

• 生物育种与工艺优化 •

## 高通量筛选高产酪氨酸的酿酒酵母菌株

刘堂浩<sup>1,2</sup>, 李由然<sup>1,2</sup>, 张梁<sup>1,2</sup>, 丁重阳<sup>1,2</sup>, 顾正华<sup>1,2</sup>, 石贵阳<sup>1,2</sup>, 徐沙<sup>1,2</sup>

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

刘堂浩, 李由然, 张梁, 等. 高通量筛选高产酪氨酸的酿酒酵母菌株. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3348-3360.

Liu TH, Li YR, Zhang L, et al. High-throughput screening of *Saccharomyces cerevisiae* efficiently producing tyrosine. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3348-3360.

**摘要:** 酪氨酸是重要的芳香族氨基酸, 自身不仅具有重要的营养价值, 也是合成香豆素类化合物和黄酮类化合物的重要前体。文中以实验室前期构建的一株解除了酪氨酸反馈抑制的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* LTH0 (*ARO4*<sup>K229L</sup>, *ARO7*<sup>G141S</sup>,  $\Delta$ *aro10*,  $\Delta$ *zwf1*,  $\Delta$ *ura3*) 为出发菌株, 异源表达甜菜黄素合成基因 *DOD* 和 *CYP76AD1*, 使酿酒酵母产生黄色荧光。然后利用紫外诱变和常压室温等离子体 (Atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 诱变相结合的方法对上述菌株进行随机诱变, 并通过流式细胞仪筛选荧光强度显著提高的突变株。其中突变株 LTH2-5-*DOD-CYP76AD1* 在激发波长 485 nm、发射波长 505 nm 处荧光强度为 (5 941±435) AU/OD, 比诱变前提高了 8.37 倍。对诱变后荧光强度提高较多的 14 株突变株进行发酵生产酪氨酸, 胞外酪氨酸产量最高为 26.8 mg/L, 比出发菌株提高了 3.96 倍。进一步异源表达约翰逊黄杆菌 *Flavobacterium johnsoniae* 来源的酪氨酸解氨酶 *FjTAL*, 对香豆酸产量达到 119.8 mg/L, 比出发菌株 LTH0-*FjTAL* 提高了 1.02 倍。

**关键词:** 酪氨酸, 对香豆酸, 甜菜黄素, 高通量筛选

## High-throughput screening of *Saccharomyces cerevisiae* efficiently producing tyrosine

Tanghao Liu<sup>1,2</sup>, Youran Li<sup>1,2</sup>, Liang Zhang<sup>1,2</sup>, Zhongyang Ding<sup>1,2</sup>, Zhenghua Gu<sup>1,2</sup>, Guiyang Shi<sup>1,2</sup>, and Sha Xu<sup>1,2</sup>

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:** Tyrosine is an important aromatic amino acid. Besides its nutritional value, tyrosine is also an important precursor for the synthesis of coumarins and flavonoids. Previously, our laboratory constructed a *Saccharomyces cerevisiae* strain LTH0 (*ARO4*<sup>K229L</sup>, *ARO7*<sup>G141S</sup>,  $\Delta$ *aro10*,  $\Delta$ *zwf1*,  $\Delta$ *ura3*) where tyrosine feedback inhibition was released. In the present study, heterologous expression of betaxanthins synthesis genes *DOD* (from *Mirabilis jalapa*) and *CYP76AD1* (from sugar beet

**Received:** November 26, 2020; **Accepted:** March 3, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2019YFA0905500).

**Corresponding author:** Sha Xu. Tel/Fax: +86-510-85914371; E-mail: xusha1984@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2019YFA0905500) 资助。

网络出版时间: 2021-04-29

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210428.1711.001.html>

*B. vulgaris*) in strain LTH0 enabled production of yellow fluorescence. The engineered strain LTH0-DOD-CYP76AD1 was subjected to UV combined with ARTP mutagenesis, followed by flow cytometry screening. Among the mutants screened, the fluorescence intensity of the mutant strain LTH2-5-DOD-CYP76AD1 at the excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 505 nm was  $(5\,941 \pm 435)$  AU/OD, which was 8.37 times higher than that of strain LTH0-DOD-CYP76AD1. Fourteen mutant strains were subjected to fermentation to evaluate their tyrosine producing ability. The highest extracellular tyrosine titer reached 26.8 mg/L, which was 3.96 times higher than that of strain LTH0-DOD-CYP76AD1. Heterologous expression of the tyrosine ammonia lyase *FjTAL* derived from *Flavobacterium johnsoniae* further increased the titer of coumaric acid to 119.8 mg/L, which was 1.02 times higher than that of the original strain LTH0-*FjTAL*.

**Keywords:** tyrosine, *p*-coumaric acid, betaxanthins, high-throughput screening

酪氨酸是重要的半必需氨基酸，是所有活生物体中蛋白质合成过程中的重要芳香族氨基酸<sup>[1]</sup>，作为氨基酸类药物或营养添加剂直接添加在食品中<sup>[2]</sup>。酪氨酸作为重要前体物质<sup>[3]</sup>，在解氨酶的作用下形成对香豆酸，作为重要的初级代谢产物，能够代谢产生各种黄酮类物质<sup>[4]</sup>，对于人体内自由基的清除以及心脑血管疾病的治疗有显著功效。目前，L-酪氨酸的生产方法主要有蛋白质水解法、化学合成法、酶法和微生物发酵法<sup>[5]</sup>。蛋白质水解法已经逐渐淘汰。化学合成法由于其生产工艺复杂、副产物较多等原因不适于大规模生产。工业上生产L-酪氨酸主要依靠酶法，但天然酶活性低和稳定性差等缺点限制了其应用<sup>[6]</sup>。微生物发酵法可以利用生物质原料实现酪氨酸的从头合成，可以降低生产成本<sup>[7]</sup>。

酿酒酵母中芳香族氨基酸和下游黄酮类物质代谢途径以及部分调控机理尚未完全解析(图1)。目前已知的芳香族氨基酸从头合成分为10步反应<sup>[8]</sup>，存在多处负反馈调控<sup>[9]</sup>，5-磷酸葡萄糖脱氢酶可以使6-磷酸葡萄糖进入磷酸戊糖途径(Pentose phosphate pathway, PPP)，将5-磷酸葡萄糖脱氢酶基因(*ZWF1*)敲除后可以调节糖酵解途径和磷酸戊糖途径的代谢流，增加赤藓糖-4-磷酸进入莽草酸途径的通量<sup>[10]</sup>。在莽草酸途径中，突变2-酮-3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸(DAHP)合酶同工酶*ARO4*<sup>K229L</sup>和*ARO7*<sup>G141S</sup>，可减弱目的产物L-酪氨酸对*ARO4*和*ARO7*的反馈抑制作用以积累酪氨酸<sup>[11]</sup>。表达约翰逊黄杆菌*Flavobacterium*

