

乙酰辅酶 A 合成代谢对酿酒酵母生理功能的影响

陈孚江¹, 周景文², 史仲平^{1,3}, 刘立明^{1,2*}, 堵国成², 陈坚^{2,3*}

(江南大学,¹ 食品科学与技术国家重点实验室,² 工业生物技术教育部重点实验室,³ 生物工程学院, 无锡 214122)

摘要:【目的】研究酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中乙酰辅酶 A 合成酶基因 *ACS1* 和 *ACS2* 的生理作用。【方法】将来源于 *S. cerevisiae* 的 *ACS1* 和 *ACS2* 分别进行过量表达, 研究过量表达 *ACS1* 和 *ACS2* 后 *S. cerevisiae* 胞内乙酰辅酶 A 含量、ATP 水平、甲羟戊酸途径转录和乙醇耐受性等生理学特性变化。【结果】与出发菌株相比, 过量表达 *ACS1* 和 *ACS2* 使得:(1) 胞内乙酰辅酶 A 含量提高了 2.19 倍(*ACS1*)和 5.02 倍(*ACS2*); (2) 胞内 ATP 含量提高了 3.93 倍(*ACS1*)和 2.05 倍(*ACS2*); (3) 甲羟戊酸途径 8 个关键基因表达量显著上调;(4) *S. cerevisiae* 对乙醇胁迫抵御能力显著增强。过量表达 *ACS1* 对乙醇胁迫的耐受能力强于过量表达 *ACS2*。【结论】增加胞内乙酰辅酶 A 的含量可以显著增加甲羟戊酸途径碳代谢流量, 并增强 *S. cerevisiae* 对发酵过程主要副产物乙醇的耐受能力。

关键词: 酿酒酵母; 乙酰辅酶 A; 乙酰辅酶 A 合成酶; 乙醇抗性; 甲羟戊酸途径

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1172-08

乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 是微生物细胞内重要的辅因子, 直接参与了包括三羧酸循环、氨基酸代谢、脂类代谢、萜类代谢在内的近 200 个生化反应^[1]。采用代谢工程策略改造乙酰辅酶 A 代谢途径调控胞内乙酰辅酶 A 的含量, 是生产与辅酶 A 相关的精细化学品的研究热点。以源于植物的萜类化合物的异源表达为例, 其共同前体异戊二烯焦磷酸 (IPP) 是由乙酰辅酶 A 经甲羟戊酸途径 (Mevalonate pathway) 合成的^[2]。因此, 如何高效供给乙酰辅酶 A 成为以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 作为宿主细胞生产以乙酰辅酶 A 为前体的生物基产品的关键。为此, Shiba 等通过异源表达来自于肠沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 的乙酰辅酶 A 合成酶基因 *acs*, 将碳代谢流定向引入甲羟戊酸代谢途径, 使得抗疟疾药物青蒿素前体的产量提高了 1.8 倍^[3]。Asadollahi 等通过弱化甲羟戊酸代谢途径反馈抑制,

增加了甲羟戊酸途径的碳代谢流量, 使得目标产物的产量提高了 85%^[4]。Engels 等人通过对甲羟戊酸代谢途径的改造使香叶基香叶脂和前体紫杉二烯的产量分别达到 33 mg/L 和 8.7 mg/L^[5]。上述研究结果表明, 高效供给乙酰辅酶 A 能显著提高目标代谢产物的生成效率。酿酒酵母中乙酰辅酶 A 主要源于丙酮酸代谢旁路, 其中, 最关键的是编码乙酰辅酶 A 合成酶两个基因 *ACS1* 和 *ACS2*。*ACS1* 在氧缺乏和高浓度葡萄糖条件下表达受到显著抑制, 对非葡萄糖碳源的代谢具有非常重要的作用; 而组成型表达的 *ACS2* 则是 *S. cerevisiae* 以葡萄糖为碳源进行生长和繁殖所必需的基因^[6]。本研究以 *S. cerevisiae* 为研究对象, 通过过量表达 *S. cerevisiae* 自身的 *ACS1* 和 *ACS2* 研究乙酰辅酶 A 合成酶的生理代谢功能, 为以 *S. cerevisiae* 为宿主进行萜类等以乙酰辅酶 A 为前体的生物基产品的异源合成提供辅

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (20836003); 国家自然科学基金 (20706025); 国家“863 计划” (2006AA10Z313); 霍英东教育基金项目 (11075)

* 通信作者。Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn; jchen@jiangnan.edu.cn

作者简介: 陈孚江 (1984-), 男, 江苏宿迁人, 硕士研究生。E-mail: chenfujiang123@163.com

收稿日期: 2010-04-05; **修回日期:** 2010-05-17

因子改造策略。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: *S. cerevisiae* CEN. PK2 (*a/MATa*; *ura3-52/ura3-52*; *trp1-289/trp1-289*; *leu2-3, 112/leu2-3, 112*; *his3 D1/his3 D1*; *MAL2-8/MAL2-8*; *SUC2/SUC2*) 购于 EUROSCARF 菌种保藏中心。该菌株作为后续研究的宿主。*E. coli* JM109 用于质粒构建。穿梭载体 pY26-GPD-TEF 由华盛顿州立大学 Li Aimin 博士提供。pMD19-T Simple Vector 购买自大连宝生物有限公司。

