合成生物技术・

# 重构树干毕赤酵母合成白藜芦醇

颜丙扬1,韩禹梅1,李伟国2,隋玉鑫1,乔建军1,2,赵广荣1,2\*

1 天津大学 化工学院 教育部合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室,天津 300350
 2 天津大学 浙江研究院(绍兴),浙江 绍兴 312300

颜丙扬, 韩禹梅, 李伟国, 隋玉鑫, 乔建军, 赵广荣. 重构树干毕赤酵母合成白藜芦醇[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 1926-1941. YAN Bingyang, HAN Yumei, LI Weiguo, SUI Yuxin, QIAO Jianjun, ZHAO Guangrong. Reconstruction of *Scheffersomyces stipitis* for synthesis of resveratrol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 1926-1941.

摘 要: 白藜芦醇是一种有价值的植物多酚类化合物,目前主要通过植物提取法获得,受到天然原料的限制,不易长期大量获取,因此有必要开发一种更加简便、经济的白藜芦醇生产方法。本研究 以树干毕赤酵母的野生型菌株为宿主,首先通过引入编码白藜芦醇合成的关键酶基因(HaTAL1、 AtPAL2、AtC4H、At4CL2 以及 VvSTS)得到菌株 Ss05,合成白藜芦醇 55.28 mg/L。随后通过过表达 3-脱氧-D-阿拉伯庚糖酮酸-7-磷酸(3-deoxy-D-arabino-heptulonate-7-phosphate, DAHP)合成酶突变体 SsARO4<sup>K221L</sup>及分支酸变位酶突变体 SsARO7<sup>G139S</sup>、敲除丙酮酸脱羧酶基因(PDC1)、过表达乙酰辅酶 A 羧化酶突变体 SsACC1<sup>S650A,S1152A</sup>,增强对香豆酸及丙二酰辅酶 A 的供应。在此基础上,进一步增 加关键基因的拷贝数得到工程菌株 Ss17,白藜芦醇产量提高到 150.56 mg/L。最后将工程菌株 Ss17 在 5 L 发酵罐中通过分批补料葡萄糖发酵 128 h,得到了 558.40 mg/L 白藜芦醇。本研究运用合成生 物学思路,构建利用简单碳源合成白藜芦醇的工程菌株,同时利用生物反应器放大微生物发酵规模, 为树干毕赤酵母中芳香族化合物的生物合成提供了重要参考。 关键词: 白藜芦醇; 非常规酵母; 代谢工程; 合成生物学

# Reconstruction of Scheffersomyces stipitis for synthesis of resveratrol

## YAN Bingyang<sup>1</sup>, HAN Yumei<sup>1</sup>, LI Weiguo<sup>2</sup>, SUI Yuxin<sup>1</sup>, QIAO Jianjun<sup>1,2</sup>, ZHAO Guangrong<sup>1,2\*</sup>

1 Key Laboratory of Bioengineering (Ministry of Education), Frontier Science Center for Synthetic Biology,

School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China

2 Zhejiang Institute of Tianjin University, Shaoxing, Shaoxing 312300, Zhejiang, China

Abstract: Resveratrol is a valuable plant polyphenol. It is currently obtained primarily through

资助项目: 天津大学浙江研究院(绍兴)自主基金(2023X2-0013)

This work was supported by the Tianjin University Zhejiang Research Institute (Shaoxing) Independent Fund (2023X2-0013). \*Corresponding author. E-mail: grzhao@tju.edu.cn