*johnsoniae* 来源的酪氨酸解氨酶基因 *FjTAL*，可以进一步合成对香豆酸。

目前已有一些通过工业微生物发酵生产酪氨酸以及下游对香豆酸的策略。在大肠杆菌中，过表达编码分支酸突变酶/苯甲酸酯脱氢酶基因 *TYRA*，在200 L发酵罐上进行发酵优化后，48 h得到55 g/L的酪氨酸<sup>[12]</sup>；Santos等通过易错PCR优化与芳香族氨基酸代谢相关的代谢簇并结合高通量筛选手段，对芳香族氨基酸合成途径进行合理修饰，36 h补料发酵得到13.8 g/L酪氨酸<sup>[13]</sup>。在酿酒酵母中，Rodriguez等以酿酒酵母 CEN.PK102-5B 为出发菌株，通过敲除丙酮酸脱羧酶基因 *ARO10* 和 *PDC5*，突变 *ARO4*<sup>K229L</sup> 与 *ARO7*<sup>G141S</sup> 以减弱反馈抑制，过表达莽草酸途径五官能团酶基因 *ARO1* 和分支酸合酶基因 *ARO2* 以增强前体物质供应，并过表达约翰逊黄杆菌来源的 *FjTAL* 基因，得到  $(1.93 \pm 0.26)$  g/L对香豆酸<sup>[14]</sup>；Gu等在解酯耶式酵母 *Yarrowia lipolytica* 改造 DAHP 合成酶减轻反馈抑制，并通过异源表达磷酸酮醇酶和敲除丙酮酸激酶积累分支酸，得到  $(593.53 \pm 28.75)$  mg/L的对香豆酸<sup>[15]</sup>；Borja等以木糖作为碳源发酵得到242 mg/L对香豆酸<sup>[16]</sup>；张思琪等通过敲除酪氨酸合成竞争途径基因 *ARO10* 和 *PDC5*，过表达芳香族氨基酸合成调控蛋白 *ARO4*<sup>K229L</sup> 与 *ARO7*<sup>G141S</sup> 解除芳香族氨基酸负反馈抑制，增强前体酪氨酸供应的同时表达对香豆酸合成基因 *FjTAL*，并引入苯丙氨酸为底物的对香豆酸合成途径，经由发酵优化，在摇瓶中得到

1 146.48 mg/L 对香豆酸, 在 5 L 发酵罐上优化得到 3.56 g/L 对香豆酸<sup>[17]</sup>。

本研究利用以酪氨酸作为前体的甜菜黄素能够在激发波长 485 nm、发射波长 505 nm 处出现特异性吸收峰为检测手段, 以甜菜黄素荧光强度<sup>[18]</sup>变化作为筛选条件, 建立一种高通量筛选高产酪氨酸酿酒酵母的方法<sup>[19-20]</sup>。甜菜黄素常被用作染料中的一种有效成分<sup>[21]</sup>。酪氨酸在甜菜来源的基因 *CYP76AD1* 作用下生成左旋多巴, 继而在开花植物紫茉莉来源的 *DOD*<sup>[22]</sup>基因编码的多巴

4,5-双加氧酶作用下生成甜菜黄素<sup>[23]</sup>。本研究以解除了酪氨酸反馈抑制的突变株 *LTH0*<sup>[24]</sup>作为出发菌株, 经诱变筛选后获得了几株酪氨酸和对香豆酸产量显著提高的突变株。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒与所用引物

研究过程中所用的菌株及质粒如表 1 所示, 所用引物如表 2 所示, 实验所用引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

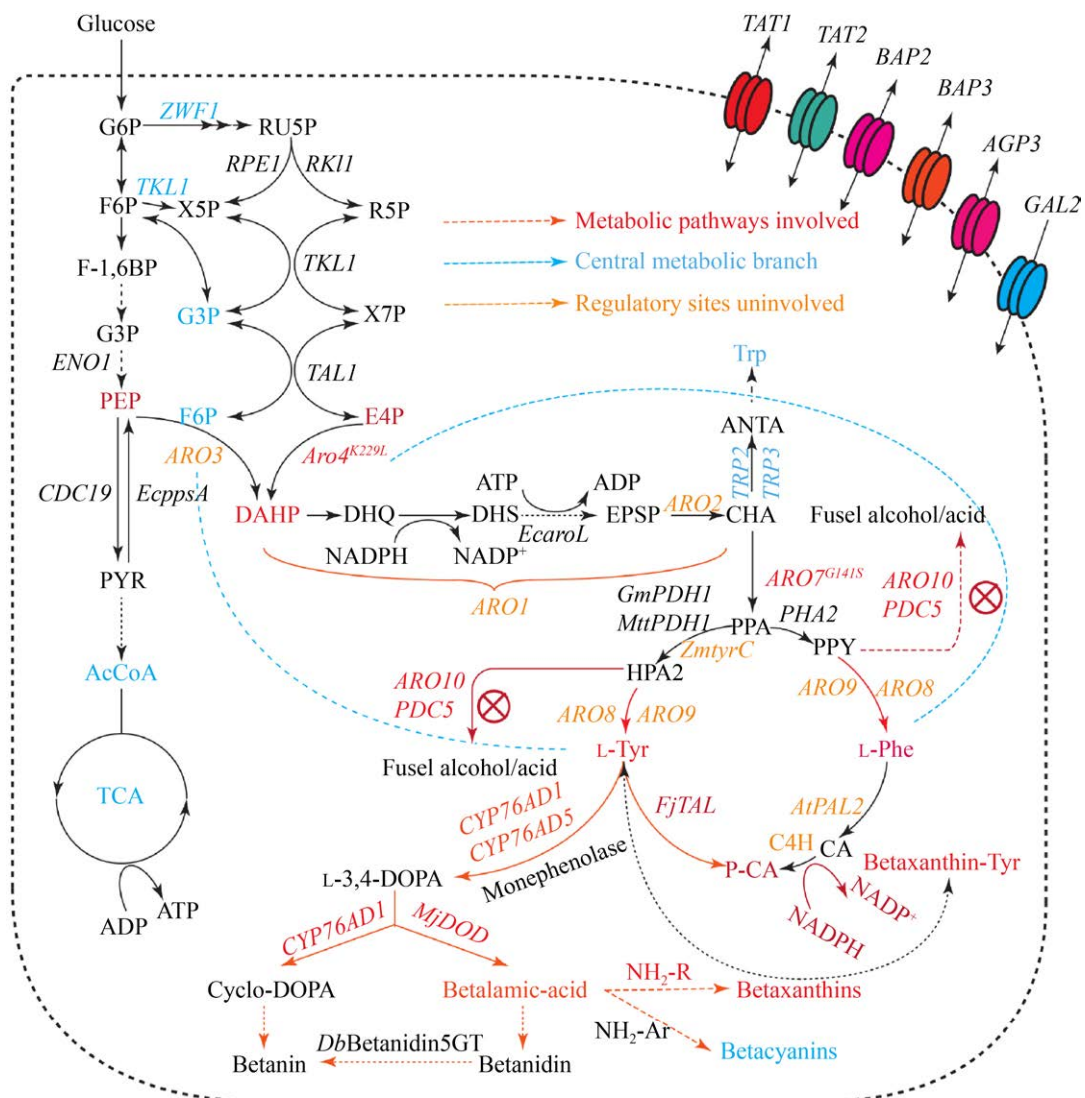


图 1 酿酒酵母芳香族氨基酸代谢途径

Fig. 1 Metabolic pathways of aromatic amino acids in *S. cerevisiae*.

