

• 生物育种与工艺优化 •

产虫草素酿酒酵母工程菌株的构建与发酵优化

霍春红¹, 李鸿宇¹, 李倩², 王际辉^{1,3}, 李成¹, 王亮¹

1 大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034

2 大连大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622

3 东莞理工学院 化学工程与能源技术学院, 广东 东莞 523808

霍春红, 李鸿宇, 李倩, 等. 产虫草素酿酒酵母工程菌株的构建与发酵优化. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3334-3347.

Huo CH, Li HY, Li Q, et al. Construction and optimization of cordycepin-producing *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3334-3347.

摘要: 虫草素作为药用真菌蛹虫草的主要活性成分, 具有抗肿瘤、抗病毒等多种生理功能。现阶段虫草素主要通过蛹虫草液体发酵生产, 但发酵周期长、生产强度低, 制约了其大规模开发利用。文中在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C 中异源表达虫草素合成关键基因 *ScCNS1* 和 *ScCNS2*, 成功构建了产虫草素的酵母工程菌 SHC16, 发酵 240 h 虫草素产量可达 67.32 mg/L; 基因表达分析显示, 发酵后期磷酸戊糖途径、嘌呤代谢及虫草素合成途径关键酶编码基因 *ZWF1*、*PRS4*、*ADE4*、*ScCNS1* 及 *ScCNS2* 表达水平显著上调。进一步地, 通过优化发酵培养基组成, 确定以 50 g/L 葡萄糖为初始底物结合一次补料、添加 5 mmol/L Cu^{2+} 和 1.0 g/L 腺嘌呤为最适培养基组成。基于此在 5 L 搅拌发酵罐中开展补料分批发酵, 144 h 虫草素产量达到 137.27 mg/L, 生产强度达 0.95 mg/(L·h), 较未优化发酵体系提高 240%。

关键词: 酿酒酵母, 虫草素, 蛹虫草, 补料分批发酵, 培养基优化

Received: November 22, 2020; **Accepted:** March 3, 2021

Supported by: Science Research Foundation of Department of Science & Technology of Liaoning Province, China (No. 2019-ZD-0575), Science Research Foundation of Educational Department of Liaoning Province, China (No. J2020102), Science and Technology Innovation Foundation of Dalian, China (No. 2019J12SN59), Dalian Youth Science and Technology Star Project (No. 2019RQ104).

Corresponding authors: Liang Wang. Tel: +86-411-86324050; E-mail: wangliang@dlpu.edu.cn

Qian Li. E-mail: lq2003dlut007@163.com

辽宁省科技厅自然科学基金 (No. 2019-ZD-0575), 辽宁省教育厅科研项目 (No. J2020102), 大连市科技创新基金 (No. 2019J12SN59), 大连市青年科技之星项目 (No. 2019RQ104) 资助。

Construction and optimization of cordycepin-producing *Saccharomyces cerevisiae*

Chunhong Huo¹, Hongyu Li¹, Qian Li², Jihui Wang^{1,3}, Cheng Li¹, and Liang Wang¹

¹ School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

² School of Life Science and Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning, China

³ School of Chemical Engineering and Energy Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, Guangdong, China

Abstract: Cordycepin is the key active component of medicinal fungus *Cordyceps militaris*, and it shows multiple functional activities such as anti-tumor and anti-virus. Cordycepin was conventionally produced by liquid fermentation of *C. militaris*, but the long production cycle and the low productivity constrained its development and application. In this study, two key genes for cordycepin biosynthesis (*ScCNS1* and *ScCNS2*) were introduced into *Saccharomyces cerevisiae* S288C, producing 67.32 mg/L cordycepin at 240 h. Analysis of gene expression profiles indicated that *ZWF1*, *PRS4*, *ADE4*, *ScCNS1* and *ScCNS2* which encode enzymes involved in pentose phosphate pathway, purine metabolism and cordycepin biosynthesis pathway, were significantly up-regulated in the late phase of fermentation. Optimization of fermentation medium determined that 50 g/L initial glucose followed by feeding, supplemented with 5 mmol/L Cu^{2+} and 1.0 g/L adenine were the best condition. Fed-batch fermentation using the engineered yeast in a 5 L stirred fermenter produced 137.27 mg/L cordycepin at 144 h, with a productivity up to 0.95 mg/(L·h) reached, which was 240% higher than that of the control.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, cordycepin, *Cordyceps militaris*, fed-batch fermentation, medium optimization

虫草素 (Cordycepin), 又名 3'-脱氧腺苷 (3'-deoxyadenosine), 1951 年首次被 Cunningham 等从蛹虫草 *Cordyceps militaris* 发酵液中分离得到^[1], 是第一个从真菌中分离出来的核苷类抗生素^[2], 因其具有抗癌^[3]、治疗白血病^[4]、免疫调节^[5]、抗肺细胞纤维化^[6]等医用价值, 引起了学术界和医学临床研究的高度关注。

虫草素获取途径主要包括化学合成法和生物法, 其中生物法包括两种途径: 直接从天然或人工培育的蛹虫草子实体中提取, 或经过液体发酵从蛹虫草菌丝体和发酵液中提取。目前, 虫草素多源自蛹虫草液体发酵, 但发酵周期长 (15–60 d)、生产强度低, 导致虫草素价格昂贵, 不利于虫草素的大规模应用。中国科学院上海植物生理研究所王成树研究员团队利用比较基因组分析蛹虫草基因组, 挖掘了虫草素生物合成基因簇 (*cns1*–4), 通过基因敲除、异源表达和代谢途径分析等技术对 *cns1*–4 进行功能分析, 明确了负责合成虫草素

的两个关键基因: 编码氧化还原酶的 *cns1* (CCM_04436, NCBI 序列号: XM_006669584.1) 和编码磷酸水解酶的 *cns2* (CCM_04437, NCBI 序列号: XM_006669585.1)。虽然虫草素生物合成机制至今尚未完全阐明, 但该团队提出了较合理的虫草素生物合成途径假设^[7]: 通过 *cns3* 编码的核苷酸激酶催化腺苷磷酸化形成 3'-磷酸腺苷 (3'-AMP), 进一步通过 *cns2* 编码的磷酸水解酶催化 3'-AMP 去磷酸化生成 2'-羧基-3'-脱氧腺苷, 最后通过 *cns1* 编码的氧化还原酶催化还原反应产生虫草素 (图 1)。虫草素生物合成关键基因的确定及代谢途径的初步解析, 为基于酿酒酵母等底盘细胞构建基因工程菌株实现虫草素高效生产奠定了基础。

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 作为常用的模式真菌, 具有生物安全、遗传背景清晰、发酵周期短、适于大规模工业生产等优点。目前, 在酿酒酵母中已经实现了多种代谢产物的异源合

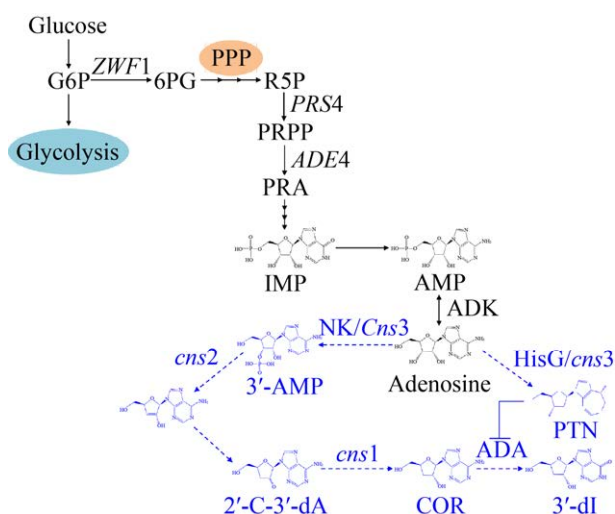


图1 蛹虫草中虫草素生物合成途径预测^[7]

