

# 增强甘油代谢提高酵母工程菌的红没药烯产量

臧瑜<sup>#</sup>, 李圳炆<sup>#</sup>, 卢雨欣, 杭嘉炜, 袁围, 孙杰<sup>\*</sup>

浙江工业大学生物工程学院, 浙江 湖州 313000

臧瑜, 李圳炆, 卢雨欣, 杭嘉炜, 袁围, 孙杰. 增强甘油代谢提高酵母工程菌的红没药烯产量[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 847-857.

ZANG Yu, LI Zhenyang, LU Yuxin, HANG Jiawei, YUAN Wei, SUN Jie. Enhancing the glycerol utilization of engineered yeast increases its bisabolene production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 847-857.

**摘要:** 红没药烯(bisabolene)是植物精油中普遍存在的活性成分, 广泛应用于化工、医药、保健等领域。本研究通过对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)工程菌中甘油代谢途径进行改造, 从而获得高产红没药烯的酵母工程菌株。以利用 *GAL* 启动子加强甲羟戊酸途径的酿酒酵母工程菌 YS036 作为出发菌株, 通过高表达来自嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)的甘油转运通道基因 *PtFPS2* 和来自耐热甲基化酵母(*Ogataea parapolymorpha*)的甘油脱氢酶基因 *Opgdh*, 有效增强酵母对甘油的利用; 另一方面, 为减弱葡萄糖阻遏作用, 敲除葡萄糖抑制转录因子编码基因 *MIG1*。结果表明, *MIG1* 敲除菌的蔗糖和甘油共利用能力得到进一步增强, 重组菌株的 *GAL* 启动子转录水平增加。在摇瓶发酵中的红没药烯的最高产量比出发菌株提高 82.2%, 达到 866.7 mg/L。本研究通过对酵母工程菌碳源代谢进行改造, 提高了红没药烯的产量, 并为提高工程酵母合成其他萜类化合物产量提供了一种有效的策略。

**关键词:** 红没药烯; 酿酒酵母; 甘油代谢; 甲羟戊酸途径

## Enhancing the glycerol utilization of engineered yeast increases its bisabolene production

ZANG Yu<sup>#</sup>, LI Zhenyang<sup>#</sup>, LU Yuxin, HANG Jiawei, YUAN Wei, SUN Jie<sup>\*</sup>

College of Biological Engineering, Zhejiang University of Technology, Huzhou 313000, Zhejiang, China

**Abstract:** Bisabolene is a compound commonly found in essential oils of various plants. It has a broad application in sectors such as chemical, pharmaceutical, and health-care products. This study focuses on modifying the glycerol metabolism pathway to obtain a high

\*Corresponding author. E-mail: jsun@zjut.edu.cn

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study.

Received: 2023-05-08; Accepted: 2023-07-11; Published online: 2023-07-18

bisabolene-producing strain of *Saccharomyces cerevisiae*. To achieve this, the glycerol transporter gene *PtFPS2* from *Pachysolen tannophilus* and the glycerol dehydrogenase gene *Opgdh* from *Ogataea parapolyomorpha* were overexpressed in engineered yeast YS036, which was equipped with a *GAL* promoters-enhanced mevalonic acid pathway. Additionally, the glucose-inhibiting transcription factor *MIG1* was knocked out to reduce glucose inhibition. The results showed that the *GAL* promoter transcription levels of the recombinant yeast strains increased, and the co-utilization of sucrose and glycerol was further improved in *MIG1*-knockout strain. Moreover, the maximum yield of bisabolene in shaking flask fermentation increased to 866.7 mg/L, an 82.2% increase compared to that of the original strain. By modifying the metabolic pathway of carbon sources, the yield of bisabolene was considerably improved. This study offers an effective strategy for enhancing the yield of terpene compounds in engineered yeast.

**Keywords:** bisabolene; *Saccharomyces cerevisiae*; glycerol metabolism; mevalonic acid pathway

红没药烯(bisabolene)又称甜没药烯,是一种单环倍半萜类化合物,具有木香和果香,天然存在于红没药、佛手柑、八角油和穗状薰衣草油等植物中。红没药烯具有抗疟疾、肿瘤、溃疡、抑制细菌生物活性和调节神经活动等作用<sup>[1-2]</sup>,广泛用于香料、化妆品和洗涤剂中<sup>[3]</sup>。目前,大多数红没药烯的工业生产是通过从植物精油中浓缩浸取得到<sup>[4]</sup>。但该方法存在原料来源有限、产品收率低、分离步骤复杂和易造成生态资源浪费等缺点<sup>[5]</sup>。化学合成红没药烯也存在生产设备复杂、原料转化率低等问题<sup>[6]</sup>。利用生物法合成制备红没药烯是一种更具可持续性和环境友好性的方法。

近年来,利用代谢工程方法异源合成红没药烯取得了很大进展。最先得到的 $\alpha$ -红没药烯合成酶基因是由 Bohlmann 等<sup>[7]</sup>从北美冷杉(*Abies grandis*)中分离出来。研究者随后在大肠杆菌(*Escherichia coli*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[8]</sup>、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)<sup>[9]</sup>和荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)<sup>[10]</sup>中成功合成了红没药烯。酵母中异源构建的红没药烯生物合成途径如图 1 所示,葡萄糖在糖酵解后合成丙酮酸,进一步氧化脱羧产生乙酰 CoA,作为甲羟戊酸(mevaleric acid, MVA)途径的初始底物。

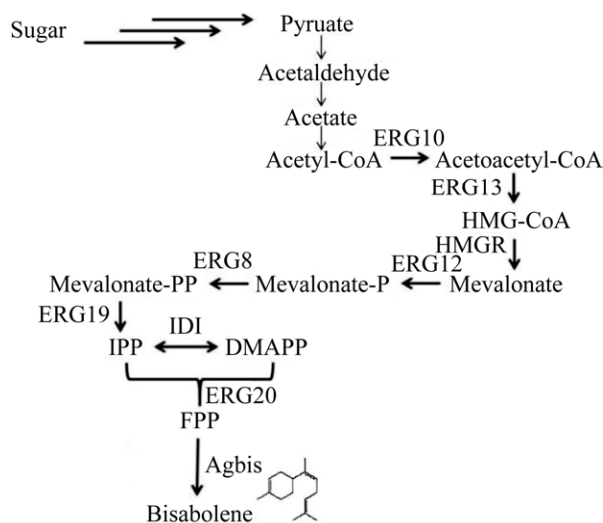


图 1 酿酒酵母中构建异源 $\alpha$ -红没药烯合成途径

Figure 1 Heterologous  $\alpha$ -bisabolene synthesis pathway constructed in *Saccharomyces cerevisiae*.

