* 三个基因都是两拷贝的菌株 G04EBI 比只增加一份 *SpCrtYB* 拷贝的重组菌株 G04B 的 β -胡萝卜素产量低。*CrtI* 和 *CrtE* 拷贝数的增加反而影响了 β -胡萝卜素产量, 选用重组工程菌株 G04B 用于后续进一步改造。

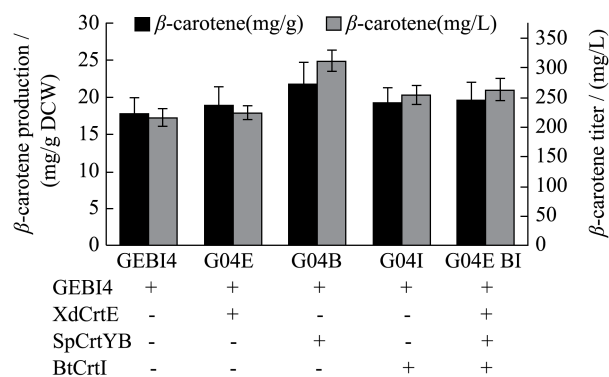


图 4 *CrtE*、*CrtYB*、*CrtI* 基因拷贝数对 β -胡萝卜素产量的影响

Fig.4 Effect of *CrtE*, *CrtYB*, *CrtI* copy number adjustment on the production of β -carotene

2.4 β -胡萝卜素合成代谢调控优化

2.4.1 强化MVA途径前体供应

HMGR 和 *IDI* 是 MVA 途径的关键酶, 通过过表达 *HMGR* 和 *IDI* 可以提高 MVA 途径的前体供应量^[15]。过表达 *HMGR* 和 *IDI* 对 β -胡萝卜素产量的

影响如图 5 所示, 提高 MVA 途径前体物质供给对 β -胡萝卜素产量仅有很小的提升, 单独过表达 *HMGR* 和 *IDI* 时 β -胡萝卜素几乎没有提升, 而 *HMGR* 和 *IDI* 联合过表达时 β -胡萝卜素产量也仅仅提高了 1.565%。结果显示, 该菌株的 MVA 途径前体物质的供应并不是 β -胡萝卜素生产途径中的限速步骤, 应该从其他方面切入去提高 β -胡萝卜素产量。

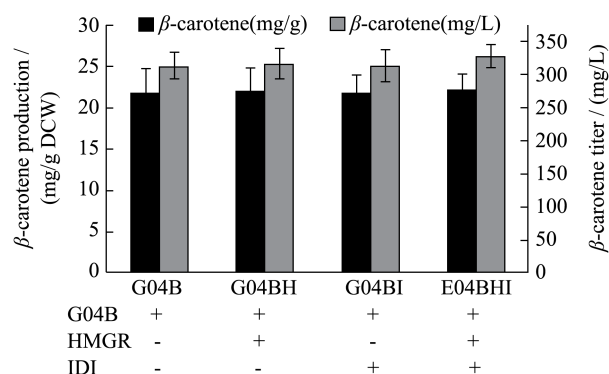


图 5 过表达 *HMGR* 和 *IDI* 对 β -胡萝卜素产量的影响

Fig.5 Overexpression of *HMGR* and *IDI* on the production of β -carotene

2.4.2 还原力 (NADPH) 供给优化

工程化的代谢途径与内源性细胞代谢强度相关并且受到严格调控, 类胡萝卜素的合成需要大量的还原力 (NADPH), 其供应会影响细胞代谢流量^[16]。在酿酒酵母中, NADH 激酶 *POS5* 主要将 NADH 转化为 NADPH, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 *ZWF1* 可促进 NADPH 的生成, 相关文献报道毕赤酵母中过表达 *ZWF1* 可增强 PPP 途径并调节 NADPH 的生成。

过表达 *POS5* 和 *ZWF1* 对 β -胡萝卜素产量的影响如图 6 所示, 结果显示, 单独过表达 *POS5* 使得 β -胡萝卜素产量下降了 3.34%, 单独过表达 *POS5* 使得 β -胡萝卜素产量下降了 7.52%, 而联合过表达 *POS5* 和 *ZWF1* 使得 β -胡萝卜素产量下降了 16.89%。推测可能的原因是过表达 *POS5* 基因和 *ZWF1* 基因导致代谢通路之间产生了串扰, 不利于 β -胡萝卜素产量的积累。另外一个原因推测可能是毕赤酵母本身具有足够的 NADPH 供应量, 所以不需要再增加 NADPH 的供应, 文献显示, Peng 等^[17]在利用毕赤酵母生产游离脂肪酸 (FFAs) 的实验中, 也尝试了几种增加 NADPH 供应的策略, 但都导致了较低的 FFA 产量, 他们在做了辅因子定量后发现, 甲醇培养的毕赤酵母的 NADPH/NADP⁺ 水平显著高于酿酒酵母。尽管 FFA 生物合成消耗了大量 NADPH, 但它们的 NADPH/NADP⁺ 水平仍远高于酿酒酵母。