Fig. 1 The possible biosynthesis pathway of cordycepin in *C. militaris*^[7]. G6P: glucose-6-phosphate; 6PG: 6-phospho-D-glucono-1,5-lactone; R5P: ribose 5-phosphate; PRPP: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; PRA: 5-phosphoribosylamine; IMP: inosine monophosphate; AMP: adenosine monophosphate; 3'-AMP: adenosine-3'-monophosphate; 2'-C-3'-dA: 2'-carbonyl-3'-deoxyadenosine; 3'-dI: 3'-deoxyinosine; COR: cordycepin; PTN: pentostatin; ADK: adenosine kinase; ADA: adenosine deaminase; NK: an N-terminal nucleoside/nucleotide kinase; HisG: a C-terminal HisG family of ATP phosphoribosyltransferases; PPP: pentose phosphate pathway.

成^[8], 2006年美国Keasling教授团队通过在酿酒酵母中异源表达青蒿酸合成途径的关键酶基因: 紫穗槐二烯合成酶(ADS)、细胞色素P450单加氧酶及其天然氧化还原酶(CYP71AV1/CPR), 并通过过表达截短的HMG-CoA还原酶、下调ERG9基因表达等方法增强法尼焦磷酸(Farnesyl diphosphate, FPP)代谢通量、削弱由FPP向麦角固醇转化的代谢通量、促进青蒿酸前体紫穗槐二烯的生成进而高效合成青蒿酸, 最终积累超过100 mg/L青蒿酸, 并通过发酵优化等手段将青蒿酸产量提高到2.5 g/L^[9]。该团队进一步通过改造酿酒酵母甲羟戊酸途径、引入合成己酰CoA的代谢途径、表达大麻酸生物合成的酶基因CsTKs和CsOAC、大麻酸酯香叶基转移酶基因CsPT4等多个外源基因

等手段, 提高了酿酒酵母底盘细胞香叶基焦磷酸(Geranyl pyrophosphate, GPP)的代谢通量, 最终实现了包括大麻萜酚酸(Cannabigerolic acid, CBGA)、四氢大麻酚(Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid, THCA)、大麻二酚(Cannabidiolic acid, CBDA)在内的多种主要大麻素及其衍生物的生物全合成^[10]。

本研究拟在酿酒酵母*S. cerevisiae* S288C中构建虫草素生物合成途径, 虫草素合成关键基因*cns1*和*cns2*经密码子优化后在酿酒酵母*S. cerevisiae* S288C中异源表达, 成功构建产虫草素的酵母工程菌。随后在深层液体发酵体系进行了关键基因表达分析, 并对碳源、氮源、前体以及金属离子等培养基组分进行优化进一步提高虫草素产量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

酿酒酵母*S. cerevisiae* S288C作为出发菌株, 大肠杆菌*Escherichia coli* DH5 α 用于所有质粒的克隆。实验所用菌株详见表1。

1.1.2 培养基

LB培养基(g/L): 氯化钠10, 酵母浸粉5, 胰蛋白胨10(pH 7.0–7.2)。

YPD培养基(g/L): 葡萄糖30, 酵母浸粉10, 蛋白胨10。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

参考蛹虫草菌*C. militaris* CGMCC 3.14242基因组中*cns1*和*cns2*序列信息, 按酿酒酵母密码子优化并合成*ScCNS1*和*ScCNS2*基因。以酿酒酵母*S. cerevisiae* S288C基因组为模板, 分别PCR扩增*TDH3*和*TEF1*启动子序列、*CYC1*和*ADH1*终止子序列。将扩增得到的各片段按*TDH3p-ScCNS1-CYC1t*和*TEF1p-ScCNS2-ADH1t*构建基因表达盒, 通过无缝克隆技术连接至带有卡那霉

素抗性基因的游离表达载体 pYES2-Kan 上, 得到重组质粒 pYES2-ScCNS。本研究涉及的质粒和引物如表 1 和表 2 所示。

1.2.2 酵母转化和阳性克隆筛选

酿酒酵母转化采用 LiAc 化学转化法^[11]。向 50 μL 感受态细胞中加入转化混合液 (250 μL PEG3350 (50%, W/V)、36 μL 1.0 mol/L LiAc、25 μL ssDNA (2 mg/mL)、50 μL ddH₂O 和 5 μL 质粒 DNA), 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20–25 min, 加入 700 μL YPD 培养基 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 涂布于 YPD 固体平板 (含 250 $\mu\text{g/mL}$ G418), 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2–3 d 后挑选阳性克隆。液体培养后提取质粒^[11], 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 纯化质粒 (MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0, TaKaRa, 大连) 进行 PCR 和酶切验证。

1.2.3 摇瓶液体发酵

将–80 $^{\circ}\text{C}$ 保藏的酵母甘油液体种子接种到新鲜 YPD 培养基中 (1%, V/V), 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 活化培养 14–16 h。按 1% (V/V) 接种量转接到装液量为 100 mL 的 250 mL 三角瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 发酵 240 h, 初始葡萄糖浓度为 30 g/L、50 g/L 或 100 g/L, 测定生物量、残糖、乙醇及虫草素浓度。

1.2.4 发酵罐补料分批发酵

按 10% (V/V) 接种量将 300 mL 酵母液体活化种子接入装有 2 700 mL YPD 培养基 (初始 50 g/L 葡萄糖) 的 5 L 搅拌发酵罐中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、300 r/min 进行深层液体发酵, 通气量为 1.5 L/min。采用补料策略, 初始底物葡萄糖耗尽后, 在第 48 h 进行补料 (补料后葡萄糖浓度为 25 g/L), 每隔 24 h 取样测定生物量、残糖、乙醇及虫草素浓度。

1.2.5 基因表达分析

取 4 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 菌体用去离子水清洗 2 次, 液氮速冻后–80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。样品经液氮和石英砂研磨, 采用 TRIZOL 法提取总 RNA (TaKaRa, 大连), 通过反

转录试剂盒 (EasyScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix, 北京全式金生物技术有限公司) 将其反转录成 cDNA, 再利用 qPCR 定量试剂盒 (TransStart[®] Top Green qPCR Super Mix, 北京全式金生物技术有限公司) 进行 qRT-PCR 分析, 检测基因表达水平。以酿酒酵母 *ACT1* 基因为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量^[12], 相关引物如表 2 所示。

1.2.6 生物量测定

取 4 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 2 min, 经去离子水洗 2 次后收集菌体, 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重, 称重并计算生物量浓度。

1.2.7 葡萄糖及乙醇浓度测定

发酵液中葡萄糖及乙醇浓度采用 SBA 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所) 测定。

1.2.8 发酵液中虫草素鉴定及定量分析

发酵液中虫草素鉴定及定量分析分别选用液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 法及高效液相色谱 (HPLC) 法^[13]。色谱条件: 流动相为水: 甲醇 (80:20) 梯度, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速为 0.5 mL/min, 检测波长范围为 210–400 nm, 进样量 5 μL 。质谱条件: TSQ Quantum Ultra 三重四极杆液质联用仪 (Thermo Scientific, USA), 配有电喷雾离子源 (Electrospray ionization, ESI), 选择反应监测扫描 (Selected reaction monitoring, SRM) 模式。离子源温度: 380 $^{\circ}\text{C}$; 喷雾气压 0.069 MPa; 辅助气体 GS1 0.34 MPa, 辅助气体 GS2 0.52 MPa; 离子喷雾电压 5 000 V; 碰撞能量 20 V; 出口电压 27 V; 质荷比 m/z 范围为 50–350。

