解脂耶氏酵母异源合成番茄红素代谢途径的构建与调控

李晨，张桂林，付晓丹，刘振*，李宁阳

（中国海洋大学食品科学与工程学院，海洋食品加工与安全控制国家重点实验室，青岛市食品生物技术重点实验室，中国轻工业水产品生物加工重点实验室，山东青岛 266404）

摘要：番茄红素作为一种具有强抗氧化活性与重要健康益处的天然色素，其传统获取方式存在来源有限或提取成本高昂等问题，因此利用微生物细胞工厂实现其高效合成成为研究热点。为实现番茄红素在解脂耶氏酵母中的高效合成，研究首先通过共表达 *CrtB* 与 *CrtI* 基因，成功构建了初始合成途径。为提升前体供应，采用 RIAD/RIDD 介导的模块化策略组装 IDI 与 GGS1，进一步通过多拷贝表达关键基因 *CrtB-CrtI* 及异源表达甲羟戊酸途径关键酶 MvaE 与 $MvaS_{MT}$ 以强化代谢通量，以及协同表达 *ERG12-GGPPxd*，并在探究下游催化瓶颈发现 *CrtI* 的表达对产量提升更为显著。继而引入解除底物抑制且保留八氢番茄红素合成功能的突变酶 $CarRP^{E78K+Y27R}$ 能够显著促进番茄红素的积累，整合上述优化策略获得的工程菌株 lyc7-6 产量达到 288.91 $mg·L^{-1}$。综上，通过系统构建与逐步优化番茄红素合成途径，包括异源基因引入、模块化酶组装、多拷贝表达、上游途径强化及下游关键限速步骤，有效提升番茄红素在解脂耶氏酵母中的产量，为萜类高值化合物的微生物细胞工厂理性设计提供范例。

关键词：解脂耶氏酵母；番茄红素；牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸；限速步骤

文章编号：1673-9078(2026)10-29-38 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.0101

Construction and Regulation of A Heterologous Lycopene Biosynthetic Pathway in *Yarrowia lipolytica*

LI Chen, ZHANG Guilin, FU Xiaodan, LIU Zhen*, LI Ningyang

(State Key Laboratory of Marine Food Processing and Safety Control, College of Food Science and Engineering, Qingdao Key Laboratory of Food Biotechnology, Key Laboratory of Biological Processing of Aquatic Products, China National Light Industry, Ocean University of China, Qingdao 266404, China)

Abstract: Lycopene, a natural pigment with potent antioxidant activity and significant health benefits, is difficult to obtain through conventional approaches because of limited natural sources and the high cost of extraction. Consequently, microbial cell factories have emerged as a promising platform for efficient lycopene production. To achieve high-level lycopene production in *Yarrowia lipolytica*, an initial biosynthetic pathway was constructed by co-expressing the *CrtB* and *CrtI* genes. To enhance precursor supply, a RIAD/RIDD-mediated modular assembly strategy was employed to co-localize IDI and GGS1. Metabolic flux was further enhanced through multi-copy integration of *CrtB* and *CrtI*, heterologous expression of the mevalonate pathway enzymes MvaE and $MvaS_{MT}$, and coordinated expression of *ERG12* and *GGPPxd*. Analysis of downstream catalytic limitations revealed that increasing *CrtI* expression had a greater effect on lycopene production than increasing *CrtB* expression. Subsequently, introduction of the mutant enzyme $CarRP^{E78K+Y27R}$, which relieves substrate inhibition while retaining phytoene synthase activity, significantly increased lycopene accumulation. The final engineered strain, lyc7-6, incorporating these optimization strategies, achieved a lycopene titer of 288.91 $mg·L^{-1}$. Collectively, systematic engineering of the lycopene

收稿日期：2026-01-19；修回日期：2026-03-28；接受日期：2026-04-01

基金项目：国家自然科学基金项目（32172178）

作者简介：李晨（2001-），女，硕士研究生，研究方向：食品生物技术，E-mail：lichen10248@163.com

通讯作者：刘振（1982-），男，博士，教授，研究方向：食品生物技术，E-mail：liuzhenyq@ouc.edu.cn

biosynthetic pathway through heterologous gene introduction, modular enzyme assembly, multi-copy gene integration, enhancement of precursor supply, and optimization of downstream catalytic efficiency substantially increased lycopene production in *Y. lipolytica*. These findings provide a framework for the rational design of microbial cell factories for the production of high-value terpenoids.

Key words: *Yarrowia lipolytica*; lycopene; geranylgeranyl pyrophosphate; rate-limiting step

引文格式：

李晨,张桂林,付晓丹,等.解脂耶氏酵母异源合成番茄红素代谢途径的构建与调控[J].现代食品科技,2026,42(10):29-38.

LI Chen, ZHANG Guilin, FU Xiaodan, et al. Construction and regulation of a heterologous lycopene biosynthetic pathway in *Yarrowia lipolytica* [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 29-38.

番茄红素（Lycopene）作为C_{40}天然类胡萝卜素，是由 11 个共轭双键和 2 个非共轭双键构成的直链碳氢化合物[1]。在自然界中，番茄红素主要作为八氢番茄红素等类胡萝卜素的下游产物，通过脱氢、环化等酶促反应进一步转化为其他具有重要生理功能的萜类色素[2]。