1.1.2 培养基: (1) LB 培养基: 分子级胰蛋白胨 10 g, 分子级酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, 调节 pH 至 7.0, 定容至 1 L, 按需要在灭菌后加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素, 固体培养基添加 20 g 琼脂; (2) 种子和发酵培养基: ① YPD 培养基: 20 g 葡萄糖, 20 g 蛋白胨, 10 g 酵母粉定容至 1 L, 此培养基主要用于制备 *S. cerevisiae* 感受态细胞和传代培养。② YNB (不含游离氨基酸的含氮碱基) 培养基: 葡萄糖 20 g, YNB 6.7 g (YNB 中含有硫酸铵, 如果 YNB 中不含硫酸铵, 则加入 1.7 g YNB 和 5 g 硫酸铵) 定容至 1 L, 此培养基用于研究 *S. cerevisiae* 生理代谢。上述培养基在制作斜面或平板时, 加入 20 g 琼脂。

1.1.3 培养条件: (1) *E. coli* JM109 培养条件: 挑取单菌落至装有 20 mL LB 的 250 mL 的摇瓶中, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 转速为 200 r/min 的摇床上。(2) *S. cerevisiae* CEN. PK2 培养条件: ① 感受态制备培养条件: 挑取单菌落至含有 20 mL YPD 的 250 mL 的摇瓶, 放置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 转速为 200 r/min 的摇床上培养 12 h, 以 10% 转接量转入含有 50 mL YPD 培养基的摇瓶中, 至 OD_{600} 为 1.0 左右离心收集细胞制备感受态。② 生理代谢研究培养条件: 从斜面中接种 1 环 *S. cerevisiae* CEN. PK2 细胞于 20 mL 加有所需的氨基酸的 YNB 的培养基中, 放置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 转速为 200 r/min 的摇床上, 生长至对数中期, 以 10% 的转接量转入含有 50 mL 的 YNB 的培养基 (加入了生长所必需的氨基酸) 中, 生长到对数期后再次以 10% 的转接量接种到含有 100 mL 的 YNB 的培养基中。

1.1.4 主要仪器和试剂: BIO-RAD C1000 PCR 仪、BIO-RAD CFX96TM 实时定量 PCR 仪、BIO-RAD 凝胶成像仪和 BIO-RAD 电泳仪购买自美国伯乐科学仪器有限公司; Agilent1200 高效液相色谱仪购买自安

捷伦科技(中国)有限公司; 岛津 UV-2450 分光光度计购买自日本岛津有限公司; Nikon 显微镜购买自尼康映像仪器(中国)有限公司; 日立高速冷冻离心机购买自日本日立有限公司。*ExTaq* DNA 聚合酶、T4 连接酶、大肠杆菌感受态制备试剂盒、*EcoR* I 限制性内切酶、*Hind* III 限制性内切酶、PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、RNAiso PlusRNA 和 SYBR[®] Premix *Ex Taq*TM (Perfect Real Time) 购买自宝生物工程(大连)有限公司; YNB (不含游离氨基酸含氮碱基)、色氨酸、亮氨酸、组氨酸和二硫苏糖醇购买自上海生物工程有限公司; 二羟甲基丁酸 (DMBA)、ATP、CoASH、 NAD^+ 、L-苹果酸、苹果酸脱氢酶、柠檬酸合成酶和 0.1% 甲酸乙腈购买自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; Tris-HCl (pH 7.7)、氯化镁、高氯酸、乙酸铵、磷酸氢二钾和磷酸二氢钾购买自国药集团有限公司; G-Biosciences FastTM - Yeast 酵母基因操作试剂盒购买自 G-Biosciences 生物科技有限公司。

1.2 DNA 操作

S. cerevisiae 总 DNA 的提取、感受态的制备以及质粒的转化用 G-Biosciences FastTM-Yeast 试剂盒; *E. coli* JM109 感受态的制备使用上海生工有限公司一步法制备大肠杆菌感受态试剂盒, 大肠杆菌质粒的提取用大连宝生物有限公司质粒提取试剂盒; DNA 的片段回收, 纯化用大连宝生物有限公司相关的试剂盒; 限制性内切酶、连接酶和 DNA 聚合酶等购买于大连宝生物有限公司。

1.3 表达载体的构建、验证和转化

(1) 根据 NCBI 上发布的 *S. cerevisiae* S228C *ACS1* 和 *ACS2* 的基因序列设计两对引物, 用于从 *S. cerevisiae* 基因组中扩增这两个基因和重组质粒的鉴定(表 1), 引物两端分别加有限制性内切酶酶切位点 *EcoR* I 和 *Hind* III。(2) 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别酶切质粒 pY26-GPD-TEF 和 PCR 反应的产物, 把经过纯化的线性化的质粒和目标 DNA 片段以 1:6 的比例混合, 12 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。(3) 将经过连接后的混合液体转化 *E. coli* JM109 涂布在含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 平板上, 12 h 后挑选阳性克隆子用表 1 引物进行菌落 PCR 验证。(4) 将经过菌落 PCR 验证的表达载体以尿嘧啶作为筛选标记, 利用 G-Biosciences FastTM-Yeast Transformation 试剂盒转化 *S. cerevisiae* CEN. PK2, 挑选单菌落划线传代培养, 从转化子中提取表达载体, 并用表 1 引物进行验证。