表 1 本实验使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype	Source
JM109	<i>E. coli</i> used for gene cloning	This lab
S288c	MAT $\alpha$ <i>SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	This lab
LTH0	As S288c; $\Delta$ <i>ura3</i> , $\Delta$ <i>aro10</i> , $\Delta$ <i>zwf1</i> , <i>ARO4</i> <sup>K229L</sup> , <i>ARO7</i> <sup>G141S</sup>	[23]
LTH0-DOD-CYP76AD1	As LTH0; pY26-DOD-CYP76AD1	This study
LTH1-1(2/3/4/5/6)	As LTH0; UV mutated; high tyrosine production	This study
LTH2-1(2/3/4/5/6/7/8/9)	As LTH0; UV and ARTP mutated; high tyrosine production	This study
LTH1-1(2/3/4/5/6)-DOD-CYP76AD1	As LTH0; UV mutated; high betaxanthin production; pY26-DOD-CYP76AD1	This study
LTH2-1(2/3/4/5/6/7/8/9)-DOD-CYP76AD1	As LTH0; UV and ARTP mutated; high betaxanthin production; pY26-DOD-CYP76AD1	This study
LTH1-1(2/3/4/5/6)-FjTAL	As LTH0; UV mutated; high <i>p</i> -coumaric acid production; pY26-FjTAL	This study
LTH2-1(2/3/4/5/6/7/8/9)-FjTAL	As LTH0; UV and ARTP mutated; high <i>p</i> -coumaric acid production; pY26-FjTAL	This study
pY26	Shuttle plasmid with <i>TEF</i> and <i>GPD</i> promoters, Amp <sup>r</sup> , $\Delta$ <i>ura3</i>	This lab
pHCas9-Nours	Expressing Cas9 protein, Nours <sup>r</sup>	This lab
pYES2-sgRNA-Hyg	Guiding Cas9 protein to cuttarget segment, Amp <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	This lab
pY26-DOD-CYP76AD1	Shuttle plasmid with gene <i>CYP76AD1</i> and <i>DOD</i>	This study
pY26-FjTAL	Shuttle plasmid with gene <i>FjTAL</i>	This study

表 2 本实验使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>CYP76AD1</i> -F	TTAAGAACCGTATCTTGGGATTGG
<i>CYP76AD1</i> -R	ATGGACCACGCTACTTTG
<i>DOD</i> -F	ATGAAGGGTACTTACTACATCAACC
<i>DOD</i> -R	TTAAGAACCGTCAGTCTTTTGAGTAG
pY26-F	CACCAGAACTTAGTTTCGACGG
pY26-R	CTTTTCGGTTAGAGCGGATGTG
<i>FjTAL</i> -F	ATGAACACCATTAATGAATACTTGAGT
<i>FjTAL</i> -R	TTAATTGTTAATCAAATGATCCTTAACCTTTTG
<i>FjTAL</i> -RF	CAGGAATTCGATATCAAGCTTATGAACACCATTAATGAATACTTGAGT( <i>EcoR</i> I)
<i>FjTAL</i> -RR	CAAAAGCTTAAGGATCATTGATTAACAATTAAGCTTATCGATACCGTCGAC( <i>EcoR</i> I)
<i>URA3</i> -sgRNA-F	TTGGTATATATACGCATATGTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
<i>URA3</i> -sgRNA-R	AATTATATCAGTTATTACCCGGGGATCATTATCTTTCCTACTGCGGAG
<i>URA3</i> -v-F	GATTCGGTTTTCTTTGAAATTTTTTTG
<i>URA3</i> -v-R	CGCCAGAACCAAGTAACAGTA
sgRNA-v-F	GCTAAATGTACGGGCGACAGTCAC
sgRNA-v-R	CGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAG

Note: generated restriction enzyme sites are underlined and indicated in the table.

## 1.2 培养基

大肠杆菌培养基 LB (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 若需固体培养基添加琼脂粉 20, 121 °C、20 min 灭菌。

酵母种子培养基 YPD (g/L): 胰蛋白胨 20, 酵母粉 10, 葡萄糖 20, 若需固体培养基添加琼脂粉 20, 115 °C、20 min 灭菌。

发酵培养基 (g/L): 酵母氮基 1.7, 硫酸铵 5, 葡萄糖 30, 甲硫氨酸 0.05, 115 °C、20 min 灭菌。

筛选培养基 (g/L): 酵母氮基 1.7, 硫酸铵 5, 葡萄糖 30, 尿嘧啶 0.03, 5-FOA 1, 115 °C、20 min 灭菌。

大肠杆菌在添加 100 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中生长, 37 °C、200 r/min 培养。诱变后的细胞洗涤后置于添加尿嘧啶的筛选培养基中培养, 荧光定性完成后将高荧光菌株进行传代验证荧光稳定性, 将菌株按 0.5% 接种量接种至液体筛选培养基中培养 3–5 代, 涂布至筛选平板挑取单菌落得到色素合成途径缺失的酪氨酸生产菌株。酿酒酵母经两级活化后, 将对数后期细胞接种至装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中发酵, 接种量为 5%, 30 °C、220 r/min 培养, 24 h 补加 20 g/L 葡萄糖。

## 1.3 实验材料

2×Taq PCR Master Mix、2×Pfu PCR Master Mix, 杭州宝赛公司; Fast Digested™ 快速限制性内切酶, 购自美国 Thermo 公司; T4 DNA 连接酶、pY26 质粒, 购自大连 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素、遗传霉素 G418、诺尔丝菌素、潮霉素, 购自 Sigma-Aldrich 公司; 质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、Phanta 高保真 DNA 聚合酶, 南京诺唯赞生物有限公司; 氨基酸标准品、OPA 衍生试剂, 购自 Agilent 公司; 对香豆酸标准品、5-氟乳清酸、PI 染色试剂盒, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 酵母氮基, 购自索莱宝科技有限公司。

## 1.4 酿酒酵母中甜菜黄素合成途径的构建

*Not* I 和 *Sac* II 双酶切甜菜来源的细胞色素 P450 多巴氧化酶编码基因 *CYP76AD1*, 连接至线性化 pY26 质粒  $P_{TEF}$  表达盒上, *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切开花植物紫茉莉来源多巴双加氧酶的编码基因 *DOD* 并连接至线性化质粒 pY26 的  $P_{GPD}$  表达盒上, 构建重组质粒 pY26-*DOD-CYP76AD1*, 利用醋酸锂转化法转化 LTH0, 得到一株能够积累甜菜黄素的 LTH0-*DOD-CYP76AD1* 菌株。

## 1.5 紫外诱变与 ARTP 诱变

种子液活化后按照生长曲线选取 16–18 h 的对数生长后期细胞 7–8 mL, 离心弃上清, 用超纯水洗涤后, 再用 0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤, 数次后加入与培养基等量的 PBS 缓冲液悬浮菌体; 注入 9 mm 无菌平板中使菌液平铺为 0.5 cm 左右的液层, 紫外灯 254 nm 间隔 20 cm 照射 60–90 s, 严格避光减轻光复活。诱变后将菌液按梯度稀释至  $4 \times 10^3$ – $6 \times 10^3$  个细胞/mL, 取 100 µL 涂布酵母基础培养基 (SC) 平板, 锡箔纸避光 30 °C 培养 48–72 h。ARTP 诱变取 10 µL 菌悬液平铺于 ARTP 载片上, 气量 10 L/min, 功率 100 W, 等离子诱变 45–55 s, 诱变后将载片上的菌液于 1 mL SC 培养基中 30 °C、220 r/min 培养 72 h, 采取先紫外诱变再进行 ARTP 诱变的策略。

