

## · 酶催化与生物合成机制 ·

**肖文海** 天津大学系统生物工程教育部重点实验室副教授、博士生导师。中国药学会制药工程专业委员会委员。主要研究方向：复杂结构药物、高附加值化学品的高效微生物制造；代谢工程、合成生物学、人工细胞工厂设计与构建；发酵过程设计与优化。发表SCI论文20余篇，其中以第一作者或者通信作者在 *Metabolic Engineering*、*Microbial Cell Factories* 等上发表论文14篇。以第二作者在 *Science* 和 *PNAS* 各发表论文一篇。研究成果多次被 *Science*、MIT 官方网站、*Chemical Reviews*、*Metabolic Engineering* 等高度评价和引用。申请发明专利11项，承担横向项目两项，实现成果转化(番茄红素和玉米黄质生物合成)两项。



# 脱落酸生物合成研究进展

李可心<sup>1,2,3</sup>, 王颖<sup>1,2</sup>, 姚明东<sup>1,3</sup>, 肖文海<sup>1,2\*</sup>

1 天津大学化工学院, 天津 300072

2 天津大学合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

3 天津大学前沿技术研究院, 天津 301700

李可心, 王颖, 姚明东, 肖文海. 脱落酸生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2190-2203.

LI Kexin, WANG Ying, YAO Mingdong, XIAO Wenhai. Advances in abscisic acid biosynthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2190-2203.

**摘要:** 脱落酸作为一种抑制生长的植物激素, 是平衡植物内源激素和调节生长代谢的关键因子。脱落酸具有提高作物抗旱耐盐、减少果实褐变的作用, 同时可降低疟疾发病率、刺激胰岛素分泌, 因此在农业和医药领域有着广阔的应用前景。相较于传统的植物提取法和化学合成法, 利用微生物合成脱落酸是一种经济、可持续的来源方式。目前利用天然微生物如灰葡萄孢霉菌、蔷薇色尾孢菌等合成脱落酸的研究已经取得了诸多进展, 而脱落酸的异源微生物合成研究相对较少。酿酒酵母、解脂耶氏酵母、大肠杆菌等工程菌株作为天然产物异源合成的常用宿主, 具有遗传背景清晰、易于操作、便于工业化生产等优势, 因此利用微生物异源合成脱落酸是一种更具潜力的生产方式。本文着重从底盘细胞的选择、关键酶的筛选与表达强化、辅因子的调节、增强前体供应及促进脱落酸外排 5 个方面对微生物异源合成脱落酸的研究进行综述。最后, 对该领域的未来发展方向进行了展望。

**关键词:** 脱落酸; 异源合成; 关键酶优化; 底盘选择; 产物外排

资助项目: 国家自然科学基金(22178261)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22178261).

\*Corresponding author. E-mail: wenhai.xiao@tju.edu.cn

Received: 2022-07-25; Accepted: 2022-11-10; Published online: 2022-11-14

# Advances in abscisic acid biosynthesis

LI Kexin<sup>1,2,3</sup>, WANG Ying<sup>1,2</sup>, YAO Mingdong<sup>1,3</sup>, XIAO Wenhai<sup>1,2\*</sup>

1 School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Frontier Science Center for Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

3 Frontier Technology Research Institute, Tianjin University, Tianjin 301700, China

**Abstract:** Abscisic acid, a plant hormone that inhibits growth, is a key factor in balancing plant endogenous hormones and regulating growth and metabolism. Abscisic acid can improve the drought resistance and salt tolerance of crops, reduce fruit browning, reduce the incidence rate of malaria and stimulate insulin secretion, so it has a broad application potential in agriculture and medicine. Compared with traditional plant extraction and chemical synthesis, abscisic acid synthesis by microorganisms is an economic and sustainable route. At present, a lot of progress has been made in the synthesis of abscisic acid by natural microorganisms such as *Botrytis cinerea* and *Cercospora rosea*, while the research on the synthesis of abscisic acid by engineered microorganisms is rarely reported. *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* and *Escherichia coli* are common hosts for heterologous synthesis of natural products due to their advantages of clear genetic background, easy operation and friendliness for industrial production. Therefore, the heterologous synthesis of abscisic acid by microorganisms is a more promising production method. The author reviews the research on the heterologous synthesis of abscisic acid by microorganisms from five aspects: selection of chassis cells, screening and expression enhancement of key enzymes, regulation of cofactors, enhancement of precursor supply and promotion of abscisic acid efflux. Finally, the future development direction of this field is prospected.

**Keywords:** abscisic acid; heterologous synthesis; key enzyme optimization; selection of chassis cells; effluent efflux

脱落酸(abscisic acid, ABA), 又称休眠素, 是一种具有倍半萜结构的植物激素<sup>[1]</sup>, 因其能促使叶子脱落而得名, 是植物 5 大天然生长调节剂之一<sup>[2]</sup>。天然的 ABA 存在对映异构体, 起主要活性作用的是右旋异构体 S-ABA。ABA 是平衡植物内源激素和调节生长代谢的关键因子, 具有增强作物抗旱<sup>[3-4]</sup>、耐盐<sup>[5]</sup>以及减少果实褐变<sup>[6]</sup>等作用, 可用于提高农作物的品质和产量<sup>[7]</sup>; 除在农业上的应用外, ABA 还可应用于人体, 对免疫系统、心血管细胞、干细胞和糖尿病<sup>[8-10]</sup>等有广泛的调节作用(图 1)。ABA 实

用制剂应用市场的打开, 将会带来巨大的经济效益和社会效益。

ABA 广泛存在于高等植物中, 也存在于一些植物病原真菌、细菌<sup>[11-13]</sup>中。ABA 的生物合成途径分为间接途径和直接途径<sup>[14-15]</sup>: 在高等植物中, 主要通过间接途径合成 ABA, 该途径最显著的特点是通过氧化裂解 C<sub>40</sub> 类胡萝卜素来形成 C<sub>15</sub> 骨架, 随后通过多步酶催化反应合成 ABA; 在真菌中, ABA 则直接由法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)经多步氧化形成, 此途径称为 C<sub>15</sub> 直接途径, 不同真菌形成

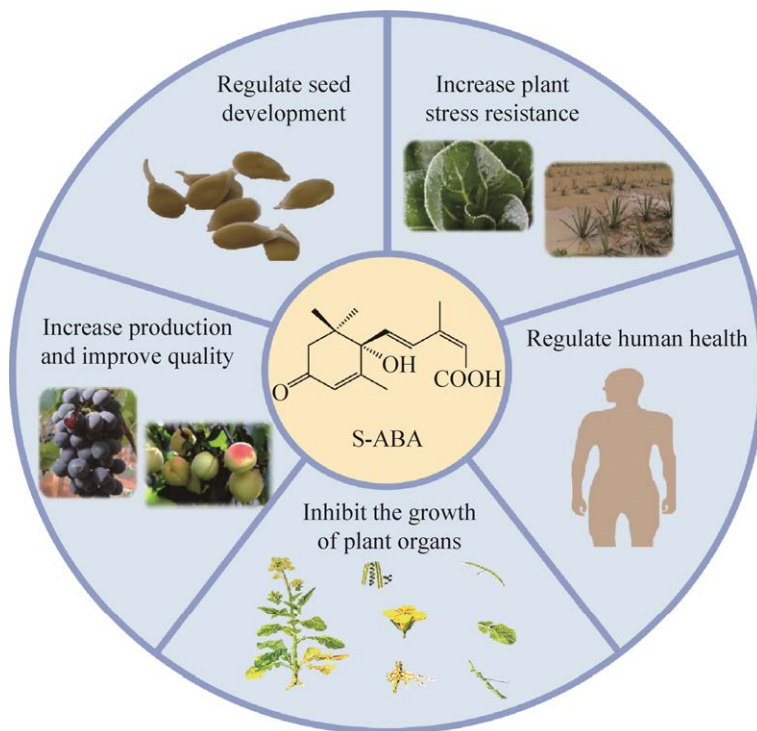


图 1 脱落酸的应用

Figure 1 Application of abscisic acid.

