

· 合成生物技术 ·

酿酒酵母稳定整合位点鉴定及其在橘烯生物合成中的应用

陈东莹, 朱晁谊, 陈和锋, 周靖涛, 李爽*

华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

陈东莹, 朱晁谊, 陈和锋, 周靖涛, 李爽. 酿酒酵母稳定整合位点鉴定及其在橘烯生物合成中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1924-1934.

CHEN Dongying, ZHU Chaoyi, CHEN Hefeng, ZHOU Jingtao, LI Shuang. Stable integration sites in *Saccharomyces cerevisiae*: identification and application in the biosynthesis of valencene[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1924-1934.

摘要: 橘烯(valencene)是一种带有柑橘香气的高值倍半萜类化合物, 被广泛应用于食品、化妆品等行业, 以及工业合成圆柚酮。本研究在酿酒酵母基因组中鉴定到了 16 个位于基因间区(intergenic region, IGR)的基因组位点, 利用 CRISPR-Cas9 技术, 将 Ypet 表达盒整合到不同的基因组位点, 整合成功率高达 87.50%, 不同插入位点之间的表达差异达 1.91 倍。研究显示, 位置效应在基因表达中相对稳定, 基本不受启动子和报告基因变更的影响。之后筛选高效表达的元件组合 P_{TDH3} - T_{PRC1} , 在优选的整合位点迭代整合来自阿拉斯加黄扁柏(*Callitropsis nootkatensis*)橘烯合成酶(VSm), 橘烯产量提升至 254.67 mg/L。过表达多个拷贝的关键基因 *tHMG1-ERG20*, 橘烯的产量提高了 93.49%。所得工程菌株 L-13 在 3 L 发酵罐中进行 2 阶段补料分批发酵能够生产橘烯 9 530.18 mg/L, 相较出发菌株提高了近 100 倍, 展现了筛选出的基因组位点在橘烯生产优化过程中的潜力。

关键词: 酿酒酵母; 位点效应; CRISPR-Cas9; 橘烯; 生物合成

资助项目: 国家自然科学基金(22178131, 21878104); 国家重点研发计划(2018YFA0901504)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22178131, 21878104) and the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901504).

*Corresponding author. E-mail: shuangli@scut.edu.cn

Received: 2023-11-17; Accepted: 2024-02-23; Published online: 2024-04-02

Stable integration sites in *Saccharomyces cerevisiae*: identification and application in the biosynthesis of valencene

CHEN Dongying, ZHU Chaoyi, CHEN Hefeng, ZHOU Jingtao, LI Shuang*

School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

Abstract: Valencene, a high-value sesquiterpene with a citrus aroma, is widely employed in the food and cosmetic fields and the industrial synthesis of nootkatone. In this study, 16 genomic loci in the intergenic regions (IGRs) of *Saccharomyces cerevisiae* were identified. A Ypet expression cassette was successfully integrated into various genomic loci by CRISPR-Cas9, with an impressive integration success rate of 87.50% and exhibiting expression variations of up to 1.91-fold depending on the insertion site. The study demonstrates that the positional effect exhibits relative stability in gene expression, and is essentially unaffected by changes in promoters and reporter genes. Furthermore, a high-expression element combination, P_{TDH3} - T_{PRC1} , was selected. The iterative integration of the valencene synthase gene *VSm* from *Callitropsis nootkatensis* at the selected loci increased the valencene yield to 254.67 mg/L. Overexpression of key genes *tHMG1-ERG20* with multiple copies increased the valencene yield by 93.49%. The engineered strain L-13 achieved the valencene yield of 9 530.18 mg/L by two-stage fed-batch fermentation in a 3 L fermenter. This yield represents a nearly 100-fold increase compared with that of the starting strain, highlighting the significant potential of the screened genomic loci in optimizing valencene production.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; position effect; CRISPR-Cas9; valencene; biosynthesis

橘烯(valencene)是一种存在于柑橘属植物中的高附加值倍半萜类化合物,因其具有独特的天然柑橘类香气,被广泛应用于食品、化妆品等行业,也常被用作前体物质生产重要香料类倍半萜化合物——圆柚酮(nootkatone)^[1-2]。目前,橘烯生产主要是从柑橘精油中蒸馏提取,但植物中橘烯含量低(0.2%–0.6%,质量百分比),限制了其商业应用^[3]。随着合成生物学的迅猛发展,通过在微生物中设计并构建合理的代谢通路实现橘烯的合成,已经成为一种高效生产橘烯的有效策略。橘烯已经成功地在多种生物中进行了合成,例如集胞藻^[4]、谷氨酸棒状杆菌^[5]和球状红杆菌^[6]等微生物。酿酒酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*)因其清晰的代谢网络、便于基因工程操作以及是一种被广泛认可为安全的(generally recognized as safe, GRAS)微生物而成为优良的生物制造宿主^[7]。甲羟戊酸途径(mevalonate, MVA)是酿酒酵母合成萜烯类化合物的重要生物合成途径^[8],该途径以乙酰辅酶A为起点,通过关键酶催化产生倍半萜化合物的前体物质,即法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP),其中包括了关键酶,例如3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMG1)和法尼基焦磷酸合成酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS,由 *ERG20* 基因编码)。前体物质 FPP 能进

一步通过不同倍半萜合成酶的作用生成多种倍半萜类化合物。HMG1 的酶活性对于决定碳通量方向至关重要, 其 N 端截短产物 tHMG1 有效提高了酵母中萜类化合物的产量^[9]。通过改造 MVA 途径, 构建高效的微生物细胞工厂, 能够实现橘烯等高附加值倍半萜类化合物的生产。

