

· 工业生物技术 ·

柚皮素合成关键基因表达水平对目标产物积累水平的量化影响

焦亭亭^{1,2}, 周景文^{1,2}, 徐沙^{1,2}

1 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

焦亭亭, 周景文, 徐沙. 柚皮素合成关键基因表达水平对目标产物积累水平的量化影响. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1256–1265.

Jiao TT, Zhou JW, Xu S. Quantitative effect of the expression level of key genes in naringenin synthesis on the accumulation level of target products. Chin J Biotech, 2019, 35(7): 1256–1265.

摘要: 柚皮素是一种天然黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗病毒、预防动脉粥样硬化等多种药理活性, 也是其他黄酮类化合物合成的重要前体, 具有重要的应用价值。目前, 微生物法生产柚皮素等黄酮类化合物由于代谢通路不平衡等原因导致产量较低, 在很大程度上限制了其工业应用。文中以一株产柚皮素的酿酒酵母菌株 Y-01 为研究对象, 利用启动子和拷贝数控制柚皮素合成代谢途径关键酶 4-香豆酸: CoA 连接酶 (4CL)、查尔酮合成酶 (CHS) 和查尔酮异构酶 (CHI) 编码基因的表达水平, 考察这些基因的表达水平对目标产物积累水平的量化影响。结果表明, 柚皮素产量与 4CL 或 CHI 编码基因的表达量之间关联性较低, 而与 *chs* 基因的表达量存在显著的正相关性。通过调控 *chs* 基因的表达水平, 获得一株高产柚皮素的酿酒酵母工程菌株 Y-04, 产量较出发菌株 Y-01 提高了 4.1 倍。研究结果表明, CHS 是柚皮素合成过程的关键调控靶点, 合理调控 CHS 表达可以显著促进酿酒酵母积累柚皮素。相关结果为采用代谢工程强化微生物合成柚皮素等重要黄酮类化合物提供了重要的理论参考。

关键词: 柚皮素, 表达量, 关键基因, 启动子, 拷贝数

Received: December 19, 2018; **Accepted:** February 28, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31670095).

Corresponding author: Sha Xu. Tel/Fax: +86-510-85914371; E-mail: xus1984@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31670095) 资助。

网络出版时间: 2019-03-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190318.1121.002.html>

Quantitative effect of the expression level of key genes in naringenin synthesis on the accumulation level of target products

Tingting Jiao^{1,2}, Jingwen Zhou^{1,2}, and Sha Xu^{1,2}

¹ National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Naringenin is a natural flavonoid compound with anti-inflammatory, anti-oxidation, anti-viral, anti-atherosclerosis and other pharmacological activities. It is also an important precursor of other flavonoid synthesis and with great value of application. At present, the production of flavonoids such as naringenin by microbial methods has a low yield due to imbalance of metabolic pathways, which greatly limits its industrial application. In this study, a naringenin-producing strain of *Saccharomyces cerevisiae* Y-01 was used in the research object. The expression levels of 4-coumaric acid: CoA ligase (4CL), chalcone synthase (CHS) and chalcone isomerase (CHI) were controlled by promoter and copy numbers to investigate the quantitative effect of key enzyme expression level on the accumulation level of target products. The results showed that the correlation between naringenin production and 4CL or CHI expression was not significant while there was a positive correlation with the expression level of CHS. Strain Y-04 with high yield of naringenin was obtained by regulating the expression level of *chs* gene, and the yield was increased by 4.1-folds compared with the original strain Y-01. This study indicated that CHS is a key regulatory target of naringenin synthesis. Rational regulation of CHS expression can significantly promote the accumulation of naringenin. The related results provide an important theoretical reference for the use of metabolic engineering to strengthen microbial synthesis of important flavonoids such as naringenin.

Keywords: naringenin, expression level, key gene, promoter, copy number

柚皮素 (4',5,7-三羟基二氢黄酮) 是一种重要的二氢黄酮类化合物。柚皮素及其衍生物普遍存在于高等植物中, 例如西红柿和柑橘类水果。药理研究表明, 柚皮素及其衍生物具有抗炎、抗氧化、抗病毒、预防动脉粥样硬化等各种活性^[1]。此外, 柚皮素也是大多数黄酮类化合物的合成前体, 可以用于合成具有更多生理活性和应用价值的重要黄酮类化合物。目前, 国内外报道的柚皮素制备方法主要有植物提取法、化学合成法和微生物法。由于植物提取法存在植物生长周期长、含量低、代谢产物复杂等问题, 导致成本较高, 严重阻碍了柚皮素的研究和应用^[2-3]。化学合成法涉及有毒化学品和极端反应条件, 除成本较高外, 还无法保证关键手性基团的天然等同性^[4]。由于微生物法生产黄酮不受季节限制, 具有完全的天然等同性等特点, 是目前被认为最有前景的发展