Received: 2024-07-30; Accepted: 2024-10-21; Published online: 2024-10-22

plant extraction, which is difficult to obtain in large quantities over a long period of time due to the scarcity of natural raw materials. Therefore, it is necessary to develop a simple and cost-saving method for producing resveratrol. In this study, the genes encoding key enzymes for resveratrol synthesis (HaTAL1, AtPAL2, AtC4H, At4CL2, and VvSTS) were introduced into the wild-type strain of Scheffersomyces stipitis to construct strain Ss05, which achieved the resveratrol yield of 55.28 mg/L. Subsequently, the supply of p-coumaric acid and malonyl-CoA precursors was enhanced by overexpression of the feedback-insensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulonate-7-phosphate synthase mutant SsARO4<sup>K221L</sup> and chorismate mutase mutant SsARO7<sup>G139S</sup>, knockout of the pyruvate decarboxylase gene (PDC1), and overexpression of the acetyl-CoA carboxylase mutant SsACC1<sup>S650A, S1152A</sup>. On this basis, the copy number of key genes was increased to create the engineered strain Ss17, which achieved the resveratrol yield of 150.56 mg/L. Finally, 558.40 mg/L resveratrol was produced by fed-batch fermentation of glucose with strain Ss17 in a 5-L fermenter for 128 h. In this study, we employed synthetic biology to construct an engineered strain of S. stipitis for the synthesis of resveratrol from a simple carbon source and then scaled up the microbial fermentation in a bioreactor, providing an important reference for the biosynthesis of aromatic compounds in S. stipitis.

Keywords: resveratrol; non-conventional yeast; metabolic engineering; synthetic biology

近年来,随着人们生活水平的提高,对于 健康和品质的生活需要也日益增长,白藜芦醇 (resveratrol)因其特殊的生理活性受到了广泛关 注<sup>[1]</sup>。白藜芦醇是植物受到外界刺激时产生的 一种抗毒素,属于植物多酚类化合物,在抗氧 化、抗癌、抗病毒、抗衰老、预防心血管疾病 等方面有着十分显著的作用<sup>[2-5]</sup>。目前市面上的 白藜芦醇主要从虎杖、葡萄、花生等植物中提 取<sup>[6]</sup>,提取方法较为成熟,但产量和规模受到 天然原料的限制,有必要开发一种更加简便、 经济的白藜芦醇生产方法。

合成生物学和代谢工程的快速发展为白藜 芦醇的生产提供了一个新方向<sup>[7-8]</sup>。在植物中, 白藜芦醇有 L-酪氨酸(L-Tyr)和 L-苯丙氨酸 (L-Phe)这2条合成途径<sup>[9]</sup>。以L-Tyr为前体合成白 藜芦醇需要3个关键酶,酪氨酸氨裂解酶(tyrosine ammonia-lyase, TAL)是第一个关键酶,它可以 催化 L-Tyr 的脱氨,进而生成对香豆酸。随后, 对香豆酰辅酶 A 连接酶(4-coumarate:coenzyme A ligase, 4CL)催化对香豆酸转化成对香豆酰辅 酶 A<sup>[10]</sup>。最后,1分子对香豆酰辅酶 A 与3分子 的丙二酰辅酶 A,在二苯乙烯合酶(stilbene synthase, STS)的催化下发生克莱森缩合反应<sup>[11]</sup>, 形成白藜芦醇。L-Phe 与 L-Tyr 结构上有所差异, 苯丙氨酸氨裂解酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL)催化 L-Phe 脱氨生成肉桂酸而不是 对香豆酸,因此肉桂酸还需要在反式肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate-4-hydroxylase, C4H)的作用 下发生 4 位羟化反应转化成对香豆酸,然后参 与后续的反应(图 1)。

树干毕赤酵母(Scheffersomyces stipitis)具 有较高的磷酸戊糖途径代谢通量和丰富的赤藓 糖-4-磷酸(erythrose-4-phosphate, E4P)供应<sup>[12]</sup>, E4P 是合成芳烃的前体,因此该酵母适合芳烃 及其衍生物的生物合成<sup>[13]</sup>。本研究在树干毕赤 酵母的天然菌株中引入编码白藜芦醇合成的关 键基因,获得初始合成白藜芦醇的菌株,随后通 过解除 L-酪氨酸的反馈抑制<sup>[14-15]</sup>、增强丙二酰辅 酶 A 的供给<sup>[16]</sup>、增加关键基因拷贝数等<sup>[17]</sup>方式 提高菌株合成白藜芦醇的能力,对芳香族氨基酸