ABA 的代谢途径略有不同。目前 ABA 主要通过化学合成方法获得,但化学合成的 ABA 是 S-ABA 和 R-ABA 的混合物,效价较低。随着合成生物学技术的发展,利用微生物合成天然产物已经成为研究热点。目前,利用天然微生物合成 ABA 的研究已取得诸多进展,而 ABA 的异源微生物合成研究相对较少。相较于细胞内部代谢情况尚不明晰、可用遗传工具数量有限的天然合成 ABA 的真菌,异源微生物如酿酒酵母、解脂耶氏酵母、大肠杆菌等的遗传背景清晰,代谢已被详细研究,可应用高效的遗传操作工具,具有较好的安全性,是合成 ABA 的有希望的候选者。利用这些工程菌株进行 ABA 的异源合成将是一种更具潜力的生产方式。本文在介绍 ABA 生物合成途径和关键酶的基础上,将重点对微生物异源合成 ABA 的研究进展

及相关工程化策略进行综述,并对其前景进行分析与展望。

## 1 脱落酸的生物合成途径和关键酶

### 1.1 脱落酸的生物合成途径

在植物中,ABA 生物合成主要发生在质体中,根冠和叶片是合成 ABA 的主要部位<sup>[1]</sup>。ABA 在植物体内的合成以 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸(methylerythritol-4-phosphate pathway, MEP)途径为起始,随后经牻牛儿基焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP)、FPP、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)等物质合成关键中间体  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[16]</sup>(图 2)。 $\beta$ -胡萝卜素经  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶( $\beta$ -carotene hydroxylase, BCH/CrtZ)连续氧化依

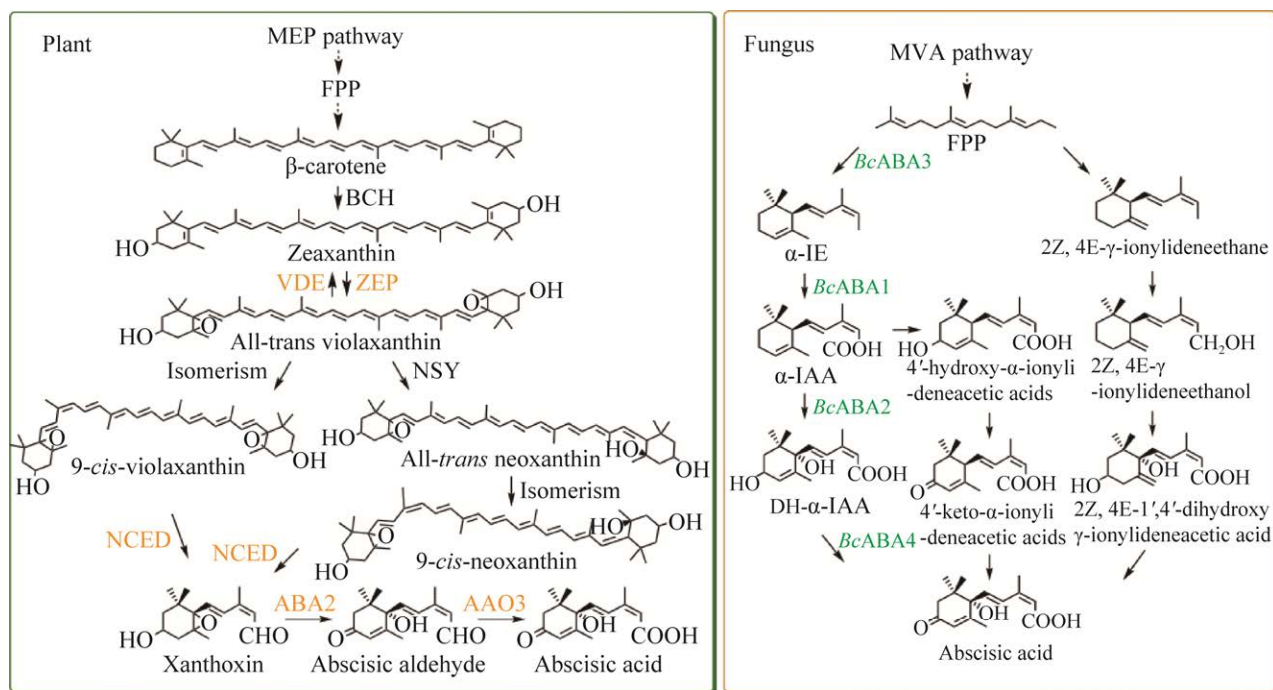


图 2 脱落酸在植物(左)和真菌(右)中的生物合成途径  $\alpha$ -IE:  $\alpha$ -苜香乙烷;  $\alpha$ -IAA:  $\alpha$ -苜香乙酸; DH- $\alpha$ -IAA: 1',4'-ABA 二醇

Figure 2 Biosynthetic pathway of abscisic acid in plants (left) and fungi (right).  $\alpha$ -IE:  $\alpha$ -ionylideneethane;  $\alpha$ -IAA:  $\alpha$ -ionylideneacetic acid; DH- $\alpha$ -IAA: 1',4'-trans-dihydroxy- $\alpha$ -ionylideneacetic acid.

次生成隐黄质和玉米黄质;之后玉米黄质在玉米黄质环氧化酶(zeaxanthin epoxidase, ZEP)作用下依次生成花药黄质和全反式紫黄质,同时全反式紫黄质可以在光照作用下经紫黄质脱环氧化酶(violaxanthin de-epoxidase, VDE)脱环氧化生成玉米黄质<sup>[17-19]</sup>。研究表明,从全反式紫黄质到 ABA 的合成途径有两种:全反式紫黄质可以经新黄质合酶(neoxanthin synthase, NSY)催化生成全反式新黄质,随后经异构化变为 9-顺-新黄质<sup>[20]</sup>;同时全反式紫黄质也可以异构化为 9-顺-紫黄质。在 9-顺-环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED)作用下,9-顺-新黄质和 9-顺-紫黄质的 C<sub>11</sub>、C<sub>12</sub> 键断裂生成黄质醛。最后,黄质醛经黄素脱氢酶(xanthoxin dehydrogenase, ABA2)、脱落醛氧化酶(abscisic-aldehyde oxidase, AAO3)两步氧化

生成 ABA<sup>[21-23]</sup>。

除植物外,许多真菌也能合成 ABA,如葡萄孢霉属、尾孢霉属等<sup>[24]</sup>。尽管所有的真菌普遍采用 C<sub>15</sub> 途径直接合成 ABA,但 ABA 的生物合成途径根据物种不同存在一定差异<sup>[24-25]</sup>(图 2)。研究较多的真菌有灰葡萄孢霉属<sup>[26-27]</sup>、豆类煤污尾孢菌<sup>[24,28]</sup>、蔷薇色尾孢菌<sup>[24]</sup>,这些真菌通过不同的氧化步骤,分别以 1',4'-ABA 二醇、1',4'-二羟基-亚硫代乙酸或 4-酮-苜香乙酸为中间体,直接从 FPP 合成 ABA<sup>[29]</sup>。在灰葡萄孢霉属(*Botrytis cinerea*)中,倍半萜合成酶 ABA3 ( $\alpha$ -ionylideneethane synthase aba3, ABA3)将 FPP 环化为 $\alpha$ -苜香乙烷,之后 $\alpha$ -苜香乙烷经细胞色素 P450 单加氧酶 ABA1 (cytochrome P450 monooxygenase aba1, ABA1)、细胞色素 P450 单加氧酶 ABA2 (cytochrome