1.2.9 细胞存活率测定

酵母细胞存活率采用美蓝染色法测定。取 200 μL 发酵液, 5 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用生理盐水重悬菌体, 1:1 (V/V) 加入吕氏碱性美蓝染液, 染色 3 min 后, 显微镜计数, 计算细胞存活率。

表 1 菌种和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains/Plasmids	Descriptions	Sources
Strains		
<i>S. cerevisiae</i> S288C	<i>MATα</i> <i>SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	Our lab
<i>S. cerevisiae</i> SHC01	pYES2-Kan inserted	This study
<i>S. cerevisiae</i> SHC16	pYES2-ScCNS inserted	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	Competent cells	TaKaRa, Dalian
<i>C. militaris</i> CGMCC 3.14242	With the gene cluster for cordycepin biosynthesis	Donored by Prof. Chengshu Wang from Shanghai Institute of Plant Physiology & Ecology
Plasmids		
pYES2-Kan	<i>URA3</i> replaced by <i>KanMX4</i>	Our lab
pYES2-ScCNS	With cassettes <i>TDH3p-ScCNS1-CYC1t</i> and <i>TEF1p-ScCNS2-ADH1</i> integrated into the plasmid pYES2-Kan	This study

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	Cassettes involved
<i>TDH3p</i> -F	TTCGGATCTTCCAGAGATATCCAGTTTCGAGTTTATCATTATCAATACTGC	<i>TDH3</i> promoter
<i>TDH3p</i> -R	CGTTCTCGTTCATGGCCATTTTGTGTTTATGTGTGTTTATTTCGA	
<i>ScCNS1</i> -F	AATGGCCATGAACGAGAACGG	<i>ScCNS1</i>
<i>ScCNS1</i> -R	CATGATTATCAGGCAATGCCAACCTTA	
<i>CYC1t</i> -F	GGCATTGCCGTGATAATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACA	<i>CYC1</i> terminator
<i>CYC1t</i> -R	CAACTGCCGTCGACGATATCGAAATTAAGCCTTCGAGCG	
<i>TEF1p</i> -F	TTCGGATCTTCCAGAGATATCCCTTGCCAACAGGGAGTTCTT	<i>TEF1</i> promoter
<i>TEF1p</i> -R	GCTGAAGTTGGACAGGACATTTTGTAATTAAGCTTAGATTAGATTGCTATG	
<i>ScCNS2</i> -F	ATGTCCTGTCCAACCTTCAGCAGG	<i>ScCNS2</i>
<i>ScCNS2</i> -R	TCGCTTATCACCTATGCTGGGTCCTGG	
<i>ADH1t</i> -F	CCAGCATAGGTGATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTA	<i>ADH1</i> terminator
<i>ADH1t</i> -R	CAACTGCCGTTTCGACGATATCCATGCCGGTAGAGGTGTGGT	
Fragment1-F	ATTAAGCTTGGTACCGAGCTCCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATACTGC	The combination of <i>TDH3</i> promoter, <i>ScCNS1</i> gene and <i>CYC1</i> terminator
Fragment1-R	GGCAAGGGCAAATTAAGCCTTCGAGCG	
Fragment2-F	GGCTTTAATTTGCCCTTGCCAACAGGGAGTTCTT	The combination of <i>TEF1</i> promoter, <i>ScCNS2</i> gene and <i>ADH1</i> terminator
Fragment2-R	GTTACTAGTGGATCCGAGCTCCATGCCGGTAGAGGTGTGGT	
qACT1-F	ACCATGTTCCCAGGTATTGC	<i>ACT1</i> for qPCR
qACT1-R	TGGACCACTTTCGTCGTATTC	
qCNS1-F	CGACTACTTGAGGAGACCA	<i>ScCNS1</i> for qPCR
qCNS1-R	GCAAGATGGTCTTAACGCC	
qCNS2-F	CAGACATCGTTGCTAAGCAC	<i>ScCNS2</i> for qPCR
qCNS2-R	CGACCTTTTGAGCGTCTTC	
qPRS4-F	CTCCCATCCTGATTGGCTG	<i>PRS4</i> for qPCR
qPRS4-R	CTCACCTATGGTGACAGAGG	
qADE4-F	GCCCACTTGAGATATCCTACAG	<i>ADE4</i> for qPCR
qADE4-R	GTAAGTCCGAATCACTGTCC	
qZWF1-F	CGGCTATTTGACTCTATAGGC	<i>ZWF1</i> for qPCR
qZWF1-R	CCTCAGATTTACCGTACTGGC	

2 结果与分析

2.1 产虫草素酿酒酵母工程菌的构建

蛹虫草虫草素合成关键基因的功能验证为建立基于酿酒酵母底盘细胞构建产虫草素的基因工程菌株奠定了基础^[7]。本研究构建了游离表达 *ScCNS1* 和 *ScCNS2* 的重组质粒 pYES2-*ScCNS* (图 2A)。重组质粒经酶切及测序验证后转入酿酒酵母 S288C 感受态细胞, 获得的阳性克隆 PCR 验证后经液体发酵筛选得到一株发酵性能优异的酵母工程菌株 SHC16 (图 2B, D)。工程菌 SHC16 发酵液经过 LC-MS/MS 分析 (图 2C), 存在与虫草素标准品出峰时间及质荷比 (m/z) 一致的代谢

物, 由此确认工程菌 SHC16 能发酵生产虫草素。

为考察 *ScCNS1* 和 *ScCNS2* 表达对酵母细胞的影响, 本研究比较了原始宿主 S288C、工程菌 SHC01 (含空白质粒 pYES2-Kan) 以及 SHC16 (含重组质粒 pYES2-*ScCNS*) 的发酵特性。

如图 3 所示, 发酵 12 h, S288C、SHC01 及 SHC16 发酵体系的残糖浓度分别为 (16.14 ± 0.14) g/L、 (18.98 ± 0.19) g/L 和 (23.12 ± 0.44) g/L, 生物量浓度分别为 (1.88 ± 0.033) g/L、 (1.38 ± 0.044) g/L 和 (0.38 ± 0.15) g/L。发酵 48 h 后 S288C 和 SHC01 的生物量浓度基本一致, 但 SHC16 生物量浓度仅为 (4.08 ± 0.13) g/L, 较 S288C 降低 15.53%。实验结果

