

代谢工程改造大肠杆菌合成酪醇

薛宇翔^{1,2}, 陈献忠^{*1,2}, 杨翠^{1,2}, 沈微^{1,2}, 樊游^{1,2}

(1. 江南大学, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 酪醇是一种天然存在于橄榄油、酒及绿茶中的酚类化合物。由于酪醇具有抗炎症和抗氧化的生理活性,因此广泛应用于医药、化工等工业领域。传统的酪醇生产方法是化学合成法,但是这些方法存在着工艺复杂、得率低和环境污染等问题。另外,植物中较低的酪醇含量也限制了酪醇的分离纯化工工艺研究。因此微生物发酵法生产酪醇研究越来越受到重视。通过在大肠杆菌内异源表达酿酒酵母中的丙酮酸脱羧酶基因 ARO10,成功构建了合成酪醇的重组大肠杆菌。通过敲除预苯酸脱水酶编码基因 *pheA* 和苯乙醛脱氢酶编码基因 *feaB*,提高了酪醇的合成能力。在最适的培养条件下,过表达 ARO10 基因的重组菌利用 10 g/L 葡萄糖作为碳源,发酵 48 h 酪醇产量可达 4.15 mmol/L。研究发现,发酵培养基中外源添加酪氨酸能够提高重组大肠杆菌的酪醇合成能力。同时,研究还发现在大肠杆菌细胞中存在能够催化酪氨酸合成酪醇的前体物质 4-羟基苯丙酮酸的酶。为工业水平微生物发酵法合成酪醇提供了思路。

关键词: 酪醇;丙酮酸脱羧酶;大肠杆菌;基因敲除

中图分类号:Q 815 文章编号:1673-1689(2019)10-0152-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.021

Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Tyrosol Synthesis

XUE Yuxiang^{1,2}, CHEN Xianzhong^{*1,2}, YANG Cui^{1,2}, SHEN Wei^{1,2}, FAN You^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Tyrosol (2- (4-hydroxyphenyl) ethanol) is an attractive phenolic compound that is naturally found in several foods such as olive oil, wines and green tea. Tyrosol has widely used in pharmaceutical, chemical and other industrial fields because of its anti-inflammatory and antioxidant activities. Traditionally, tyrosol is often produced chemically in industrial scale, however complex process, low yield and environmental issues are hampers. On the other hand, it would be hard to purify tyrosol from olive oil at an industrial scale because of its low concentration, absence of effective separation methods. Therefore, biotechnological production of tyrosol has been paid more and more attention. In this study, the phenylpyruvate decarboxylase gene ARO10 was cloned from *Saccharomyces cerevisiae* and introduced into *Escherichia coli* to generate a recombinant tyrosol

收稿日期: 2017-02-17

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP51611A)。

* 通信作者: 陈献忠(1980—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事发酵工程专业领域研究。E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

引用本文: 薛宇翔,陈献忠,杨翠,等. 代谢工程改造大肠杆菌合成酪醇[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(10):152-159.

producer. Furthermore, the genes of *pheA* and *feaB* encoding prephenate dehydratase and the endogenous phenylacetaldehyde dehydrogenase respectively, were deleted sequentially to improve tyrosol synthesis. Under the optimal fermentation conditions, the recombinant strain overexpressing ARO10 gene produced 4.15 mmol/L tyrosol from 10 g/L glucose in 48 h. Moreover, it shows that adding tyrosine in M9Y medium could increase tyrosol titer. Meanwhile, it also shows that it had several enzymes that converted tyrosine into 4-hydroxyphenylpyruvate. In summary, we successfully engineered a novel metabolic pathway in *E. coli* capable of producing tyrosol and provided a strategy for microbial tyrosol production in an industrial-scale.

Keywords: tyrosol, pyruvate decarboxylase, *Escherichia coli*, gene knockout

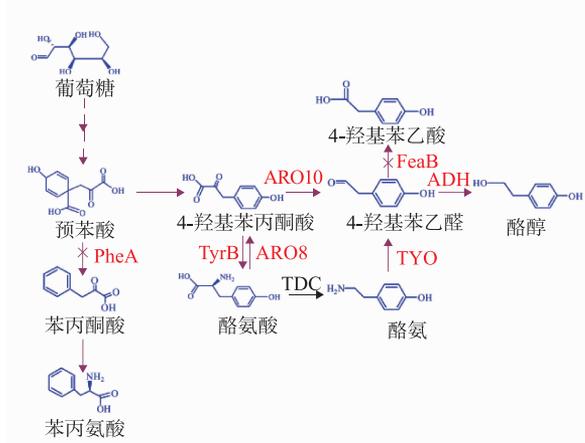
酪醇,即4-(2-羟基乙基)苯酚,作为一种重要的芳香族化合物,是天然的抗氧化剂,也是苯乙醇的衍生物^[1]。酪醇天然存在于橄榄油、绿茶及酒中^[2-4],它可以保护细胞免受氧化伤害。酪醇及其衍生物具有多方面的生理学活性^[5],如抗疲劳、抗缺氧、抗应激、抗寒冷、镇静等的药理作用^[2,6],进而运用在相关药物(主要是治疗心血管疾病的药物)的研发生产上^[7]。随着对酪醇的生理功能的研究进一步加深,酪醇的生产也受到越来越多的关注。

