



研究报告

过表达乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶 2 基因(*RKAcat2*)对红冬孢酵母产类胡萝卜素的影晌

郭锐 倪金梅 胡丽 季秀玲 魏云林 张琦*

昆明理工大学生命科学与技术学院 云南 昆明 650500

摘要:【背景】乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶(Acetyl Coenzyme A Acyltransferase, Acat)是硫解酶家族的一员,分为 I 型和 II 型,而 II 型作为甲羟戊酸(Mevalonate, MVA)途径的第一个限速酶,其表达水平和催化活性会影响萜类及其衍生物的合成量。【目的】分析 Acat II 型基因的过表达对红冬孢酵母产类胡萝卜素的影响。【方法】从红冬孢酵母 YM25235 菌株中克隆编码 Acat II 型的基因 *RKAcat2*,将其回转到红冬孢酵母 YM25235 菌株中,构建一株 *RKAcat2* 基因过表达菌株进行分析。【结果】与对照菌株相比, *RKAcat2* 基因过表达使 YM25235 菌株中类胡萝卜素含量提高了 50.53%,而菌株中油脂含量降低了 22.80%,脂肪酸组成中油酸含量显著下降了 17.78%,而且菌株中乙酰辅酶 A (Coenzyme A, CoA)的含量也下降了 13.64%。【结论】过表达 *RKAcat2* 基因促进更多乙酰 CoA 进入 MVA 途径中,从而提高了类胡萝卜素的合成水平,这与部分 MVA 途径和类胡萝卜素合成途径中基因的转录分析结果一致。研究结果可为进一步通过代谢工程手段提高产油红酵母中类胡萝卜素及其特定组分含量的研究提供参考。

关键词: 红冬孢酵母, 乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶, 基因过表达, 类胡萝卜素, 乙酰辅酶 A

Effects of *RKAcat2* overexpression on carotenoid production in *Rhodospiridium kratochvilovae*

GUO Rui NI Jinmei HU Li JI Xiuling WEI Yunlin ZHANG Qi*

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China

Abstract: [Background] Acetyl-CoA acetyltransferase (Acat) belongs to thiolase family and it can be classified into two types (I and II). Type II Acat acts as the first rate-limiting enzyme of the mevalonate (MVA) pathway, and its expression level and catalytic activity affect the production of terpenoids and their derivatives. [Objective] To study whether *Acat2* overexpression can increase the carotenoid biosynthesis in *Rhodospiridium kratochvilovae*. [Methods] A gene encoding type II Acat, named *RKAcat2*, was cloned from *R. kratochvilovae* strain YM25235 and then introduced into YM25235 for overexpression. [Results] Compared with the control, *RKAcat2* overexpression in YM25235 increased the carotenoid content by

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31960466)

*Corresponding author: E-mail: qzhang37@kust.edu.cn

Received: 19-03-2021; Accepted: 10-04-2021; Published online: 21-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31960466)

*通信作者: E-mail: qzhang37@kust.edu.cn

收稿日期: 2021-03-19; 接受日期: 2021-04-10; 网络首发日期: 2021-04-21

50.53% while decreased the lipid content, oleic acid content, and acetyl-CoA level by 22.80%, 17.78%, and 13.64%, respectively. **[Conclusion]** *RKAcat2* overexpression promoted the entry of more acetyl-CoA into MVA pathway. Consequently, the carotenoid biosynthesis in YM25235 was increased, which is consistent with the results of transcriptional analysis of some genes in MVA and carotenoid biosynthesis pathways. This study may provide a reference for further research on improving the contents of carotenoid and its specific compositions in oil-producing red yeast by metabolic engineering.

Keywords: *Rhodospiridium kratochvilovae*, acetyl coenzyme A acyltransferase, gene overexpression, carotenoid, acetyl coenzyme A

类胡萝卜素是由 2 个二萜缩合而成, 含有 8 个异戊二烯单位的四萜化合物^[1], 具有很强的清除自由基和抗氧化的能力^[2]。在生物体内, 类胡萝卜素具有光保护性能、调节细胞分化、细胞周期和凋亡等作用^[3]; 在工业上, 类胡萝卜素被用作食品着色剂、营养强化剂和抗氧化剂等^[4]。近年来, 天然类胡萝卜素的需求不断上升而其产量却依旧处于瓶颈^[5]。因此, 研究类胡萝卜素在微生物体内的合成和累积, 并通过分子手段改造微生物提高类胡萝卜素的产量逐渐成为研究热点^[6]。

甲羟戊酸(Mevalonate, MVA)途径是微生物合成包括类胡萝卜素在内的萜类化合物及其衍生物的主要途径之一, 可分为上游途径与下游途径, 催化乙酰辅酶 A (Coenzyme A, CoA) 转化为萜类化合物共同的前体物质异戊烯焦磷酸(Isopentenylpyrophosphate, IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸酯(Dimethylallylpyrophosphate, DMAPP)

(图 1)^[7]。在不影响细胞生长的前提下, 改变 MVA 途径关键酶基因的表达, 是一种提高 MVA 途径代谢流的调控策略^[8-10]。

乙酰 CoA 乙酰基转移酶(Acetyl coenzyme A Acyltransferase, Acat)属于硫解酶(Thiolase)家族的一员, 其分为 I 型硫解酶和 II 型硫解酶, 分别存在于线粒体和细胞质中^[11-12]。I 型硫解酶对 4-22 个碳的底物具有宽链特异性, 并硫解催化去除 3-乙酰基-CoA 中的乙酰基, 如在每个脂肪酸 β -氧化催化循环的最后一步^[13]。II 型硫解酶主要位于胞质基质中, 位于 MVA 途径中的 Acat 属于 II 型硫解酶, 其催化 MVA 途径反应的第一步, 将 2 分子乙酰 CoA 浓缩成 1 分子乙酰 CoA^[14], 从而将乙酰 CoA 代谢流引向 MVA 途径。为了区分, 将 II 型硫解酶命名为乙酰 CoA 乙酰基转移酶 2 (Acat2), 其作为关键酶对 MVA 途径及类胡萝卜素的合成可能存在较大的影响。

