

研究报告

挖掘与调控乙酸胁迫响应基因提高重组酿酒酵母合成番茄红素水平

李佳蓉^{1,2}, 林静远^{1,2}, 李正宇^{1,2}, 段长青^{1,2}, 燕国梁^{*1,2,3}

1 中国农业大学食品科学与营养工程学院葡萄与葡萄酒研究中心, 北京 100083

2 中国农业大学食品科学与营养工程学院 农业农村部葡萄酒加工重点实验室, 北京 100083

3 中国农业大学食品科学与营养工程学院 中国轻工业食品生物工程重点实验室, 北京 100083

李佳蓉, 林静远, 李正宇, 段长青, 燕国梁. 挖掘与调控乙酸胁迫响应基因提高重组酿酒酵母合成番茄红素水平[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2781-2797.

LI Jiarong, LIN Jingyuan, LI Zhengyu, DUAN Changqing, YAN Guoliang. Mining and regulating acetic acid stress-responsive genes to improve lycopene synthesis in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2781-2797.

摘要: 【背景】乙酰辅酶 A 是酿酒酵母异源合成番茄红素的重要中间产物, 胞质中乙酰辅酶 A 主要来自乙酰辅酶 A 合成酶催化乙酸合成。【目的】通过外源添加乙酸盐结合调控乙酸胁迫应答基因增加胞内乙酰辅酶 A 含量, 改善细胞生长, 促进番茄红素合成。【方法】在合成番茄红素的重组酵母菌中过表达乙酰辅酶 A 合成酶编码基因(*acs2*), 在发酵过程中添加 10 g/L 乙酸盐, 结合转录组学分析挖掘乙酸胁迫响应基因, 进行单一和组合调控。【结果】添加乙酸盐后, 重组菌 Y02 中番茄红素含量增加了 19.14%, 但细胞生长受到抑制, 转录组学结果表明 *adk2*、*fap7*、*hem13*、*elo3*、*pdc5*、*set5*、*pmt5*、*hst4*、*clb2* 和 *swel* 表达水平增加, 因此构建了单基因和双基因过表达菌株, 其中 Y02-*set5-hst4* 菌在添加乙酸盐后细胞生长得到了显著改善, 同时胞内乙酰辅酶 A 浓度提高了 78.21%, 番茄红素含量和产量达到 12.62 mg/g-DCW 和 108.67 mg/L, 与对照菌 Y02 相比分别提高了 42.76% 和 67.13%。同时该菌中甲羟戊酸途径中关键基因 *erg12*、*erg20* 和 *hmg1* 的表达量与对照菌相比分别上调了 1.70、1.44 和 1.96 倍。【结论】在过表达 *acs2* 的基础上, 过表达 *set5* 和 *hst4* 能够增加酵母对乙酸胁迫的耐受能力, 并提高乙酰辅酶 A 合成水平和甲羟戊酸途径代谢通量, 促进番茄红素的合成, 研究结果可为其他类异戊二烯产物的代谢工程研究提供有益的借鉴。

关键词: 酿酒酵母; 番茄红素; 乙酰辅酶 A; 乙酸胁迫; 响应基因

资助项目: 国家自然科学基金(31972058); 国家重点研发计划(2022YFD2101401)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31972058) and the National Key Research and Development Program of China (2022YFD2101401).

*Corresponding author. E-mail: glyan@cau.edu.cn

Received: 2022-10-09; Accepted: 2022-12-08; Published online: 2023-02-08

Mining and regulating acetic acid stress-responsive genes to improve lycopene synthesis in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

LI Jiarong^{1,2}, LIN Jingyuan^{1,2}, LI Zhengyu^{1,2}, DUAN Changqing^{1,2}, YAN Guoliang^{*1,2,3}

1 Centre for Viticulture and Enology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2 Key Laboratory of Viticulture and Enology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

3 Key Laboratory of Food Bioengineering (China National Light Industry), College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] Acetyl-CoA is an important intermediate for lycopene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, and acetyl-CoA in cytosol is mainly derived from acetic acid catalyzed by acetyl-CoA synthase. [Objective] To improve cell growth and lycopene production by increasing the content of intracellular acetyl-CoA through adding acetate combined with regulation of acetic acid stress-responsive gene. [Methods] Lycopene recombinant yeast strains overexpressing acetyl-CoA synthase (*acs2*) were added with 10 g/L acetate during the fermentation process. The transcriptomic analysis was combined to excavate acetic acid stress-responsive genes for single and combined regulation. [Results] After adding acetate, the lycopene content of the recombinant Y02 strain increased by 19.14%, but cell growth was suppressed. The results of the transcriptional analysis indicated that the expression levels of *adk2*, *fap7*, *hem13*, *elo3*, *pdh5*, *set5*, *pmt5*, *hst4*, *clb2*, and *swel* were increased significantly. Therefore, a single-gene and dual-gene were overexpressed in the Y02 strain. It was found that the growth of Y02-*set5-hst4* was significantly improved in the presence of acetate. At the same time, the intracellular acetyl-CoA concentration was increased by 78.21%, and the lycopene content and yield reached 12.62 mg/g-DCW and 108.67 mg/L, respectively, which were increased by 42.76% and 67.13%, respectively, as compared with the control strain Y02. In addition, the expression levels of key genes *erg12*, *erg20*, and *hmg1* in the mevalonate pathway were increased by 1.70, 1.44, and 1.96 folds, respectively, as compared with the control strain. [Conclusion] On the basis of overexpression of *acs2*, the overexpression of *set5* and *hst4* can improve the tolerance of yeast to acetic acid stress and increase the synthesis level of acetyl-CoA and the metabolic flux of mevalonate pathway, thus promoting the synthesis of lycopene. The results of this study provide valuable references for the metabolic engineering of other isoprenoid products.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; lycopene; acetyl-CoA; acetic acid stress; stress-responsive genes

番茄红素是一种广泛存在于果蔬中的类异戊二烯化合物, 具有提高人体氧化应激能力、保护心脑血管、增强免疫力及预防癌症等功效^[1-2], 在食品、化妆品和保健品等行业被广泛应用^[3]。

目前番茄红素主要来源于化学合成, 植物提取及微生物发酵。与前两者相比, 通过微生物发酵法合成番茄红素具有安全、生产成本低、来源广泛、生产不受季节限制等优点, 是最有希望实现工业化的生产方法^[4-5]。近年来, 随着合成生物学和代谢工程技术的发展, 构建基因工程菌研究类胡萝卜素的合成调控机制成为该领域研究的热点^[6-7]。相关研究不但有望获得高产菌株, 更为重要的是能够发现影响类胡萝卜素合成的关键因素, 应用于其他工业微生物的研究^[8]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为一种简单的真核微生物, 具有遗传背景清晰、生长周期短、发酵能力强、基因操作简单和安全性高等优点, 成为该研究领域最常用的模式生物^[9]。

图 1 为外源番茄红素在酿酒酵母中的合成途径。通过引入外源的 *crtE* 基因(编码牻牛儿基焦磷酸合成酶)、*crtB* 基因(编码番茄红素环化酶)和 *crtI* 基因(编码八氢番茄红素脱氢酶)将酿酒酵母自身的甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径中的法尼基二磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)引向番茄红素合成途径^[9]。大量的研究表明, 前体的有效供给是决定类胡萝卜素产物高产的一个关键因素^[10], 其中乙酰辅酶 A 作为甲羟戊酸途径的第一个前体物质, 是番茄红素^[11]等类异戊二烯化合物的一个关键前体^[12-13]。在酿酒酵母中, 乙酰辅酶 A 的合成分布在细胞质、线粒体、过氧化物酶体和细胞核 4 个不同的亚细胞区域^[14], 其中细胞质中的乙酰辅酶 A 是供给甲羟戊酸途径的主要来源。其主要由丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)旁路合成: 细胞质中的丙酮酸在丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, Pdc)的作用下转化为乙醛, 乙醛在乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, Ald)的作用下转化为乙酸, 然后由乙酰辅酶 A 合成酶

(acetate-CoA ligase, Acs)将其催化为乙酰辅酶 A^[15] (图 1)。过量表达乙醛脱氢酶基因(*ald6*)和乙酰辅酶 A 合酶基因(*acs1*、*acs2*)可以提高乙酰辅酶 A 合成水平, 增加番茄红素^[9,16]、 β -香树脂醇^[17-18]、 α -檀香烯^[19]产量。Shiba 等^[20]通过在酿酒酵母中过表达来自肠沙门氏菌(*Salmonella enterica*)的乙酰辅酶 A 合成酶(*SEacs*^{L641P}), 增强了 PDH 旁路, 使得紫穗槐二烯产量提高了 1.2 倍。除了过量表达乙酰辅酶 A 合成酶, 直接添加乙酸(盐)也能够增加乙酰辅酶 A 的浓度, 促进重组酿酒酵母中类胡萝卜素的合成^[21]。

