

· 合成生物技术 ·

产对香豆酸酿酒酵母工程菌株的构建与优化

张思琪^{1,2}, 周景文^{1,2}, 张国强^{1,2}, 陈坚^{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

张思琪, 周景文, 张国强, 等. 产对香豆酸酿酒酵母工程菌株的构建与优化. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1838–1848.

Zhang SQ, Zhou JW, Zhang GQ, et al. Construction and optimization of *p*-coumaric acid-producing *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1838–1848.

摘要: 对香豆酸是黄酮类、芪类等天然活性化合物的重要前体, 在生物医药、食品等行业应用广泛。与传统植物提取和化学合成相比, 微生物合成对香豆酸因其具有生产周期短、转化效率高等优势而得到广泛关注。为构建高产对香豆酸酵母工程菌株, 以酿酒酵母为出发菌, 通过敲除酪氨酸合成竞争路径基因 *ARO10* 和 *PDC5*, 突变芳香族氨基酸合成调控基因 *ARO4^{K229L}* 与 *ARO7^{G141S}*、解除酪氨酸负反馈抑制、并整合酪氨酸解氨酶 *FjTAL*, 获得的工程菌 C001 对香豆酸产量为 296.73 mg/L。为进一步提高对香豆酸合成前体积累, 分别敲除 8 个与氨基酸、糖类等转运相关基因并强化糖异生途径, 分析其对对香豆酸积累的影响。结果表明, 敲除 *GAL2* 及过表达 *EcppsA*, 对香豆酸产量提高至 475.11 mg/L。最后, 分析了 *FjTAL* 蛋白锚定至酵母液泡对产物积累的影响, 结果表明其定位液泡后对香豆酸产量明显提升, 达到 593.04 mg/L。通过强化前体物供应, 阻断竞争旁路途径, 利用亚细胞定位等策略有效提高对香豆酸产量, 为后续黄酮类及芪类化合物的合成提供高效平台菌株, 具有重要的应用前景。

关键词: 酿酒酵母, 对香豆酸, 转运蛋白, 糖异生途径, 亚细胞定位

Construction and optimization of *p*-coumaric acid-producing *Saccharomyces cerevisiae*

Siqi Zhang^{1,2}, Jingwen Zhou^{1,2}, Guoqiang Zhang^{1,2}, and Jian Chen^{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: *p*-Coumaric acid is an important precursor of various natural compounds, such as flavonoids and stilbenes. It has been widely used in biomedicine, food, nutrition and health care industries. Compared with traditional plant extracts and chemical synthesis, microbial synthesis of natural compounds such as *p*-coumaric acid has attracted wide attention due to its short production cycle and high conversion efficiency. Here a *p*-coumaric acid-producing *Saccharomyces cerevisiae* platform

Received: January 2, 2020; **Accepted:** March 25, 2020

Supported by: National Science Fund for Excellent Young Scholars (No. 21822806), National Natural Science Foundation of China (No. 31670095).

Corresponding authors: Jian Chen. Tel/Fax: +86-510-85918307; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

Guoqiang Zhang. Tel/Fax: +86-510-85914371; E-mail: gqzhang@jiangnan.edu.cn

国家优秀青年科学基金 (No. 21822806), 国家自然科学基金 (No. 31670095) 资助。

strain was developed. First, the tyrosine synthesis competition pathway genes *ARO10* and *PDC5* were knocked out, and *ARO4^{K229L}* and *ARO7^{G141S}* were mutated to release negative feedback inhibition from tyrosine. The tyrosine ammonia-lyase coding gene *TAL* from *Flavobacterium johnsoniae* was then integrated into genome and obtained C001 with yield of *p*-coumaric acid 296.73 mg/L. To further increase the accumulation of *p*-coumaric acid precursors, 8 genes encoding amino acids and carbohydrate transporters were knocked out and the gluconeogenesis pathway was enhanced. The results showed that *GAL2* knockout and overexpression of *EcppsA* increased the yield of *p*-coumaric acid to 475.11 mg/L. Finally, the effect of *FjTAL* anchoring to yeast vacuoles on product accumulation was analyzed, and the highest titer of *p*-coumaric acid of 593.04 mg/L was obtained after intracellular vacuolar localization of *FjTAL*. It provided an efficient *p*-coumaric acid-producing platform strain for the subsequent synthesis of flavonoids and stilbene compounds by enhancing the supply of precursors, blocking the competitive bypass pathway, and using the strategy of subcellular localization.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *p*-coumaric acid, transporter, gluconeogenesis, subcellular localization

对香豆酸 (*p*-Coumaric acid, *p*-CA) 作为植物类苯丙素途径的上游代谢产物, 是类苯丙素、木质酚素、黄酮类和芪类化合物的共同前体^[1-2]。研究表明对香豆酸及其衍生物具有多种生物学活性, 例如降低血脂、抗病毒抗氧化、预防癌症和心血管疾病等^[3-4]。因此, 对香豆酸及其衍生物在医药、营养保健品、化妆品中得到广泛应用^[5-6]。与传统的植物提取和化学合成相比, 微生物合成对香豆酸等天然化合物因其具有生产成本低、转化效率高等优势而得到广泛关注^[7]。其中, 酿酒酵母适合代谢工程的改造和工业规模的发酵, 是生产高附加值植物特异性次生代谢产物的重要底盘细胞^[5,8]。

