

创建酿酒酵母细胞工厂发酵生产芳香精油瓦伦烯

杨婷婷^{1,2,3}, 王冬^{2,3}, 李文豪^{1,2,3}, 石玉松^{2,3}, 李荣生^{2,3}, 马文建¹,
戴住波^{2,3*}, 张学礼^{2,3}

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308;
3. 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308)

摘要: 瓦伦烯是一种具有柑橘气味的倍半萜类化合物, 常被用于化妆品和食品添加剂, 以及工业合成诺卡酮。本研究拟用合成生物学技术创建酿酒酵母细胞工厂发酵生产瓦伦烯。首先, 在底盘细胞 YTT-T5 中引入北美金柏来源的瓦伦烯合酶 (CnVS), 成功获得可生产 $1.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 瓦伦烯的工程菌 VAL-01; 采用蛋白质融合技术, 不同植物来源的瓦伦烯合酶筛选, 并调整了关键基因拷贝数后, 瓦伦烯产量提升至 $436.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。进一步工作中, 删除转录因子 *ROX1*, 瓦伦烯的产量提高了 17.4%。最后, 对半乳糖诱导系统进行调控, 并过表达多药耐药性调控因子 *PDR3* 和调控内质网大小转录因子 *INO2*, 所得工程菌株 VAL-10 经高密度发酵能生产 $2\,798.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 瓦伦烯 (产量是初始菌株的 2 500 倍), 为瓦伦烯绿色生产提供了基础。

关键词: 合成生物学; 酿酒酵母; 倍半萜; 瓦伦烯

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1619-10

Construction of cell factories for production of valencene in *Saccharomyces cerevisiae*

YANG Ting-ting^{1,2,3}, WANG Dong^{2,3}, LI Wen-hao^{1,2,3}, SHI Yu-song^{2,3}, LI Rong-sheng^{2,3},
MA Wen-jian¹, DAI Zhu-bo^{2,3*}, ZHANG Xue-li^{2,3}

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; 3. Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: Valencene, a kind of sesquiterpenoid with a citrus flavor, is mainly found in *Valencia orange* and is commonly used in cosmetics and food additives, as well as industrial synthetic nootkatone. In this study, synthetic biology was used to create a *Saccharomyces cerevisiae* cell factory to produce valencene. Firstly, valencene synthase gene (*CnVS*) from *Callitropsis nootkatensis* was inserted into the chromosome of the chassis strain YTT-T5. The resulting strain VAL-01 could produce $1.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ valencene. Protein fusion technique was used, different valencene synthases were compared and the copy number of key genes was adjusted, yielding valencene to $436.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Then, knocking-out the transcription factor *ROX1* resulted in valencene improvement by 17.4%. Moreover, the induction system of galactose was regulated, transcription factor *PDR3* and *INO2* were overexpressed. The engineered strain VAL-10 could produce $2\,798.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ valencene by high cell density fermentation method (nearly 2 500 times higher than VAL-01). This study provides a basis for green production of valencene.

Key words: synthetic biology; *Saccharomyces cerevisiae*; sesquiterpenoid; valencene

收稿日期: 2022-12-21; 修回日期: 2023-01-18.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2020YFA0908000).

*通讯作者 E-mail: dai_zb@tib.cas.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1382

瓦伦烯 (valencene) 是一种具有柑橘气味的倍半萜类化合物, 主要存在于柑橘属植物中, 常被用作化妆品和食品的添加剂^[1,2], 以及工业上合成诺卡酮 (nootkatone)。诺卡酮具有约 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低气味阈值, 被广泛用于化妆品、食品、芳香治疗、驱蚊杀虫等领域^[3]。植物提取是瓦伦烯的主要来源, 但是植物来源的供给不稳定。同时, 经济高速增长带来物质需求增长, 仅从原植物中提取天然产物的方法无法满足市场需求^[4]。随着合成生物学的发展, 构建微生物细胞工厂实现天然产物的生物合成一直是合成生物学的研究热点^[5]。目前许多科学家已经在微生物中实现了多种高价值药效成分的生产, 例如青蒿素^[6]、大麻素^[7]、人参皂苷^[8-10]、山茛菪碱和东莨菪碱等^[4]。

酿酒酵母作为一种真核模式生物, 因其被普遍认为是安全的 (GRAS) 微生物, 是合成生物学技术产业中的一个重要平台微生物, 已经被广泛应用于玫瑰精油、榄香烯、番茄红素和 β -胡萝卜素等天然萜类化合物的发酵生产^[4-11]。酿酒酵母生产萜类化合物主要是通过甲羟戊酸途径 (MVA pathway), 即乙酰辅酶 A 经过 7 步酶促反应合成萜类化合物基本单元异戊烯基焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP)。在倍半萜化合物生物合成途径中, IPP 和 DMAPP 可在法尼基焦磷酸合成酶 (FPPS, *ERG20* 基因编码) 的作用下生成倍半萜化合物前体法尼基焦磷酸 (FPP), 它可在不同的倍半萜合成酶催化下生成瓦伦烯、榄香烯等倍半萜类化合物 (图 1)。

前期实验室已构建出过表达 MVA 途径相关基因的底盘菌 YTT-T5, 该菌株能够显著增加酿酒酵母合成萜类化合物的通量。本研究采用蛋白质融合、高效基因元件筛选、调整限速酶基因的拷贝数、半乳糖诱导系统改造和发酵工艺优化等策略来提高酵母细胞工厂合成瓦伦烯的能力, 最终产量达到 $2.8 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (提高近 2 500 倍), 为瓦伦烯等倍半萜化合物的生物合成奠定了基础。

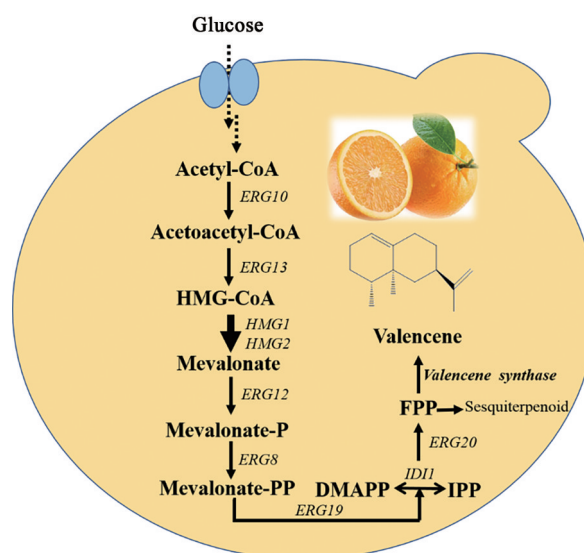


Figure 1 The biosynthesis pathway of valencene in yeast. HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; IPP: Isopentenyl-diphosphate; DMAPP: Dimethylallyl diphosphate; FPP: Farnesyl diphosphate; ERG10: Acetoacetyl-CoA thiolase; ERG13: HMG-CoA synthase; HMG1/HMG2: HMG-CoA reductase 1/2; ERG12: Mevalonate kinase; ERG8: Phosphomevalonate kinase; ERG 19: Mevalonate pyrophosphate decarboxylase; IDI1: Isopentenyl diphosphate isomerase 1; ERG20: FPP synthase

