



代谢工程改造酿酒酵母提高法尼醇产量

郭俊琪, 王征, 张伟欣*, 刘巍峰

山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266200

摘要: 【目的】法尼醇(FOH, $C_{15}H_{26}O$)是一种具有芳香气味的非环状倍半萜醇, 被广泛应用于化妆品和医学药物的工业化生产, 也可作为航空燃料的理想替代品。具有食品级安全性的酿酒酵母细胞能够合成内源性法尼醇, 但其产量很低, 无法满足工业生产的需要。因此, 需要采用代谢工程手段, 改造法尼醇合成途径, 以有效提高法尼醇在酿酒酵母中的产量。【方法】以酿酒酵母工业菌株CEN.PK2-1D为底盘细胞, 强化甲羟戊酸途径中关键酶的表达水平和弱化麦角固醇合成分支途径, 以提高法尼醇合成所需的直接前体物质法尼基焦磷酸(FPP); 并分别表达催化FPP合成法尼醇的五种内源磷酸酶和两种异源合酶, 筛选能高效合成法尼醇的磷酸酶或合酶。【结果】通过在CEN.PK2-1D (法尼醇产量 <0.1 mg/L)中强化表达甲羟戊酸途径中截短形式的HMG-CoA还原酶(tHMGR1)和FPP合酶(ERG20), 使法尼醇产量提高约50.8倍, 达到5.08 mg/L; 使用HXT1启动子替换鲨烯合酶编码基因ERG9启动子以下调其表达水平, 使法尼醇产量进一步提升47.1倍, 达到239.17 mg/L。在此基础上, 筛选发现, 表达酿酒酵母内源性磷酸酶PAH1时, 获得最高产量法尼醇, 达到393.13 mg/L。【结论】采用代谢工程策略对酿酒酵母法尼醇合成途径进行改造, 有效提高法尼醇产量至393.13 mg/L, 为目前报道的在酿酒酵母中摇瓶培养条件下的最高产量。

关键词: 法尼醇, 酿酒酵母, 甲羟戊酸途径, 磷酸酶, 法尼醇合酶

萜类化合物, 又称类异戊二烯, 广泛分布于植物及微生物初级代谢物和次生代谢物中^[1], 根据所含异戊二烯数目分为单萜(C10)、倍半萜(C15)、二萜(C20)、三萜(C30)、四萜(C40)和多萜(C >40)等。法尼醇($C_{15}H_{26}O$, FOH), 又名金合欢

醇, 是一种具有芳香气味的非环状倍半萜醇。它存在于香茅、橙花油、柠檬草、玫瑰和麝香等植物中^[2], 也存在于动物和微生物中, 在信号转导、群体感应和细胞凋亡诱导等过程中发挥重要作用^[3]。法尼醇常被用作化妆品的香味成分和抗癌

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0905700)

*通信作者。Tel: +86-532-58632405; E-mail: zhangwx@sdu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-03; 修回日期: 2020-07-29; 网络出版日期: 2020-12-11

药物的原料，并且由于其具有低水溶性和高能量值，被认为可作为柴油或喷气燃料等的替代品^[4-5]。从植物中分离提取法尼醇步骤繁琐，且高度依赖原料的可利用性；而经化学方法合成的法尼醇，往往存在异构体混杂、毒性大等问题^[3]。因此，构建定向、高效、安全的法尼醇合成细胞工厂，对其生产和应用具有重要意义。

具有食品级安全性的酿酒酵母是生产萜类化合物的优良底盘细胞，其体内天然的甲羟戊酸 (Mevalonate, MVA) 途径能够为萜类的合成提供直接前体^[6]。法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP) 是 MVA 途径的关键分支点，流向麦角固醇合成通路和法尼醇合成通路 (图 1)。酿酒酵母内源的法尼醇是在磷酸酶的作用下由 FPP 脱磷酸化而形成^[3]。磷酸酶 DPP1 (diacylglycerol pyrophosphate phosphatase 1) 和 LPP1 (lipid phosphate phosphatase 1) 分别定位于液泡和高尔基体细胞膜上，是胞内磷酸异戊酯磷酸酶活性的主要贡献者，二者均具有水解 FPP 生成法尼醇的能力^[7]。碱性磷酸酶 Pho8 (phosphatase 8) 通过 N 端跨膜螺旋锚定于液泡表面，去掉 N 端的 62 个氨基酸后，定位于胞质的突变体 (Pho8 Δ 62) 能够在胞质中高效地水解 FPP 为法尼醇^[8]。除了 DPP1 和 LPP1，酵母中存在另外两种磷脂酰磷酸酶 APP1 (actin patch protein 1) 和 PAH1 (phosphatidic acid phosphohydrolase 1)，APP1 定位于皮质肌动蛋白片 (cortical actin patch) 上，PAH1 定位于细胞膜上，可以经由胞质易位至细胞核/内质网膜上^[9-11]。APP1 和 PAH1 在法尼醇合成中的作用目前还不清楚。与酿酒酵母中法尼醇由磷酸酶介导合成不同的是，植物中法尼醇是由法尼醇合酶催化 FPP 生成 (图 2)，目前来源于 *Oryza sativa* L. 的合酶 OsTPS13 和来源于

Phyllostachys edulis 的合酶 MoTPS2 被鉴定出具有体外合成法尼醇的能力^[12-13]。在过去十几年里，人们对提高酿酒酵母中法尼醇产量做了一些探索工作 (表 1)。Asadollahi 等^[14] 使用甲硫氨酸抑