作为脂溶性色素，番茄红素主要存在于番茄、西瓜、番石榴及红肉葡萄柚中。与部分类胡萝卜素（如*β*-胡萝卜素）不同，番茄红素在人体内不具备维生素 A 原活性，其核心生物学价值主要源于其强大的抗氧化性[3]。凭借其强效抗氧化机制，番茄红素在预防慢性疾病和延缓衰老方面展现出多维生理活性，具体包括：降低前列腺癌、肺癌等恶性肿瘤风险；减缓心血管动脉粥样硬化进程；抵御皮肤光老化；并对眼部健康及免疫调节产生潜在积极影响[1,4,5]。然而，植物中的番茄红素含量会受到生长条件、季节性及品种等因素的显著影响，新鲜番茄样品中番茄红素的含量范围为 1.82~11.19 mg/100 g[6]。此外，提取过程复杂且成本高昂，难以满足不断增长的市场需求。近年来，合成生物学作为类胡萝卜素大规模生产的关键技术手段应运而生，它能够高效、经济且可持续地合成特定化合物[7]。目前，利用微生物异源合成番茄红素已成为研究热点，大肠杆菌（*Escherichia coli*）和酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）等微生物已被成功改造为生产番茄红素的细胞工厂[8,9]。大肠杆菌缺乏内源甲羟戊酸（MVA）途径，需引入外源途径，且产物储存能力弱，亲脂性番茄红素易嵌入细胞膜，导致细胞生长抑制和产量受限[10]；酿酒酵母虽具备内源 MVA 途径，但前体乙酰辅酶 A 合成效率较低，副产物甾醇竞争前体削弱番茄红素通量[11]。因此，开发兼具高效前体供应、强大产物储存能力及工业适应性的底盘细胞，已成为突破番茄红素生物制造瓶颈的核心方向。在微生物宿主中，解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）因其独特的生理代谢特性，是极具潜力的番茄红素合成细胞工厂[12]。解脂耶氏酵母已被美国食品药品监督管理局（FDA）认定为“公认安全”（Generally Recognized As Safe, GRAS）微生物，适用于食品、制药及其他领域的高品质生产。该酵母作为天然产油微生物，具备强大的乙酰辅酶 A 生成能力和胞质甲羟戊酸（MVA）途径，能够为番茄红素合成提供充足的前体异戊烯基焦磷酸及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸[12,13]。其胞质中可积累大型脂滴，为类胡萝卜素等亲脂性产物提供天然储存位点，这不仅提升细胞的承载能力，还降低产物对细胞膜的毒性[13,14]。同时，解脂耶氏酵母可高密度发酵，能够在低成本培养基中实现大规模生产，在番茄红素合成方面具有显著优势。目前，已有研究在解脂耶氏酵母中实现番茄红素的异源合成，但仍存在前体供应不足、代谢途径不平衡以及下游催化效率低等问题，制约其产量进一步提升。

基于上述背景，本研究采用系统代谢工程策略，在解脂耶氏酵母中实现目标萜类化合物番茄红素的高效生物合成（图 1）。首先，在宿主细胞中构建番茄红素合成通路，创新性地引入 RIAD/RIDD 介导的蛋白模块化共组装策略，协同优化异戊烯基焦磷酸异构酶（IDI）与牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶（GGS1）的表达效率，显著增强前体向产物的定向通量。表达内源甲羟戊酸（MVA）途径基因与引入异源高效 MVA 上游模块的双重策略，协同提升前体通量，提供关键中间体 GGPP；最后，引入高效下游催化模块 *CarB-CarRP*$^{E78K+Y27R}$，将前体高效特异性地转化为目标产物，并减少副产物积累。通过上述多层次模块化重塑，本研究最终实现番茄红素产量的突破性提升，为解脂耶氏酵母中萜类化合物的高效合成提供了可复制的系统代谢工程范例。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒构建

本研究涉及的所有质粒和菌株信息详见表 1。其中，来自成团泛菌（*Pantoea agglomerans*）*CrtB* 基因与携带 Y160F 与 N576S 突变的三孢布拉氏霉（*Blakeslea trispora*）*CrtI* 基因，来自卷枝毛霉菌（*Mucor circinelloides*）的 CarRP 和 CarB 基因，来自粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）的 *MvaE* 和 *MvaS* 序列，来源于红法夫酵母（*Xanthophyllomyces dendrorhous*）的 *GGPPxd* 基因均经解脂耶氏酵母密码子偏好性优化后，并由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。*IDI*、*GGS*1、*ERG12* 基因来源于解脂耶氏酵母（*Y. lipolytica*）PO1h 基因组。目标基因及质粒骨架等线性片段的扩增均采用 2×Phanta Max Master Mix（Dye Plus）DNA 聚合酶，所用特异性引物如表 2 所示。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳验证后，使用 Cycle Pure 纯化试剂盒（Omega Bio-tek）进行纯化。质粒构建采用 ClonExpress Ultra 一步克隆试剂盒（诺唯赞，南京）完成无缝克隆，并通过 TIANprep Rapid Mini 质粒提取试剂盒依照说明书进行质粒提取。所有重组质粒均交由生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序验证。

在解脂耶氏酵母基因整合中，本研究采用 Cre/loxP 系统对 URA3 标记回收。在回收该标签时通过转化 pUB4-Cre 质粒，后涂板于含潮霉素 1 000 μg·mL^{-1} 的 YPD 培养基，未转入质粒的酵母细胞无法在平板上生长，存活的细胞则继续划线于 SD-URA 和 YPD 平板，传代 2~3 次在 SD-URA 平板上不生长，在 YPD 平板上正常生长即为成功回收 URA3 标签的营养缺陷型菌株。

1.1.2 培养基配方

LB 培养基：0.5%（*m/V*）酵母粉，1%（*m/V*）蛋白胨，1%（*m/V*）的 NaCl，固体培养基需加入 2%（*m/V*）琼脂粉，115 ℃高温高压灭菌 30 min。YPD 培养基：1%（*m/V*）酵母粉，2%（*m/V*）蛋白胨，固体培养基需加入 2%（*m/V*）琼脂粉，115 ℃高温高压灭菌 30 min，再加入 10%（*V/V*）的 20%（*m/V*）葡萄糖溶液。SD-Ura 固体培养基：8 g·L^{-1} 的 SD-Ura 粉末，加入 1 mol·L^{-1} 的 NaOH 调节 pH 至中性，再加入 2%（*m/V*）琼脂粉，115 ℃高温高压灭菌 30 min，再加入 10%（*V/V*）的 20%（*m/V*）葡萄糖溶液。