方向。

柚皮素的生物合成途径从芳香族氨基酸开始, 主要由 4 种酶参与, 即酪氨酸解氨酶 (TAL)/苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、4-香豆酸: CoA 连接酶 (4CL)、查尔酮合成酶 (CHS) 和查尔酮异构酶 (CHI)。其中, TAL 将 L-酪氨酸转化为对香豆酸; 4CL 催化 1 分子 CoA 和 1 分子对香豆酸形成对香豆酰辅酶 A; CHS 负责将 3 分子丙二酰辅酶 A 和 1 分子对香豆酰辅酶 A 转化为柚皮素查尔酮; CHI 催化柚皮素查尔酮异构化为柚皮素。为了提高目标产物的产量, 研究人员首先关注于筛选高活性酶和改善酶的性质并获得了一系列具有较高催化活性的酶^[5-6]。大量的代谢工程实例表明, 高效的黄酮生物合成途径还需要调节高活性酶的表达水平。目前, 基于不同强度启动子和不同拷贝数的模块化优化策略已经用于平衡代谢流, 并显著强

化了生松素^[7]和柚皮素^[8]等黄酮类物质的积累。但是,该策略需要筛选具有梯度强度的启动子文库,并且在多基因途径中这些启动子的天文数目组合在实际操作中是一个巨大的挑战。因此,在构建平衡途径的启动子-关键基因组合之前,探究途径中目标物质产量与关键酶编码基因表达量的关系是必要的。为此,文中以一株可以积累柚皮素的酿酒酵母 Y-01 为研究对象,利用不同强度启动子和整合位点,梯度过量表达酶活较高香芹素 4CL、矮牵牛 CHS 和紫苜蓿 CHI^[8],结合实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 方法检测它们的表达水平,获得柚皮素产量与这 3 个关键酶表达量之间的关系。

结果表明,CHS 是黄酮合成过程的关键调控靶点,合理调控 CHS 表达有利于酵母中柚皮素的积累。研究结果对后续代谢工程强化微生物合成柚皮素等重要黄酮类化合物具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 用于质粒构建和保存。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Y-01 用于整合片段及表达,酿酒酵母 S288C 用于基因扩增。文中使用的主要菌株如表 1 所示。

表 1 本研究所用的主要菌株

Table 1 Strains used in this study

Name	Description	Source
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C		Navogen
CEN.PK2-1D-Δubi4	MATa <i>ura3-52; trp1-289; leu2-3, 112; his3Δ 1; MAL28 SUC2</i>	Navogen
Y-01	CEN.PK2-1D, <i>gal80::Loxp-G418-Loxp, pY26-P_{GAL10}-chi-P_{GALI}-chs-P_{GAL7}-4cl</i>	This study
Y-02	Y-01, <i>leu2::P_{GAL10}-4cl-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-03	Y-01, <i>leu2::P_{TEF}-4cl-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-04	Y-01, <i>leu2::P_{GAL7}-chs-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-05	Y-01, <i>leu2::P_{GAL10}-chs-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-06	Y-01, <i>leu2::P_{GAL10}-chi-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-07	Y-01, <i>leu2::P_{TEF}.chi-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-08	Y-01, <i>rdna::P_{TEF}-4cl--Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-09	Y-01, <i>rdna::P_{GAL1}-4cl--Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-10	Y-01, <i>rdna::P_{GAL7}-4cl--Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-11	Y-01, <i>rdna::P_{GAL10}-4cl--Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-12	Y-01, <i>rdna::P_{GAL2}-4cl--Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-13	Y-01, <i>rdna::P_{PGL1}-4cl--Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-14	Y-01, <i>rdna::P_{TEF}.chs-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-15	Y-01, <i>rdna::P_{GALI}-chs-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-16	Y-01, <i>rdna::P_{GAL7}-chs-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-17	Y-01, <i>rdna::P_{GAL10}-chs-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-18	Y-01, <i>rdna::P_{GAL2}-chs-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-19	Y-01, <i>rdna::P_{PGL1}-chs-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-20	Y-01, <i>rdna::P_{TEF}-chi-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-21	Y-01, <i>rdna::P_{GALI}-chi-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-22	Y-01, <i>rdna::P_{GAL7}-chi-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-23	Y-01, <i>rdna::P_{GAL10}-chi-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-24	Y-01, <i>rdna::P_{GAL2}-chi-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study
Y-25	Y-01, <i>rdna::P_{PGL1}-chi-Loxp-HIS5-Loxp</i>	This study

4cl from *Petroselinum crispum*, *chs* from *Petunia X hybrida*, *chi* from *Medicago sativa*.