构建微生物细胞工厂并实现多个基因的高效表达, 需要进行广泛的基因改造^[10]。例如, 重新建立酿酒酵母中阿玛碱的生物合成途径, 需要在不同基因组位点过表达 17 个关键基因^[11]。尽管质粒可以用于基因表达, 但其不稳定性可能导致细胞产生异质性, 从而影响大规模发酵生产的细胞性能^[12]。因此, 基因组整合被认为是替代方法之一, 其中首要任务是识别可以整合到基因组上的位点, 这些位点应该能够被破坏, 而不会对细胞的生理和代谢产生明显的影响。在酿酒酵母中, 通过表征来自 3 条染色体的 14 个基因组位点, 成功构建了吡啶类硫代葡萄糖苷生物合成途径^[13]。然而, 新陈代谢途径中基因之间的相互作用错综复杂, 若改造集

中在某些染色体上, 可能会带来代谢紊乱的现象。将多个外源基因导入宿主生物体是一个不断优化和迭代的过程, 在此过程中可能需要多轮基因重组和重新整合。因此, 为了提高酵母的基因组整合能力, 需要寻找更多合适的基因组位点。

本研究在酿酒酵母全基因组范围内鉴定并分析基因组位点, 深入研究这些位点的整合效率、基因表达水平以及表达稳定性。利用鉴定出的稳定基因组位点, 结合多种代谢调控策略, 包括表达元件筛选、迭代整合橘烯合成酶 *VSm* 表达基因, 以及调整限速酶基因的拷贝数等, 成功增强了酵母细胞工厂合成橘烯的能力, 经过筛选的整合位点可以被应用于建立酿酒酵母细胞工厂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株

本实验中所用质粒、整合位点信息和菌株见表 1、表 2 和表 3。

表 1 本研究所用质粒

Table 1 The plasmids used in this study

Plasmids name	Description	Source
p414	p414- P_{TEF2} - <i>Cas9</i> - T_{CYC1} , Cas9	Addgene
p426	p426- P_{SNR52} - <i>gRNA.CANI.Y-T_{SUP4}</i>	Addgene
YEplac181-CnVS	YEpl81 derived, P_{PDC1} - <i>VS-T_{SAG1}</i>	Lab store
YEpl81-tHMG1-ERG20	YEpl81 derived, P_{TEF1} - <i>tHMG1-T_{CYC1}</i> - P_{PDC1} - <i>ERG20-T_{SAG1}</i>	Lab store
YEpl81-URA3-TRP1	YEpl81 derived, P_{URA3} - <i>URA3-T_{URA3}</i> - P_{TRP1} - <i>TRP1-T_{TRP1}</i>	Lab store
p181-V1	YEpl81 derived, P_{ENO2} - <i>VSm-T_{LSC2T}</i>	This study
p181-V2	YEpl81 derived, P_{TDH3} - <i>VSm-T_{LSC2T}</i>	This study
p181-V3	YEpl81 derived, P_{TEF2} - <i>VSm-T_{ADH1}</i>	This study
p181-V4	YEpl81 derived, P_{TEF2} - <i>VSm-T_{PRC1}</i>	This study
p181-V5	YEpl81 derived, P_{TDH3} - <i>VSm-T_{PRC1}</i>	This study
p181-Ypet	YEpl81 derived, P_{TEF2} - <i>Ypet-T_{BNA4}</i>	This study
p181-GUS	YEpl81 derived, P_{TEF2} - <i>GUS-T_{BNA4}</i>	This study

表 2 本研究整合位点信息及对应的菌株信息

Table 2 The integrated sites and strains information used in this study

Integration sites	PAM sequences (20 bp+NGG) (5'→3')	Strains	Description
IGR I-1	GAAACTATAAGGAAAATACGAGG	P-IGR I-1	PK2, IGR I-1::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR I-2	CTCCCACTTATAATGCACCGAGG		
IGR I-3	ATAAATCTGTTGTCTTCCCGAGG	P-IGR I-3	PK2, IGR I-3::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR IV-4	TCAATTGGAAGAAATGACAGTGG	P-IGR IV-4	PK2, IGR IV-4::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR IV-5	GAGAACAAGAAATGCCAAGGTGG	P-IGR IV-5	PK2, IGR IV-5::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR V-6	GAGGAACAAATCCTTCCTCGCGG	P-IGR V-6	PK2, IGR V-6::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR VI-7	GGTCTGGAGAATGGACACCAGGG	P-IGR VI-7	PK2, IGR VI-7::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR VII-8	ATACTGAGCTACTTACTTGGGGG	P-IGR VII-8	PK2, IGR VII-8::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR VIII-9	TGGAATACTACTTCTCTGGGG	P-IGR VIII-9	PK2, IGR VIII-9::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR IX-10	AAGTGTGTGAACGAATTACGCGG	P-IGR IX-10	PK2, IGR IX-10::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR XII-11	ACAGTGAACAGTGAACAGTGGGG	P-IGR XII-11	PK2, IGR XII-11::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR XII-12	CAAAAACGACAATCTCCAGGCGG		
IGR XII-13	GTAGGCATCTAACTATGGAACGG	P-IGR XII-13	PK2, IGR XII-13::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR XIII-14	AATCGCCCACTCTAAATCAGCGG	P-IGR XIII-14	PK2, IGR XIII-14::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR XIV-15	AGACATTTACAAAGTAGACGGGG	P-IGR XIV-15	PK2, IGR XIV-15::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}
IGR XV-16	AGACTGCCCATATATCCACGG	P-IGR XV-16	PK2, IGR XV-16::P _{TEF2} -Ypet-T _{BNA4}