基于以上结果, 本研究认为在过量表达乙酰辅酶 A 合成酶基因的基础上, 外源供给乙酸(乙酸盐)是提高乙酰辅酶 A 合成、促进类异戊二烯合成的一种有效手段。但是外源添加乙酸会强烈抑制细胞的生长, 作为一种胁迫因子, 乙酸胁迫会干扰细胞的底物运输^[22]、细胞壁(膜)的合成及糖的正常代谢^[23]。因此, 高效利用乙酸合成乙酰辅酶 A 的前提是提高细胞对乙酸胁迫的耐受性, 改善细胞生长。本研究主要探究外源添加乙酸盐结合调控乙酸胁迫应答基因对重组酿酒酵母胞内乙酰辅酶 A 含量、细胞生长和番茄红素合成的影响, 研究结果以期为进一步高效利用乙酸高产类异戊二烯天然产物的研究提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

研究所用的酿酒酵母菌株见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、质粒提取试剂盒、溶壁酶, 天根生化科技(北京)有限公司; 酵母 RNA 提取试剂盒, 广州美基生物科技有限公司; In-fusion 无缝克隆试剂盒、反转录试剂盒

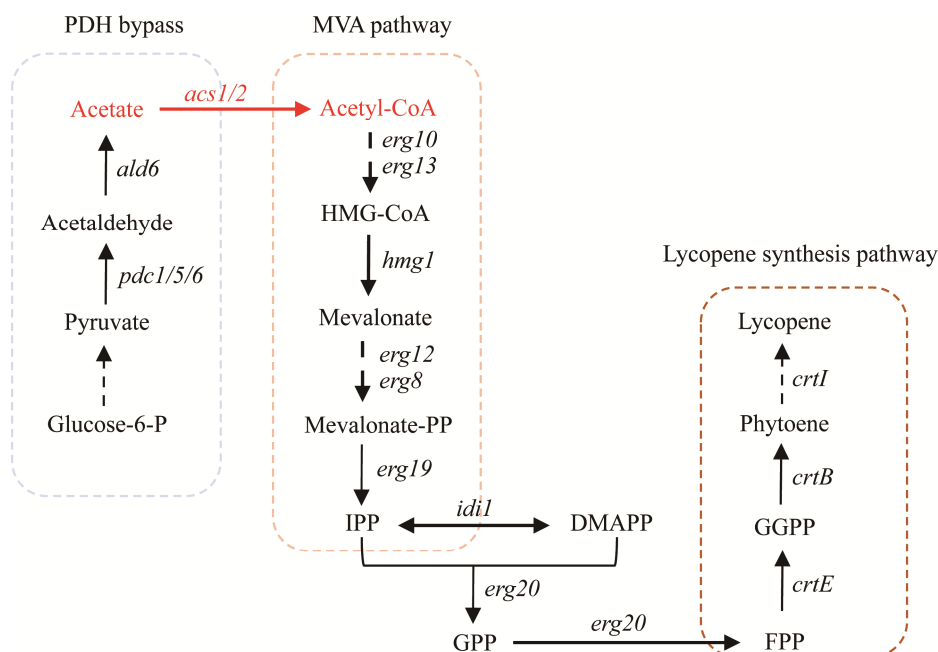


图 1 酿酒酵母中番茄红素的生物合成途径 *pdc1/5/6*: 编码丙酮酸脱羧酶; *ald6*: 编码乙醛脱氢酶; *acs1/2*: 编码乙酰辅酶 A 合成酶; *erg10*: 编码乙酰乙酰 CoA 硫解酶; *erg13*: 编码 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 氧化酶; *hmg1*: 编码 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶; *erg12*: 编码甲羟戊酸激酶; *erg8*: 编码甲羟戊酸二磷酸激酶; *erg19*: 编码甲羟戊酸二磷酸脱羧酶; *erg20*: 编码法尼基焦磷酸合成酶; *idi1*: 编码异戊烯基焦磷酸异构酶; *crtE*: 编码异源 GGPP 合成酶; *crtB*: 编码八氢番茄红素合成酶; *crtI*: 编码八氢番茄红素脱氢酶; IPP: 异戊烯基焦磷酸; DMAPP: 二甲基烯丙基焦磷酸; GPP: 牻牛儿基焦磷酸; GGPP: 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸; FPP: 法尼基焦磷酸

Figure 1 Biosynthesis pathway of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *pdc1/5/6*: Indolepyruvate decarboxylase; *ald6*: Aldehyde dehydrogenase; *acs1/2*: Acetate-CoA ligase; *erg10*: Acetoacetyl-CoA thiolase; *erg13*: Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase; *hmg1*: Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; *erg12*: Mevalonate kinase; *erg8*: Phosphomevalonate kinase; *erg19*: Mevalonate-5-diphosphate decarboxylase; *erg20*: Farnesyl diphosphate synthase; *idi1*: Isopentenyl diphosphate isomerase; *crtE*: GGPP synthase; *crtB*: Phytoene synthase; *crtI*: Phytoene desaturase; IPP: Isopentenyl pyrophosphate; DMAPP: Dimethylallyl pyrophosphate; GPP: Geranyl diphosphate; GGPP: Geranyl diphosphate; FPP: Farnesyl diphosphate.

HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR+gDNA Wiper 和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 番茄红素标准品, 上海源叶生物科技有限公司; 乙酸钠, 上海麦克林生化科技有限公司; 乙酰辅酶 A 酶联免疫分析试剂盒, 江苏晶美生物科技有限公司; 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、RIPA 裂解液(强) [radio

immunoprecipitation assay lysis buffer (strong)], 上海碧云天生物技术有限公司。紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; 多功能酶标仪, 珀金埃尔默仪器有限公司。

1.1.3 培养基

YPD 培养基、G418 培养基和 LB 培养基的配制方法详见参考文献[24]。

表 1 文中所用的菌株

Table 1 Strains used in this work

酵母菌株	亲本菌株	基因型 ^a	来源
Strains	Parental strains	Genotype ^a	Sources
FY1679-01B	S288C	MATa; ura3-52	Our laboratory
L1	FY1679-01B	$\Delta gal1-10-7::T_{adh1-crtI}-P_{gal10}-P_{gal1-crtB}-T_{cyc1}$	This work
Y01	L1	$\Delta gal80::T_{adh1-crtE}-P_{gal10}$	This work
Y02	Y01	$\Delta YPL062W::T_{adh1-acs2}-P_{gal10}$	This work
Y02- <i>adk2</i>	Y02	$\Delta lpp1::P_{gal1-adk2}-T_{cyc1}$	This work
Y02- <i>fap7</i>	Y02	$\Delta lpp1::P_{gal1-fap7}-T_{cyc1}$	This work
Y02- <i>hem13</i>	Y02	$\Delta lpp1::P_{gal1-hem13}-T_{cyc1}$	This work
Y02- <i>elo3</i>	Y02	$\Delta lpp1::P_{gal1-elo3}-T_{cyc1}$	This work
Y02- <i>pdcs5</i>	Y02	$\Delta lpp1::P_{gal1-pdc5}-T_{cyc1}$	This work
Y02- <i>set5</i>	Y02	$\Delta lpp1::P_{gal1-set5}-T_{cyc1}$	This work
Y02- <i>clb2</i>	Y02	$\Delta lpp1::P_{gal1-clb2}-T_{cyc1}$	This work
Y02- <i>hst4</i>	Y02	$\Delta lpp1::P_{gal1-hst4}-T_{cyc1}$	This work
Y02- <i>swe1</i>	Y02	$\Delta lpp1::P_{gal1-swe1}-T_{cyc1}$	This work
Y02- <i>pmt5</i>	Y02	$\Delta lpp1::P_{gal1-pmt5}-T_{cyc1}$	This work
Y02- <i>set5-adk2</i>	Y02- <i>set5</i>	$\Delta dpp1::T_{adh1-adk2}-P_{gal10}$	This work
Y02- <i>set5-fap7</i>	Y02- <i>set5</i>	$\Delta dpp1::T_{adh1-fap7}-P_{gal10}$	This work
Y02- <i>set5-hem13</i>	Y02- <i>set5</i>	$\Delta dpp1::T_{adh1-hem13}-P_{gal10}$	This work
Y02- <i>set5-pmt5</i>	Y02- <i>set5</i>	$\Delta dpp1::T_{adh1-pmt5}-P_{gal10}$	This work
Y02- <i>set5-hst4</i>	Y02- <i>set5</i>	$\Delta dpp1::T_{adh1-hst4}-P_{gal10}$	This work

^a: 表中基因型的描述基于亲本菌株^a: The description of the genotype in the table is based on the parental strain.