材料与方法

工具酶与试剂 PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶购自宝生物生物工程公司 (大连); 质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; DNA 回收试剂盒购自美国 Biomiga 公司; 酵母选择培养基购自北京泛基诺科技有限公司; 酵母 DNA 提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; 瓦伦烯标准品和 5-氟乳清酸 (5-FOA) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

质粒、菌株及引物 本研究所用的质粒和菌株信息见表 1。引物信息见表 2。

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Name	Description	Source
Plasmids		
pEASY-Blunt simple	Cloning vector for blunt ligation, <i>Amp</i> , <i>Km</i>	TransGen Biotech
p-P _{GAL7}	Cloning P _{GAL7} and T _{SPG5} into pEASY-Blunt simple	Lab collection
p-P _{GAL10}	Cloning P _{GAL10} and T _{CWP2} into pEASY-Blunt simple	Lab collection
p-P _{GAL1}	Cloning P _{GAL1} and T _{PRM9} into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM3-tHMG1	Cloning P _{TEF1} -tHMG1-T _{CYC1} cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
P _{GAL7} -cHMG2-T _{SPG5}	Cloning truncated HMG2 into p-P _{GAL7}	Lab collection
P _{GAL10} -HMGR-N-T _{CWP2}	Cloning HMGR-N into p-P _{GAL10}	Lab collection
P _{GAL1} -tHMG1-T _{PRM9}	Cloning tHMG1 into p-P _{GAL1}	Lab collection
P _{GAL10} -CnVS-T _{CWP2}	Cloning CnVS into p-P _{GAL10}	This study
P _{GAL10} -SmFPS-CsVal-T _{CWP2}	Cloning SmFPS-CsVal into p-P _{GAL10}	This study
P _{GAL10} -SmFPS-EgVal-T _{CWP2}	Cloning SmFPS-EgVal into p-P _{GAL10}	This study

Name	Description	Source
P_{GAL10} -SmFPS-CnVS-T _{CWP2}	Cloning <i>SmFPS-CnVS</i> into p- P_{GAL10}	This study
pRS425-LEU2-TRP1-URA3-TEF1p-ObGES	Cloning <i>LEU2</i> , <i>TRP1</i> , <i>URA3</i> makers and P_{TEF1} - <i>ObGES-T_{CYC1}</i> cassette into pRS425	Lab collection
NDT80-HIS3	Cloning <i>NDT80</i> and <i>HIS3</i> marker into pEASY-Blunt simple	Lab collection
P_{ACT3} -PDR3m-T _{PDR3}	Cloning P_{ACT3} - <i>PDR3^{Q763L}</i> -T _{PDR3} cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
P_{GAL1} -INO2-T _{PRM9}	Cloning <i>INO2</i> into p- P_{GAL1}	Lab collection
NDT80-gRNA	<i>NDT80</i> disruption gRNA cassette, 2 micron, <i>URA3</i> marker	Lab collection
LEU2-gRNA	<i>LEU2</i> disruption gRNA cassette, 2 micron, <i>URA3</i> marker	Lab collection
HIS3-gRNA	<i>HIS3</i> disruption gRNA cassette, 2 micron, <i>URA3</i> marker	Lab collection
HO-gRNA	<i>HO</i> disruption gRNA cassette, 2 micron, <i>URA3</i> marker	Lab collection
GAL80-gRNA	<i>GAL80</i> disruption gRNA cassette, 2 micron, <i>URA3</i> marker	Lab collection
ROX1-gRNA	<i>ROX1</i> disruption gRNA cassette, 2 micron, <i>URA3</i> marker	Lab collection
HXX2-gRNA	<i>HXX2</i> disruption gRNA cassette, 2 micron, <i>URA3</i> marker	Lab collection
Strains		
YTT-T5	A platform yeast for mono- and sesquiterpenoid production	Lab collection
VAL-01	P_{GAL10} - <i>CnVS-T_{CWP2}</i> and P_{GAL1} - <i>tHMG1-T_{PRM9}</i> cassettes were integrated into <i>NDT80</i> site of YTT-T5	This study
VAL-02	P_{GAL10} - <i>SmFPS-CnVS-T_{CWP2}</i> and P_{GAL1} - <i>tHMG1-T_{PRM9}</i> cassettes were integrated into <i>NDT80</i> site of YTT-T5	This study
VAL-03	P_{GAL10} - <i>SmFPS-CsVal-T_{CWP2}</i> and P_{GAL1} - <i>tHMG1-T_{PRM9}</i> cassettes were integrated into <i>NDT80</i> site of YTT-T5	This study
VAL-04	P_{GAL10} - <i>SmFPS-EgVal-T_{CWP2}</i> and P_{GAL1} - <i>tHMG1-T_{PRM9}</i> cassettes were integrated into <i>NDT80</i> site of YTT-T5	This study
VAL-05	P_{GAL10} - <i>SmFPS-CnVS-T_{CWP2}</i> and P_{GAL1} - <i>tHMG1-T_{PRM9}</i> cassettes were integrated into <i>LEU2</i> site of VAL-02	This study
VAL-06	P_{GAL10} - <i>SmFPS-CnVS-T_{CWP2}</i> and P_{GAL1} - <i>tHMG1-T_{PRM9}</i> cassettes were integrated into <i>HIS3</i> site of VAL-05	This study
VAL-07	P_{GAL10} - <i>SmFPS-CnVS-T_{CWP2}</i> and P_{GAL1} - <i>tHMG1-T_{PRM9}</i> cassettes were integrated into <i>HO</i> site of VAL-06	This study
VAL-08	<i>ROX1</i> was deleted in VAL-05	This study
VAL-09	<i>HXX2</i> was deleted in VAL-08 and subsequently P_{GAL4} - <i>GAL4-T_{GAL4}</i> cassette was integrated into <i>GAL80</i> site	This study
VAL-10	<i>LEU2</i> , <i>TRP1</i> , <i>URA3</i> , <i>HIS3</i> makers, P_{ACT3} - <i>PDR3m-T_{PDR3}</i> , P_{TEF1} - <i>tHMG1-T_{CYC1}</i> and P_{GAL1} - <i>INO2-T_{PRM9}</i> were integrated into <i>YPRCdelta15</i> site of VAL-09	This study