1.1.2 培养基

LB (Luria Broth) 液体培养基 (L): 10 g NaCl, 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母提取物, pH 7.0。

YNB (Yeast Nitrogen Base) 培养基 (L): 200 g/L 葡萄糖母液 100 mL, 67.4 g/L YNB (Yeast nitrogen base without amino acids) 母液 100 mL, 并添加所需的缺陷氨基酸 (Trp、His、Leu) 各 10 mL, 终浓度均为 50 mg/L, 加蒸馏水至 1 L, 过滤除菌, 4 °C 冰箱保存。

YPSe 培养基 (L): 20 g 蛋白胨, 10 g 酵母提取物, 10 g 蔗糖, 10 mL 无水乙醇。

1.1.3 主要试剂

各种抗生素和氨基酸, 包括氨苄青霉素、遗传霉素、色氨酸、组氨酸、亮氨酸, 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。柚皮素标样购自 Sigma-Aldrich 公司。蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司。乙腈 (质谱纯) 购自 Merck 公司。其他本实验中使用的各种分析化学试剂如无特别说明均购自上海国药集团。各种一步克隆酶、连接酶、感受态制备试剂盒、pMD19-T Simple Vector 购自大连宝生物 (TaKaRa) 有限公司。细菌质粒小量提取试剂盒购自于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。胶回收试剂盒购自 Fermentas 公司。引物合成以及 DNA 测序服务均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。

1.1.4 摇瓶培养条件

从平板上挑取改造后产柚皮素酿酒酵母的单菌落, 在含有 20 mL YNB 培养基 (添加 Trp 和 Leu) 的 250 mL 摇瓶中于 30 °C、220 r/min 培养 18 h。然后以 10% (V/V) 的接种量转接到 20 mL YPSe 发酵培养基中, 同时加入 10 g/L CaCO₃ 及终浓度 500 mg/L 对香豆酸, 于 30 °C、220 r/min 培养 84 h。

1.2 方法

1.2.1 酿酒酵母基因组整合框构建

为了使代谢途径基因协同表达, 首先确定代

谢途径关键基因过量表达对产物柚皮素含量的影响。选择 6 个不同强度的启动子 (P_{GALI} 、 P_{TEF} 、 P_{GAL7} 、 P_{GAL10} 、 P_{GAL2} 、 P_{PGII}) 分别表达 *4cl*、*chs*、*chi* 基因, 并选取了基因组上 LEU2 和核糖体 DNA (rDNA) 作为整合位点。启动子 P_{GALI} 、 P_{TEF} 、 P_{GAL7} 、 P_{GAL10} 通过实验室原有质粒为模板扩增获得, P_{GAL2} 、 P_{PGII} 和基因整合的上下游同源臂 (上下游同源臂各 500–1 000 bp) 以 *S. cerevisiae* S288C 基因组为模板扩增得到, 以 HIS5 作为营养缺陷标签。先将上下游同源臂、HIS5 标签盒通过同源重组连接在 T 载上, 在实验室已有质粒 pY26- P_{GAL10} -*chs*- P_{GALI} -*4cl*- P_{GAL7} -*chi*、pY26- P_{GAL10} -*chi*- P_{GALI} -*chs*- P_{GAL7} -*4cl*、pY26- P_{GAL10} -*chs*- P_{GALI} -*chi*- P_{GAL7} -*4cl* 上分别扩增 P_{GALI} -*4cl*- T_{GALI} 、 P_{GALI} -*chs*- T_{GALI} 和 P_{GALI} -*chi*- T_{GALI} 片段, 通过同源重组的方法得到质粒 T-LEU2up- P_{GALI} -*4cl*- T_{GALI} -HIS5-LEU2down、T-LEU2up- P_{GALI} -*chs*- T_{GALI} -HIS5-LEU2down、T-LEU2up- P_{GALI} -*chi*- T_{GALI} -HIS5-LEU2down、T-25Sup- P_{GALI} -*4cl*- T_{GALI} -HIS5-5Sdown、T-25Sup- P_{GALI} -*chs*- T_{GALI} -HIS5-5Sdown、T-25Sup- P_{GALI} -*chi*- T_{GALI} -HIS5-5Sdown, 然后分别将另外 5 个启动子与这 6 个质粒中启动子 P_{GALI} 通过同源重组的方法替换, 得到另外 30 个质粒。再通过引物 Pf_LEU2 和 Pr_LEU2 分别扩增 3 个基因在 LEU2 位点上的整合片段, 引物 Pf_25S 和 Pr_5S 分别扩增 3 个基因在 rDNA 区域的整合片段。文中所用主要引物见表 2。

采用醋酸锂转化法将这 36 个片段分别整合到菌株 Y-01 的基因组上, 用 YNB 培养基 (添加 Trp 和 Leu) 筛选, 30 °C 恒温培养 3–4 d 至长出单菌落。挑取单菌落至 YNB 液体筛选培养基中培养 24 h, 13 500 r/min 离心 5 min 去上清, 收集菌体提取酿酒酵母基因组, 进行 PCR 验证, 得到与实际大小相符的特异性条带, 则证明菌株构建成功。