## 1.6 高通量筛选甜菜黄素高产菌株

将培养好的菌液离心弃上清, 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤两次并悬浮菌体, 控制  $OD_{600}$  为 0.3–0.5, PI 染料染色, 利用 BD FACSAriaIII 流式细胞仪分选, 采用双向计光器, 纵向计光器运用激发波长 536 nm、发射波长 617 nm 特异性识别 PI 染色, 死细胞被染色呈阳性, 横向计光器利用 485 nm 激发、515 nm 发射识别甜菜黄素自身的黄色荧光, 挑取存活且具有高黄色荧光的细胞分选至 96 孔浅孔板中, 在台面振荡器上 30 °C 培养 48 h, 按 5% 接种量接种至盛有新鲜 SC 培养基的 96 孔深孔板中, 30 °C 培养 72 h。孔板离心机 4 °C

离心菌悬液, 弃上清并用 0.01 mol/L PBS 洗涤两次, 使用 Synergy H4 Hybrid Microplate Reader 测定黄色荧光, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 505 nm, 波宽为 9 nm, 增益值为 120。

### 1.7 酪氨酸和对香豆酸含量鉴定

将筛选出的高荧光菌株接种至筛选培养基中, 5-氟乳清酸将含有 *URA3* 基因的质粒的菌株杀死, 得到失去甜菜黄素合成能力的酪氨酸生产菌株。发酵培养基发酵 120 h, 取上清液加 10% 三氯乙酸混合后 4 °C 过夜放置沉降杂蛋白, 0.22 μm 尼龙膜过滤, 高效液相色谱测定胞外酪氨酸含量; 提取胞内酪氨酸时, 将菌体和等体积的 PBS 缓冲液和 0.5 mm 玻璃珠混合, 振荡 30 min, 取上清液加 10% 三氯乙酸混合后 4 °C 过夜放置, 0.22 μm 尼龙膜过滤。使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A, 配置 PDA 检测器和氨基酸柱前自动衍生程序, Thermo Hypersil ODS C18 Column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为水相 (25 mmol/L 十二水磷酸氢二钠, 25 mmol/L 十水合四硼酸钠, pH 8.2)、有机相 (甲醇: 乙腈: 水=4.5: 4.5: 1), 流速 1.6 mL/min, 柱温 50 °C。梯度洗脱程序为: 0 min, 5% B; 6 min, 10% B; 10 min, 16% B; 23 min, 40% B; 30 min, 50% B; 31 min, 100% B; 35 min, 5% B。

取 1 mL 发酵液测量对香豆酸含量, 加入 1 mL 色谱级甲醇过夜放置, 离心后取上清氮吹浓缩, 上清液过 0.22 μm 尼龙滤膜。使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A, 配置 UV 检测器, Thermo Hypersil ODS C18 Column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 进样量为 10 μL, 柱温 40 °C, 检测波长 290 nm, 流速 1 mL/min。流动相 A (0.1% 三氟乙酸+水), B (乙腈)。梯度洗脱程序为: 0 min, 10% B; 0.1 min–9 min, 10%–40% B; 9 min–15 min, 40%–60% B; 15 min–18 min, 60%–10% B; 18 min–20 min, 10% B<sup>[17]</sup>。

### 1.8 胞外代谢物含量测定

使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A, 配置视差检

测器, Dikma CarboPac H<sup>+</sup> 色谱柱 (300 mm×8.0 mm, 6 μm) 测定胞外代谢物乙醇和葡萄糖的含量变化, 流动相为 5 mmol/L 稀硫酸, 流速 0.8 mL/min, 柱温 40 °C, 发酵液使用 10% 三氯乙酸沉淀过夜沉降杂蛋白。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组菌的构建

以酿酒酵母 LTH0 (*ARO4*<sup>K229L</sup>, *ARO7*<sup>G141S</sup>, *Δaro10*, *Δzwf1*, *Δura3*) 为出发菌株, 转化重组质粒 pY26-*DOD-CYP76AD1* 得到 LTH0-*DOD-CYP76AD1*, 利用一步克隆法将 *FjTAL* 片段构建至 pY26 质粒的 *P<sub>GPD</sub>* 表达盒上, 得到 pY26-*FjTAL*, 转化得到 LTH0-*FjTAL*, 质粒图如图 2 所示。表达甜菜黄素后酵母菌落 (左侧划线区域) 显示黄色 (图 3)。

### 2.2 紫外诱变筛选高产甜菜黄素的突变株

LTH0-*DOD-CYP76AD1* 经 SC 培养基培养 72 h, 在激发波长 485 nm、发射波长 505 nm 处测定得到相对荧光强度为 (634±45) AU/OD。紫外灯于 254 nm 间隔 20 cm 以恒定功率照射, 致死率与照射时间之间的关系如图 4A 所示, 照射 45 s 时致死率达到 90%, 随着时间进一步提高致死率继续升高, 本研究选取 45–60 s 进行诱变。经过紫外诱变挑选出其中 10 株荧光强度明显提高的突变株, 如图 4C 所示, 其中 LTH1-5-*DOD-CYP76AD1* 生长 72 h 荧光强度为 (3 352±104) AU/OD, 比对照组提高了 4.29 倍, 且菌体生长情况良好, 因此对 LTH1-5-*DOD-CYP76AD1* 进一步诱变。紫外诱变虽然操作简单, 但其严重的光复活效应也会产生许多回复突变。进一步遗传稳定性实验发现, 紫外诱变产生的高荧光强度突变株随着传代次数的增加, 荧光强度会逐渐呈现波动式下降趋势, 其中 LTH1-1-*DOD-CYP76AD1* 传代 7 次后荧光降至第一代的 73%, 紫外诱变作为随机突变方式虽然能提供大量突变可能性, 但不宜于优良性状的保持。

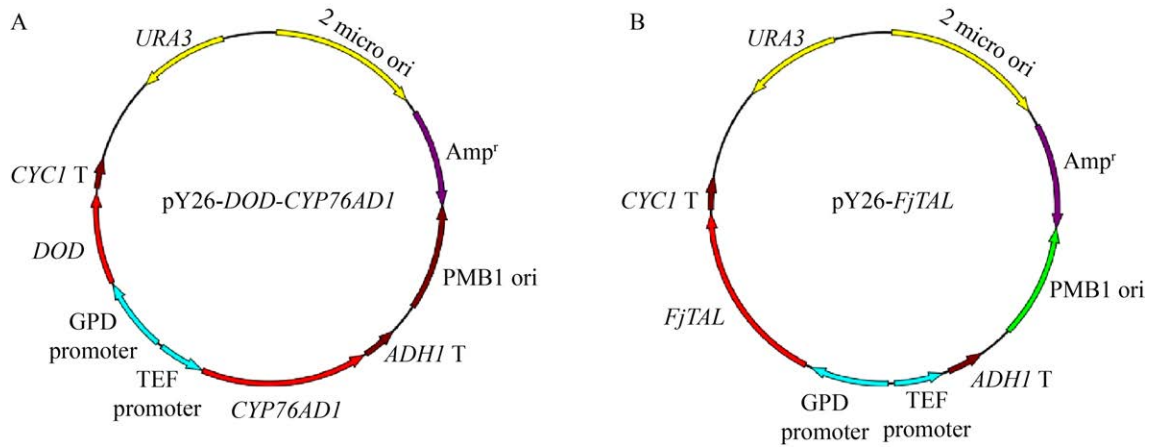


图 2 重组质粒 pY26-DOD-CYP76AD1 和 pY26-FjTAL 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant plasmids pY26-DOD-CYP76AD1 (A) and pY26-FjTAL (B).