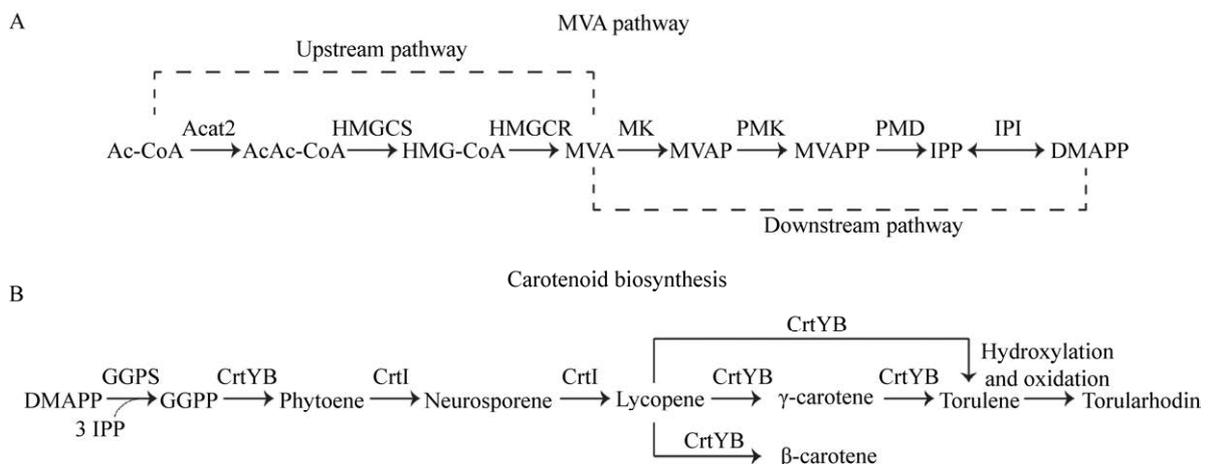


图 1 MVA 途径(A)和类胡萝卜素合成途径(B)

Figure 1 MVA pathway (A) and carotenoid biosynthesis pathway (B)

红冬孢酵母(*Rhodospiridium kratochvilovae*) YM25235 是一株分离自云南程海湖的具有低温适应性的产油红酵母,其产亚油酸和 α -亚麻酸 2 种多不饱和脂肪酸^[15]。由于产油的特性,其胞内可持续提供乙酰 CoA 作为底物进一步合成包括类胡萝卜素和油脂在内的其他衍生物^[16],而且调节乙酰 CoA 的流向会影响不同代谢衍生物的合成水平在理论上是可行的。因此,本研究从 YM25235 菌株中克隆了 *RKAcac2* 基因,并转回 YM25235 菌株中过表达,分析其对类胡萝卜素合成的影响,以期为进一步的研究与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

红冬孢酵母(*R. kratochvilovae*) YM25235 菌株分离于云南丽江程海湖,保存于本研究室;质粒克隆菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 购自北京擎科生物科技有限公司,保存于本研究室;克隆载体 pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司,表达载体 pRH2034 购自新加坡国立大学。

Yeast Malt (YM)培养基(g/L): 酵母膏 3.0, 胰蛋白胨 5.0, 麦芽糖 5.0; 酵母浸出粉胨葡萄糖 (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium, YPD)培养基(g/L): 酵母膏 10.0, 胰蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 纯化回收试剂盒,北京百泰克生物技术有限公司; Ezup 柱式酵母基因组 DNA 抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司; 质粒小提试剂盒、总 RNA 提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; 限制性内切酶、反转录试剂盒, Thermo Fisher Scientific 公司; 高保真 DNA 聚合酶、高灵敏度染料法定量 PCR 检测试剂盒,南京诺唯赞生物有限公司; T4 连接酶, TaKaRa 公司; 乙酰辅酶 A 酶联免疫分析试剂盒,江苏晶美生物技术有限公司。

PCR 扩增仪,北京六一生物技术有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Roche 公司; 琼脂糖凝胶

电泳仪, Amersham 公司; 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 高效液相色谱仪、气相色谱质谱联用仪, Agilent Technologies 公司。

1.3 *RKAcac2* 基因的克隆与序列分析

根据基因组和转录组测序获得的 *RKAcac2* 基因的蛋白编码序列,设计并合成引物 *RKAcac2*-F (5'-TCACCATGGCCGTCTTCATCGCG-3', 下划线部分为 *Nco* I 位点)和 *RKAcac2*-R (5'-CTTGATATCCTACACCCGCTCAAAGAG-3', 下划线部分为 *Eco*R V 位点)。将红冬孢酵母 YM25235 菌株接种在 YM 培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 24 h 后 5 000 r/min 离心 8 min 收集菌体,使用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 并使用反转录试剂盒将总 RNA 反转录得到 cDNA,以此 cDNA 为模板进行 *RKAcac2* 基因的克隆扩增。PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μ L, 2 \times Buffer 25 μ L, dNTP Mix 1 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 高保真 DNA 聚合酶 1 U, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,经蓝白斑筛选和菌落 PCR 验证后送北京擎科生物科技有限公司测序验证。根据测序结果利用 ProtParam 程序对 *RKAcac2* 基因编码的氨基酸序列进行蛋白理化性质分析^[17],利用 NCBI 网站(www.ncbi.nlm.nih.gov/)的 BLASTp 程序进行同源序列比对分析,同时利用 NCBI 中 Conserved Domain 程序进行蛋白质序列结构域预测^[18]。

1.4 重组表达质粒 pRHRKAcac2 的构建

使用 *Nco* I 和 *Eco*R V 这 2 种限制性内切酶分别对连接有 *RKAcac2* 基因的 pMD18-T 载体和表达载体 pRH2034 根据说明书条件进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳分别回收目的片段后用 T4 连接酶 16 °C 连接过夜。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 中,通过菌落 PCR 和提取质粒进行双酶切鉴定来筛选阳性克隆,然后进一步将重组质粒送北京擎

科生物科技有限公司测序验证, 验证通过后, 将所构建的重组表达质粒命名为 pRHRKAcat2。

1.5 重组表达质粒转化红冬孢酵母 YM25235

将重组表达质粒 pRHRKAcat2 通过原生质体转化法^[19]转入红冬孢酵母 YM25235 中。重组表达菌株通过含 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 的 YPD 固体培养基筛选得到抗性转化子。然后利用酵母基因组提取试剂盒提取抗性转化子的基因组 DNA, 以此为模板通过 PCR 进行阳性克隆验证获得 *RKAcat2* 基因转化成功的转化子。