结合文献和实验结果表明, 甲醇培养的毕赤酵母细胞具有足够的 NADPH 供应用于类胡萝卜素的生物合成, 这可以解释为什么 NADPH 工程策略在酿酒酵母中成功, 但在毕赤酵母中失败, 所以该菌株的 NADPH 供应并不是 β -胡萝卜素生产途径中的限制性因素, 应该从其他方面切入去提高 β -胡萝卜素产量。

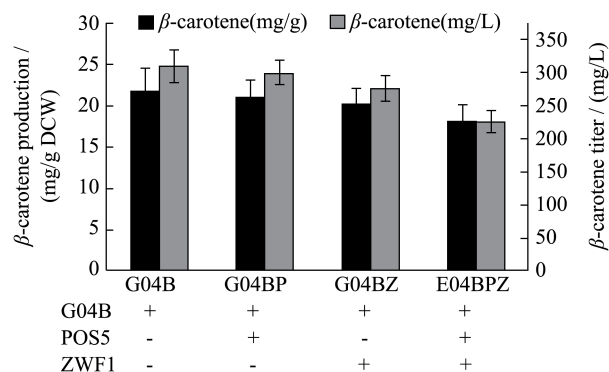


图 6 过表达 *POS5* 和 *ZWF1* 对 β -胡萝卜素产量的影响

Fig.6 Overexpression of *POS5* and *ZWF1* on the production of β -carotene

2.4.3 改善脂类合成

β -胡萝卜素属于疏水亲脂性化合物, 改善细胞中的脂质合成有助于细胞中 β -胡萝卜素合成及贮存^[18]。相关研究表明, 在酿酒酵母中过表达 *OLE1* 基因编码的硬脂酰辅酶-9-去饱和酶, 可以从饱和脂肪酸 (C16:0 和 C18:0) 产生单不饱和脂肪酸 (C16:1 和 C18:1)。*OLE1* 基因的过表达增加了单不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例, 并有助于膜的柔韧性, 可以使细胞膜中不饱和脂肪酸的增加从而有利于番茄红素的生产。红发夫酵母中固醇调节元件结合蛋白 *SREBP* (*Sre*), 是固醇稳态和其他细胞过程的保守转录因子, 甲羟戊酸途径和麦角固醇生物合成的基因直接受 *Sre* 调控。该转录因子可以在该酵母中调控甾醇相关脂类的合成及合成类胡萝卜素前体所需的甲羟戊酸途径中的基因上调, 而促进该酵母中类胡萝卜素合成。

本研究尝试通过过表达 *OLE1* 和 *Sre* 基因来提高类胡萝卜素产量。如图 7 所示, 单独过表达 *Sre* 时, β -胡萝卜素产量所有提升, 滴度与出发菌 (309.49 mg/L) 相比提高了 18.44% (366.55 mg/L), 产量与出发菌 (21.71 mg/g DCW) 相比提高了 12.10% (24.34 mg/g DCW)。而单独表达 *OLE1* 时, β -胡萝卜素产量下降了 10.25%, *OLE1* 和 *Sre* 联合过表达时 β -胡萝卜素产量下降了 16.25%。Zhang 等^[9]在过表达 *Sre* 后, 毕赤酵母番茄红素的产量提高到原来

的 10.87%; 转录组数据分析后显示转录因子 *Sre* 过表达促进重组酵母脂类合成途径中鞘磷脂等物质的合成, 进而促进类胡萝卜素的合成及贮存, 使类胡萝卜素产量提高^[9]。由此可见, 通过改善细胞中的脂质合成一定程度上有助于细胞中 β -胡萝卜素的合成及贮存。