目前, 对香豆酸的生物合成可以通过苯丙氨酸脱氨羟化后合成或酪氨酸通过酪氨酸解氨酶 (Tyrosine ammonia lyase, *TAL*) 催化生成。由于前者羟化过程所用的 4-肉桂酸羟化酶 (Cinnamate 4-hydroxylase, *C4H*) 表达与活性不足, 限制了对香豆酸的合成, 酪氨酸裂解途径成为对香豆酸生物合成研究的重要方向。酪氨酸是对香豆酸的合成前体, 主要来源于莽草酸途径, 因此, 酿酒酵母胞内莽草酸合成途径的有效调控会影响对香豆酸的积累 (图 1)。有研究表明过表达转酮醇酶 (*TKL1*) 和核糖-5-磷酸酮醇异构酶 (*RK11*), 可增加莽草酸途径的必要前体赤藓糖-4-磷酸 (E4P), 最终芳香族氨基酸提高两倍以上^[9-10]。丙酮酸激

酶 (*CDC19*) 的 T21E 突变体可能可以减缓磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 向丙酮酸的转化, 并积累 PEP 作为莽草酸途径的前体^[8]。此外, 通过过表达抗反馈基因 3-脱氧-D-阿拉伯糖-庚糖酸-7-磷酸 (DAHP) 合酶 (*ARO3^{K222L}*、*ARO4^{K229L}*) 和分支酸变位酶 (*ARO7^{G141S}*) 解除底物抑制作用^[11], 过表达多功能酶基因 (*ARO1*) 和莽草酸激酶 (*EcaroL*) 强化代谢途径和解除限速步骤^[5], 敲除分支途径上的邻氨基苯甲酸合酶 (*TRP2*) 和预苯酸脱水酶 (*PHA2*) 基因, 阻止色氨酸和苯丙氨酸竞争氮通量, 敲除苯丙酮酸和 4-羟苯丙酮酸 (PPY 和 HPP) 脱羧酶 (*ARO10*、*PDC5* 和 *PDC6*), 减少副产物苯乙醇的产生等策略^[3], 均可有效提高对香豆酸的产量。

为获得优良的产对香豆酸工程菌株, 本研究以酿酒酵母 CEN PK2-1D 为底盘细胞, 首先通过敲除酪氨酸合成竞争路径基因 *ARO10* 和 *PDC5*, 突变芳香族氨基酸合成调控基因 *ARO4^{K229L}* 与 *ARO7^{G141S}*, 解除芳香族氨基酸负反馈抑制并整合酪氨酸解氨酶 *FjTAL*, 构建了产对香豆酸酵母菌株 C001。为进一步优化对香豆酸产量, 研究了 8 个不同氨基酸、多胺和糖类相关转运基因敲除对对香豆酸合成的影响, 并且过表达酵母和大肠糖异生途径上的关键基因, 强化前体的供应, 最后利用酪氨酸解氨酶亚细胞定位的方法, 进一步提高对香豆酸的产量, 最终获得工程菌株的对香豆酸产量可达 593.04 mg/L。