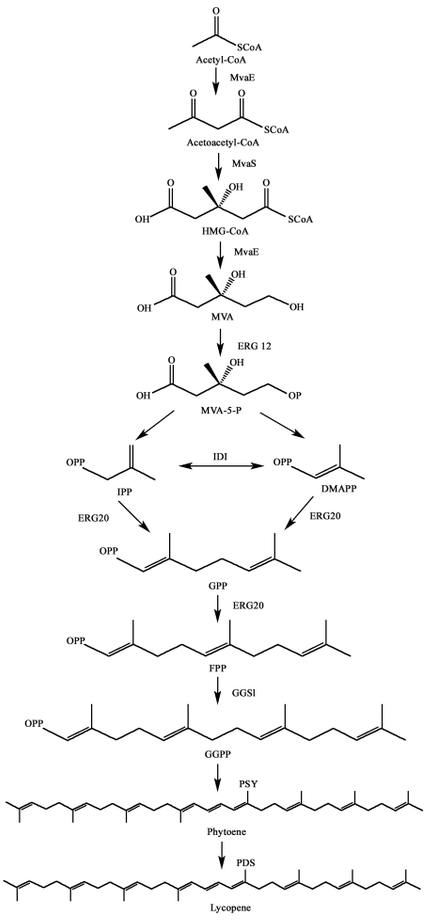


图 1 在解脂耶氏酵母中构建的番茄红素合成途径

Fig.1 Construction of the lycopene biosynthetic pathway in *Y. lipolytica*

注：乙酰辅酶 A（Acetyl-CoA, Acetyl-CoA）；乙酰乙酰辅酶 A（Acetoacetyl-CoA, Acetoacetyl-CoA）；3- 羟基-3- 甲基戊二酰辅酶 A（3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA）；甲羟戊酸（Mevalonic acid, MVA）；甲羟戊酸 -5- 磷酸（Mevalonic acid-5-phosphate, MVA-5-P）；异戊烯基焦磷酸（Isopentenyl pyrophosphate, IPP）；二甲基烯丙基焦磷酸（Dimethylallyl diphosphate, DMAPP）；牻牛儿基焦磷酸（Geranyl pyrophosphate, GPP）；法尼基焦磷酸（Farnesyl pyrophosphate, FPP）；牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸（Geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP）；八氢番茄红素（Phytoene）；番茄红素（Lycopene）。乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 /3- 羟基 -3- 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶（acetyl-CoA acetyltransferase/3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, MvaE）；3- 羟基 -3- 甲基戊二酰辅酶 A 合成酶（3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, MvaS）；甲羟戊酸激酶（Mevalonate kinase, ERG12）；异戊烯基焦磷酸异构酶（Isopentenyl pyrophosphate isomerase, IDI）；牻牛儿基焦磷酸合成酶 / 法尼基焦磷酸合成酶（Geranyl pyrophosphate synthase/farnesyl pyrophosphate synthase, ERG20）；牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶（Geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGS1）；八氢番茄红素合成酶（Phytoene synthase, PSY）；八氢番茄红素脱氢酶（Phytoene dehydrogenase, PDS）。

表 1 本研究使用的质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this research

	名称	相关信息	来源
Plasmid	pUB4-Cre	P_{hp4d}-cre, HygR	本实验室保藏
	CrtB-CrtI	pMT-P_{ETF}-*CrtB*-T_{XPR2}-P_{gpd}-*CrtI*-T_{LIP1t}-URA	本实验构建
	CarB-CarRP$^{E78K+Y27R}$	pMT-P_{ETF}-*CarRP*$^{E78K+Y27R}$-T_{XPR2}-P_{gpd}-*CarB*-T_{LIP1t}-URA	本实验构建
	CarB-CarRP^{Y27R}	pMT-P_{ETF}-*CarRPY27R*-T_{XPR2}-P_{gpd}-*CarB*-T_{LIP1t}-URA	本实验构建
	IDI-GGS1	pMT-P_{ETF}-*IDI*-T_{XPR2}-P_{gpd}-*GGS1*-T_{LIP1t}-URA	本实验室保藏
	MvaE-$MvaS_{MT}$	pMT-P_{ETF}-*MvaE*-T_{XPR2}-P_{gpd}-*MvaS*$_{MT}$-T_{LIP1t}-URA	本实验室保藏
	ERG12-GGPPxd	pMT-P_{ETF}-*ERG12*-T_{XPR2}-P_{gpd}-*GGPPxd*-T_{LIP1t}-URA	本实验室保藏
Strain	PO1f	matA, leu2-270, ura3-302, xpr2-322, axp1-2, leu$^-$,ura$^-$, ΔAEP, ΔAXP, Suc$^+$	本实验室保藏
	lyc1-1	*CrtB-CrtI* cassette in PO1f	本实验构建
	lyc2DG4	*IDI-GGS1* cassette in lyc1-1	本实验构建
	lyc3BI	*CrtB-CrtI* cassette in lyc2DG4	本实验构建
	lyc3M	*MvaE-MvaS*$_{MT}$ cassette in lyc2DG4	本实验构建
	lyc4BI	*CrtB-CrtI* cassette in lyc3BI	本实验构建
	lyc4M	*MvaE-MvaS*$_{MT}$ cassette in lyc3BI	本实验构建
	lyc5M5	*MvaE-MvaS*$_{MT}$ cassette in lyc4-6	本实验构建
	lyc6G9	*ERG12-GGPPxd* cassette in lyc5M5	本实验构建
	lyc5-B	*CrtB* cassette in lyc5	本实验构建
	lyc5-I	*CrtI* cassette in lyc5	本实验构建
	lyc5-BI	*CrtB-CrtI* cassette in lyc5	本实验构建
	lyc6-7827	*CarB-CarRP*$^{E78K+Y27R}$ cassette in lyc6G9	本实验构建
	lyc6-78	*CarB-CarRP*^{E78K} cassette in lyc6G9	本实验构建
	lyc6-0	*CarB* cassette in lyc6G9	本实验构建
	lyc7-6	*CarB-CarRP*$^{E78K+Y27R}$ cassette in lyc6G9	本实验构建

1.1.3 解脂耶氏酵母工程菌株的构建

将表达的线性 DNA 片段以随机插入的方式整合进解脂耶氏酵母基因组，转化方法如下：以质粒为模板，使用 2×Phanta Max Master Mix（Dye Plus）DNA 聚合酶扩增得到线性化片段。感受态细胞的制备：使用 YPD 培养基 30 ℃，220 r·min^{-1} 培养菌体 12~24 h。取 1 mL 菌液，3 000×*g* 离心 2 min，弃上清。加 1 mL 的 1×TE 缓冲液重新悬浮菌体，再 3 000×*g* 离心 2 min，弃上清。加 1 mL 的 0.1 mol·L^{-1} 的 LiAc 重新悬浮菌体，30 ℃静置 1 h 后 3 000×*g* 离心 2 min，弃上清。加 500 μL 的 0.1 mol·L^{-1} 的 LiAc 重新悬浮菌体，分装成 40 μL 管。每管感受态细胞加入 5 μL 鲑鱼精 DNA 和 0.5~5 μg 线性片段，轻轻吹打混匀，30 ℃静置 15 min 后加 280 μL 的 50% PEG4000、35 μL 的水、35·μL 的 1 mol·L^{-1} LiAc 和 16 μL 的 1 mol·L^{-1} DTT 溶液，30 ℃静置 1 h。加 40 μL DMSO，39 ℃热激 10 min；加 600 μL 的 0.1 mol·L^{-1} LiAc，25 ℃静置 30 min；3 000×*g* 离心 2 min，弃部分上清，留 100 μL 左右液体，轻轻吹打混匀；涂布于 URA 缺陷型固体平板（含 100 μg·L^{-1} 氨苄青霉素）在 30 ℃培养箱中培养 2~3 d。各工程菌株的基因型描述详见表 1。