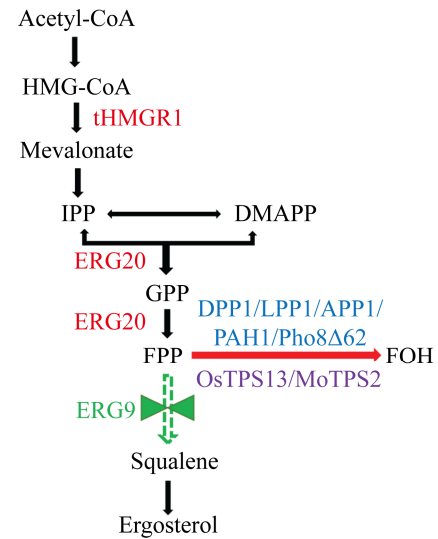


图 1. 本文在酿酒酵母中提高法尼醇产量的策略示意图
Figure 1. Schematic illustration of strategies used in this study to increase farnesol production in *Saccharomyces cerevisiae*. The strategies includes overexpressing two key enzymes in the MVA pathway, the truncated HMG-CoA reductase (tHMGR1) and the FPP synthase ERG20, replacing the native *ERG9* promoter with the *HXT1* promoter, and overexpressing the endogenous phosphatases DPP1/LPP1/APP1/PAH1/Pho8 Δ 62 and heterologous farnesol synthases OsTPS13/MoTPS2, respectively, for screening the enzyme with best performance in farnesol production. HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; IPP: isopentenyl pyrophosphate; DMAPP: dimethylallyl diphosphate; FPP: (E,E)-farnesyl diphosphate; FOH: (E,E)-farnesol; tHMGR1: truncated HMG-CoA reductase 1; ERG20: FPP synthase; ERG9: squalene synthase 9; DPP1: diacylglycerol pyrophosphate phosphatase 1; LPP1: lipid phosphate phosphatase 1; APP1: actin patch protein 1; PAH1: phosphatidic acid phosphohydrolase 1; Pho8 Δ 62: repressible vacuolar alkaline phosphatase; OsTPS13: terpene synthase of *Oryza sativa* L.; MoTPS2: terpene synthase of *Phyllostachys edulis*.

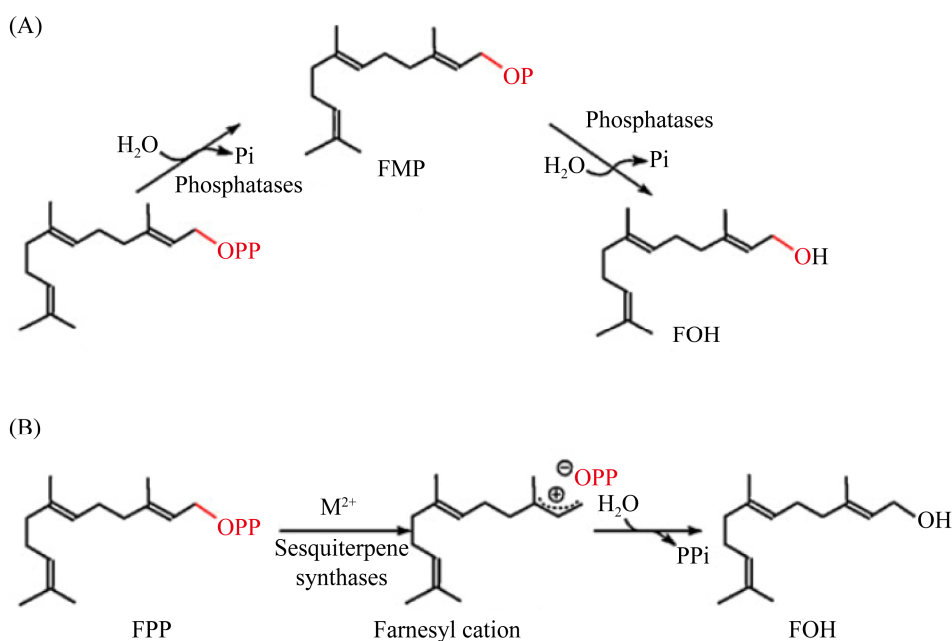


图 2. 由磷酸酶和合酶分别催化 FPP 生成法尼醇的反应机制^[3]

Figure 2. Reaction mechanisms of FOH synthesis mediated by phosphatase and synthase with FPP as substrate^[3]. A: FOH is either generated from hydrolysis of FPP by phosphatases; B: FOH is either generated from addition of a hydroxyl group to FPP carbocation intermediate mediated by sesquiterpene synthases. FPP phosphoester bond is indicated in red. FMP: farnesyl monophosphate; FOH: farnesol; FPP: farnesyl diphosphate; M^{2+} : bivalent metalion; Pi: monophosphate; Ppi: diphosphate.

表 1. 酿酒酵母中生产法尼醇的研究进展

Table 1. Summary of progress in farnesol production in *S. cerevisiae*

Host strains	Approaches	FOH titer/(mg/L)	References
CEN.PK113-5D	Replacing the native <i>ERG9</i> promoter with the <i>MET3</i> promoter	20.2 (5 liter batch fermenter)	[13]
ATCC 64031 ^a	Supplementing oils and detergents to the culture	28.0	[14]
ATCC 64031 ^a	Optimization of culture condition including adjusting pH to neutral value	102.8 (10 liter jar fermenter for 133 h)	[15]
AURGG101 ^b	Overexpressing the truncated HMG-CoA reductase encoding gene (<i>tHMGRI</i>)	145.7 (5 liter bench-scale jar fermenter for 7 d)	[16]
CEN.PK2-1D	Overexpressing the truncated HMG-CoA reductase encoding gene (<i>tHMGRI</i>) and farnesyl diphosphate synthase encoding gene (<i>ERG20</i>), replacing the native <i>ERG9</i> promoter with the <i>HXT1</i> promoter, and overexpressing the yeast endogenous phosphatase PAH1	319.1 (20 mL shake flask for 72 h)	This study

^aATCC 64031: a squalene synthetase-deficient mutant *S. cerevisiae*; ^bAURGG101: an ATCC 200589 recombinant strain carrying *AURI-C* instead of *AURI* for resistance to aureobasidin^[18].