表 3 本研究所用菌株

Table 3 Strains used in this study

Strains	Description	Source
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F-φ80 lacZ ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	TaKaRa, 9057
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1Ca	MATa trp1-289 leu2-3 leu2-112 ura3-52 his3Δ1	ATCC [®] MYA-1108 [™]
PK2-12	PK2, <i>erg9</i> ::Δ220-176, <i>rox1</i> ::mut, <i>Leu</i> ::P _{PDC1} -VS-T _{SAG1}	Lab store
PK2-00	PK2-12, IGR XIII-14::P _{TEF2} -tHMG1-T _{CYC1}	This study
L-01	PK2-00, IGR VIII-9::P _{ENO2} -VSm-T _{LSC2T}	This study
L-02	PK2-00, IGR VIII-9::P _{TDH3} -VSm-T _{LSC2T}	This study
L-03	PK2-00, IGR VIII-9::P _{TEF2} -VSm-T _{CYC1}	This study
L-04	PK2-00, IGR VIII-9::P _{TEF2} -VSm-T _{PRC1}	This study
L-05	PK2-00, IGR VIII-9::P _{TDH3} -VSm-T _{PRC1}	This study
L-06	PK2-00, IGR VII-8::P _{TDH3} -VSm-T _{PRC1}	This study
L-07	L-06, IGR XI-11::P _{TDH3} -VSm-T _{PRC1}	This study
L-08	L-07, IGR XV-16::P _{TDH3} -VSm-T _{PRC1}	This study
L-09	L-08, IGR V-6::P _{TDH3} -VSm-T _{PRC1}	This study
L-10	L-09, IGR XII-13::P _{TDH3} -VSm-T _{PRC1}	This study
L-11	L-10, IGR IX-10::P _{TEF2} -tHMG1-T _{CYC1} -P _{PDC1} -ERG20-T _{SAG1}	This study
L-12	L-11, IGR IV-4::P _{TEF2} -tHMG1-T _{CYC1} -P _{PDC1} -ERG20-T _{SAG1}	This study
L-13	L-12, IGR I-1::P _{TEF2} -tHMG1-T _{CYC1} -P _{PDC1} -ERG20-T _{SAG1}	This study

1.1.2 主要试剂

本实验所用 2×PrimeSTAR Max Premix 购自 TaKaRa 公司；Tris-HCl pH 7.5 和 PBS 缓冲液购自生工生物工程(上海)股份有限公司；ClonExpress® MultiS 重组试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；PCR 产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒均购自 Magen 公司；*S. c.* EasyComp Transformation Kit 购自 Invitrogen 公司；溶壁酶、对硝基苯酚、对硝基酚-β-D-葡萄糖醛酸苷、橘烯标准品和 5-氟乳酸(5-fluorolactic acid, 5-FOA)均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.1.3 主要培养基与溶液

大肠杆菌培养用 LB 培养基，酿酒酵母用 YPD、SD/ΔUra、SD/ΔUra-ΔTrp、SD/5-FOA-ΔTrp Verduyn 培养基的配制见参考文献[2]。100 mmol/L 对硝基苯酚储存液、1 g/L 对硝基酚-β-D-葡萄糖醛酸苷储存液、0.4% NaOH 溶液的配制见参考文献[14]。

1.2 方法

1.2.1 不同表达载体的构建

以 YEplac181-CnVS 为模板^[2]，以引物对 VSm-F/VSm-R 扩增得到瓦伦西亚烯合酶基因

(VSm from *Callitropsis nootkatensis*, JX040471)，纯化后利用同源重组与质粒骨架连接，转化至感受态细胞大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 中，构建相应表达载体。实验所需引物如表 4 所示。

以 p426 为模板，选取质粒上一段序列作为通用引物(tong-F/R)，以质粒上原有的 gRNA 靶序列前后的序列设计引物，并添加基因组位点的 gRNA 序列形成 20 bp 同源臂，通过同源重组获得各位点的 gRNA 表达质粒。

1.2.2 菌株的构建

重组菌株的构建均利用 CRISPR/Cas9 技术，以 IGR I-1 位点整合 Ypet 表达盒为例：以 p181-Ypet 为模板，以 Donor-IGR I-1-F/Donor-IGR I-1-R 为引物对，通过 PCR 获得两端带有 IGR I-1 位点同源臂的片段，纯化后获得供体 DNA 片段。利用 *S.c.* EasyComp Transformation Kit，按照说明书将 Cas9 蛋白表达质粒 p414、gRNA 表达质粒和供体 DNA 片段共同转化到 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1Ca^[2]，实现外源基因的敲入。通过菌落 PCR 扩增靶基因并对 PCR 产物测序，根据测序结果确定整合效率。

表 4 本研究所用引物

Table 4 Primers used in this study

Primer name	Sequences (5'→3')	Size (bp)
VSm-F	ATGGCTGAAATGTTCAACGGAAATA	25
VSm-R	TTAGGGAATAATCGGTTTCGACAAAG	25
tong-F	TAATAATGGTTTCTTAGTATGA	22
tong-R	ACTAAGAAACCATTATTATCAT	22
P _{ENO1} -VSm-F	<u>CACAAACACTAAAATCAAAA</u> ATGGCTGAAATGTTCAACGG	38
T _{PRC1} -VSm-R	<u>GCCTACACATACACGCTTTA</u> TTAGGGAATAATCGGTTTCGA	40
P _{TEF2} -VSm-F	<u>CGAACTATAATTAACAAAC</u> ATGGCTGAAATGTTCAACGG	40
T _{CYC1} -VSm-R	<u>TTACATGACTGCAGGTCGACT</u> TAGGGAATAATCGGTTTCGA	40
P _{TDH3} -VSm-F	<u>CATAAACAAACAAATCTAGA</u> ATGGCTGAAATGTTCAACGG	40
T _{LSC2} -VSm-R	<u>CTCTTTGTTTTTCTCGAGAT</u> TAGGGAATAATCGGTTTCGA	40
Donor-IGR I-1-F	<u>AAAGCGTACTTAAATTAGCAGCAAAAAAATTTTAAATAAC</u> AGACAGCGAGCCACCATTA	59
Donor-IGR I-1-R	<u>ATGTCTCAAAAATGAGAAACGGGGACTCTCATAATCAGTAGCCATTTTGATCCATTCT</u>	59

The complementary sequences are underlined.