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体构建及转化

pUMRI-21 整合表达载体的构建过程及大肠杆菌转化详见参考文献[24-25]。酵母感受态制备及转化采用醋酸锂转化法^[26]。

1.2.2 酵母发酵培养及生长监测

将-80 °C保存的酿酒酵母菌划线, 接种于G418 固体培养基上, 30 °C培养 24 h。挑取单菌落接种到 4 mL YPD 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 12 h 进行活化。采用紫外-可见分光光度计检测 OD_{600} 。将菌液接种至含有 50 mL YPD 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 接种后初始 OD_{600} 为 0.05, 30 °C、220 r/min 培养 72 h 进行摇瓶发酵。每 12 h 通过紫外-可见分光光度计测量 OD_{600} 来监测酿酒酵母细胞的生长^[25]。

1.2.3 番茄红素的提取与检测

番茄红素提取采用热酸法来提取细胞内番茄红素^[27]。用高效液相色谱仪配备 C18 柱(5 μ m, 4.6 mm×150 mm)进行分析^[25]。流动相为乙腈:甲醇:异丙醇(体积比为 50:30:20), 流速为 1 mL/min, 温度为 40 °C, 进样体积为 20 μ L, UV 检测器在 472 nm 处检测。菌体干重的测定方法为: 取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 12 000×g 离心 1 min 弃上清, 用 1 mL 纯净水重悬沉淀, 12 000×g 再次离心 1 min 弃上清。将离心管置于 80 °C 烘箱中放置至恒重, 即获得菌体干重。

1.2.4 酵母总 RNA 的提取与检测

取摇瓶发酵过程中的发酵液, 12 000×g 离心 1 min 后用水洗涤细胞, 去除培养基。洗后的菌体立即放入液氮中并转至-80 °C 冰箱中保

存备用。酿酒酵母总 RNA 提取采用 HiPure Yeast RNA Kit 方法, RNA 反转录按照 HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR+gDNA Wiper 试剂盒的说明书进行。

1.2.5 实时荧光定量 PCR

PCR 反应体系详见参考文献[28], 其中选择 *act1* 基因作为酿酒酵母的内参基因用于不同样品间的均一化^[28]。实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 采用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。荧光定量引物序列见表 2。

1.2.6 转录组分析取样和检测

将活化后的 Y02 菌液接种至含有 50 mL YPD 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 接种后初始 OD_{600} 为 0.05, 30 °C、220 r/min 培养 12 h 时加入 10 g/L 乙酸盐(乙酸钠), 继续培养 2 h 和 12 h 后取样, 以不加入乙酸盐培养作为对照。取 1 mL 发酵液, 4 °C、12 000×g 条件下离心 5 min 收集酵母细胞, 弃上清后用预冷的 PBS 缓冲液洗涤菌体沉淀 2 次, 提取酵母 RNA, 于 -80 °C 冰箱储存待测。转录组学检测与分析由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.2.7 乙酰辅酶 A 含量检测

将已在 YPD 液体培养基中活化的待测菌株接种至含有 50 mL YPD 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 接种后初始 OD_{600} 为 0.05, 30 °C、220 r/min 发酵培养。在对数生长期(发酵 24 h)时取样。取 1 mL 发酵液在常温下 12 000×g 离心 1 min, 尽量吸除上清液, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次后, 向菌体中加入 600 μ L 山梨醇 buffer, 加入 50 U 溶壁酶, 充分混匀。30 °C 处理 30 min, 4 000×g 离心 10 min 去除沉淀。在上清液中使用 RIPA 裂解液(强)裂解细胞, 具体测定流程按照 RIPA 裂解液(强)说明书进行。用乙酰辅酶 A 酶联免疫分析试剂盒测定乙酰辅酶 A 含量。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

引物名称 Primer name	序列 Primer sequences (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
<i>act1</i> -F	GAAATGCAAACCGCTGCTCA	145
<i>act1</i> -R	TACCGGCAGATTCCAAACCC	
<i>adk2</i> -F	CACCGGAGAACCATTGACCA	138
<i>adk2</i> -R	TCCCCAGAGACGGTACCAAA	
<i>fap7</i> -F	GGCAAGTCGTCTACGTGTGA	127
<i>fap7</i> -R	CAATGTGCGATTACGGCCC	
<i>hem13</i> -F	CCGTCGCAAACAAGCTGAAA	100
<i>hem13</i> -R	ACCACCACCACCATCGTTAC	
<i>elo3</i> -F	GTGGCTATCCAGCTGAGCAA	129
<i>elo3</i> -R	AGGCGCGTAAGATAGCTTGG	
<i>pdh5</i> -F	TCGGTTTGCCAGGTGACTTT	119
<i>pdh5</i> -R	AGCGTAACCATCAGCAGCAT	
<i>set5</i> -F	ATAGCGGAGGCCAACAAACA	106
<i>set5</i> -R	GGGACTGGGAGACCGTTTTT	
<i>clb2</i> -F	AGATCAACAGCCGCACAAGA	121
<i>clb2</i> -R	GCGCACCAAAATTGCTGACTA	
<i>hst4</i> -F	TCCAAATCCCAACGCCATCA	103
<i>hst4</i> -R	CAGATATACCTGCCCCGCTG	
<i>pmt5</i> -F	GGAGTGGCTGTTGAGCTTCT	113
<i>pmt5</i> -R	TGGGCGGCAAAGCCTAATAA	
<i>swe1</i> -F	TCTTCCACCGATTCTTCGCC	150
<i>swe1</i> -R	CGTAACCTGGTAGACCGTGG	
<i>hmg1</i> -F	ACTACGACCGCGTATTTGGC	151
<i>hmg1</i> -R	CGCATGGCAGAAGCTACCAA	
<i>erg12</i> -F	ACCGATGGCTTGTCTCAGGA	174
<i>erg12</i> -R	CCCAGCACCGATGGGTAAAG	
<i>erg20</i> -F	ACTACAACACTCCAGGCGGT	165
<i>erg20</i> -R	CGGCGACCAAGAAGTAAGCC	

2 结果与分析

2.1 过表达 *acs2* 对番茄红素合成和细胞生长的影响

为了获得生长与产物解偶联的番茄红素合成菌株, 本研究采用诱导型 *GAL* 启动子将番茄红素合成的外源基因 *crtE*、*crtB*、*crtI* 引入 FY1679-01B 菌中, 得到具有番茄红素合成途径的菌株 Y01。在 *GAL* 启动子体系下, 发酵 12 h

后产物大量合成^[21,27]。Y01 发酵 72 h 时番茄红素含量达到最高 5.76 mg/g-DCW。过表达酿酒酵母乙酰辅酶 A 合成酶能够提高乙酰辅酶 A 含量, 促进相关类异戊二烯产物合成, 而且过表达 *acs2* 的效果优于过表达 *acs1*^[29]。因此, 本研究在 Y01 的基础上过表达 *acs2* 构建了重组菌 Y02, 与 Y01 相比, Y02 番茄红素含量提高了 28.91%, 为 7.42 mg/g-DCW (图 2A), 然而 Y02 的生长受到抑制, 最大生物量与 Y01 相比下降了 17.29% (图 2B)。进而比较了 Y01 和 Y02 菌胞内乙酰辅酶 A 含量及 MVA 途径关键基因的表达式。发现 Y02 菌株中乙酰辅酶 A 含量较

Y01 提高了 14.23% (图 2C), MVA 途径中关键基因 *erg12*、*erg20*、*hmg1* 的表达式分别提高了 2.52、1.53 和 1.39 倍(图 2D), 表明过表达 *acs2* 促进了乙酰辅酶 A 合成, 同时提高了 MVA 途径的代谢通量。但需要指出的是 Y02 的生长也受到了抑制, 这可能由于高产番茄红素造成了代谢负荷^[30-31]。