制性 *MET3* 启动子替换鲨烯合酶编码基因 *ERG9* 的启动子, 通过添加甲硫氨酸弱化麦角固醇合成来增强法尼醇合成, 最终在生物反应器中获得了 20.2 mg/L 的法尼醇。Muramatsu 等^[15-16]通过外源

添加角鲨烯合酶抑制剂的方式, 抑制麦角固醇合成途径, 同时在培养液中添加豆油和清洁剂, 优化培养条件使法尼醇产量达 28.0 mg/L; 并进一步在中性条件下(pH 7.0)培养酵母细胞, 使法尼醇产

量达到 102.8 mg/L。2009 年, Ohto 等^[17]采用强化表达 MVA 途径中的限速酶羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA) 的方法, 强化 FPP 前体供应, 经过 7 d 的分批发酵获得产量为 145.7 mg/L 的法尼醇。从上述结果得知, 虽然法尼醇在酿酒酵母中的产量与其内源产量相比已有较大提高, 但是仍然无法满足工业生产需要, 因此, 需要更多研究去进一步提升产量。

为进一步提升酿酒酵母中法尼醇的产量, 在本文中, 我们通过采用强化 MVA 途径关键酶的表达水平和弱化麦角固醇分支途径以增加法尼醇合成直接前体 FPP 的供应, 以及筛选高效内源磷酸酶和异源合酶促进法尼醇合成的策略(图 1), 使得法尼醇在小体积摇瓶中产量达到 393.13 mg/L, 这是目前已知的酿酒酵母中合成法尼醇的最高产量。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂: PrimeSTAR HS DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA Marker D15000+2000 购自北京天根生物有限公司; 无缝克隆试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司; 真菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega Bio-Tech 公司; 正十二烷购自上海麦克林生化科技有限公司; 法尼醇、角鲨烯标准品购自 Sigma-Aldrich 公司; 氨苄青霉素购自上海生物工程(集团)有限公司。各种化学试剂均为分析纯标准。

主要仪器: 高压灭菌锅(上海中安医疗器械厂)、PCR 扩增仪(BIOER)、高速冷冻离心机

(Eppendorf 5804R)、Minispin 离心机(Eppendorf)、电泳仪(Jun Yi JY300C)、酶标仪(Tecan)、恒温培养箱、水浴锅、电子天平(Sartorius)、pH 酸度计(Sartorius)、快速核酸检测仪(Eppendorf)、组织匀浆器(Herein)以及气相色谱(GC2010, Shimadzu)等。

1.2 菌株与质粒

本文所用菌株及质粒如表 2 所示。

1.3 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10; 酵母提取物 5, 氯化钠 5, 蒸馏水定容至 1 L。固体培养基另添加 1.5% 琼脂粉。根据需要加入氨苄青霉素至终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

YPDG 培养基(g/L): 蛋白胨 20, 酵母提取物 10。根据需要加入相应的碳源。葡萄糖和半乳糖可配成 20% 母液, 单独灭菌后加入至终浓度分别为 0.2% 和 2%。固体培养基需添加 2% 琼脂粉。

SD 培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, Yeast Nitrogen Base (YNB) 1.7, 葡萄糖 20。根据需要选择添加遗传霉素(Geneticin, G418)、亮氨酸、组氨酸、色氨酸、尿嘧啶等, G418 在培养基中终浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 亮氨酸、组氨酸、色氨酸、尿嘧啶终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。固体培养基需添加 2% 琼脂粉。

所有培养基均经 115 $^\circ\text{C}$ 灭菌处理 30 min。

大肠杆菌在 LB 平板上生长于温度为 37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中静置培养 12–14 h, 在 LB 液体培养基中于温度为 37 $^\circ\text{C}$ 、转速为 200 r/min 的培养箱中培养 12–14 h。酿酒酵母在 SD 平板上于温度为 30 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中静置培养 3 d, 在相应液体培养基中于温度为 30 $^\circ\text{C}$ 、转速为 200 r/min 的培养箱中培养 12–24 h。营养缺陷型菌株筛选采用 SD 培养基, 摇瓶培养采用 YPDG 培养基。

表 2. 本文所使用的质粒及菌株
Table 2. Plasmids and strains used in this study

Plasmids and strains	Description	Sources
pRS306	<i>ura3, Amp^r</i>	Laboratory stock
pRS306- <i>tHMGR1</i>	<i>ura3, pRS306-P_{TPII}-tHMGR1-T_{CYCI}</i>	This study
pRS304	<i>trp1, Amp^r</i>	Laboratory stock
pRS304- <i>ERG20</i>	<i>trp1, pRS304-P_{ADHI}-ERG20-T_{ADHI}</i>	This study
pRS425	2 μ ori, <i>leu2, Amp^r</i>	Laboratory stock
pRS425-P _{GALI} -T _{ADHI}	2 μ ori, <i>leu2, pRS425-P_{GALI}-T_{ADHI}</i>	Laboratory stock
pRS425-DPP1	2 μ ori, <i>leu2, pRS425-P_{GALI}-DPP1-T_{ADHI}</i>	This study
pRS425-LPP1	2 μ ori, <i>leu2, pRS425-P_{GALI}-LPP1-T_{ADHI}</i>	This study
pRS425-APP1	2 μ ori, <i>leu2, pRS425-P_{GALI}-APP1-T_{ADHI}</i>	This study
pRS425-PAH1	2 μ ori, <i>leu2, pRS425-P_{GALI}-PAH1-T_{ADHI}</i>	This study
pRS425- <i>Pho8Δ62</i>	2 μ ori, <i>leu2, pRS425-P_{GALI}-Pho8Δ62-T_{ADHI}</i>	This study
pRS425- <i>MoTPS2</i>	2 μ ori, <i>leu2, pRS425-P_{GALI}-MoTPS2-T_{ADHI}</i>	This study
pRS425- <i>OsTPS13</i>	2 μ ori, <i>leu2, pRS425-P_{GALI}-OsTPS13-T_{ADHI}</i>	This study
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1D	<i>MATα; leu2-3, 112; ura3-52; his3-A1; trp1-289; MAL2-8^C; SUC2</i>	Laboratory stock
S1	CEN.PK2-1D, pRS306-P _{TPII} - <i>tHMGR1-T_{CYCI}</i>	Laboratory stock
S2	S1, pRS304-P _{ADHI} - <i>ERG20-T_{ADHI}</i>	This study
S3	S2, P _{ERG9} :: <i>loxP-P_{HXT1}</i>	This study
S4	S3, pRS425-P _{GALI} -T _{ADHI}	This study
S5	S3, pRS425-P _{GALI} -DPP1-T _{ADHI}	This study
S6	S3, pRS425-P _{GALI} -LPP1-T _{ADHI}	This study
S7	S3, pRS425-P _{GALI} -APP1-T _{ADHI}	This study
S8	S3, pRS425-P _{GALI} -PAH1-T _{ADHI}	This study
S9	S3, pRS425-P _{GALI} - <i>Pho8Δ62-T_{ADHI}</i>	This study
S10	S3, pRS425-P _{GALI} - <i>MoTPS2-T_{ADHI}</i>	This study
S11	S3, pRS425-P _{GALI} - <i>OsTPS13-T_{ADHI}</i>	This study