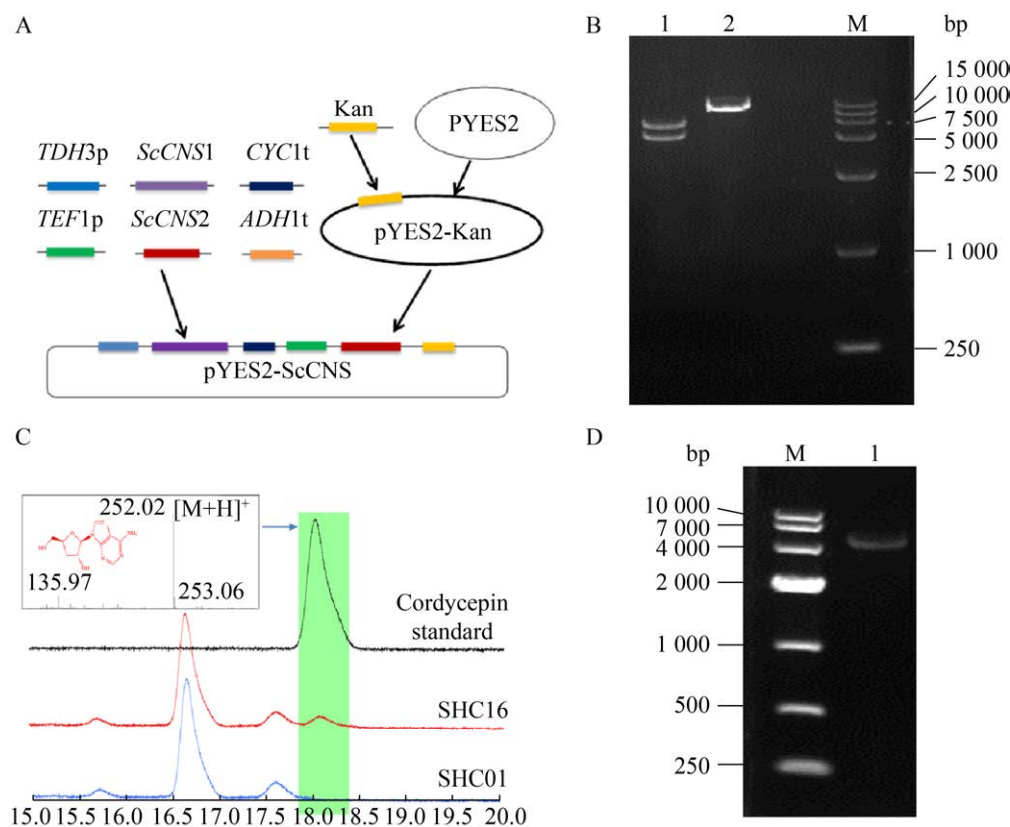


图 2 重组质粒和菌株的构建及验证

Fig. 2 Construction and verification of the recombinant plasmid and engineered yeast. (A) Schematic diagram for the construction of the recombinant plasmid. (B) Electrophoresis verification of the digestion product. 1: digestion of the recombinant plasmid by *Eco*R53KI; 2: the recombinant plasmid; M: DL 15 000 marker. (C) LC-MS/MS analysis of cordycepin in the supernatant during liquid fermentation by the engineered yeast SHC16. (D) Electrophoresis verification. 1: PCR product amplified from the recombinant plasmid with primers *TDH3-F/ADH1-R*; M: DL 10 000 marker.

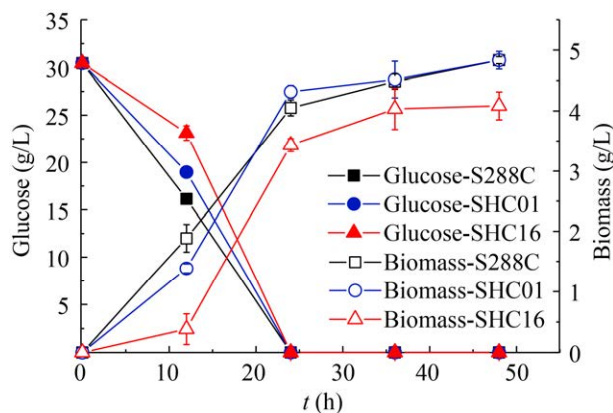


图3 酵母 S288C、SHC01 和 SHC16 的底物消耗和菌体生长曲线

Fig. 3 Profile of substrate consumption and cell growth of *S. cerevisiae* S288C, SHC01 and SHC16.

表明,外源基因 *ScCNS1* 和 *ScCNS2* 的表达增加了酵母细胞的代谢负担,同时胞内虫草素积累增大了细胞毒性,从而导致细胞生长及底物消耗速率降低。

2.2 液体发酵体系酵母工程菌基因表达分析

如图 1 所示,磷酸戊糖途径 (PPP) 及嘌呤代谢与虫草素代谢密切相关,葡萄糖进入细胞后,经 PPP 途径合成核糖-5-磷酸 (R5P),R5P 可反应生成 5-磷酸核糖-1-焦磷酸 (PRPP) 进入嘌呤代谢,参与合成腺苷等虫草素生物合成前体代谢物。*ZWF1* 编码的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 生成 6-磷酸葡萄糖酸 (6PG),是 PPP 途径的关键酶;*PRS4* 和 *ADE4* 编码的 PRPP 合成酶和酰胺转移酶是嘌呤代谢的两个关键酶,催化合成嘌呤代谢的重要中间产物 PRPP 和 5-磷酸核糖胺 (PRA)^[14-15]。

外源基因 *ScCNS1* 和 *ScCNS2* 的引入使得酵母工程菌 SHC16 能够代谢合成虫草素,本研究以 SHC01 为对照体系,分析了深层液体发酵体系 SHC16 的 PPP 途径、嘌呤代谢及虫草素合成途径关键基因 *ZWF1*、*PRS4*、*ADE4*、*ScCNS1* 及 *ScCNS2* 的表达情况。

如图 4 所示,发酵过程中 SHC16 发酵液中虫草素持续积累,而 SHC01 由于缺少虫草素合成关

键基因 *ScCNS1* 和 *ScCNS2* 而不合成虫草素。随着虫草素持续积累,SHC16 中 *ScCNS1* 和 *ScCNS2* 基因表达不断上调,168 h 后基因表达上调显著,240 h 时基因表达量分别是 30 h 的 26.86 倍和 9.14 倍。推测可能随着发酵的进行底物葡萄糖耗尽,乙醇、有机酸等高浓度初级代谢产物被细胞吸收利用,使其对 *ScCNS1* 和 *ScCNS2* 基因表达的抑制得以解除。

图 4D-F 显示,发酵后期 SHC16 与 SHC01 中 PPP 和嘌呤代谢途径关键酶编码基因 *ZWF1*、*PRS4* 和 *ADE4* 表达水平显著上调,168 h 时 SHC16 中三者表达水平分别是 SHC01 的 1.61 倍、7.08 倍和 1.55 倍。*ZWF1*、*PRS4* 及 *ADE4* 基因表达水平上调表明 PPP 和嘌呤代谢途径通量可能增大,腺苷、腺嘌呤等参与虫草素合成的前体代谢物因此得到积累,进而有助于虫草素合成。*PRS4* 编码的 PRPP 合成酶催化 R5P 合成 PRPP,是嘌呤代谢第一步反应,发酵后期 SHC16 中 *PRS4* 的高水平表达显示 PRPP 的供给可能与虫草素代谢调控相关。

2.3 碳源对酵母工程菌虫草素代谢的影响

碳源作为培养基的主要成分,其选择对细胞生长和产物代谢有较大影响,研究表明在蛹虫草 *C. militaris* 液体发酵体系中虫草素积累的最适碳源为葡萄糖^[16]。本研究以酵母工程菌 SHC16 深层液体发酵体系为研究对象,探究了葡萄糖浓度以及添加方式对虫草素代谢的影响。初始葡萄糖浓度分别为 30 g/L、50 g/L 和 100 g/L,此外在 30 g/L 和 50 g/L 葡萄糖发酵体系分别进行两次补料,补料时间分别为 (30 h、60 h) 和 (60 h、96 h),补料后葡萄糖浓度分别为 10 g/L 和 25 g/L。