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5' to 3')
3G-1-M-GAL7p-CWP2t-R	CCCTTAGCTGCGATTAAAGAGTCAAGGCGTAAAAACATAGGCGAAAGTGGTGTACAGCGAATTTCCCTCAC
3G-2-M-GAL7p-CWP2t-F	GAACCTGTAAACAATTCGTTCCCTACATGTGAGGAAATTCGCTGTGACACCACTTTCGCCTATGTTTTTCACGC
GAL1p-R	TATAGTTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTAT
GAL1p-F	TTATATTGAATTTTCAAAAATCTTACTTTTTTTTTGGATGG
NDT80-50-CWP2t-F	TACTAACCTTTCATTAAGAGAAATAACAATATTATAAAAAGCGCTTAAACACTTTCGCCTATGTTTTTCACGC
NDT80-50-PRM9t-down	GATCCACAGAATTCGCATATTTTTTAACGATTTAAAATCATTAGTTTATTCAACATCGTATTTCCGAAGCG
LEU2-50-CWP2t-F	TTACATTTACAGCAATATATATATATATTTCAAGGATATACCATTCTACACTTTCGCCTATGTTTTTCACGC
LEU2-50-PRM9t-down	CGGTGGTACTGTGGAACCACCTAAATCACCAGTTCTGATACCTGCATCCTCAACATCGTATTTCCGAAGCG
HIS3-50-CWP2t-F	CTTCGAAGAATATACTAAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACGAAGCAAAGCACTTTCGCCTATGTTTTTCACGC
HIS3-50-PRM9t-down	TATACACATGTATATATATCGTATGCTGCAGCTTTAAATAATCGGTGTCATCAACATCGTATTTCCGAAGCG
HO-50-CWP2t-F	TCTAAATCCATATCCTCATAAGCAGCAATCAATTCTATCTATACTTTAAACACTTTCGCCTATGTTTTTCACGC
HO-50-PRM9t-down	ATTAATTTTACTTTTATTACATACAACCTTTTAAACTAATATACACATTTCAACATCGTATTTCCGAAGCG
GAL80-GAL4p-F	CCAGCGTATACAATCTCGATAGTTGGTTTCCCGTCTTTCCACTCCCCTGACAGCATTCCGCCAGTATTTTTTTATTC
GAL4t-GAL80-R	GTTTTTATAACGTTCTGCTGCACTGGGGCCAAGCACAGGGCAAGATGCTTTTAACTTCTACTTTACTGTTGGTGGTAGG
delta15-LEU2t-F	GTAGTTTTTAAATTTCAAATCCGAACAACAGAGCATAGGGTTTCGCAAACCGTTGAGCCATTAGTATCAATTGCTTAC
URA3t-HIS3p-R	CGGGAGCTGCATGTGTACAGGTTTTACCGTCAACCGAAACGCGGAACTCTTCTTTTTCAATGGGTATAACTG
URA3t-HIS3p-F	AGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCATTGAAAAAGGAAGAGTTCGCGGTTTCGGTGATGA
HIS3t-ACT3p-R	ATGTTAGAACCACCTGGGCCAACAAATCATATTGAATCTTCTGGTATCAGCGTGTCACTACATAAGAACACCTTGGTG
HIS3t-ACT3p-F	ATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACAAAGGTGTTCTTATGTAGTGACACGCTGATACCAGAAGATTCAATA TGATTGTTG
PDR3t-TEF1p-R	GTAAAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGGTGTGTGGGGGATCACTCTTTTTGAACAGCGCGCCCA
PDR3t-TEF1p-F	ACATAAGATCAACGATTTCTTCAATTTTTGGGCGCGCTGTTCAAAAAGAGTGATCCCCACACACCAT
CYC1t-GAL1p-R	CTTTGCGTCCATCAAAAAAAGTAAGAATTTTGAATTTCAATATAAGCGCGTTGGCCGATTCATTA

Continued

Continued

Primer name	Sequence (5' to 3')
CYC1t-GAL1p-F	GGCTTAAATTTGCAAGCTGCGGCCCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCTTATATTGAATTTCAAAAATTC TTACTTTTTTTTTGGA
Delta15-50-PRM9t-R	TCTGTATTGTTCTTCTTAGTGCTGTATATGCTCATCCCACCTTCCATTTC AACATCGTATTTTCCGAAGCGT
ROX1-KO-up-F	CCGACAAATCCCCTGGATATCATTG
ROX1-KO-up-R	ACTTTTATTAACAGGAGCCTGTTGATTGTCTAACTGCGTTCTTTTGT
ROX1-KO-down-F	ACGCAGTTAGACAATCAACAGGCTCCTGTTAATAAAAAGTTAAATCGCC
ROX1-KO-down-R	CGATTGTGTCTATATCTACAATATGAACCTG
HXK2-KO-UP-F	ATGTTACTACGAGTTTTCTGAACCTCCTC
HXK2-KO-UP-R	GTAGAAAAAGGGCACCTTCTGTTGTTCAAACCTAATTTACAAATTAAGTTTTATTAATTAGCGTACTTATTA TGTGTGGAGAATT
HXK2-KO-DOWN-F	GTTGTAGGAATATAATTCTCCACACATAATAAGTACGCTAATTAATAAAAACCTAATTTGTAAATTAAGTTTGA ACAACAAGAAGGT
HXK2-KO-DOWN-R	CGCGTAAAAATCGCGGGTAT
GAL10p-F(251bp)	CGGAGGGCTGTCGCC
AscI-CnVS-R	GCGGCGCGCCTTAAGGGATGATTGGTTCAACGAAAAACT
CsVal-YZ-R	CTATATCGATTCTAACAGAGCAGATTTGC
EgVal-YZ-R(486)	CAAACCTCTCGCGTCGTTAAC
GAL1p-F(349)	GCCGCACTGCTCCGA
ASC1-tHMG1-R	GCGGCGCGCCTTAGGATTTAATGCAGGTGACGGACC
NDT80-OUT-F	TGTTAATTCCTTTGTGCCAGATAGTATTG
NDT80-OUT-R	CACCCAATCTTCATTATTCACCAAATATTCCC
LEU2-OUT-F	GCTTGCAATCACAATACTTGAAGTTGAC
ASC1-CWP2t-F	GGCGCGCCGAAATCTCTGATTTTTATAATATCTATATGGCTTTTTTTC
ASC1-PRM9t-F	GGCGCGCCACAGAAGACGGGAGACACTAGC
LEU2-OUT-R	GTGCCCTCCTCTGTCAATATTAAT
HIS3-OUT-F	GCCTCGTAATGATTTTCATTTTTTTTTTCC
HIS3-OUT-R	GCGCCTCGTTCAGAATGACAC
HO-OUT-F	CTGGGCGTTATTAGGTGTGAAACC
HO-OUT-R	CGCGTAAATATTTAGCTTGATAACTGTTACTG
ROX1-YZ-F	CAGGTGCAGGCGTACTTTAAAG
ROX1-YZ-R	GCCACTTGAGCTTTCGGTTTG
HXK2-OUT-F	AACAAAGAAAAAGCAAGAGTAAATAGCG
HXK2-OUT-R	CGGTGTTTCATCCAGGTGTAATATC
GAL80-OUT-F	GTTGGCCTCTACTACTCCATCGAC
pGAL4-SexAI	GCGACCTGGTCTTTTCAGGAGGCTTGCTTCTCT
GAL4t-F	AATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCC
GAL80-OUT-R	GGCATTATATGGCCGATTGTATTAGTATCC
PDR3-YZ-F(207)	GGAGAGGAATCGTACACTCAAGAC
TEF1-PAC1-R	GCGTTAATTAATTTGTAATTAATAACTTAGATTAGATTGCTATGCTTTCTTTC
TEF1p-YZ-F(350bp)	GCCGTACCACTTCAAAAACCC
INO2-R	TCAGGAATCATCCAGTATGTGCTGT