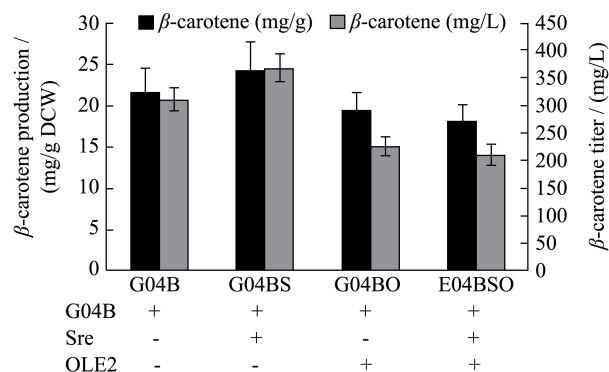


图 7 过表达 *Sre* 和 *OLE1* 对 β -胡萝卜素产量的影响

Fig.7 Overexpression of *Sre* and *OLE1* on the production of β -carotene

2.5 重组 β -胡萝卜素酵母工程菌株 5 L 发酵罐高密度发酵

将重组菌株 G04BS 在 5 L 发酵罐中高密度发酵, 发酵液的 pH 值维持在 6.0, 溶氧维持在 20% 空气饱和度左右。当菌体生长 41 h 时, 菌体 OD₆₀₀ 达到 206 时, 开始甲醇诱导, 发酵到 137 h, 即甲醇诱导 96 h 时, β -胡萝卜素产量达到最高 6.15 g/L (49.16 mg/g DCW), 随后 OD₆₀₀ 和 β -胡萝卜素产量都略有下降 (图 8)。

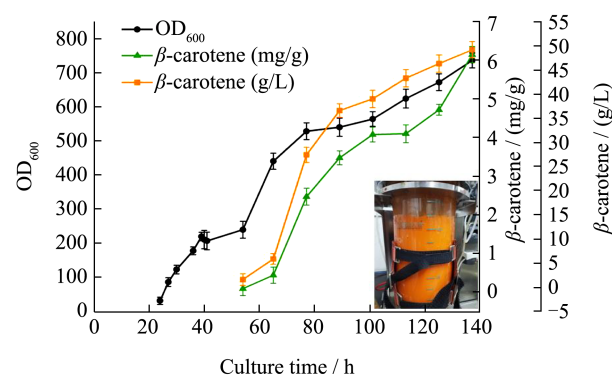


图 8 重组菌株 G04BS 在 5 L 发酵罐的产 β -胡萝卜素分析

Fig.8 β -carotene production of recombinant strain G04BS in 5 L fermenter

在现有的微生物细胞工厂异源合成类胡萝卜素的工程菌中, 不同菌株表现出各自的优势和局限性。大肠杆菌通过引入动态调控 MEP 途径, 并结合

CRISPRi或动态传感器调控系统,可实现6.2 g/L的 β -胡萝卜素产量^[19]。大肠杆菌优势在于遗传操作简便、生长速度快,但受限于代谢毒性及前体优化的复杂性。谷氨酸棒杆菌通过优化中心碳代谢、增强PPP途径及使用RNA调控元件,产量达到2.3 g/L^[20]。其优势在于碳源利用能力强、代谢毒性低,适合工业化生产,但产量相对较低。而红法夫酵母作为天然产类胡萝卜素的酵母,通过过表达crt基因(*CrtI*和*CrtYB*)并优化发酵条件,产量为1.5 g/L^[21]。其优势在于天然合成能力,但遗传操作复杂且生长缓慢。酿酒酵母通过优化MVA途径、过表达*HMG1*和*ERG20*等策略,产量达到3.2 g/L^[1]。其优势在于操作简便、食品安全性高且耐受性强。此外,解脂耶氏酵母在补料批式培养中实现了6.5 g/L的 β -胡萝卜素产量^[8]。其优势在于高效的脂质合成能力,能够将 β -胡萝卜素储存于脂质体中,产量较高,但代谢调控较为复杂。本研究中,通过异源基因筛选,在毕赤酵母中引入 β -胡萝卜素合成基因,并结合甲羟戊酸途径优化、辅因子NADPH供给优化以及过表达脂质合成优化基因等策略,对毕赤酵母的 β -胡萝卜素合成途径进行优化重构。最终,毕赤酵母的 β -胡萝卜素产量高达6.15 g/L (49.16 mg/g DCW),显著高于酿酒酵母和红法夫酵母,并接近解脂耶氏酵母的最高产量。这一结果表明,毕赤酵母在类胡萝卜素异源合成中具有重要的应用潜力。

3 结论

本论文构建了毕赤酵母细胞工厂,筛选出较优的基因组合*XdCrtE*、*SpCrtB*和*BtCrtI*,使得重组酵母工程菌株GEBI4的 β -胡萝卜素滴度达到215.70 mg/L,产量为17.90 mg/g DCW。随后,通过调节基因剂量,将 β -胡萝卜素产量提高了21.3% (21.71 mg/g DCW),效价提高了43.48% (309.49 mg/L)。进一步通过MVA途径优化、辅因子NADPH供给优化以及过表达脂质合成优化基因,最终获得重组酵母工程菌株G04BS,其 β -胡萝卜素产量达到366.55 mg/L (24.34 mg/g DCW);在5 L发酵罐高密度发酵时,产量高达6.15 g/L (49.16 mg/g DCW),为目前文献中毕赤酵母 β -胡萝卜素产量的最高水平。