1.6 *RKAcat2* 基因过表达菌株类胡萝卜素及其组分含量变化分析

将阳性转化子接种于 50 mL YPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 发酵培养 168 h 后, 5 000 r/min 离心 8 min 收集菌体, 置于烘箱 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干后研磨成粉。取 0.4 g 干菌体使用丙酮提取菌体总类胡萝卜素, 参考文献[20]的方法, 利用紫外分光光度计在 450 nm 处测定吸光度并计算总类胡萝卜素含量(mg/g 干菌体), 经过多代筛选后, 得到一株稳定高产类胡萝卜素的转基因菌株, 命名为 YM25235/pRHRKAcat2。按照上述方法将 YM25235 菌株和转基因菌株 YM25235/pRHRKAcat2 分别培养 168 h, 提取干菌体中的总类胡萝卜素。以 YM25235 菌体样品作为对照, 通过紫外分光光度计法分析 YM25235/pRHRKAcat2 菌株中总类胡萝卜素的含量变化情况。进一步利用高效液相色谱法(HPLC)对总类胡萝卜素的 4 种主要成分的含量变化进行检测分析, 分析条件参照魏娜等^[21]的方法进行, 液相色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) HPLC Column。

1.7 总油脂含量变化分析

分别取上述 YM25235 菌株和转基因菌株 YM25235/pRHRKAcat2 干菌体 0.3 g 提取菌体内总油脂。向干菌体中加入 1.8 mL 4 mol/L 的盐酸溶液, 用旋涡振荡仪混匀, 室温放置 30 min 后于沸水浴中加热 3 min, 待冷却到室温后加入 3.6 mL 氯仿-甲醇(2:1, 体积比)混合液, 用旋涡振荡仪

充分混匀, 7 000 r/min 离心 5 min, 取底层的氯仿层加入等体积的 0.1% (质量体积分数)氯化钠溶液, 振荡混匀, 在 3 000 r/min 下离心 5 min, 取底层的氯仿层, 挥发氯仿后, 得到油脂, 称量油脂重量。

$$\text{油脂含量(\%)} = \frac{\text{油脂重量(mg)}}{\text{干菌体重量(mg)}} \times 100。$$

1.8 脂肪酸组分分析

分别取上述 YM25235 菌株和转基因菌株 YM25235/pRHRKAcat2 干菌体 0.1 g 提取菌体内脂肪酸。向干菌体中添加 2.5 mL 的 10%氢氧化钾-甲醇溶液及 2.5 mL 的 0.6 mg/mL C17:0 内标物提取脂肪酸, 并在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下皂化 3–5 h。之后用盐酸调节 pH 值至 2.0, 然后在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下添加 4 mL 14%三氟化硼-乙醚使脂肪酸甲酯化 1.5 h。随后利用正己烷萃取脂肪酸甲酯, 最后使用 0.45 μm 微孔滤膜过滤除去大颗粒杂质, 使用气相色谱质谱联用仪进行 GC-MS 分析, 得到脂肪酸组分的变化情况^[15]。

1.9 乙酰 CoA 含量测量

将 YM25235 菌株和转基因菌株 YM25235/pRHRKAcat2 接种于 50 mL YPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 发酵培养 96 h, 取 10 mL 发酵液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 后用 1 mL 0.25 mol/L pH 5.0 的磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline, PBS)洗 2 次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min 去上清, 用 1 mL 6%高氯酸溶液重悬, 逐滴加入 0.3 mol/L 的碳酸钾溶液进行盐沉淀(添加的过程中漩涡振荡使其充分混匀), 调节 pH 值为 3.0, 接着 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min 除去高氯酸钾(KClO_4)晶体。样品制备完毕后使用乙酰辅酶 A 酶联免疫分析试剂盒分析转基因菌株 YM25235/pRHRKAcat2 和对照菌株 YM25235 的乙酰 CoA 含量。

1.10 类胡萝卜素合成相关基因的转录水平分析

收集发酵培养 96 h 后的 YM25235 菌株和转基因菌株 YM25235/pRHRKAcat2, 使用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 并使用反转录试剂盒将总

RNA 反转录, 得到 cDNA。以 YM25235 菌株样品作为对照, 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法检测 *RKAcat2* 基因过表达对类胡萝卜素合成相关基因转录水平的影响^[22]。使用高灵敏度染料法定量 PCR 检测试剂盒和基因特异性引物(表 1)。RT-qPCR 反应体系(20 μ L): cDNA 模板 1 μ L, 2 \times Mix 10 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。RT-qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min。使用小亚基 rRNA 基因(*SSU rRNA*)作为内部对照, 通过 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}方法分析不同基因的相对转录水平^[23]。

2 结果与分析

2.1 *RKAcat2* 基因的克隆与序列分析

以红冬孢酵母 YM25235 的 cDNA 为模板通过 PCR 扩增获得大小约为 1 200 bp 的基因片段, 将片段回收, 连接至 pMD18-T 载体, 使用载体通用引物进行测序, 测序结果显示, 基因片段大小为 1 191 bp, 编码 396 个氨基酸, 所编码蛋白的分子量大小为 41.7 kD, 等电点为 8.55。通过 NCBI 网站 BLAST 搜索, *RKAcat2* 编码的氨基酸序列 *RKAcat2* (GenBank 登录号: MW628325)与酵母

来源的 *Acat2* 相似性最大, 其中与圆红冬孢酵母 (*Rhodotorula toruloides*)的 *RTAcat2* (GenBank 登录号: PRQ77817.1)、红法夫酵母(*Xanthophyllomyces dendrorhous*)的 *XDAcat2* (GenBank 登录号: BAQ25473.1)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 *SCAcat2* (GenBank 登录号: PJP07170.1)的相似性分别为 86.84%、33.04%和 33.83%。序列比对分析的结果还表明, *RKAcat2* 与已报道 *Acat2*^[24-25]结构类似, 在 C 端存在硫解酶高度保守位点(图 2 下划线标出, NVNGGAIALGHPLAAS, 氨基酸位点 342-357), 以及 3 个催化活性中心关键的氨基酸残基 Cys⁸⁸、His³⁵¹、Cys³⁸² (图 2 星号标出)。这些结果表明, 所获得的 *RKAcat2* 是一个新的潜在的编码 *Acat2* 蛋白的基因。