1.1.4 主要仪器设备

ZQZY-88BE 全温振荡培养箱，上海知楚仪器有限公司；DHP-9051 微生物培养箱，上海一恒科学仪器有限公司；48L 全自动样品快速研磨仪，上海净信实业发展有限公司；Trident960 基因扩增仪，力康生物医疗科技控股有限公司；1-14 SIGMA 离心机，德国 SIGMA；InGenius 照胶仪，基因有限公司；HH-4A 数显恒温水浴锅，国华（常州）仪器制造有限公司；GI80TW 立式自动压力蒸汽灭菌器，致微仪器有限公司；HYC-940 医用冷藏箱，青岛海尔生物医疗股份有限公司；DW-30L278 医用低温保存箱，青岛海尔生物医疗股份有限公司；DW-86L416G 低温保存箱，青岛海尔生物医疗股份有限公司；Smart 系列超纯水机，青岛莱伯瑞科技有限公司；DYY-6C 电泳仪，北京六一生物科技有限公司；LC-20AT Prominence 液相色谱仪，日本岛津；

BSA124S 电子天平，赛多利斯科学仪器有限公司。

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物	序列 (5'-3')
PacrtB-F	gtactaaccgcaggccaccatgtcccagcccccc
PacrtB-R	caagaccggcaacgtggggttacacaggtcgctgccaaagac
boneB-F	ccccacgttgccggtcttg
boneB-R	ggtggcctgcggttagtactg
crtI-F	ttagattcggatgtcgttagaagactggc
crtI-R	atgtccgaccagaagaagcac
boneI-F	cttcttctggtcggacatggtggccatcgtggatgtg
boneI-R	aacgacatccgaatctaaggttcatgagaagataaatatataaatacattgag
ceB-F	gtctggccatccgggtaacc
ceB-R	gacgggattttgccacctacaag
ceI-F	gtgtatatagaacctttccccagcttgtg
insert5-F	acgccagcaagacgtagcccagcgc
insert5-R	ggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacc
Y27R-R2	cggtgtatcggggtcgggacagccaagacaggacg
Y27R-F1	cccgaccccgatacaccgccaccgacg
Y27R-R1	gctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatc
Y27R-F2	gccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagc
RP529-78F	gttcttcatcattatgaccctcctgactgtcgccttcactaacctcgtc
halfRP-F	cttctacaccgcctctgccgtgttc
halfRP-R	gaacacggcagaggcggtgtagaag

1.2 菌株摇瓶发酵

将菌落 PCR 验证正确的菌株划线在 YPD 平板培养基 30 ℃倒置培养 24 h，挑取少量形态饱满、生长良好的单菌落接入含有 10 mL 的 YPD 培养基的摇瓶（50 mL 规格）中，30 ℃，220 r·min^{-1} 震荡培养 12 h，制备发酵种子液。将种子液接入盛有 50 mL 的 YPD 发酵培养基的摇瓶（250 mL 规格）中，接菌量为 2%（*V/V*），30 ℃，220 r·min^{-1} 震荡培养 120 h。

1.3 番茄红素的提取和定量方法

1.3.1 番茄红素的萃取方法

取 100 μL 发酵液置于 2 mL 研磨管中，10 000×*g* 离心 2 min，弃上清，向研磨管中加入适量 0.52 mm 氧化锆研磨珠和 1 mL 二氯甲烷（含 0.5%（*m/V*）的特丁基对苯二酚），使用全自动样品快速研磨仪对工程菌株进行破碎和萃取，研磨条件如下：设定频率为 65 Hz，每次运行时间为 2 min，每次运行后间歇时间为 10 s，运行次数为 8 次。研磨结束后将研磨管 10 000×*g* 离心 2 min，注射器吸取上清，使用 0.22 μm 尼龙滤膜过滤除杂，得到萃取液。

1.3.2 番茄红素的检测

采用高效液相色谱仪配合 C_{30} 色谱柱（规格：250×4.6 mm，5 μm）对萃取液进行分析。检测条件如下：色谱柱温度 35 ℃，总流量 1 mL·min^{-1}。采用梯度洗脱法，溶剂 A 为甲醇－乙腈（6:4，*V/V*），溶剂 B 为叔丁基甲基醚。溶剂 A 梯度程序：0 min，100%（*V/V*）；15 min，60%（*V/V*）；18 min，20%（*V/V*）；20 min，20%（*V/V*）；21 min，100%（*V/V*）；25 min，100%（*V/V*）。番茄红素检测波长 472 nm。

1.3.3 番茄红素标准曲线的制作

用分析天平称取 1.5 mg 的番茄红素标品溶于 10 mL 二氯甲烷，标品母液质量浓度为 150 μg·mL^{-1}；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=97 281x−2 096，R^2=0.999 7，y 代表峰面积，x 代表标品番茄红素的质量浓度。具体液相条件及操作方法按照 1.3.2 所述。番茄红素标品购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3.4 数据分析

每个重组酵母菌株重复发酵三次，每次番茄红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。使用 Paired Comparison Plot 进行显著性差异分析。显著性水平设定为：*P≤0.05，**P≤0.01，***P≤0.001。

2 结果与讨论

2.1 番茄红素异源合成途径构建

由于解脂耶氏酵母天然缺乏八氢番茄红素合成酶（PSY）和八氢番茄红素脱氢酶（PDS），其自身无法合成番茄红素，本研究选取 *CrtB* 基因[8]与含 Y160F 与 N576S 突变的 *Crt*I 基因[15]构建异源合成途径。基于 pMT-URA 质粒骨架，通过在底盘细胞 PO1f 共表达 *CrtB* 和 *CrtI*，挑取阳性转化子进行摇瓶培养，发酵 120 h 后，对照菌 PO1f 为乳白色，lyc1-1 菌株为粉红色，初步表明 lyc1-1 菌株有番茄红素合成。样品通过液相分析检测出番茄红素产物，番茄红素的滴度为 18.82 mg·L^{-1}。异源番茄红素合成基因成功在解脂耶氏酵母中表达，但番茄红素的产量有待提高。

2.2 模块化组装IDI-GGS1强化番茄红素前体供应

生物合成番茄红素依赖于甲羟戊酸途径衍生的异戊二烯前体的异戊烯焦磷酸（IPP）及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸（DMAPP）[16]。IDI-GGS1 通过平