P450 monooxygenase aba2, ABA2) 氧化为 1',4'-ABA 二醇, 最后 1',4'-ABA 二醇经短链脱氢酶 ABA4 (short-chain dehydrogenase/reductase aba4, ABA4) 氧化生成 ABA<sup>[27]</sup>; 在豆类煤污尾孢菌中, FPP 经环化形成 $\gamma$ -苜香乙烷后进一步被氧化形成 1',4'-二羟基-亚硫代乙酸, 最终合成 ABA<sup>[29]</sup>; 蔷薇色尾孢菌则是氧化顺序的差别, 先氧化 $\alpha$ -苜香乙烷生成 4-酮-苜香乙酸, 最终氧化生成 ABA<sup>[24]</sup>。

## 1.2 脱落酸生物合成途径的关键酶

近年来, 随着有关 ABA 合成物种基因组和转录组分析的报道越来越多, 多种物种中参与 ABA 合成的酶已成功被表征, 其中 ABA 生物合成途径的关键酶汇总如表 1 所示。在高等植物中, 对 ABA 生物合成起关键作用的反应存在于 $\beta$ -胡萝卜素之后的步骤, 其中 ZEP、NCED 被认为是途径关键酶。

ZEP, 一个定位于类囊体膜基质侧的双功能单加氧酶, 被认为是 ABA 生物合成的关键酶之一<sup>[36-37]</sup>。编码 ZEP 的 cDNA 序列最先是从小烟草中分离获得<sup>[38]</sup>, 随后也陆续在拟南芥、番茄等植物中解析。Couso 等<sup>[30]</sup>将绿色微藻小球藻(*Chlorella zofingiensis*)来源的 CzZEP 导入缺乏 ZEP 活性的衣藻突变体, 阳性转化子能够有效地将玉米黄质转化为紫黄质, 侧面验证了 CzZEP 的功能。ABA 生物合成的另一关键是通过 NCED 裂解类胡萝卜素以产生黄质醛。NCED 与其他 4 个类胡萝卜素裂解双加氧酶(carotenoid cleavage dioxygenases, CCDs)亚家族(CCD1、CCD4、CCD7、CCD8)裂解位点有所不同<sup>[39-40]</sup>, 它在 C<sub>11</sub>、C<sub>12</sub> 双键位置上切割 9-顺-紫黄质或 9-顺-新黄质产生 15 碳的黄质醛。NCED 最初在玉米 viviparous 14 (vp14) 突变体中发现<sup>[41]</sup>, 并在多种植物中被证明是 ABA 合成

表 1 脱落酸生物合成途径的关键酶

Table 1 Key enzymes in abscisic acid biosynthesis pathway

Synthetic pathway	Key enzyme	Name	Species	Research progress	References
C <sub>40</sub> pathway	ZEP	CzZEP	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Heterologous gene complementation proves the function of the enzyme	[30]
		PtZEP2, PtZEP3	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Pathway complementation proves the function and catalytic activity of the enzyme	[31]
	NCED	PaNCED1, PaNCED3	<i>Persea americana</i>	Vitro experiments showed the function of the enzyme	[32]
		AhNCED1	<i>Arachis hypogaea</i>	The results showed that NCED located in chloroplasts, roots and leaves were the main parts of ABA synthesis in response to water stress	[33]
	AcNCED1	<i>Actinidia chinensis</i>	It is proved that AcNCED1 is a key enzyme involved in the synthesis of ABA in <i>Actinidia chinensis</i>	[34]	
C <sub>15</sub> pathway	BcABA1	BcABA1	<i>Botrytis cinerea</i>	It is proved that BcABA1 participates in ABA biosynthesis and identifies the functions and properties of enzymes	[26-27,29]
	BcABA2	BcABA2	<i>Botrytis cinerea</i>	It is proved that BcABA2 participates in ABA biosynthesis and identifies the functions and properties of enzymes	[26-27,35]
	BcABA3	BcABA3	<i>Botrytis cinerea</i>	Identify the properties and reaction mechanism of the enzyme	[26-27,35]
	BcABA4	BcABA4	<i>Botrytis cinerea</i>	Determine the nature and function of the enzyme	[26-27]



的限速酶<sup>[39,42-44]</sup>。Hu 等<sup>[33]</sup>利用蛋白印迹及荧光显色确定了花生(*Arachis hypogaea*)来源的 *AhNCED1* 的细胞器定位。Chernys 等<sup>[32]</sup>证明了鳄梨(*Persea americana*)来源的 *PaNCED1* 和 *PaNCED3* 能够在体外切割 9-顺式叶黄素为黄质醛。

ABA 在真菌中的合成途径与植物不同,驱动真菌中 ABA 生物合成的分子机制研究有限,仅在灰葡萄尾孢菌中发现了一个包含 4 个基因的基因簇。该基因簇由倍半萜环化酶(*BcABA3*)、P450 单加氧酶(*BcABA1* 和 *BcABA2*)和短链脱氢酶/还原酶(*BcABA4*)组成<sup>[27,29]</sup>。该 *BcABA* 基因簇的存在是罕见的,研究进展见表 1。2004 年, Siewers 等<sup>[29]</sup>通过靶向失活编码细胞色素 P450 氧化还原酶的基因,证明了 *BcABA1* 对 ABA 的生物合成是必不可少的。2006 年, Siewers 等<sup>[35]</sup>继续通过邻域分析及基因的靶向失活,证明了 *BcABA2* 和 *BcABA3* 参与 ABA 的生物合成,还表明了 *BcABA4* 的贡献。近年来, *BcABA* 基因簇的功能逐渐被确定。Takino 等<sup>[26]</sup>鉴定了新型倍半萜合酶 *BcABA3* 以及 ABA 合成的 3 步反应机制,之后 Takino 等<sup>[27]</sup>通过生物转化实验和体外酶反应,进一步阐明了 *BcABA* 基因簇的功能。

## 2 异源合成脱落酸底盘细胞的比较和选择

异源生物合成目标产物的产量与底盘细胞的选择和代谢途径密切相关,异源合成 ABA 底盘细胞的比较如表 2 所示。酿酒酵母、解脂耶氏酵母和大肠杆菌作为最常用的微生物底盘,它们的遗传背景清晰、操作简便,是工业化生产的理想菌株。有研究者曾尝试在大肠杆菌中生产紫黄质未成功<sup>[38,45]</sup>,大多所表达的单

个基因不能产生目标化合物,有时需要添加前体和优化培养条件获得目标产物。因此,将大肠杆菌用于体外酶的表达或者功能验证是不错的选择。

与大肠杆菌相比,具有真核表达系统的酿酒酵母、解脂耶氏酵母更适合作为 ABA 的合成平台。以紫黄质的合成为例,无论是大肠杆菌还是酿酒酵母虽然都能合成紫黄质的前体玉米黄质,但由于重要的单加氧酶 ZEP 表达效率低下,最终产物紫黄质在大肠杆菌中的产量远低于工程化酿酒酵母。解脂耶氏酵母是一种非常规酵母,该酵母与酿酒酵母相比具有明显不同的代谢特点<sup>[46-47]</sup>。利用解脂耶氏酵母作为异源表达宿主,成功生产了有价值的萜类化合物 ABA (263.5 mg/L),在所有的测试底盘细胞中产量最高<sup>[48]</sup>。