1.4 表达载体和启动子替换盒的构建

以酿酒酵母 CEN.PK2-1D 基因组为模板, 扩增 N 端截短 529 个氨基酸的 *tHMGR1* 的编码基因片段, 使用无缝克隆试剂盒连入含有 *TPII* 启动子和 *CYCI* 终止子的 pRS306 载体, 经筛选获得正确的表达质粒 pRS306-*tHMGR1* 同样扩增出 *ERG20* 的基因片段, 利用无缝克隆试剂盒与 *Sma* I 线性化的 pRS304-P_{ADHI}-T_{ADHI} 载体骨架连接, 并转化进入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经筛选验证获得正确的表达质粒 pRS304-*ERG20*。

同样以酿酒酵母 CEN.PK2-1D 基因组为模板

分别扩增出 5 种磷酸酶 DPP1、LPP1、APP1、PAH1 和 *Pho8Δ62* 的基因片段, 连接进入 *Sma* I 线性化的 pRS425-P_{GALI}-T_{ADHI} 载体骨架, 获得重组质粒 pRS425-DPP1、pRS425-LPP1、pRS425-APP1、pRS425-PAH1 和 pRS425-*Pho8Δ62*。以相同的方法, 将密码子优化过的两种植物来源的倍半萜合酶的编码基因 *MoTPS2* (GenBank No.: KP097716.1) 和 *OsTPS13* (GenBank No.: DQ872159.1) 分别连接进入 pRS425-P_{GALI}-T_{ADHI} 载体骨架, 获得重组质粒 pRS425-*MoTPS2* 和 pRS425-*OsTPS13*。选择 969 bp 的 *HXT1* 启动子片段, 连入 *EcoR* V 酶切

的携带 G418 抗性的 pUG6 载体骨架, 再利用带有 *ERG9* 两侧同源臂的巢式引物, 经 2 次扩增得到启动子替换盒 *ERG9up-G418-P_{HXT1}-ERG9orf*。

1.5 重组酵母菌株构建

采用醋酸锂化学转化法^[19]将重组质粒或片段转入酿酒酵母中。将整合质粒 pRS306-*tHMGR1* 转入 CEN.PK2-1D 后获得重组菌株 S1; 将 pRS304-*ERG20* 转化到 S1 中获得重组菌株 S2; 将替换 *ERG9* 基因启动子的 *HXT1* 启动子盒转化进入 S2 中, 利用获得重组菌株 S3; 将 pRS425-*P_{GALI}-T_{ADHI}*, pRS425-*DPPI*、pRS425-*LPPI*、pRS425-*APPI*、pRS425-*PAHI*、pRS425-*Pho8Δ62*, pRS425-*MoTPS2* 和 pRS425-*OsTPS13* 分别转化进入 S3, 获得重组菌株 S4-S11。本文构建的质粒和菌株见表 2。

1.6 发酵培养及产物检测分析

挑取待测菌株的 3-5 个单菌落分别到 5 mL YNB 液体培养基中, 培养至对数生长期时以 1% 的接种量转接到含有 20 mL YPDG 培养基(葡萄糖和半乳糖的终浓度分别为 0.2%和 2%)的 100 mL 锥形瓶中, 初始 OD_{600} 为 0.2 左右, 再加入 10% (V/V) 体积的十二烷(防止培养过程中目标产物挥发), 于转速为 200 r/min 的 30 °C 摇床中培养 72 h。

将 20 mL 菌液置于 100 mL 离心管中, 于 10000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上层十二烷液体, 于 -20 °C 保存, 并使用 Shimadzu GC-FID 气相色谱系统分析法尼醇含量^[20]。使用 RTX-1701 色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 程序升温条件为: 初始温度 40 °C, 维持 1 min, 以 25 °C/min 的速率升温至 180 °C, 维持 5 min, 再以 15 °C/min 的速率升温至 250 °C, 维持 3 min, 总分析时间 19.27 min; 进样口温度 250 °C、检测器温度

270 °C; 载气(氮气)流速为 2.34 mL/min; 进样体积为 1 μL, 分流比为 10。

以正十二烷为溶剂, 配制一定浓度梯度的法尼醇标准品溶液, 进行气相色谱分析并记录数据, 以峰面积为横坐标, 法尼醇浓度为纵坐标, 绘制标准曲线。实验样品的法尼醇浓度根据标准曲线计算得到具体数值。