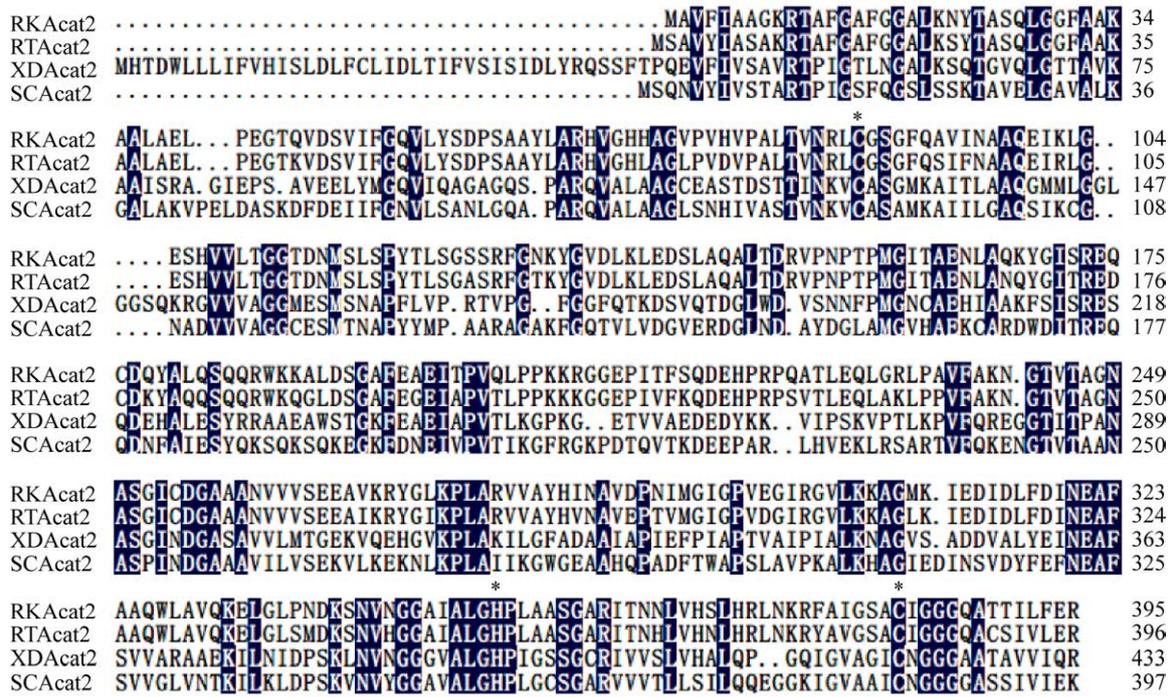
2.2 重组过表达质粒 pRHRK*Acat2* 的构建

为了验证 *RKAcat2* 基因对红冬孢酵母 YM25235 菌株类胡萝卜素合成的影响, 将目的片段从 pMD18-T 切下并插入到表达载体 pRH2034 的 *Nco* I 和 *Eco*R V 位点之间, 构建重组质粒 pRHRK*Acat2* (图 3A)。限制性酶切分析结果显示, 重组质粒 pRHRK*Acat2* 酶切产生 1.19 kb 和 10.1 kb 这 2 条带(图 3B 第 3 泳道), 小分子量条带

表 1 YM25235 菌株中不同基因的 mRNA 转录水平分析所用引物

Table 1 Primers used for the analysis of mRNA levels in YM25235 strain

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	目的基因 Target genes
RT-SSU rRNA-F	CCATTCACCTTACAAACACAA	核糖体 RNA 小亚基基因
RT-SSU rRNA-R	CACCACCAGATTCCTAA	Ribosomal RNA small subunit gene, <i>SSU rRNA</i>
RT-RK <i>Acat2</i> -F	CCGAACATTATGGGCATC	乙酰 CoA 乙酰基转移酶 2 基因
RT-RK <i>Acat2</i> -R	CGATGTCCTCAATCTTCAT	Acetyl-CoA Acyltransferase 2 gene
RT-RKHMGCs-F	AGACGCTCATCGACAAGA	3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶基因
RT-RKHMGCs-R	CCTCAATGTCCGAGTTGC	3-hydroxy-3-methylglutarul-coenzyme A synthase gene, <i>RKHMGCs</i>
RT-RKHMGCr-F	CATTGTCACCGTCTTCTG	3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因
RT-RKHMGCr-R	GTCGTCGTAGAGGAGGAA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene, <i>RKHMGCr</i>
RT-RKMK-F	ACACGATCAACCCGCTCTTC	甲羟戊酸激酶基因
RT-RKMK-R	GAGGGACGAAAGCTCAACGA	Mevalonate kinase gene, <i>RKMK</i>
RT-RK <i>CrtI</i> -F	GTTACTGATGTCCGTCAC	八氢番茄红素脱氢酶基因
RT-RK <i>CrtI</i> -R	GTAAGGAGGAGGTTGTA	Phytoene desaturase gene, <i>RK<i>CrtI</i></i>
RT-RK <i>CrtYB</i> -F	GTTCTTCTTGTGGGAGTG	八氢番茄红素合成酶和番茄红素环化酶基因
RT-RK <i>CrtYB</i> -R	CCGCTTCTTCAATCTCAA	Phytoene synthase and lycopene cyclase genes, <i>RK<i>CrtYB</i></i>

图 2 *RKAcat2* 与同源 *Acat2s* 的氨基酸序列比对Figure 2 Alignment of amino acid sequence of *RKAcat2* and homologous *Acat2s*

注: 其中下划线部分表示高度保守位点, 星号部分表示活性氨基酸位点

Note: The substrate binding domain is underlined, and the active amino acid sites are indicated with asterisks