1.2.3 荧光检测

将阳性转化子接入每孔含有 200 μL SD/ ΔUra - ΔTrp 培养基的 96 孔板中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 培养 24 h, 按照 1:200 转接至深孔板中, 同时以未做改造的 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1Ca 作为阴性对照, 500 μL SD/ ΔUra - ΔTrp 培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 培养 8 h。用酶标仪检测光密度(OD_{600})和 Ypet 荧光(激发波长: 517 nm; 吸收波长: 530 nm)来测量细胞生长和荧光强度。

1.2.4 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, GUS)酶活检测

细胞裂解: 将重组菌株转接至含有 10 mL YPD 的 50 mL 摇瓶中, 220 r/min、30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h; 3 000 $\times g$ 离心 5 min 收集菌体, 使用 Tris-HCl 洗涤 2 次; 将菌体重悬至 Tris-HCl 中, 控制 OD_{600} 在 0.6–0.7 之间; 在 96 孔板中加入 200 μL 细胞悬浮液, 加入 10 U/mL zymolyase, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 裂解 6 h, 获得细胞裂解液。**酶活测定:** 在 96 孔板中加入 80 μL 1 g/L 对硝基苯酚储液、90 μL PBS 和 10 μL 细胞裂解液; 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后, 加入 20 μL 0.4% NaOH 终止反应; 使用酶标仪测定 OD_{405} 。通过与梯度稀释的对硝基酚- β -D-葡萄糖醛酸苷标准品建立标准曲线, 计算样品中 GUS 的酶活性^[14]。

1.2.5 重组菌株的发酵

摇瓶发酵: 将重组菌株按初始 $OD_{600}=0.05$ 转接至含有 10 mL YPD 的 50 mL 摇瓶中, 覆盖 20% 正十二烷, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 48 h。

发酵罐发酵: 按 10% 接种量接种至 3 L 发酵罐, 覆盖 20% 正十二烷, 控制 pH 5.5、25 $^{\circ}\text{C}$ 、搅拌速度 400 r/min、气流速度 2 vvm。24 h 后以 4 mL/h 速度流加 500 g/L 葡萄糖, 待溶氧上升至 50% 时提升补糖速度至 20 mL/h。菌体密度达 $OD_{600}=200$ 时, 改为 30 mL/h 的乙醇流加补料, 通过溶氧-补料策略(dissolved oxygen-feed strategy, DO-STAT)控制补料速率。

1.2.6 橘烯的鉴定及产量检测

发酵结束后, 取正十二烷有机相 500 μL , 与等体积乙酸乙酯混合后振荡萃取 10 min, 14 000 r/min 离心 5 min, 取上层萃取液 800 μL 经 0.22 μm 有机滤膜过滤至色谱瓶中待气相检测。

GC-FID 检测: 用气相色谱仪对制备的样品及标样进行检测, 气相色谱柱为 Agilent HP-5 (30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm), 检测器为氢火焰检测器(flame ionization detector, FID); 载气为 N_2 。

检测方法: 1 μL 样品分流进样, 分流比 15:1; 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 检测器温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 柱温 100 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min, 再以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 200 $^{\circ}\text{C}$, 200 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min, 总时间为 20 min。

2 结果与分析

2.1 整合位点的筛选

本研究基于 *S. cerevisiae* 基因组序列, 对 16 条染色体的 IGR 进行了筛选。IGR 应当具备以下特征: (1) 远离着丝粒两端各 20 kb; (2) 远离端粒内侧 10 kb; (3) IGR 的长度大于 5 000 bp (以减少对转录元件如启动子和终止子的影响)。通过对 *S. cerevisiae* 的全基因组序列进行分析, 根据标准(1)–(3), 筛选出了 16 个候选 IGRs, 并对它们进行了详细的特征分析, 以确定它们是否适合作为外源 DNA 整合区域。此外, 还确认初步筛选的 IGR 与已有的研究数据之间没有重叠。利用网站 <http://chopchop.cbu.uib.no/> 筛选每个 IGR 赋分最高的 gRNA 序列作为整合位点^[15], 用于后续研究。

2.2 整合位点的特征

利用 CRISPR/Cas9 技术将 Ypet 表达盒(P_{TEF2} -Ypet- T_{BNA4})敲入到所选的整合位点。从图 1A 中可以看出, 除了 IGR I-1、IGR I-2、IGR IV5、IGR XII-12 之外, 其余位点均实现了

100.00%的整合效率(图 1A), 整合成功率高达 87.50%。通过对 14 株重组菌株进行荧光强度的测定, 结果显示, 所有菌株与对照菌株相比均表现出正常生长(图 1B), 这表明选择的整合位点未对细胞生长产生不良影响。在这些菌株中, 重组菌株 IGR VII-8 表达强度最高, IGR VI-7 表达强度最低, 重组菌株的相对荧光强度差异为 1.91 倍(图 1B), 这表明基因组结构或位置可能会对基因表达产生影响。