**图 1** 利用树干毕赤酵母以葡萄糖为碳源合成白藜芦醇的示意图 蓝色为异源途径基因及代谢物, 红色为突变体及内源基因。G-6-P:葡萄糖-6-磷酸; PPP:磷酸戊糖途径; EMP:糖酵解途径; PEP:磷酸烯醇式丙酮酸; PYR:丙酮酸; TCA cycle:三羧酸循环; ACD:乙醛; ACE:乙酸盐; E4P:赤藓糖-4-磷酸; DAHP: 3-脱氧-D-阿拉伯庚糖酮酸-7-磷酸; EPSP: 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸; CHA:分 支酸; PP:苯酸酯; SsARO4<sup>K221L</sup>: DAHP 合酶突变体; SsARO7<sup>G139S</sup>:分支酸变位酶突变体; SsACC1<sup>S650A,S1152A</sup>:乙酰辅酶 A 羧化酶 1 突变体; AtATR2:源自拟南芥的细胞色素 P450 还原酶 2; SsCYB5:内源的细胞色素 b5。

Figure 1 Schematic diagram of *Scheffersomyces stipitis* to accommodate resveratrol biosynthetic pathway from glucose. Blue is heterologous pathway genes and metabolites, red is mutants and endogenous genes. G-6-P: Glucose-6-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; PPP: Pentose phosphate pathway; EMP: Glycolysis pathway; PYR: Pyruvic acid; TCA cycle: Tricarboxylic acid cycle; ACD: Acetaldehyde; ACE: Acetate; E4P: Erythrose-4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulonate-7-phosphate; EPSP: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate; CHA: Chorismic acid; PP: prephenate; SsARO4<sup>K221L</sup>: DAHP synthase mutant; SsARO7<sup>G139S</sup>: Chorismite mutase mutant; SsACC1<sup>S650A,S1152A</sup>: Acetyl-CoA carboxylase 1 mutant; AtATR2: Cytochrome P450 reductase 2 from *Arabidopsis thaliana*; SsCYB5: Endogenous cytochrome b5.

生物合成及其下游分支衍生物(如黄酮、生物碱、 二苯乙烯类化合物等)的合成具有借鉴意义。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物

本研究构建的菌株与质粒见表 1 和表 2, 所用引物见表 3。 树干毕赤酵母属于 CTG 分支酵母(CTG clade),其特点是基因中 CTG 密码子通常编码 丝氨酸而不是亮氨酸<sup>[18]</sup>。为了使外源基因在树 干毕赤酵母中具有良好的表达效果,本研究对 大肠杆菌(Escherichia coli)来源的潮霉素抗性 基因 Hpt,酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes) 来源的核酸酶基因 Cas9,橙色滑柱菌 (Herpetosiphon aurantiacus)来源的 HaTAL1,拟

南芥(Arabidopsis thaliana)来源的 AtPAL2、 AtC4H、At4CL2、AtATR2 以及葡萄(Vitis vinifera) 来源的 VvSTS 基因使用在线软件 JCAT (http:// www.jcat.de)进行密码子优化,并将其中 CTG 密码子优化为 TTG 密码子<sup>[19]</sup>, 然后再交由苏州 金唯智公司合成。

## 1.1.2 主要试剂

对香豆酸(纯度≥98%)、白藜芦醇(纯度≥ 98%)、氨基酸粉末(纯度≥98%)购自北京索莱宝 科技有限公司。潮霉素 B (50 mg/mL)购自北京 酷来博生物科技有限公司。乙酸乙酯(色谱纯)、 乙腈(分析纯)、无水乙醇(分析纯)、三氟乙酸(分 析纯)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。 质粒小提试剂盒、普通 PCR 产物纯化试剂盒与 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技(北 京)有限公司。酵母质粒小量提取试剂盒购自北 京庄盟生物基因科技有限公司。同源重组试剂 盒购自博迈德生物技术有限公司。

## 1.1.3 培养基

LB培养基: 10.0 g/L 胰蛋白胨, 5.0 g/L 酵母提取物, 10.0 g/L NaCl;用于固体培养基时额外加入 2% (质量体积比)的琼脂粉,使用前根据需要添加抗生素。