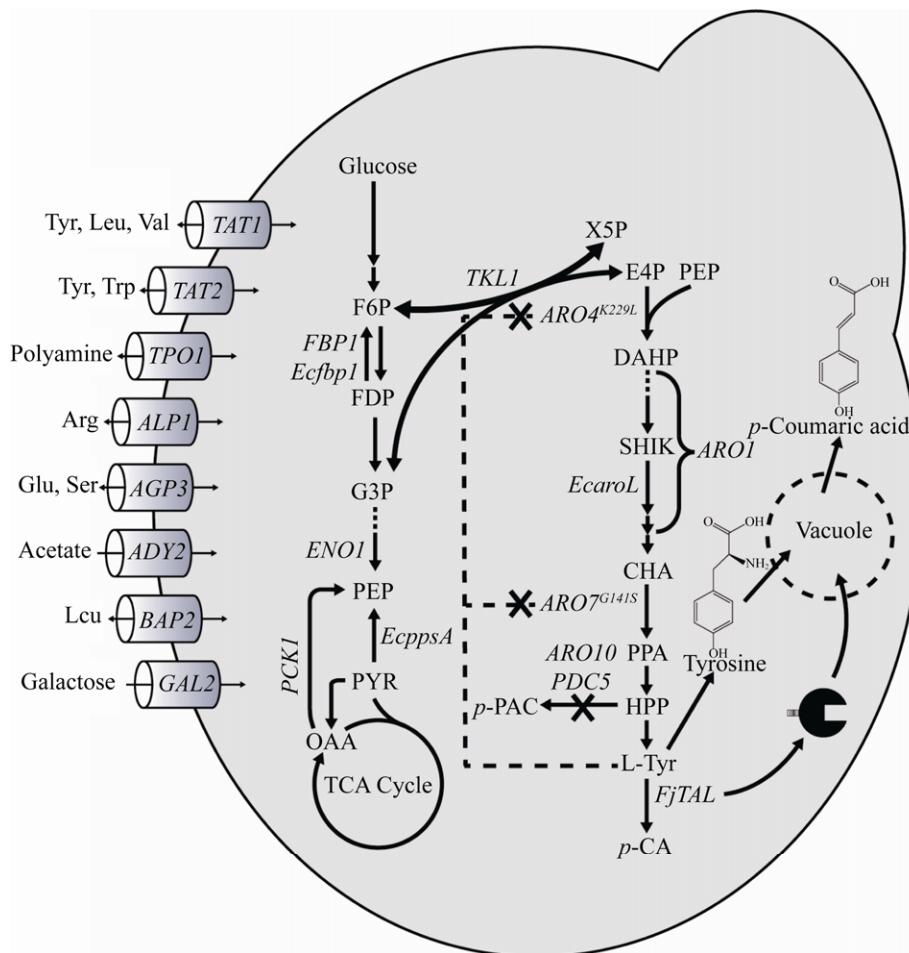


图 1 酿酒酵母中对香豆酸的生物合成途径和相关转运蛋白

Fig. 1 Biosynthetic pathway for *p*-Coumaric acid and amino acids, carbohydrate transporters in *S. cerevisiae*. *FBP1*: fructose-bisphosphatase; *Ecfbp1*: fructose-bisphosphatase from *E. coli*; *PCK1*: phosphoenolpyruvate carboxykinase; *EcppsA*: phosphoenolpyruvate synthase from *E. coli*; *ENO1*: phosphopyruvate hydratase; *EcaroL*: shikimate kinase from *E. coli*; *ARO3* and *ARO4*: 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase; *ARO1*: pentafunctional arom protein; *ARO7*: chorismate mutase; *FjTAL*: tyrosine ammonia-lyase *TAL* from *Flavobacterium johnsoniae*; *TAT1*: amino acid transporter for valine, leucine, isoleucine, and tyrosine; *TAT2*: high affinity tryptophan and tyrosine permease; *TPO1*: polyamine transporter of the major facilitator superfamily; *ALP1*: arginine transporter. *AGP3*: polyamine transporter of the major facilitator superfamily; *ADY2*: acetate transporter; *BAP2*: high-affinity leucine permease; *GAL2*: galactose permease.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

酿酒酵母 CEN PK2-1D 作为出发菌株。大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 JM109 用于所有质粒的克隆。PCR 引物及测序服务均由生工生物工程 (上海) 股

份有限公司提供。所用菌株和引物详见表 1 和表 2。

1.1.2 主要酶及相关试剂盒

一步克隆酶试剂盒购自南京 Vazyme 生物科技有限公司; DNA 聚合酶、DNA Marker 及 pMD19-T Simple Vector 购自 TaKaRa 公司; 其他化学试剂均购自国药 (分析纯)。

1.1.3 培养基

LB 培养基: 0.5% 酵母提取物, 1% 蛋白胨, 1% 氯化钠, 筛选培养基添加 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苋青霉素。

YPD 培养基: 1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖。

SC 培养基: 0.5% 硫酸铵, 0.174% 酵母基础氮源培养基 (YNB), 2% 葡萄糖。根据酵母内载体携带的标签添加 50 mg/L 缺失的氨基酸组分, 固体培养基中都额外添加 2% 的琼脂。

1.2 质粒与菌株构建

来源于黄杆菌的酪氨酸解氨酶基因 (*FjTAL*) 为本实验室前期保存, 酵母启动子、基因和终止子从 CEN PK2-1D 基因组上扩增, *EcppsA*、*Ecfbp1*、*EcaroL* 基因从大肠杆菌基因组上扩增。使用 Vazyme 的一步克隆酶或 Gibson 多片段组装酶构建质粒, 通过 PCR 及测序验证质粒是否构建成功。通过融合基因序列的上游和下游构建敲除框, 利用 CRISPR/Cas9 技术敲入或者敲除目标基

表 1 本研究所用的菌株

Table 1 Strains used in this study

Strain	Parent strains	Integrated plasmids	Source
<i>S. cerevisiae</i> CEN PK2-1D		<i>MATa Δhis3-1Δleu2 trp1Δura3</i>	Our lab
C001	<i>S. cerevisiae</i> CEN PK2-1D	<i>ARO10::GAL1, 10p-ARO4^{K229L}-ARO7^{G141S}, PDC5::GAL7p-FjTAL, GAL80Δ</i>	This study
C002	C001	<i>TAT1Δ</i>	This study
C003	C001	<i>TAT2Δ</i>	This study
C004	C001	<i>ALP1Δ</i>	This study
C005	C001	<i>TPO1Δ</i>	This study
C006	C001	<i>ADY2Δ</i>	This study
C007	C001	<i>AGP3Δ</i>	This study
C008	C001	<i>BAP2Δ</i>	This study
C009	C001	<i>GAL2Δ</i>	This study
C010	C002	<i>TAT1Δ, TAT2Δ</i>	This study
C011	C009	<i>GAL2Δ, AGP3Δ</i>	This study
C012	C009	<i>GAL2Δ, BAP2Δ</i>	This study
C013	C009	<i>pY26-TEF1p-PCK1</i>	This study
C014	C009	<i>pY26-TEF1p-ENO1</i>	This study
C015	C009	<i>pY26-GPD1p-EcppsA</i>	This study
C016	C009	<i>pY26-TEF1p-PCK1-GPD1p-EcppsA</i>	This study
C017	C009	<i>pY26-TEF1p-ENO1-GPD1p-EcppsA</i>	This study
C018	C009	<i>pY15-TEF1p-FBP1</i>	This study
C019	C009	<i>pY15-TEF1p-Ecfbp1</i>	This study
C020	C009	<i>pRS425-TEF1p-FBP1</i>	This study
C021	C009	<i>pRS425-TEF1p-Ecfbp1</i>	This study
C022	C015	<i>pY13-TEF1p-ARO1</i>	This study
C023	C015	<i>pY13-SED1p-EcaroL</i>	This study
C024	C015	<i>pY13-TEF1p-ARO1-SED1p-EcaroL</i>	This study
C025	C024	<i>pRS424-TEF1p-FjTAL</i>	This study
C026	C024	<i>pRS424-TEF1p-vtFjTAL</i>	This study