2.3 整合位点的特征位点效应的稳定性研究

本研究构建了一系列重组菌株, 包含不同强度的启动子和不同的报告基因, 旨在深入探究在酵母中调整启动子强度和更换报告基因对位点效应的影响。为研究这些因素对基因表达的影响, 选择了 IGR IV-4、IGR VI-7、IGR VII-8、IGR VIII-9 和 IGR XII-11 这 5 个位点进行探究, 这些位点具有不同的表达强度。首先探究了在相同的整合位点上, 改变启动子是否会对位点效应造成影响。当使用强启动子 PDC1 时, 位点之间的最大差异为 1.6 倍, 当更换为弱启动子 ADH2 后, 最大差异为 5.9 倍, 表明使用强启动子可以缩小位点之间的差异, 尽管差异倍数发生

了显著变化, 但位点之间的差异趋势保持不变(图 2A)。进一步评估了更换报告基因对位点效应的影响, 采用了相同表达元件来调控 *GUS* 基因。*GUS* 是一种理想的报告蛋白, 具有表达稳定、耐酸碱、活性高、表型可见和易检测的特点^[14]。将 *GUS* 表达载体分别整合至上述 5 个位点。结果表明, *GUS* 酶活与 *Ypet* 表达强度的积分呈正相关($R^2=0.84$) (图 2B), 不同报告基因对位置效应的影响较小, 表明位点效应具有较好的稳定性。

2.4 启动子、终止子组合优化与增加 *VSm* 拷贝数增强橘烯生产

在弱化角鲨烯合成酶 PK2-12^[3]基础上, 通过过表达 MVA 途径关键酶 tHMG1, 获得底盘菌株 PK2-00, 在该菌株的 IGR VIII-9 位点分别引入不同启动子和终止子组合的 *VSm* 表达盒。结果显示, P_{TDH3} -*VSm*- T_{PRC1} 表达盒(L-05)获得最高的橘烯产量, 达 79.22 mg/L。各表达盒产量顺序依次为 L-05>L-02>L-01>L-04>L-03。鉴于 P_{TDH3} -*VSm*- T_{PRC1} 组合表现最佳, 因此选择该组合元件用于后续研究。不同的启动子和终止子组合显著影响橘烯的产量, 且启动子调节作用强于终止子(图 3A)。

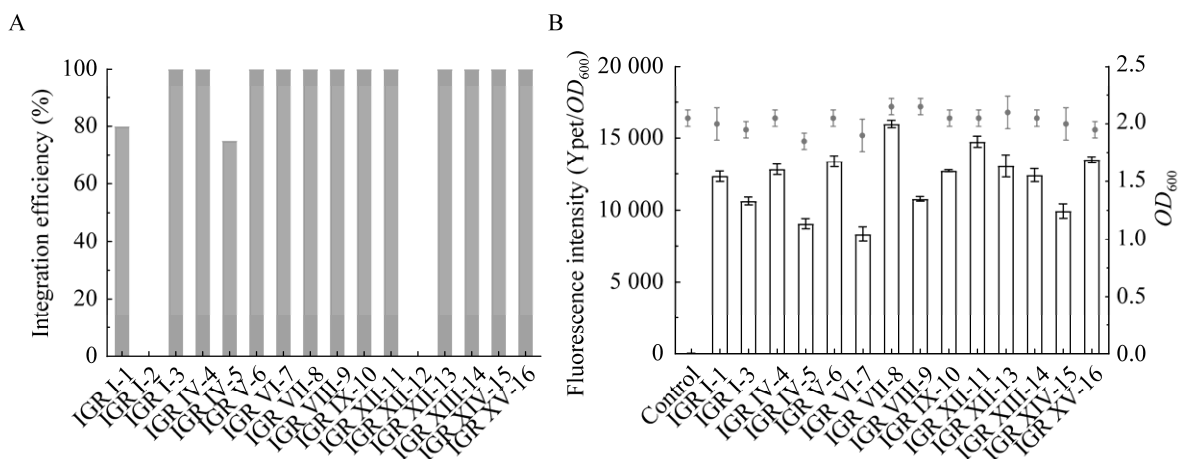


图 1 整合位点的特征分析

Figure 1 Analysis of characteristics of integration sites. A: Integration efficiency of integration sites. B: Impact of integration sites on the expression level of heterologous gene.

通过调节基因拷贝数来增加基因表达是提高目标代谢途径通量的有效方法^[7]。为了进一步提高橘烯产量,本研究在所筛选的基因组位点中,选择表达量较高且位于不同染色体的5个位点,分别是 IGR VII-8、IGR XI-11、IGR XV-16、IGR V-6 和 IGR XII-13 位点。通过调整这些位点上关键基因 *VSm* 的拷贝数,分别获得了5个工程菌株,分别命名为 L-06、L-07、L-08、L-09 和 L-10,其 *VSm* 的拷贝数分别为1、2、3、4、5。随着将 *VSm* 整合到宿主生物中的拷贝数逐渐增加,橘烯的产量也由 96.67 mg/L 逐渐增至 254.67 mg/L。然而,在将 *VSm* 整合到第5个拷贝时,观察到 L-10 相对于 L-09 的

产量并没有明显提高。产生此现象的原因之一可能是前体供应不足对橘烯产量产生了限制^[14]。

2.5 优化代谢途径提高细胞产量

为了提高橘烯的前体物质 FPP 的含量,采用增加 MVA 代谢途径中的关键基因 *tHMG1* 和 *ERG20* 的表达水平的策略。利用课题组前期构建的质粒 YEp181-tHMG1-ERG20,将 *tHMG1-ERG20* 表达盒分别整合到 IGR IX-10、IGR IV-4 和 IGR I-1 位点。经过缺陷培养基的筛选、PCR 检测以及测序验证,成功获得了3个工程菌株,它们分别是为 L-11、L-12 和 L-13。其中,L-13 表现出最高的橘烯产量,可达 492.77 mg/L (图4)。L-12 和 L-13 在橘烯产量方面没有明显的差异,