SD 培养基: 20.0 g/L 葡萄糖, 6.7 g/L 无氨

#### 表1 本研究所用菌株

 Table 1
 Strains used in this study

Strains	Description	Source
Eescherichia coli	E. coli K-12 F-λ-ilvG-rfb-50 rph-1	Lab preservation
DH5a		
Saccharomyces	MATα, <i>leu</i> 2-3, 112; <i>trp</i> 1-901; <i>his</i> 3Δ200; <i>ade</i> 2-101	Lab preservation
cerevisiae		
MaV203		
Scheffersomyces	CICC 1960(CBS 6054)	China Center of
stipitis		Industrial Culture
Ss02	CBS 6054, <i>∆trp1</i>	This study
Ss03	Ss02 harboring pYBY08	This study
Ss04	CBS 6054, $\Delta trp1::P_{PIRI}$ -HaTAL1-T <sub>TEF1</sub> , $P_{ENO1}$ -At4CL2-T <sub>AOX1</sub> , $P_{TEF1}$ -VvSTS-T <sub>GLN1</sub>	This study
Ss05	Ss04 harboring pYBY11	This study
Ss06	Ss04, $\Delta ade2::P_{ADH1}-ARO4^{K221L}-T_{GLN1}$	This study
Ss07	Ss04, $\Delta ade2::P_{PKGI}$ -ARO7 <sup>G139S</sup> -T <sub>AOX1</sub>	This study
Ss08	Ss04, $\Delta ade2::P_{ADHI}-ARO4^{K221L}-T_{GLNI}$ , PpKg1-ARO7 <sup>G139S</sup> -T <sub>AOXI</sub>	This study
Ss09	Ss08, <i>Apdc1</i>	This study
Ss10	Ss08, <i>Aaro10</i>	This study
Ss11	Ss08, Δpdc1, Δaro10	This study
Ss12	Ss08, <i>Apdc1</i> ::P <sub>TEF1</sub> -AtPAL2-T <sub>GLN1</sub> , P <sub>EN01</sub> -AtC4H-T <sub>AOX1</sub> , P <sub>PIR1</sub> -AtATR2-T <sub>TEF1</sub> , P <sub>ADH1</sub> -SsCYB5-T <sub>XYL2</sub>	This study
Ss13	Ss12, <i>Aleu2</i> ::P <sub>TEF1</sub> -SsACC1 <sup>S650A,S1152A</sup> -T <sub>GLN1</sub>	This study
Ss14	$Ss04, \varDelta xyl2:: P_{PIRI}-HaTAL1-T_{TEFI}, P_{ENOI}-At4CL2-T_{AOXI}, P_{TEFI}-VvSTS-T_{GLNI}$	This study
Ss15	$Ss08, \varDelta xyl2:: P_{PIR1}-HaTAL1-T_{TEF1}, P_{ENO1}-At4CL2-T_{AOX1}, P_{TEF1}-VvSTS-T_{GLN1}$	This study
Ss16	Ss12, <i>Axyl2</i> ::P <sub>PIR1</sub> -HaTAL1-T <sub>TEF1</sub> , P <sub>EN01</sub> -At4CL2-T <sub>AOX1</sub> , P <sub>TEF1</sub> -VvSTS-T <sub>GLN1</sub>	This study
Ss17	Ss13, <i>Axyl2::Ppiri-HaTAL1-Ttefi</i> , <i>Penoi-At4CL2-TAOXi</i> , <i>Ptefi-VvSTS-TGLNi</i>	This study