1.2.2 基因转录水平的测定

取发酵液中培养至对数中期的酿酒酵母细

表 2 本研究中所用的主要引物

Table 2 Main primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Amplification efficiency (%)
Pf_LEU2	ATGTTTCGTTCCAATGTCAAGTTCG	24	
Pr_LEU2	ACTTTTTGTGTGGTGCCCTCCTCC	24	
Pf_25S	GTCGTAAGTATAACCGCAGCAGGT	24	
Pr_5S	CACAACCGAAACCAAAACCAACG	23	
Pf_4CL	CTGCTGTCCCGTAAAGTTG	144	103
Pr_4CL	CGCCATAGTGCTGATTGC		
Pf_CHS	ATGGTTACGGTGGAAGAATAC	144	101
Pr_CHS	ATGTTTCAGAGTTGGTGATACG		
Pf_CHI	GGTCACGGGCAAATCATAAC	162	105
Pr_CHI	TCCAGCAGTTCTTCAGAGC		
Pf_Actin	TTATTGATAACGGTTCTGGTATG	100	104
Pr_Actin	CCTTGGTGTCTTGGTCTAC		

胞,采用热酚法提取总 RNA^[9]。利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa) 去除总 RNA 中的基因组 DNA 后,将总 RNA 反转录成 cDNA。使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒处理样品,在 LightCycler 480 II 热循环仪系统 (Roche, Mannheim, Germany) 上进行定量 PCR (qPCR) 测定。以 β -actin 基因作为内参基因,用引物 Pf_Actin 和 Pr_Actin 进行 qPCR 值的归一化。*4cl*、*chs* 和 *chi* 分别用引物 Pf_4CL/Pr_4CL、Pf_CHS/Pr_CHS 和 Pf_CHI/Pr_CHI 进行扩增。最后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[10]获得 *4cl*、*chs* 和 *chi* 的 mRNA 表达水平来表征它们的相对表达量。

1.2.3 基因整合拷贝数的测定

酵母基因组 DNA 的提取按照 Thermo 公司 GeneJET Genomic DNA Purification Kit 中酵母基因组 DNA 提取说明书进行操作。

以前的研究表明在不同条件下外源基因在基因组上单拷贝克隆具有遗传稳定性^[11-12],而很少有研究能够确定多拷贝克隆的遗传稳定性。由于一株菌株中多拷贝克隆位点起源于同一基因座处的多个同源重组事件,外源基因通常在基因组上

串联重复可能导致整合基因的不稳定^[13]。为了确定基因 *4cl*、*chs* 和 *chi* 整合到酵母 rDNA 区域菌株的遗传稳定性,将以 rDNA 为整合位点的所有酿酒酵母重组菌株在 YNB 缺陷型平板上划线,培养 3-4 d 至长出单菌落,挑取单菌落至 20 mL 新鲜的液体 YNB 缺陷型培养基中,30 °C、220 r/min 培养 24 h,然后按 1%接种量转移到新鲜的 20 mL YPD 中并在相同条件下温育 24 h。该过程再重复 5 次,总生长时间为 144 h,即传代 72 代。

从原始的非传代菌株和传代 72 次菌株中提取基因组 DNA,通过 qPCR 检测基因组中关键酶的整合拷贝数。对带有目的基因 *4cl*、*chs* 和 *chi* 的 T 载体分别进行梯度稀释,制备目的基因质粒的标准曲线,取基因组 DNA 各 1 μ L 为模板,用荧光引物对目的基因进行 qPCR,将得到的 C_t 值代入标准曲线中,求出 DNA 样品中起始模板的拷贝数。利用相同的方法计算看家基因 *sgal* (编码葡聚糖 1,4- α -葡糖苷酶,在基因组以单拷贝的形式存在) 的起始模板的拷贝数。因为在表达菌株中都导入了质粒 pY26-P_{GAL10}-*chi*-P_{GAL1}-*chs*-P_{GAL7}-*4cl*,因此要除去质粒中目的基因的拷贝数。利用

上述同样的方法制作该质粒的标准曲线,以质粒中 *ura3* 作为目标基因。因此,基因组中关键酶的整合拷贝数计算公式为: $N=(N1-N2)/N0+1$ ($N1$ 代表基因组中目的基因的起始模板的拷贝数, $N2$ 代表基因组中 *ura3* 基因起始模板的拷贝数, $N0$ 代表基因组中看家基因 *sga1* 起始模板的拷贝数, 1 代表基因组染色体上 *ura3* 原有一个拷贝数)。

1.2.4 柚皮素的提取与检测

发酵结束后,收集发酵液并加入同体积的无水乙醇萃取柚皮素,剧烈振荡混匀后,13 500 r/min 离心 5 min 取上清,有机相滤膜过滤后使用 Agilent 1260 高效液相色谱仪进行产物检测,采用 C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm) 进行色谱分离,色谱柱温度控制在 25 °C,进样量为 10 μ L,流动相为超纯水 (0.3% 乙酸) 和乙腈 (0.3% 乙酸),流速为 1 mL/min。柚皮素通过乙腈/水的梯度洗脱进行分离:0–10 min,色谱条件为 10%–40% 的乙腈 (体积/体积); 10–15 min,色谱条件控制为 40%–60% 的乙腈; 15–17 min,色谱条件控制在 60%–10% 的乙腈^[14]。柚皮素的检测波长为 290 nm,以标准品柚皮素浓度为横坐标,紫外区吸收峰峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