在这些底盘生物中,不同微生物生产萜类化合物的优势各不相同,需要根据天然产物的特性选择最适宿主细胞,实现高效价生产。ABA 合成途径依靠多种酶的参与,是一个多因素调节的复杂的动态过程,不同的胞内环境影响 ABA 合成关键酶的高效异源表达。Arnesen 等<sup>[48]</sup>通过工程化改造解脂耶氏酵母实现了异源微生物生产 ABA 的最高产量,表明解脂耶氏酵母有希望通过  $C_{15}$  直接途径实现 ABA 高效生产。Cataldo 等<sup>[49]</sup>表明酿酒酵母是表达铁氧还蛋白 NADPH 氧化还原酶(ferredoxin-NADPH oxidoreductase, FNR)、铁氧还蛋白(ferredoxin, FD)、ZEP 全功能系统的合适宿主,适合植物来源的 ABA 生物合成酶的表达,有望实现 ABA 间接途径的全合成。在异源 ABA 生产成为可行的工业选择之前,需要对酵母底盘和培养条件进行进一步的工程设计。

表 2 异源合成脱落酸底盘细胞的比较

Table 2 Comparison of chassis cells for heterologous synthesis of abscisic acid

Chassis cell	Advantage	Disadvantages
<i>Escherichia coli</i>	Fermentation cycle is short (2–3 d), and the precursors are not shunted Culture and metabolism are easy to control Accumulate precursors and cofactors	Rapid gene expression system may adversely affect the balance of metabolic pathways Lacking post-translational modification, it is difficult to express more complex enzymes
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Provide a large number of precursors for terpenoid synthesis Intracellular environment is suitable for terpene synthesis Suitable for CYPs expression	Fermentation cycle is long (5–7 d), and the endogenous terpenoids are shunted Incomplete processing of signal peptide When secreted and expressed, the secretion efficiency is relatively low
<i>Yarrowia lipolytica</i>	The accumulation of acyl coenzyme A and acetyl coenzyme A in cells is high, which is suitable for the synthesis of terpenoids The rich subcellular structure of lipid droplets can provide a storage place for carotenoid hydrophobic products and other substances It has the ability to secrete protein efficiently	Strictly aerobic non fermenting yeast Intracellular non homologous recombination is highly efficient and difficult to operate Difficult to regulate the intrinsic metabolic pathway, and adapt the heterologous and endogenous pathways

### 3 微生物异源合成脱落酸的研究进展

#### 3.1 微生物异源合成脱落酸的研究现状

在发现部分真菌可以天然合成 ABA 后, 研究者们已采取多种诱变策略来提高 ABA 的产量<sup>[50-51]</sup>。从目前报道来看, ABA 大规模产量约为 2–4 g/L。目前天然 ABA 生产菌的研究达到一定瓶颈, 缺乏高效的通量系统来筛选改良的高性能菌株; 以及缺少方便的遗传工具, 使得合理设计 ABA 高产菌株变得困难。研究者们开始探究微生物异源合成 ABA, 表 3 总结了微生物异源合成 ABA 的研究进展。Takino 等<sup>[15]</sup>将含灰葡萄尾孢菌来源的 *BcABA1*、*BcABA2*、*BcABA3*、*BcABA4* 基因的质粒导入米曲霉中, 研究是否有 ABA 的产生, 发现在 MPY 培养基中 ABA 产量达 8 mg/L。Otto 等<sup>[52]</sup>将灰葡萄尾孢菌来源的 *BcABA1*、*BcABA2*、*BcABA3*、*BcABA4*、*BcABA5* 导入酿酒酵母, 通过敲除对比发现 *BcABA1*、*BcABA2*、

*BcABA3* 和 *BcABA4* 的表达足以使异源宿主产生 ABA; 之后引入异源细胞色素 P450 还原酶 (Cytochrome P450 reductase, CPR)、增加 *BcABA1*、*BcABA2* 基因拷贝数, 使 ABA 的产量提高到 11 mg/L。Arnesen 等<sup>[48]</sup>将 *BcABA1*、*BcABA2*、*BcABA3*、*BcABA4*、*Bccpr1* 导入解脂耶氏酵母, 通过整合额外拷贝的甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA) 基因、ABA 生物合成编码基因, 表达异源 ABA 转运蛋白, 获得了一株 ABA 产量为 263.5 mg/L (9.1 mg/g DCW) 的工程菌。

在 ABA 合成的间接途径中, 目前已在异源底盘细胞实现中间体-紫黄质的生产。Cataldo 等<sup>[49]</sup>利用一株产  $\beta$ -胡萝卜素的酿酒酵母菌株, 通过适配 *CrtZ* 和 *ZEP*, 并截短 *ZEP*、增加  $\beta$ -胡萝卜素合成基因的基因拷贝数, 使紫黄质分批补料发酵产量达 7.3 mg/g DCW。Takemura 等<sup>[53]</sup>在大肠杆菌中合成紫黄质时探究了不同来源 *ZEP* 对紫黄质产量的影响, 发现辣椒 (*Capsicum annuum*) 来源的 *CaZEP* 有最好的转化效率, 后

表 3 微生物异源合成脱落酸的研究进展

Table 3 Research progress of microbial heterologous synthesis of abscisic acid

Chassis cell	Engineering means	Yield (mg/L)	Fermentation time (h)	References
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Introduction of heterologous (<i>Botrytis cinerea</i>) ABA synthesis pathway</li> <li>·Add <i>BcABA1</i>/<i>ABA3</i>/<i>ABA4</i> copy</li> <li>·Add <i>ERG20</i>, <i>POS5</i> copy</li> <li>·Expression of exogenous ABA transporter <i>AtDTX50</i></li> </ul>	263.5	72	[48]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Introduction of heterologous (<i>Botrytis cinerea</i>) ABA synthesis pathway</li> <li>·Knock out the competitive pathways <i>LPP1</i>/<i>DPP1</i>/<i>ERG9</i></li> <li>·Overexpression of <i>tHMG1</i>, <i>ERG20</i></li> <li>·Add <i>BcABA1</i>/<i>BcABA2</i> copy</li> <li>·Introduction of heterologous cytochrome P450 reductase</li> </ul>	11.0	48	[52]
<i>Aspergillus oryzae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Introduction of heterologous (<i>Botrytis cinerea</i>) ABA synthesis pathway</li> </ul>	8.0	–	[15]

– indicates that relevant data are not disclosed in the literature.