2.2 添加乙酸盐对细胞生长和番茄红素合成的影响

为了进一步增加乙酰辅酶 A 的合成水平, 本研究在 Y02 发酵 12 h 时添加乙酸盐, 课题组前期研究表明此时添加乙酸盐对细胞生长的影

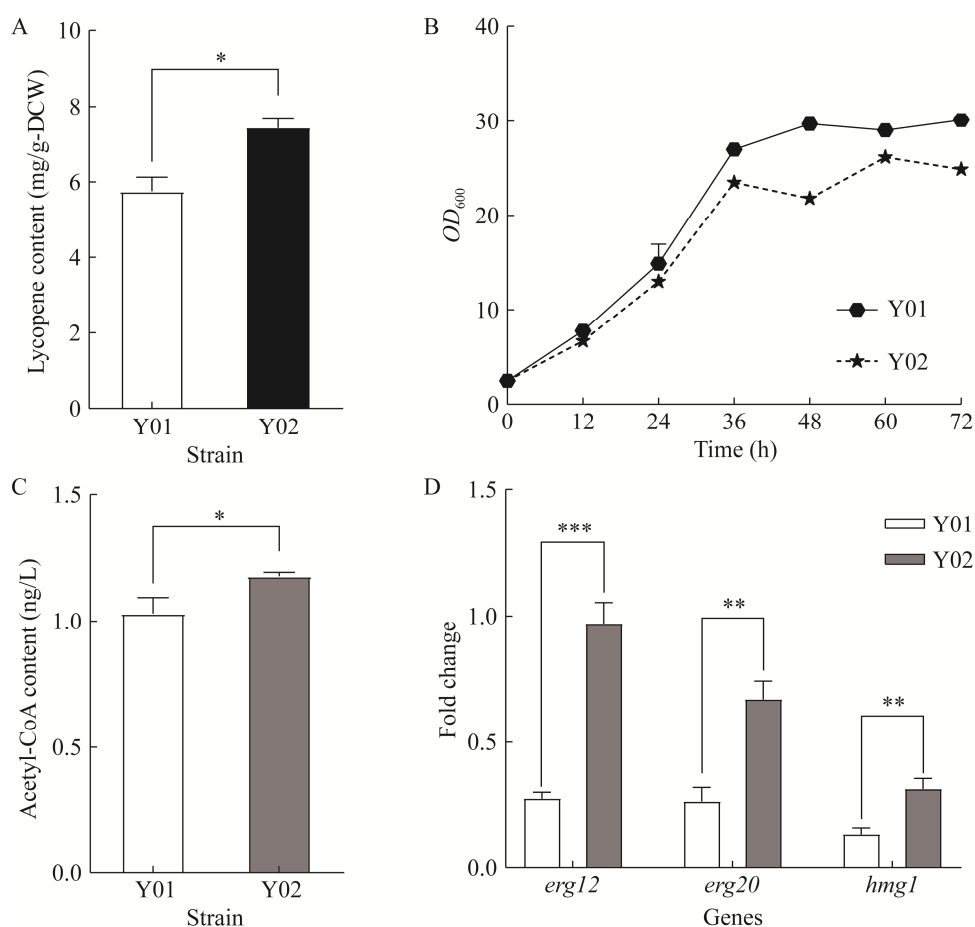


图 2 Y01 与 Y02 菌株的番茄红素含量(A)、生长曲线(B)、乙酰辅酶 A 含量(C)和关键基因表达量(D)
Figure 2 Lycopene content (A), cell growth (B), acetyl-CoA content (C) and key gene expression levels (D) of strain Y01 and Y02. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.005$; ***: $P < 0.001$.

响最小^[21]。为了确定适宜的添加浓度,实验设置了 5、10 和 15 g/L 这 3 个浓度,以不添加乙酸盐作为对照。结果发现,添加乙酸盐促进了胞内番茄红素的积累。其中,添加 10 g/L 乙酸盐对产物的促进作用最佳,番茄红素含量为 8.84 mg/g-DCW,较对照组提高 19.14% (图 3A)。但是随着添加浓度的增加,细胞生长受到显著影响,生物量随之降低(图 3B)。由于细胞生长受到抑制,虽然番茄红素含量得到了增加,但是总产量的增加幅度有限。因此需要改善细胞生长,即提高细胞对乙酸胁迫的耐受力。本研究希望通过挖掘和调控乙酸胁迫下相关基因的表达水平,提高细胞的耐受性,进一步提高产物合成水平。

2.3 转录组技术分析细胞应答乙酸胁迫的分子机制

挖掘某种环境胁迫下细胞的应答基因(responsive-genes)并进行表达调控有可能提高细胞对该胁迫的耐受性,促进细胞生长和(或)产物合成^[32-33]。为了探究乙酸胁迫下 Y02 菌株的应答响应机制,我们利用转录组测序

(RNA-Seq)技术比较了 Y02 在添加和不添加乙酸盐基因组的全局转录差异。采用 DESeq 对样本进行分析,以 $P < 0.05$ 及差异倍数 ≥ 2 为筛选条件,筛选表达差异显著的基因。在发酵 12 h 时添加乙酸盐,继续培养 2 h 和 12 h 后取样测定。与对照组相比,胁迫 2 h 后的细胞中共有 722 个差异表达基因,其中有 350 个基因上调、372 个基因下调。胁迫 12 h 后的细胞中共有 1 171 个差异表达基因,其中有 721 个基因上调、450 个基因下调。两个时间点中重叠的上调基因数量为 312,下调基因为 331。对 2 个时间点中相同变化的基因进行 KEGG 富集分析结果显示:上调基因主要集中在主代谢途径、核糖体、真核生物核糖体生物发生、细胞周期调节、次级代谢途径、减数分裂、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、DNA 复制等途径;下调基因集中在主代谢途径、次级代谢途径、碳代谢、氧化磷酸化、辅因子生物合成等代谢途径(图 4)。以上结果表明,乙酸胁迫对细胞的生理和物质代谢产生了显著的影响。

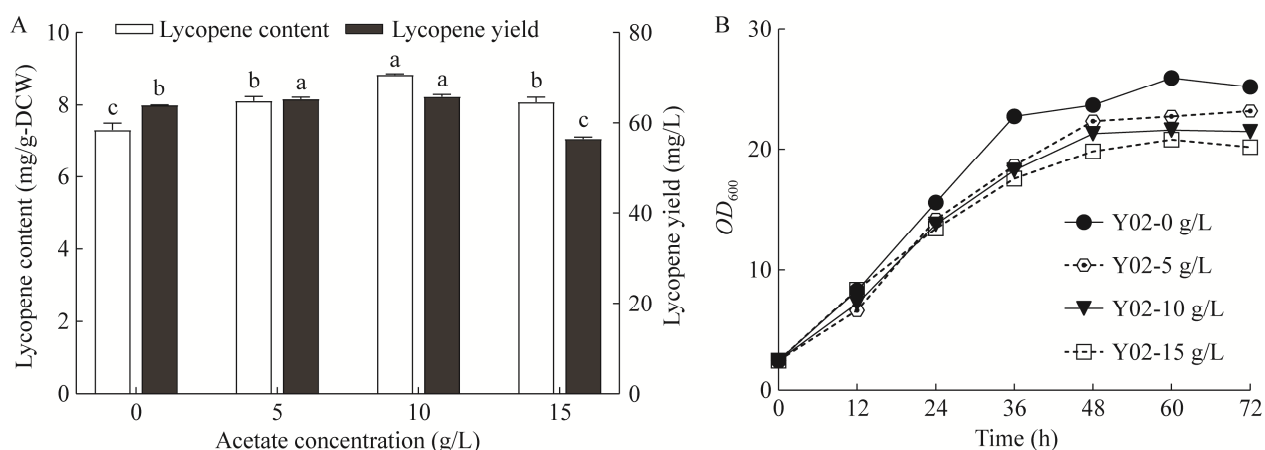


图 3 添加不同浓度乙酸盐对 Y02 菌株番茄红素含量、产量(A)和细胞生长(B)的影响 不同小写字母表示组间差异显著

Figure 3 Effect of different concentrations acetate addition of lycopene content, yield (A) and cell growth (B) of Y02. Different lowercase letters indicated significant differences among different groups.

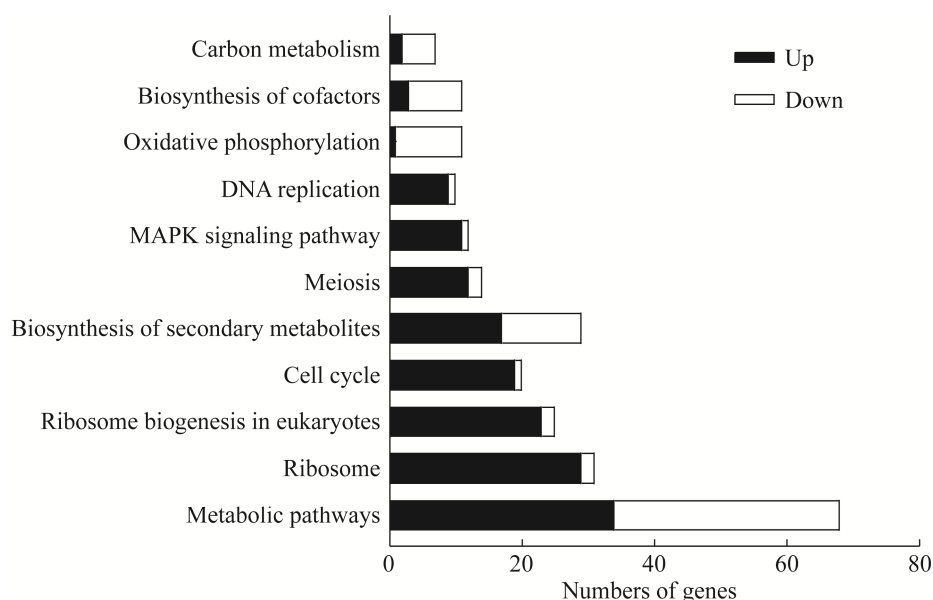


图 4 菌株 Y02 在添加乙酸盐 2 h 和 12 h 时共同上调基因的 KEGG 分析

Figure 4 KEGG analysis of co-up-regulated genes of strain Y02 after acetate addition at 2 h and 12 h.