2 结果与分析

2.1 4CL 过量表达对柚皮素产量的影响

以 Y-01 为出发菌株,将在不同强度启动子 (P_{GAL1} 、 P_{TEF} 、 P_{GAL7} 、 P_{GAL10} 、 P_{GAL2} 、 P_{PGII}) 控制下的 *4cl* 基因分别整合在基因组 LEU2 位点和 rDNA 区域。每株菌在发酵培养基中发酵得到柚皮素的产量,qPCR 得到 *4cl* 转录水平上的相对表达量,从而获得柚皮素产量与 *4cl* 转录水平的关系。

每株菌做 3 个平行,并重复 3 次,以确保实验数据的可靠性,从而获得 36 组数据。结果如图 1 所示,柚皮素的产量与 *4cl* 的相对表达量几

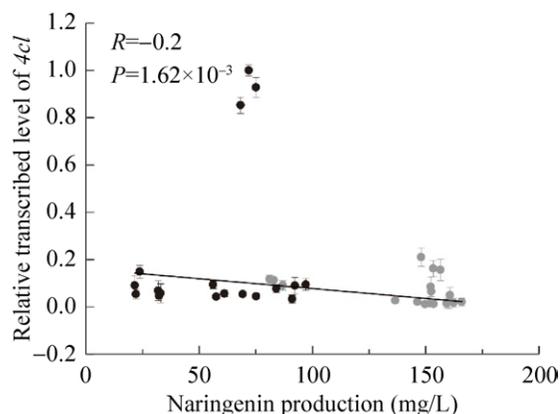


图 1 柚皮素产量与 *4cl* 转录水平的关系

Fig. 1 Relationship between naringenin production and transcription level of *4cl*. Gray: single copy clone; black: multicopy clone.

乎没有相关性 ($R=-0.2$, $P=1.62\times 10^{-3}$),并且 *4cl* 在基因组上单拷贝整合时有利于柚皮素的积累。以 LEU2 为整合位点,*4cl* 在启动子 P_{GAL10} 控制下,柚皮素的最高产量为 165.9 mg/L (Y-02),比 Y-01 (46.1 mg/L) 提高了 2.6 倍;在启动子 P_{TEF} 控制下,获得最低产量 81.1 mg/L (Y-03),比 Y-01 增加了 75.9%。以 rDNA 区域为整合位点过量表达 *4cl*,柚皮素产量在 21.5 mg/L 到 97.0 mg/L 之间变化,最低产量 (Y-12) 比 Y-01 减少了一半。结果表明过量表达 *4cl* 并不一定能提高柚皮素的产量。

2.2 CHS 过量表达对柚皮素产量的影响

以上述相同的方法分析 CHS 过量表达对柚皮素产量的影响。结果如图 2 所示,柚皮素的产量与 *chs* 转录水平有一定的线性正相关性 ($R=0.8$, $P=6.24\times 10^{-10}$),并且 *chs* 单拷贝数克隆时更有利于柚皮素的积累。以 LEU2 为整合位点时,*chs* 在强启动子 (P_{TEF} 、 P_{GAL1} 、 P_{GAL7}) 控制下过量表达,转录水平和柚皮素产量均较高,转录水平在 0.8 到 1.0 之间,柚皮素产量在 185.3 mg/L 到 235.9 mg/L 之间。当 *chs* 受 P_{GAL7} 启动子控制时,柚皮素最高产量为 235.9 mg/L (Y-04),较 Y-01 提高了 4.1 倍;当 *chs* 受 P_{GAL10} 启动子控制时,最低

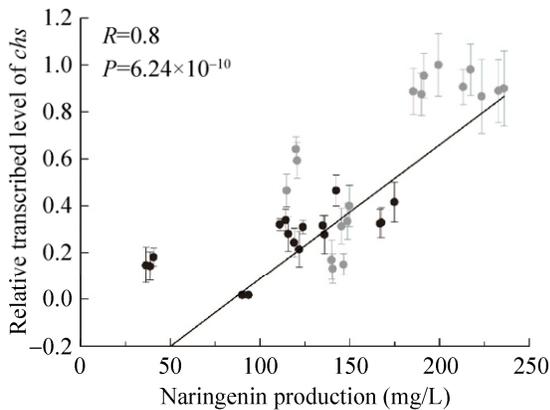


图 2 柚皮素产量与 *chs* 转录水平的关系

Fig. 2 Relationship between naringenin production and transcription level of *chs*. Gray: single copy clone; black: multicopy clone.