现阶段,酪醇制备方法主要是天然材料提取法和化学法合成法。对于天然材料提取来说,酪醇可以从橄榄或橄榄油制备过程中产生的废水中提取分离纯化获得。天然提取制备酪醇存在很多弊端,对于橄榄油提取酪醇,其回收率和纯度极低,成本投入高,这些问题在工业大规模化生产应用时会带来很大的阻力^[8]。化学合成法主要是以对羟基苯乙烯、对羟基苯乙胺等为原料合成酪醇,生产原料价格昂贵,且在生产过程中会产生对环境有害物质,这些问题制约了大规模化、工业化生产^[9-10]。

近年来,研究者尝试通过生物发酵法来合成酪醇,由于生物合成有能够减少对环境的污染及方便后续酪醇的提取,同时不依赖于植物资源等优点,备受关注。在自然界中,存在两种生物合成途径,见图1,一种是酿酒酵母生物合成途径:酪氨酸(TYR)经过芳香族氨基酸氨基转移酶(ARO8)作用脱去氨基,再经丙酮酸脱羧酶(ARO10)的作用脱羧,最后在乙醇脱氢酶的作用下合成酪醇^[11-13];一种是酪氨酸经酪氨酸脱羧酶(TDC)的作用生成酪胺,酪胺进一步在酪胺氧化酶(TYO)和乙醇脱氢酶(ADH)的作用下生成酪醇^[1]。研究者在酿酒酵母中过表达 ARO8 及 ARO10 基因,以苯丙氨酸为底物,可以提

高的苯乙醇合成能力,重组菌的苯乙醇的产量比野生型的提高了 36.8%^[14]。为了构建产红景天苷的大肠杆菌,研究者在大肠杆菌异源表达 ARO10 和葡萄糖基转移酶等关键基因,并进行代谢途径改造,重组菌能够合成红景天苷和其前体物质酪醇^[1]。

本研究在 *E. coli* 中异源表达 ARO10 基因,并通过敲除预苯酸脱水酶编码基因 *pheA* 和苯乙醛脱氢酶编码基因 *feaB*,阻断了苯丙氨酸途径及 4-羟基苯乙酸合成途径,改善了酪醇的合成能力,通过培养条件的优化,提高了酪醇的产量。在外源添加酪氨酸的发酵培养基中,重组菌合成酪醇的能力有所提高。



注:预苯酸脱水酶(Phe),酪胺氧化酶(TYO),芳香族氨基酸氨基转移酶(ARO8),酪氨酸脱羧酶(TDC),酪胺氧化酶(TYO),乙醇脱氢酶(ADH),苯乙醛脱氢酶(FeaB),丙酮酸脱羧酶(ARO10)

图1 酪醇的生物合成途径
Fig. 1 Biosynthesis pathway of tyrosol

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒 菌株: 大肠杆菌 (*Escherichia coli* BL21 (DE3))、*E. coli* JM109, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* EBY100) 均为江南大学生物资源与生物能源研究中心保藏。

质粒:pRSFDuet-1、pKD13、pKD46、pCP20 由本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶及蛋白分子量 marker 均购自 TaKaRa 生物技术公司。B 型质粒少量快速提取试剂盒及 DNA 纯化与割胶回收试剂盒均购自北京博大泰克生物基因技术有限公司。氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kan) 与异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自上海生工生物工程有限公司, 酪氨酸和酪醇标准品购自 SIGMA (上海) 公司, 其他的分析纯级试剂购自上海生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基和培养条件 LB 培养基: 酵母粉 0.5%, 蛋白胨 1%, 氯化钠 1%, 固体培养基加琼脂粉 2%, 121 °C 下灭菌 20 min。

M9Y 培养基: 葡萄糖 1%, 酵母粉 0.025%, 七水

磷酸氢二钠 1.28%, 磷酸二氢钾 0.3%, 氯化钠 0.05%, 氯化铵 0.1%, 115 °C 下灭菌 15 min。转接时需添加分开灭菌的硫酸镁溶液, 其最终浓度应为 5 mmol/L。