1.4 相关指标的分析与测定

细胞内乙酰辅酶 A 含量使用 Agilent 1200 高效

液相色谱仪检测,检测条件见参考文献^[7]。乙酰辅酶 A 合成酶活性测定方法参见文献^[8]。细胞内 ATP 含量的检测使用 Agilent 1200 高效液相色谱仪,检测条件见参考文献^[9]。细胞死亡率的测定用亚甲基蓝染色进行,染色后随机选择 3 个不同的视野进行拍照,拍完照片后,计数照片中被染上色的细胞占总细胞的百分比,计算出细胞的死亡率^[10]。甲羟戊酸代谢途径关键基因转录的测定:使用 Beacon Designer 7.0 设计荧光定量 PCR 所需要的引物,引物序列如表 1 所示;使用 RNAiso PlusRNA 提取试剂

盒(购买自大连宝生物有限公司)提取总 RNA,并使用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (购买自大连宝生物有限公司)将总 RNA 反转录成 cDNA,使用 SYBR[®] Premix Ex Taq TM (Perfect Real Time) 试剂盒(购买自大连宝生物有限公司)以 cDNA 作为模板进行荧光定量 PCR 反应,以 β -肌动蛋白基因 *ACT1* 作为参照基因,比较三株菌的甲羟戊酸代谢途径在转录水平的变化情况。本实验用荧光定量 PCR 仪器为 BIO-RAD CFX96[™] 实时定量 PCR 仪。

表 1 本文 PCR 反应所用引物

Table 1 Primers of PCR reactions used in this work

Name of Primer	Name of Primer (5'→3')	Target gene	Restriction enzyme cutting site
ACS1-F	GCgaattcATGTCGCCCTCTGCCGT	<i>ACS1</i>	<i>EcoR</i> I
ACS1-R	GCaagcttTTACA ACTTGACCGAATCAATTA		<i>Hind</i> III
ACS2-F	GCgaattcATGACAATCAAGGAACATA	<i>ACS2</i>	<i>EcoR</i> I
ACS2-R	GCaagcttTTATTTCTTTTTTTGAGAGA		<i>Hind</i> III
ERG8-F	AGGAGTCTTACTTGCTTAATAC	<i>ERG8</i>	—
ERG8-E	CTGAGTTACATCCAGCCATTG		—
BST1-F	TGTCTCCTTCCTCACACCAC	<i>BST1</i>	—
BST1-R	TGTAATGTCTCAGCAAAGCC		—
MVD1-F	CGTTTACACAGCATCCGTTAC	<i>MVD1</i>	—
MVD1-R	GTAGCCGCAGAGGCAAC		—
ERG13-F	CCAAGTCTGTCAAGTCTGTC	<i>ERG13</i>	—
ERG13-R	ACTACAATGGCGTCTCTACC		—
ERG20-F	AGCCAGAGATGTCTTGATTCC	<i>ERG20</i>	—
ERG20-R	TTCCAATGCCTTGTGATTACC		—
HMG1-F	GCCTTTGATTGTAGTTGTTGTTG	<i>HMG1</i>	—
HMG1-R	ATCAAACGACCACCCTCTTC		—
HMG2-F	TTTATGAGATTTCGGACA ACTACC	<i>HMG2</i>	—
HMG2-R	TACCAGATACGGAGACA ACTTC		—
IDH1-F	CATTACAACAAAGACCTAATACCC	<i>IDH1</i>	—
IDH1-R	CGGCACCAATAGCATTATCG		—
ACT1-F	TCCCAGGTATTGCCGAAAGAATG	<i>ACT1</i>	—
ACT1-R	TGTTGGAAGGTAGTCAAAGAAGCC		—

Underscored lowercase alphabets are the sequence of restriction enzyme sites of primers.

2 结果

2.1 *ACS1*、*ACS2* 过量表达重组菌株的构建

以 *S. cerevisiae* CEN. PK2 全基因组为模板,PCR 扩增出与文献报道相符的 *ACS1* (2142 bp) 和 *ACS2* (2052 bp) 基因片段。将 PCR 扩增所得的基因片段链接到 pMD19-T Simple Vector 上测序验证 PCR 反应的保真性,测序结果与 NCBI 上刊载的 *ACS1*、*ACS2* 基因序列完全一致。将 *ACS1* 和 *ACS2* 基因片段分别连接到质粒 pY26-GPD-TEF, 获得酵母表达质粒 pY26-*ACS1* 和 pY26-*ACS2*。分别把重组质粒 pY26-*ACS1*、pY26-*ACS2* 和 pY26-GPD-TEF 转化 *S. cerevisiae* CEN. PK2, 分别挑取转化子纯化培养、提取

质粒,并以此质粒为模板进行 PCR 验证。验证结果显示,可以得到 *ACS1* (2142 bp) 和 *ACS2* (2052 bp) 基因条带,表明重组菌构建成功。