产量为 114.0 mg/L (Y-05), 较 Y-01 的产量提高了 1.5 倍。以 rDNA 为整合位点过量表达 *chs*, 柚皮素产量在 36.5–174.9 mg/L 之间变化, 最低产量 (Y-14) 比 Y-01 降低了 20.8%。结果表明, 在一定程度上过量表达 *chs* 更有利于柚皮素的大量积累。

2.3 CHI 过量表达对柚皮素产量的影响

以上述相同的方法分析 CHI 过量表达对柚皮素产量的影响。结果如图 3 所示, 柚皮素的产量与 *chi* 转录水平的线性关系较小 ($R=0.4$, $P=3.14 \times 10^{-5}$),

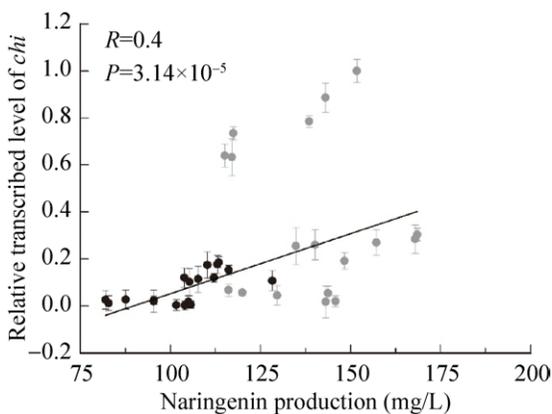


图 3 柚皮素产量与 *chi* 转录水平的关系

Fig. 3 Relationship between naringenin production and transcription level of *chi*. Gray: single copy clone; black: multicopy clone.

并且 CHI 在基因组单拷贝克隆时更利于柚皮素的积累。

当 LEU2 作整合位点时, *chi* 在启动子 P_{GAL10} 控制下, 柚皮素最高产量达到 168.5 mg/L (Y-06), 比 Y-01 提高了 2.7 倍; *chi* 在启动子 P_{TEF} 控制下, 柚皮素最低产量为 115.0 mg/L (Y-07), 比 Y-01 提高了 1.5 倍。以 rDNA 为整合位点过量表达 *chi*, 柚皮素的产量在 81.9 mg/L 到 128.2 mg/L 之间变化, 最低产量 (Y-20) 比 Y-01 增加了 77.7%。结果表明, 过量表达 *chi* 提高了柚皮素的产量。

2.4 多拷贝克隆菌株传代稳定性的验证

结果如图 4 所示, *4cl* 基因组整合重组菌 Y-08、Y-09、Y-10、Y-11、Y-12 及 Y-13 未传代与传代 72 代后拷贝数差异分别为 9.0%、5.9%、23.6%、9.5%、10.1%、15.7% (图 4A); *chs* 基因组整合重组菌 Y-14、Y-15、Y-16、Y-17、Y-18 及 Y-19 未传代与传代 72 代后拷贝数差异分别为 12.5%、1.3%、0.5%、5.8%、1.7%、2.2% (图 4B); *chi* 基因组整合重组菌 Y-20、Y-21、Y-22、Y-23、Y-24 及 Y-25 未传代与传代 72 代后拷贝数差异分别为 6.4%、5.1%、7.9%、11.6%、5.7%、10.6% (图 4C)。上述结果表明, 多拷贝克隆菌株传代 72 代后拷贝数差异基本在 15% 以下, 表明了在本实验条件下多拷贝克隆菌株具有遗传稳定性。

3 讨论

文中以产柚皮素酿酒酵母 Y-01 为出发菌株, 首次考察了关键酶 4CL、CHS 和 CHI 分别过量表达对柚皮素产量的影响。当 *chs* 在强启动子 P_{GAL7} 控制下并插入到 LEU2 位点时, 达到最高产量 235.9 mg/L, 比目前报道的以酿酒酵母为宿主异源合成柚皮素最高产量 113.0 mg/L^[15] 提高了 1.1 倍。在以前的研究中, 因柚皮素合成需要 3 分子的丙二酰辅酶 A, 而胞内游离丙二酰辅酶 A 浓度由于脂肪酸生物合成的内在紧密调节维持在低水平,