IPP: Isopentenyl diphosphate; DMAPP: Dimethyl allyl diphosphate; FPP: Farnesyl pyrophosphate; Erg10: Acetyl-CoA thiolase; Erg13: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase; HMGR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; ERG12: Mevalonate kinase; ERG8: Phosphomevalonate kinase; ERG19: Mevalonate pyrophosphate decarboxylase; IDI: IPP/DMAPP isomerase; Erg20: Farnesyl pyrophosphate synthetase; Agbis:  $\alpha$ -bisabolene synthase from *Abies grandis*.

在 MVA 途径中合成的法尼烯焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)经过红没药烯合成酶催化,最终合成红没药烯<sup>[11]</sup>。乙酰辅酶 A 合成酶以乙酸和辅酶 A 为底物合成乙酰辅酶 A 时需要消耗 ATP,该步反应限制了下游 MVA 途径的代谢通量<sup>[12]</sup>。当以甘油为底物时,可以增强丙酮酸的合成<sup>[13]</sup>,推测可以进一步增加乙酰辅酶 A 的合成。另外, *MIG1* 蛋白作为葡萄糖转录负调控中的关键因子,其编码的蛋白具有 C2H2 锌指结构,培养基中存在葡萄糖时, *MIG1* 蛋白会与 *GAL* 启动子的上游调节序列结合,从而抑制 *GAL* 启动子的转录活性<sup>[14-15]</sup>。此情况下,去除或部分解除葡萄糖阻遏效应能够进一步增强甘油代谢,有助于促进糖类和甘油的共利用。例如,蔡艳青等<sup>[16]</sup>从葡萄糖阻遏的角度研究葡萄糖、木糖共利用的问题,发现 *MIG1* 和 *SNF1* 双敲除的菌株虽然利用葡萄糖加快而利用木糖减慢,但是菌株能够同时代谢葡萄糖和木糖。

基于上述报道,本研究拟过表达来自嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)的甘油转运通道基因 *PtFPS2* 和来自耐热甲基化酵母(*Ogataea parapolymorpha*)的甘油脱氢酶基因 *Opgdh*,以期有效增强酵母的甘油利用;进一步探究敲除

*MIG1* 基因能否部分解除葡萄糖阻遏效应,提高酿酒酵母工程菌同时利用蔗糖和甘油的能力,从而达到提高红没药烯产量的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究中所有酿酒酵母菌株以单倍体 YS036 为出发菌株,该菌株来源于 CEN.PK2-1D,敲除 *GAL80* 基因,并利用 *GAL* 启动子增强其甲羟戊酸途径<sup>[17]</sup>。本实验中所有菌株及基因型详见表 1。根据酿酒酵母的密码子偏好性,对来自 *A. grandis* (GenBank 登录号: O81086.1)编码红没药烯合酶的基因 *Agbis* 进行密码子优化,将其克隆到 pYES2 质粒中,得到质粒 pYES2-*Agbis*。以质粒 p414-TEF1p-Cas9-CYC1 (Addgene)为模板,使用表 2 中所列引物,PCR 扩增得到 TEF1p-Cas9-CYC1 的表达盒。通过一步克隆试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司, ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit, C115),插入质粒 p426-SNR52p-gRNA. CAN1.Y-SUP4t (Addgene), 所得到的新质粒命名为 p414-Cas9-gRNA。

表 1 本研究中所涉及到的菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Host strain	Gene type	Resource
CEN.PK2-1D		<i>MATa; his3D1; leu2-3_112; ura3-52; trp1-289; MAL2-8c; SUC2</i>	Euroscarf
YS036	CEN.PK2-1D	<i>GAL80Δ::loxP, trp1-289::P<sub>GALI</sub>-tHmg1_P<sub>GALI0</sub>-Erg20-TRP1, rox1Δ::P<sub>GALI</sub>-Mvd1_P<sub>GALI0</sub>-ERG8_P<sub>GAL2</sub>-Idi1, ypl062wΔ::P<sub>GALI</sub>-RpHmgr_P<sub>GALI0</sub>-ERG13_P<sub>GAL2</sub>-Erg12, P<sub>ERG9</sub>Δ::P<sub>GALI0</sub>-Erg13_P<sub>GALI</sub>-ERG12_P<sub>GAL2</sub>-ID11_P<sub>HXT1</sub>-Erg9, BTS1Δ::P<sub>GALI</sub>-RpHmgr_P<sub>GALI0</sub>-Erg10-P<sub>GAL2</sub>-tHMG; adh1Δ::P<sub>FBA1</sub>-ACS2_P<sub>GALI0</sub>-zmPDC_P<sub>HXT7</sub>-ADH2</i>	[17]
HJW03	YS036	pYES2- <i>Agbis</i>	This study
HJW04	YS036	<i>YPRCtau3Δ::PtFPS2-P<sub>GALI0/1</sub>-Opgdh_P<sub>GAL7</sub>-DAK1-His-P<sub>GAL2</sub>-NOXE</i>	This study
HJW05	HJW04	pYES2- <i>Agbis</i>	This study
HJW10	HJW04	<i>MIG1Δ</i>	This study
HJW11	HJW10	pYES2- <i>Agbis</i>	This study