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
<i>EcppsA</i> -F	GTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGTCCAACAATGGCTCGTCA
<i>EcppsA</i> -R	TGACATAACTAATTACATGACTCGAGTTATTTCTTCAGTTCAGCCAGGC
<i>PCK1</i> -F	AAGTTTTCTAGAAGTAGCGCGGCCGCATGTCCCCTTCTAAAATGAATGCT
<i>PCK1</i> -R	GGCGAAGAATTGTTAATTAAGATCTTTACTCGAATTGAGGACCAGC
<i>ENO1</i> -F	AAGTTTTCTAGAAGTAGCGCGGCCGCATGGCTGTCTCTAAAGTTTACGCTAG
<i>ENO1</i> -R	GGCGAAGAATTGTTAATTAAGATCTTTATAATTTGTCACCGTGGTGGAAAG
<i>FBP1</i> -F	CTAAGTTTTCTAGAAGTAGTGGATCCATGCCAACTCTAGTAAATGGACC
<i>FBP1</i> -R	TCGAGGTGCGACGGTATCGATAAGCTTCTACTGTGACTTGCCAATATGG
<i>Ecfbp1</i> -F	CTAAGTTTTCTAGAAGTAGTGGATCCATGAAAACGTTAGGTGAATTTATTGTCCG
<i>Ecfbp1</i> -R	TCGAGGTGCGACGGTATCGATAAGCTTTTACGCGTCCGGGAAGTCA
<i>SED1p</i> -F	CTACCTTCCATACACCACTGATTGC
<i>SED1p</i> -R	CGGCAGATAATAGGACAGTTGATAAT
<i>EcaroL</i> -F	AACTGTCCTATTATCTGCCGATGACACAACCTCTTTTTCTGATCGG
<i>EcaroL</i> -R	AGTTAACTGATCAGCGGCCGTCAACAATTGATCGTCTGTGCCAG
<i>ADH1t</i> -F	CGGCCGCTGATCAGTAACTC
<i>ADH1t</i> -R	CTCGCTATTACGCCAGCTGAA
<i>ARO1</i> -F	GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTACTCTTTTCGTAACGGCATCA
<i>ARO1</i> -R	CTAATCTAAGTTTTCTAGAAGTAGTATGGTGCAGTTAGCCAAAGTC
<i>FjTAL</i> -F	GTTTTCTAGAAGTAGTGGATCCCCATGAACACCATTAATGAATACTTGAGTT
<i>vtFjTAL</i> -F	GTTTTCTAGAAGTAGTGGATCCCCATGAAGGCCATCTCATTGCAAAG
<i>vtFjTAL</i> -R	TTACATGACTCGAGGTGCGCGTTAATTGTTAATCAAATGATCCTTAACCTTTTG

因, 分别设计位于基因与同源臂序列上的引物, 通过 PCR 验证基因是否被成功敲除或敲入并测序验证。

1.3 产对香豆酸酵母菌株的发酵培养

挑选酿酒酵母单菌落接种到 YPD 或 SC 培养液中在 30 °C、220 r/min 活化培养 18–20 h。然后按 2% 接种量转接到装液量为 25 mL 的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、220 r/min 发酵 72 h, 初始葡萄糖浓度为 20 g/L。按一定时间间隔取样, 每次取 100 μL 发酵液稀释至 OD_{600} 在 0.2–0.8 之间, 用分光光度计检测 OD_{600} 处的吸光值。

1.4 亚细胞定位与分析

构建质粒 pRS424-TEF1p-*vtFjTAL*, 将酵母羧肽酶 Y (*PRCI*) 锚定信号肽 (KAISLQRPLGLDKDVL) 与 *FjTAL* 蛋白的 N 末端融合使其具有液泡定位功能^[12]。在酿酒酵母菌株中分别表达 *FjTAL* 和

vtFjTAL (vacuole-targeted *FjTAL*), HPLC 检测对照菌株和表达 *vtFjTAL* 菌株发酵液中对香豆酸含量。

1.5 对香豆酸产量的测定

取 500 μL 发酵液于 1.5 mL 离心管中, 加入等体积甲醇, 振荡混匀, 12 000 r/min 离心 2 min, 用 1.5 mL 注射器取上清, 上清过孔径 0.2 μm 的尼龙滤膜。使用 HPLC (Thermo) 配备 Hypersil ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 的 C18 柱与紫外检测器检测发酵液中对香豆酸的含量。对香豆酸检测波长为 290 nm, 柱温 40 °C, 流动相流速 1.0 mL/min, 上样量 10 μL。洗脱所用的两种流动相 A 相和 B 相分别为加入 0.1% (V/V) 三氟乙酸 (TFA) 的水和乙腈。流动相梯度洗脱程序为: B 相组分从 10% (0–0.1 min) 开始, 之后 B 相组分从 10% 到 40% (0.1–9.0 min) 线性增加, 然后 B 相组分从 40% 增加到 60% (9.0–15.0 min), 之后 B

相组分再从 60% 降到 10% (15–18 min), 然后 B 相组分维持在 10% (18.0–20.0 min) 直至结束, 对香豆酸滞留时间为 9.8 min, 通过与标准曲线拟合, 对对香豆酸的浓度定量。

2 结果与分析

2.1 产对香豆酸重组酵母菌株的构建

莽草酸途径中, *ARO4* 和 *ARO7* 受芳香族氨基酸的反馈抑制, 这会阻碍芳香族氨基酸的合成^[11]。此外, 丙苯酮酸 (PPY) 和 4-羟基苯丙酮酸 (4-HPP) 是生物合成芳香族氨基酸的重要前体物质, 而 *ARO10* 和 *PDC5* 催化 PPY 和 4-HPP 生成相应的苯乙醛和 4-羟基乙酸, 影响了对香豆酸前体供应^[13]。为获得一株产对香豆酸的出发菌株, 分别以 *GAL1*、10p 和 *GAL7p* 作为 *ARO4*^{K229L}、*ARO7*^{G141S} 和 *FjTAL* 的启动子, 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑方法, 将 *ARO4*^{K229L} 和 *ARO7*^{G141S} 整合到 *ARO10* 的位置上, 解除酪氨酸负反馈抑制和阻断旁路竞争途径, 将酪氨酸解氨酶 *FjTAL* 整合至 *PDC5* 的位置上。进一步敲除 *GAL80* 解除其对 *GAL* 系列启动子的影响^[14], 获得产对香豆酸重组菌株 C001 (图 2)。通过摇瓶发酵评价其产对香豆酸性能, 测定发酵液中芳香族氨基酸和对香豆酸产量。发酵结果表明发酵液中含有 296.73 mg/L 的对香豆酸, 此外分别有 22.55 mg/L、55.20 mg/L