#### 表 2 本研究所用质粒

#### Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Description	Source
pUC57	$Amp^R$	Lab preservation
pRS414	Amp <sup>R</sup> , CEN/ARS2, ScTrp1	Lab preservation
pYBY01	Amp <sup>R</sup> , SsCEN6, SsARS2, Polei-Hpt-TxyL2	This study
pYBY04	Amp <sup>R</sup> , P <sub>PIR1</sub> -Cas9-T <sub>GLN1</sub> , P <sub>SNR52</sub> -Trp1-sgRNA scaffold	This study
pYBY05	pRS414, SsCEN6, SsARS2, Polei-Hpt-TXYL2,	This study
	P <sub>PIRI</sub> -Cas9-T <sub>GLNI</sub> , P <sub>SNR52</sub> -Trp1-sgRNA scaffold	
pYBY08	pRS414, SsCEN6, SsARS2, Polei-Hpt-Txyl2, Ppiri-HaTAL1-Ttefi,	This study
	$P_{ENOI}$ -At4CL2-T <sub>AOX1</sub> , $P_{TEF1}$ -VvSTS-T <sub>GLN1</sub>	
pYBY09	pRS414, Trp1HA	This study
pYBY10	pYBY09, Ppiri-HaTAL1-Ttefi, Penoi-At4CL2-TAOXI, Ptefi-VvSTS-TGLNI	This study
pYBY11	pRS414, SsCEN6, SsARS2, PTEF1-AtPAL2-TGLN1, PENOI-AtC4H-TAOX1,	This study
	PPIRI-AtATR2-TTEFI, PADHI-SSCYB5-TXYL2	
pYBY18	pRS414, Ade2HA	This study
pYBY20	pYBY05 derivate, P <sub>SNR52</sub> -Ade2-sgRNA scaffold	This study
pYBY22	pYBY18, PADHI-ARO4 <sup>K221L</sup> -T <sub>GLN1</sub>	This study
pYBY23	pYBY18, P <sub>PKG1</sub> - <i>ARO7<sup>G1395</sup></i> -T <sub>AOX1</sub>	This study
pYBY24	pYBY18, PADHI-ARO4 <sup>K221L</sup> -T <sub>GLNI</sub> , PpKG1-ARO7 <sup>G139S</sup> -TAOXI	This study
pYBY26	pYBY05 derivate, P <sub>SNR52</sub> -Pdc1-sgRNA scaffold	This study
pYBY29	pYBY05 derivate, P <sub>SNR52</sub> -Aro10-sgRNA scaffold	This study
pYBY31	pRS414, Pdc1HA	This study
pYBY32	pYBY31, PTEFI-AtPAL2-TGLN1, PENOI-AtC4H-TAOX1, PPIRI-AtATR2-TTEF1,	This study
	PADHI-SsCYB5-TXYL2	
pYBY33	pRS414, Leu2HA	This study
pYBY34	pYBY33, P <sub>TEF1</sub> -SsACC1 <sup>S650A,S1152A</sup> -T <sub>GLN1</sub>	This study
pYBY35	pYBY05 derivate, P <sub>SNR52</sub> -Leu2-sgRNA scaffold	This study
pYBY38	pRS414, Xyl2HA	This study
pYBY39	pYBY38, Ppiri-HaTAL1-Ttefi, Penoi-At4CL2-TAOXI, Ptefi-VvSTS-TGLNI	This study
pYBY40	pYBY05 derivate, P <sub>SNR52</sub> -Xyl2-sgRNA scaffold	This study

基酸酵母基本氮源(yeast nitrogen base without amino acids, YNB), 1.3 g/L 氨基酸缺省粉末, 调节 pH 值为 6.5; 用于固体培养基时额外加入 2% (质量体积比)的琼脂粉, 使用前根据需要添 加所需的氨基酸母液与抗生素。

YPD 培养基:10.0 g/L 酵母提取物,20.0 g/L 蛋白胨,20.0 g/L 葡萄糖;用于固体培养基时 额外加入 2% (质量体积比)的琼脂粉,使用前根 据需要可添加 0.2%的腺嘌呤,配制成 YPDA 培 养基。

发酵培养基:在 YPD 培养基的基础上,将

葡萄糖浓度提高至 50 g/L。根据发酵所需,可以补充适量的抗生素和氨基酸。

#### 1.2 方法

#### 1.2.1 树干毕赤酵母表达载体构建

本研究主要采用无缝克隆和酿酒酵母组装 这 2 种方式构建表达载体。小于 10 kb 的表达 载体一般采用无缝克隆的方法构建,例如表达 载体 pYBY01 的构建。设计含有约 20 bp 同源 臂的引物,扩增片段 *SsCEN6、SsARS2、PoLE1、 Hpt、TxrL2*,并将这些片段通过无缝克隆试剂盒连 接到商业化载体 pUC57 上,即得到载体 pYBY01。