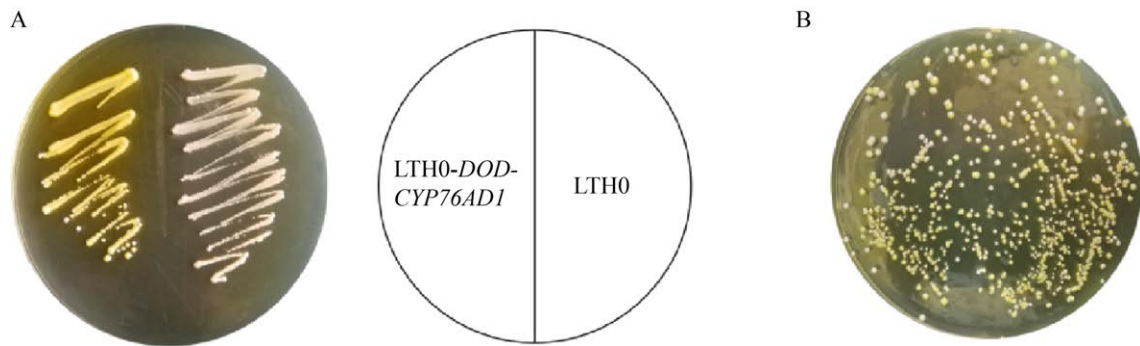


图 3 甜菜黄素的合成

Fig. 3 Synthesis of betaxanthin. (A) Expression of DOD and CYP76AD1. (B) Different fluorescence in mutant strains.

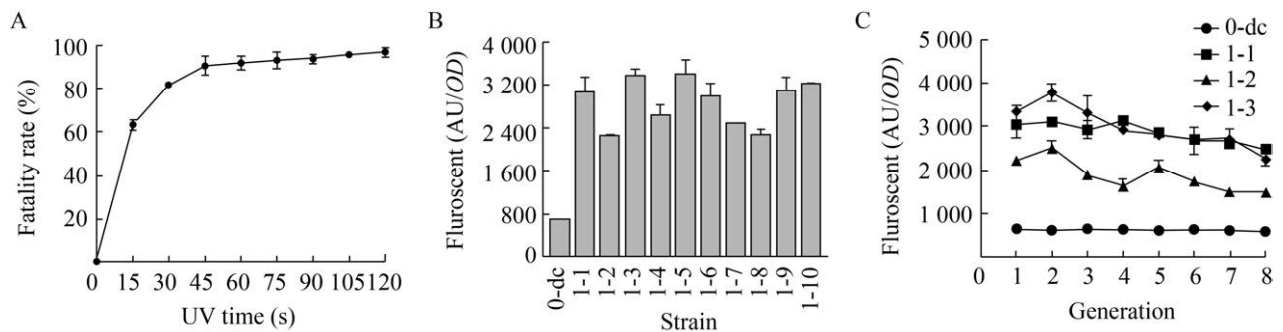


图 4 紫外诱变后细胞荧光变化情况

Fig. 4 Cell fluorescence changes after UV mutagenesis. (A) The lethal rate varies with UV exposure time. (B) Fluorescence intensity in mutant strains. (C) Changes of fluorescence intensity over generations.



### 2.3 ARTP 诱变及流式分选筛选高产甜菜黄素的突变株

利用流式细胞仪进行高通量筛选, 流式细胞仪使用双向激光器检测, PE-A 通道检测 PI 染料所激发出的红色荧光, FITC-A 检测细胞表面甜菜黄素散发的黄色荧光, 利用双向激光器检测出的细胞参数, 挑选出处于 Q4 象限、具有高黄色荧光并具有生物活性的突变株。

如图 5A 所示, LTH0 未合成甜菜黄素时, 细胞分群情况集中在 Q3 区域, 几乎观察不到死细胞以及带有荧光的细胞, 细胞密度呈现从内而外逐级降低的趋势, 细胞分群情况良好, 说明初始菌株不具备黄色荧光。LTH1-5-DOD-CYP76AD1

的荧光分布如图 5B 所示: 单位时间流经通路的 25 000 个细胞中, Q4 区域占比 19.1%, 即具有高荧光强度的活细胞, 最高黄色荧光值约  $2.5 \times 10^4$  AU, 选取 P4 区域 (占比约 0.4%) 分选至 96 孔板培养。LTH2-5-DOD-CYP76AD1 的荧光分布如图 5C 所示, 观察发现荧光分群明显向右移动, 黄色荧光进一步增强, 单位时间流经通路的 29 000 个细胞中 Q4 区域占比 29.2%, 荧光最高值达到  $8 \times 10^4$  AU。对比单一紫外诱变, 复合诱变能够得到荧光强度更高的突变株。经过 SC 培养基复苏培养后的细胞群中, 复合诱变菌株死亡率为 32%, 显著高于紫外诱变的 16%, 原因可能是紫外光复活效应在细胞复苏过程中发挥作用导致大量细胞复苏, 从而降低突变效率。