种子培养: 划单菌落到 LB 液体培养基, 在 37 °C、200 r/min 的条件下培养约 12 h。用紫外分光光度仪测定种子培养液的 OD₆₀₀, 转接 1 mL 种子培养液到 50 mL 的 LB 液体培养基中。

诱导培养: 将培养基在 37 °C、200 r/min 的条件下培养, 控制培养液 OD₆₀₀ 在 0.6~0.8, 添加一定量的 IPTG, 在 30 °C、200 r/min 的条件下培养 10 h。

发酵培养: 将诱导表达后的培养液于 4 °C、7 000 r/min 的条件下离心 3 min, 并用无菌水离心洗涤, 收集菌体。转接入 M9Y 培养基在 30 °C、200 r/min 的条件下, 发酵培养 48 h。

1.2.2 目的基因的克隆 本研究中所用引物见表 1, 引物由上海生工生物工程技术服务部合成。根据 NCBI 公布的酿酒酵母 (*S. cerevisiae* EBY100) 丙酮酸脱羧酶基因 ARO10 (GenBank ID: 851987) 序列设计引物 ARO10U 和 ARO10D。PCR 扩增参数: 95 °C 变性 5 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环后 16 °C 保温 30 min, 得到目的基因 ARO10。

表 1 基因 PCR 扩增引物列表

Table 1 List of primers in this study

引物	核苷酸序列 (5'-3')
ARO10U	CATGCCATGGATGGCACCTGTTACAATTG
ARO10D	CGGGCGCGGATCCCTATTTTTTATTTCTT
YfeaBU	ATGACAGAGCCGCATGTAGCAGTATTAAGCCAGGTCCAACAGTTTCTCGAGTGTGGCTGGAGCTGCCTC
YfeaBD	TTAATACCGTACACACACCGCTTAGTTTCACACCAACCGTCCAGCCAGTATTCCGGGGATCCGTCGACC
YpheAU	AGGCAACACTATGACATCGGAAAACCCGTTACTGGCGCTGCGAGAGAAAAGTGTGGCTGGAGCTGCCTC
YpheAD	TCAGGTTGGATCAACAGGCACTACGTTCTCACTTGGGTAACAGCCCAATAATTCCGGGGATCCGTCGACC
YtyrBU	GTCTGTACTA CAACGAAGAC GGAATTATTC CACAACCTGCA AGCCGTGGCGGTGTAGGCTGGAGCTGCCTC
YtyrBD	TTACATCACCGCAGCAAACGCCTTTGCCACACGTTGTACA TTTGCCGTATATTCCGGGGATCCGTCGACC
NfeaBU	GTCGCT GCCTTTTACTTCCT
NfeaBD	ACCGGTCTTG GACAATACAG
NpheAU	CGCGTCCCTTATATTGAGTGTATCGC
NpheBD	TGCTGCGTTTTTCAGACTGAAAGC
NtyrBU	TGCTGCGTTTTTCAGACTGAAAGC
NtyrBD	TATTTCACTGCA GGCTGGGTAG

1.2.3 重组表达载体的构建 将 ARO10 基因 PCR 产物与 pRSFDUet-1 质粒同时用 *NcoI* 与 *BamHI* 双酶切后,纯化处理,用 T4 DNA 连接酶进行连接,16℃ 反应 12 h,得到表达载体 pRSFDUet-ARO10,转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,提取质粒酶切鉴定。

1.2.4 *feaB*、*pheA* 和 *tyrB* 基因的敲除 制备含有 pKD46 的 *E. coli* BL21(DE3)电转化感受态细胞^[15],将由引物 YfeaBU 和 YfeaBD(表 1)扩增获得的 DNA 片段(*feaB* 上下游同源序列、FRT 位点和 *kan* 基因),电转化入含有 pKD46 的 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,电转化条件为 2 mm 电转杯、电压 2 500 V,电转化后 37℃ 下培养 2 h,涂布于 Amp 和 Kan 双抗性 LB 平板上。突变盒片段进入细胞后,在 pKD46 辅助质粒所表达的重组蛋白的帮助下,同源臂基因与大肠杆菌基因组发生同源重组,使 *feaB* 基因区域被敲除框替换,即 *feaB* 被 *kan* 替换,因此,重组菌可在 Kan 抗性平板上生长。平板培养 12 h 后挑取单菌落,用鉴定性引物 NfeaBU 和 NfeaBD(表 1)PCR 扩增,通过确定敲除框上下游是否正确交换来鉴定的敲除。之后将 pCP20 质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) Δ *feaB*:*kan* 菌株中,42℃ 培养 12 h,取菌液稀释,涂布于 LB 固体平板。pCP20 质粒含编码 FLP 重组酶的基因,可介导 2 个 FRT 位点间的切除,从而消除 *kan* 基因。pCP20 为温敏型质粒,培养温度高于 37℃ 时会自动丢失,因此挑取单菌落分别点到 Kan 抗性 LB 平板和 LB 平板上培养 12 h,挑取在 LB 固体培养基平板上生长而 Kan 抗性平板上不生长的菌落,即为 *E. coli* BL21(DE3) Δ *feaB*。