如图 5A 所示,30 g/L、50 g/L 和 100 g/L 葡萄糖体系发酵 240 h 虫草素产量分别为 (67.32±2.32) mg/L、(63.59±0.96) mg/L 和 (53.37±0.41) mg/L,较 60 h 分别提高 206.69%、119.81% 和 25.31%。在 60–240 h 发酵期间,30 g/L 和 50 g/L 葡萄糖发酵体系中虫草素产量持续积累,而 100 g/L 葡萄糖发酵体系中虫草素积累较缓慢。

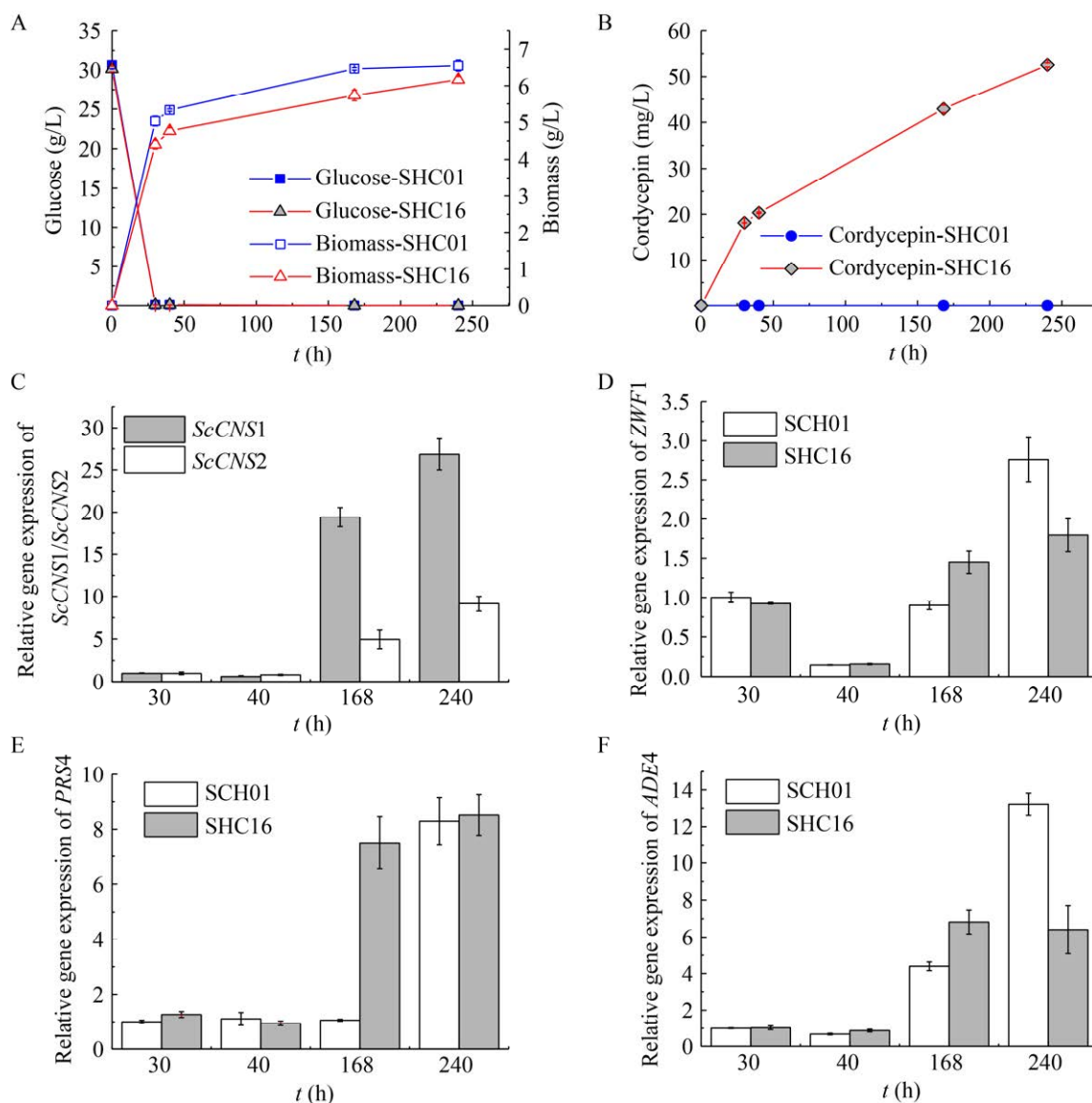


图4 酵母 SHC01 和 SHC16 发酵参数比较及基因表达分析

Fig. 4 Fermentation and transcription profiles of *S. cerevisiae* SHC01 and SHC16. (A) Residual glucose and biomass levels. (B) Cordycepin level. (C) Relative gene expression levels of *ScCNS1* and *ScCNS2* of *S. cerevisiae* SHC16. (D–F) Relative gene expression levels of *ZWF1*, *PRS4*, *ADE4* of *S. cerevisiae* SHC01 and SHC16.

比较 30 g/L 和 50 g/L 葡萄糖补料体系发现, 补料后虫草素浓度明显升高 (图 5A), 第一次补料后虫草素产量较无补料体系分别提高 46.01% (60 h vs 30 h) 和 57.78% (96 h vs 60 h), 表明碳源补料有利于虫草素积累。第二次补料后 30 g/L 葡萄糖补料体系虫草素继续积累, 而 50 g/L 葡萄糖补料体系虫草素产量基本不变。50 g/L 葡萄糖补

料体系和 100 g/L 葡萄糖体系发酵终点酵母细胞存活率仅为 71.37% 和 87.27% (图 5C), 较其他低糖发酵体系显著降低, 可能是高糖厌氧发酵产生高浓度乙醇导致细胞活性降低, 进而降低虫草素合成代谢通量。