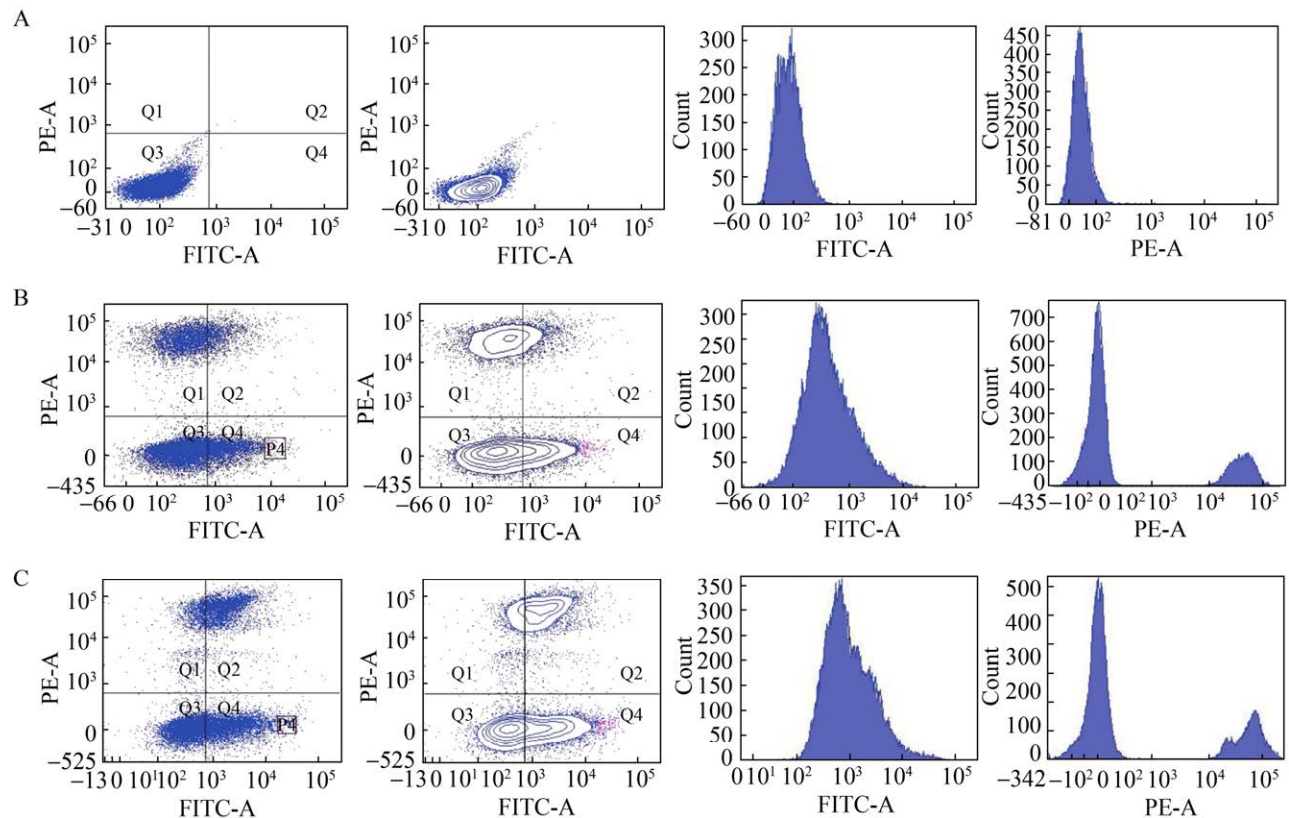


图 5 诱变株在流式细胞仪中的分群情况

Fig. 5 Sorting cells using flow cytometry, PE-A channel uses 536 nm as excitation light and 610 nm as emission light, FITC-A channel uses 485 nm as excitation light and 515 nm as emission light. The fluorescence grouping and intensity for strain LTH0 (A), strain LTH1-5-DOD-CYP76AD1 (B), and strain LTH2-5-DOD-CYP76AD1 (C).



ARTP 诱变致死曲线如图 6A 所示, 45–55 s 诱变时间较为合适, 致死率为 (90±3)% , 能产生较多正向突变且细胞存活数量适中。将已经经过紫外诱变的 LTH1-5-*DOD-CYP76AD1* 经过 ARTP 诱变, 通过流式细胞仪分选后选取 9 株高荧光菌株, 相对荧光强度如图 6B 所示。其中 LTH2-5-*DOD-CYP76AD1* 突变株 72 h 相对荧光强度达到 (5 941±435) AU/OD, 比 LTH0-*DOD-CYP76AD1* 相对荧光强度增加了 8.37 倍; 比 LTH1-5-*DOD-CYP76AD1* 相对荧光强度提高了 77%。在复合突变株中随机选取 3 株 LTH2-1-*DOD-CYP76AD1*、LTH2-2-*DOD-CYP76AD1*、LTH2-3-*DOD-CYP76AD1* 进行遗传稳定性分析, 传代 7 次后荧光强度仍保持在第 1 代的 93.4%、90.2%、92.3%, 荧光稳定性较强。

#### 2.4 突变株生产酪氨酸和对香豆酸

选取 14 株优势突变株摇瓶发酵, 紫外诱变得到的高荧光强度突变株生产酪氨酸结果如图 7 所示。LTH0 72 h 在胞外积累 5.4 mg/L 的酪氨酸, 胞内积累 2.7 mg/L 酪氨酸。突变株中 LTH1-1、LTH1-4、LTH1-5 分别胞外积累 13.4 mg/L、8.6 mg/L、16.0 mg/L 的酪氨酸, 与 LTH0 相比胞外酪氨酸产量分别增加 1.48 倍、0.59 倍以及 2.11 倍。LTH1-4 胞内积累 4.2 mg/L 酪氨酸, 其余突变株胞内酪氨酸积累量相比 LTH0 有所减少, 有可能是酪氨酸转运蛋白发生了相应突变, 表达质粒

pY26-*FjTAL* 后, LTH0-*FjTAL* 摇瓶发酵 120 h 时胞外积累了 59.2 mg/L 的对香豆酸, LTH1-1-*FjTAL* 和 LTH1-4-*FjTAL* 分别积累了 68.8 mg/L 和 64.9 mg/L 的对香豆酸, 比 LTH0-*FjTAL* 分别提高了 16.2% 和 11%。

复合诱变得到的突变株能够更加有效地积累胞外酪氨酸和对香豆酸。从图 8 中可以看出, LTH2-1 摇瓶发酵 120 h 胞外积累了 16.8 mg/L 酪氨酸, LTH2-1-*FjTAL* 对香豆酸 120 h 产量为 74.3 mg/L, 比对照菌株 LTH0 胞外酪氨酸积累量提高了 2.05 倍, 比对照菌株 LTH0-*FjTAL* 对香豆酸产量提高了 24.2%。LTH2-5 发酵 120 h 胞外积累了 26.8 mg/L 酪氨酸, LTH2-5-*FjTAL* 对香豆酸 120 h 为 119.4 mg/L, 相比于对照菌株 LTH0 胞外酪氨酸产量提高了 3.96 倍, 比 LTH0-*FjTAL* 胞外对香豆酸积累量提高了 1.02 倍。此外, 大部分突变株的胞内酪氨酸的积累量下降, 胞外酪氨酸积累量增加, 可能是因为酪氨酸转运蛋白在突变过程中发生了改变, 需要通过基因组测序比对分析的手段进一步确定。对香豆酸胞内浓度较低, 可能有利于减轻其产物抑制。

从上述突变株中挑选出酪氨酸和对香豆酸显著提高的 LTH1-1、LTH1-4、LTH2-1、LTH2-5 四株突变株进一步分析其生长代谢, 结果如图 9 所示。其中产量最高的 LTH2-5 发酵过程中乙醇生产量高于其他菌株, 乙醇的大量积累可能是其生

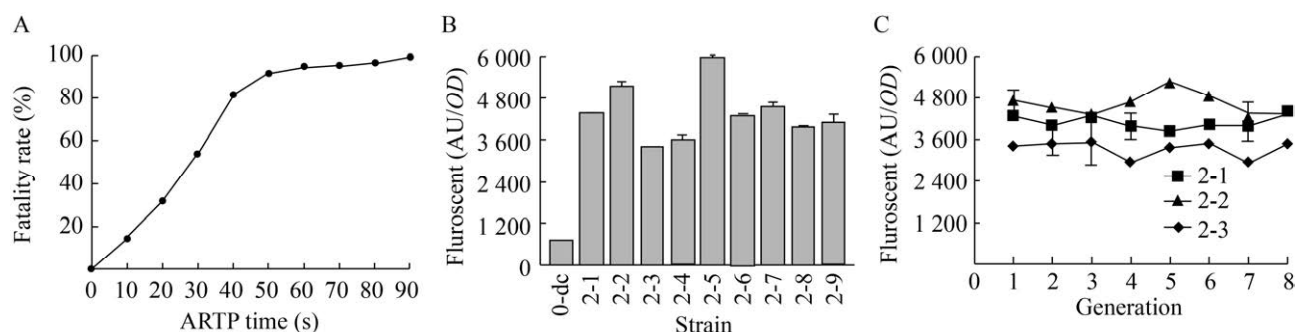


图 6 复合诱变后细胞荧光变化情况

Fig. 6 Cell fluorescence changes after compound mutation. (A) The lethal rate varies with ARTP processing time. (B) Fluorescence intensity in mutant strains. (C) Changes of fluorescence intensity over generations.