和 56.29 mg/L 的色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸积累 (图 3)。

2.2 不同转运蛋白对对香豆酸积累的影响

有研究表明, 敲除 *TAT1*、*TPO1*、*ALP1*、*AGP3*、*ADY2*、*GAL2* 和 *BAP2* 等转运相关基因, 对香豆酸产量可提高 20%–50%^[15]。通过对蛋白功能比较发现, 这些蛋白主要与氨基酸、多胺和糖类的转运相关 (表 3), 例如 *TAT1* 与 *TAT2* 均与芳香族氨基酸的转运密切相关^[16]。为进一步研究不同转运蛋白对对香豆酸合成的影响, 在 C001 的基础上分别敲除 *TAT1*、*TAT2*、*TPO1*、*ALP1*、*AGP3*、*ADY2*、*GAL2* 和 *BAP2* 共 8 个基因, 并评价其对菌体生长的影响。

结果表明敲除 *TAT1*、*TAT2*、*ALP1*、*TPO1* 和 *ADY2* 对香豆酸产量没有明显提高且对菌体生长影响较小 (图 4)。有研究报道缺失 *TAT1* 可以减少胞内酪氨酸外泄, 增强底物的供应, 从而提高对香豆酸产量^[15]。本研究中缺失 *TAT1* 对香豆酸产量却没有提高, 可能是因为 C001 对香豆酸产量较低, 单敲除 *TAT1* 并没有影响胞内酪氨酸前体的供应, 不会显著改变对香豆酸产量。进一步在 *TAT1* 缺失的基础上敲除同样具有酪氨酸转运功能的 *TAT2*, 结果表明双敲除菌株前 24 h 生长缓慢, 推测双敲除菌株 C010 在生长早期芳香族氨

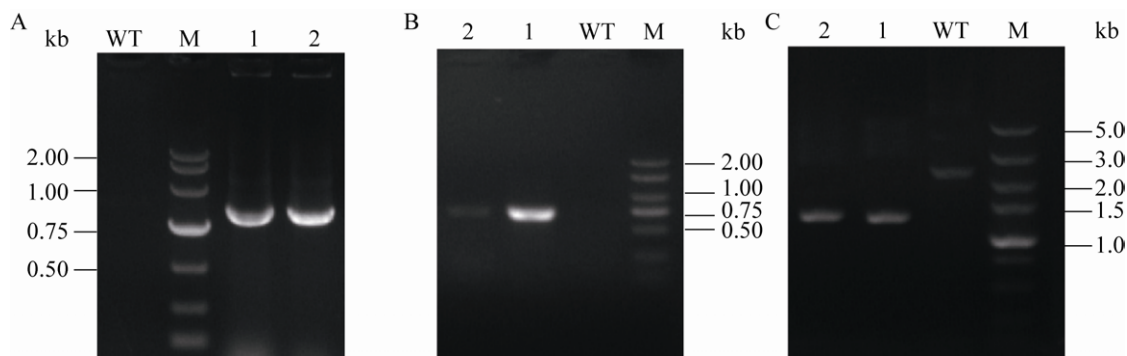


图 2 产对香豆酸重组菌株 PCR 验证

Fig. 2 PCR validation of recombinant strain C001. (A) Integration of *FjTAL* at *PDC5* site. (B) Integration of *ARO4*^{K229L} and *ARO7*^{G141S} at *ARO10* site. (C) Knockout of *GAL80*. WT: wild type; M: DNA marker; 1–2: strain C001.

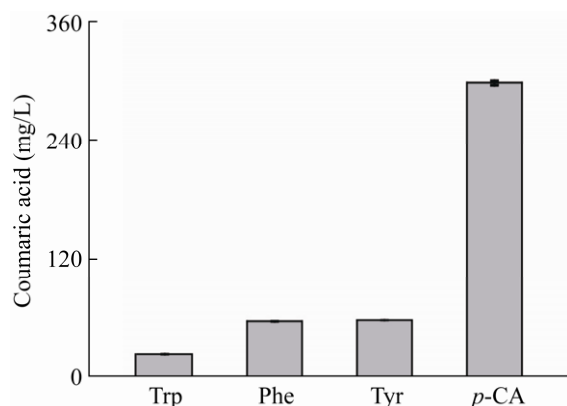


图3 C001菌株发酵72 h后色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和对香豆酸产量

Fig. 3 Yield of tryptophan(Trp), phenylalanine(Phe), tyrosine(Tyr) and p-CA for C001 strain at 72 h.

氨基酸摄取受限, 导致前期生长缓慢, 进而影响对香豆酸产量。此外, 敲除 *AGP3*、*BAP2* 和 *GAL2* 后对香豆酸产量分别提高了 8.98%、16.82% 和 46.14%。然而, 在单敲除 *GAL2* 的 C009 菌株基础上分别敲除 *AGP3* (C011) 和 *BAP2* (C012), 对香豆酸产量并未进一步提高。其中 C011 菌株生长受到影响, 对香豆酸产量反而降低了 7.76%。初步研究结果表明部分转运蛋白的敲除可以有效提高对香豆酸产量, 而不同转运蛋白的协同作用还需进一步研究。

2.3 强化糖异生途径积累 PEP 和 E4P

莽草酸途径是芳香族氨基酸合成的主要途

表3 *TAT1*、*TAT2*、*TPO1*、*ALP1*、*AGP3*、*ADY2*、*GAL2* 和 *BAP2* 基因的功能

Table 3 Function of 8 genes including *TAT1*, *TAT2*, *TPO1*, *ALP1*, *AGP3*, *ADY2*, *GAL2* and *BAP2*