培养基 LB培养基: 1%蛋白胨、0.5%酵母粉、1%氯化钠、100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素; YPD培养基: 1%酵母粉、2%蛋白胨、2%葡萄糖; SD-Trp 筛选培养基: 0.8%氨基酸选择培养组分(四缺, Ura-Trp-His-Leu)、2%葡萄糖、0.002%尿嘧啶、0.005%组氨酸和0.01%亮氨酸; SD-Trp-Ura 筛选培养基: 0.8%氨基酸选择培养组分(四缺, Ura-Trp-His-Leu)、2%葡萄糖、0.005%组氨酸、0.01%亮氨酸; SD-Ura-Trp-His-Leu 筛选培养基: 0.8%氨基酸选择培养组分(四缺, Ura-Trp-His-Leu)、2%葡萄糖; SD-Trp-5FOA 筛选培养基: 0.8%氨基酸选择培养组分(四缺, Ura-Trp-His-Leu)、2%葡萄糖、0.002%尿嘧啶、0.005%组氨酸、0.01%亮氨酸、0.1%5-FOA。上述

液体培养基加入2% Agar可配成相应的固体培养基。

高密度发酵培养基和补料培养基参照人参皂苷高密度发酵培养基配方配置^[12]。

瓦伦烯工程菌的构建 相关工程菌株构建均采用基于CRISPR/Cas9技术介导的同源重组, 原理如图2所示。

VAL-01菌株的构建 模块和引物的搭配方案见表3, 用PrimeSTAR GXL高保真聚合酶扩增和切胶回收得到用于同源重组的各个片段, 用SD-Trp液体培养基活化YTT-T5后将各个片段同NDT80-gRNA共同转入醋酸锂方法制备的感受态中, 并用SD-Trp-Ura固体培养基筛选转化子。转化子分别用GAL10p-F(251bp)/

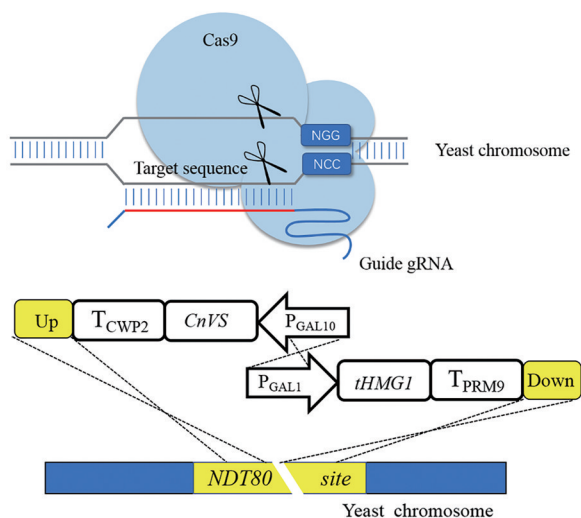


Figure 2 Construction of strain VAL-01 by CRISPR/Cas9

Table 3 Information of DNA assembler

Template	Primer name	Module
P_{GAL10} -CnVS- T_{CWP2}	NDT80-50-CWP2t-F GAL1p-R	P_{GAL10} -CnVS- T_{CWP2}
P_{GAL1} -tHMG1- T_{PRM9}	GAL1p-F NDT80-50-PRM9t-R	P_{GAL1} -tHMG1- T_{CWP2}

AscI-CnVS-R、GAL1p-F(349)/AscI-tHMG1-R、NDT80-OUT-F/NDT80-OUT-R 等引物进行 PCR 验证后, 阳性克隆菌株命名为 VAL-01。

工程菌 VAL-02、VAL-03 和 VAL-04 的构建模块和引物的搭配方案见表 4, 使用 PrimeSTAR GXL 高保真聚合酶扩增和切胶回收得到用于同源重组的各个片段, 用 SD-Trp 固体培养基活化 YTT-T5 后将各个片段转入醋酸锂方法制备的感受态中, 并用 SD-Trp-Ura 固体培养基筛选转化子。转化子分别用特异引物 GAL10p-F(251bp)/AscI-CnVS-R、GAL10p-F(251bp)/CsVal-YZ-R、GAL10p-F(251bp)/EgVal-YZ-R(486), 以及共用引物 GAL1p-F(349)/AscI-tHMG1-R、NDT80-OUT-F/NDT80-OUT-R 进行 PCR 验证后, 阳性克隆菌

Table 4 Information of DNA assembler

Strain	Template	Primer name	Module
VAL-02	P_{GAL10} -SmFPS-CnVS- T_{CWP2}	NDT80-50-CWP2t-F GAL1p-R	P_{GAL10} -SmFPS-CnVS- T_{CWP2}
	P_{GAL1} -tHMG1- T_{PRM9}	GAL1p-F NDT80-50-PRM9t-R	P_{GAL1} -tHMG1- T_{PRM9}
VAL-03	P_{GAL10} -SmFPS-CsVal- T_{CWP2}	NDT80-50-CWP2t-F GAL1p-R	P_{GAL10} -SmFPS-CsVal- T_{CWP2}
	P_{GAL1} -tHMG1- T_{PRM9}	GAL1p-F NDT80-50-PRM9t-R	P_{GAL1} -tHMG1- T_{PRM9}
VAL-04	P_{GAL10} -SmFPS-EgVal- T_{CWP2}	NDT80-50-CWP2t-F GAL1p-R	P_{GAL10} -SmFPS-EgVal- T_{CWP2}
	P_{GAL1} -tHMG1- T_{PRM9}	GAL1p-F NDT80-50-PRM9t-R	P_{GAL1} -tHMG1- T_{PRM9}

株分别命名为 VAL-02、VAL-03 和 VAL-04。

工程菌 VAL-05、VAL-06 和 VAL-07 的构建模块和引物的搭配方案见表 5, 用 PrimeSTAR GXL 高保真聚合酶扩增和切胶回收得到用于同源重组的各个片段, 用 SD-Trp 液体培养基活化去除 gRNA 质粒的 VAL-02 后将各个片段同 LEU2-gRNA 共同转入醋酸锂方法制备的感受态中, 并用 SD-Trp-Ura 固体培养基筛选转化子。转化子分别用通过 LEU-OUT-F/ASC1-CWP2t-F、ASC1-PRM9t-F/LEU-OUT-R、LEU-OUT-F/LEU-OUT-R 引物进行 PCR 验证后阳性克隆命名为 VAL-05。