### 1.1.2 培养基

LB 培养基: 氯化钠 1%, 蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5%, 调节 pH 至 7.0。

酵母膏胨葡萄糖琼脂(yeast extract peptone dextrose, YPD)培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母提取物 1%。

YND 培养基: 葡萄糖 2%, 硫酸铵 0.5%, 酵母非氨基酸氮源(YNB) 0.17%。根据不同筛选标记的需要, 在培养基中添加亮氨酸、组氨酸和尿嘧啶的终浓度均为 20 mg/L。

YNS 培养基: 蔗糖 2%, YNB 0.17%, 硫酸铵 0.5%。根据不同筛选标记的需要, 在培养基中添加亮氨酸、组氨酸和尿嘧啶的终浓度均为 20 mg/L。

YNSG 培养基: 将 YNS 培养基中的蔗糖 2%, 替换为蔗糖 1% 和甘油 1%。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌株的构建

将来源于 *Pachysolen tannophilus* 的甘油转运通道基因 *PtFPS2* (GenBank 登录号: AFN43531.1)、来源于 *Ogataea parapolyomorpha* 的甘油脱氢酶基因 *Opgdh* (GenBank 登录号: XP\_018210953.1)、来源于乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的 NADH 氧化酶编码基因 *NOXE* (GenBank 登录号: EQC87502.1) 按照酿酒酵母密码子偏好性人工合成。本研究中使用的启动子、编码内源性酶的基因、终止子和用于整合的同源臂是从酿酒酵母 BY4741 的基因组 DNA 扩增而来的。

采用表 2 引物, PCR 扩增分别得到带有同源序列的整合位点 YPRCtau3 上游同源臂、*PtFPS2*-*PGAL10/1*-*Opgdh* 片段、*GAL7* 启动子、二羟基丙酮激酶 *DAK1* 基因、His 表达盒、*GAL2* 启动子、*NOXE* 基因和整合位点 YPRCtau3 下游同源臂。按照文献中的 DNA 装配方法<sup>[18]</sup>, 将上述带有同源臂和重叠区的 DNA 长片段, 通过乙

酸锂化学转化法, 整合至 YS036 酵母基因组上, 得到菌株 HJW04。

利用网站 <http://chopchop.cbu.uib.no/>, 根据靶位点 *MIG1* 基因设计靶标序列(catacaaaactcccaccctcg), 使用引物对 gRNA-*Mig1*-F/gRNA-*Mig1*-R 通过全质粒 PCR, 得到靶向 *MIG1* 基因的 p414-Cas9-gRNA.*Mig1* 质粒。转化菌株 HJW04, YPD 连续传代后, 使用 5-氟乳清酸筛选丢失 p414-Cas9-gRNA.*Mig1* 质粒的菌株, 得到 *MIG1* 基因敲除的菌株 HJW10。

分别向菌株 YS036、HJW04 和 HJW10 转入带有红没药烯合成酶基因 *Agbis* 的 pYES2 质粒, 得到红没药烯的合成菌株 HJW03、HJW05 和 HJW11。

### 1.2.2 摇瓶双相发酵

采用摇瓶双相发酵进行培养评估红没药烯产生菌株。将保藏的菌株在葡萄糖固体培养基上划线, 挑取单菌落接种于装有 50 mL YND 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 30 °C、180 r/min 预培养过夜。按 5% 的接种量, 转接至含有 50 mL YNS 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 30 °C、180 r/min 发酵 12 h 加入体积终浓度 10% 的十二烷, 培养 96 h 后收集菌体, 测量细胞密度, 并采集十二烷样品用于红没药烯分析。

### 1.2.3 荧光定量 PCR

用 TransZol Up 试剂盒(TransGen Biotech)提取总 RNA, 并使用 qPCR-RT 试剂盒(Toyobo)从 500 ng 总 RNA 合成 cDNA。使用 SYBR Green 实时 PCR 试剂盒(Toyobo), 使用 Lightcycler 480II 实时 PCR 系统(Roche)进行定量 PCR 测定。基因特异性引物列于表 3 中。PCR 程序设置为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 57 °C 5 s, 72 °C 15 s, 共 40 个循环。以相对表达量不会改变的基因 *ACT1* 作为内参基因, 相对于基因 *ACT1* 的 mRNA 表达水平使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 *GAL1*、*GAL2*、*GAL10* 转录水平。