制备含有 pKD46 的 *E. coli* BL21(DE3) Δ *feaB* 的感受态细胞,将由引物 YpheAU 和 YpheAD(表 1)扩增获得的 DNA 片段(含 *pheA* 上下游同源序列、FRT 位点和 *kan* 基因),利用同上的电转化技术,转入含有 pKD46 的 *E. coli* BL21(DE3) Δ *feaB* 的感受态细胞。利用同上的方法,最终得到了 *E. coli* BL21(DE3) Δ *feaB* Δ *pheA*。

制备含有 pKD46 的 *E. coli* BL21(DE3)的感受态细胞,将引物 YtyrBU 和 YtyrBD(表 1)扩增获得 DNA 片段(含 *tyrB* 上下游同源序列、FRT 位点和 *kan* 基因),利用电转化技术,转入含有 pKD46 的 *E. coli* BL21(DE3)的感受态细胞,经标记基因弹出后,最终获得 *E. coli* BL21(DE3) Δ *tyrB*。

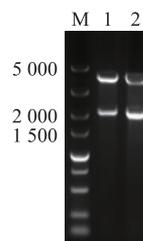
1.2.5 酪醇和酪氨酸的高效液相测定 使用高效液相色谱(HPLC)。色谱条件如下:HPLC 色谱柱为 COSMOSIL-5C18-MS-II(3.0 ID×150 mm)^[16]。流动相 A 为 0.1%三氟乙酸,流动相 B 为纯甲醇,柱温为 30℃,紫外检测器,流速设置为 0.4 mL/min。流动相需用 0.22 μm 孔径的水系膜进行真空抽滤,使用前超声 10 min 除去气泡。

样品处理:取发酵液 100 mL,12 000 r/min 离心 5 min 收集上清,经 0.22 μm 孔径滤膜过滤后加入 HPLC 样品瓶对发酵液中的酪醇和酪氨酸含量进行检测^[17]。

2 结果与分析

2.1 产酪醇的重组大肠杆菌构建

2.1.1 重组质粒的构建 以酿酒酵母(*S. cerevisiae* EBY100)染色体 DNA 为模版,PCR 扩增得到 ARO10 基因片段,目的基因经 *NcoI* 与 *BamHI* 酶切纯化后插入到表达载体 pRSFDUet-1 的相应酶切位点上,获得重组表达载体 pRSFDUet-ARO10,酶切验证(如图 2 所示),ARO10 片段大小为 1 908 bp,与预期结果一致,证明表达载体 pRSFDUet-ARO10 构建成功。



M:DNA Marker; 1,2:pRSFDUet-ARO10(*NcoI*/*BamHI*)

图 2 酶切产物电泳检测图

Fig. 2 Enzyme-digested product of the recombinant plasmid pRSFDUet-ARO10

2.1.2 重组菌发酵生产酪醇 将 pRSFDUet-1 质粒和重组表达载体 pRSFDUet-ARO10 分别导入 *E. coli* BL21(DE3)中,获得重组菌 BE0 和重组菌 BE1,两株重组菌发酵培养 48 h,发酵结果如图 3 所示。由图 3 可知,重组菌 BE0 发酵液中未检测到酪醇,可见大肠杆菌本体内不能合成酪醇。重组菌株 BE1 的酪醇产量达到 0.35 mmol/L,可知通过丙酮酸脱羧酶编码基因 ARO10 异源表达,可以建立 *E. coli* 合成酪醇的途径。另一方面,虽然重组质粒进行游离

表达,而且带有 T7 的强启动子,但是酪醇的产量还是较低的,这说明重组 *E. coli* 从葡萄糖到酪醇的合成途径较长,而且芳香族氨基酸合成途径中存在的反馈调节,也可能阻碍酪醇的合成。