用 SD-Trp 液体培养基活化去除 gRNA 质粒的 VAL-05 后将各个片段同 HIS3-gRNA 共同转入醋酸锂方法制备的感受态中, 并用 SD-Trp-Ura 固体培养基筛选转化子。用 HIS3-OUT-F/ASC1-CWP2t-F、ASC1-PRM9t-F/HIS3-OUT-R、HIS3-OUT-F/HIS3-OUT-R 引物进行 PCR 验证后阳性克隆命名为 VAL-06。

用 SD-Trp 液体培养基活化去除 gRNA 质粒的 VAL-06 后将各个片段同 HO-gRNA 共同转入醋酸锂方法制备的感受态中, 并用 SD-Trp-Ura 固体培养基筛选转化子。用 HO-OUT-F/ASC1-CWP2t-F、ASC1-PRM9t-F/HO-OUT-R、HO-OUT-F/HO-OUT-R 引物进行 PCR 验证后阳性克隆命名为 VAL-07。

工程菌 VAL-08 和 VAL-09 的构建模块和引物的搭配方案见表 6, 用 PrimeSTAR GXL 高保真聚合酶扩增和切胶回收得到用于同源重组的各个片段, 用 SD-Trp 液体培养基活化去除 gRNA 质粒的 VAL-05 后将 ROX1-KO 片段及 ROX1-gRNA 共同转入醋酸锂方法制备的感受态中, 并用 SD-Trp-Ura 固体培养基筛选转化子。转化子分别用 ROX-YZ-F/ROX-YZ-R 引物进行 PCR 验证后, 阳性克隆菌株命名 VAL-08。

用 SD-Trp 液体培养基活化去除 gRNA 质粒的 VAL-08 后将 HXK2-KO 片段同 HXK2-gRNA 共同转入醋酸锂方法制备的感受态中, 使用 HXK2-OUT-F/HXK2-OUT-R 引物对转化子进行 PCR 验证后挑选其

Table 5 Information of DNA assembler

Strain	Template	Primer name	Module
VAL-05	P _{GAL10} -SmFPS-CnVS-T _{CWP2}	LEU2-50-CWP2t-F GAL1p-R	P _{GAL10} -SmFPS-CnVS-T _{CWP2}
	P _{GAL1} -tHMG1-T _{PRM9}	GAL1p-F LEU2-50-PRM9t-R	P _{GAL1} -tHMG1-T _{PRM9}
VAL-06	P _{GAL10} -SmFPS-CnVS-T _{CWP2}	HIS3-50-CWP2t-F GAL1p-R	P _{GAL10} -SmFPS-CnVS-T _{CWP2}
	P _{GAL1} -tHMG1-T _{PRM9}	GAL1p-F HIS3-50-PRM9t-R	P _{GAL1} -tHMG1-T _{PRM9}
VAL-07	P _{GAL10} -SmFPS-CnVS-T _{CWP2}	HO-50-CWP2t-F GAL1p-R	P _{GAL10} -SmFPS-CnVS-T _{CWP2}
	P _{GAL1} -tHMG1-T _{PRM9}	GAL1p-F HO-50-PRM9t-R	P _{GAL1} -tHMG1-T _{PRM9}

中一个阳性克隆, 去除 gRNA 后制备感受态, 加入 GAL80-gRNA 片段及 P_{GAL4}-GAL4-T_{GAL4}, 并用 SD-Trp-Ura 固体培养基筛选转化子。转化子分别用 GAL80-OUT-F/pGAL4-SexAI、GAL4t-F/GAL80-OUT-R、GAL80-OUT-F/GAL80-OUT-R 引物进行 PCR 验证后, 阳性克隆菌株命名 VAL-09。

Table 6 Information of DNA assembler

Template	Primer name	Module
Yeast genome	ROX1-KO-up-F ROX1-KO-up-R	ROX1-up
	ROX1-KO-down-F ROX1-KO-down-R	ROX1-down
ROX1-upand	ROX1-KO-up-F	ROX1-KO
ROX1-down	ROX1-KO-down-R	
Yeast genome	HXX2-KO-UP-F HXX2-KO-UP-R	HXX2-up
	HXX2-KO-DOWN-F HXX2-KO-DOWN-R	HXX2-down
HXX2-upand	HXX2-KO-UP-F	HXX2-KO
HXX2-down	HXX2-KO-DOWN-R	
Yeast genome	GAL80-GAL4p-F GAL4t-GAL80-R	P _{GAL4} -GAL4-T _{GAL4}

工程菌 VAL-10 的构建 使用同源重组法构建菌株 VAL-10。用 PrimeSTAR GXL 高保真聚合酶扩增和切胶回收得到用于同源重组的各个片段, 将 VAL-09 去掉 gRNA 和 Cas9 质粒后用 YPD 液体培养基活化后

用醋酸锂方法制备的感受态, 加入表 7 所得的各个模块片段, 电击转化, 并用 SD-Trp-Ura-Leu-Ura 固体培养基筛选转化子。转化子再分别用 PDR3-YZ-F(207)/TEF1-PAC1-R、TEF1p-YZ-F(350bp)/ASC-tHMG1-R、GAL1p-F(349)/INO2-R 等引物进行 PCR 验证后, 得到工程菌 VAL-10。

菌株发酵及产物提取 摇瓶发酵: 在平板上挑取单克隆于装有 3 mL 相应的液体培养基的试管中, 30 °C、250 r·min⁻¹ 震荡培养过夜, 制备种子液。将种子液按照 1% (v/v) 的接种量转移至含有 15 mL 相应液体选择培养基的 100 mL 三角瓶中, 加入 1.5 mL 正十二烷, 30 °C、250 r·min⁻¹ 震荡培养 6 天。最后将三角瓶中的发酵液转移至 50 mL 离心管, 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集有机相, 用正己烷将其稀释 10 倍后, 过有机尼龙膜 (0.22 μm) 后备用。高密度发酵: 经火焰接种环, 将 200 mL 种子液加入含 2 L 发酵培养基的 5 L 生物反应器中。发酵过程中参数设定值分别为: 温度 30 °C, pH 5.0, 溶氧 30%, 空气流量 3~9 L·min⁻¹, 搅拌转速 300~1 000 r·min⁻¹, 溶氧与搅拌转速、通气相偶联。发酵 24 h 后向生物反应器中加入 200 mL 肉豆蔻酸异丙酯。