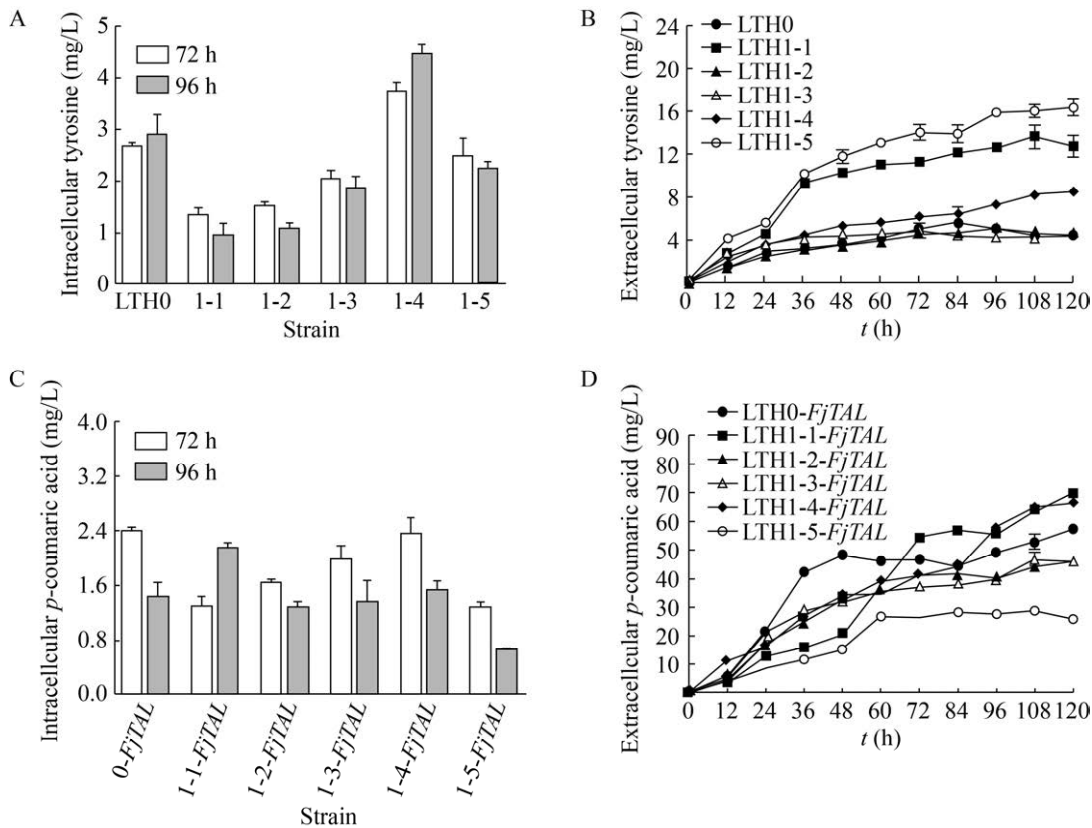


图7 紫外突变株发酵生产酪氨酸和对香豆酸

Fig. 7 Tyrosine and *p*-coumaric acid production in strains by UV mutation. (A) Intracellular tyrosine production. (B) Extracellular tyrosine production. (C) Intracellular *p*-coumaric acid production. (D) Extracellular *p*-coumaric acid production.

长情况不佳的重要因素。相较于 LTH0, 4 株突变株的葡萄糖消耗速率有所减缓, 在发酵前期突变株生长速度低于 LTH0, 但是在发酵后期依然能缓慢生长, 原因可能是多代突变影响了菌株自身的生长活力。

### 3 讨论

笔者在酿酒酵母中异源表达植物中细胞色素 P450 多巴氧化酶基因 *CYP76AD1* 和多巴双加氧酶合成基因 *DOD*, 酵母积累甜菜黄素使得细胞带有明显黄色, 将荧光强度这一易于检测的指标作为高产酪氨酸的筛选标记, 能够大大简化产物测定的过程并实现高产酪氨酸菌株的高通量筛选。

本实验室前期构建了一株能初步积累酪氨酸的酿

酒酵母 LTH0。通过紫外诱变与 ARTP 等离子体诱变相结合, 经过流式细胞仪荧光分选出 14 株高产甜菜黄素菌株, 对比了紫外诱变与复合诱变的诱变效果后发现复合诱变效果最佳, 得到突变株 LTH2-5-*DOD-CYP76AD1*, 荧光强度达到  $(5\,941 \pm 435)$  AU/OD, 相比于 LTH0-*DOD-CYP76AD1* 提高了 8.29 倍。最终, LTH2-5 在胞外积累了 26.8 mg/L 的酪氨酸和 119.8 mg/L 的对香豆酸, 相比于对照菌株胞外酪氨酸提高了 3.96 倍, 对香豆酸提高了 1.02 倍。

由于发酵过程均采用 SC 合成培养基, 营养不足, 菌体生长比较缓慢。后续研究将继续整合 *FjTAL* 到基因组上, 并进一步优化发酵条件, 改造莽草酸及分支酸途径加强前体供应, 大部分突