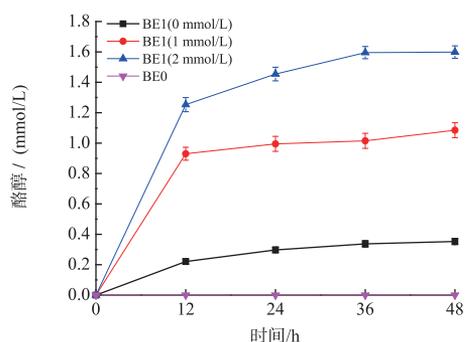


图3 外源添加酪氨酸对重组菌 BE1 酪醇合成的影响及重组菌 BE0 发酵生产酪醇过程

Fig. 3 Effect of supplementing tyrosine on the tyrosol production for the recombinant strain BE1 and the course of producing tyrosol by the recombinant strain BE0

2.2 外源添加酪氨酸对重组菌 BE1 酪醇合成的影响

由图 1 代谢途径可知,酪氨酸和酪醇合成过程中需要利用相同的前体—4-羟基苯丙酮酸(4HPP)。因此,推测胞内的酪氨酸浓度可能会影响酪醇的合成。通过添加不同浓度(0、1.0、2.0 mmol/L)的酪氨酸考察了重组菌 BE1 对酪醇的产量的影响。发酵结果及酪醇产量提高率如图 3 和表 2 所示。

表 2 添加不同浓度酪氨酸时重组菌 BE1 合成酪醇的产量

Table 2 Tyrosol production of different concentration tyrosine supplemented in M9Y for BE1

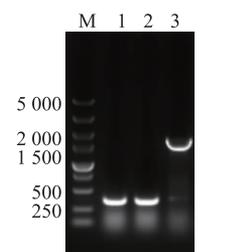
酪氨酸添加量/(mmol/L)	酪醇产量/(mmol/L)	酪醇产量提高率/%	酪氨酸残留量
0	0.35±0.02	—	ND
1	1.08±0.05	209	ND
2	1.64±0.04	369	ND

注:ND 代表未检出

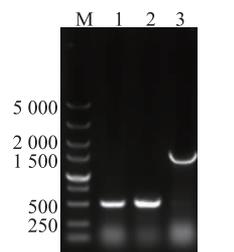
从图 3 中可以得出,发酵培养基中添加不同浓度的酪氨酸,酪醇的产量都有了较大的提高。发酵液中未检测到酪氨酸,说明发酵液中几乎没有酪氨酸残留。从代谢途径上可以推测重组菌 BE1 中大肠杆菌本体内基因 *tyrB* 可能导致酪氨酸生成 4-羟基苯丙酮酸,进而产生了酪醇。根据以上结果,决定保留该菌株的酪氨酸合成途径。

2.3 改造旁路代谢途径并提高酪醇产量

2.3.1 敲除基因 *feaB* 和 *pheA* 由代谢途径(图 1)分析可知,敲除 *feaB* 和 *pheA* 基因,可以阻断 4-羟基苯乙酸的合成途径和苯丙氨酸代谢途径,推测可能提高酪醇产量。因此,进一步构建含有 *feaB* 基因同源臂和 *kan* 抗性基因的删除盒并转化 *E. coli* BL21(DE3)菌株,筛选转化子并经诱导弹出 *kan* 抗性基因。突变株的 PCR 鉴定结果如图 4(a)所示,原始菌株 PCR 产物大小为 1 780 bp,抗性基因弹出后的突变株 PCR 产物大小为 398 bp,与预期结果一致,证明成功敲除了 *feaB* 基因。在敲除 *feaB* 基因的基础上,敲除 *pheA* 基因,阻断苯丙氨酸代谢途径。将 *kan* 抗性基因整合 *E. coli* BL21 (DE3) $\Delta feaB$ 菌株的 *pheA* 基因位点,转入 pCP20 质粒消除 Kan 抗性后转化子验证,结果如图 4(b)所示,原始序列为 1 658 bp,突变株 499 bp。与预期结果一致,证明成功敲除了 *pheA* 基因。



(a) 大肠杆菌 *feaB* 基因敲除



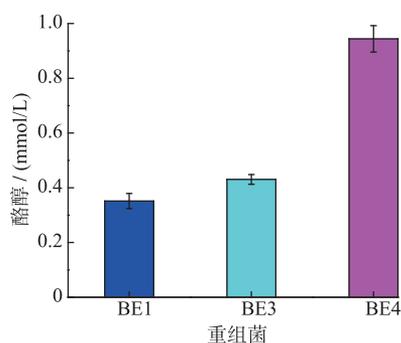
(b) 大肠杆菌 *pheA* 基因敲除

M: DNA marker; 1~2: 阳性转化子; 3: 野生型

图 4 PCR 验证

Fig. 4 PCR identification

2.3.2 基因敲除后对酪醇产量的影响 将构建好的表达载体 pRSFDUet-ARO10 导入 *E. coli* BL21 (DE3) $\Delta feaB$ 和 *E. coli* BL21 (DE3) $\Delta feaB \Delta pheA$, 获得重组突变菌株 BE3 和 BE4。将重组菌 BE1、BE3 和 BE4 发酵 48 h, 收集发酵液处理后检测酪醇, 结果如图 5 所示。