衡关键前体 IPP/DMAPP 并放大 FPP 的合成通量，为整个途径提供稳定充足的中间物供应，确保上游通量能够高效地传递至下游 GGPP。生物细胞内的多酶复合体可以划分代谢途径，从而减少途径间的相互干扰，促进代谢调控，并降低外源化合物对细胞生长的影响[17]。本研究采取模块化组装策略（图 2）：利用具有高亲和力的短肽标签 RIAD 与 RIDD，在空间上将 IDI 与 GGS1 构建为高效的前体供应模块。RIDD 来源于 cAMP 依赖性蛋白激酶 A（PKA）R 亚基 N 端前 44 个氨基酸残基形成的二聚体结构；RIAD 则衍生自激酶 A 锚定蛋白（AKAP）锚定域中的两亲性螺旋，能够特异性地与 RIDD 二聚体结合，二者分子尺寸小，相互作用力强，具有明确的 2:1 结合化学计量比，使其成为理想的酶组装标签[18]。利用 RIAD 与 RIDD 特异性结合形成连接单元的特性，将异戊烯二磷酸异构酶（IDI）与香叶基香叶基焦磷酸合成酶（GGS1）与 RIAD 和 RIDD 进行融合。随后，将线性 DNA 片段 *IDI-RIAD-GGS1-RIDD* 导入 lyc1-1 菌株，以探究 IDI 与 GGS1 的模块化组装对番茄红素产量的影响，由此构建得到工程菌株 lyc2DG4 的番茄红素滴度达到 45.64 mg·L^{-1}（图 2），是初始菌株 lyc1-1 产量的 2.4 倍。IDI 作为类异戊二烯生物合成途径中的关键酶，负责催化异戊烯焦磷酸（IPP）与其异构体二甲基烯丙基焦磷酸（DMAPP）之间的可逆转化，为下游番茄红素合成提供必需的前体。Kang 等[18]首次在大肠杆菌和酿酒酵母中验证了 RIAD/RIDD 短肽标签可介导异源酶自发组装，使类胡萝卜素产量提升 5.7 倍、番茄红素产量提升 58%。Park 等[19]在强化 MVA 途径，过表达该途径的关键限速酶 GGS1，其目标产物八氢番茄红素的产量也获得有效提高。本研究首次将模块化组装 IDI-GGS1 策略应用于解脂耶氏酵母产番茄红素，使目标产物产量提升 2.4 倍，增产幅度高于酿酒酵母体系，这一差异可能归因于解脂耶氏酵母其胞内存在大量脂滴，而由 RIAD/RIDD 组装形成的 IDI-GGS1 复合体可能富集于脂滴膜界面，确保由 IDI 催化产生的 IPP/DMAPP 无需在胞质中扩散或积累，即可被 GGS1 催化为 GGPP，有效避免中间产物对细胞产生反馈抑制，为该酵母中其他萜类途径的代谢工程改造提供参考。

2.3 多拷贝 *CrtB-CrtI* 和表达 *MvaE-MvaS*$_{MT}$ 解除番茄红素代谢瓶颈

提高目标产物产量的一种有效策略是提高上游代谢通量和增加关键酶的基因拷贝数[20]，所以本研究继续增加 *CrtB-CrtI* 拷贝数和表达上游 MVA 关键酶以提高番茄红素产量。在工程菌株 lyc2DG4 中，分别将产番茄红素关键基因表达一次或两次得到工程菌株 lyc3BI 和 lyc4BI，如图 3 所示番茄红素滴度产量为 75.30 mg·L^{-1} 和 97.42 mg·L^{-1}，较菌株 lyc2-4 产量提高 65.13% 和 113.64%。该结果表明，增加关键酶 CrtB-CrtI 的基因拷贝数可有效驱动代谢通量，并与番茄红素产量正相关。其次，为验证前体供应是否充足，本研究在 lyc2DG4 中强化甲羟戊酸途径。双功能酶 MvaE 可催化乙酰-CoA 至乙酰乙酰-CoA、以及 HMG-CoA 至 MVA 的两步反应，而突变体 MvaS$_{MT}$ 负责中间步骤，将乙酰乙酰 -CoA 转化为 HMG-CoA，其第 110 位丙氨酸被甘氨酸取代，增强酶活或稳定性[21]。该异源模块在解脂耶氏酵母中的建立，实现了 MVA 前体通量的定向增强，保障后续番茄红素的积累。所以在工程菌株 lyc2DG4 异源表达关键酶组合 *MvaE-MvaS*$_{MT}$，构建菌株 lyc3M，该策略同样有效地将番茄红素产量提高至 67.58 mg·L^{-1}，相当于较初始产量提升了约 48.20%。类似的在工程菌株 lyc3BI 中表达 *MvaE-MvaS*$_{MT}$，得到 lyc4M 的番茄红素滴度产量 94.58 mg·L^{-1}，提高了 25.60%（图 3）。

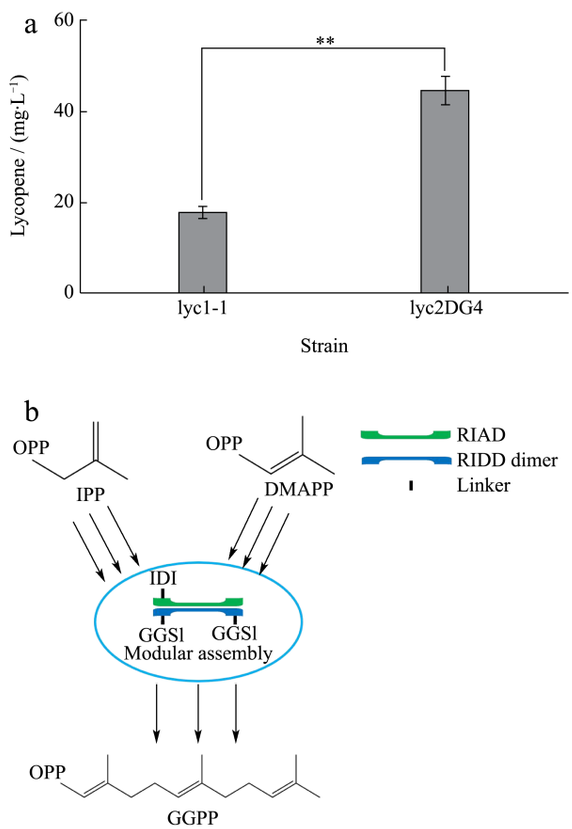


图 2 表达 *CrtB-CrtI* 和模块化 IDI-GGS1 对番茄红素产量的影响

Fig.2 The Effects of expressing *CrtB-CrtI* and modular IDI-GGS1 on lycopene production

注：相关实验组具有显著差异，（**$P \leq 0.01$）。

本研究表明，无论是通过增强上游前体供应，还是通过增加下游关键酶的基因拷贝数，均能有效提高番茄红素的产量。其中，增加 *CrtB-CrtI* 拷贝数，特别是实现双拷贝表达具有更为显著的增产效果[22]。与已有研究相比，虽然在大肠杆菌或酿酒酵母中通过多拷贝整合类胡萝卜素合成基因提升产量，但在解脂耶氏酵母中，由于其对脂溶性产物的天然耐受性及高乙酰辅酶 A 通量，双拷贝策略的增产幅度显著高于部分研究中单次整合的效果，展现该宿主在类胡萝卜素合成方面的独特优势[23]。Zhang 等[24]在解脂耶氏酵母中构建番茄红素菌株中，也尝试构建不同 *Crt* 基因拷贝数组合的菌株，均表现出不同的番茄红素生产性能，所以适当调整 *CrtB* 和 *CrtI* 基因的拷贝数可能会增强番茄红素或其衍生物的生物合成。