2.2 过量表达 *ACS1*、*ACS2* 对胞内乙酰辅酶 A 库的影响

乙酰辅酶 A 合成酶基因 *ACS1/2* 的过量表达,对乙酰辅酶合成酶活力和胞内乙酰辅酶 A 含量的影响见图 1。图 1-B 表明 *Acs1p* 和 *Acs2p* 在 *S. cerevisiae* 中的活性以及发挥最佳催化活性的时间不同,过量表达 *ACS1* 和 *ACS2* 的菌株分别在 24 h 和 12 h 表现出最高的乙酰辅酶合成酶活力,分别是对照组的 1.41 倍和 1.62 倍。乙酰辅酶合成酶活性的增加显著地提高了 *S. cerevisiae* 在对数生长的前期

胞内乙酰辅酶 A 含量(图 1-A), 过量表达 *ACS1* 和 *ACS2* 的菌株的最高胞内乙酰辅酶 A 分别是对照菌株的 2.19 倍和 5.02 倍。

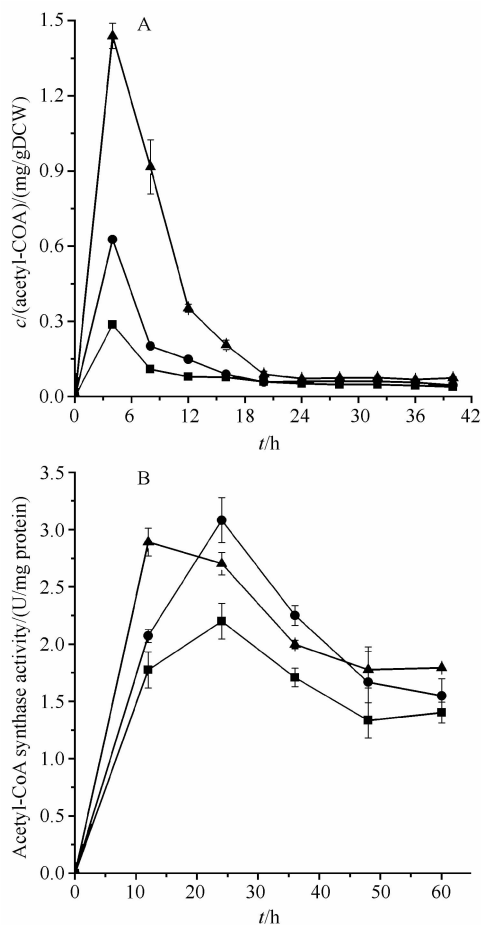


图 1 胞内乙酰辅酶 A 含量的变化情况

Fig. 1 The changes of acetyl-CoA content and its synthetase activity. A: acetyl-CoA; B: The changes of intracellular acetyl-CoA synthetase activity. —▲— strain of *ACS2* over-expressed, —●— strain of *ACS1* over-expressed, —■— strain of control.

2.3 过量表达 *ACS1* 和 *ACS2* 对甲羟戊酸代谢途径关键基因转录水平的影响

图 2 为 *S. cerevisiae* 甲羟戊酸代谢途径 8 个关键基因: *ERG13*、*HMG1*、*HMG2*、*ERG8*、*MVD1*、*ID11*、*BST1* 和 *ERG20*。8 个基因编码的酶分别为: 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 合成酶、3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 1、3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 2、磷酸甲羟戊酸激酶、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶、异戊烯基二磷酸- δ -异构酶、龙牛儿基转移酶和二甲基烯丙基转移酶。利用荧光定量 PCR 技术研究过量表达 *ACS1/2* 后这 8 个关键基因转录变化情况。其中, *ACS1* 和 *ACS2* 的过量表达均上调了 *ERG13*、*HMG1*、*MVD1*、*HMG2*、*ERG8*、*BST1*、

ERG20 的表达水平。但是, *ACS1* 和 *ACS2* 的过量表达对所有 8 个关键基因表达水平的影响程度不同。与对照相比, 过量表达 *ACS1* 使所有 8 个基因表达水平上调, 其中, *ERG13*、*HMG1*、*HMG2*、*MVD1* 表达水平上调幅度超过 2 倍, 分别为 2.21 倍、2.38 倍、4.25 倍、和 3.24 倍; 而 *ACS2* 的过量表达除了使得 *ERG13*、*ERG20*、*HMG1*、*MVD1* 和 *BST1* 表达上调超过 2 倍, 分别为 3.39 倍、2.27 倍、2.40 倍、3.29 倍和 2.15 倍。相反, 导致 *ID11* 基因的表达量下调 2.27 倍。

2.4 乙酰辅酶 A 合成酶过量表达对乙醇胁迫的耐受能力

2.4.1 乙酰辅酶 A 合成酶过量表达菌株在不同浓度的乙醇胁迫条件下的生长情况: 通过测定细胞的生长状态 OD_{600} , 研究过量表达乙酰辅酶 A 合成酶基因 *ACS1/2* 对 *S. cerevisiae* 乙醇胁迫耐受能力的影响(图 3)。低乙醇胁迫条件下(5%、7.5%), 过量表达 *ACS1* 对乙醇胁迫耐受能力显著强于过量表达 *ACS2* (图 3 B-C)。在 5% 乙醇胁迫条件下, 过量表达 *ACS1* 的菌株细胞生长达到稳定期时 OD_{600} 为 4.25, 而过量表达 *ACS2* 的菌株和对照菌株的 OD_{600} 在稳定期时仅为 3.2 和 3.0。虽然较高浓度的乙醇胁迫(10%、12.5%)对 *S. cerevisiae* 细胞生长具有强烈的抑制作用(图 3 D-E), 但过量表达 *ACS1* 和 *ACS2* 均可显著增强菌株对高浓度乙醇的耐受能力, 且过量表达 *ACS1* 的影响显著强于过量表达 *ACS2*。