毕赤酵母作为一种高效的微生物底盘细胞,适合表达复杂的代谢途径基因,其强启动子(如AOX1)可以实现外源基因的高效表达,为 β -胡

萝卜素合成途径的优化提供了基础。同时,毕赤酵母具有可高密度发酵的优势,能够在低成本培养基中实现大规模生产,在 β -胡萝卜素合成方面具有显著优势。本研究通过代谢重构,成功构建了高产 β -胡萝卜素的毕赤酵母细胞工厂,为类胡萝卜素的异源合成提供了重要参考。未来研究可从以下几个方面进一步优化:首先,通过调控与萜类合成相关的转录因子(如Sre)和信号通路,优化全局代谢网络,以提高 β -胡萝卜素产量;其次,结合高通量筛选和适应性进化策略,快速获得高产菌株;最后,整合多组学数据和系统生物学建模,揭示毕赤酵母 β -胡萝卜素合成的代谢网络,预测关键优化靶点。这些策略不仅有望进一步提升 β -胡萝卜素的产量和生产效率,还可为毕赤酵母合成其他萜类化合物的代谢工程改造提供理论依据和技术支持。

参考文献

- [1] SUN Y, SUN L, SHANG F, et al. Enhanced production of β -carotene in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by inverse metabolic engineering with supplementation of unsaturated fatty acids [J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(5): 568-577.
- [2] JOHNSON E J. The role of carotenoids in human health [J]. *Nutrition in Clinical Care*, 2002, 5(2): 56-65.
- [3] BOON C S, MCCLEMENTS D J, WEISS J, et al. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2010, 50(6): 515-532.
- [4] KRINSKY N I, JOHNSON E J. Carotenoid actions and their relation to health and disease [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005, 26(6): 459-516.
- [5] ZHAO J, LI Q, SUN T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production [J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 17: 42-50.
- [6] POLLMANN H, BREITENBACH J, SANDMANN G. Engineering of the carotenoid pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous* leading to the synthesis of zeaxanthin [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101: 103-111.
- [7] GAO S, TONG Y, ZHU L, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 192-201.
- [8] LARROUDE M, CELINSKA E, BACK A, et al. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018,

- 115(2): 464-472.
- [9] 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.
- [10] YOON S H, KIM J E, LEE S H, et al. Engineering the lycopene synthetic pathway in *E.coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea ananatis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74: 131-139.
- [11] NIU F X, LU Q, BU Y F, et al. Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids: carotenoids and isoprenoid-based biofuels [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2017, 2(3): 167-175.
- [12] ZHU H Z, JIANG S, WU J J, et al. Production of high levels of 3 S, 3' S-astaxanthin in *Yarrowia lipolytica* via iterative metabolic engineering [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(8): 2673-2683.
- [13] 宋佳. 掷孢酵母八氢番茄红素合成酶/番茄红素环化酶(*CrtYB*)功能研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- [14] SHI B, MA T, YE Z, et al. Systematic Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Lycopene Overproduction [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(40): 11148-11157.
- [15] LI C, SWOFFORD C A, SINSKEY A J. Modular engineering for microbial production of carotenoids [J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 10: e00118-e.
- [16] HONG J, PARK S-H, KIM S, et al. Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by enzyme engineering and increasing membrane flexibility and NAPDH production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(1): 211-223.
- [17] CAI P, WU X, DENG J, et al. Methanol biotransformation toward high-level production of fatty acid derivatives by engineering the industrial yeast *Pichia pastoris* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2022, 119(29): e2201711119.
- [18] WANG C, ZHAO S, SHAO X, et al. Challenges and tackles in metabolic engineering for microbial production of carotenoids [J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18: 55.
- [19] YE L, ZHANG C, BI C, et al. Combinatory optimization of chromosomal integrated mevalonate pathway for β -carotene production in *Escherichia coli* [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 1-10.
- [20] CHU L L, TRAN C T B, PHAM D T K, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of flavonoids and stilbenoids [J]. Molecules, 2024, 29(10): 2252.
- [21] RODRÍGUEZ-SÁIZ M, DE LA FUENTE J L, BARREDO J L. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(3): 645-658.