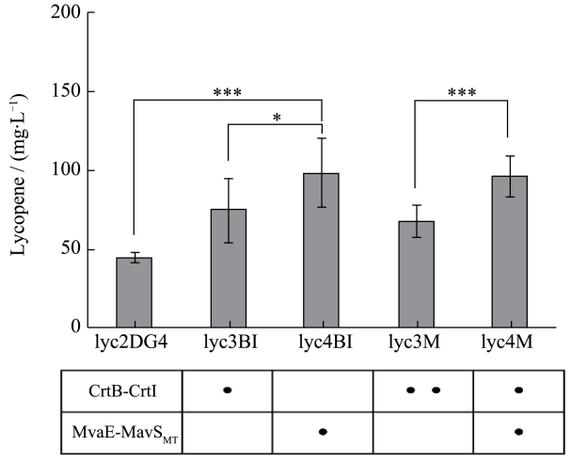


图 3 过表达 *CrtB-CrtI* 和表达 *MvaE-MvaS*$_{MT}$ 对番茄红素产量的影响

Fig.3 Effects of *CrtB-CrtI* overexpression and *MvaE-MvaS*$_{MT}$ expression on lycopene production

注：相关实验组具有显著差异（*P≤0.05，***P≤0.001）。下图同。

为继续提高番茄红素产量，基于双拷贝 *CrtB-CrtI* 的高产菌株，继续对上游甲羟戊酸（MVA）途径实施改良。在工程菌株 lyc4BI 中表达异源 *MvaE-MvaS*$_{MT}$ 获得番茄红素 lyc5M5 滴度为 151.23 mg·L^{-1}，如图 4 所示，较工程菌株 lyc4BI 提升了 55%。Zhang 等[25]在过表达 *MvaE-MvaS*$_{MT}$ 后，解脂耶氏酵母中的类胡萝卜素产量也有所提高。

在解脂耶氏酵母中表达 *ERG12* 与 *GGPPxd* 可通过协同增强甲羟戊酸（MVA）途径通量与下游类胡萝卜素前体供应，显著提升番茄红素的合成能力。过表达丙酮酸至甲羟戊酸途径的第一步，可增加乙酰辅酶 A 至 MVA 途径的碳通量，以供应类异戊二烯合成所需的前体 IPP/DMAPP。而 GGPPxd 作为类胡萝卜素合成的关键节点酶，负责催化 GGPP 的生成，其高活性可显著提升番茄红素直接前体 GGPP 的积累效率。此外，解脂耶氏酵母固有的高脂质合成能力可为疏水性番茄红素提供储存空间[26]，如图 4 所示，进一步促进其胞内积累获工程菌株 lyc6G9 番茄红素产量为 181.44 mg·L^{-1}，较 lyc5M5 提升了 19.98%。Liu 等[27]过表达促进 MVA 磷酸化的 ERG12，其类胡萝卜素含量进一步增加，结果表明增强从 MVA 到 GGPP 的代谢流可以有效提高类胡萝卜素的产量。

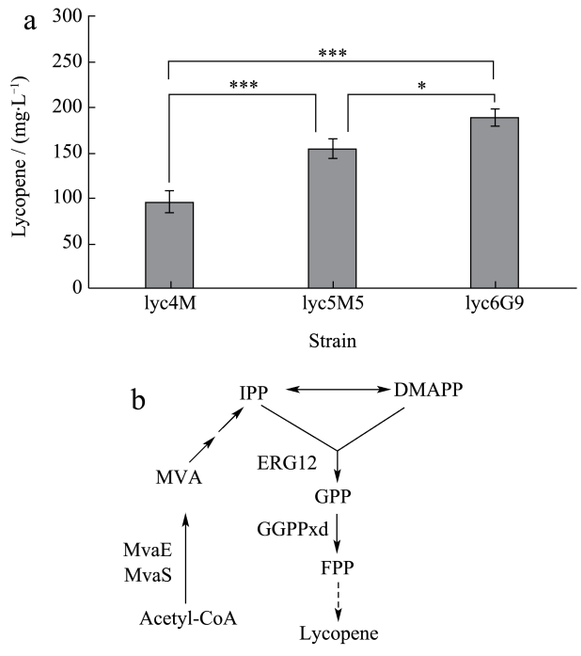


图 4 表达 *MvaE-MvaS*$_{MT}$ 和表达 *ERG12-GGPPxd* 对番茄红素产量的影响

Fig.4 Effects of *MvaE-MvaS*$_{MT}$ and *ERG12-GGPPxd* expression on lycopene production

2.4 番茄红素合成途径限速步骤的探究与调控

目标产物获得上游途径的充足前体供应后，下游催化模块的转化能力往往成为新的限速步骤，本研究进一步探究番茄红素工程菌株中 *CrtB-CrtI* 基因模块的限速情况[28]。在同一番茄红素工程菌株 lyc5M5 中分别表达 *CrtB*、*CrtI* 和 *CrtB-CrtI*，得到菌株 lyc5-B、lyc5-I、lyc5-BI，其番茄红素滴度产量为 128.32、213.13、133.81 mg·L^{-1}，如图 5 所示，其中仅工程菌株 lyc5-I 番茄红素产量提升最多，表明 GGPP 至番茄红素合成途径存在限速步骤。当 CrtB 活性通过内源表达或低水平表达已能满足基础通量时，CrtI 催化的多步脱氢反应可能受到限制。

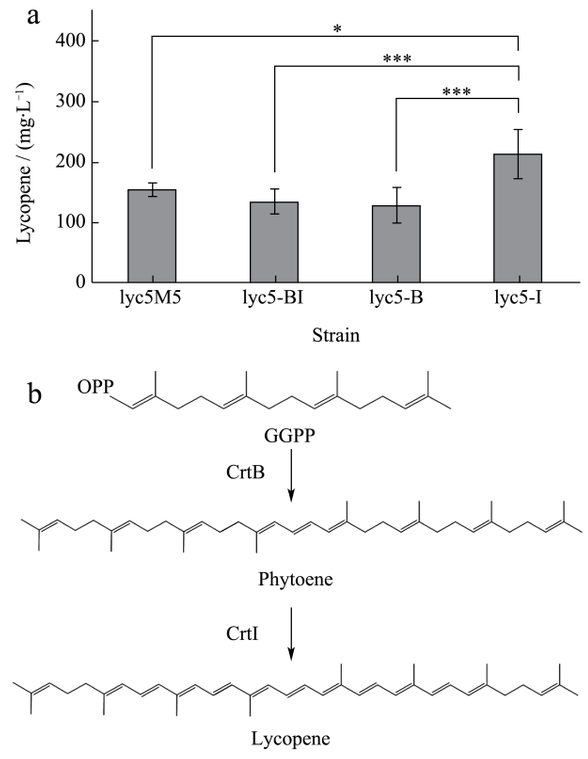


图 5 表达 *CrtB*、*CrtI* 和 *CrtB-CrtI* 对番茄红素产量的影响

Fig.5 Effects of *CrtB*, *CrtI* and *CrtB-CrtI* expression on lycopene production