Gene	Function
<i>TAT1</i>	Amino acid transporter for valine, leucine, isoleucine, and tyrosine; low-affinity tryptophan and histidine transporter
<i>TAT2</i>	High affinity tryptophan and tyrosine permease
<i>TPO1</i>	Polyamine transporter of the major facilitator superfamily
<i>ALP1</i>	Arginine transporter
<i>AGP3</i>	Low-affinity amino acid permease
<i>ADY2</i>	Acetate transporter required for normal sporulation
<i>GAL2</i>	Galactose permease; required for utilization of galactose; also able to transport glucose
<i>BAP2</i>	High-affinity leucine permease; functions as a branched-chain amino acid permease involved in uptake of leucine, isoleucine and valine

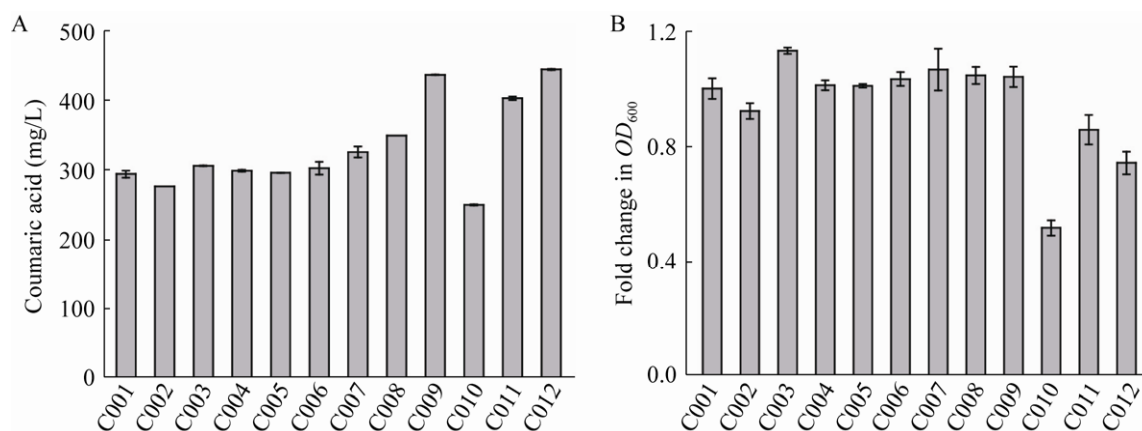


图4 转运蛋白基因敲除对对香豆酸产量(A)及酵母生长(B)的影响

Fig. 4 Effect of transporter genes knockout on p-CA yield and yeast growth. (A) Effects of single and double knockouts of 8 genes on p-CA yield. (B) Effects of single and double knockout on strain growth at 24 h in fermentation. The OD_{600} of C001 was set as 1.

径,其中 PEP 和 E4P 是该途径的关键前体 (图 1)。在酿酒酵母中,糖异生途径合成 PEP 由 *PYCI* 和 *PCK1* 催化^[17],而在大肠杆菌中,*EcppsA* 可将丙酮酸转化为 PEP^[18]。酿酒酵母和大肠杆菌中,果糖-1,6-二磷酸 (FDP) 在果糖二磷酸酶 *FBP* 催化作用下转化为果糖 6 磷酸 (F6P),进而合成 E4P^[19]。为进一步提高前体 PEP 和 E4P 的供应,分别过表达 *PCK1*、*EcppsA*、*ENO1*、*FBP1*、*Ecfbp1* 并分析其对香豆酸积累的影响 (图 5)。结果表明单独过表达 *ENO1*、*PCK1* 对香豆酸产量都没有显著提高,而在 C015 中过表达 *EcppsA* 后,对香豆酸产量提高到 475.11 mg/L。在过表达 *EcppsA* 基础上分别过表达 *ENO1*、*PCK1*,改造后菌株 C016 和 C017 的对香豆酸产量并没有进一步提升。以

往也有类似研究表明在酿酒酵母中过表达 *PCK1* 时并没有明显增加 PEP 积累,可能是由于酿酒酵母胞内草酰乙酸浓度过低导致^[20]。最后,分别利用低拷贝和高拷贝质粒过表达酿酒酵母和大肠杆菌来源的果糖二磷酸酶基因,均对菌株生长有明显抑制作用,可能是过表达果糖二磷酸酶基因使胞内同时进行糖异生和糖酵解循环造成 ATP 浪费^[21],从而阻碍酵母正常生长。以上结果表明对糖异生途径中不同基因的组合调控,有利于进一步强化对香豆酸前体供应。