2 结果和分析

2.1 强化表达 MVA 途径关键酶

增加前体供给是一种常用且有效的促进目标产物合成的策略。HMG-CoA 还原酶(HMGR, *HMGI* 编码)是类异戊二烯合成途径中的限速酶, 催化 HMG-CoA 形成甲羟戊酸, 其活性受到末端产物的抑制。有研究表明, 相对于完整的 HMGR, 截短 N 端调控序列的 HMGR1 (*tHMGR1*)可解除产物的负反馈调控, 具有更高活性^[17]。FPP 合酶(FPPS, *ERG20* 编码)作为催化两步反应的双重功能酶, 可催化 IPP 与其异构体 DMAPP 结合形成 GPP, 并进一步催化 GPP 结合 IPP 形成 FPP, 在 MVA 代谢途径中发挥关键作用^[21]。因此, 表达截短形式的 HMGR1 和提高 *ERG20* 表达水平可以有效增强萜类前体分子 IPP、DMAPP 和 FPP 的供给, 是提高倍半萜产量的通用策略^[22-23]。

为了提高法尼醇产量, 我们也采用了这两个通用策略, 以酿酒酵母 CEN.PK2-1D 为底盘细胞, 使用组成型启动子 *TPII* 表达截短形式的 HMGR1 编码基因, 获得重组菌株 S1, 并在菌株 S1 的基础上, 使用组成型启动子 *ADHI* 表达 FPP 合酶编码基因 *ERG20*, 获得重组菌株 S2 (表 2)。将上述菌株发酵培养 72 h, 萃取并检测发酵液中法尼醇产量。如图 3 所示, 未在 CEN.PK2-1D 菌株的发

醇液中检测到法尼醇, 说明其产量低于气相色谱的检测下限 0.1 mg/L; 过表达 tHMGR1 的菌株 S1 中法尼醇产量达到 1.87 mg/L, 实现从“无”到“有”的量变; 在此基础上过表达 ERG20 的菌株 S2 中法尼醇产量进一步提升到 5.08 mg/L, 约为菌株 S1 中产量的 2.7 倍, 为出发菌株 CEN.PK2-1D 的 50.8 倍。这些实验结果表明, 强化表达 MVA 途径中的关键酶, 可有效提升目标产物法尼醇的产量。

2.2 弱化麦角固醇分支途径

在酿酒酵母中, FPP 是异戊二烯合成途径中的关键节点, 流向麦角固醇合成通路和法尼醇合成通路。FPP 在鲨烯合酶(Squalene synthase, *ERG9* 编码)的催化下形成角鲨烯, 再经一系列反应最终合成细胞膜的重要组分麦角固醇。由于麦角固醇在细胞生长中具有重要作用, 这条途径只能下调, 不能完全消除, 因此, 需要采用弱启动子或抑制性启动子替换内源 *ERG9* 启动子以有效改变

FPP 的流向。根据已有研究报道, 酵母内源葡萄糖转运蛋白编码基因 *HXT1* 的启动子强度依赖于葡萄糖浓度, 在高浓度葡萄糖条件下上调表达, 而在低浓度葡萄糖条件下下调表达, 表达水平显著低于 *ERG9* 启动子^[24], 是常用的替换启动子。我们在培养发酵菌株时使用的培养基中含有 0.2% 葡萄糖和 2% 半乳糖(下面 2.3 部分中使用 *GALI* 启动子驱动磷酸酶或合酶表达的诱导剂), 酵母细胞能够快速消耗葡萄糖, 满足初始菌体的积累; 在葡萄糖耗尽, 利用半乳糖时, 启动子替换为 *HXT1* 启动子的 *ERG9* 使转录表达水平有效降低^[24], 能够显著削弱角鲨烯合成途径, 使前体 FPP 更多地流向法尼醇合成通路, 进而有利于目标产物法尼醇的合成。与预期相符的是, 在菌株 S2 基础上替换 *ERG9* 启动子获得的菌株 S3 中, 法尼醇产量提高至 239.17 mg/L, 为菌株 S2 产量的 47.1 倍(图 3)。

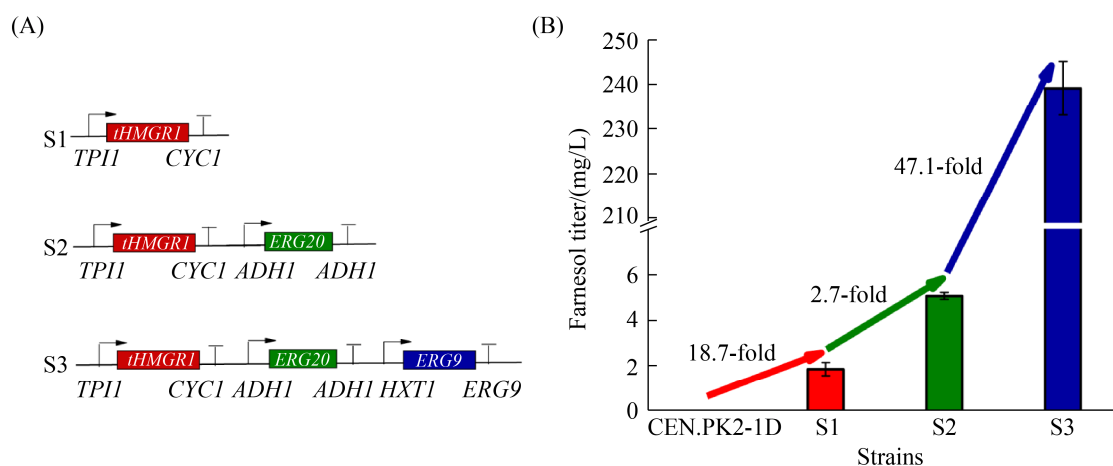


图 3. 上调 MVA 途径关键酶的表达和下调麦角固醇分支途径合成对法尼醇产量的影响

Figure 3. The effect of up-regulating the expression of key enzymes in the MVA pathway and down-regulating the ergosterol synthesis on farnesol production of *S. cerevisiae*. S1: yeast cells overexpressing truncated HMGR1(tHMGR1); S2: yeast cells overexpressing tHMGR1 and ERG20; S3: yeast cells overexpressing tHMGR1 and ERG20 and carrying the *ERG9* gene promoter replaced with the *HXT1* promoter. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments with at least three independent transformants.