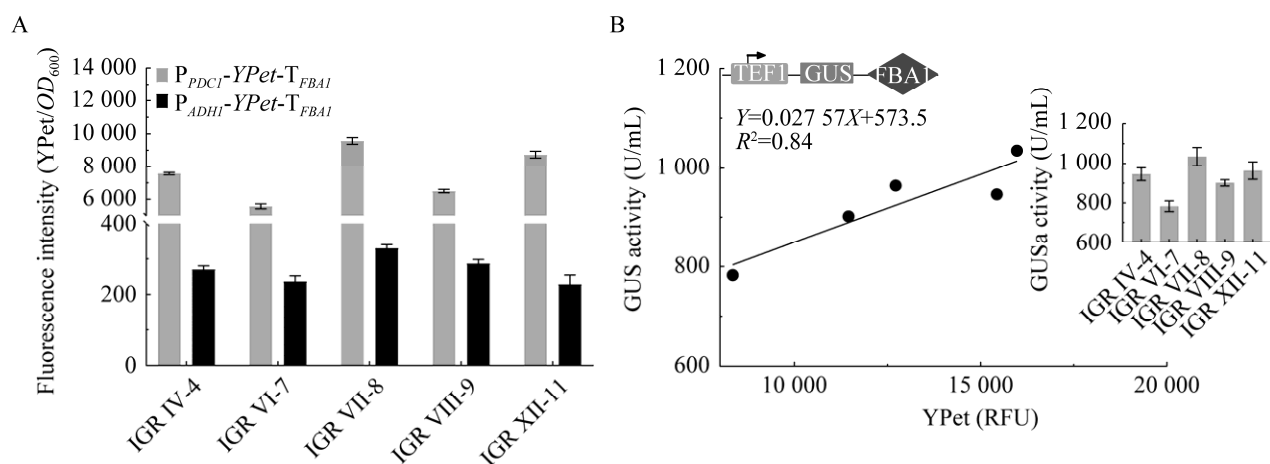


图2 启动子(A)和报告基因(B)对位点效应的影响

Figure 2 Influence of promoters and reporter genes on site effects. A: Impact of promoters on site effects. B: Impact of reporter genes on site effects.

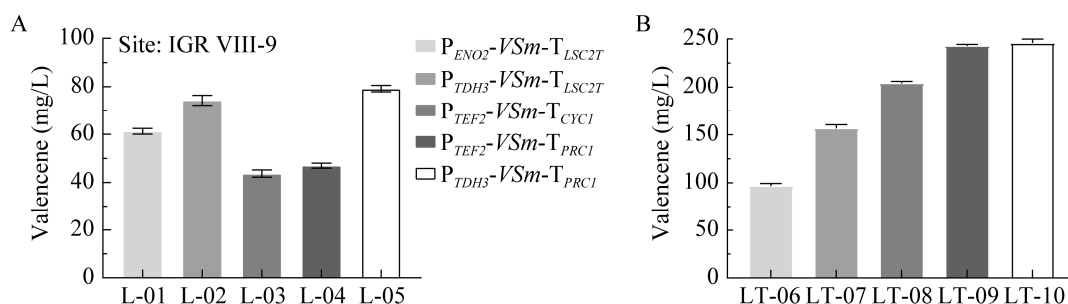


图3 橘烯生产优化策略

Figure 3 Optimization strategies for valencene production. A: Optimization of promoter and terminator combinations. B: Iterative integration of *VSm* genes.

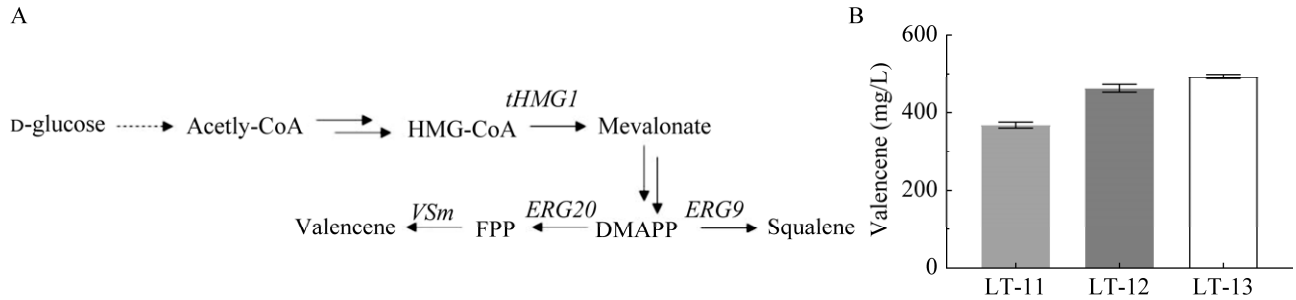


图4 调控 MVA 途径对重组菌合成橘烯的影响

Figure 4 The impact of regulating the MVA pathway on the recombinant strains for valencene synthesis. A: The biosynthesis pathway of valencene in yeast. HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; DMAPP: Dimethylallyl diphosphate; ERG: Farnesyl diphosphate synthase/dimethylallyltransferase. B: Valencene production by strains L-11, L-12 and L-13.