进一步地, 本研究以 30 g/L 葡萄糖为基础碳源设计了添加 1%、3% 和 5% (V/V) 乙醇的发酵体系,

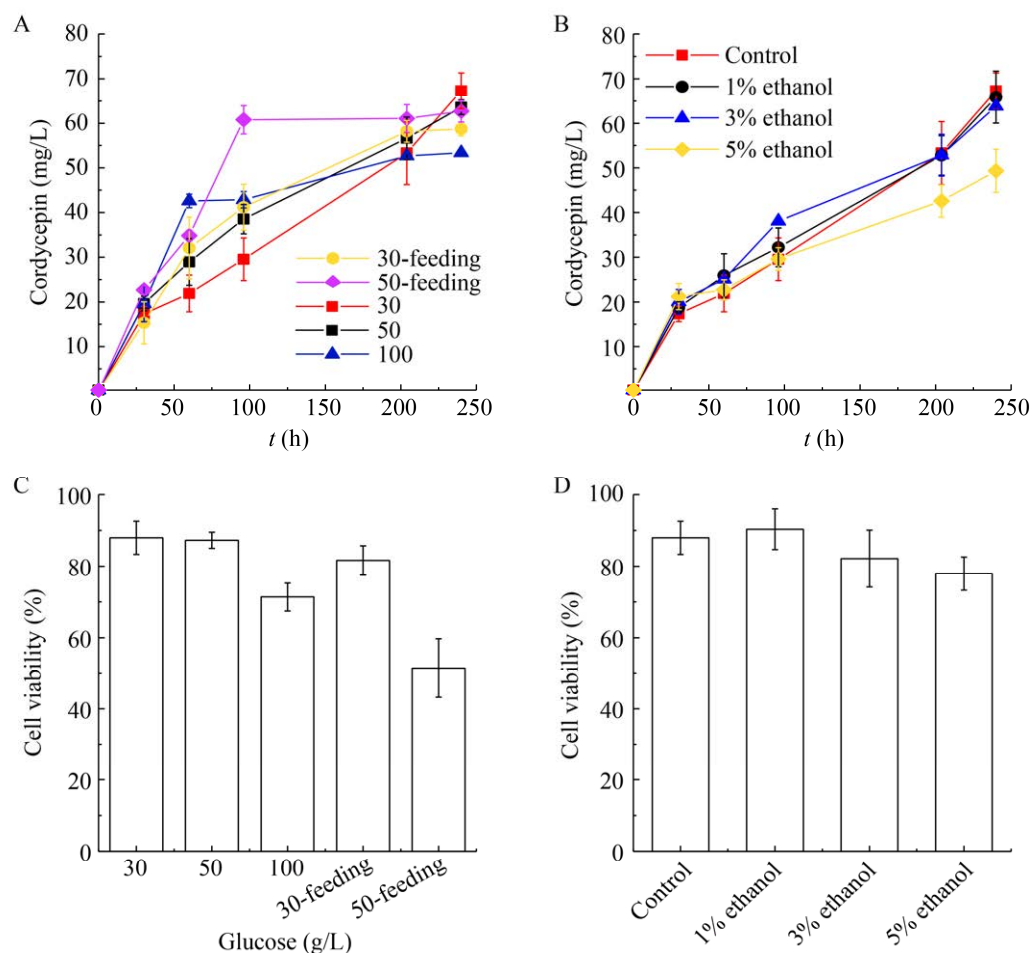


图5 碳源对酵母工程菌 SHC16 细胞生长及虫草素代谢的影响

Fig. 5 Effect of carbon source on cell growth and cordycepin production of *S. cerevisiae* SHC16. Cordycepin production and cell viability with different initial glucose concentrations (A&C) and ethanol supplementation (B&D) were compared.

以考察乙醇浓度对虫草素代谢的影响。由图 5B 可知, 随着乙醇添加量增大, 发酵终点虫草素产量逐渐降低, 同时细胞存活率也随之降低 (图 5D), 当乙醇添加量为 5% (V/V) 时, 发酵 240 h 虫草素产量仅为 (49.33 ± 2.79) mg/L, 较无乙醇添加组降低了 26.72%。实验结果表明, 底物补料有利于产物虫草素积累, 但高浓度乙醇会降低细胞存活率, 不利于虫草素积累。因此, 在酵母细胞乙醇耐受范围内进行底物补料能够有效提高虫草素产量。

虽然 30 g/L 葡萄糖体系发酵 240 h 虫草素产量达到 (67.32 ± 2.32) mg/L, 高于其他发酵体系,

然而 50 g/L 葡萄糖补料发酵体系第一次补料后, 96 h 虫草素产量就达到了 (60.76 ± 1.83) mg/L, 生产强度达到 0.63 mg/(L·h), 较 30 g/L 葡萄糖发酵体系的 0.28 mg/(L·h) 提高了 124.60%。因此, 将 50 g/L 初始葡萄糖并结合一次补料 (在 60 h 补料至 25 g/L 葡萄糖) 确定为最适碳源策略。

2.4 氮源对酵母工程菌虫草素代谢的影响

本研究利用酵母工程菌 SHC16 开展深层液体发酵, 在发酵培养基中添加 5 mmol/L、10 mmol/L 或 15 mmol/L 无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 NaNO_3 , 以考察氮源对虫草素代谢的影响 (图 6)。

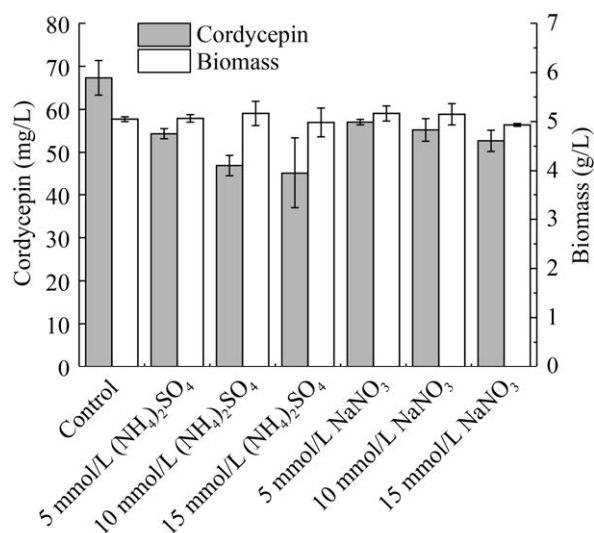


图6 氮源对酵母工程菌 SHC16 细胞生长及虫草素代谢的影响

Fig. 6 Effect of nitrogen source on cell growth and cordycepin production of *S. cerevisiae* SHC16.

如图6所示,添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NaNO_3 后对菌体生长没有显著影响,生物量浓度均在 4.93–5.17 g/L 范围内。然而随着添加量增大,虫草素产量随之下降,其中添加 15 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 抑制较明显,240 h 虫草素产量仅为 (45.17 ± 4.73) mg/L,较对照组降低了 32.90%。虽然氮是虫草素的基本组成元素,且流加铵盐能够有效提高蛹虫草发酵体系的虫草素产量^[17-18],然而在酵母工程菌 SHC16 发酵体系中高浓度氮源明显抑制了其虫草素代谢,表明 NH_4^+ 和 NO_3^- 不直接参与虫草素合成,而可能通过其他代谢途径影响虫草素合成。 NH_4^+ 作为糖酵解途径关键酶磷酸果糖激酶的激活剂,其浓度升高可以提高糖酵解途径通量^[19],致使 PPP 途径代谢通量降低,进而降低虫草素产量。

2.5 前体对酵母工程菌虫草素代谢的影响

微生物代谢过程中前体物质能直接被结合到产物分子中,添加合适的前体物质能够有效提高产物的产量。在蛹虫草液体发酵体系, Sari 等向

发酵培养基中添加 6.75 g/L 腺嘌呤,虫草素产量提高了 360.13%,达到 6.24 g/L^[20]; Masuda 等组合添加 1 g/L 腺嘌呤和 16 g/L 甘氨酸后,虫草素产量提高了 309.84%,达到 2.50 g/L^[21]。基于此,本研究选择了腺嘌呤 (0.5 g/L、1 g/L 和 2 g/L) 和甘氨酸 (8 g/L、16 g/L 和 20 g/L) 两种前体物质,考察其对 SHC16 发酵生产虫草素的影响。

随着腺嘌呤添加量增大,生物量浓度逐渐升高,当添加 2 g/L 腺嘌呤时,240 h 生物量浓度达到 (6.83 ± 0.25) g/L,较对照组提高 35.25%;虫草素产量在添加 1 g/L 腺嘌呤时达到峰值,为 (121.46 ± 1.61) mg/L,较对照组提高 80.42% (图 7A)。添加甘氨酸对细胞生长没有显著影响,但明显影响虫草素合成,当添加 20 g/L 甘氨酸时,240 h 虫草素发酵产量仅为 (40.77 ± 0.25) mg/L,较对照组降低了 39.44% (图 7B)。研究表明,腺嘌呤作为虫草素合成的前体物质,对酵母工程菌 SHC16 中虫草素积累有明显的促进作用。

2.6 金属离子对酵母工程菌虫草素代谢的影响

金属离子与细胞的生长和代谢有着密切的关系,其过量或缺乏都会对细胞功能造成影响。本研究在 YPD 培养基中分别添加 5 mmol/L Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} ,以探究其对酵母工程菌 SHC16 液体发酵生产虫草素的影响 (图 8)。