表 2 用于菌株构建的引物序列

Table 2 Primers used for strain construction

Strain and plasmid	Primers	Sequences (5'→3')
HJW04	YPRCtau3-up-F	CGATAAGTGCTAAAGGAGGTGC
	YPRCtau3-up-R	TATAGCATGAGGTCGCTCCAATACGTCCCCTTTGATACTTCCATA
	FPS2-gdh-F	TATGGAAGTATCAAAGGGGACGTATTGGAGCGACCTCATGCTATA
	FPS2-gdh-R	GTGAGGAAATTCGCTGTGACACTGTGAGCGAGGAAGCGGAA
	GAL7-F	TTCCGCTTCCTCGCTCACAGTGTACAGCGAATTCCTCAC
	GAL7-R	ACTTCAAACGATTTAGCGGACATTTTTGAGGGAATATTCAACTGTTTT
	DAK1-F	AAAACAGTTGAATATTCCTCAAAAATGTCCGCTAAATCGTTTGAAGT
	DAK1-R	ACTTCCCTGACTAATGCCGTGCCCTTCTTGTCTTACCACCGAT
	His-F	ATCGGTGGTAAGAACAAGAAGGACACGGCATTAGTCAGGGAAGT
	His-R	CCGTAAACCTCCTTGGATTAGTACAGGTATTTCTCCTTACGCATCTGT
	GAL2-F	ACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCTGTACTAATCCAAGGAGGTTTACGG
	GAL2-R	TGCCGATCACGACTATCTTCATTATGAAAGAATTATTTTTTTTATTATGTTAATC
	NOXE-F	GATTAACATAATAAAAAAATAATTCTTTCATAATGAAGATAGTCGTGATCGGCA
	NOXE-R	GCAACCCAAGACTCGGCATAAATTGGAGCGACCTCATGCTAT
	YPRCtau3-down-F	ATAGCATGAGGTCGCTCCAATTTATGCCGAGTCTTGGGTTGC
	YPRCtau3-down-R	AGCCCCTAATACAACAGTGAGCT
	p414-CAS9-gRNA plasmid	CE-CAS9-F
CE-CAS9-R		TCTTCCGCTTCCTCGCTCACGCTTTGAAAGATGATACTCTTTATTAA
gRNA-plasmid-F		GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
gRNA-plasmid-R		CAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA
HJW10	gRNA-Mig1-F	CATACAACTCCCACCCTCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG
	gRNA-Mig1-R	CCGAGGGTGGGAGTTTGTATGGATCATTATCTTTCCTACTGCGGAGA
	MIGup-F	TATGGAAGTATCAAAGGGGACGTATTGGAGCGACCTCATGCTATA
	MIGup-R	GTGAGGAAATTCGCTGTGACACTGTGAGCGAGGAAGCGGAA
	MIG1down-F	TTCCGCTTCCTCGCTCACAGTGTACAGCGAATTCCTCAC
	MIG1down-R	ACTTCAAACGATTTAGCGGACATTTTTGAGGGAATATTCAACTGTTTT

表 3 本研究所使用的荧光定量引物

Table 3 Primers used for qPCR

Primers	Sequences (5'→3')
RT-GAL1-F	CTGGCTGGGGTGGTTGTA
RT-GAL1-R	AACTCATTGGCAAGGGCTTCT
RT-GAL2-F	CTGTGAAAACTTGGGACATCG
RT-GAL2-R	AACACCAACAGAGGCGTAGATGA
RT-GAL10-F	GGTGAAGCGACGCCAATAAA
RT-GAL10-R	GCACCATAATCTCCGTACCCTC
RT-ACT1-F	TTTTGGGTTTGAATCTGCC
RT-ACT1-R	TCGGCAATACCTGGGAACAT

1.2.4 代谢物的测定

红没药烯和甘油使用 Agilent 7890A 气相色谱系统进行测定。样品(1 μL)在 280 °C 下以分流模式(比例 1:10)进样; 分析物在 HP-5 气相色谱

柱(30 m×0.25 μm×0.25 μm EZ-guard; Agilent)上分离, 氦气流量为 1 mL/min, 温度梯度程序如下: 60 °C 5 min, 以 10 °C/min 升至 250 °C。对于质谱分析, 进样器和检测器的温度分别为 230 °C 和 150 °C。参考 Zhang 等<sup>[10]</sup>, 使用倍半萜(-)-反式石竹烯(Aladdin)制作标准曲线进行定量。

培养基中蔗糖含量使用 Waters 2695 液相色谱系统进行测定。检测条件为 C18 柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm), 流动相为 V(乙腈):V(甲醇):V(水)=8:1:1, 流速 1.0 mL/min, 温度 35 °C, 示差检测器。

1.2.5 统计数据

所有测定进行 3 次独立的生物学重复, 数据以平均值±标准差表示。在 GraphPad Prism 中使

用 Student's *t* 检验来确认本研究中的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 产红没药烯的酿酒酵母工程菌株的构建

本团队前期通过提高乙酰 CoA 的通量、增强 MVA 途径的代谢水平、减弱 *erg9* 的启动子,已成功构建了产萜类化合物的酿酒酵母工程菌株 YS036<sup>[17]</sup>,具体基因型详见表 1。本研究首先在出发菌株 YS036 中转入带有红没药烯合成酶基因 *Agbis* 的质粒,得到含红没药烯合成酶基因 *Agbis* 的菌株 HJW03,进行摇瓶双相发酵,测得菌株 HJW03 在蔗糖培养基中  $\alpha$ -红没药烯的产量为 475.7 mg/L。通过质谱鉴定(图 2),得到的谱图具备红没药烯 *m/z* 161、189 和 204 的特征谱<sup>[19]</sup>,同时也与 Peralta 等<sup>[8]</sup>和 Zhao 等<sup>[9]</sup>报道的  $\alpha$ -红没药烯的质谱谱图一致,说明成功构建了可合成  $\alpha$ -红没药烯的酿酒酵母工程菌株。

### 2.2 酿酒酵母甘油代谢的增强

本研究通过在酵母基因组上整合表达  $P_{GAL10}$ -*PtFPS2*、 $P_{GAL1}$ -*Opgdh*、 $P_{GAL7}$ -*DAK1* 和  $P_{GAL2}$ -*NOXE* 基因表达盒,增强菌株的甘油代谢

能力,得到菌株 HJW04。转入 pYES2-*Agbis* 质粒得到菌株 HJW05。为探究增强甘油代谢对红没药烯合成的影响,将 HJW03 和 HJW05 分别用碳源为 2%蔗糖的 YNS 培养基和碳源为 1%蔗糖+1%甘油的 YNSD 培养基进行摇瓶发酵,研究表明,虽然 YNS 培养基中两株菌的红没药烯产量没有显著差异,但是 HJW05 在 YNSD 培养基中的红没药烯产量较 HJW03 在 YNS 培养基的产量提高 12.9%,达到 537.1 mg/L,证明菌株增强甘油代谢途径的构建与平衡能有效增加红没药烯产量(图 3)。Lv 等<sup>[20]</sup>用甘油替代培养基中的蔗糖作为碳源,利用来源于 BY4741 的工程酵母菌发酵合成异戊二烯,在 1.4%甘油+0.6%蔗糖培养基中异戊二烯的产量比 2%蔗糖培养基中提高了 200%,远高于本研究中增强甘油代谢对红没药烯产量的提高幅度。这可能是由于本研究使用的酿酒酵母菌株 CEN.PK2 与 BY4741 (来源于菌株 S288C)的遗传背景和对甘油的利用能力不同导致<sup>[21]</sup>。另外,相比于 HJW03 在蔗糖培养基中发酵 96 h 后平均  $OD_{600}$  达到 9.1,增强甘油代谢的菌株 HJW05 在 YNSG 培养基中发酵 96 h