瓦伦烯的检测 分别使用 GC-MS 和 GC 进行样品的定性和定量分析^[12]。

GC-MS 条件 进样口温度 250 °C, 进样口体积

Table 7 Information of DNA assembler

Template	Primer name	Module
pRS425-LEU2-TRP1-URA3-TEF1p-ObGES	Delta15-LEU2t-F URA3t-HIS3p-R	LEU2-TRP1-URA3 Maker
NDT80-HIS3	URA3t-HIS3p-F HIS3t-ACT3p-R	HIS3 Maker
P _{ACT3} -PDR3m-T _{PDR3}	HIS3t-ACT3p-F PDR3t-TEF1p-R	P _{ACT3} -PDR3m-T _{PDR3}
pM3-tHMG1	PDR3t-TEF1p-F CYC1t-GAL1p-R	P _{TEF1} -tHMG1-T _{CYC1}
P _{GAL1} -INO2-T _{PRM9}	CYC1t-GAL1p-F Delta15-50-PRM9t-R	P _{GAL1} -INO2-T _{PRM9}

1 μL , 不分流, 溶剂延时 3 min; 色谱柱: HP-5ms (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 色谱条件: 45 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 至 300 $^{\circ}\text{C}$, 保温 5 min; MS 条件: Full Scan: 50~750 amu。

GC 条件 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 1 μL , 不分流, 色谱柱: HP-5 (30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm); 色谱条件: 45 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 至 300 $^{\circ}\text{C}$, 保温 5 min; FID 检测器。

结果与分析

1 瓦伦烯酿酒细胞工厂创建及产物鉴定

酿酒酵母能天然合成倍半萜类通用前体 FPP, 自然界中 FPP 能被瓦伦烯合酶催化生成瓦伦烯。本实验室前期已构建了一株强化了 MVA 途径并弱化了 *ERG20* 基因表达的萜类底盘菌株 YTT-T5。研究将北美金柏 (*Callitropsis nootkatensis*) 来源的 *CnVS* 基因 (经密码子优化) 置于半乳糖诱导型启动子 P_{GAL10} 下, 并插入到底盘菌 YTT-T5 的 *NDT80* 基因位点, 经过缺陷培养基的筛选、PCR 和测序验证正确后得到菌株 VAL-01。VAL-01 经过 6 天的摇瓶发酵后, 利用 GC-MS 对发酵产物进行定性和定量分析, 发现工程菌株 VAL-01 能在 12.855 min 出现与瓦伦烯标品相同质谱图的新峰, 其瓦伦烯产量为 $1.1 \pm 0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 3)。

2 融合 SmFPS 和 CnVS 蛋白提高瓦伦烯产量

使用蛋白质融合技术拉近途径中相邻酶在空间上的距离, 能提高中间代谢产物的利用速率, 从而进一步提高整个途径的催化能力, 是代谢工程改造过程中的重要手段^[13,14]。FPP 是倍半萜类产物的中间体, 同时将被

鲨烯合酶连接成为三萜通用前体鲨烯^[8]。将 FPS 和倍半萜合酶进行融合会提高倍半萜化合物的产量, 前期课题组张丽丽等^[13]使用连接肽 GGGs 将 FPS 与橙花叔醇合酶融合后使得工程菌株橙花叔醇产量提高了 59.8 倍。本研究中将来源丹参的法尼基焦磷酸合酶 (SmFPS) 与 *CnVS* 进行融合后置于 *GAL1* 启动子下, 并整合到底盘菌 YTT-T5 中, 经过缺陷培养基的筛选、PCR 和测序验证正确后得到菌株 VAL-02。与 VAL-01 相比, VAL-02 瓦伦烯的产量提高了 343.2 倍, 达到 $344.2 \pm 17.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 4)。

3 高效的瓦伦烯合酶的筛选

除北美金柏来源的 *CnVS* 外, 柑橘 (*Citrus sinensis*) 来源的 *Cstps1*^[15], 葡萄 (*Vitis Vinifera*) 来源的 *VvVal*^[16] 及冰川刺芹 (*Eryngium glaciale*) 来源的 *EgVS* 均具有瓦伦烯合酶活性^[17]。本研究中将 SmFPS 分别与柑橘 *CsVal*、冰川刺芹 *EgVS* 进行融合后, 转入 YTT-T5 菌株中评价融合酶的活性, 分别构建出的工程菌株 VAL-03 和 VAL-04。摇瓶发酵 6 天后, 其中菌株 VAL-02 (融合北美金柏来源的 *CnVS*) 瓦伦烯的产量达 $344.2 \pm 17.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 是菌株 VAL-03 ($25.1 \pm 6.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 13.7 倍、VAL-04 ($79.3 \pm 22.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 4.3 倍 (图 4A), 表明 SmFPS-*CnVS* 融合酶的活性较其余二者更强。

4 调整基因拷贝数增强瓦伦烯生产

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^[18]。为了进一步提高瓦伦烯产量, 本研究调整了关键基因 *tHMG1* 以及 *SmFPS-CnVS* 的拷贝数, 分别获得了瓦伦烯合酶拷贝数为 2、3、4 的工程菌株 VAL-05、VAL-06 和 VAL-07。其中过表达 2

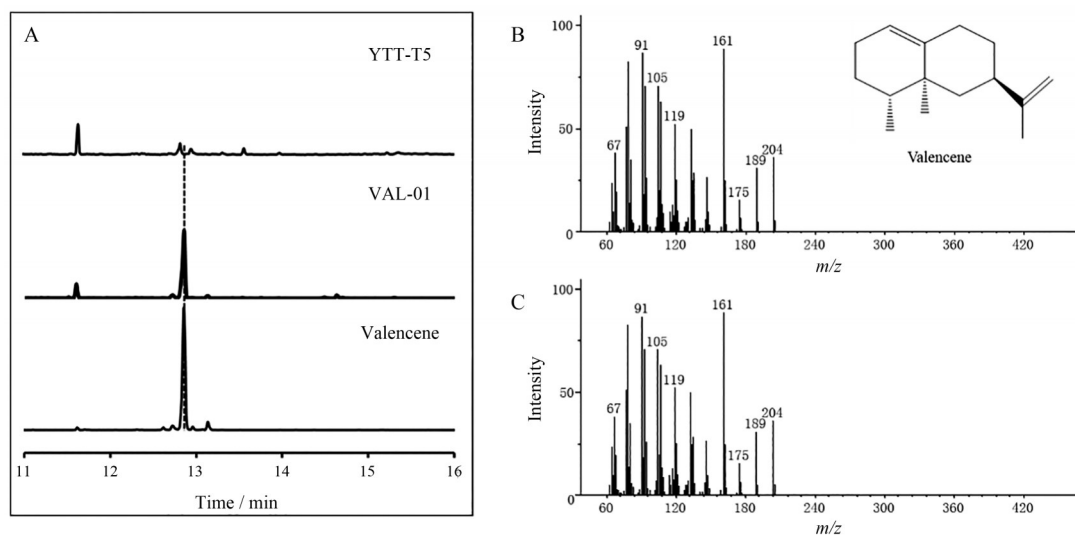


Figure 3 GC-MS analysis of strain VAL-01. A: Valencene represents the standard product of valencene, YTT-T5 represents the fermentation product of engineering strain YTT-T5, and VAL-01 represents the fermentation product of VAL-01; B: The 12.855 min mass spectrum of valencene standard; C: The 12.855 min mass spectrum of the fermentation products of engineering strain VAL-01