\_\_\_\_

Primer name	Primer sequences $(5' \rightarrow 3')$	
CEN6-F	TTGCGTCTCTAAGTTTCGACACCCAGAGAGTAG	
CEN6-R	TGTCAAATCTGAATTCAATATAGCCGAC	
ASR2-F	ATGTCGGCTATATTGAATTCAGATTTGACAGAATTCAGTATAGGATATGGTGTTTAGC	
ARS2-R	TGTCAGAAAGAAGATCTTCTGCGGTGTCTAC	
OLE1p-F	GCAGAAGATCTTCTTGACATTGGTGCGTATG	
OLE1p-R	TGGCTTCTTCATACTGAAATCGAAATAGAATCAGAAGTTGAAG	
XYL2t-F	CTAAGGAATAATGGCCCAAAGTGAACCAGAAAC	
XYL2t-R	GGGGAAACTTGATGAAGAAGTTGTG	
Hpt-F	TCGATTTCAGTATGAAGAAGCCAGAATTGACTGC	
Hpt-R	ACTTTGGGCCATTATTCCTTAGCTCTTGGTCTAGTAGATG	
Cas9-F	ATGGACTACAAGGATGACGATG	
Cas9-R	AACTTTTCTTTCTTCTTAGGATCGTC	
PIR1p-F	TTGCGTCTCTAAGGCTCTTTGAATTTACTTTGCC	
PIR1p-R	TCGTCATCCTTGTAGTCCATTGTAAATCAATCAGGTTTATTGTAGATAGCG	
GLN1t-F	CGATCCTAAGAAGAAAAGAAAAGTTATGTCTGGCTGGTTTCCTTC	
GLN1t-R	TAACGAATAATGAACATTAGTACCACC	
N20-Trp1-F1	ACGTACTATTCAAGAACCAGGTTTTAG	
SUPt-R	CTCCGTCTCTAACACACTAAGAGATGCTCGAT	
SNR52p-F	CATTATTCGTTAGTTTAAACTGGAGGGAATCCTAGGAT	
SNR52p-R	CTGGTTCTTGAATAGTACGTGAAATAAATGTATCTTGTTGGAAACGAACC	
Cas-CEH6-F	CGAGCATCTCTTAGTGTGTTAAGTTTCGACACCCAGAGAGT	
Hpt-Sc-R	TTCGCCTTCCTTGGAGTTAGGAGTAGGGGAAACTTGATGAAGAAGTTGTG	
Trp1-up-F	GCTCACTCTAGATGATGGTACC	
Trp1-up-R	TGAGAGCCGTCTCATACACTGCCCGATTGGGTACAAGAATTAC	
Trp1-dw-F	AGTGTATGAGACGGCTCTCAG	
Trp1-dw-R	ATCCCACCTAACGCTTGAAC	
TAL1-F	TTGATTTACAATGTCTACCACCTTGATCTTGAC	
TAL1-R	ATTAATCAGCTTAACGGAACAAGATGATAGAACGC	
4CL2-F	CGCACTAACAATGACCACCCAAAACGTTATCATC	
4CL2-R	TGAGCAATTCTTAGTTCATCAAACCGTTAGCCAATC	
STS-F	AGTCTATCTACAATGGCTTCTGTTGAAGAATTTAG	
STS-R	AGCCAGACATTTAGTTGGTAACCATTGGGATAGAG	
PAL2-F	ATCCAAATTATCATGGATCAGATTGAAGCTATGTTG	
PAL2-R	AGCCAGACATCTAGCAAATAGGGATGGGAGC	
C4H-F	CCCGCACTAACAATGGATCTTCTCCTATTAGAAAAGAGTC	
C4H-R	CCTGAGCAATTCCTAACAATTACGAGGCTTCATGAC	
ATR2-F	GATTGATTTACAATGTCCAGCTCTTCTTCTTCTAG	
ATR2-R	AAATTAATCAGCCTACCATACATCCCTAAGGTATCTAC	
SsCYB5-F	AGTCTATCTACAATGGCTACTGAAACCTTGAAGAC	
SsCYB5-R	CTTTGGGCCATTAGTTGTTTTGCAAGAAGTAGTAGG	
		(待续)