图 4 为过量表达 *ACS1/2* 后细胞死亡率的变化情况, 实验结果进一步表明过量表达 *ACS1/2* 显著增强了 *S. cerevisiae* 抵御乙醇胁迫的能力。过量表达 *ACS1/2* 可以显著降低 *S. cerevisiae* 在不同浓度乙醇下的细胞死亡率。在乙醇浓度为 5% 时, 对照菌株稳定期细胞的死亡率分别是过量表达 *ACS1* 和 *ACS2* 菌株的 4.74 倍和 1.44 倍。然而, 在高浓度乙醇条件下(12.5%), 过量表达 *ACS1* 和 *ACS2* 对稳定期细胞的存活能力无显著影响。

2.4.2 不同乙醇浓度胁迫下细胞内能量代谢的改变情况: 表 2 为过量表达 *ACS1/2* 菌株和对照菌株在浓度为 0%、5%、7.5%、10% 乙醇胁迫条件下细胞内 ATP 随时间的变化情况。过量表达乙酰辅酶 A 合成酶基因 *ACS1/2* 后细胞内 ATP 含量显著提高。其中, 当细胞处于无乙醇胁迫条件下, 过量表达 *ACS1* 和 *ACS2* 菌株内 ATP 含量是对照菌株的 3.93 和 2.05 倍。随着乙醇浓度的不断增加, 对照菌株和重组菌株内 ATP 的含量均不断下降。其中, 对照菌

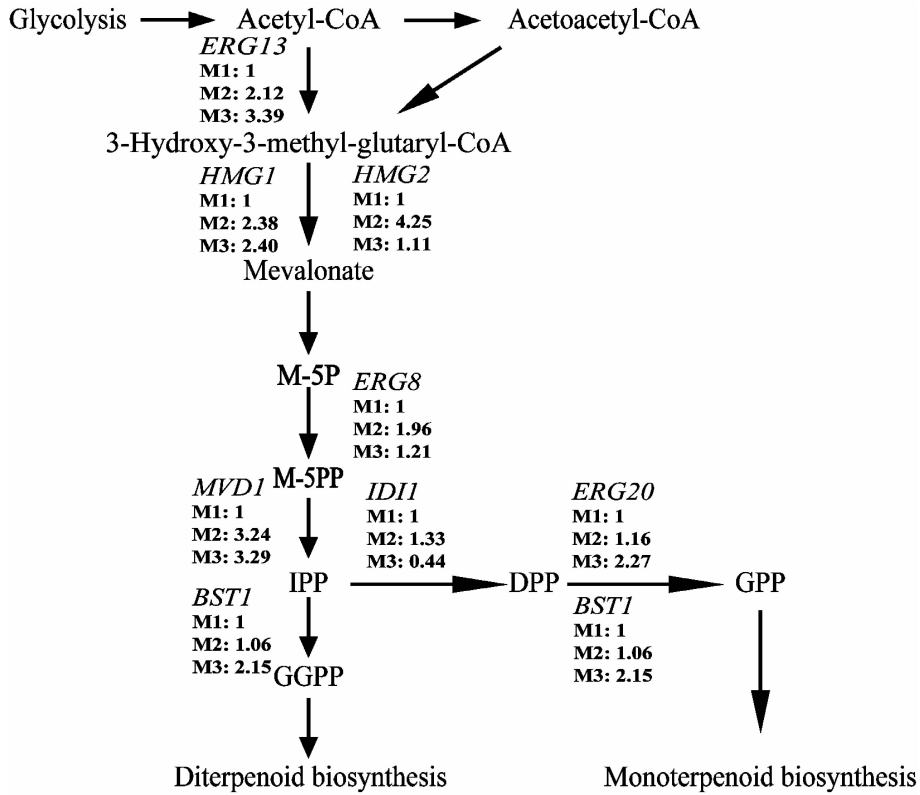


图2 过量表达 *ACS1* 和 *ACS2* 后酿酒酵母甲羟戊酸代谢途径关键基因转录情变化况

Fig. 2 Changes of Mevalonate pathway key genes transcription after *ACS1* and *ACS2* over-expression. M-5P: mavalonate 5-phosphate, M-5PP: mavalonate 5-diphosphate, IPP: isopentenyl diphosphate, DPP: dimethylallyl diphosphate, GPP: Geranyl diphosphate, GGPP: Geranyl geranyl-diphosphate; *ERG13*: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene, *HMG1*: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 1 gene, *HMG2*: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 2 gene, *ERG8*: Phosphomevalonate kinase gene, *ID11*: Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase gene, *MVD1*: Mevalonate pyrophosphatedecarboxylase gene, *ERG20*: Dimethylallyltransferase gene, *BST1*: Geranyltransferase gene; M1: *S. cerevisiae* - pY26, M2: *S. cerevisiae* - pY26-*ACS1*, M3: *S. cerevisiae* - pY26-*ACS2*.