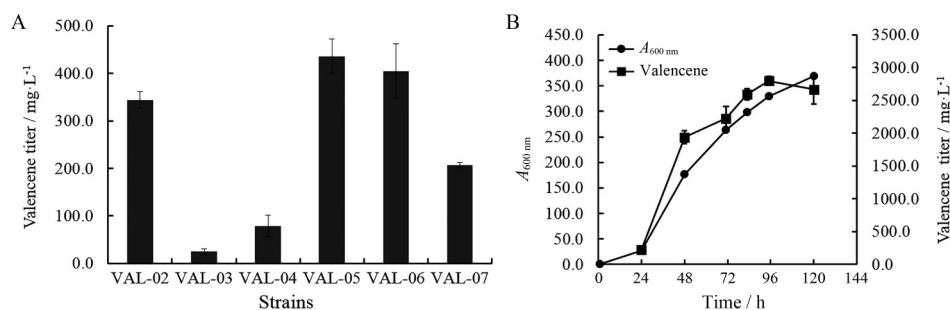


Figure 4 A: Valencene production by strains VAL-02-VAL-07. B: High cell density fermentation of VAL-10 for production of valencene

拷贝的菌株 VAL-05 产量最高, 瓦伦烯产量可达 $436.4 \pm 35.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 4A)。在增加拷贝数时, 生物量显著降低, VAL-07 较 VAL-02 生物量降低了 33.3%, 推测可能过多增加基因表达将对细胞带来负荷^[19], 同时瓦伦烯对酿酒酵母细胞具有一定的毒性^[20]。

5 敲除调控因子 *ROX1* 提高细胞产量

在内源的麦角甾醇途径中, 编码血红素依赖的转录抑制因子 Rox1p 能与多个麦角甾醇途径基因 (ERG) 启动子结合发挥直接抑制作用^[21,22]。对 *ROX1* 进行敲除, 可以提高 ERG 基因的表达, 并显著提高类胡萝卜素、倍半萜类等萜类化合物产量^[23]。在本研究中, 进一步敲除了 VAL-05 菌株的 *ROX1* 基因, 获得工程菌株 VAL-08, 其产量较 VAL-05 提高 17.4%。

6 调控半乳糖诱导系统降低生产成本

虽然菌株 VAL-08 不能代谢半乳糖 (其 *GAL1*、*GAL7* 和 *GAL10* 等半乳糖代谢基因被敲除), 但在发酵时还需要额外添加半乳糖作为诱导剂来生产瓦伦烯。半乳糖价格昂贵, 取消半乳糖的使用会极大地降低生产成本。酿酒酵母在高葡萄糖浓度时, 己糖激酶 Hxk2p 与 Snf1p 复合体相互作用, 阻断 Mig1p 磷酸化, 而 Mig1p 的磷酸化对于解除葡萄糖抑制基因 (GAL 基因) 是必不可少的^[24-27]。已有文献^[24]表明下调 Hxk2p 会大幅提高橙花叔醇的生产。Gal4p 是半乳糖诱导系统的开关, 在添加半乳糖并缺乏抑制碳源 (如葡萄糖) 的情况下, Gal4p 可以大幅度诱导半乳糖代谢基因的表达 (如 *GAL1/2/7/10* 表达量可以提高 1 000 倍以上)^[28]。Gal80p 是半乳糖调控系统的负调控子, 通过与半乳糖诱导系统的开关 Gal4p 的 C 端转录激活域结合进而抑制 GAL 基因的表达^[29]。

因此进一步敲除了 VAL-08 菌株的 *HXK2* 和 *GAL80* 基因, 同时强化了 *GAL4* 的表达获得的工程菌 VAL-09, 在仅以葡萄糖为碳源发酵 VAL-09 时, 其瓦伦烯的产量能成功达到 $259.3 \pm 1.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

7 工程菌修复及发酵工艺优化

为了进一步提高 VAL-09 工程菌的发酵性能, 增加

瓦伦烯的产量及工程菌的耐受性, 在修复菌株 VAL-09 营养缺失 marker 基因 *LEU2*、*HIS3*、*URA3* 和 *TPR1* 的同时, 过表达 *PDR3*^{Q763L} (*PDR3*^{Q763L} 突变可能对提高萜类化合物的耐受性有益^[30])、*tHMG1* 和 *INO2* (调控内质网大小的转录因子, 过表达 *INO2* 可以提高萜类化合物产量^[31]) 等功能模块, 得到菌株 VAL-10。与 VAL-09 菌株相比, 其瓦伦烯产量进一步提高了 13.8%, 达到 $295.3 \pm 21.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对 VAL-10 菌株进行发酵工艺优化, 在 5 L 生物反应器中发酵 95 h, 瓦伦烯的产量达到 $2\,798.6 \pm 66.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $A_{600\text{nm}}$ 达到 329.9 (图 4B)。

讨论

利用合成生物学技术生产具有高附加值天然化合物是合成生物学领域的热点及难点问题^[4]。瓦伦烯具有柑橘气味的特殊香气, 同时为诺卡酮的底物, 具有商业化前景。前期已有国际团队在多个方面进行异源生物合成的探索, 在宿主微生物选择方面, 酿酒酵母^[32]、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)^[33] 和集胞藻 (*Synechocystis sp. PCC 6803*)^[34] 等被用于瓦伦烯的生产; 在亚细胞区室化利用方面, 由于细胞中的线粒体、高尔基体、内质网等细胞器能为生物反应提供特定的催化环境, 利用导肽将法尼基焦磷酸合酶和瓦伦烯合酶定位到酵母细胞器线粒体中, 可以增加工程菌瓦伦烯的合成^[35]; 在碳源利用方面, 通过途径改造使工程菌能利用甘露醇来生产瓦伦烯, 甘露醇为一种更为环保、价格低廉的非发酵碳源^[36]。本研究通过蛋白质融合技术, 基因元件筛选, 关键基因拷贝数优化, 提高了瓦伦烯的产量; 进一步工作中, 为解决原料成本问题, 调控了半乳糖诱导系统相关基因表达, 最后结合调控系列转录因子的表达, 获得了高密度发酵瓦伦烯产量达到 $2\,798.6 \pm 66.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的酿酒酵母细胞工厂。研究最终获得的瓦伦烯工程菌摇瓶发酵产量为 $295.3 \pm 21.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 单位菌密度产量能达到 $26.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot A_{600\text{nm}}^{-1}$, 但是高密度发酵时只有 $8.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot A_{600\text{nm}}^{-1}$, 表明高密度发酵条件有待优化。此外, 前期研究发现在同一倍半萜