2.4 *FjTAL* 蛋白亚细胞定位

前期研究表明,*FjTAL* 不能将发酵过程中积累的酪氨酸完全转化为对香豆酸,导致部分前体芳香族氨基酸的积累。而 *FjTAL* 游离过表达可以

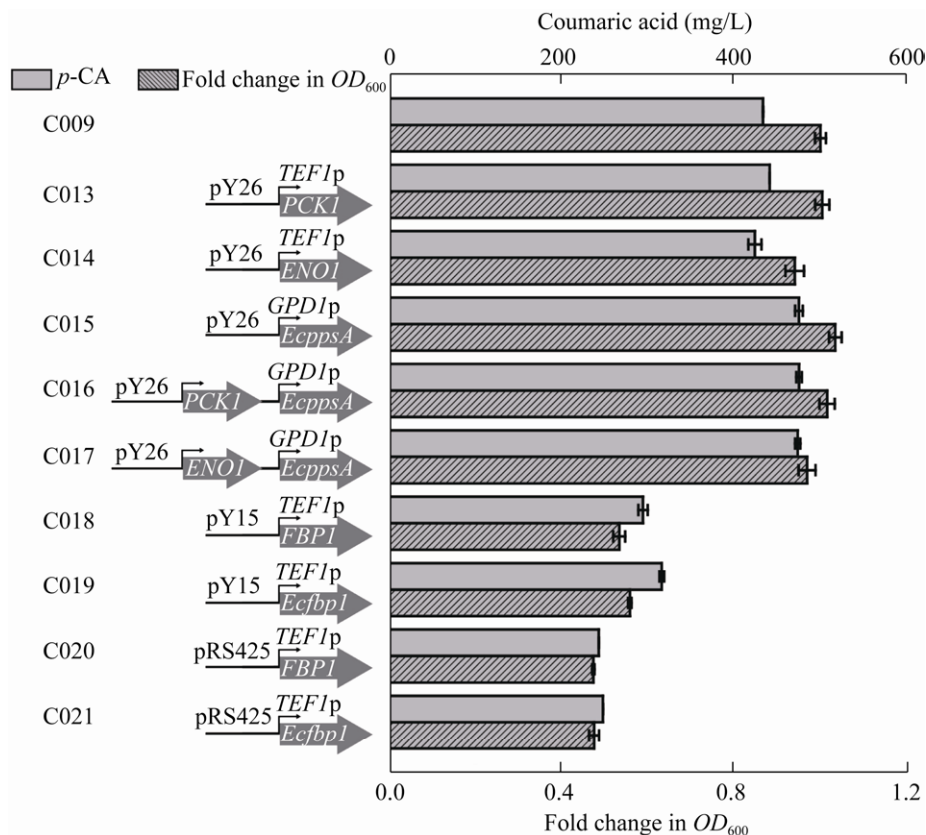


图 5 糖异生和糖酵解途径相关基因对对香豆酸产量和重组菌生长的影响

Fig. 5 Effects of gluconeogenesis and glycolysis pathways related genes on *p*-CA yield and growth. The OD_{600} of C009 was set as 1.

提高酪氨酸的转化效率,对香豆酸产量提高了4.64%,因此 *FjTAL* 催化效率不足是影响对香豆酸积累的限制因素。已有研究报道,酵母液泡会在氮源丰富时储存50%的氨基酸,在氮源缺乏时,液泡中氨基酸排泄到细胞质中保证酵母生长^[22]。为进一步促进酪氨酸有效转化,利用羧肽酶Y的锚定肽将 *FjTAL* 定位到液泡,改造后菌株 C026 对香豆酸产量为 593.04 mg/L,提高了 23.31% (图 6A)。以上研究结果表明,相较于游离表达 *FjTAL*,将 *FjTAL* 定位于液泡的策略是有效的,可能是由于液泡定位后的 *FjTAL* 能够快速利用液泡中的酪氨酸,增加局部氨基酸底物浓度,提高催化效率,使得对香豆酸产量提高。

3 讨论

对香豆酸及其衍生物在医药和保健品领域具有重要的应用前景,因此构建能够高效合成对香豆酸的工程菌株具有重要意义。本研究中,通过表达莽草酸途径上的抗反馈抑制基因 *ARO4*^{K229L}

和 *ARO7*^{G141S} 解除限速步骤,敲除 *ARO10* 和 *PDC5* 阻断旁路竞争途径和过表达 *FjTAL*, 获得产对香豆酸工程菌株 C001。在 C001 的基础上,分别敲除 *TAT1*、*TAT2*、*TPO1*、*ALP1*、*AGP3*、*ADY2*、*GAL2* 和 *BAP2*, 筛选影响酵母合成对香豆酸的关键基因 *GAL2*, *GAL2* 敲除菌株 C009 对香豆酸产量提高了 46.14%。有研究表明过表达莽草酸途径相关基因能有效提高对香豆酸产量^[23-24], 我们尝试过表达了莽草酸途径上的基因 *ARO1* 和 *EcaroL*, 但没有明显效果。为进一步强化 PEP 和 E4P 前体供应,过表达酵母和大肠杆菌糖异生途径上的 *PCK1*、*EcppsA*、*ENO1*、*FBP1*、*Ecfbp1* 基因,研究发现只有过表达 *EcppsA* 基因可将香豆酸产量提高至 475.11 mg/L。由于 *FjTAL* 酪氨酸解氨酶是对香豆酸合成的关键酶,其催化性能不足,限制对香豆酸的有效积累^[25]。利用亚细胞定位策略,将 *FjTAL* 过表达并锚定到酵母液泡上,提高液泡中酪氨酸利用率,对香豆酸产量提高至 593.04 mg/L。综上,通过代谢工程优化产对香豆