BE1: (*E. coli* BL21(DE3)(pRSFDUet-ARO10)); BE2: (*E. coli* BL21(DE3) $\Delta feaB$ (pRSFDUet-ARO10)); BE3: (*E. coli* BL21(DE3) $\Delta feaB\Delta pheA$ (pRSFDUet-ARO10))

图5 基因敲除对酪醇产量的影响

Fig. 5 Effect of gene deletion on tryptophan production

从图5中可以看出,对于菌株BE3来说,酪醇产量达到0.41 mmol/L,可知,敲除 $feaB$ 基因,较BE1提高了17.1%,说明敲除 $feaB$ 基因,有助于提高酪醇的合成能力;对于菌株BE4来说,可产酪醇0.91 mmol/L,较BE1提高了160%,说明在敲除 $feaB$ 基因基础上,敲除 $pheA$ 基因,可显著提高酪醇的合成能力。进而说明敲除 $feaB$ 和 $pheA$ 基因,阻断了4-羟基苯乙酸与苯丙氨酸生成途径,使葡萄糖更多地流向酪醇合成途径,从而提高了酪醇的合成能力。

2.4 重组突变菌株BE4产酪醇条件的优化

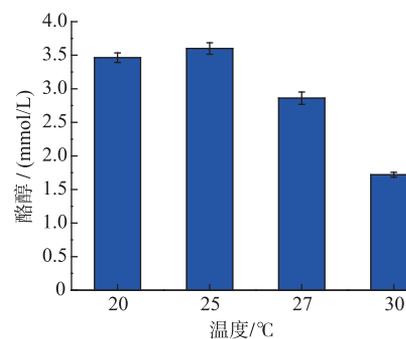
2.4.1 重组蛋白诱导温度及诱导时机的优化

温度对酶的活性及其表达有着极大的影响^[18],考察了不同诱导温度(20、25、27、30 °C对酪醇产量的影响,结果如图6(a)所示。从图中6(a)可以看出诱导温度在25 °C时,酪醇的产量最高,产量可达3.61 mmol/L。

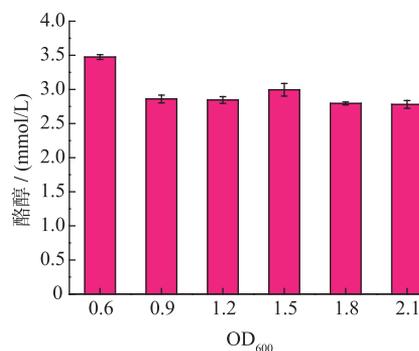
诱导时机对重组蛋白表达有重要影响。考察了在不同OD值(0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.1)时诱导剂IPTG诱导蛋白表达对酪醇产量的影响,结果如图6(b)所示。图6(b)表明OD值高于0.6时并不利于酪醇的产生,当OD值在0.6~0.8,大肠杆菌处于对数生长期,生理状态良好,更利于最终酪醇的产生。最终酪醇产量可达3.48 mmol/L。

2.4.2 诱导剂浓度的优化

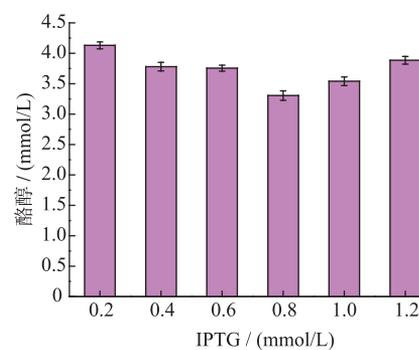
诱导剂浓度的大小可以起到促进或抑制的作用,所以适当浓度的诱导剂是十分关键的。考察了不同IPTG浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L)对酪醇产量的影响,结果如图6(c)所示。由图中6(c)可以看出当IPTG浓度在0.8 mmol/L时,酪醇产量最低,当IPTG浓度在0.2 mmol/L时,



(a) 诱导温度



(b) 诱导时间



(c) 诱导剂浓度

图6 重组菌诱导条件对酪醇合成的影响

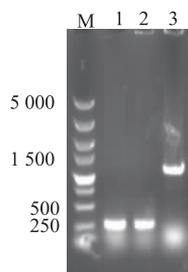
Fig. 6 Optimization of induction conditions for tryptophan production