由图 8 可知,当添加 5 mmol/L Cu^{2+} 时,生物量无显著变化,但对虫草素合成有积极影响,发酵 240 h 产量可达 (96.56 ± 2.74) mg/L,较对照组提高 43.43%;添加 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 虽有利于细胞生长,但虫草素产量明显降低, Fe^{2+} 添加组虫草素产量仅为 (9.97 ± 1.36) mg/L,较对照组降低了 85.19%。在蛹虫草深层液体发酵体系中,添加 10 mmol/L Zn^{2+} 或 6.58 mmol/L Fe^{2+} 能将虫草素发酵产量分别提高 588.30% 和 70.45%^[16,22],然而在酵母工程菌 SHC16 中 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 却未表现出促进虫草素合成的能力,表明 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 不直接参与虫草素合成

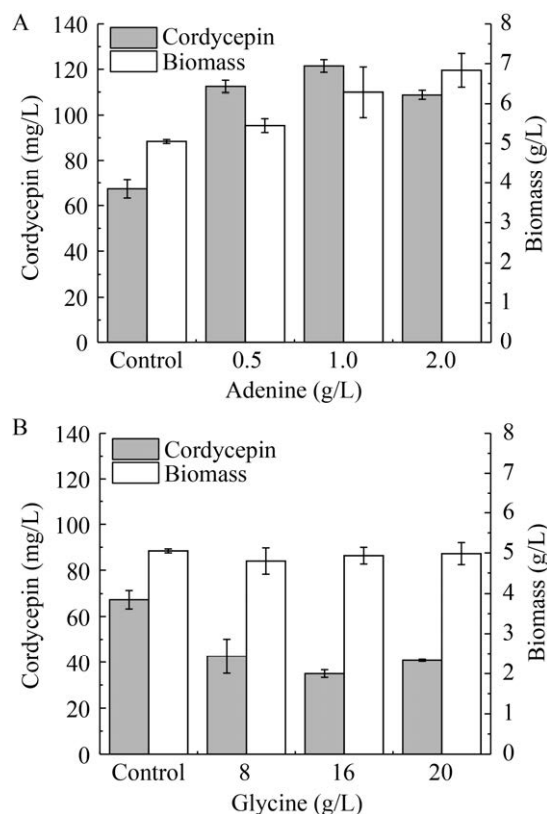


图7 前体对酵母工程菌 SHC16 细胞生长及虫草素代谢的影响

Fig. 7 Effects of precursors on cell growth and cordycepin production of *S. cerevisiae* SHC16. (A) Adenine. (B) Glycine.

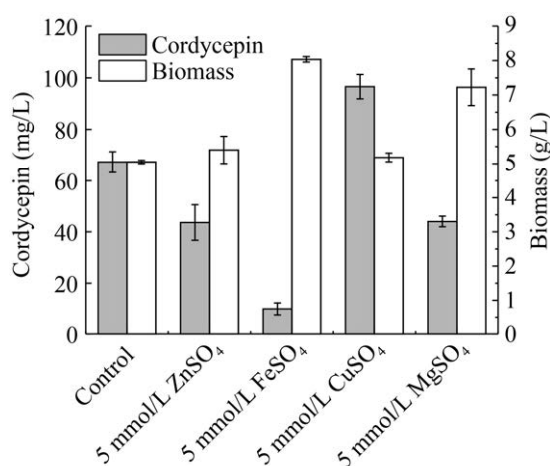


图8 金属离子对酵母工程菌 SHC16 细胞生长及虫草素代谢的影响

Fig. 8 Effects of metal ions on cell growth and cordycepin production of *S. cerevisiae* SHC16.

关键酶活性调节, 推测可能是蛹虫草富集胞外金属离子诱发胞内氧化应激, 进而调控虫草素合成途径关键基因表达。

2.7 酵母工程菌补料分批发酵生产虫草素

通过对碳源、氮源、金属离子及前体物质的优化, 初步确定酵母工程菌 SHC16 液体发酵生产虫草素的培养基组成: 50 g/L 初始葡萄糖结合一次补料, 并在培养基中添加 1 g/L 腺嘌呤和 5 mmol/L Cu²⁺, 其他成分与 YPD 培养基一致。为进一步提高虫草素发酵产量, 本研究在 5 L 搅拌式发酵罐中利用酵母工程菌 SHC16 开展了补料分批发酵, 在 48 h 进行补料 (补料后糖浓度为 25 g/L), 生物量、残糖、乙醇、虫草素浓度等参数如图 9 所示。

如图 9 所示, 发酵 24 h 底物已基本耗尽, 补料后生物量积累不明显, 然而虫草素产量明显增加, 144 h 虫草素产量达到 137.27 mg/L, 生产强度达到 0.95 mg/(L·h), 较未优化培养基的摇瓶发酵体系提高 239.85%。乙醇浓度在 96 h 后逐渐降低, 144 h 乙醇浓度降到 5.07 g/L, 与此同时虫草素浓度逐渐升高, 推测发酵后期由于底物葡萄糖耗尽, 碳源供应不足, 代谢产物乙醇作为碳源进入细胞代谢, 乙醇消耗有助于恢复细胞活性, 促进虫草素代谢。

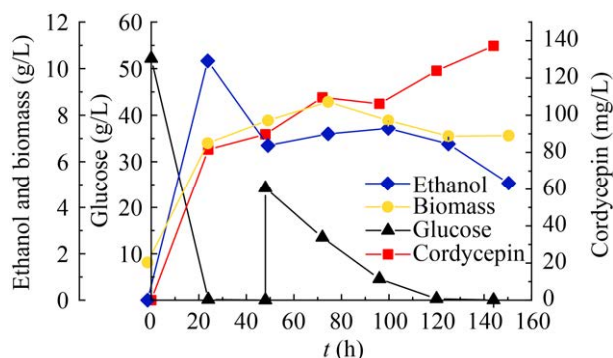


图9 酵母工程菌 SHC16 补料分批发酵生产虫草素

Fig. 9 Fed-batch fermentation of *S. cerevisiae* SHC16 for cordycepin production.

3 讨论

虫草素作为一种核苷类抗生素,具有重要的医用价值和前景,构建基因工程菌株高效生产虫草素具有重要意义。本研究在酿酒酵母 *S. cerevisiae* S288C 中表达虫草素合成关键基因 *ScCNS1* 和 *ScCNS2*,成功获得产虫草素的酵母工程菌 SHC16。基因表达分析显示,发酵后期 *ScCNS1*、*ScCNS2*、*ZWF1*、*PRS4* 及 *ADE4* 基因表达显著上调,有助于增加 PPP 途径、嘌呤代谢及虫草素合成途径的代谢通量。通过优化发酵培养基中碳源、氮源、前体物质及金属离子发现:50 g/L 初始葡萄糖并结合一次补料发酵 96 h 虫草素产量达到 (60.76 ± 1.83) mg/L,生产强度达到 0.63 mg/(L·h),较 30 g/L 葡萄糖发酵体系提高 124.60%;添加 1.0 g/L 腺嘌呤或 5 mmol/L Cu^{2+} 发酵体系 240 h 虫草素产量分别达到 (121.46 ± 1.59) mg/L 和 (96.56 ± 2.74) mg/L,较对照组分别提高 80.42% 和 43.43%。进一步地,在 5 L 搅拌式发酵罐中开展了补料分批发酵,144 h 虫草素产量达到 137.27 mg/L,生产强度达 0.95 mg/(L·h),较未优化培养基的摇瓶发酵体系提高了 239.85%。