经宿主、表达载体的适配和核糖体结合位点 (ribosome binding site, RBS) 序列优化使紫黄质的产量达 231  $\mu\text{g/g}$  DCW。ABA 间接途径的异源合成未能实现紫黄质下游产物合成的瓶颈可能是：异源代谢途径长度的增加将会产生更多的碳分流，需要不断地累积增加前体供应，维持长途径碳流的供给； $\text{C}_{40}$  间接途径发掘于高等植物，大部分酶位于叶绿体中表达，而微生物宿主缺乏此种细胞器，酶在异源表达过程中可能存在一定限制，需进一步优化。

### 3.2 异源合成脱落酸的工程化策略

在发现 ABA 生物合成途径的基因后，研究者们已采取多种方法构建、优化异源合成 ABA 的微生物菌株以提高 ABA 的产量，相关工程化策略如图 3 所示。这些研究除提高 ABA 的产量外，还揭示了在微生物中异源合成 ABA 的限制性因素。

#### 3.2.1 关键酶的筛选与表达强化

近年来，灰葡萄尾孢菌中的 ABA 生物合成途径被挖掘，ABA 合成基因簇的功能逐渐被确定，*BcABA1* 和 *BcABA2* 已被 Siewers 等<sup>[29,35]</sup> 证明是 ABA 生物合成必不可少的 P450 单加氧

酶。Otto 等<sup>[52]</sup> 通过过表达 ABA 合成基因簇基因来测试灰葡萄尾孢菌的 ABA 基因簇中是否有至少一种酶的活性限制 ABA 的产生，结果表明过表达 *BcABA1*、*BcABA2*、*BcABA3* 均不同程度提高了 ABA 的产量，尤其是 *BcABA1* 的过表达；通过进一步比较中间副产物的积累，发现 ABA 的产生主要受 *BcABA1* 活性的限制，同时较高的 *BcABA2* 活性可以避免 *BcABA1* 下游副产物的积累，这可能会增加 ABA 途径的代谢通量。基于这些结果，Otto 等<sup>[52]</sup> 同时过表达 *BcABA1* 和 *BcABA2* 使 ABA 产量增加了 4.1 倍。Arnesen 等<sup>[48]</sup> 研究在解脂耶氏酵母中过表达 ABA 生物合成途径基因 *BcABA1*、*BcABA2*、*BcABA3*、*BcABA4* 对 ABA 产量的影响，发现只有过表达 *BcABA1* 的菌株 ABA 的产量增加了 2.8 倍。这些结果证明了 *BcABA1* 和 *BcABA2* 的活性是菌株异源合成 ABA 的瓶颈，额外的基因拷贝可以增加 ABA 的合成通量。

在 ABA 的间接合成途径中，催化玉米黄质合成紫黄质的 ZEP 是途径关键酶之一。Cataldo 等<sup>[49]</sup> 在合成  $\beta$ -胡萝卜素的酿酒酵母产生菌 SM14 中共表达泛菌 (*Pantoea ananatis*) 来源的



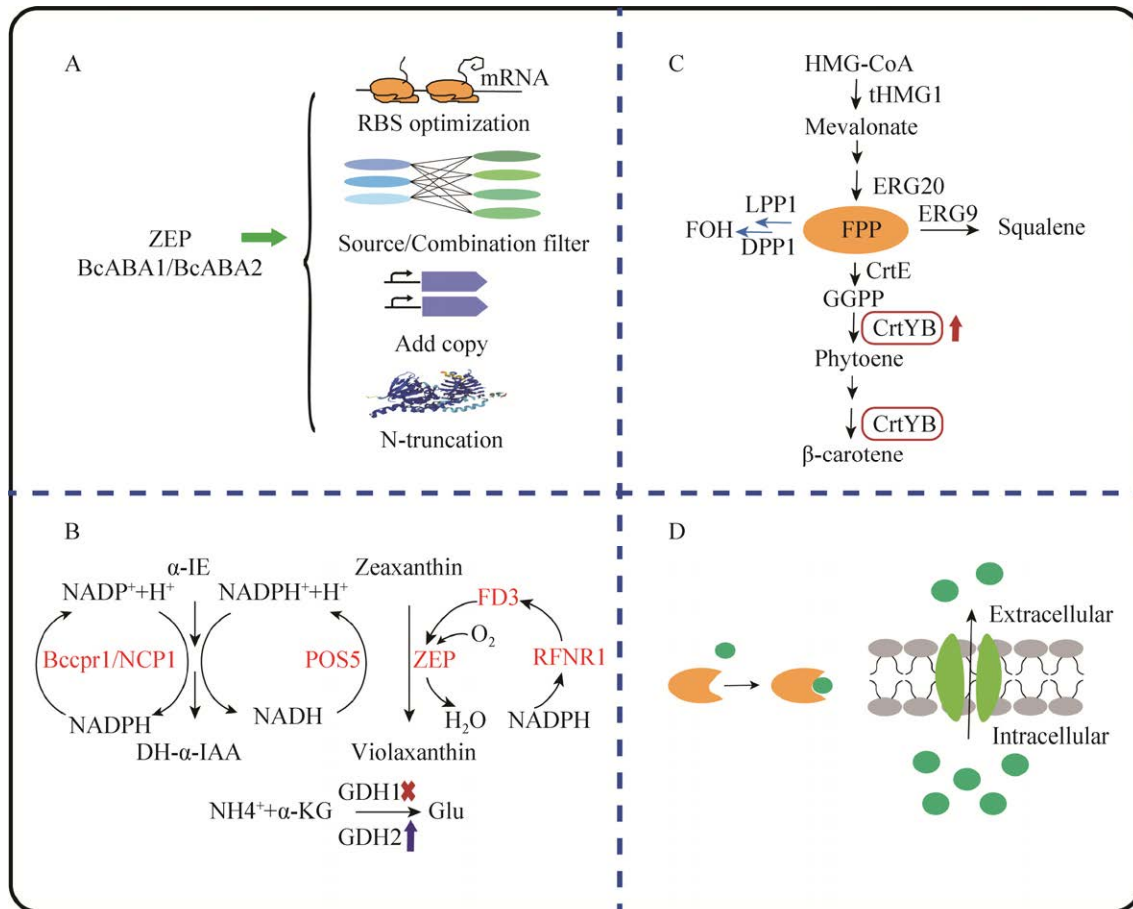


图3 异源合成脱落酸的工程化策略 A: 关键酶的筛选与表达强化策略. B: 辅因子调节策略. C: 增强前体供应策略. D: 促进脱落酸外排策略

Figure 3 Engineering strategy for heterologous synthesis of abscisic acid. A: Screening and expression enhancement strategy of key enzymes. B: Cofactor regulation strategy. C: Enhanced precursor supply strategy. D: Strategies to promote abscisic acid efflux.

*PaCrtZ* 和湖泊红球藻(*Haematococcus lacustris*) 来源的 *HIZEP* 实现了紫黄质的合成; 为继续提高紫黄质的产量, 作者预测了全长 ZEP 酶的结构和转运肽位置, *HIZEP* 在 N 端截短 30 个或 59 个氨基酸时, 紫黄质产量提高了 4 倍, 该结果揭示了植物源的酶在微生物表达可能需要截掉信号肽和定位序列促使蛋白异源表达的正确性。Takemura 等<sup>[53]</sup>在大肠杆菌中异源合成紫黄质时, 对大肠杆菌底盘细胞、表达载体和核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)序列进行了适配优化。结果表明, 在菌株 JM101(DE3)中,

用 pUC18 载体表达 *CaZEP* 且所使用的 RBS 为 RBS5000 时, 紫黄质产量最高(231  $\mu\text{g/g}$  DCW)。

### 3.2.2 辅因子的调节

在 ABA 生物合成的直接途径中, *BcABA1* 和 *BcABA2* 作为 P450 单加氧酶(cytochrome P450, CYP450), 需要 CPR 介导 NADPH 向 CYP450 传递电子, 电子传递给 CYP450 之后, CYP450 才能与底物发生氧化还原反应。研究者们尝试调节相关辅因子促进途径代谢, Arnesen 等<sup>[48]</sup>尝试过表达酵母内源的 NADH 激酶(NADH kinase POS5, POS5)以改善 NADPH 氧化还原辅因子的供应;