2.3 筛选高效内源磷酸酶和异源法尼醇合酶

在酿酒酵母中存在 4 种内源磷脂酰磷酸酶，分别是 DPP1、LPP1、APP1 和 PAH1^[9-11]。其中 DPP1 和 LPP1 已被发现在水解 FPP 生成法尼醇过程中发挥作用^[7]，而 APP1 和 PAH1 是否在该过程中发挥作用还不清楚。此外，碱性磷酸酶 Pho8 的 N 端截短形式突变体 Pho8 Δ 62 也能够促进法尼醇生成^[8]。除了上述内源五种磷酸酶，两种来源植物的倍半萜合酶 OsTPS13 和 MoTPS2 被发现能够在体外催化 FPP 生成法尼醇^[12-13]。为了进一步增强法尼醇产量，我们将上述 5 种磷酸酶和两种合酶编码基因分别在酿酒酵母中表达，并检测对法尼醇产量的影响。

我们分别扩增了 5 种内源磷酸酶 DPP1、LPP1、APP1、PAH1、Pho8 Δ 62 和 2 种异源合酶 OsTPS13、MoTPS2 的编码基因片段，连接进入含有诱导型强启动子 *GAL1* 的 pRS425 载体骨架，

并将它们分别转入上述构建的菌株 S3 中，获得重组菌株 S5–S11；同时单独将 pRS425 载体骨架转入 S3，获得对照菌株 S4 (图 4-A, 表 2)。将这些重组菌株在含有 0.2% 葡萄糖和 2% 半乳糖为碳源的摇瓶中培养 72 h，并采用气相色谱检测法尼醇的产量。分析发现，表达空载质粒的菌株 S4 与未表达空载质粒的菌株 S3 的法尼醇产量相同。以 S4 菌株作为对照菌株，进一步分析发现重组菌株 S5–S11 的法尼醇产量均有所提升，其中表达磷酸酶 PAH1 的菌株 S8 的法尼醇产量最高，达到 393.13 mg/L；表达磷酸酶 DPP1 的菌株 S5 次之，达到 366.78 mg/L (图 4-B)。这些结果表明，在强化前体关键酶和抑制竞争途径的基础上，使用半乳糖诱导型启动子分别表达内源磷酸酶和异源法尼醇合酶，对法尼醇的合成均具有促进作用，内源性磷酸酶 PAH1 的强化表达对法尼醇产量的提升效果最为明显。

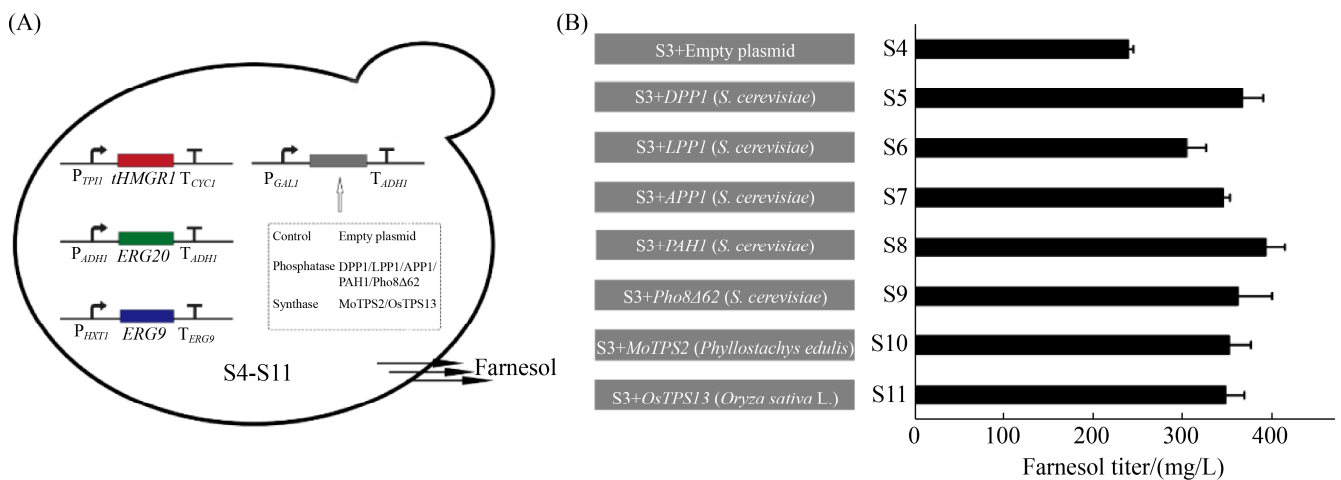


图 4. 分别组成型过表达酵母内源磷酸酶与植物来源的法尼醇合酶对法尼醇产量的影响

Figure 4. The effect of respective constitutive overexpression of five endogenous phosphatases and two heterologous synthases on farnesol production in *S. cerevisiae*. A: schematic illustration of yeast strains S4–S11; B: production of farnesol in yeast strains S4–S11. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments with at least three independent transformants.

3 讨论

本文以酿酒酵母 CEN.PK2-1D 菌株为底盘细胞, 以模块化的策略调控类异戊二烯合成途径和法尼醇合成途径, 构建高效生产法尼醇的酿酒酵母工程菌株。在上游合成模块中, 强化表达甲羟戊酸途径中的关键酶 *tHMGR1* 和 *ERG20*, 以提高前体物质 FPP 的供给; 在下游支路模块中, 利用响应葡萄糖浓度变化的 *HXT1* 启动子动态调控角鲨烯合酶编码基因 *ERG9* 的表达, 减少鲨烯-麦角固醇合成通路对 FPP 的竞争; 在产物合成模块中, 筛选高效的内源磷酸酶或异源法尼醇合酶, 进一步增强了目标产物法尼醇合成途径在 FPP 节点处的竞争力。在摇瓶培养 72 h 的条件下, 组合模块优化得到的工程菌株的法尼醇产量最高达到 393.13 mg/L, 是 Ohto 等^[17]报道在小型发酵罐中培养酿酒酵母 7 d 所获得的法尼醇产量的 2.7 倍。