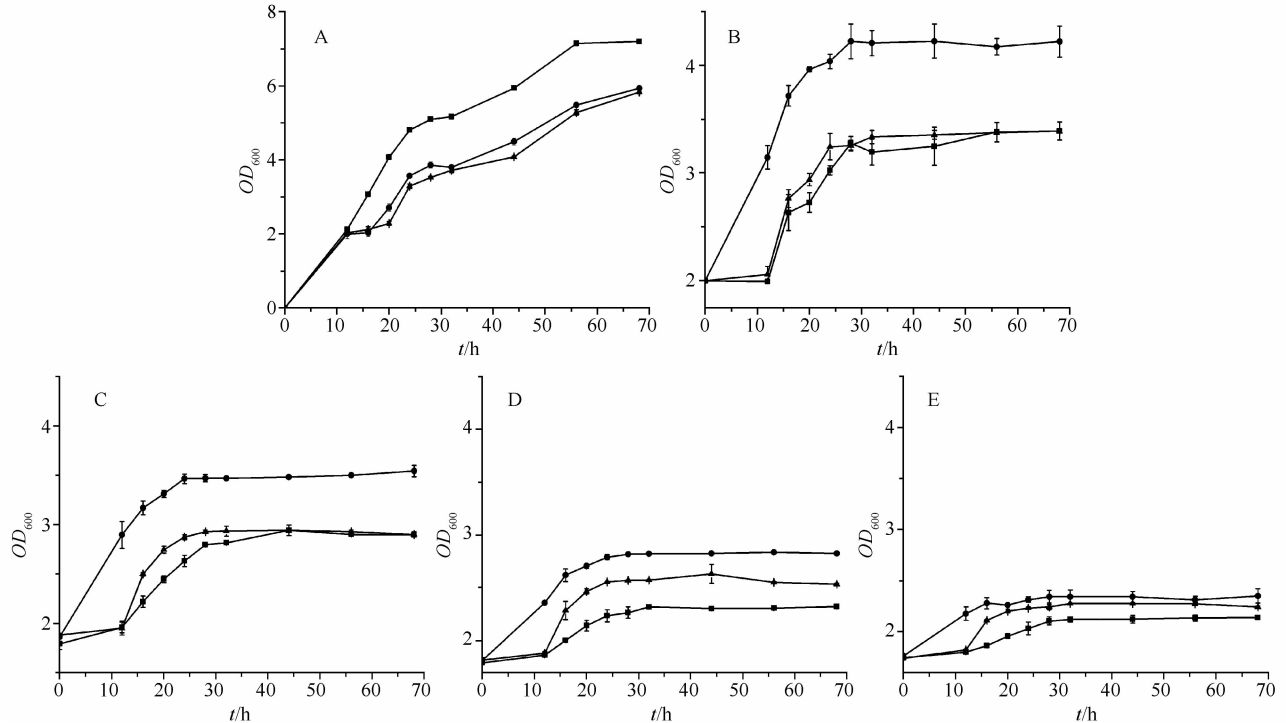


图3 不同浓度的乙醇对 *S. cerevisiae* 生长状况的影响

Fig. 3 Changes of growth conditions under different concentration of ethanol stress. A: 0% (v/v) ethanol stress; B: 5% (v/v) ethanol stress; C: 7.5% (v/v) ethanol stress; D: 10% (v/v) ethanol stress; E: 12.5% (v/v) ethanol stress. —▲— over-expression of *f ACS2*, —●— over-expression of *f ACS1*, —■— control strain.

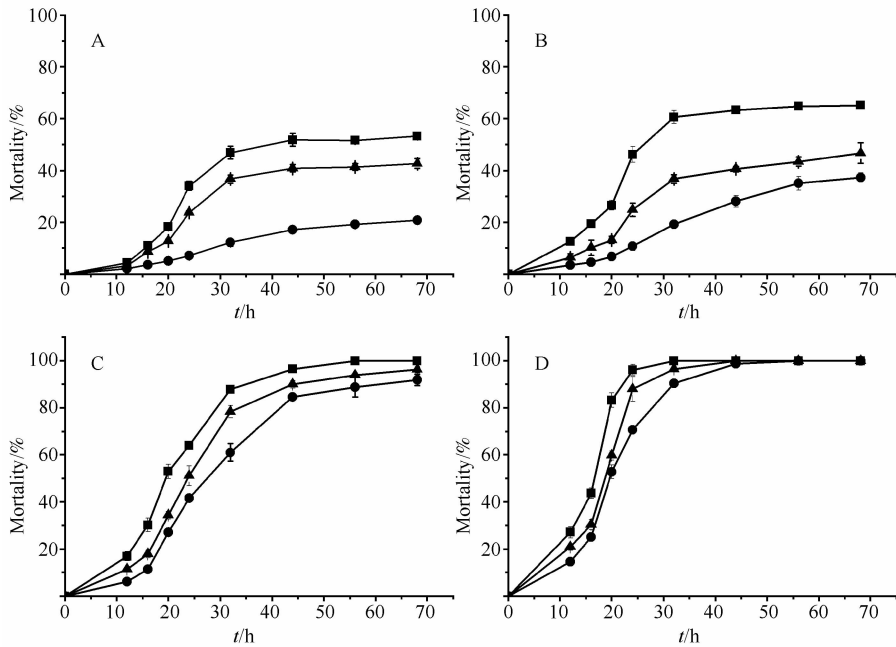


图4 不同浓度的乙醇对 *S. cerevisiae* 细胞死亡率的影响

Fig. 4 Changes of mortality under different concentration of ethanol stress. A: 5% (v/v) ethanol stress; B: 7.5% (v/v) ethanol stress; C: 10% (v/v) ethanol stress; D: 12.5% (v/v) ethanol stress. —▲— strain of ACS2 overexpressed, —●— strain of ACS1 overexpressed, —■— strain of control.