Otto 等<sup>[52]</sup>通过敲除 NADPH 依赖的氨同化谷氨酸脱氢酶(NADP-specific glutamate dehydrogenase 1, GDH1)和过表达 NADH 依赖的谷氨酸脱氢酶(NAD-specific glutamate dehydrogenase, GDH2)增加 NADPH 的供应,并导入异源 *Bccpr1* 和过表达酿酒酵母内源 CPR (NCP1)测试对 ABA 产量的影响。结果发现,只有异源 *Bccpr1* 的表达以及酵母内源 NCP1 的过表达使 ABA 的产量增加了 3.5 倍,体现了 CPR 过表达的重要性,增加通向 CYP450 的电子。但 NCP1 的过表达导致菌株的生长受限, $OD_{600}$  下降 30%,可能对细胞产生一定毒性。

在 ABA 生物合成的间接途径中,ZEP 是一个黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)、NAD(P)H、 $O_2$  依赖性双功能单加氧酶<sup>[54]</sup>。异源表达的 ZEP 从酵母内源代谢中获得所需的还原当量较少,电子转移到 ZEP 是有限的。因此,为了提高紫黄质的产量,Cataldo 等<sup>[49]</sup>在表达 *tr59-HIZEP* 的紫黄质合成菌株中共表达 FNR 和 FD。引入来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)来源的氧化还原伙伴铁氧还蛋白-NADP 还原酶(ferredoxin-NADP reductase, RFNR1)和铁氧还蛋白(ferredoxin-3, FD3)使紫黄质的含量增加了 47%;进一步截短铁氧还蛋白(RFNR1/tr-FD3)或同时截断铁氧还蛋白和铁氧还蛋白-NADP 还原酶(tr-RFNR1/tr-FD3),紫黄质的积累增加了 2.2 倍。可见,酿酒酵母适合 FNR/FD/ZEP 系统的表达。

### 3.2.3 增强前体供应

随着生物技术的不断发展,利用基因工程手段改造菌株减少副产物的积累、提高前体物质的供给从而提高目标产物的产量成为了研究热点。萜类化合物发酵过程中副产物法尼醇、角鲨烯等相关合成基因的敲除、MVA 途径基因的过表达成为了研究者们普遍选择的改造策

略。目前,紫黄质的合成已在酿酒酵母中实现,而  $\beta$ -胡萝卜素是紫黄质合成的关键中间体。Cataldo 等<sup>[49]</sup>尝试过表达香叶基香叶基二磷酸合酶(geranylgeranyl diphosphate synthase, CrtE)、八氢番茄红素去饱和酶(phytoene desaturase, CrtI)和双功能番茄红素环化酶/八氢番茄红素合酶(bifunctional lycopene cyclase/phytoene synthase, CrtYB)来增加  $\beta$ -胡萝卜素合成途径通量,发现只有增加 CrtYB 的拷贝数使类胡萝卜素总量显著增加(从 9.1 mg/g DCW 增加至 12.3 mg/g DCW),为紫黄质的产生提供了更多前体物质,同时也为微生物生产  $C_{40}$  途径中其他有价值的环氧类胡萝卜素以及 ABA 提供了一定的参考价值。

### 3.2.4 促进脱落酸外排

拟南芥 ABC 转运蛋白 G 亚家族(ABC transporter G family, ABCG)是拟南芥中最大的转运蛋白亚家族<sup>[55]</sup>。Kuromori 等<sup>[56]</sup>通过融合荧光蛋白方式发现 *AtABCG25* 在植物细胞中定位于细胞质膜,后经囊泡转运实验及过表达 *AtABCG25* 证明了 *AtABCG25* 是 ABA 的输出蛋白,并参与形成细胞间 ABA 信号通路。ABA 转运蛋白的第二大家族是神经肽 F (neuropeptide F, NPF) (NRT1/PTR)家族。Kanno 等<sup>[57]</sup>利用改良的酵母双杂交系统以及异源转运分析,表明了 AIT1/NRT1.2 是参与 ABA 输入的蛋白。2014 年,Zhang 等<sup>[58]</sup>在大肠杆菌和非洲爪蟾卵母细胞中异源表达 *AtDTX50* (detoxification 50, DTX50),证明了拟南芥中 DTX/Mate (multidrug and toxic extrusion transporter, Mate)家族成员 *AtDTX50* 作为 ABA 输出蛋白的功能。

在异源合成 ABA 的菌株中,Otto 等<sup>[52]</sup>发现采用上清萃取法(乙酸乙酯-甲酸)处理 ABA 发酵样品可以回收 93%的 ABA,表明 ABA 可以通过细胞膜运输转运至胞外。于是,Arnesen 等<sup>[48]</sup>为工程菌提供额外的 ABA 植物转运蛋白

测试是否可以进一步强化 ABA 的分泌,从而缓解细胞压力。作者表达了来自拟南芥的两个转运蛋白 *AtDTX50p* 和 *AtABCG25p*。然而,与原始菌株相比,异源转运蛋白的表达并没有对菌株产生正向影响。这表明在目前的产量水平下,天然酵母转运蛋白足以输出大部分的 ABA。

## 4 总结与展望

ABA 应用广泛且市场需求逐渐增大,促使关于 ABA 合成的研究也越来越深入。由于植物提取中 ABA 含量较低、资源消耗过大,微生物发酵生产 ABA 起步较晚、生产成本很高等问题,在较长时间里化学合成是获得 ABA 的主要工业方法。近年来,随着 ABA 合成物种(主要是植物和真菌)基因组和转录组数据的挖掘<sup>[26,59-60]</sup>,完整的 ABA 生物合成途径逐渐被阐明,一些 ABA 生物合成基因也已通过体内或体外测定被鉴定出来。利用合成生物学在微生物中人工构建高价值天然产物的生物合成途径将会是一种更便捷、更经济的生产方式。在 ABA 的异源合成方面,已有研究者在解脂耶氏酵母<sup>[48]</sup>和酿酒酵母<sup>[52]</sup>中构建了异源代谢通路实现了 ABA 的合成。与此同时,如何提高工业平台菌株的生产力,成为 ABA 实现产业化首先要解决的问题。

一些新技术和方法可用于改造微生物菌株以提高 ABA 产量,例如:(1) 利用高通量筛选技术选育出优良菌株<sup>[61]</sup>;(2) 利用细菌微区室(bacterial microcompartments, BMCs)技术在不影响细胞代谢的基础上高效合成 ABA<sup>[62]</sup>;(3) 在充分了解 ABA 生物合成和副产物积累的基础上,利用全局转录调控以及辅因子调控,进一步提高 ABA 产量<sup>[63]</sup>;(4) 对限制性酶进行理性设计或非理性设计,提高酶活;(5) 利用基因组再造以及诱导重排,提高底盘细胞的稳定

性和可操作性等。

综上所述,合成生物学技术的不断进步,为 ABA 生物合成和代谢工程的进一步研究提供了新思路。ABA 工业化的生产不仅将带来巨大的经济利益,还会对农业和医药行业产生有益影响。