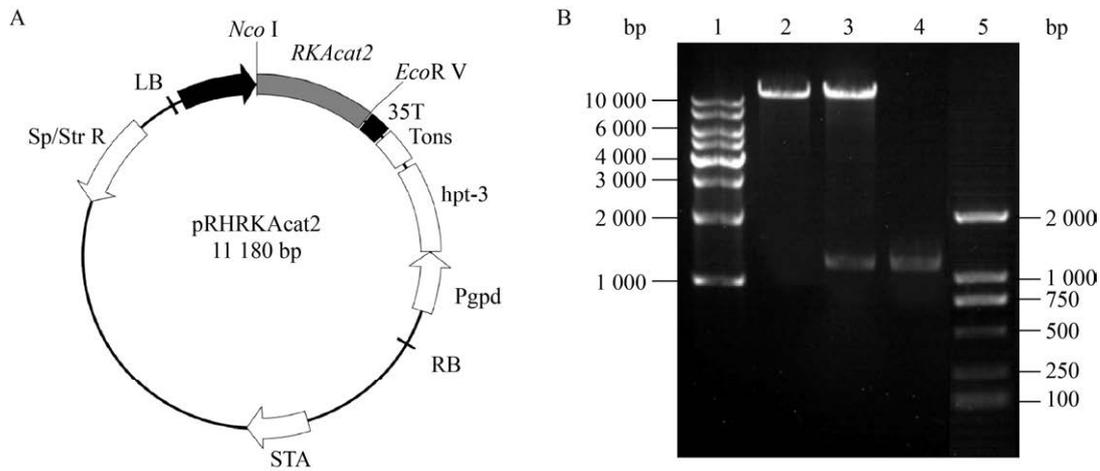


图 3 重组质粒 pRHRKAcac2 的构建及限制性酶切分析

Figure 3 Construction of recombinant plasmid pRHRKAcac2 and restriction enzyme analysis

注: A: pRHRKAcac2 质粒图谱; B: pRHRKAcac2 质粒酶切分析。1: DL10000 DNA Marker; 2: 质粒 pRH2034 的 *Nco I/EcoR V* 双酶切; 3: 重组质粒 pRHRKAcac2 的 *Nco I/EcoR V* 双酶切; 4: *RKAcat2* 基因的 PCR 产物; 5: DL2000 DNA MarkerNote: A: Map of recombinant plasmid pRHRKAcac2; B: Restrictive analysis of pRHRKAcac2. 1: DL10000 DNA Marker; 2: pRH2034 was digested by *Nco I* and *EcoR V*; 3: pRHRKAcac2 was digested by *Nco I* and *EcoR V*; 4: PCR product of *RKAcat2*; 5: DL2000 DNA Marker

与基因的 PCR 产物(图 3B 第 5 泳道)大小一致,大分子量条带与 pRH2034 双酶切产生的条带(图 3B 第 2 泳道)大小一致,而且 DNA 测序结果表明片段与目的序列一致,证明重组表达质粒构建成功。

2.3 *RKAcet2* 基因过表达对类胡萝卜素及其不同组分含量的影响

分析结果显示,过表达菌株 YM25235/pRHRKAcet2 的类胡萝卜素含量相比于对照菌株 YM25235 有明显提高,从 4.73 mg/g-DCW 提高到 7.12 mg/g-DCW,提高了 50.53%(表 2)。进一步通过 HPLC 分析 YM25235 中 4 种类胡萝卜素组分含量变化的结果显示, YM25235/pRHRKAcet2 菌株的红酵母红素、圆酵母素、 β -胡萝卜素及 γ -胡萝卜素含量相比于对照菌株均有提高,其中 β -胡萝卜素最为显著,达 4.64 mg/g-DCW(表 2)。这些结果表明,过表达 *RKAcet2* 基因可显著提高 YM25235 菌株的类胡萝卜素的合成,特别是 β -胡萝卜素。

2.4 *RKAcet2* 过表达对油脂产量的影响

因为油脂和类胡萝卜素的合成都以乙酰 CoA 为前体。在本研究中,过表达 *RKAcet2* 基因提高了 YM25235 中类胡萝卜素的含量,因此进一步对过表达菌株 YM25235/pRHRKAcet2 和对照菌株 YM25235 的油脂含量进行了测定。结果如表 3 所示,过表达菌株 YM25235/pRHRKAcet2 的油脂含量约为 4.52%,油脂含量相比于对照菌株(5.86%)下降了 22.80%。结果表明过表达 *RKAcet2* 基因会

减少 YM25235 菌株中油脂的积累。

2.5 *RKAcet2* 过表达对脂肪酸不同组分含量的影响

为了验证油脂中脂肪酸组分的变化,通过提取过表达菌株 YM25235/pRHRKAcet2 和对照菌株 YM25235 的总脂肪酸并进行 GC-MS 分析。结果显示,棕榈酸(Palmitic, C16:0)、棕榈油酸(Palmitoleic, C16:1)、硬脂酸(Stearic, C18:0)、亚油酸(Linoleic, C18:2 LA)、亚麻酸(Linolenic, C18:3 ALA)相较于对照菌株都略有上升但不显著,而油酸(Oleic acid, C18:1 OA)相较于对照菌株 YM25235 发生明显下降,从 22.67 mg/g-DCW 降至 18.64 mg/g-DCW,下降了 17.78%(表 4)。该结果表明, *RKAcet2* 基因的过表达促进 YM25235 菌株中油酸的降解脂肪酸的降解,产生更多的乙酰 CoA,同时引起油脂含量下降,这与上述油脂含量分析结果一致。

2.6 *RKAcet2* 过表达对胞内乙酰 CoA 水平的影响

乙酰 CoA 是类胡萝卜素和油脂(脂肪酸)的共同合成底物^[26]。本研究中,过表达 *RKAcet2* 基因提高了类胡萝卜素的含量,降低了油脂(脂肪酸)的含量。为了探究过表达 *RKAcet2* 基因后 YM25235 菌株内乙酰 CoA 含量的变化,对过表达菌株 YM25235/pRHRKAcet2 和对照菌株 YM25235 中的乙酰 CoA 含量进行了分析。分析结果显示 *RKAcet2* 基因过表达后,乙酰 CoA 含量为 0.15 mg/L,相较于对照菌株(0.18 mg/L)下降了 13.64%(表 5)。以上

表 2 *RKAcet2* 基因过表达对 YM25235 菌株中类胡萝卜素含量及其组分变化的影响

Table 2 Effect of *RKAcet2* overexpression on the content of total carotenoid and its composition in YM25235