酵母底盘菌株中进行酶催化能力评估时, 倍半萜化合物橙花叔醇和瓦伦烯的产量分别为 900 和 5 mg·L⁻¹^[37], 推断瓦伦烯合成酶的酶活可能是瓶颈, 因此可以进一步进行新酶筛选, 或利用 AlphaFold2 等计算机辅助设计^[38], 或通过酶定向进化^[39]等策略提高酶的活性。

作者贡献: 戴住波、张学礼和马文建设计实验并提供资金; 杨婷婷、王冬、李文豪、石玉松和李荣生参与实验、分析数据和撰写论文。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Hunter GLK, Brogden WB. Analysis of the terpene and sesquiterpene hydrocarbons in some citrus oils [J]. *J Food Sci*, 1965, 30: 383-387.
- [2] Ignea C, Triikka FA, Kourtzelis I, et al. Positive genetic interactors of HMG2 identify a new set of genetic perturbations for improving sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 162.
- [3] Fraatz MA, Berger RG, Zorn H. Nootkatone--a biotechnological challenge [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83: 35-41.
- [4] Dai Z, Wang Y, Zhou Z, et al. Synthetic biology for production of plant-derived natural products[J]. *Bull Chin Acad Sci (中国科学院院刊)*, 2018, 33: 1228-1238.
- [5] Huang L, Gao W, Zhou Y. Application of synthetic biology to sustainable utilization of Chinese materia medica resources [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 37-43.
- [6] Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, et al. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E111-E118.
- [7] Luo XZ, Reiter MA, d'Espaux L, et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast [J]. *Nature*, 2019, 567: 123-128.
- [8] Wang D, Liu Y, Xu J, et al. Construction of efficient yeast cell factories for production of ginsenosides precursor dammarene-diol-II [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1233-1241.
- [9] Zhang T, Liang H, Gong T, et al. Studies on the enzymatic synthesis of a new PPT-type ginsenoside via UDP-glycosyltransferase PgUGT74AE2 from *Panax ginseng* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1565-1570.
- [10] Luo H, Song J, Li X, et al. Cloning and expression analysis of a key device of HMGR gene involved in ginsenoside biosynthesis of *Panax ginseng* via synthetic biology approach [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 219-227.
- [11] Liu X, Luo L, Ma Y, et al. Biopathway construction of plant natural products [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 3285-3299.
- [12] Dai Z, Liu Y, Zhang X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides [J]. *Metab Eng*, 2013, 20: 146-156.
- [13] Zhang L, Ma X, Wang D, et al. Construction of cell factories for high production of nerolidol in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2017, 42: 2962-2968.
- [14] Dai Z, Liu Y, Huang L, et al. Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 2845-2853.
- [15] Sharon-Asa L, Shalit M, Frydman A, et al. Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of Cstps1, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene [J]. *Plant J*, 2003, 36: 664-674.
- [16] Lucker J, Bowen P, Bohlmann J. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 2649-2659.
- [17] Ye Z, Huang Y, Shi B, et al. Coupling cell growth and biochemical pathway induction in *Saccharomyces cerevisiae* for production of (+)-valencene and its chemical conversion to (+)-nootkatone [J]. *Metab Eng*, 2022, 72: 107-115.
- [18] Meadows AL, Hawkins KM, Tsegaye Y, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production [J]. *Nature*, 2016, 537: 694-697.
- [19] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2010, 330: 70-74.
- [20] Serra E, Hidalgo-Bastida LA, Verran J, et al. Antifungal activity of commercial essential oils and biocides against *Candida albicans* [J]. *Pathogens*, 2018, 7: 15.
- [21] Lowry CV, Zitomer RS. *ROX1* encodes a heme-induced repression factor regulating *ANB1* and *CYC7* of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Cell Biol*, 1988, 8: 4651-4658.
- [22] Balasubramanian B, Lowry CV, Zitomer RS. The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 6071-6078.
- [23] Ozaydin B, Burd H, Lee TS, et al. Carotenoid-based phenotypic screen of the yeast deletion collection reveals new genes with roles in isoprenoid production [J]. *Metab Eng*, 2013, 15: 174-183.
- [24] Lu ZY, Peng BY, Ebert BE, et al. Auxin-mediated protein depletion for metabolic engineering in terpene-producing yeast [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 1051.
- [25] Kummel A, Ewald JC, Fendt SM, et al. Differential glucose repression in common yeast strains in response to *HXK2* deletion [J]. *Fems Yeast Res*, 2010, 10: 322-332.
- [26] Ahuatzli D, Riera A, Pelaez R, et al. *Hxk2* regulates the phosphory-

- lation state of *Mig1* and therefore its nucleocytoplasmic distribution [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 4485-4493.
- [27] Sanz P, Alms GR, Haystead TAJ, et al. Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 1321-1328.
- [28] Mirisola MG, Gallo A, De Leo G. Ras-pathway has a dual role in yeast galactose metabolism [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581: 2009-2016.
- [29] Lohr D, Venkov P, Zlatanova J. Transcriptional regulation in the yeast gal gene family - a complex genetic network [J]. *FASEB J*, 1995, 9: 777-787.
- [30] Brennan TCR, Williams TC, Schulz BL, et al. Evolutionary engineering improves tolerance for replacement jet fuels in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81: 3316-3325.
- [31] Kim JE, Jang IS, Son SH, et al. Tailoring the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum for functional assembly of terpene synthesis pathway [J]. *Metab Eng*, 2019, 56: 50-59.
- [32] Cao C, Cao X, Yu W, et al. Global metabolic rewiring of yeast enables overproduction of sesquiterpene (+) -valencene [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70: 7180-7187.
- [33] Frohwitter J, Heider SA, Peters-Wendisch P, et al. Production of the sesquiterpene (+) -valencene by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. *J Biotechnol*, 2014, 191: 205-213.
- [34] Dietsch M, Behle A, Westhoff P, et al. Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. *PCC 6803* for the photoproduction of the sesquiterpene valencene [J]. *Metab Eng Commun*, 2021, 13: e00178.
- [35] Farhi M, Marhevka E, Masci T, et al. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids [J]. *Metab Eng*, 2011, 13: 474-481.
- [36] Zhu CY, You X, Wu T, et al. Efficient utilization of carbon to produce aromatic valencene in *Saccharomyces cerevisiae* using mannitol as the substrate [J]. *Green Chem*, 2022, 24: 4614-4627.
- [37] Li RS, Wang K, Wang D, et al. Production of plant volatile terpenoids (rose oil) by yeast cell factories [J]. *Green Chem*, 2021, 23: 5088-5096.
- [38] Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold [J]. *Nature*, 2021, 596: 583-589.
- [39] Xie W, Lv X, Ye L, et al. Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering [J]. *Metab Eng*, 2015, 30: 69-78.