上调基因反映了细胞为应答某种胁迫做出的生理响应,而调控该基因有可能增加细胞对胁迫的耐受能力^[34]。本研究从转录组分析结果中挖掘出 10 个显著上调的基因,分别为 *adk2*、*fap7*、*hem13*、*pmt5*、*hst4*、*set5*、*elo3*、*pdc5*、*clb2*、*swel* (表 3)。为了验证转录组结果,对以上 10 个基因进行实时荧光定量 PCR 检测,测定结果与转录组结果一致(表 3)。*adk2* 编码腺苷酸激酶,该酶催化 GDP 和 ADP 合成 GTP 和 AMP,与维持细胞核苷酸的稳定状态和细胞内能量合成相关^[35]。*fap7* 编码核苷三磷酸酶,该酶具有 ATP 水解活性和腺苷酸激酶活性,参与细胞对氧化胁迫的应激反应^[36],研究发现过表达 *fap7* 能够增强酿酒酵母对亚砷酸胁迫的抗性^[37],因此推测其可以增加细胞对乙酸胁迫的抗性。*hem13* 编码共卟啉原氧化酶,该酶是催化血红素生物合成的限速酶,研究表明促进血红素生物合成能够提高酿酒酵母氧化应激能力^[38]。*pmt5* 编码磷酸甘露糖蛋白甘露糖基转移酶,崔红晶等^[39]研究显示,酿酒酵母中 *pmt5* 基因与细

胞增殖活力有关,过表达 *pmt5* 可增加细胞对环境胁迫的耐受性。*hst4* 编码 NAD 依赖型组蛋白脱乙酰酶,过表达该酶有助于修复 DNA 损伤和组蛋白转录,能够增加细胞对各种胁迫的应激响应^[40]。*set5* 编码 S-腺苷甲硫氨酸依赖型甲基转移酶,该酶调节亚端粒和转座因子的特定转录程序,并参与多个生化过程,包括组蛋白乙酰化的调节、促进 DNA 损伤的修复等^[41]。有研究发现过表达 *set5* 能够提高酿酒酵母对乙酸胁迫的应答水平^[42]。*elo3* 编码脂肪酸延伸酶,在脂肪酸延伸中起重要作用,同时在维持细胞膜稳定性、抵抗细胞氧化应激方面也具有重要作用^[43]。*pdc5* 编码丙酮酸脱羧酶,该酶催化芳香族氨基酸的分解代谢过程,能够催化丙酮酸生成乙醛^[44-45]。*clb2* 编码蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶,该酶参与细胞有丝分裂周期的调控和蛋白质去磷酸化的负调节,对细胞周期具有正调节作用^[46]。*swel* 编码蛋白酪氨酸激酶,该酶对鞘脂生物合成具有积极的调节作用^[47]。基于以上分析,我们将这 10 个基因作为目标分别进行过表达,以增

表 3 转录组筛选到的乙酸胁迫 2 h 和 12 h 后上调基因

Table 3 Transcriptome screened up-regulated genes after 2 h and 12 h acetate stress

系统名称 Systematic name	基因名称 Standard name	描述 Description	上调倍数 Fold change			
			转录组结果		RT-qPCR 结果	
			Transcriptome results		RT-qPCR results	
			2 h	12 h	2 h	12 h
<i>YER170W</i>	<i>adk2</i>	Mitochondrial adenylate kinase	2.15	2.76	2.64	2.43
<i>YDL166C</i>	<i>fap7</i>	Nucleoside-triphosphatase	2.08	2.75	2.65	2.74
<i>YDR044W</i>	<i>hem13</i>	Coproporphyrinogen oxidase	2.12	2.74	1.90	2.55
<i>YDL093W</i>	<i>pmt5</i>	Protein O-mannosyltransferase	2.58	2.80	2.93	2.62
<i>YDR191W</i>	<i>hst4</i>	NAD-dependent histone deacetylase	2.38	3.40	2.78	2.65
<i>YHR207C</i>	<i>set5</i>	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	2.42	4.30	2.35	3.30
<i>YLR372W</i>	<i>elo3</i>	Fatty acid elongase	2.03	2.13	1.97	2.36
<i>YLR134W</i>	<i>pdcs</i>	Indolepyruvate decarboxylase	2.64	2.09	2.00	4.33
<i>YPR119W</i>	<i>clb2</i>	B-type cyclin involved in cell cycle progression	2.03	1.43	2.20	2.51
<i>YJL187C</i>	<i>swe1</i>	Tyrosine protein kinase	2.19	1.73	2.80	2.34

强细胞对乙酸胁迫的耐受性,提高番茄红素合成水平。

2.4 过表达乙酸胁迫应答上调基因对细胞生长和番茄红素合成的影响

为了提高 10 个目标基因的表达水平,我们在 Y02 菌株中利用 *GAL* 启动子分别连接这 10 个基因,构建了 10 株重组菌,分别为 Y02-*adk2*、Y02-*fap7*、Y02-*hem13*、Y02-*elo3*、Y02-*pdcs*、Y02-*set5*、Y02-*clb2*、Y02-*hst4*、Y02-*pmt5*、Y02-*swe1* (表 1)。结果显示这种调控对乙酸胁迫下细胞生长和产物合成产生了显著影响(图 5A)。其中 Y02-*set5* 和 Y02-*pdcs* 菌株的生长得到了改善,细胞生物量与对照相比分别提高 4.70%和 8.75%,而其他 8 株菌的生长受到了抑制作用(72 h *OD*₆₀₀ 值),其中 Y02-*clb2* 和 Y02-*swe1* 生长受到的抑制作用最强。在产物合成方面(图 5B),Y02-*clb2*、Y02-*hem13*、Y02-*pmt5*、Y02-*swe1*、Y02-*hst4*、Y02-*fap7* 和 Y02-*adk2* 菌株番茄红素含量与对照菌株相比分别提高了 36.06%、33.38%、29.35%、28.05%、25.31%、17.17%和 14.09%,Y02-*pdcs* 番茄红素含量降低了 39.85%,而 Y02-*set5* 番茄红素含量与 Y02 无显著性差异

(图 5B)。因此,为了提高产物产量,需要对以上基因进行组合调控。

2.5 基因组合过表达对细胞生长和番茄红素合成的影响

以上结果表明,Y02-*set5* 细胞生长得到了改善,这与前人的研究结果^[42]一致,但该菌株的产物水平与对照菌相比无显著差异,而 Y02-*hem13*、Y02-*pmt5*、Y02-*hst4*、Y02-*fap7* 和 Y02-*adk2* 番茄红素含量得到了提高,但细胞生长受到了抑制。因此我们在 Y02-*set5* 的基础上分别过表达 *adk2*、*fap7*、*hem13*、*pmt5* 和 *hst4*,构建了 5 株组合过表达菌株,包括 Y02-*set5*-*adk2*、Y02-*set5*-*fap7*、Y02-*set5*-*hem13*、Y02-*set5*-*pmt5*、Y02-*set5*-*hst4* (表 1),并进行了乙酸盐添加实验。结果表明,Y02-*set5*-*hst4* 中番茄红素含量较 Y02 提高了 42.76%,达到 12.62 mg/g-DCW,该值与单独过表达菌株 Y02-*set5* 和 Y02-*hst4* 相比也分别提高了 55.50%和 16.53%。最终 Y02-*set5*-*hst4* 中番茄红素产量为 108.67 mg/L,与 Y02、Y02-*set5* 和 Y02-*hst4* 相比分别提高了 67.13%、63.82%和 52.81% (图 6A)。同时与对照相比 5 株菌的生长情况均得到了显著提高,

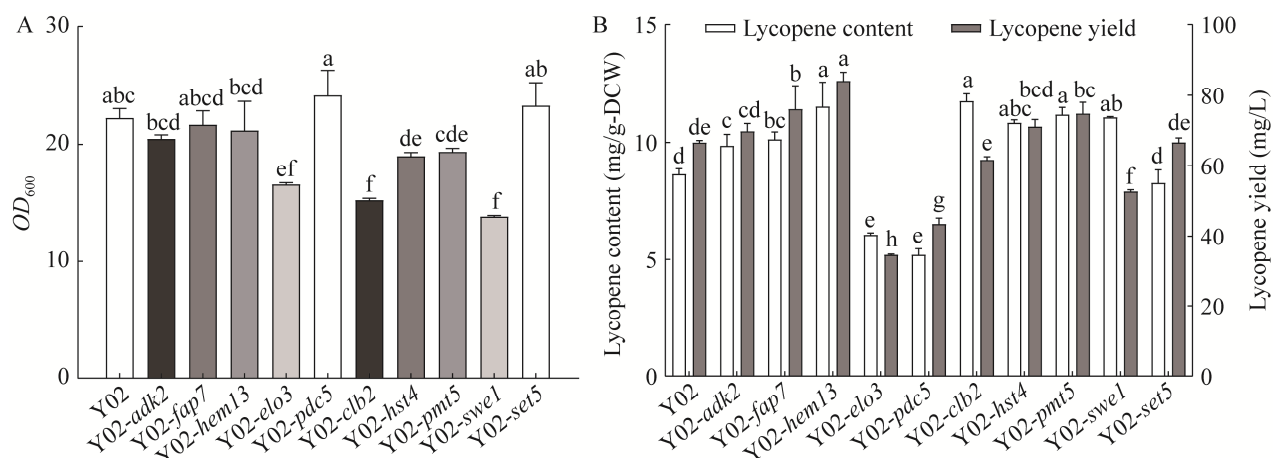


图 5 添加乙酸盐对重组菌细胞生长(A)和番茄红素含量、产量(B)的影响 不同小写字母表示组间具有显著性差异

Figure 5 Effect of acetate addition of cell growth (A) and lycopene content, yield (B) on recombinant strains. Different lowercase letters indicated significant differences among different groups.