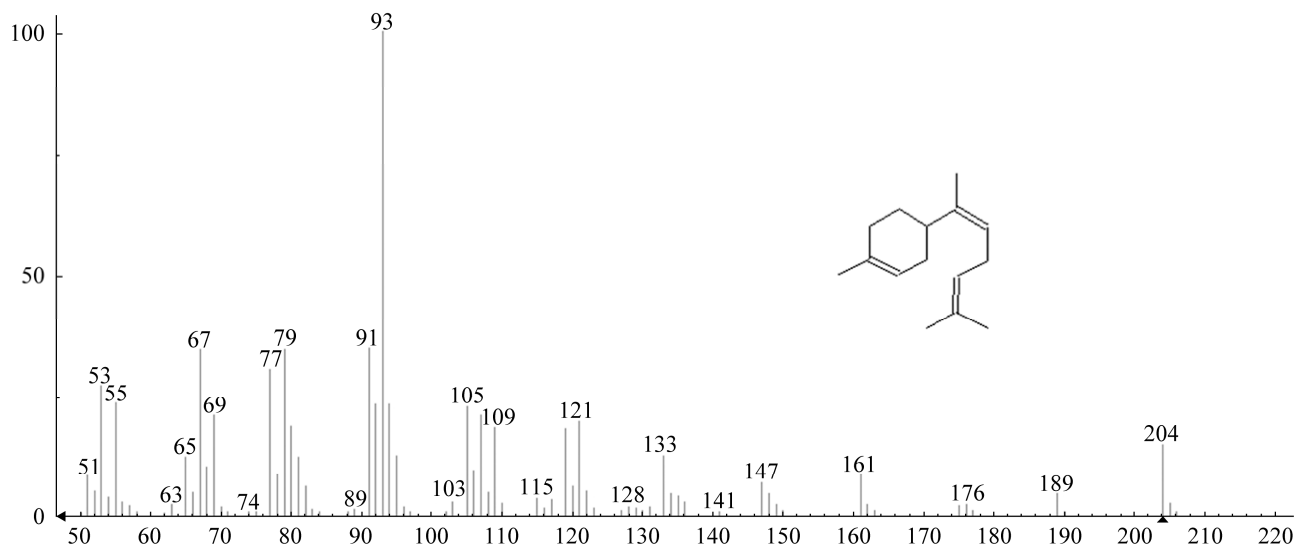


图 2 发酵液有机相中  $\alpha$ -红没药烯的质谱图

Figure 2 Mass spectrum of  $\alpha$ -bisabolene in fermentation broth.

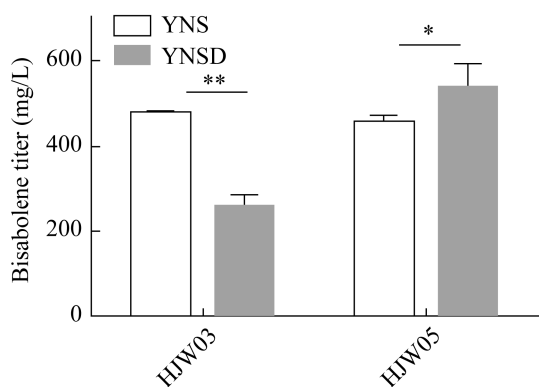


图3 重组菌株在 YNS 培养基和 YNSD 培养基中摇瓶培养 96 h 后的红没药烯产量

Figure 3 The yield of bisabolene after 96 h shake flask culture in YNS and YNSD medium. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

后平均  $OD_{600}$  仅为 6.9, HJW05 的菌株生物量下降 24.2%, 推测酵母的葡萄糖阻遏效应影响了蔗糖和甘油的共利用。

### 2.3 *MIG1* 敲除对细胞生长和红没药烯合成的影响

*MIG1* 蛋白是酿酒酵母葡萄糖阻遏效应的关键调控因子之一<sup>[22]</sup>。酵母中负责蔗糖代谢的蔗糖水解酶(EC 3.2.1.26)的表达也受到葡萄糖阻遏。在酿酒酵母中, *MIG1* 基因的失活解除葡萄糖对 *SUC2* 编码的蔗糖水解酶的表达阻遏, 促进蔗糖的利用<sup>[23]</sup>。为进一步提高菌株对甘油的利用效率, 探究 *MIG1* 敲除对细胞生长和红没药烯合成的影响, 将 HJW05 和 *MIG1* 敲除菌株 HJW11, 分别接种在 YNSG 培养基(1%蔗糖+1%甘油), 进行摇瓶发酵。菌株 HJW05 和 HJW11 的甘油和蔗糖消耗曲线如图 4A 所示, 未敲除 *MIG1* 的 HJW05 菌株甘油代谢受葡萄糖阻遏效应抑制, 甘油消耗速度较 HJW11 慢。对于敲除 *MIG1* 的菌株 HJW11 而言, 在发酵初期蔗糖没有消耗完时, 便开始快速消耗甘油, 证明敲除