菌株 Strains	类胡萝卜素组分 Carotenoid composition (mg/g-DCW)				总类胡萝卜素含量 Total carotenoid content (mg/g-DCW)
	红酵母红素 Torularhodin	圆酵母素 Torulene	γ -胡萝卜素 γ -carotene	β -胡萝卜素 β -carotene	
YM25235	1.12±0.05	0.60±0.03	0.16±0.01	2.97±0.13	4.73±0.21
YM25235/pRHRKAcet2	1.48±0.02*	0.93±0.02*	0.50±0.01*	4.64±0.07**	7.12±0.10**

注:表中数据为平均值±标准差,与 YM25235 菌株中总类胡萝卜素及其不同组分含量相比较有统计学差异。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$
Note: Data in table are mean \pm standard deviation. Compared with YM25235, the content of total carotenoid and four carotenoid composition in YM25235/pRHRKAcet2 showed statistical difference. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

表 3 *RKAcac2* 基因过表达对 YM25235 菌株中油脂含量的影响Table 3 Effect of *RKAcac2* overexpression on the lipid content in YM25235

菌株 Strains	油脂含量 Lipid content (%)
YM25235	5.86±0.17
YM25235/pRHRKAcac2	4.52±0.23*

注: 表中数据为平均值±标准差; *: $P < 0.05$

Note: Data in table are mean ± standard deviation. Compared with YM25235; *: $P < 0.05$

结果表明, 在红冬孢酵母 YM25235 中过表达 *RKAcac2* 基因能够更有效地利用乙酰 CoA 进入 MVA 途径, 导致胞内乙酰 CoA 含量下降, 从而促进类胡萝卜素的合成。

2.7 *RKAcac2* 过表达对产类胡萝卜素相关基因转录水平的影响

为了分析 *RKAcac2* 基因过表达促使红冬孢酵母 YM25235 类胡萝卜素合成增加的潜在分子机理, 通过 RT-qPCR 分析了与类胡萝卜素合成相关基因的转录水平变化。结果表明, 过表达菌株 YM25235/pRHRKAcac2 的 MVA 途径中 *RKAcac2*、*RKHMGCRCR* 和 *RKMK* 基因和类胡萝卜合成相关的基因 *RKCrtYB* 的转录水平相较于对照菌株有显著提高, 分别提高 2.79、1.60、3.38 和 4.26 倍 (图 4)。这些结果表明, *RKAcac2* 基因过表达提高了 MVA 途径 *RKAcac2*、*RKHMGCRCR*、*RKMK* 基因以及类胡萝卜素合成途径中 *RKCrtYB* 基因的转录水平, 最终提高了过表达菌株中类胡萝卜素的含量。

表 4 *RKAcac2* 基因过表达对 YM25235 菌株中脂肪酸组分含量变化的影响Table 4 Effect of *RKAcac2* overexpression on the content of fatty acid compositions in YM25235

菌株 Strains	脂肪酸组分 Fatty acid composition (mg/g-DCW)						
	C17:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 OA	C18:2 LA	C18:3 ALA
YM25235	15.00±0.57	4.15±0.33	0.82±0.10	0.64±0.06	22.67±0.89	8.69±0.41	1.09±0.10
YM25235/pRHRKAcac2	15.00±0.61	4.03±0.17	0.58±0.12	0.94±0.02	18.64±0.54*	8.08±0.23	1.07±0.07

注: C17:0: 十七烷酸; C16:0: 棕榈酸; C16:1: 棕榈油酸; C18:0: 硬脂酸; C18:1 OA: 油酸; C18:2 LA: 亚油酸; C18:3 ALA: 亚麻酸。表中数据为平均值±标准差; *: $P < 0.05$

Note: C17:0: Heptadecanoic acid; C16:0: Palmitic acid; C16:1: Palmitoleic acid; C18:0: Stearic acid; C18:1 OA: Oleic acid; C18:2 LA: Linoleic acid; C18:3: ALA α -linolenic acid. Data in table are mean ± standard deviation. Compared with YM25235; *: $P < 0.05$

3 讨论与结论

包括类胡萝卜素在内的许多具有重要生理功能的类异戊二烯化合物具有复杂的化学性质, 通过传统的化学合成方法合成这些化合物异常困难^[27]。代谢工程是一种利用定向基因操作来重组细胞代谢的实践, 能将生物体转化为单细胞化学工厂, 利用更可持续的生物过程, 生产更复杂的化合物, 这对于难以使用传统化学方法合成的化学物质尤为重要^[5]。通过代谢工程使得微生物能够高效益、低成本生产类胡萝卜素成为了一种潜在的替代途径, 并且已经在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)等模式微生物中的研究取得了进展, 具有很大的商业化应用前景^[5]。然而, 包括红冬孢酵母在内的产油红酵母由于其产油的特性, 通过降低其产油的代谢流将其引入产类胡萝卜素的代谢通路具有更大的优势^[28], 但相关的研究结果却鲜有报道。

MVA 途径上的 *Acat* 属于 II 型硫解酶 *Acat2*^[14], 与 I 型 *Acat* (*Acat1*) 一样, *Acat2* 也具有一个硫解酶保守位点和 Cys-His-Cys 催化三联体^[25]。硫解酶保守位点的功能目前尚不清楚, 但 Cys-His-Cys 催化三联体中 2 个保守的 Cys 残基分别参与形成乙酰-酶复合体^[29]和使第 2 个乙酰 CoA 底物去质子化, 参与缩和反应中的去质子化^[30], 而保守的 His 残基与乙酰 CoA 的硫酯羰基相互作用^[31]。序列分析结果表明, 红冬孢酵母 *RKAcac2* 与酵母来源的 *Acat2* 具有最大的相似

表 5 *RKAcat2* 基因过表达对 YM25235 菌株中乙酰 CoA 含量的影响

Table 5 Effect of *RKAcat2* overexpression on the acetyl-CoA content in YM25235

菌株	乙酰 CoA 含量
Strains	Acetyl-CoA content (mg/L)
YM25235	0.18±0.01
YM25235/pRHRKAcat2	0.15±0.01