## REFERENCES

- [1] KARL D. The discovery of abscisic acid: a retrospect[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34(4): 795-808.
- [2] SAH SK, REDDY KR, LI JX. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 571.
- [3] 项洪涛,李琬,何宁,王雪扬,曹大为,曹良子,唐晓东,李一丹. 外源脱落酸(ABA)调节植物抗旱机制的研究进展[J/OL]. *东北农业科学*, 2022, 47(5): 37-41.  
XIANG HT, LI W, HE N, WANG XY, CAO DW, CAO LZ, TANG XD, LI YD. Research progress on exogenous abscisic acid (ABA) regulating plant drought resistance[J/OL]. *Journal of Northeast Agricultural Sciences*, 2022, 47(5): 37-41 (in Chinese).
- [4] AHANGER MA, SIDDIQUE KHM, AHMAD P. Understanding drought tolerance in plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 172(2): 286-288.
- [5] GÓMEZ-CADENAS A, ARBONA V, JACAS J, PRIMO-MILLO E, TALON M. Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in *Citrus* plants[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2002, 21(3): 234-240.
- [6] ZHANG Q, LIU YL, HE CC, ZHU SJ. Postharvest exogenous application of abscisic acid reduces internal browning in pineapple[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(22): 5313-5320.
- [7] CHEN TT, LI GY, ISLAM MR, FU WM, FENG BH, TAO LX, FU GF. Abscisic acid synergizes with sucrose to enhance grain yield and quality of rice by improving the source-sink relationship[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 525.
- [8] BOOZ V, CHRISTIANSEN CB, KUHRE RE, SALTIEL MY, SOCIALI G, SCHALTENBERG N, FISCHER AW, HEEREN J, ZOCCHI E, HOLST JJ, BRUZZONE S. Abscisic acid stimulates the release of insulin and of GLP-1 in the rat perfused pancreas and intestine[J]. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2019, 35(2): e3102.
- [9] GURI AJ, HONTECILLAS R, BASSAGANYA-

- RIERA J. Abscisic acid ameliorates experimental IBD by downregulating cellular adhesion molecule expression and suppressing immune cell infiltration[J]. *Clinical Nutrition*, 2010, 29(6): 824-831.
- [10] GLENNON EKK, ADAMS LG, HICKS DR, DEHESH K, LUCKHART S. Supplementation with abscisic acid reduces malaria disease severity and parasite transmission[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2016, 94(6): 1266-1275.
- [11] DARMA R, LUTZ A, ELLIOTT CE, IDNURM A. Identification of a gene cluster for the synthesis of the plant hormone abscisic acid in the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2019, 130: 62-71.
- [12] PAN W, LU Q, XU QR, ZHANG RR, LI HY, YANG YH, LIU HJ, DU ST. Abscisic acid-generating bacteria can reduce Cd concentration in pakchoi grown in Cd-contaminated soil[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 177: 100-107.
- [13] NAGAMUNE K, HICKS LM, FUX B, BROSSIER F, CHINI EN, SIBLEY LD. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*[J]. *Nature*, 2008, 451(7175): 207-210.
- [14] 万小荣, 李玲. 高等植物脱落酸生物合成途径及其酶调控[J]. *植物学通报*, 2004, 21(3): 352-359.
- WAN XR, LI L. Pathways and related enzymes of ABA biosynthesis in higher plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2004, 21(3): 352-359 (in Chinese).
- [15] INOMATA M, HIRAI N, YOSHIDA R, OHIGASHI H. The biosynthetic pathway to abscisic acid via ionylideneethane in the fungus *Botrytis cinerea*[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(19): 2667-2678.
- [16] FINKELSTEIN R. Abscisic acid synthesis and response[J]. *The Arabidopsis Book*, 2013, 11: e0166.
- [17] 杨秋玲, 季静, 王罡, 关春峰. 类胡萝卜素合成途径终产物脱落酸的合成调控与生物学效应[J]. *天津农业科学*, 2011, 17(5): 24-27.
- YANG QL, JI J, WANG G, GUAN CF. Regulation and biological effects of end-product abscisic acid of carotenoid biosynthetic pathway[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2011, 17(5): 24-27 (in Chinese).
- [18] HIEBER AD, BUGOS RC, YAMAMOTO HY. Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000, 1482(1/2): 84-91.
- [19] SIMIONATO D, BASSO S, ZAFFAGNINI M, LANA T, MARZOTTO F, TROST P, MOROSINOTTO T. Protein redox regulation in the thylakoid lumen: the importance of disulfide bonds for violaxanthin de-epoxidase[J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(8): 919-923.
- [20] NEUMAN H, GALPAZ N, CUNNINGHAM FX Jr, ZAMIR D, HIRSCHBERG J. The tomato mutation *nxdl* reveals a gene necessary for neoxanthin biosynthesis and demonstrates that violaxanthin is a sufficient precursor for abscisic acid biosynthesis[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2014, 78(1): 80-93.
- [21] NURBEKOVA Z, SRIVASTAVA S, STANDING D, KURMANBAYEVA A, BEKTUROVA A, SOLTABAYEVA A, OSHANOVA D, TURECKOVA V, STRAND M, BISWAS MS, MANO J, SAGI M. *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3, known to oxidize abscisic aldehyde to abscisic acid, protects leaves from aldehyde toxicity[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2021, 108(5): 1439-1455.
- [22] GONZÁLEZ-GUZMÁN M, APOSTOLOVA N, BELLÉS JM, BARRERO JM, PIQUERAS P, PONCE MR, MICOL JL, SERRANO R, RODRÍGUEZ PL. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(8): 1833-1846.
- [23] WU J, KAMANGA BM, ZHANG WY, XU YH, XU L. Research progress of aldehyde oxidases in plants[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13119.
- [24] YAMAMOTO H, INOMATA M, TSUCHIYA S, NAKAMURA M, ORITANI T. Metabolism of chiral ionylideneacetic acids on the abscisic acid biosynthetic pathway in *Cercospora*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64(12): 2644-2650.
- [25] 莫才清, 周俊初. 真菌中脱落酸的代谢及定量分析技术[J]. *氨基酸和生物资源*, 1996, 18(1): 44-48.
- MO CQ, ZHOU JC. Metabolism of abscisic acid in fungi and its quantitative analysis methods[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 1996, 18(1): 44-48 (in Chinese).
- [26] TAKINO J, KOZAKI T, SATO Y, LIU CW, OZAKI T, MINAMI A, OIKAWA H. Unveiling biosynthesis of the phytohormone abscisic acid in fungi: unprecedented mechanism of core scaffold formation catalyzed by an unusual sesquiterpene synthase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(39): 12392-12395.
- [27] TAKINO J, KOZAKI T, OZAKI T, LIU CW, MINAMI A, OIKAWA H. Elucidation of biosynthetic pathway of a plant hormone abscisic acid in phytopathogenic fungi[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019, 83(9): 1642-1649.
- [28] INOMATA M, HIRAI N, YOSHIDA R, OHIGASHI H. Biosynthesis of abscisic acid by the direct pathway via