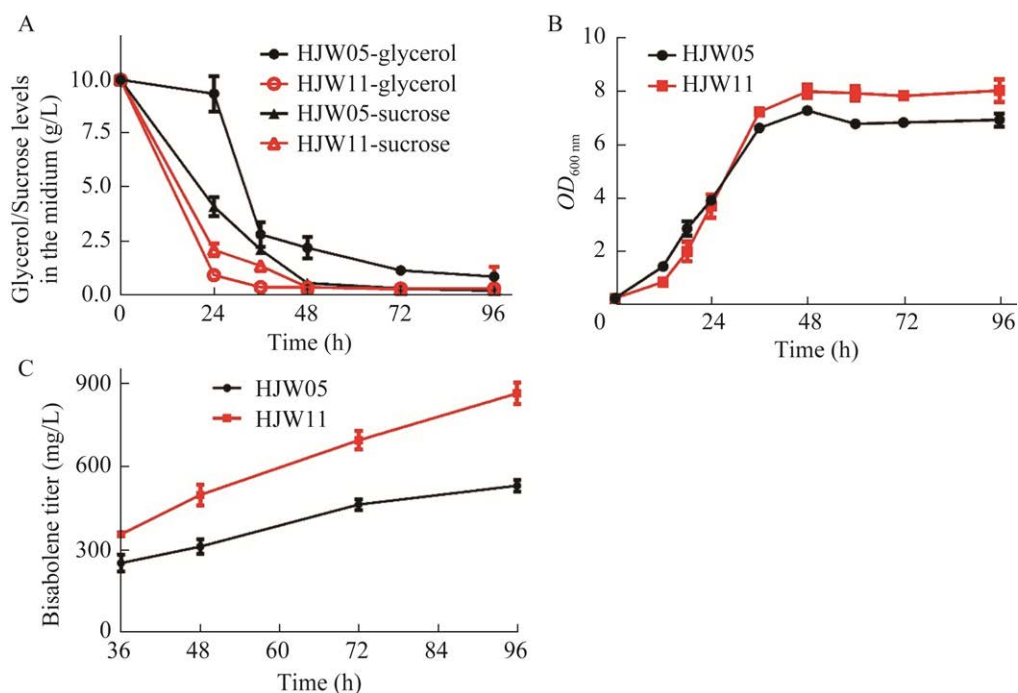


图4 HJW05 和 HJW11 分别在 YNSG 培养基中发酵 96 h 的碳源消耗情况(A)、生长曲线(B)和红没药烯合成曲线(C)

Figure 4 The carbon source consumption (A), growth curves (B), and bisabolene synthesis curves (C) of HJW05 and HJW11 cultured in YNSG medium for 96 h.



*MIG1* 部分解除葡萄糖阻遏效应, 促进了蔗糖和甘油的共利用, 有利于红没药烯的合成。

从酵母细胞生长曲线(图 4B)和红没药烯合成曲线(图 4C)中, 可观察到敲除 *MIG1* 的菌株 HJW11 在 24 h 后开始有较明显的增长优势, 发酵 96 h 后菌株 HJW11 平均  $OD_{600}$  维持在 8.0, 而 HJW05 的平均  $OD_{600}$  维持在 6.9 左右, 生物量增长 15.9%。菌株 HJW11 在 YNSG 培养基中红没药烯产量达到 866.7 mg/L, 比菌株 HJW05 提高 61.4%。

#### 2.4 敲除 *MIG1* 对 *GAL1*、*GAL2*、*GAL10* 转录水平的影响

酵母细胞中与半乳糖代谢相关的 *GAL* 启动子受到 *GAL4* 蛋白的激活, 而 *MIG1* 与 *GAL4* 启动子结合, 降低 *GAL4* 的转录水平<sup>[14]</sup>。本研究中的工程菌株利用 *GAL* 启动子加强红没药烯的合成途径, 因此推测 *MIG1* 的敲除可以通过增强 *GAL* 启动子的转录水平, 提高红没药烯的产量。为验证这一推测, 本研究比较了菌株 HJW05 和 HJW11 的 *GAL1*、*GAL2*、*GAL10* 转录水平。如图 5 所示, 敲除 *MIG1*, 菌株 HJW11 相对于 HJW05 的 *GAL1*、*GAL2*、*GAL10* 基因均表现出了更高的转录水平。

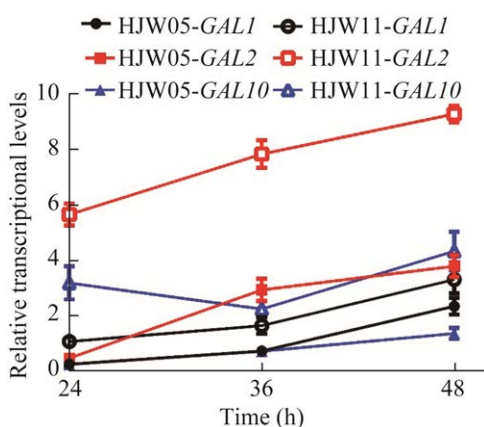


图 5 菌株 HJW05 和 HJW11 的 *GAL1*、*GAL2*、*GAL10* 转录水平变化

Figure 5 Transcriptional levels of *GAL1*, *GAL2* and *GAL10* for HJW05 and HJW11 strains.