现阶段虫草素主要通过蛹虫草液体发酵液获得,包括静态液体发酵和深层液体发酵(表 3)。通过蛹虫草静态液体发酵可以获得较高产量的虫草素^[20,23-24],但发酵周期长、空间利用率低、生产强度低等劣势限制了其广泛应用。深层液体发酵技术具有生产强度高、空间利用率高、易大规模生产等优点,适合于目标产物的高效生产,但在蛹虫草深层液体发酵体系中,虫草素产量较低且发酵周期长^[22,25-26],难以实现工业化生产。因此,构建高产量、高强度的基因工程菌是实现虫草素高效生产的重要途径。

虽然本研究构建的产虫草素的酿酒酵母工程菌 SHC16 发酵产量暂不及蛹虫草发酵体系,但 SHC16 的发酵周期明显缩短,且虫草素生产强度已超过部分蛹虫草深层液体发酵体系(表 3)。酵母工程菌 SHC16 仍然具有巨大的提升空间,可基于代谢工程改造、过程工程优化等策略进一步提高虫草素产量或生产强度,如强化虫草素前体供应(过表达 *ZWF1*、*PRS4* 及 *ADE4* 基因等)、弱化虫草素分解途径(调控腺苷脱氨酶表达)、发酵分离耦合(降低虫草素的细胞毒性)等,酵母工程菌深层液体发酵有望成为虫草素的主要供给途径。

表 3 酵母工程菌与蛹虫草发酵体系生产虫草素的比较

Table 3 Comparisons of cordycepin fermentation systems between the engineered *S. cerevisiae* and *C. militaris*

Fermentation systems	Strains	Strategies	Cordycepin titers (mg/L)	Periods (d)	Cordycepin productivity (mg/(L·h))	References
Static liquid fermentation	<i>C. militaris</i> NBRC 10352-3	Supplementation with 6.75 g/L adenosine	6 200	24	10.76	[20]
	<i>C. militaris</i> CICC 14014	Supplementation with 20 g/L of peanut oil	5 290	20	11.02	[23]
	<i>C. militaris</i> NBRC 9787	Optimization of carbon/nitrogen sources	640	27	0.99	[24]
Submerged liquid fermentation	<i>C. militaris</i>	Supplementation with 1 g/L FeSO_4	596.59	20	1.24	[22]
	<i>C. militaris</i>	Optimization of carbon/nitrogen sources	345.40	21	0.68	[25]
	<i>C. militaris</i>	Two-stage dissolved oxygen control	201.10	18	0.47	[26]
	<i>S. cerevisiae</i> SHC16	Heterologous expression of <i>ScCNS1</i> and <i>ScCNS2</i>	137.27	6	0.95	This study

REFERENCES

- [1] Cunningham KG, Manson W, Spring FS, et al. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Nature, 1950, 166(4231): 949.
- [2] Tao XD, Ning Y, Zhao XW, et al. The effects of cordycepin on the cell proliferation, migration and apoptosis in human lung cancer cell lines A549 and NCI-H460. J Pharm Pharmacol, 2016, 68(7): 901-911.
- [3] Yoon SY, Park SJ, Park YJ. The anticancer properties of cordycepin and their underlying mechanisms. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3027.
- [4] Liang SM, Lu YJ, Ko BS, et al. Cordycepin disrupts leukemia association with mesenchymal stromal cells and eliminates leukemia stem cell activity. Sci Rep, 2017, 7: 43930.
- [5] Ashraf SA, Elkhailifa AEO, Siddiqui AJ, et al. Cordycepin for health and wellbeing: a potent bioactive metabolite of an entomopathogenic medicinal fungus *Cordyceps* with its nutraceutical and therapeutic potential. Molecules, 2020, 25(12): 2735.
- [6] Wang Y, Mo HM, Gu J, et al. Cordycepin induces apoptosis of human acute monocytic leukemia cells via downregulation of the ERK/Akt signaling pathway. Exp Ther Med, 2017, 14(4): 3067-3073.
- [7] Xia YL, Luo FF, Shang YF, et al. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin. Cell Chem Biol, 2017, 24(12): 1479-1489.e4.
- [8] Lian JZ, Mishra S, Zhao HM. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: new tools and their applications. Metab Eng, 2018, 50: 85-108.
- [9] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. Nature, 2013, 496(7446): 528-532.
- [10] Luo XZ, Reiter MA, D'Espaux L, et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. Nature, 2019, 567(7746): 123-126.
- [11] Gietz RD, Schiestl RH. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat Protoc, 2007, 2(1): 38-41.
- [12] 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.
- [13] 关海晴, 李鸿宇, 李倩, 等. 蛹虫草菌深层液体发酵耦合大孔树脂吸附高效生产虫草素. 化工学报, 2019, 70(7): 2675-2683.
- Guan HQ, Li HY, Li Q, et al. Efficient production of cordycepin during submerged liquid fermentation by *Cordyceps militaris* coupled with macroporous resin adsorption. CIESC J, 2019, 70(7): 2675-2683 (in Chinese).
- [14] Noree C, Begovich K, Samilo D, et al. A quantitative screen for metabolic enzyme structures reveals patterns of assembly across the yeast metabolic network. Mol Biol Cell, 2019, 30(21): 2721-2736.
- [15] Hove-Jensen B, Andersen KR, Kilstrup M, et al. Phosphoribosyl diphosphate (PRPP): biosynthesis, enzymology, utilization, and metabolic significance. Microbiol Mol Biol Rev, 2017, 81(1): e00040-16.
- [16] 赵星月, 李倩, 刘文静, 等. 蛹虫草菌生物合成虫草素的研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1293-1304.
- Zhao XY, Li Q, Liu WJ, et al. Advances in biosynthesis of cordycepin from *Cordyceps militaris*. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1293-1304 (in Chinese).
- [17] Leung PH, Wu JY. Effects of ammonium feeding on the production of bioactive metabolites (cordycepin and exopolysaccharides) in mycelial culture of a *Cordyceps sinensis* fungus. J Appl Microbiol, 2007, 103(5): 1942-1949.
- [18] Mao XB, Zhong JJ. Significant effect of NH_4^+ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Enzyme Microb Technol, 2006, 38(3/4): 343-350.
- [19] Anastassiadis S, Aivasidis A, Wandrey C. Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. Appl Microbiol

- Biotechnol, 2002, 60(1/2): 81-87.
- [20] Sari N, Suparmin A, Kato T, et al. Improved cordycepin production in a liquid surface culture of *Cordyceps militaris* isolated from wild strain. Biotechnol Bioproc Eng, 2016, 21(5): 595-600.
- [21] Masuda M, Urabe E, Honda H, et al. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Enzyme Microb Technol, 2007, 40(5): 1199-1205.
- [22] Fan DD, Wang W, Zhong JJ. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate. Biochem Eng J, 2012, 60: 30-35.
- [23] Tang JP, Qian ZQ, Wu H. Enhancing cordycepin production in liquid static cultivation of *Cordyceps militaris* by adding vegetable oils as the secondary carbon source. Bioresour Technol, 2018, 268: 60-67.
- [24] Masuda M, Urabe E, Sakurai A, et al. Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Enzyme Microb Technol, 2006, 39(4): 641-646.
- [25] Mao XB, Eksriwong T, Chauvatcharin S, et al. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Process Biochem, 2005, 40(5): 1667-1672.
- [26] Mao XB, Zhong JJ. Hyperproduction of cordycepin by two-stage dissolved oxygen control in submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* in bioreactors. Biotechnol Prog, 2004, 20(5): 1408-1413.

(本文责编 郝丽芳)