- ionylideneethane in a fungus, *Cercospora cruenta*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(12): 2571-2580.
- [29] SIEWERS V, SMEDSGAARD J, TUDZYNSKI P. The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 3868-3876.
- [30] COUSO I, CORDERO BF, VARGAS MÁ, RODRÍGUEZ H. Efficient heterologous transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* npq2 mutant with the zeaxanthin epoxidase gene isolated and characterized from *Chlorella zofingiensis*[J]. *Marine Drugs*, 2012, 10(9): 1955-1976.
- [31] EILERS U, DIETZEL L, BREITENBACH J, BÜCHEL C, SANDMANN G. Identification of genes coding for functional zeaxanthin epoxidases in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2016, 192: 64-70.
- [32] CHERNYS JT, ZEEVAART JAD. Characterization of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(1): 343-354.
- [33] HU B, HONG L, LIU X, LI L, LUO GY. Comparative study of the tissue-specific distribution of ABA from *Arachis hypogaea* L. and expression of the 9-*cis* epoxycarotenoid dioxygenase 1 (AhNCED1) during plant development[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2012, 26(5): 3201-3205.
- [34] GAN ZY, SHAN N, FEI LY, WAN CP, CHEN JY. Isolation of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene from kiwifruit and its effects on postharvest softening and ripening[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 261: 109020.
- [35] SIEWERS V, KOKKELINK L, SMEDSGAARD J, TUDZYNSKI P. Identification of an abscisic acid gene cluster in the grey mold *Botrytis cinerea*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 4619-4626.
- [36] PASTENES C, PIMENTEL P, LILLO J. Leaf movements and photoinhibition in relation to water stress in field-grown beans[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(411): 425-433.
- [37] YAMAMOTO HY, NAKAYAMA TOM, CHICHESTER CO. Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1962, 97(1): 168-173.
- [38] MARIN E, NUSSAUME L, QUESADA A, GONNEAU M, SOTTA B, HUGUENEY P, FREY A, MARION-POLL A. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(10): 2331-2342.
- [39] YAO YX, JIA L, CHENG Y, RUAN MY, YE QJ, WANG RQ, YAO ZP, ZHOU GZ, LIU J, YU JH, ZHANG P, YIN YH, DIAO WP, WAN HJ. Evolutionary origin of the carotenoid cleavage oxygenase family in plants and expression of pepper genes in response to abiotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 12: 792832.
- [40] DARUWALLA A, KISER PD. Structural and mechanistic aspects of carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs)[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomolecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(11): 158590.
- [41] TAN BC, SCHWARTZ SH, ZEEVAART JA, MCCARTY DR. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(22): 12235-12240.
- [42] QI KJ, WU X, XIE ZH, SUN XJ, GU C, TAO ST, ZHANG SL. Seed coat removal in pear accelerates embryo germination by down-regulating key genes in ABA biosynthesis[J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2019, 94(6): 718-725.
- [43] LIANG JH, YANG LX, CHEN X, LI L, GUO DL, LI HH, ZHANG BY. Cloning and characterization of the promoter of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Arachis hypogaea* L.[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(9): 2103-2106.
- [44] HUANG Y, GUO YM, LIU YT, ZHANG F, WANG ZK, WANG HY, WANG F, LI DP, MAO DD, LUAN S, LIANG MZ, CHEN LB. 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase 3 regulates plant growth and enhances multi-abiotic stress tolerance in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 162.
- [45] DAMBEK M, EILERS U, BREITENBACH J, STEIGER S, BUCHEL C, SANDMANN G. Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(15): 5607-5612.
- [46] MAMAIEV D, ZVYAGILSKAYA R. *Yarrowia lipolytica*: a multitasking yeast species of ecological significance[J]. *FEMS Yeast Research*, 2021, 21(2): foab008.
- [47] 张金宏, 崔志勇, 祁庆生, 侯进. 解脂耶氏酵母表达调控工具的开发及天然产物合成的研究进展[J]. *生*

- 物工程学报, 2022, 38(2): 478-505.
- ZHANG JH, CUI ZY, QI QS, HOU J. The recent advances in developing gene editing and expression tools and the synthesis of natural products in *Yarrowia lipolytica*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 478-505 (in Chinese).
- [48] ARNESEN JA, JACOBSEN IH, DYKJÆR JD, RAGO D, KRISTENSEN M, KLITGAARD AK, RANDELOVIC M, MARTINEZ JL, BORODINA I. Production of abscisic acid in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. FEMS Yeast Research, 2022, 22(1): foac015.
- [49] CATALDO VF, ARENAS N, SALGADO V, CAMILO C, LBANEZ F, AGOSIN E. Heterologous production of the epoxy-carotenoid violaxanthin in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2020, 59: 53-63.
- [50] 谭红, 周金燕, 钟娟, 杨杰, 肖亮. 一种高效制备天然脱落酸的方法: CN102399827B[P]. 2013-06-05.
- TAN H, ZHOU JY, ZHONG J, YANG J, XIAO L. An efficient method for preparing natural abscisic acid: CN102399827B[P]. 2013-06-05 (in Chinese).
- [51] DING ZT, ZHANG Z, ZHONG J, LUO D, ZHOU JY, YANG J, XIAO L, SHU D, TAN H. Comparative transcriptome analysis between an evolved abscisic acid-overproducing mutant *Botrytis cinerea* TBC-A and its ancestral strain *Botrytis cinerea* TBC-6[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37487.
- [52] OTTO M, TEIXEIRA PG, VIZCAINO MI, DAVID F, SIEWERS V. Integration of a multi-step heterologous pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for the production of abscisic acid[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 205.
- [53] TAKEMURA M, KUBO A, HIGUCHI Y, MAOKA T, SAHARA T, YAOI K, OHDAN K, UMENO D, MISAWA N. Pathway engineering for efficient biosynthesis of violaxanthin in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(23): 9393-9399.
- [54] BÜCH K, STRANSKY H, HAGER A. FAD is a further essential cofactor of the NAD(P)H and O<sub>2</sub>-dependent zeaxanthin-epoxidase[J]. FEBS Letters, 1995, 376(1/2): 45-48.
- [55] VERRIER PJ, BIRD D, BURLA B, DASSA E, FORESTIER C, GEISLER M, KLEIN M, KOLUKISA OGLU U, LEE Y, MARTINOIA E, MURPHY A, REA PA, SAMUELS L, SCHULZ B, SPALDING EJ, YAZAKI K, THEODOULOU FL. Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(4): 151-159.
- [56] KUROMORI T, MIYAJI T, YABUUCHI H, SHIMIZU H, SUGIMOTO E, KAMIYA A, MORIYAMA Y, SHINOZAKI K. ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(5): 2361-2366.
- [57] KANNO Y, HANADA A, CHIBA Y, ICHIKAWA T, NAKAZAWA M, MATSUI M, KOSHIBA T, KAMIYA Y, SEO M. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(24): 9653-9658.
- [58] ZHANG HW, ZHU HF, PAN YJ, YU YX, LUAN S, LI LG. A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant, 2014, 7(10): 1522-1532.
- [59] YANG WL, LI N, FAN YX, DONG BY, SONG ZH, CAO HY, DU TT, LIU TY, QI M, NIU LL, MENG D, YANG Q, FU YJ. Transcriptome analysis reveals abscisic acid enhancing drought resistance by regulating genes related to flavonoid metabolism in pigeon pea[J]. Environmental and Experimental Botany, 2021, 191: 104627.
- [60] GOGOLEVA NE, NIKOLAICHIK YA, ISMAILOV TT, GORSHKOV VY, SAFRONOVA VI, BELIMOV AA, GOGOLEV Y. Complete genome sequence of the abscisic acid-utilizing strain *Novosphingobium* sp. P6W[J]. 3 Biotech, 2019, 9(3): 94.
- [61] 孙怡, 张腾, 吕波, 李春. 胞内生物传感器提高微生物细胞工厂的精细调控[J]. 化工学报, 2022, 73(2): 521-534.
- SUN Y, ZHANG T, LV B, LI C. Improvement for fine regulation of microbial cell factory by intracellular biosensors[J]. CIESC Journal, 2022, 73(2): 521-534 (in Chinese).
- [62] KIRST H, KERFELD CA. Bacterial microcompartments: catalysis-enhancing metabolic modules for next generation metabolic and biomedical engineering[J]. BMC Biology, 2019, 17(1): 79.
- [63] PATEL ZM, HUGHES TR. Global properties of regulatory sequences are predicted by transcription factor recognition mechanisms[J]. Genome Biology, 2021, 22(1): 285.

(本文责编 郝丽芳)