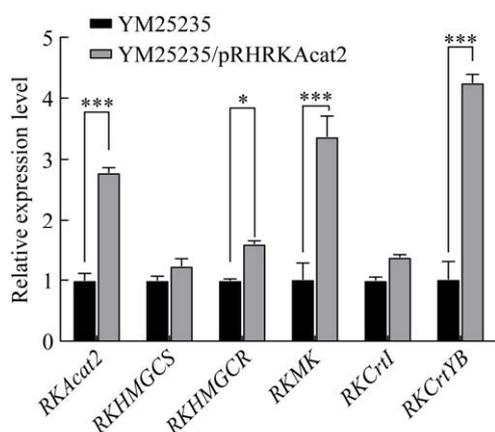


图 4 *RKAcat2* 基因过表达对 YM25235 菌株中类胡萝卜素合成相关基因转录水平的影响

Figure 4 Effect of overexpression of *RKAcat2* on transcript levels of carotenoid synthesis related genes in strain YM25235

注: 图中显示 3 次独立实验的平均值±标准差。*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$

Note: Graphs show the mean ± standard deviation of three independent experiments. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$

性, 但不完全相同; 而且红冬孢酵母 *RKAcat2* 同样具有 *Acat2* 蛋白特征性硫解酶保守位点 NVNGGAIALGHPLAAS (位于氨基酸位点 342–357), 以及 3 个活性氨基酸位点 Cys⁸⁸、His³⁵¹、Cys³⁸² (图 2)。这些结果表明, 获得的 *RKAcat2* 基因是一个新的潜在的编码 *Acat2* 蛋白的基因。

乙酰 CoA 是类胡萝卜素和油脂(脂肪酸)合成的共同前体^[31-32], 可以推测: 作为 MVA 途径第一步反应, 提高 YM25235 菌株中 *Acat2* 的表达水平可促进更多乙酰 CoA 进入 MVA 途径, 显著提高类胡萝卜素等异戊二烯衍生物的合成水平。我们

的分析结果也显示, 过表达 *RKAcat2* 基因导致 YM25235 菌株中类胡萝卜素含量显著提高, 表明方法是可行的。此外, 有研究表明, 粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 在葡萄糖不足或饥饿条件下, 选择性降解棕榈酸和油酸产生乙酰 CoA, 导致油脂的积累减少, 但提高了类胡萝卜素的产量^[33]。我们的分析结果同样显示, 培养 168 h 后, 培养基中葡萄糖耗尽, 但过表达菌株 YM25235/pRHRKAcat2 中油脂累积则发生明显下降, 而且脂肪酸组分中油酸含量也发生显著下降, 表明过表达 *RKAcat2* 基因可能促进了油酸降解产生乙酰 CoA, 导致油脂累积下降, 同时促进更多的乙酰 CoA 进入 MVA 途径, 提高了类胡萝卜素的产量, 这在类胡萝卜素相关基因的转录水平和胞内乙酰 CoA 含量分析也得到证明。因此, 调节乙酰 CoA 的代谢流可以影响不同代谢终产物的合成水平。

MVA 途径对包括类胡萝卜素在内的萜类及其衍生物的含量具有重要调节作用^[34], 并且一些研究也通过对 MVA 途径相关基因的过表达得到了类似的结果。比如, 在番茄中过表达芥菜 *HMGCS* 基因显著提高甾醇、类胡萝卜素等物质含量^[35], 而在酿酒酵母中, 过表达 *HMGCR* 基因使得 β -胡萝卜素的产量提高了 35.1%, 如果同时抑制麦角固醇合成则提高了 106.8%^[36]。*Acat2* 基因作为 MVA 途径第一个关键酶基因, Sando 等发现在酵母异源性系统中, 橡胶 *Acat2* 基因的表达能促进酵母生长^[37]; Soto 等发现 *Acat* 参与苜蓿的非生物适应性反应, 苜蓿 *Acat* 在转基因植物中过表达, 表现耐盐性状^[38]。然而, 通过 *Acat2* 基因过表达来提高类胡萝卜素合成相关途径的代谢流, 促进类胡萝卜素合成的相关研究还鲜有报道。本研究结果表明 *RKAcat2* 基因的过表达能够导致更多乙酰 CoA 进入 MVA 途径, 从而提高 YM25235 菌株中类胡萝卜素及其特定组分的含量。因此, 本研究为进一步筛选类胡萝卜素高产菌株和工艺化生产类胡萝卜素的研究与应用奠定了基础, 也为利用产油红酵母进行相关的代谢工程研究提供参考。