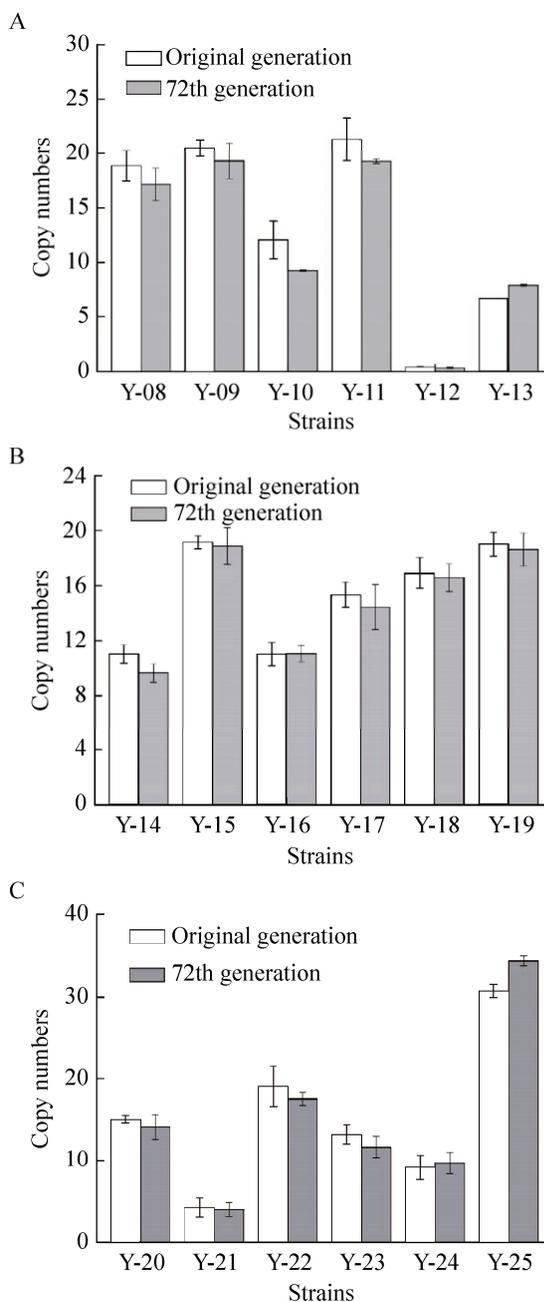


图 4 关键基因在基因组 rDNA 上的拷贝数

Fig. 4 Copy number of key genes on genomic rDNA. (A) *4cl*. (B) *chs*. (C) *chi*.

使丙二酰辅酶 A 一直被认为是黄酮合成的限制性前体因子。一般采用过量表达乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acc1)^[16]、敲除丙二酰辅酶 A 的竞争途径^[17]和基于反义 RNA 策略^[18]及 CRISPRi 系统调控^[19]等方法提高胞内丙二酰辅酶 A 含量,使细胞内丙二酰

辅酶 A 最大程度地流向目标途径以提高目标化合物产量。但是,最新报道显示在酿酒酵母中异源合成柚皮素的前期阶段,丙二酰辅酶 A 并不是柚皮素合成的限速前体,关键酶之间的协同表达更有利于柚皮素的积累^[20]。对于调控途径基因的协同表达,常用的方法是过量表达关键基因的同时调节其表达量,包括调节基因拷贝数、启动子强度及降低蛋白质的降解等方式^[15,21]。但这些方式所调控的范围往往较大,目前还无法对蛋白表达进行精确调控。近年来,越来越多的计算机辅助方法应用于代谢通量平衡分析,如 OptForce^[22]、OptORF^[23]和 RobustKnock^[24]等。许多基于计算机的途径设计策略已成功应用于所需化合物的生产,例如三乙酸内酯^[25]、琥珀酸^[26]、脂肪酸^[27]等。然而,由于代谢途径涉及众多的前体合成和相关修饰基因导致缺乏准确的酶反应参数,使这些调节策略的使用受到极大的限制。

目前,精确调控途径基因之间的协同表达以平衡代谢通路还是一个巨大的难题。清楚地了解关键酶表达对产物柚皮素的影响有利于后期平衡代谢流的研究。据报道,CHS 是燕麦叶中黄酮类化合物的限速酶^[28],植物可以通过调控 *chs* 表达来调节黄酮类化合物的产生^[29-30]。而以微生物为生产宿主异源合成柚皮素途径尚无明确的报道。文中提出了启动子和拷贝数控制代谢工程,并采用 qPCR 方法检测细胞中靶基因的转录水平,探究了关键酶 4CL、CHS 和 CHI 分别过量表达对柚皮素产量的影响。结果显示在一定范围内分别过量表达 4CL、CHS 和 CHI 均能提高柚皮素的产量,但是柚皮素产量与 4CL 或 CHI 的表达量没有密切的联系,而与 CHS 的表达量存在线性正相关 ($R=0.8$, $P=6.24 \times 10^{-10}$),并且柚皮素的产量在过量表达 CHS 时达到最大值,这表明 CHS 表达对柚皮素产量的影响最大,并推测 CHS 是该研究中柚皮素合成途径的限速酶。

此外,实验结果显示,基因单拷贝克隆的表达水平大多高于多拷贝克隆的表达水平,造成的原因可能与酿酒酵母 rDNA 区域的基因沉默有关^[31],外源基因插入该区域,其表达水平往往低于插入到常染色质区域的表达水平。rDNA 作为外源基因整合位点,插入其内部的外源基因的遗传稳定性还没有明确的结论,这可能与外源基因的拷贝数和整合形式有关^[32]。文中通过 qPCR 检测未传代和传代后菌株中外源基因拷贝数并比较两者的差异,发现在实验条件下外源基因插入 rDNA 区域具有遗传稳定性。文中确立了柚皮素产量与关键酶编码基因相对表达量的关系,并揭示了 CHS 是黄酮化合物合成过程的关键调控位点,为后续深入研究代谢工程强化微生物合成柚皮素等重要黄酮类化合物提供了重要的参考依据。