原因在于过量增加基因表达对细胞造成了负担^[16], 同时橘烯对酿酒酵母细胞产生了一定的毒性^[17]。

2.6 优化代谢途径提高细胞产量 3 L 罐发酵培养重组菌株生产橘烯

在整个发酵过程中, 橘烯的生产表现为与菌体生长偶联的模式, 橘烯的合成始终与菌体的生长保持相同的生长速率。在发酵的前 20 h, 菌体生长处于迟滞期, 菌体密度增长缓慢, 几乎所有的葡萄糖均被消耗, 伴随着酵母的生长和乙醇浓度的急剧增加, 产物橘烯的积累较少;

当菌体度过迟滞期后, 细胞开始进入快速生长阶段, 在大约 70 h 向发酵罐中添加乙醇时可以观察到橘烯积累速率明显增加, 根据酵母代谢碳源的途径不同, 乙醇的直接供给可能促进了胞质乙酰辅酶 A 向 MVA 途径的供给^[18]。最终在发酵 200 h 之后, 菌体生长浓度达到了 $OD_{600}=350$ 的高密度发酵状态^[2], 橘烯产量为 9 530.18 mg/L, 是出发菌株摇瓶发酵(96.67 mg/L)的近 100 倍(图 5A、5B)。本研究中橘烯的生物合成产量可达 g/L 的级别, 与传统的化学合成方法相比, 生物合成方法产量高, 具有显著的竞争优势。

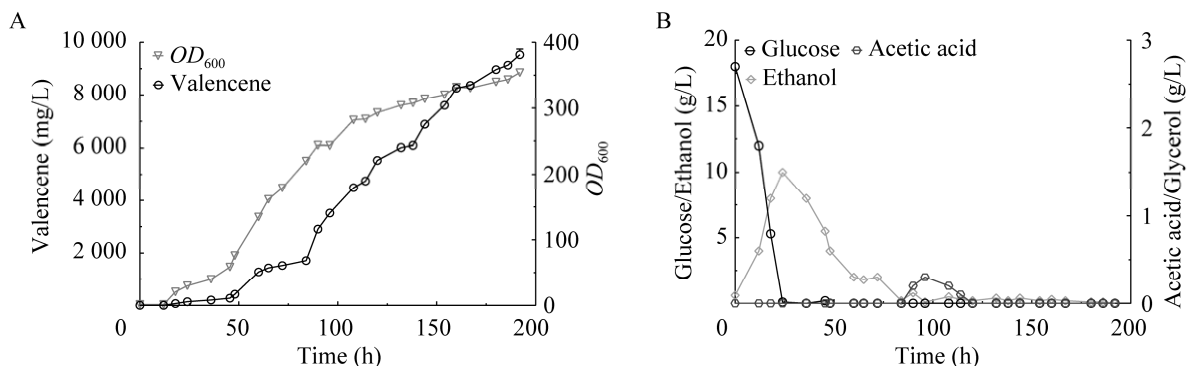


图5 3 L 发酵罐中 L-13 菌株的发酵和生产特征

Figure 5 L-13 strain fermentation and production profiles in a 3-liter bioreactor. A: Concentration curves of valencene and biomass during 0–200 h fermentation. B: Curves of glucose concentration, ethanol, and acetic acid during 0–200 h fermentation.

3 讨论与结论

酵母作为优良的外源基因表达平台, 研究其位点效应对于在基因层面优化外源基因表达至关重要^[19]。*S. cerevisiae* 基因组含有很多编码序列之间的 IGR, 该区域通常没有已知的功能, 因此可以作为容纳外源 DNA 序列的理想区域^[20]。本研究在 *S. cerevisiae* 的 IGR 中鉴定并表征了 16 个整合位点, 成功率为 87.50%, 未成功或整合率较低的位点可能是由于其 IGR 中存在未知重要的 DNA 序列, 整合干扰了细胞功能; 或者 IGR 染色质结构紧密影响了 Cas9 的结合^[21]。14 株重组菌株的 Ypet 相对荧光强度差异为 1.91 倍, 接近于先前研究中报道的优良基因组整合位点^[22]。而且筛选到的全部整合菌株生长状况正常。不同报告基因和表达盒整合验证结果表明, 各位点整合效率、蛋白表达具有较好稳定性。在合成生物学领域, 整合位点的稳定表达至关重要, 这种稳定性确保了目标产物合成的一致性和可预测性。尽管已有研究探究了酿酒酵母中位于不同染色体上的 8 个位点, 但缺乏有效的化合物产量方面的表征^[23]。因此, 本研究探索了鉴定出的整合位点在橘烯生物合成中的应用。在弱化角鲨烯合成酶 PK2-12^[3]基础上, 通过过表达 MVA 途径关键酶 tHMG1, 获得底盘菌株 PK2-00, 通过整合位点筛选获得橘烯产量最高的表达盒 P_{TDH3}-VSm-T_{PRC1}。P_{TDH3} 启动子, 作为一种广泛用于激活糖酵解基因的高活性启动子, 不仅表达水平高, 而且其活性在不同培养条件和时间下非常稳定^[22], 这为橘烯的高产提供了基础。随后, 利用整合位点迭代整合橘烯合成酶, 将橘烯的产量由 96.67 mg/L 逐渐增至 254.67 mg/L。进一步优化橘烯合成路径的前体通量, 过表达多个拷贝的 tHMG1-ERG20, 使橘烯产量提升至 492.77 mg/L。最后经高密度发酵橘烯产量达到 9 530.18 mg/L。

通过选择合适的整合位点并对橘烯合成途径进行优化, 成功构建了高效的橘烯生物合成系统。

本研究在 *S. cerevisiae* 基因中鉴定并表征了 16 个整合位点, 初步探究了位点效应的稳定性; 随后在这些位点中引入橘烯合成酶, 并结合代谢途径改造等策略最终获得了一株高产橘烯的酿酒酵母工程菌株, 对选择合适的整合位点来表达高价值化合物具有重要的参考意义。