REFERENCES

- [1] Ashour M, Wink M, Gershenzon J. Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes[M]. New York: American Cancer Society, 2018: 258-303
- [2] Mohamadin AM, Elberry AA, Mariee AD, Morsy GM, Al-Abbasi FA. Lycopene attenuates oxidative stress and heart lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in rats: a biochemical study[J]. Pathophysiology, 2012, 19(2): 121-130
- [3] Fraser PD, Bramley PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids[J]. Progress in Lipid Research, 2004, 43(3): 228-265
- [4] Zakynthinos G, Varzakas T. Carotenoids: from plants to food industry[J]. Current Research in Nutrition and Food Science Journal, 2016, 4(1): 38-51
- [5] Ward VCA, Chatzivasileiou AO, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of isoprenoids[J]. FEMS Microbiology Letters, 2018, 365(10): fny079
- [6] Kot AM, Błażej S, Kurcz A, Gientka I, Kieliszek M. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(14): 6103-6117
- [7] Xu ZX, Li MJ, Men X, Chen GQ, Wang JM, Xian M, Zhang HB. Progress in metabolic pathway bypass regulation strategies of the mevalonate pathway[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2020, 18(1): 44-51 (in Chinese)
徐镇祥, 李美洁, 门潇, 陈国强, 王纪明, 咸漠, 张海波. 甲羟戊酸途径的代谢支路调控策略的研究进展[J]. 生物加工过程, 2020, 18(1): 44-51
- [8] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(7): 796-802
- [9] Vadali RV, Fu Y, Bennett GN, San KY. Enhanced lycopene productivity by manipulation of carbon flow to isopentenyl diphosphate in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Progress, 2005, 21(5): 1558-1561
- [10] Yoon SH, Lee SH, Das A, Ryu HK, Jang HJ, Kim JY, Oh DK, Keasling JD, Kim SW. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of beta-carotene in *E. coli*[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(3/4): 218-226
- [11] Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants[J]. Natural Product Reports, 1999, 16(5): 565-574
- [12] Newman JD, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 34(2): 95-106
- [13] Yang SY, Yang XY, Healy-Louie G, Schulz H, Elzinga M. Nucleotide sequence of the *fadA* gene. Primary structure of 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase from *Escherichia coli* and the structural organization of the *fadAB* operon[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(18): 10424-10429
- [14] Heath RJ, Rock CO. The Claisen condensation in biology[J]. Natural Product Reports, 2002, 19(5): 581-596
- [15] Cui JJ, He SW, Ji XL, Lin LB, Wei YL, Zhang Q. Identification and characterization of a novel bifunctional Δ^{12}/Δ^{15} -fatty acid desaturase gene from *Rhodospiridium kratochvilovae*[J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(7): 1155-1164
- [16] Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. Oily yeasts as oleaginous cell factories[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(4): 1219-1227
- [17] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. The Proteomics Protocols Handbook[M]. Totowa: Humana Press, 2005: 571-607
- [18] Yang MZ, Derbyshire MK, Yamashita RA, Marchler-Bauer A. NCBI's conserved domain database and tools for protein domain analysis[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2020, 69(1): e90
- [19] Liu YB, Koh CMJ, Sun LH, Hlaing MM, Du M, Peng N, Ji LH. Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *RtGPD1* and development of genetic transformation method by dominant selection in oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(2): 719-729
- [20] Yang WZ, Cao XJ, Li JS, Zeng M, Zhou SS, Wei XG. Improvement of determination of total carotenoids in seabuckthorn oil by UV spectrophotometry[J]. Journal of Minzu University of China: Natural Sciences Edition, 2009, 18(3): 5-8 (in Chinese)
杨万政, 曹秀君, 李金淑, 曾鸣, 周珊珊, 魏小刚. 紫外分光光度法测定沙棘油中总类胡萝卜素方法改进[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2009, 18(3): 5-8
- [21] Wei N, Xu Q, Zhang N, Li XG, Xiao YN, Li BX. Extraction and identification of carotenoids in *Sporobolomyces pararoseus*[J]. Food Science, 2014, 35(19): 133-137 (in Chinese)
魏娜, 徐琼, 张宁, 李显贵, 肖亦农, 李炳学. 掷孢酵母类胡萝卜素的提取与鉴定[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 133-137
- [22] Bernhards Y, Pöggeler S. The phocein homologue SmMOB₃ is essential for vegetative cell fusion and sexual development in the filamentous ascomycete *Sordaria macrospora*[J]. Current Genetics, 2011, 57(2): 133-149
- [23] Pöggeler S, Nowrousian M, Ringelberg C, Loros JJ, Dunlap JC, Kück U. Microarray and real-time PCR analyses reveal mating type-dependent gene expression in a homothallic fungus[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2006, 275(5): 492-503
- [24] Chen Q, Yan J, Meng X, Xu F, Zhang W, Liao Y, Qu J.

- Molecular cloning, characterization, and functional analysis of acetyl-CoA C-acetyltransferase and mevalonate kinase genes involved in terpene trilactone biosynthesis from *Ginkgo biloba*[J]. *Molecules*, 2017, 22(1):74
- [25] Li Q, Meng QW, Lü FG, Guo WC, Li GQ. Identification of ten mevalonate enzyme-encoding genes and their expression in response to juvenile hormone levels in *Leptinotarsa decemlineata* (Say)[J]. *Gene*, 2016, 584(2): 136-147
- [26] Krivoruchko A, Zhang YM, Siewers V, Chen Y, Nielsen J. Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 28-42
- [27] Langenheim JH. Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1994, 20(6): 1223-1280
- [28] Tkáčová J, Klempová T, Čertík M. Kinetic study of growth, lipid and carotenoid formation in β -carotene producing *Rhodotorula glutinis*[J]. *Chemical Papers*, 2018, 72(5): 1193-1203
- [29] Gehring U, Harris JI. The active site cysteines of thiolase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1970, 16(3): 492-498
- [30] Palmer MAJ, Differding E, Gamboni R, Williams SF, Peoples OP, Walsh CT, Sinskey AJ, Masamune S. Biosynthetic thiolase from *Zoogloea ramigera*: evidence for a mechanism involving Cys-378 as the active site base[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(13): 8369-8375
- [31] Miziorko HM. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 505(2): 131-143
- [32] Ke J, Behal RH, Back SL, Nikolau BJ, Wurtele ES, Oliver DJ. The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A synthetase in fatty acid synthesis in developing *Arabidopsis* seeds[J]. *Plant Physiology*, 2000, 123(2): 497-508
- [33] Tkáčová J, Čaplová J, Klempová T, Čertík M. Correlation between lipid and carotenoid synthesis in torularhodin-producing *Rhodotorula glutinis*[J]. *Annals of Microbiology*, 2017, 67(8): 541-551
- [34] Bach TJ, Boronat A, Caelles C, Ferrer A, Weber T, Wettstein A. Aspects related to mevalonate biosynthesis in plants[J]. *Lipids*, 1991, 26(8): 637-648
- [35] Liao P, Chen X, Wang M, Bach TJ, Chye ML. Improved fruit α -tocopherol, carotenoid, squalene and phytosterol contents through manipulation of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase1 in transgenic tomato[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(3): 784-796
- [36] Yan GL, Wen KR, Duan CQ. Enhancement of β -carotene production by over-expression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol biosynthesis inhibitors in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Current Microbiology*, 2012, 64(2): 159-163
- [37] Sando T, Takaoka C, Mukai Y, Yamashita A, Hattori M, Ogasawara N, Fukusaki E, Kobayashi A. Cloning and characterization of mevalonate pathway genes in a natural rubber producing plant, *Hevea brasiliensis*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72(8): 2049-2060
- [38] Soto G, Stritzler M, Lisi C, Alleva K, Pagano ME, Ardila F, Mozzicafreddo M, Cuccioloni M, Angeletti M, Ayub ND. Acetoacetyl-CoA thiolase regulates the mevalonate pathway during abiotic stress adaptation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(15): 5699-5711