在 lyc5-BI 菌株中，*CrtB* 与 *CrtI* 的共表达并未产生预期的协同效应，产量仅与 lyc5-B 相当。外源过表达 CrtB 可能产生过量的八氢番茄红素，超过了 CrtI 的催化能力，两个基因同时高强度表达可能导致细胞代谢负担加重，反而抑制整体催化效率。研究表明，平衡多个基因的表达强度而非简单叠加，是优化异源途径的关键[29]。Liu 等[30]在通过提高下游关键基因的表达水平，精确调控 *β*-胡萝卜素生物合成途径的代谢平衡。单一强化内源基因难以突破代谢途径的内源性限制瓶颈，本研究引入催化活性高的异源功能酶组合，实现下游催化模块的协同强化与代谢通量的平衡，从而有效解除番茄红素生物合成的产量限制。选用来自 *M. aurum* 的 *CarRP*（八氢番茄红素合酶 / 番茄红素环化酶基因）和 *CarB*（八氢番茄红素脱氢酶基因），CarRP 作为双功能酶，其 C 端的 P 结构域催化两分子香叶基香叶基焦磷酸缩合，生成第一个类胡萝卜素，即八氢番茄红素；随后，其 N 端的 R 结构域负责将番茄红素环化，生成单环或双环的胡萝卜素[31]。因为番茄红素初始异源途径效率较低，所以选择对高催化活性的 CarRP 进行定点突变。依据 Ma 等[32]尝试在关键基因 *CarRP* 上引入关键位点突变（E78K 或 Y27R），Y27R 可以在保证酶活不降低的前提下完全解除番茄红素底物抑制，E78K 使 *CarRP* 的 *β* 环化功能丧失，仅保留八氢番茄红素合成功能。

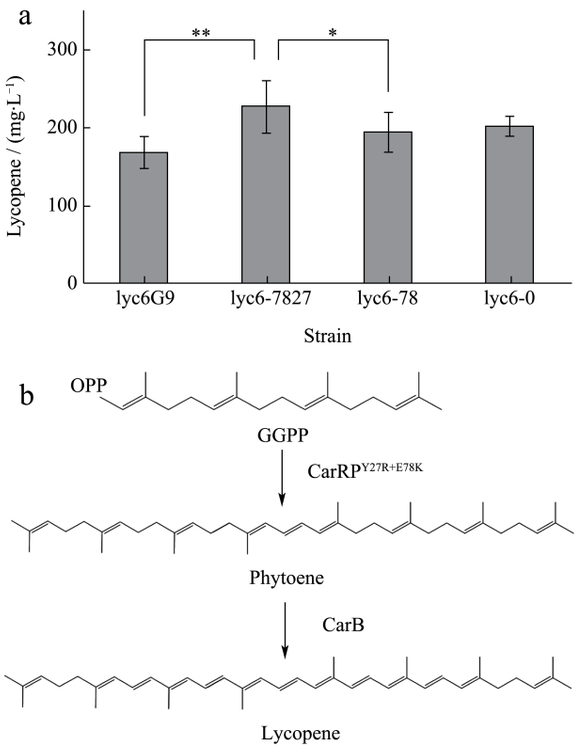


图 6 表达 *CarB*、*CarB-CarRP*$^{E78K+Y27R}$ 和 *CarB-CarRP*^{E78K} 对番茄红素产量的影响

Fig.6 Effects of *CarB*, *CarB-CarRP*$^{E78K+Y27R}$ and *CarB-CarRP*^{E78K} expression on lycopene production

注：相关实验组具有显著差异（*P≤0.05，**P≤0.01）。

在工程菌株 lyc6G9 分别表达 *CarB*、*CarB-CarRP*$^{E78K+Y27R}$、*CarB-CarRP*^{E78K} 得到系列菌株 lyc6-0、lyc6-7827、lyc6-78，其中 CarB 具备八氢番茄红素环化酶功能、CarB-CarRP$^{E78K+Y27R}$ 具备由 GGPP 产生番茄红素且解除底物抑制的功能，但 CarB-CarRP^{E78K} 仅具备由 GGPP 产生番茄红素的功能。如图 6 所示，工程菌株 lyc6-0 单独表达下游催化模块 CarB 使番茄红素滴度提高 11.2%，表明八氢番茄红素脱氢步骤确为限速步骤，但产量提升有限。而当引入对 CarRP 进行单点突变 E78K，即在工程菌株 lyc6-78 表达 CarB-CarRP^{E78K} 形成完整催化单元时，产量反而受到抑制，表明 CarRP^{E78K} 催化效率较低或者中间产物积累引发反馈抑制。本研究发现使用仅保留八氢番茄红素合成功能和解除底物抑制的突变酶 CarRP$^{E78K+Y27R}$ 能够显著促进番茄红素的积累，即工程菌株 lyc6-7827 催化效率增强，解除该步骤的代谢通量限制，最终番茄红素产量显著提升。最后，将 *CarB-CarRP*$^{E78K+Y27R}$ 导入菌株 lyc6G9 后，获得了最优工程菌株 lyc7-6，其番茄红

素滴度产量达到了 288.91 mg·L^{-1}（18.06 mg·g^{-1} DCW）（图 7），相较于对照菌株提升了 159.23%，是本研究中番茄红素滴度产量提升最多的策略。