REFERENCES

- [1] WITHERS ST, KEASLING JD. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(5): 980-990.
- [2] LIU T, LI W, CHEN HF, WU T, ZHU CY, ZHUO M, LI S. Systematic optimization of HPO-CPR to boost (+)-nootkatone synthesis in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(49): 15548-15559.
- [3] OUYANG XD, CHA YP, LI W, ZHU CY, ZHU MZ, LI S, ZHUO M, HUANG SB, LI JJ. Stepwise engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to produce (+)-valencene and its related sesquiterpenes[J]. RSC Advances, 2019, 9(52): 30171-30181.
- [4] DIETSCH M, BEHLE A, WESTHOFF P, AXMANN IM. Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for the photoproduction of the sesquiterpene valencene[J]. Metabolic Engineering Communications, 2021, 13: e00178.
- [5] FROHWITTER J, HEIDER SAE, PETERS-WENDISCH P, BEEKWILDER J, WENDISCH VF. Production of the sesquiterpene (+)-valencene by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 191: 205-213.
- [6] BEEKWILDER J, van HOUWELINGEN A, CANKAR K, van DIJK ADJ, de JONG RM, STOOPEN G, BOUWMEESTER H, ACHKAR J, SONKE T, BOSCH D. Valencene synthase from the heartwood of *Nootka cypress* (*Callitropsis nootkatensis*) for biotechnological production of valencene[J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, 12(2): 174-182.
- [7] SHI SB, LIANG YY, ZHANG MM, ANG EL, ZHAO HM. A highly efficient single-step, markerless strategy for multi-copy chromosomal integration of large

- biochemical pathways in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 33: 19-27.
- [8] BRÖKER JN, MÜLLER B, van DEENEN N, PRÜFER D, SCHULZE GRONOVER C. Upregulating the mevalonate pathway and repressing sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* enhances the production of triterpenes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(16): 6923-6934.
- [9] 孙玲, 王均华, 蒋玮, 李由然, 张梁, 丁重阳, 顾正华, 石贵阳, 徐沙. 高效合成番茄红素酿酒酵母菌株的构建[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(7): 1334-1345.
SUN L, WANG JH, JIANG W, LI YR, ZHANG L, DING CY, GU ZH, SHI GY, XU S. Construction of a highly efficient synthetic lycopene engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(7): 1334-1345 (in Chinese).
- [10] ROUX I, CHOOI YH. Cre/*lox*-mediated chromosomal integration of biosynthetic gene clusters for heterologous expression in *Aspergillus nidulans*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(3): 1186-1195.
- [11] LIU TF, GOU YW, ZHANG B, GAO R, DONG C, QI MM, JIANG LH, DING XW, LI C, LIAN JZ. Construction of ajmalicine and sanguinarine *de novo* biosynthetic pathways using stable integration sites in yeast[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(5): 1314-1326.
- [12] WANG ZK, GONG JS, QIN JF, LI H, LU ZM, SHI JS, XU ZH. Improving the intensity of integrated expression for microbial production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(11): 2796-2807.
- [13] MIKKELSEN MD, BURON LD, SALOMONSEN B, OLSEN CE, HANSEN BG, MORTENSEN UH, HALKIER BA. Microbial production of indolylglucosinolate through engineering of a multi-gene pathway in a versatile yeast expression platform[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(2): 104-111.
- [14] CHA YP, LI W, WU T, YOU X, CHEN HF, ZHU CY, ZHUO M, CHEN B, LI S. Probing the synergistic ratio of P450/CPR to improve (+)-nootkatone production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(3): 815-825.
- [15] LABUN K, MONTAGUE TG, KRAUSE M, TORRES CLEUREN YN, TJELDNE H, VALEN E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W171-W174.
- [16] AJIKUMAR PK, XIAO WH, TYO KEJ, WANG Y, SIMEON F, LEONARD E, MUCHA O, PHON TH, PFEIFER B, STEPHANOPOULOS G. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 70-74.
- [17] SERRA E, HIDALGO-BASTIDA L.A, VERRAN J, WILLIAMS D, MALIC S. Antifungal activity of commercial essential oils and biocides against *Candida albicans*[J]. *Pathogens*, 2018, 7(1): 15.
- [18] van de LAAR T, VISSER C, HOLSTER M, LÓPEZ CG, KREUNING D, SIERKSTRA L, LINDNER N, VERRIPS T. Increased heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol as sole carbon source[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96(3): 483-494.
- [19] WU XL, LI BZ, ZHANG WZ, SONG K, QI H, DAI JB, YUAN YJ. Genome-wide landscape of position effects on heterogeneous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 189.
- [20] KONG SJ, YU W, GAO N, ZHAI XX, ZHOU YJ. Expanding the neutral sites for integrated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2022, 369(1): fnac081.
- [21] CHEN YR, ZENG SY, HU RK, WANG XX, HUANG WL, LIU JF, WANG LY, LIU GF, CAO Y, ZHANG Y. Using local chromatin structure to improve CRISPR/Cas9 efficiency in zebrafish[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182528.
- [22] REIDER APEL A, D'ESPAUX L, WEHRS M, SACHS D, LI RA, TONG GJ, GARBER M, NNADI O, ZHUANG W, HILLSON NJ, KEASLING JD, MUKHOPADHYAY A. A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(1): 496-508.
- [23] BABAEI M, SARTORI L, KARPUKHIN A, ABASHKIN D, MATROSOVA E, BORODINA I. Expansion of EasyClone-MarkerFree toolkit for *Saccharomyces cerevisiae* genome with new integration sites[J]. *FEMS Yeast Research*, 2021, 21(4): foab027.

(本文责编 郝丽芳)