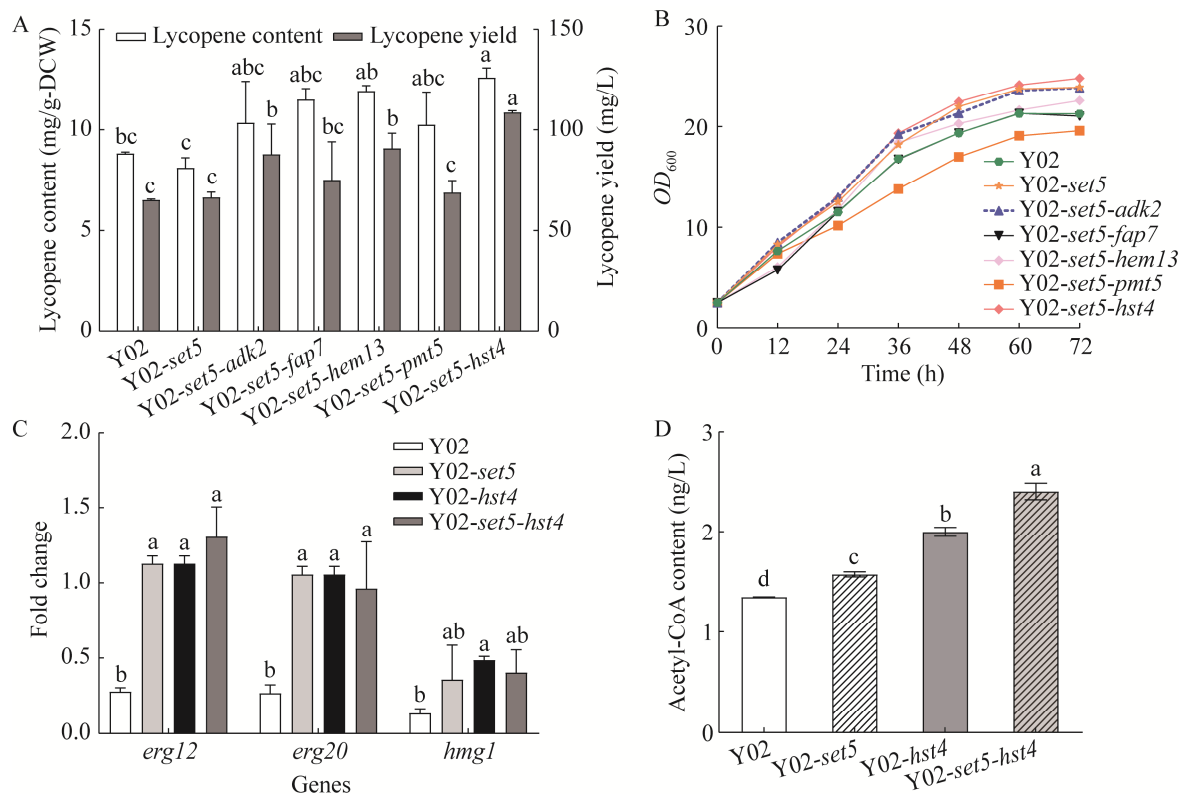


图 6 添加乙酸盐对重组菌番茄红素含量、产量(A)、细胞生长(B)、关键基因表达量(C)和乙酰辅酶 A 含量(D)的影响 不同小写字母表示组间具有显著性差异

Figure 6 Effects of acetate addition of lycopene content, yield (A), cell growth (B), key gene expressions (C) and acetyl-CoA content (D) on recombinant strains. Different lowercase letters indicated significant differences among different groups.

其中 Y02-*set5-hst4* 最大细胞量与 Y02 相比提高了 16.73% (图 6B)。

除了增加生物量, 重组菌中番茄红素产量的提高可能与乙酰辅酶 A 或(和)甲羟戊酸途径代谢通量的增加有关, 因此我们对 Y02、Y02-*set5*、Y02-*set5-hst4* 胞内乙酰辅酶 A 的含量及 MVA 途径中关键基因 *erg12*、*erg20* 和 *hmg1* 的表达量进行了测定。结果显示, 菌株 Y02-*set5-hst4* 中 MVA 途径关键基因 *erg12*、*erg20* 和 *hmg1* 的表达量较 Y02 分别提高了 1.70、1.44 和 1.96 倍; 较 Y02-*set5* 分别提高了 1.57、1.35 和 1.79 倍(图 6C)。菌株 Y02-*set5-hst4* 中乙酰辅酶 A 含量与 Y02-*set5* 和 Y02 相比分别提高了 52.65% 和 78.21% (图 6D), 说明过表达 *set5* 和 *hst4* 在增强细胞耐受乙酸胁迫的同时, 又提高了乙酰辅酶 A 含量和 MVA 途径的代谢通量, 促进了番茄红素的合成。

3 讨论与结论

利用代谢工程实现番茄红素在酿酒酵母中的高效合成已得到广泛的研究, 所采用的策略包括过表达 MVA 途径关键基因^[48]、增加乙酰辅酶 A 含量^[49]、筛选不同来源的番茄红素合成基因等^[50]。乙酰辅酶 A 是酿酒酵母合成番茄红素的重要前体, 本研究聚焦于通过增加乙酰辅酶 A 含量来提高番茄红素产量。首先通过过表达乙酰辅酶 A 合成酶结合添加乙酸盐的策略提高了胞内乙酰辅酶 A 浓度, 促进了番茄红素的合成。由于添加乙酸盐对细胞造成胁迫, 抑制细胞生长, 导致产物产量的增加程度有限。因此, 本研究通过转录组学技术研究重组菌株在乙酸胁迫下的全基因组转录表达情况, 挖掘上调的应答基因, 通过提高其表达水平增强细胞对乙酸胁迫的耐受能力, 改善细胞生长, 进一步提高目标产物水平。需要指出的是该策略已

成功地应用在多种物质的生物合成中, 包括乙醇^[51]、乳酸^[52]、3-羟基丙酸^[53]和脂肪酸^[54], 如赵姝一等^[55]通过过表达乙酸耐受性基因 *tL(CAA)K*, 进而使得 *haa1*、*msn2* 和 *msn4* 等胁迫耐受性相关转录因子编码基因的转录水平上调, 从而改善发酵性能, 提高乙酸胁迫条件下的乙醇产率。Swinnen 等^[56]通过转录组学发现转录因子 *haa1* 是细胞应答乙酸胁迫的重要调控元件, 通过调控该转录因子提高了酿酒酵母的乙酸耐受性。Cunha 等^[57]通过全基因组转录分析, 发现乙酸胁迫下 *haa1* 和 *prs3* 基因表达水平显著上调, 进而过表达该基因提高了酿酒酵母细胞生物量和乙醇合成水平。天然产物研究中 Yang 等^[58]以大肠杆菌为底盘细胞, 通过添加乙酸盐促进了 β -石竹烯的生物合成, 但该研究也发现, 外源乙酸抑制了细胞生长, 使得产物水平的提高水平有限。

本研究通过构建单过表达及双过表达菌株, 最终发现同时过量表达 *set5* 和 *hst4* 能够提高酵母细胞对乙酸胁迫的耐受能力, 并增加胞内乙酰辅酶 A 浓度和甲羟戊酸途径代谢通量, 促进番茄红素合成。在酿酒酵母中 *set5* 编码组蛋白 H4 甲基转移酶^[59], 通过调控 DNA、rRNA 和蛋白质的合成, 增强细胞对各种胁迫的应激响应^[60]。有研究报道过表达 *set5* 能够增加细胞对乙酸胁迫的耐受性^[61], 从而提高菌株的生物量及乙醇产量。Lamour 等^[62]发现在酿酒酵母中过表达 *set5* 增加了菌株的代谢稳定性和纤维二糖水解酶的活性, 提高了乙醇的合成效率。反之, 敲除 *set5* 则导致细胞耐受性降低, Chauhan 等^[63]发现在酿酒酵母中敲除 *set5* 降低了细胞在制霉菌素或多球菌素胁迫下的生存能力。