酪醇产量最高,产量可以达到4.15 mmol/L。

2.5 基因 $tyrB$ 对酪醇合成的影响

2.5.1 基因 $tyrB$ 的删除

为删除*E. coli* BL21(DE3)菌株的 $tyrB$ 基因,构建含有同源臂和Kan抗性基因的删除盒,将其转化*E. coli* BL21(DE3)并整合到基因组上,筛选转化子并经诱导弹出Kan抗性基因。野生型与突变型转化子菌落PCR验证,原始菌株PCR产物大小为1 059 bp,抗性基因弹出后的突变株PCR产物大小为254 bp。结果如图7所示,与预期的大小一致,证明基因 $tyrB$ 已成功敲除。



M: DNA marker; 1~2: 阳性转化子; 3: 野生型

图 7 大肠杆菌 *tyrB* 基因敲除的 PCR 验证

Fig. 7 PCR identification of the gene *tyrB* deletion in *E. coli* strain

2.5.2 删除基因 *tyrB* 对重组菌合成酪醇的影响
将构建好的表达载体 pRSFDUet-ARO10 导入 *E. coli* BL21(DE3) Δ *tyrB* 中, 获得重组大肠杆菌 BE2。将两株重组菌 BE1 和 BE2 经种子液培养、LB 液体培养、IPTG 诱导表达, 分别转接外源添加不同浓度 (0、1、2.8 mmol/L) 酪氨酸的 M9Y 培养基中, 发酵培养 48 h, 发酵结果如图 8 所示。

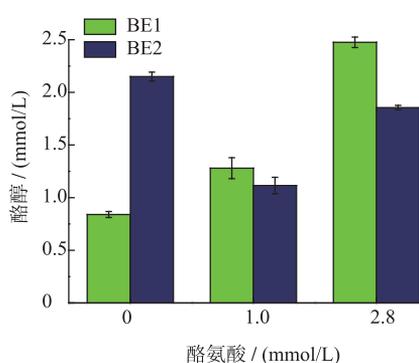


图 8 外源添加酪氨酸对重组菌 BE1 和重组菌 BE2 酪醇合成的影响

Fig. 8 Effect of supplementing tryrosine on the tyrosol production for the recombinant strain BE2 and BE1

从图 8 可以看出, 发酵培养基不添加酪氨酸时, BE1 可产酪醇 0.86 mmol/L, BE2 可产酪醇 2.18 mmol/L, BE2 的合成能力高于 BE1, 可知, 删除基因 *tyrB* 可以提高重组菌酪醇的合成能力。从图 6 可以看出, 发酵培养基外源添加 2.8 mmol/L 的酪氨酸与 1 mmol/L 酪氨酸相比, 重组菌 BE1 和 BE2 的合成能力均有提高。发酵液中未检测到酪氨酸, 说明发

酵液中几乎没有酪氨酸残留。可知, 大肠杆菌胞内存在多条催化酪氨酸合成 4-羟基苯丙酮酸的途径。

3 讨论

本研究通过在 *E. coli* BL21(DE3) 中异源表达 ARO10 基因, 获得了可以合成酪醇的重组大肠杆菌。通过删除旁路代谢途径及对培养条件优化, 利用 10 g/L 葡萄糖作为碳源, 发酵 48 h 酪醇产量可达 4.15 mmol/L。Yasuharu Satoh 通过在 *E. coli* MG1655 中异源表达 TYO 及 TDC 基因, 重组菌利用 10 g/L 葡萄糖作为碳源, 摇瓶发酵 48 h, 酪醇产量可达 0.5 mmol/L^[1]。文献[11]通过在 *E. coli* MG1655 中异源表达 ARO10 基因, 并对代谢途径进行了改造, 利用 20 g/L 葡萄糖作为碳源, 酪醇产量可达 5.4 mmol/L。与之相比, 本研究仅对酪氨酸合成途径上的个别基因进行改造, 重组菌合成酪醇的能力还有进一步的提升空间。本研究中 ARO10 基因来源于酿酒酵母, 在大肠杆菌的表达效率相对较低。下一步将对 ARO10 基因进行密码子优化, 进一步改善酪醇的合成能力。

由于大肠杆菌体内酪醇的前体物质 4-羟基苯丙酮酸合成途径较长^[15], 对于增强酪醇的合成能力, 在未来还有很多研究要做。由酪醇的代谢途径可知 (图 1), 4-羟基苯丙酮酸也是合成酪氨酸的前体物质, 下一步将采用过量合成酪氨酸的菌株合成酪醇。过去几十年里, 有关于过量合成酪氨酸的菌株的研究成一直是研究热点^[19-21]。理论推测, 利用产 10 g/L 酪氨酸的工程化的大肠杆菌可以产酪醇 7.6 g/L。这个产量比从橄榄油中提取得到的酪醇产量高 3 倍。因此, 利用合成酪氨酸能力强的宿主菌以葡萄糖为底物来提高重组菌酪醇的合成能力, 将成为下一步的研究重点。