株和 ACS2 的下降幅度更为明显。与正常条件下比较, ACS1 过量表达菌株在 5% 和 7.5% 乙醇胁迫下

ATP 浓度是对照菌和 ACS2 的 9.12、12.4 倍(5%) 和 32 倍和 3.8 倍(7.5%)。

表2 不同浓度乙醇胁迫下 ATP 变化情况

Table 2 The intracellular ATP content under different ethanol concentrations

Ethanol concentration /(v/v)	Time /h	Contents of <i>S. cerevisiae</i> intracellular ATP/($\mu\text{g/g}$ DCW)		
		pY26	pY26-ACS1	pY26-ACS2
0%	12	0.339 \pm 0.021	1.331 \pm 0.158	0.653 \pm 0.028
	24	0.282 \pm 0.035	0.401 \pm 0.074	0.311 \pm 0.036
	36	0.241 \pm 0.018	0.472 \pm 0.016	0.416 \pm 0.008
	48	0.230 \pm 0.025	0.459 \pm 0.005	0.378 \pm 0.008
5%	12	0.085 \pm 0.018	0.775 \pm 0.199	0.063 \pm 0.008
	24	0.129 \pm 0.012	0.594 \pm 0.069	0.184 \pm 0.008
	36	0.145 \pm 0.009	0.593 \pm 0.068	0.159 \pm 0.009
	48	0.145 \pm 0.011	0.734 \pm 0.127	0.191 \pm 0.0197
7.5%	12	0.123 \pm 0.016	0.328 \pm 0.034	0.095 \pm 0.008
	24	0.174 \pm 0.007	0.751 \pm 0.044	0.197 \pm 0.008
	36	0.201 \pm 0.019	0.686 \pm 0.270	0.220 \pm 0.009
	48	0.184 \pm 0.021	0.405 \pm 0.054	0.250 \pm 0.019
10%	12	0.150 \pm 0.012	0.199 \pm 0.020	0.069 \pm 0.005
	24	0.187 \pm 0.026	0.237 \pm 0.012	0.186 \pm 0.013
	36	0.214 \pm 0.020	0.153 \pm 0.015	0.067 \pm 0.009
	48	0.244 \pm 0.007	0.197 \pm 0.015	0.097 \pm 0.007

3 讨论

本研究以 pY26-TEF-GPD 穿梭载体为表达载体,以 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因的组成型启动子(P_{CPD})过量表达来源于自身的 ACS1 和 ACS2 基因,研究乙酰辅酶 A 合

成代谢对 *S. cerevisiae* 关键生理特性的影响。 P_{CPD} 表达强度适中,对细胞的正常生长和生理代谢影响较小,是采用过量表达手段研究酵母生理特性最为常用的组成型启动子。以 *S. cerevisiae* 为宿主进行萜类物质高效生产的关键之一是如何高效地供给甲羟戊酸途径合成的前体物