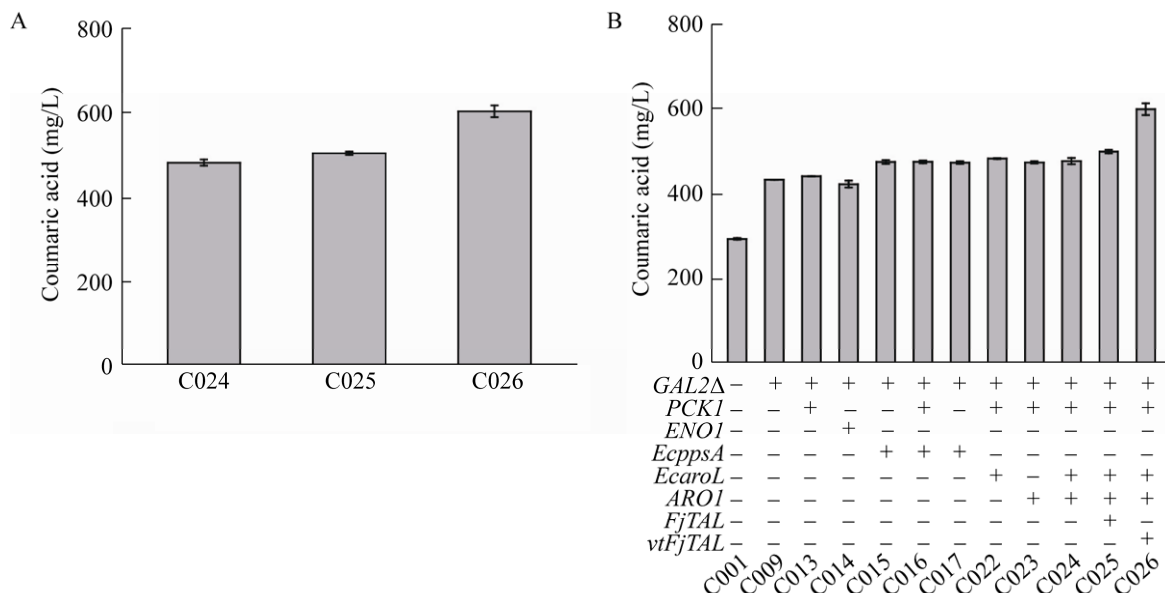


图 6 *FjTAL* 锚定到液泡和系统代谢工程改造优化对对香豆酸产量的影响。(A: *FjTAL* 游离表达和锚定到液泡对对香豆酸产量的影响; B: C001 基础上敲除及过表达不同基因对对香豆酸产量的影响)

Fig. 6 Effect of vacuole-targeted *FjTAL* enzyme and metabolic engineering optimization on *p*-CA yield. (A) Effects of free expression and vacuole-targeting *FjTAL* on *p*-CA yield. (B) *p*-CA quantification of the different engineered strains.

酸酵母工程菌株,对香豆酸产量较出发菌株提高了近一倍(图6B),为接下来对香豆酸衍生物的高效生物合成研究奠定基础。

REFERENCES

- [1] Li YK, Li J, Qian BB, et al. *De novo* biosynthesis of *p*-coumaric acid in *E. coli* with a *trans*-cinnamic acid 4-hydroxylase from the amaryllidaceae plant *Lycoris aurea*. *Molecules*, 2018, 23(12): 3185.
- [2] Lopez-Nieves S, Pringle A, Maeda HA. Biochemical characterization of TyrA dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* (Ascomycota) and *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycota). *Arch Biochem Biophys*, 2019, 665: 12–19.
- [3] 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.
- [4] Wang YC, Halls C, Zhang J, et al. Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 455–463.
- [5] Rodriguez A, Kildegaard KR, Li ML, et al. Establishment of a yeast platform strain for production of *p*-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis. *Metab Eng*, 2015, 31: 181–188.
- [6] 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.
- [7] Suástegui M, Guo WH, Feng XY, et al. Investigating strain dependency in the production of aromatic compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(12): 2676–2685.
- [8] Gold ND, Gowen CM, Lussier FX, et al. Metabolic engineering of a tyrosine-overproducing yeast platform using targeted metabolomics. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 73.
- [9] Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, et al. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2013, 15: 55–66.
- [10] Suástegui M, Ng CY, Chowdhury A, et al. Multilevel engineering of the upstream module of aromatic amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* for high production of polymer and drug precursors. *Metab Eng*, 2017, 42: 134–144.
- [11] Luttik MAH, Vuralhan Z, Suir E, et al. Alleviation of feedback inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* aromatic amino acid biosynthesis: quantification of metabolic impact. *Metab Eng*, 2008, 10(3/4): 141–153.
- [12] Farhi M, Marhevka E, Masci T, et al. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 474–481.
- [13] Romagnoli G, Luttik MAH, Kötter P, et al. Substrate specificity of thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxo-acid decarboxylases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(21): 7538–7548.
- [14] Lohr D, Venkov P, Zlatanova J. Transcriptional regulation in the yeast *GAL* gene family: a complex genetic network. *Faseb J*, 1995, 9(9): 777–787.
- [15] Rodriguez A, Chen Y, Khoomrung S, et al. Comparison of the metabolic response to over-production of *p*-coumaric acid in two yeast strains. *Metab Eng*, 2017, 44: 265–272.
- [16] Wang MM, Toda K, Block A, et al. *TAT1* and *TAT2* tyrosine aminotransferases have both distinct and shared functions in tyrosine metabolism and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2019, 294(10): 3563–3576.
- [17] Huet C, Menendez J, Gancedo C, et al. Regulation of *pyc1* encoding pyruvate carboxylase isozyme I by nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 2000, 267(23): 6817–6823.

-
- [18] Shimizu K, Matsuoka Y. Regulation of glycolytic flux and overflow metabolism depending on the source of energy generation for energy demand. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(2): 284–305.
- [19] Luo ZS, Zeng WZ, Du GC, et al. Enhanced pyruvate production in *Candida glabrata* by engineering ATP futile cycle system. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(4): 787–795.
- [20] Navas MA, Cerdán S, Gancedo JM. Futile cycles in *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(4): 1290–1294.
- [21] Hoffman M, Chiang HL. Isolation of degradation-deficient mutants defective in the targeting of fructose-1,6-bisphosphatase into the vacuole for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1996, 143(4): 1555–1566.
- [22] Kawano-Kawada M, Kakinuma Y, Sekito T. Transport of amino acids across the vacuolar membrane of yeast: Its mechanism and physiological role. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(10): 1496–1501.
- [23] Liu QL, Yu T, Li XW, et al. Rewiring carbon metabolism in yeast for high level production of aromatic chemicals. *Nat Commun*, 2019, 10: 4976.
- [24] Bergman A, Hellgren J, Moritz T, et al. Heterologous phosphoketolase expression redirects flux towards acetate, perturbs sugar phosphate pools and increases respiratory demand in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 25.
- [25] Lehka BJ, Eichenberger M, Bjørn-Yoshimoto WE, et al. Improving heterologous production of phenylpropanoids in *Saccharomyces cerevisiae* by tackling an unwanted side reaction of Tsc13, an endogenous double-bond reductase. *FEMS Yeast Res*, 2017, 17(1): fox004.

(本文责编 陈宏宇)