### 3 讨论与结论

利用合成生物学方法生产红没药烯, 文献已经有较多报道。如 Peralta-Yahya 等<sup>[8]</sup>在大肠杆菌中, 异源表达来源于北美冷杉的  $\alpha$ -红没药烯合成酶基因和酿酒酵母的 MVA 途径关键酶编码基因, 红没药烯的摇瓶产量达到 912 mg/L。Yuan 等<sup>[10]</sup>在荚膜红细菌中通过阻断 *zwf*、*phbC* 与 *glbD* 等基因, 提高 NADPH 和乙酰 CoA 的供应, 再导入异源 MVA 途径, 补料分批发酵 120 h 红没药烯产量达到 9.8 g/L。酵母具有成熟的真核表达系统, 适合异源真核蛋白表达; 其 MVA 途径的主要产物麦角甾醇的含量可以达到细胞干重的 5%, 已经成为合成异源萜类物质的常用宿主<sup>[24]</sup>。Peralta-Yahya 等<sup>[8]</sup>在酿酒酵母中增强 MVA 途径的酶编码基因, 减弱角鲨烯合成途径, 最终红没药烯摇瓶产量达到 994 mg/L。Zhao 等<sup>[9]</sup>通过过表达内源性的 MVA 途径关键酶编码基因和异源的药物外排转运蛋白, 构建了一株能从食用油中生产红没药烯的解脂耶氏酵母工程菌, 发酵条件优化后,  $\alpha$ -红没药烯的摇瓶产量达到 973.1 mg/L。本研究的出发菌株是前期增强了 MVA 途径的酿酒酵母工程菌, 在本研究中, 采用增强甘油代谢和敲除葡萄糖阻遏转录因子 *MIG1* 的组合策略, 工程菌中的红没药烯产量提高了 82.2%, 达到 866.7 mg/L。虽然由于菌株遗传背景和构建方式的不同,  $\alpha$ -红没药烯产量仍然低于上述报道, 但是本研究仍然提供了一种在酵母工程菌中增加倍半萜产量的新的改造策略。

来自耐热甲基化酵母 *O. parapolymorpha* 的甘油脱氢酶能够高效氧化代谢甘油, 过表达其编码基因 *Opgdh* 是增强甘油代谢的有效手段<sup>[25]</sup>。然而 Klein 等<sup>[26]</sup>研究表明仅过表达 *Opgdh* 并不能通过二羟基丙酮(dihydroxyacetone, DHA)途



径产生足够的代谢通量,还需要过表达内源性 DHA 激酶编码基因 *DAK1*, 酵母菌株才能够以甘油为唯一碳源生长。甘油在酿酒酵母渗透压调节中起着重要作用,甘油可以通过通道蛋白 *Fps1p* 以被动运输或促进扩散的形式穿过细胞膜,表达 *FPS1* 蛋白可以增加甘油摄取、加速甘油消耗,从而促进菌株生长<sup>[26-27]</sup>。另外,甘油脱氢酶催化甘油合成 DHA 和 NADH,通过表达 *NOXE* 基因编码的 NADH 氧化酶氧化 NADH,可以减少甘油的合成,促进甘油利用<sup>[28]</sup>。将甘油脱氢酶和 NADH 氧化酶共表达,有助于辅因子 NAD<sup>+</sup>的再生<sup>[29-30]</sup>。基于上述研究,本研究以加强甲羟戊酸途径的酵母工程菌作为出发菌株,在转入红没药烯合成酶基因 *Agbis* 的酿酒酵母菌中,增强了酵母工程菌的甘油代谢途径。结果表明,工程菌株 HJW05 在 YNSD 培养基中的红没药烯产量较 HJW03 在 YNS 培养基的产量提高了 12.9%,达到 537.1 mg/L。

在文献报道中也有通过敲除 *MIG1* 基因促进酵母碳源利用的例子。Alipourfard 等<sup>[31]</sup>发现 *MIG1* 敲除菌株较野生菌株具有更高的葡萄糖利用速率和生长速率。邹静等<sup>[32]</sup>发现 *GAL80* 和 *MIG1* 双敲除菌株的半乳糖代谢流量同野生型相比增加 15%,且半乳糖利用速率提高、半乳糖诱导所需时间减少、发酵周期缩短。本研究通过敲除 *MIG1* 基因,部分解除葡萄糖阻遏效应,构建得到高产红没药烯的酵母工程菌。菌株 HJW11 在 YNSG 培养基中红没药烯产量比菌株 HJW05 提高了 61.4%。综上,本研究证明了增强甘油代谢和敲除葡萄糖阻遏转录因子 *MIG1* 的组合策略,可以提高酵母工程菌株红没药烯产量,为萜类物质的生物合成与高产提供了可供参考的代谢改造策略。

## REFERENCES

- [1] DAVIES FK, WORK VH, BELIAEV AS, POSEWITZ MC. Engineering limonene and bisabolene production in wild type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2014, 2: 21-31.
- [2] ORELLANA-PAUCAR AM, SERRUYS ASK, AFRIKANOVA T, MAES J, de BORGGRAEVE W, ALEN J, LEÓN-TAMARIZ F, WILCHES-ARIZÁBALA IM, CRAWFORD AD, de WITTE PAM, ESGUERRA CV. Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models[J]. *Epilepsy & Behavior*, 2012, 24(1): 14-22.
- [3] 庞亚如, 胡智慧, 肖冬光, 于爱群. 柠檬烯和红没药烯的微生物代谢工程[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(1): 24-33.  
PANG YR, HU ZH, XIAO DG, YU AQ. Advances in metabolic engineering for the microbial production of naturally occurring terpenes-limonene and bisabolene: a mini review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(1): 24-33 (in Chinese).
- [4] WANG CL, ZADA B, WEI GY, KIM SW. Metabolic engineering and synthetic biology approaches driving isoprenoid production in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241: 430-438.
- [5] LOPRESTO CG, PETRILLO F, CASAZZA AA, ALIAKBARIAN B, PEREGO P, CALABRÒ V. A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction[J]. *Separation and Purification Technology*, 2014, 137: 13-20.
- [6] LIU TG, KHOSLA C. A balancing act for taxol precursor pathways in *E. coli*[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 44-45.
- [7] BOHLMANN J, CROCK J, JETTER R, CROTEAU R. Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (E)-alpha-bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(12): 6756-6761.
- [8] PERALTA-YAHYA PP, OUELLET M, CHAN R, MUKHOPADHYAY A, KEASLING JD, LEE TS. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel[J]. *Nature Communications*, 2011, 2: 483-490.
- [9] ZHAO YK, ZHU K, LI J, ZHAO Y, LI SL, ZHANG