质类异戊二烯结构单元^[11]。结果表明,过量表达来源于 *S. cerevisiae* 自身 *ACSI/2* 后,甲羟戊酸代谢途径关键基因转录水平显著升高。这一结果为代谢工程改造 *S. cerevisiae* 高效生产与甲羟戊酸途径相关的萜类化合物提供了改造靶点。此外,在对 *S. cerevisiae* 进行代谢工程改造生产精细化学品的过程中,乙醇是一种主要的主要副产物,其不仅会降低产物利率,也会抑制微生物自身生长从而降低目标代谢产物的积累^[12-13]。因此,*S. cerevisiae* 作为宿主生产精细化学品时必须弱化或删除乙醇途径,或者提高 *S. cerevisiae* 对乙醇的耐受性。而乙醇的积累对于 *S. cerevisiae* 自身胞内还原力平衡和细胞生长均具有重要意义,乙醇代谢途径的消除会显著弱化细胞生长^[14]。因此,提高细胞对乙醇的耐受性显的尤为重要。过量表达 *ACSI* 和 *ACS2* 能有效提升 *S. cerevisiae* 抵御高乙醇胁迫的原因在于:(1) 胞内乙酰辅酶 A 含量的增加,会增强三羧酸循环,从而提高胞内 ATP 水平(表 3),而 ATP 水平在 *S. cerevisiae* 细胞抵御高浓度乙醇胁迫中发挥着非常重要的作用^[15-16]; (2) 由于乙酰辅酶 A 供给的强化,使更多碳代谢流定向流向甲羟戊酸代谢途径,促进了辅酶 Q、甾醇等以甲羟戊酸途径中间代谢产物为前体物质的化合物合成,而这些化合物在维持和增强细胞膜的稳定性发挥着关键作用^[17-18]。因此,调控胞内辅因子乙酰辅酶 A 的含量不仅对于生产与乙酰辅酶 A 相关的精细化学品有非常重要的意义,也可以显著改善细胞对不良环境的抵御能力。本文的研究结果为高效合成源于乙酰辅酶 A 的生物基产品以及提升工业微生物抵御恶劣环境的能力提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Wolfe AJ. The acetate switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69:12-50.
- [2] Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson, K Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Veronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 1999, 285:901-906.
- [3] Paradise EM, Kirby J, Ro DK, Keasing JD. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids. *Metabolic Engineering*, 2007, 9:160-168.
- [4] Asadollahi MA, Maury J, Patil KR, Schalk M, Clark A, Nielsen J. Enhancing sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* through in silico driven metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 2009.
- [5] Engels B, Dahm P, Jennewein S. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metabolic Engineering*, 2008, 10:201-206.
- [6] Akamatsu S, Kamiya H, Yamashita N, Motoyoshi T, Goto-Yamamoto N, Ishikawa T, Okazaki N, Nishimura A. Effects of aldehyde dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase on acetate formation in sake mash. *Journal Bioscience Bioengineering*, 2000, 90:555-560.
- [7] Gao L, Chiou W, Tang H, Cheng XH, Camp HS, Burns DJ. Simultaneous quantification of malonyl-CoA and several other short-chain acyl-CoAs in animal tissues by ion-pairing reversed-phase HPLC/MS. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2007, 853:303-313.
- [8] vandenBerg MA, deJongGubbels P, Kortland CJ, vanDijken JP, Pronk JT, Steensma HY. The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry* 1996, 271: 28953-28959.
- [9] Sato K, Yoshida Y, Hirahara T, Ohba T. On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing. *Journal Bioscience Bioengineering*, 2000, 90:294-301.
- [10] Postgate J. Viability measurements and the survival of microbes under minimum stress. *Advances Microbial Physiology*, 1967, 1.
- [11] Naesby M, Nielsen SVS, Nielsen CAF, Green T, Tange T, Sim n E, Knechtle P, Hansson A, Schwab MS, Titiz O. Yeast artificial chromosomes employed for random assembly of biosynthetic pathways and production of diverse compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8:45.
- [12] Pronk JT, Yde Steensma H, Van Dijken JP. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1996, 12:1607-1633.
- [13] ajbidor J. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Critical reviews in biotechnology*, 1997, 17:87-103.

- [14] Kumar GR, Goyashiki R, Ramakrishnan V, Karpel JE, Bisson LF. Genes required for ethanol tolerance and utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2008, 59:401.
- [15] Hamilton C, Good A, Taylor G. Vacuolar H⁺-ATPase, but not mitochondrial F1F0-ATPase, is required for aluminum resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters*, 2001, 205:231-236.
- [16] Zhou J, Liu L, Shi Z, Du G, Chen J. ATP in current biotechnology: Regulation, applications and perspectives. *Biotechnology Advances*, 2009, 27: 94-101.
- [17] Mishra P, Kaur S. Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 34:697-702.
- [18] Do T, Schultz J, Clarke C. Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93:7534.

Effect of acetyl-CoA synthase gene overexpression on physiological function of *Saccharomyces cerevisiae*

Fujiang Chen¹, Jingwen Zhou², Zhongping Shi^{1,2}, Liming Liu^{1,2,*}, Guocheng Du², Jian Chen^{2,3,*}

(¹ State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University,² the Key Laboratory of Industrial Biotechnology,

Ministry of Education, Jiangnan University, ³ School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: **[Objective]** The aim of our work is to investigate the effects of overexpression of two acetyl-CoA synthase genes, *ACS1* and *ACS2*, on the physiological functions of *Saccharomyces cerevisiae*. **[Methods]** We overexpressed *ACS1* and *ACS2* in *S. cerevisiae* CEN. PK2 with shuttle vector pY26-TEF-GPD. We determined and compared the physiological parameters of the parent strain to the *ACS1/2* overexpressed strains, including the intracellular acetyl-CoA content, ATP content, mevalonate pathway, and the tolerance to ethanol stress. **[Results]** Compared to the parent strain, the overexpression of *ACS1* and *ACS2* led to: (1) The intracellular acetyl-CoA content increased by 2.19-fold (*ACS1*) and 5.02-fold (*ACS2*), respectively; (2) The intracellular ATP content increased by 3.92-fold (*ACS1*) and 2.05-fold (*ACS2*), respectively; (3) The transcription levels of the seven key genes in mevalonate pathway were upregulated, therefore, more carbon flux was channeled into the mevalonate pathway, which could provide precursor for terpenes synthesis; (4) The tolerance to high content of ethanol was enhanced, especially for the *ACS1* overexpression strain. **[Conclusion]** The results presented here demonstrated that the overexpression of acetyl-CoA synthase can enhance the carbon flux into mevalonate pathway and improve the tolerance of *S. cerevisiae* to high content of ethanol, which is the main byproduct of the fermentation process with the yeast.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; acetyl-CoA synthase; the tolerance to ethanol; mevalonate pathway

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (20836003), the National Natural Science Foundation of China (20706025), the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA10Z313) and the Fok Ying-Tong Education Foundation (11075)

* Corresponding author. Tel; Fax: +86-510-85918309; Fax: +86-510-85918309; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn; jchen@jiangnan.edu.cn
Received: 5 April 2010/Revised: 17 May 2010