4 结语

在外源添加酪氨酸的发酵培养基中培养合成酪醇, 可以改善酪醇的合成能力, 推测大肠杆菌体内存在催化酪氨酸合成 4-羟基苯丙酮酸的酶。下一步, 将进一步探索以酪氨酸为底物的全细胞催化合成酪醇的条件。

参考文献:

- [1] SATOH Y,TAJIMA K,MUNEKATA M,et al. Engineering of a tyrosol-producing pathway,utilizing simple sugar and the central metabolic tyrosine,in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**,2012,60(4):979-984.
- [2] DUDLEY JI,LEKLI I,MUKHERJEE S,et al. Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents;resveratrol,tyrosol,and hydroxytyrosol [J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**,2008,56(20):9362-9373.
- [3] GIOVANNINI L,MIGLIORI M,FILIPPI C,et al. Inhibitory activity of the white wine compounds,tyrosol and caffeic acid,on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha release in human peripheral blood mononuclear cells [J]. **International Journal of Tissue Reactions**,2002,24(2):53.
- [4] KOSEKI T,KUDO S,MATSUDA Y,et al. Tyrosol-producing mutant yeast strain having high productivity,and method for producing fermented alcoholic beverage using the yeast. Jpn. P3898652[P]. 2007.
- [5] BERNINI R,MINCIONE E,BARONTINI M,et al. Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**,2008,56(19):8897-8904.
- [6] DI BR,VARI R,SCAZZOCCHIO B,et al. Tyrosol,the major extra virgin olive oil compound,restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness [J]. **Nutrition Metabolism & Cardiovascular Diseases Nmed**,2007,17(7):535-545.
- [7] BORCHARD U. Pharmacological properties of β -adrenoceptor blocking drugs [J]. **Journal of Clinical & Basic Cardiology**,1998,1(1):5-9.
- [8] SERVILI M,MONTEDORO G F. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality[J]. **European Journal of Lipid Science & Technology**,2002,104(9/10):602-613.
- [9] WADA I. Production of 4-hydroxyphenethyl alcohol compound. Jpn. P3247971[P]. 2002.
- [10] STRUTZ H. Production of 4-hydroxyphenethyl alcohol. U.S. 5,003,115[P]. 1991.
- [11] BAI Y. Production of salidroside in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. **Scientific Reports**,2014,4(55):6640-6648.
- [12] HAZELWOOD LA,DARAN JM,VAN MARIS AJ,et al. The ehrlich pathway for fusel alcohol production;a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism[J]. **Applied & Environmental Microbiology**,2008,74(8):2259-2266.
- [13] SENTHESHANMUGANATHAN S,ELSDEN S R. The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biochemical Journal**,1958,69(2):210-218.
- [14] YIN S,ZHOU H,XIAO X,et al. Improving 2-Phenylethanol Production via ehrlich pathway using genetic engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. **Current Microbiology**,2015,70(5):762-767.
- [15] ZHOU Li,NIU Dandan,LI Ning,et al. Multiple gene inactivation approach in *Escherichia coli* by a combination of red recombination and xer recombination[J]. **Microbiology China**,2010,37(6):923-928.(in Chinese)
- [16] KOMA D,YAMANAKA H,MORIYOSHI K,et al. Production of aromatic compounds by metabolically engineered *Escherichia coli* with an expanded shikimate pathway[J]. **Applied & Environmental Microbiology**,2012,78(17):6203-6216.
- [17] ZHOU J,CHEN X,LU L,GOVENDER A,et al. Enhanced production of N-acetyl-d-neuraminic acid by whole-cell bio-catalysis of *Escherichia coli*[J]. **Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic**,2016,125(5):42-48.
- [18] CHEN Wei,LI Wei,ZHU Hu,et al. Optimization of fermentation process for expression of a hyperthermostable Fe-SOD (H171A) in recombinant *E.coli* BL21 (DE3)[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016,35(4):381-386.(in Chinese)
- [19] JUMINAGA D,BAIDOO EEK,REDDING-JOHANSON AM,et al. Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*[J]. **Applied & Environmental Microbiology**,2012,78(1):89-98.
- [20] IKEDA M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2006,69(6):615-626.
- [21] LUTKEEVERSLOH T,SANTOS CN,STEPHANOPOULOS G. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2007,77(4):751-762.