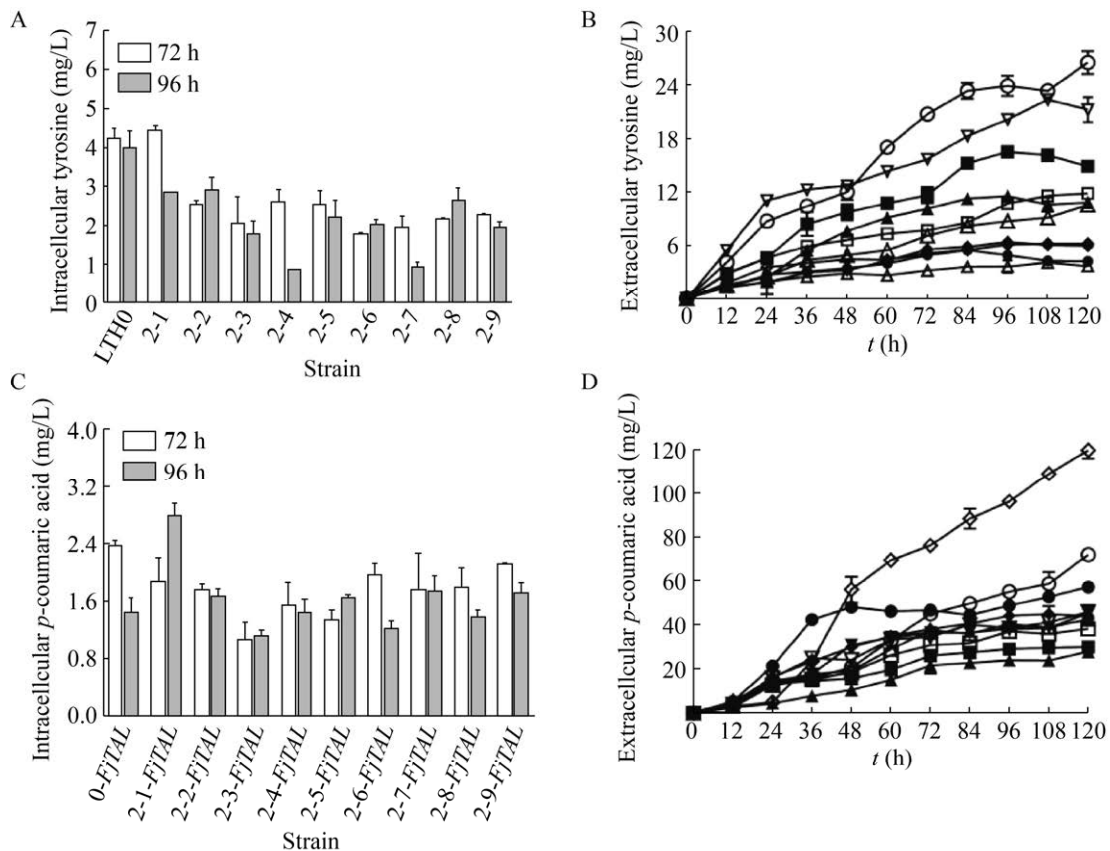


图 8 复合诱变株对香豆酸与酪氨酸积累情况

Fig. 8 Tyrosine and *p*-coumaric acid production in strains by compound mutation. ●: LTH0; ○: LTH2-1; ▲: LTH2-2; △: LTH2-3; ◆: LTH2-4; ◇: LTH2-5; ■: LTH2-6; □: LTH2-7; ▼: LTH2-8; ▽: LTH2-9. (A) Intracellular tyrosine production. (B) Extracellular tyrosine production. (C) Intracellular *p*-coumaric acid production. (D) Extracellular *p*-coumaric acid production.

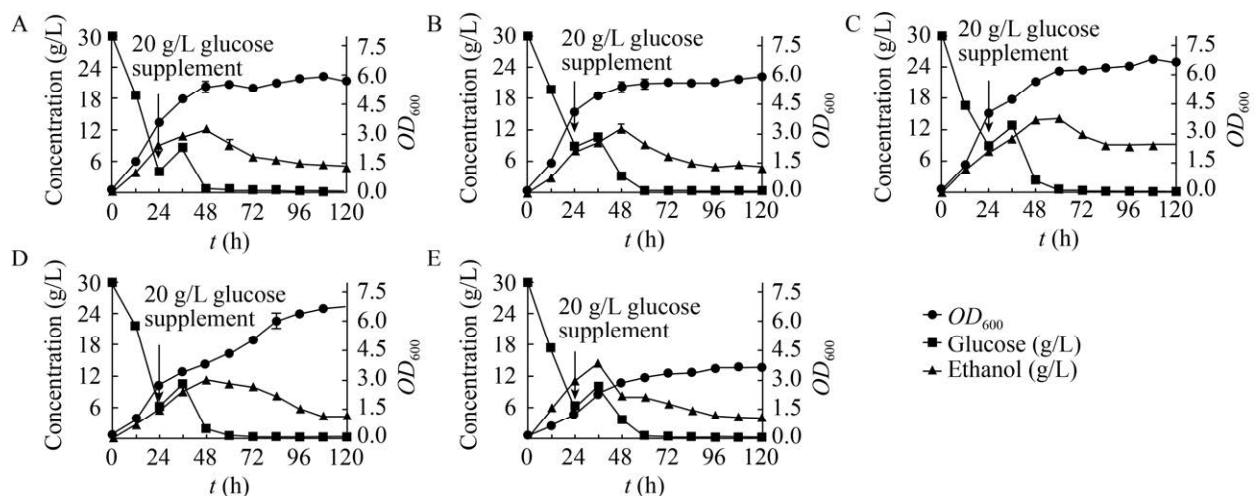


图 9 高效突变株生长情况及副产物积累

Fig. 9 The growth profile of mutant strains LTH0 (A), LTH1-1 (B), LTH1-4 (C), LTH2-1 (D), LTH2-5 (E) and the accumulation of by-products.

变株胞内酪氨酸含量减少而胞外积累量增加,下一步将对高产突变株进行基因组重测序,从基因组学的角度分析可能的调控位点并采取反向代谢工程策略,对高速生长但低产酪氨酸及对香豆酸的菌株进行定向改造以期得到高速生长的高产菌株。

## REFERENCES

- [1] 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.
- [2] Tan X, Song W, Chen XL, et al. Recent advances in biocatalytic derivatization of L-tyrosine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(23): 9907-9920.
- [3] Lynch JH, Dudareva N. Aromatic amino acids: a complex network ripe for future exploration. *Trends Plant Sci*, 2020, 25(7): 670-681.
- [4] 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.
- [5] Shen YP, Niu FX, Yan ZB, et al. Recent advances in metabolically engineered microorganisms for the production of aromatic chemicals derived from aromatic amino acids. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 43.
- [6] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 69(1): 1-8.
- [7] Huccetogullari D, Luo ZW, Lee SY. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 41.
- [8] Aversch NJH, Krömer JO. Metabolic engineering of the shikimate pathway for production of aromatics and derived compounds-present and future strain construction strategies. *Front Bioeng Biotechnol*, 2018, 6: 32.
- [9] 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.
- [10] Deaner M, Alper HS. Systematic testing of enzyme perturbation sensitivities via graded dCas9 modulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2017, 40: 14-22.
- [11] Luttk 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] Patnaik R, Zolanz RR, Green DA, et al. L-tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: fermentation optimization and recovery. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(4): 741-752.
- [13] Santos CNS, Xiao WH, Stephanopoulos G. Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(34): 13538-13543.
- [14] Rodriguez A, Kildegaard KR, Li MJ, 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.
- [15] Gu Y, Ma JB, Zhu YL, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a chassis for *de novo* synthesis of five aromatic-derived natural products and chemicals. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(8): 2096-2106.
- [16] Borja GM, Rodriguez A, Campbell K, et al. Metabolic engineering and transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* producing *p*-coumaric acid from xylose. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 191.
- [17] 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 (in Chinese).

- [18] Mao JW, Liu QL, Li YZ, et al. A high-throughput method for screening of L-tyrosine high-yield strains by *Saccharomyces cerevisiae*. J Gen Appl Microbiol, 2018, 64(4): 198-201.
- [19] Hou YN, Liu X, Li SL, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* production of betaxanthins. J Agric Food Chem, 2020, 68(31): 8370-8380.
- [20] Mao JW, Liu QL, Song XF, et al. Combinatorial analysis of enzymatic bottlenecks of L-tyrosine pathway by *p*-coumaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Lett, 2017, 39(7): 977-982.
- [21] Gandia-Herrero F, Garcia-Carmona F, Escibano J. Floral fluorescence effect. Nature, 2005, 437(7057): 334.
- [22] Sasaki N, Abe Y, Goda Y, et al. Detection of DOPA 4,5-dioxygenase (DOD) activity using recombinant protein prepared from *Escherichia coli* cells harboring cDNA encoding DOD from *Mirabilis jalapa*. Plant Cell Physiol, 2009, 50(5): 1012-1016.
- [23] DeLoache WC, Russ ZN, Narcross L, et al. An enzyme-coupled biosensor enables (*S*)-reticuline production in yeast from glucose. Nat Chem Biol, 2015, 11(7): 465-471.
- [24] 冉艳朋, 徐沙, 李由然, 等. 代谢工程改造酿酒酵母促进L-苯丙氨酸的合成. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 1-9.  
Ran YP, Xu S, Li YR, et al. Metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* for L-phenylalanine synthesis. Food Ferment Ind, 2020, 46(9): 1-9 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)