REFERENCES

- [1] Iwashina T. Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biol Sci Space*, 2003, 17(1): 24–44.
- [2] Fowler ZL, Koffas MA. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(5): 799–808.
- [3] Wang YC, Chen S, Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(4): 949–956.
- [4] Xia YQ, Guo TY, Zhao HL, et al. A novel solid phase for selective separation of flavonoid compounds. *J Sep Sci*, 2007, 30(9): 1300–1306.
- [5] Guo L, Chen X, Li LN, et al. Transcriptome-enabled discovery and functional characterization of enzymes related to (2S)-pinocembrin biosynthesis from *Ornithogalum caudatum* and their application for metabolic engineering. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 27.
- [6] Zhou SH, Liu PR, Chen J, et al. Characterization of mutants of a tyrosine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(24): 10443–10452.
- [7] Wu JJ, Du GC, Zhou JW, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy. *Metab Eng*, 2013, 16: 48–55.
- [8] Wu JJ, Zhou TT, Du GC, et al. Modular optimization of heterologous pathways for *de novo* synthesis of (2S)-naringenin in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2014, 9(7): e101492.
- [9] Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(10): 3091–3092.
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [11] Fukunaga T, Cha-Aim K, Hirakawa Y, et al. Designed construction of recombinant DNA at the *ura3Δ0* locus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2013, 30(6): 243–253.
- [12] Ohi H, Okazaki N, Uno S, et al. Chromosomal DNA patterns and gene stability of *Pichia pastoris*. *Yeast*, 1998, 14(10): 895–903.
- [13] Zhu J, Schiestl RH. Human topoisomerase I mediates illegitimate recombination leading to DNA insertion into the ribosomal DNA locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, 2004, 271(3): 347–358.
- [14] Wu JJ. Engineering *Escherichia coli* based on synthetic biology for production of flavonoid scaffolds [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015 (in Chinese). 吴俊俊. 合成生物技术改造大肠杆菌生产黄酮骨架物质[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [15] Koopman F, Beekwilder J, Crimi B, et al. *De novo* production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 155.
- [16] Shin SY, Jung SM, Kim MD, et al. Production of resveratrol from tyrosine in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*, 2012, 51(4): 211–216.
- [17] Xu P, Ranganathan S, Fowler ZL, et al. Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 578–587.
- [18] Wu JJ, Yu O, Du GC, et al. Fine-tuning of the fatty acid pathway by synthetic antisense RNA for enhanced

- (2S)-naringenin production from L-tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(23): 7283–7292.
- [19] Wu JJ, Du GC, Chen J, et al. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 13477.
- [20] Lyu XM, Ng KR, Lee JL, et al. Enhancement of naringenin biosynthesis from tyrosine by metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(31): 6638–6646.
- [21] Li MJ, Kildegaard KR, Chen Y, et al. *De novo* production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2015, 32: 1–11.
- [22] Ranganathan S, Suthers PF, Maranas CD. OptForce: An optimization procedure for identifying all genetic manipulations leading to targeted overproductions. *PLoS Comput Biol*, 2010, 6(4): e1000744.
- [23] Kim J, Reed JL. Optorf: Optimal metabolic and regulatory perturbations for metabolic engineering of microbial strains. *BMC Syst Biol*, 2010, 4: 53.
- [24] Tepper N, Shlomi T. Predicting metabolic engineering knockout strategies for chemical production: accounting for competing pathways. *Bioinformatics*, 2010, 26(4): 536–543.
- [25] Chowdhury A, Zomorodi AR, Maranas CD. k-OptForce: Integrating kinetics with flux balance analysis for strain design. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10(2): e1003487.
- [26] Khodayari A, Chowdhury A, Maranas CD. Succinate overproduction: A case study of computational strain design using a comprehensive *Escherichia coli* kinetic model. *Front Bioeng Biotechnol*, 2014, 2: 76.
- [27] Ranganathan S, Tee TW, Chowdhury A, et al. An integrated computational and experimental study for overproducing fatty acids in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2012, 14(6): 687–704.
- [28] Liu WS, Zhang B, Jiang RR. Improving acetyl-CoA biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via the overexpression of pantothenate kinase and PDH bypass. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 41.
- [29] Eckermann C, Schröder G, Eckermann S, et al. Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins. *Phytochemistry*, 2003, 62(3): 271–286.
- [30] Sun W, Meng XY, Liang LJ, et al. Molecular and biochemical analysis of chalcone synthase from *Freesia hybrid* in flavonoid biosynthetic pathway. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0119054.
- [31] Chang JS, Winston F. Spt10 and spt21 are required for transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 2011, 10(1): 118–129.
- [32] Fang C, Wang QH, Selvaraj JN, et al. High copy and stable expression of the xylanase XynHB in *Saccharomyces cerevisiae* by rDNA-mediated integration. *Sci Rep*, 2017, 7: 8747.

(本文责编 陈宏宇)