- CY, XIAO DG, YU AQ. High-efficiency production of bisabolene from waste cooking oil by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(6): 2497-2513.
- [10] ZHANG Y, SONG XH, LAI YM, MO QW, YUAN JF. High-yielding terpene-based biofuel production in *Rhodobacter capsulatus*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(6): 1545-1552.
- [11] DUETZ WA, BOUWMEESTER H, van BEILEN JB, WITHOLT B. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(4): 269-277.
- [12] ZHOU YJ, GAO W, RONG QX, JIN GJ, CHU HY, LIU WJ, YANG W, ZHU ZW, LI GH, ZHU GF, HUANG LQ, ZHAO ZBK. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for multiradiene production[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(6): 3234-3241.
- [13] WANG SM, YANG YY, YU KC, XU SY, LIU MZ, SUN J, ZHENG JY, ZHANG YJ, YUAN W. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for producing pyruvate from glycerol[J]. 3 Biotech, 2022, 12(4): 98-106.
- [14] NEHLIN JO, CARLBERG M, RONNE H. Control of yeast *GAL* genes by *MIG1* repressor: a transcriptional cascade in the glucose response[J]. The EMBO Journal, 1991, 10(11): 3373-3377.
- [15] CAO HL, YUE M, LI SG, BAI XF, ZHAO XM, DU YG. The impact of *MIG1* and/or *MIG2* disruption on aerobic metabolism of succinate dehydrogenase negative *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(3): 733-738.
- [16] 蔡艳青, 齐显尼, 齐奇, 蔺玉萍, 王正祥, 王钦宏. 敲除 *MIG1* 和 *SNF1* 基因对酿酒酵母共利用葡萄糖和木糖的影响[J]. 生物工程学报, 2018, 34(1): 54-67.  
CAI YQ, QI XN, QI Q, LIN YP, WANG ZX, WANG QH. Effect of *MIG1* and *SNF1* deletion on simultaneous utilization of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(1): 54-67 (in Chinese).
- [17] QU ZZ, ZHANG LL, ZHU SM, YUAN W, HANG JW, YIN D, TANG XC, ZHENG JY, WANG Z, SUN J. Overexpression of the transcription factor *HAC1* improves nerolidol production in engineered yeast[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 134: 109485.
- [18] SHAO ZY, ZHAO H, ZHAO HM. DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(2): e16.
- [19] KIM EM, WOO HM, TIAN T, YILMAZ S, JAVIDPOUR P, KEASLING JD, LEE TS. Autonomous control of metabolic state by a quorum sensing (QS)-mediated regulator for bisabolene production in engineered *E. coli*[J]. Metabolic Engineering, 2017, 44: 325-336.
- [20] LV XM, XIE WP, LU WQ, GUO F, GU JL, YU HW, YE LD. Enhanced isoprene biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by engineering of the native acetyl-CoA and mevalonic acid pathways with a push-pull-restrain strategy[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 186: 128-136.
- [21] MADSEN KM, UDATHA GDBRK, SEMBA S, OTERO JM, KOETTER P, NIELSEN J, EBIZUKA Y, KUSHIRO T, PANAGIOTOU G. Linking genotype and phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals metabolic engineering targets and leads to triterpene hyper-producers[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e14763.
- [22] SUKWONG P, SUNWOO IY, JEONG DY, KIM SR, JEONG GT, KIM SK. Improvement of bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* through the deletion of *GLK1*, *MIG1* and *MIG2* and overexpression of *PGM2* using the red seaweed *Gracilaria verrucosa*[J]. Process Biochemistry, 2020, 89: 134-145.
- [23] KLEIN CJ, RASMUSSEN JJ, RONNOW B, OLSSON L, NIELSEN J. Investigation of the impact of *MIG1* and *MIG2* on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 68(2-3): 197-212.
- [24] OSTERGAARD S, OLSSON L, NIELSEN J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 34-50.
- [25] JUNG JY, YUN HS, LEE J, OH MK. Production of 1,2-propanediol from glycerol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Microbiology Biotechnology, 2011, 21(8): 846-853.
- [26] KLEIN M, CARRILLO M, XIBERRAS J, ISLAM ZU, SWINNEN S, NEVOIGT E. Towards the exploitation of glycerol's high reducing power in *Saccharomyces cerevisiae*-based bioprocesses[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 464-472.

- [27] KLEIN M, SWINNEN S, THEVELEIN JM, NEVOIGT E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(3): 878-893.
- [28] VEMURI GN, EITEMAN MA, MCEWEN JE, OLSSON L, NIELSEN J. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(7): 2402-2407.
- [29] FANG BS, JIANG W, ZHOU Q, WANG SZ. Codon-optimized NADH oxidase gene expression and gene fusion with glycerol dehydrogenase for bienzyme system with cofactor regeneration[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128412.
- [30] ZHUANG MY, JIANG XP, LING XM, XU MQ, ZHU YH, ZHANG YW. Immobilization of glycerol dehydrogenase and NADH oxidase for enzymatic synthesis of 1,3-dihydroxyacetone with *in situ* cofactor regeneration[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2018, 93(8): 2351-2358.
- [31] ALIPOURFARD I, DATUKISHVILI N, BAKHTIYARI S, HAGHANI K, DI RENZO L, de MIRANDA RC, MIKELADZE D. *MIG1* glucose repression in metabolic processes of *Saccharomyces cerevisiae*: genetics to metabolic engineering[J]. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2019, 11(3): 215-220.
- [32] 邹静, 郭学武, 申童, 张翠英, 董建, 肖冬光. Lac<sup>+</sup>酿酒酵母工程菌中 *GAL80* 基因敲除对乳糖利用的影响[J]. *酿酒科技*, 2013, 234(12): 36-41.
- ZOU J, GUO XW, SHEN T, ZHANG CY, DONG J, XIAO DG. Disruption of regulatory gene *GAL80* in Lac<sup>+</sup> *S. cerevisiae* and its effects on lactose utilization[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2013, 234(12): 36-41 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)