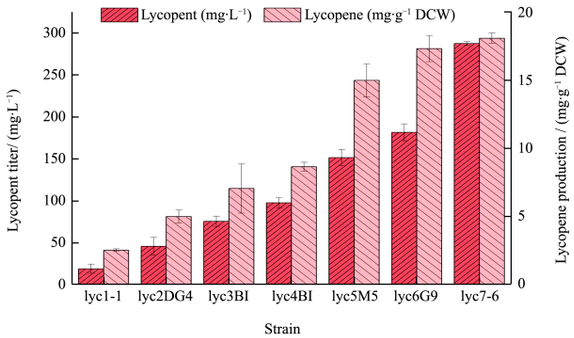


图 7 代谢改造阶段最优菌株番茄红素产量

Fig.7 Lycopene production from the optimal metabolically engineered strain

3 结论

本研究以解脂耶氏酵母为底盘细胞，通过系统代谢工程策略解除番茄红素生物合成途径中的代谢瓶颈，最终获得高产工程菌株 lyc7-6，摇瓶水平产量达 288.91 mg·L^{-1}，较初始菌株 lyc1-1 提升 15.35 倍。研究在解脂耶氏酵母中利用 RIAD/RIDD 介导的模块化组装构建 IDI-GGS1 高效前体供应模块，比较增加下游基因拷贝数、强化上游前体供应及二者协同策略的增产效果，并发现双拷贝 CrtB-CrtI 组合较单一表达更能有效提高番茄红素产量。最后引入保留八氢番茄红素合成功能和解除底物抑制的突变酶 CarRP$^{E78K+Y27R}$，发现番茄红素产量大幅提升至 288.91 mg·L^{-1}。综上，本研究通过协同优化的代谢工程策略实现番茄红素的高效合成。未来在解脂耶氏酵母中构建高产番茄红素菌株可通过以下方面进行优化：结合脂滴工程，增强番茄红素在细胞内的储存能力；通过蛋白质组学及代谢分析，对关键酶活进行机制解析，有效优化基因操作靶点，加速从实验室成果向工业化生产的转化进程，也将为其他高附加值萜类化合物在解脂耶氏酵母中的高效合成提供理论依据。

参考文献

[1] GIOVANNUCCI E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature [J]. Jnci-Journal of the National Cancer Institute, 1999, 91(4): 317-331.

[2] SIEIRO C, POZA M, DE MIGUEL T, et al. Genetic basis of microbial carotenogenesis [J]. International Microbiology, 2003, 6(1): 11-16.

[3] MEIN J R, LIAN F, WANG X D. Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention [J]. Nutrition Reviews, 2008, 66(12): 667-683.

[4] VISHWA R, SAILO B L, BHARATHWAJCHETTY B, et al. Enhancing anticancer treatment efficacy with lycopene: a comprehensive review of clinical and preclinical evidence [J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2025, 39(11): 33.

[5] TUFAIL T, UL AIN H B, NOREEN S, et al. Nutritional benefits of lycopene and beta-carotene: a comprehensive overview [J]. Food Science & Nutrition, 2024, 12(11): 8715-8741.

[6] MARKOVIĆ K, HRUŠKAR M, VAHČIĆ N. Lycopene content of tomato products and their contribution to the lycopene intake of Croatians [J]. Nutrition Research, 2006, 26(11): 556-560.

[7] SHI J, LE MAGUER M. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2000, 40(1): 1-42.

[8] CHEN Y, XIAO W, WANG Y, et al. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 113.

[9] WANG Z, SUN J, YANG Q, et al. Metabolic engineering *Escherichia coli* for the production of lycopene [J]. Molecules, 2020, 25(14): 3136.

[10] LI J, BATES E, PERERA D S, et al. Membrane engineering for carotenoid production in *Escherichia coli* [J]. SynBio, 2024, 2(4): 349-362.

[11] HUANG G, LI J, LIN J. Multi-modular metabolic engineering and efflux engineering for enhanced lycopene production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2024, 51: kuae015.

[12] WANG J, LEI Z, MA W, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for efficient production of terpenoids [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2024, 63(33): 14469-14479.

[13] MA S Y, JING Y F, LIU F Y, et al. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in *Yarrowia lipolytica* [J]. Journal of Biotechnology, 2026, 409: 202-214.

[14] JIANG D H, YANG M Q, CHEN K, et al. Exploiting synthetic biology platforms for enhanced biosynthesis of natural products in *Yarrowia lipolytica* [J]. Bioresource Technology, 2024, 399: 13.

[15] ZHOU K, YU C, LIANG N, et al. Adaptive evolution and metabolic engineering boost lycopene production in *Saccharomyces cerevisiae* via enhanced precursors supply and utilization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(8): 3821-3831.

[16] YOON S H, LEE Y M, KIM J E, et al. Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 94(6): 1025-1032.

[17] JONES J A, TOPARLAK Ö D, KOFFAS M A G. Metabolic pathway balancing and its role in the production of biofuels and chemicals [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 33: 52-59.

[18] KANG W, MA T, LIU M, et al. Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux [J]. Nature

Communications, 2019, 10(1): 4248.

[19] PARK K, KIM G, CHA S, et al. Efficient production of the colorless carotenoid phytoene in *Yarrowia lipolytica* through Metabolic Engineering [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(48): 26786-26795.

[20] LI C, SWOFFORD C A, SINSKEY A J. Modular engineering for microbial production of carotenoids [J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 10: 12.

[21] YANG J, XIAN M, SU S, et al. Enhancing production of bio-isoprene using hybrid mva pathway and isoprene synthase in *E. coli* [J]. Plos One, 2012, 7(4): e33509.

[22] ALBERMANN C. High versus low level expression of the lycopene biosynthesis genes from *Pantoea ananatis* in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(2): 313-319.

[23] SHA Y, GE M, LU M, et al. Advances in metabolic engineering for enhanced acetyl-CoA availability in yeast [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2025, 45(4): 904-922.

[24] ZHANG X K, NIE M Y, CHEN J, et al. Multicopy integrants of crt genes and co-expression of AMP deaminase improve lycopene production in *Yarrowia lipolytica* [J]. Journal of Biotechnology, 2019, 289: 46-54.

[25] ZHANG G, CHEN J, WANG Y, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for zeaxanthin production [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(37): 13828-13837.

[26] MATTHÄUS F, KETELHOT M, GATTER M, et al. Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(5): 1660-1669.

[27] LIU M, ZHANG J, YE J, et al. Morphological and metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to increase *β*-carotene production [J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(12): 3551-3560.

[28] ZUO Z Q, XUE Q, ZHOU J, et al. Engineering *Haloferax mediterranei* as an efficient platform for high level production of lycopene [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 13.

[29] LEE S H, HU Y, CHOU A, et al. Metabolic flux optimization of iterative pathways through orthogonal gene expression control: Application to the *β*-oxidation reversal [J]. Metabolic Engineering, 2024, 82: 262-273.

[30] LIU L, QU Y L, DONG G R, et al. Elevated *β*-carotene production using codon-adapted carRA&B and metabolic balance in engineered *Yarrowia lipolytica* [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 627150.

[31] VELAYOS A, ESLAVA A P, ITURRIAGA E A J E J O B. A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides* [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(17): 5509-5519.

[32] 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(1): 572.