在酿酒酵母中 *hst4* 编码 NAD 依赖型组蛋白脱乙酰酶, 该酶参与细胞应答胁迫环境及维持细胞稳定性、生长和代谢的调节^[64-65], 在维持

基因稳定性和能量稳态方面具有重要作用^[66]。研究发现过表达 *hst4* 可以降低细胞对应激环境的敏感性^[67], 抑制细胞对温度的敏感性^[68]。在酿酒酵母中敲除 *hst4* 导致细胞生长受到影响, 胞内活性氧浓度增加, 环境耐受性降低^[69]。Celic 等^[70]发现在酿酒酵母中敲除 *hst3* 与 *hst4* 后, 细胞对甲基甲烷磺酸盐、喜树碱等物质的敏感性增加。Starai 等^[71]发现敲除 *hst3* 与 *hst4* 后的酵母菌株在含有乙酸盐的培养基中细胞生长速度变慢, 并且对温度的敏感性增加。本研究证明在酿酒酵母中过表达 *hst4* 能够提高细胞对乙酸胁迫的耐受性。

将 *set5* 与 *hst4* 组合过表达除了增加细胞对乙酸胁迫的耐受性, 还提高了乙酰辅酶 A 浓度和甲羟戊酸途径的代谢通量, 其具体机制还需要进一步研究, 如利用转录组和代谢组的方法从全局角度重新揭示重组菌的转录与代谢调控机制。需要指出的是本研究采用的是 *GAL* 启动子调控相关基因, 后期可利用启动子工程对相关基因的表达水平和表达时间点进行优化, 进一步提高细胞生长和产物合成水平。综上所述, 本研究的结果表明在过表达 *acs2* 的基础上, 同时过表达 *set5* 和 *hst4* 能够增加酵母细胞对乙酸胁迫的耐受能力, 改善细胞生长, 促进类胡萝卜素的合成, 研究结果可为其他类异戊二烯产物的代谢工程研究提供有益的参考。

REFERENCES

- [1] VICKERS CE, WILLIAMS TC, PENG BY, CHERRY J. Recent advances in synthetic biology for engineering isoprenoid production in yeast[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 40: 47-56.
- [2] AGHAJANPOUR M, NAZER MR, OBEIDAVI Z, AKBARI M, EZATI P, KOR NM. Functional foods and their role in cancer prevention and health promotion: a comprehensive review[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2017, 7(4): 740-769.
- [3] KIRTI K, AMITA S, PRITI S, KUMAR AM, JYOTI S. Colorful world of microbes: carotenoids and their applications[J]. *Advances in Biology*, 2014, 23: 1-13.
- [4] SAINI RK, KEUM YS. Carotenoid extraction methods: a review of recent developments[J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 90-103.
- [5] 施明雨, 刘怡, 王冬, 路福平, 黄璐琦, 戴住波, 张学礼. 构建酿酒酵母细胞工厂生产番茄红素[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(20): 3978-3985.
SHI MY, LIU Y, WANG D, LU FP, HUANG LQ, DAI ZB, ZHANG XL. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* cell factories for lycopene production[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(20): 3978-3985 (in Chinese).
- [6] KIRBY J, KEASLING JD. Metabolic engineering of microorganisms for isoprenoid production[J]. *Natural Product Reports*, 2008, 25(4): 656-661.
- [7] 王贝贝, 施明雨, 王冬, 许骄阳, 刘怡, 杨洪江, 戴住波, 张学礼. 代谢工程改造酿酒酵母生产 β -胡萝卜素[J]. *生物工程学报*, 2014, 30(8): 1204-1216.
WANG BB, SHI MY, WANG D, XU JY, LIU Y, YANG HJ, DAI ZB, ZHANG XL. Production of β -carotene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2014, 30(8): 1204-1216 (in Chinese).
- [8] SUN YX, SUN L, SHANG F, YAN GL. Enhanced production of beta-carotene in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by inverse metabolic engineering with supplementation of unsaturated fatty acids[J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(5): 568-577.
- [9] SHI B, MA T, YE ZL, LI XW, HUANG YL, ZHOU ZY, DING YK, DENG ZX, LIU TG. Systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lycopene overproduction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(40): 11148-11157.
- [10] CHENG L, SWOFFORD CA, SINSKEY AJ. Modular engineering for microbial production of carotenoids[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2020, 10: e00118.
- [11] LI X, WANG ZX, ZHANG GL, LI JY. Improving lycopene production in *Saccharomyces cerevisiae* through optimizing pathway and chassis metabolism[J]. *Chemical Engineering Science*, 2019, 193: 364-369.
- [12] MARKHAM KA, ALPER HS. Synthetic biology expands the industrial potential of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(10): 1085-1095.
- [13] CARDENAS J, DA SILVA NA. Engineering cofactor and transport mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*

- for enhanced acetyl-CoA and polyketide biosynthesis[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 36: 80-89.
- [14] PRONK JT, STEENSMA HY, van DIJKEN JP. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast* (Chichester, England), 1996, 12(16): 1607-1633.
- [15] MEADOWS AL, HAWKINS KM, TSEGAYE Y, ANTIPOV E, KIM Y, RAETZ L, DAHL RH, TAI AN, MAHATDEJKUR-MEADOWS T, XU L, ZHAO LS, DASIKA MS, MURARKA A, LENIHAN J, ENG DA, LENG JS, LIU CL, WENGRE JW, JIANG HX, CHAO L, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production[J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 694-697.
- [16] SU B, LAI P, YANG F, LI AZ, DENG MR, ZHU HH. Engineering a balanced acetyl coenzyme A metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for lycopene production through rational and evolutionary engineering[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(13): 4019-4029.
- [17] LIU WS, ZHANG B, JIANG R. Improving acetyl-CoA biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via the overexpression of pantothenate kinase and PDH bypass[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 1-9.
- [18] LIU H, FAN J, WANG C, LI C, ZHOU XH. Enhanced β -amyrin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by coupling an optimal acetyl-CoA supply pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(13): 3723-3732.
- [19] LIU YQ, BAI CX, LIU Q, XU Q, QIAN ZL, PENG QQ, YU JH, XU MQ, ZHOU XS, ZHANG YX, CAI MH. Engineered ethanol-driven biosynthetic system for improving production of acetyl-CoA derived drugs in Crabtree-negative yeast[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 275-284.
- [20] SHIBA Y, PARADISE EM, KIRBY J, RO DK, KEASING JD. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids[J]. *Metabolic Engineering*, 2007, 9: 160-168.
- [21] BU X, LIN JY, CHENG J, YANG D, DUAN CQ, KOFFAS M, YAN GL. Engineering endogenous ABC transporter with improving ATP supply and membrane flexibility enhances the secretion of β -carotene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13 (168): 1-14.
- [22] PENA PV, GLASKER S, SRIENC F. Genome-wide overexpression screen for sodium acetate resistance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 164(1): 26-33.
- [23] MIRA NP, PALMA M, GUERREIRO JF, SA-CORREIA I. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1): 79.
- [24] 吕小妹. 利用代谢工程改造大肠杆菌及酿酒酵母进行异戊二烯生物合成的基础研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2015.
- LÜ XM. *Metabolic Engineering of Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae for the production of Isoprene*[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2015 (in Chinese).
- [25] 谢文平. 代谢工程改造酿酒酵母生物合成类胡萝卜素的生物研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2015.
- XIE WP. *Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for the production of carotenoids*[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2015 (in Chinese).
- [26] GIETZ RD, SCHIESTL RH. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(1): 35-37.
- [27] XIE WP, LIU M, LÜ XM, LIU WQ, YU HW. Construction of a controllable β -carotene biosynthetic pathway by decentralized assembly strategy in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(1): 125-133.
- [28] TESTE MA, DUQUENNE M, FRANCOIS JM, PARROU JL. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 99.
- [29] CHEN HL, YANG Y, WANG Z, DOU J, WANG H, ZHOU CL. Elevated intracellular acetyl-CoA availability by *acs2* overexpression and *mls1* deletion combined with *metK1* introduction enhanced SAM accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016: 26-34.
- [30] 尤迪, 叶邦策. 从翻译后修饰角度解析人工合成途径与底盘细胞的适配性[J]. *合成生物学*, 2020(2): 212-225.
- YOU D, YE BC. Compatibility between synthetic pathway and chassis cells from the viewpoint of post-translational modifications[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020(2): 212-225 (in Chinese).