法尼醇是在磷酸酶和倍半萜合酶的催化下将 FPP 去磷酸化形成的。本研究选取的 5 种酵母内源磷酸酶, 其中 *DPP1* 和 *LPP1* 都是具有 6 个跨膜区域的膜整合蛋白, 能与膜脂质亲和性的物质如 FPP 发生反应^[7]; *Pho8* 是锚定于液泡的碱性磷酸酶, N 端截短后定位在胞质内能更高效地催化 FPP^[8]; 上述这 3 种酶均可以顺序水解 FPP 为 FMP 并在水解过程中释放出 2 个磷酸^[3]。此外, 磷脂酰磷酸酶 *APP1* 定位于皮质肌动蛋白片上, 在脂质代谢平衡和细胞生理方面是重要的调节因子^[9]。磷脂酰磷酸酶 *PAH1* 根据磷脂酸的水平定位, 可通过两亲螺旋经由胞质易位至细胞核/内质网膜上^[10-11]。虽然之前未见 *APP1* 和 *PAH1* 在法尼醇合成中的作用的报道, 但我们的结果显

示, 过表达 *APP1* 和 *PAH1* 均能一定程度上提高法尼醇的产量, 且过表达 *PAH1* 时对产量提升作用最显著。需要注意的是, 除了 N 端截短形式的 *Pho8*, 这些内源磷酸酶均锚定于膜上, 本文中所采用的诱导性强启动子对膜蛋白的高效表达未必合适, 今后仍需要探索具有合适强度的启动子, 以进一步提高产量。植物倍半萜合酶 *OsTPS13* 和 *MoTPS2* 对 FPP 是特异性的且催化时使用与磷酸酶完全不同的机制, 它们具有类似的活性位点支架, 通过形成碳正离子中间体来启动催化功能, 在金属离子存在下 FPP 被电离形成法尼基阳离子, 经焦磷酸盐的去除和水的捕获以合成法尼醇^[3]; 其中 *OsTPS13* 的产物包括 84.2% 的法尼醇和 9.7% 法尼醇结构异构体^[12], 据文献报道来源于 *Ginkgo biloba* 的合酶 *GbTPS1* 也具备催化 FPP 合成 FOH 的能力, 且具有仅生成法尼醇的专一性^[25]。日后也需要更多发现具有高催化性和高专一性的法尼醇合酶, 以进一步提高法尼醇的产量。此外, 对上述磷酸酶和合酶进行排列组合过表达也可能会获得法尼醇产量进一步提升的工程菌株, 有待探讨。

在未来可在基因水平上通过调节启动子的强度和多拷贝高效表达的方法提高酶的表达量, 进一步强化甲羟戊酸途径前体的供给^[26]; 可通过调控和改造酵母内源代谢途径或者引入外源酶的策略, 从源头上提高底物乙酰辅酶 A 的供应量^[27]; 还可过量表达调节甾醇生物合成的全局转录因子 *UPC2* 或其突变体 *UPC2-1*, 从转录水平强化 MVA 途径中各个酶的表达水平, 进而提高整个代谢途径的通量^[28]; 也可以通过对途径中各种代谢物的动态定量和监测来动态调控生物合成途径, 本文仅使用葡萄糖诱导型弱启动子 *HXT1* 和半乳

糖诱导型强启动子 *GALI* 进行初步探索, 还需进一步研究在酿酒酵母生长整个阶段内中间代谢产物的积累和合成途径中各基因的协调表达, 以实现产物合成和细胞生长的最佳平衡策略。此外, 本研究为实验室摇瓶条件下的初步发酵培养, 所用的发酵培养基比较简单, 在后期的研究中还需要加强对培养基的成分、溶氧量和 pH 等发酵条件的优化, 以及通过上述提到的多种策略进一步改造重组菌株, 以期进一步增加目标产物法尼醇的产量, 提高工程菌的发酵生产性能, 为实现工业化生产奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Belcher MS, Mahinthakumar J, Keasling JD. New frontiers: harnessing pivotal advances in microbial engineering for the biosynthesis of plant-derived terpenoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 65: 88–93.
- [2] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(2): 446–475.
- [3] Wang CL, Kim JY, Choi ES, Kim SW. Microbial production of farnesol (FOH): current states and beyond. *Process Biochemistry*, 2011, 46(6): 1221–1229.
- [4] Tippmann S, Chen Y, Siewers V, Nielsen J. From flavors and pharmaceuticals to advanced biofuels: production of isoprenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal*, 2013, 8(12): 1435–1444.
- [5] Niu FX, Lu Q, Bu YF, Liu JZ. Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids: carotenoids and isoprenoid-based biofuels. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, 2(3): 167–175.
- [6] Misawa N. Pathway engineering for functional isoprenoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(5): 627–633.
- [7] Faulkner A, Chen X, Rush J, Horazdovsky B, Waechter CJ, Carman GM, Sternweis PC. The *LPP1* and *DPP1* gene products account for most of the isoprenoid phosphate phosphatase activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(21): 14831–14837.
- [8] Song LS. A soluble form of phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* capable of converting farnesyl diphosphate into *E,E*-farnesol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 128(2): 149–157.
- [9] Chae M, Han GS, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* actin patch protein App1p is a phosphatidate phosphatase enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(48): 40186–40196.
- [10] Karanasios E, Han GS, Xu Z, Carman GM, Siniossoglou S. A phosphorylation-regulated amphipathic helix controls the membrane translocation and function of the yeast phosphatidate phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(41): 17539–17544.
- [11] Karanasios E, Barbosa AD, Sembongi H, Mari M, Han GS, Reggiori F, Carman GM, Siniossoglou S. Regulation of lipid droplet and membrane biogenesis by the acidic tail of the phosphatidate phosphatase Pah1p. *Molecular Biology of the Cell*, 2013, 24(13): 2124–2133.
- [12] Cheng AX, Xiang CY, Li JX, Yang CQ, Hu WL, Wang LJ, Lou YG, Chen XY. The rice (*E*)- β -caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes. *Phytochemistry*, 2007, 68(12): 1632–1641.
- [13] Chen X, Wang YW, Sun J, Wang J, Xun H, Tang F. Cloning, expression and functional characterization of two sesquiterpene synthase genes from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Protein Expression and Purification*, 2016, 120: 1–6.
- [14] Asadollahi MA, Maury J, Møller K, Nielsen KF, Schalk M, Clark A, Nielsen J. Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of *ERG9* repression on sesquiterpene biosynthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99(3): 666–677.
- [15] Muramatsu M, Ohto C, Obata S, Sakuradani E, Shimizu S. Various oils and detergents enhance the microbial production of farnesol and related prenyl alcohols. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(3): 263–267.
- [16] Muramatsu M, Ohto C, Obata S, Sakuradani E, Shimizu S. Alkaline pH enhances farnesol production by

- Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 108(1): 52–55.
- [17] Ohto C, Muramatsu M, Obata S, Sakuradani E, Shimizu S. Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae* for production of prenyl alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(5): 837–845.
- [18] Hashida-Okado T, Ogawa A, Kato I, Takesako K. Transformation system for prototrophic industrial yeasts using the *AURI* gene as a dominant selection marker. *FEBS Letters*, 1998, 425(1): 117–122.
- [19] Gietz RD, Schiestl RH. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2007, 2(1): 31–34.
- [20] Rodriguez S, Kirby J, Denby CM, Keasling JD. Production and quantification of sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*, including extraction, detection and quantification of terpene products and key related metabolites. *Nature Protocols*, 2014, 9(8): 1980–1996.
- [21] Fischer MJC, Meyer S, Claudel P, Bergdoll M, Karst F. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(8): 1883–1892.
- [22] Jiang GZ, Yao MD, Wang Y, Zhou L, Song TQ, Liu H, Xiao WH, Yuan YJ. Manipulation of GES and ERG20 for geraniol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 57–66.
- [23] Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, Eng D, Woolard FX, Regentin R, Horning T, Tsuruta H, Melis DJ, Owens A, Fickes S, Diola D, Benjamin KR, Keasling JD, Leavell MD, McPhee DJ, Renninger NS, Newman JD, Paddon CJ. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(3): E111–E118.
- [24] Scalcinati G, Knuf C, Partow S, Chen Y, Maury J, Schalk M, Daviet L, Nielsen J, Siewers V. Dynamic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of plant sesquiterpene α -santalene in a fed-batch mode. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(2): 91–103.
- [25] Parveen I, Wang M, Zhao JP, Chittiboyina AG, Tabanca N, Ali A, Baerson SR, Techen N, Chappell J, Khan IA, Pan ZQ. Investigating sesquiterpene biosynthesis in *Ginkgo biloba*: molecular cloning and functional characterization of (*E,E*)-farnesol and α -bisabolene synthases. *Plant Molecular Biology*, 2015, 89(4/5): 451–462.
- [26] Guo R, Ding MZ, Yuan YJ. Construction of artificial yeast cell for producing amorphadiene, and optimization of fermentation. *CIESC Journal*, 2015, 66(1): 378–385. (in Chinese)
- [27] Guo R, Ding MZ, Yuan YJ. Construction of artificial yeast cell for producing amorphadiene, and optimization of fermentation. *CIESC Journal*, 2015, 66(1): 378–385. (in Chinese)
郭睿, 丁明珠, 元英进. 产青蒿二烯的人工酵母细胞的构建及发酵优化. *化工学报*, 2015, 66(1): 378–385.
- [28] Chen Y, Daviet L, Schalk M, Siewers V, Nielsen J. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 48–54.
- [29] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MCY, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940–943.

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to improve farnesol production

Junqi Guo, Zheng Wang, Weixin Zhang*, Weifeng Liu

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266200, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] Farnesol (FOH, C₁₅H₂₆O) is a natural acyclic sesquiterpene alcohol with an aromatic odor. It is widely used in the industrial production of cosmetics and pharmaceuticals and also considered as an aviation jet-fuel substitute. Although food-grade *S. cerevisiae* can synthesize endogenous FOH, the yield is too low to meet the requirements for industrial production. Therefore, in this work, the FOH synthesis pathway in *S. cerevisiae* was metabolically engineered to overproduce FOH. [Methods] To improve the intracellular level of farnesyl pyrophosphate (FPP), the direct precursor for FOH synthesis, the mevalonate pathway in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D was enhanced via constitutive overexpression of genes encoding the two key enzymes whereas the ergosterol pathway was weakened by replacing the *EGR9* promoter with the *HXT1* promoter. In addition, five genes encoding endogenous phosphatases and two heterologous synthases that could catalyze FOH synthesis, were individually overexpressed to determine the enzyme with optimum performance. [Results] Shake flask culture experiments showed that constitutive overexpression of genes encoding the truncated HMG-CoA reductase (tHMGR1) and the FPP synthase ERG20 in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D increased the production of FOH by 50.8 fold to reach 5.08 mg/L. Down-regulation of the squalene synthase encoding gene *ERG9*, by replacing its promoter with the *HXT1* promoter, further increased the FOH titer to 239.17 mg/L. On this basis, a maximum yield of FOH (393.13 mg/L) was obtained when the endogenous phosphatase PAH1 was overexpressed. [Conclusion] In this study, metabolic engineering of *S. cerevisiae* was used to increase the production titer of FOH to 393.13 mg/L. This is the highest reported yield of FOH from *S. cerevisiae* under shake flask culture conditions.

Keywords: farnesol, *Saccharomyces cerevisiae*, mevalonate pathway, phosphatase, farnesol synthase

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key R&D Program of China (2019YFA0905700)

*Corresponding author. Tel: +86-532-58632405; E-mail: zhangwx@sdu.edu.cn

Received: 3 June 2020; Revised: 29 July 2020; Published online: 11 December 2020