- [31] VERWAAL R, JIANG Y, WANG J, DARAN JM, SANDMANN G, van den BERG JA, van OUYEN AJJ. Heterologous carotenoid production in *Saccharomyces cerevisiae* induces the pleiotropic drug resistance stress response[J]. Yeast (Chichester, England), 2010, 27(12): 983-998.
- [32] GENG P, ZHANG L, SHI GY. Omics analysis of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(5): 94.
- [33] XIAO Y, HU Y, ZHANG L, XUE W. Identification of acetic-acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* strains by microsatellite markers[J]. 2015, 14(2): 54-62.
- [34] OH EJ, WEI N, KWAK S, KIM H, JIN YS. Overexpression of RCK1 improves acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biotechnology, 2019, 292: 1-4.
- [35] GU YJ, GORDON DM, AMUTHA B, PAIN D. A GTP: amp phosphotransferase, Adk2p, in *Saccharomyces cerevisiae*. Role of the C terminus in protein folding/stabilization, thermal tolerance, and enzymatic activity[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(19): 18604-18609.
- [36] JUHNKE H, CHARIZANIS C, LATIFI F, KREMS B, ENTIAN KD. The essential protein fap7 is involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular Microbiology, 2000, 35(4): 936-948.
- [37] TAKAHASHI T, YANO T, ZHU JX, HWANG GW, NAGANUMA A. Overexpression of FAP7, MIG3, TMA19, or YLR392c confers resistance to arsenite on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2010, 35(6): 945-946.
- [38] ZHANG L, HACH A. Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator[J]. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 1999, 56(5/6): 415-426.
- [39] 崔红晶, 周涛, 赵炜, 宋浩昌, 袁源, 郑慧玲, 刘新光. 酵母 PMT1 与 PMT5 双基因缺失对细胞复制性寿命的影响[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(5): 34-38.
- CUI HJ, ZHOU T, ZHAO W, SONG HC, YUAN Y, ZHEN HL, LIU XG. Effect of PMT1 and PMT5 double-gene deficiency on yeast cells replication lifespan[J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(5): 34-38 (in Chinese).
- [40] HIROSHI M, SHIGERU M. The combination of NAD⁺-dependent deacetylase gene deletion and the interruption of gluconeogenesis causes increased glucose metabolism in budding yeast[J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0194942.
- [41] MEI YC, FENG JP, HE F, LI YM, LIU YF, LI F, CHEN Y, DU HN. Set2-mediated H3K36 methylation states redundantly repress the production of antisense transcripts: role in transcription regulation[J]. FEBS Open Bio, 2021, 11(8): 2225-2235.
- [42] ZHANG MM, ZHAO XQ, CHENG C, BAI FW. Improved growth and ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid by overexpression of SET5 and PPR1[J]. Biotechnology Journal, 2015, 10(12): 1903-1911.
- [43] EISENKOLB M, ZENZMAIER C, LEITNER E, SCHNEITER R. A specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast[J]. Molecular Microbiology, 2002, 13(12): 4414-4428.
- [44] WANG DP, WANG L, HOU L, DENG XH, GAO Q, GAO NF. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for accumulating pyruvic acid[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(4): 2323-2331.
- [45] ZHANG W, KANG J, WANG CL, WEN XP, GE JP. Effects of pyruvate decarboxylase (*pdh 1*, *pdh 5*) gene knockout on the production of metabolites in two haploid *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2022, 52(1): 62-69.
- [46] ELUERE R, OFFNER N, VARLET I, MOTTEUX O, SIGNON L, PICARD A, BAILLY E, SIMON MN. Compartmentalization of the functions and regulation of the mitotic cyclin *Clb2* in *S. cerevisiae*[J]. Journal of Cell Science, 2007, 120(4): 702-711.
- [47] HU F, APARICIO OM. *Swi1* regulation and transcriptional control restrict the activity of mitotic cyclins toward replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(25): 8910-8915.
- [48] LI MJ, XIA QQ, ZHANG HB, ZHANG RB, YANG JM. Metabolic engineering of different microbial hosts for lycopene production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(48): 14104-14122.
- [49] HONG J, PARK SH, KIM S, KIM SW, HAHN JS. Efficient production production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by enzyme engineering and increasing membrane flexibility and NADPH

- production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(1): 211-223.
- [50] MA T, SHI B, YE ZL, LI XW, LIU M, CHEN Y, XIA J, NIELSEN J, DENG ZX, LIU TG. Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 134-142.
- [51] BENJAPHOKEE S, HASEGAWA D, YOKOTA D, ASVARAK T, AUESUKAREE C, SUGIYAMA M, KANEKO Y, BOONCHIRD C, HARASHIMA S. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol[J]. *New Biotechnology*, 2012, 29(3): 379-386.
- [52] YE W, ZHANG WM, LIU TM, TAN GH, LI HH, HUANG ZL. Improvement of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by high-efficient disruption of the *ADH2* gene using a novel recombinant TALEN vector[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1067.
- [53] LEE J, CHA S, KANG C, LEE GM, LIM HG, JUNG GY. Efficient conversion of acetate to 3-hydroxypropionic acid by engineered *Escherichia coli*[J]. *Catalysts*, 2018, 8(11): 525.
- [54] GONG ZW, SHEN HW, ZHOU WT, WANG YD, YANG XB, ZHAO ZK. Efficient conversion of acetate into lipids by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 189.
- [55] 赵姝一, 袁冰, 王雪晴, 陈洪奇, 赵心清, 白凤武. 过表达 tRNA 基因 tL(CAA)K 提高酿酒酵母乙酸耐受性[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(12): 4293-4302.
- ZHAO SY, YUAN B, WANG XQ, CHEN HQ, ZHAO XQ, BAI FW. Overexpression of a leucine transfer RNA gene tL(CAA)K improves the acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(12): 4293-4302 (in Chinese).
- [56] SWINNEN S, HENRIQUES SF, SHRESTHA R, HO PW, SA-CORREIA I, NEVOIGT E. Improvement of yeast tolerance to acetic acid through Haa1 transcription factor engineering: towards the underlying mechanisms[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 7.
- [57] CUNHA JT, COSTA CE, FERRAZ L, ROMANI A, JOHANSSON B, SA-CORREIA I, DOMINGUES L. *HAA1* and *PRS3* overexpression boosts yeast tolerance towards acetic acid improving xylose or glucose consumption: unravelling the underlying mechanisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(10): 4589-4600.
- [58] YANG J, NIE Q. Engineering *Escherichia coli* to convert acetic acid to β -caryophyllene[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 1-9.
- [59] GREEN EM, MAS G, YOUNG NL, GARCIA BA, GOZANI O. Methylation of H4 lysines 5, 8 and 12 by yeast Set5 calibrates chromatin stress responses[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2012, 19(3): 361-363.
- [60] 张克俞, 张明明, 赵心清, 白凤武. 关键基因过表达提高酿酒酵母抑制剂耐受性及乙醇发酵性能[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(3): 541-546.
- ZHANG KY, ZHANG MM, ZHAO XQ, BAI FW. Improvement of inhibitor stress tolerance and ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of novel key genes[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(3): 541-546 (in Chinese).
- [61] 张明明. 乙酸胁迫耐性基因挖掘及高活性酿酒酵母构建[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2017.
- ZHANG MM. Mining of novel functional genes involved in acetic acid stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and construction of yeast strains with improved performance[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2017 (in Chinese).
- [62] LAMOUR J, WAN C, ZHANG MM, ZHAO XQ, DEN HAAN R. Overexpression of endogenous stress-tolerance related genes in *Saccharomyces cerevisiae* improved strain robustness and production of heterologous cellobiohydrolase[J]. *FEMS Yeast Research*, 2019, 19(4): foz035.
- [63] CHAUHAN N, SERE YY, SOKOL AM, GRAUMANN J, MENON AK. A PhotoClick cholesterol-based quantitative proteomics screen for cytoplasmic sterol-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast (Chichester, England)*, 2020, 37(1): 15-25.
- [64] GERSHON L, KUPIEC M. A novel role for Dun1 in the regulation of origin firing upon hyper-acetylation of H3K56[J]. *PLoS Genetics*, 2021, 17(2): e1009391.
- [65] BRACHMANN CB, SHERMAN JM, DEVINE SE, CAMERON EE, PILLUS L, BOEKE JD. The *SIR2* gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability[J]. *Genes & Development*, 1995, 9(23): 2888-2902.

- [66] MASUMOTO H, HAWKE D, KOBAYASHI R, VERREAULT A. A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response[J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 294-298.
- [67] MAAS NL, MILLER KM, DeFAZIO LG, TOCZYSKI DP. Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4[J]. *Molecular Cell*, 2006, 23(1): 109-119.
- [68] FREEMAN-COOK LL, SHERMAN JM, BRACHMANN CB, ALLSHIRE RC, BOEKE JD, PILLUS L. The *Schizosaccharomyces pombe* hst4(+) gene is a SIR2 homologue with silencing and centromeric functions[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1999, 10(10): 3171-3186.
- [69] MADSEN CT, SYLVESTERSEN KB, YOUNG C, LARSEN SC, POULSEN JW, ANDERSEN MA, PAKMQVIST EA, HEY-MOGENSEN M, JENSEN PB, TREEBAK JT, LISBY M, NIELSEN ML. Biotin starvation causes mitochondrial protein hyperacetylation and partial rescue by the SIRT3-like deacetylase Hst4p[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7726.
- [70] CELIC I, VERREAULT A, BOEKE JD. Histone H3 K56 hyperacetylation perturbs replisomes and causes DNA damage[J]. *Genetics*, 2008, 179(4): 1769-1784.
- [71] STARAI VJ, TAKAHASHI H, BOEKE JD, ESCALANTE-SEMERENA JC. Short-chain fatty acid activation by acyl-coenzyme A synthetases requires SIR2 protein function in *Salmonella enterica* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genetics*, 2003, 163(2): 545-555.