# 表 3 PCR 引物序列

Table 3 PCR primer sequences

(续表 3)

Primer name	Primer sequence $(5' \rightarrow 3')$			
In-ARO4-F	ATCCAAATTATCATGTCCCAAACACCAGTACC			
ARO4-Mutup-R	CCATACCATTCAAGGTAACACCCATGAAGTGG			
ARO4-Mutdw-F	TGGGTGTTACCTTGAATGGTATGGCTGCCATC			
In-ARO4-R	CAGCCAGACATTTATGCCTTGAGGGCTCTTCTAG			
In-ARO7-F	CATTCACATCGCTATCTCTACATAATGGATTTCACAAAGCCCGA			
ARO7-Mutup-R	CAGAACCGAAGACAAGTTCTCCTGTTGCTCTC			
ARO7-Mutdw-F	GGAGAACTTGTCTTCGGTTCTGACTCAGGAC			
In-ARO7-R	CCTGAGCAATTCTTAGTTGCTCTCACCGACCCTC			
Ade2-up-F	ACTCTAAGAAGGTTAGCACTTCCG			
Ade2-up-R	CATGGACAAGATCGTCTCCTCCAATGGAAG			
Ade2-dw-F	AGGAGACGATCTTGTCCATGGCGCAACTATC			
Ade2-dw-R	AGACTCCAGGCTCTGTACTTG			
ACC1-F1	ATGTCAGACACATCCAAAGATTCC			
ACC1-R1	CACCGTCAGCTAATTGACGAACTCCAACAATACCTC			
ACC1-F2	TCGTCAATTAGCTGACGGTGGATTGTTGGTT			
ACC1-R2	CGAAAGATAAGTCTGAAACAGCGGCAGCTCTGTTCATTTGTGG			
ACC1-F3	GCTGTTTCAGACTTATCTTTCGTTATCG			
ACC1-R3	CAGCCAGACATTCATTTAAGCGATTTCAAGAATTCAGC			
Leu2-up-F	AAGGATATCGCCTTGTCTTCAGG			
Leu2-up-R	ATGGCAGCACCTCCAATTAAATG			
Leu2-dw-F	TTAATTGGAGGTGCTGCCATAATTGCCACCATCTTGTCGG			
Leu2-dw-R	CGAATTTGCCACTTCTAGGAATC			
PDC1-up-F	GGGATAAAGTATATAAAGGCCATTGG			
PDC1-up-R	GTAACCGTCAACCCATTGGAGTGACAAATACTG			
PDC1-dw-F	TCCAATGGGTTGACGGTTACACCATCGAGC			
PDC1-dw-R	AGTAGCGAAATCCTGGCCAT			
Xyl2-up-F	TCTTGGGGTCAGGTGAAGTCG			
Xyl2-up-R	AAGTAAATTCAAAGAGCCTTAGCTGGAAGAGGGCAGCTG			
Xyl2-dw-F	TGAAAAATTACGATCAACTTTTACTCTTTTCCATTG			
Xyl2-dw-R	CTTACATAAGGTACCTGGTGGGTTTGG			

类似地,构建含有 Cas9 核酸酶和 gRNA 的表达载体 pYBY04 以及含有 TRP1 基因上下同源片段的表达载体 pYBY09 等。

大于 10 kb 的表达载体一般采用酵母组装 的方式构建<sup>[20]</sup>,例如Cas9质粒pYBY05的构建: 设计含有 40-50 bp 同源臂的引物, 扩增 CEN6-ARS2-Hpt marker、Cas9-Trp1-sgRNA scaffold 和 pRS414 载体片段,然后将这些片段一同转 化酿酒酵母,经过菌落 PCR 验证、酵母质粒提 取后,得到目的质粒。类似地,构建含有白藜 芦醇合成途径关键酶的表达载体 pYBY08、 pYBY11 等。

## 1.2.2 树干毕赤酵母整合片段构建

由于本研究使用的整合片段较长,采用传

统融合连接片段的方式效率太低。为了确保实 验的准确和高效,首先把需要整合的片段构建 在表达载体上,然后再以表达载体为模板,扩 增所需要的整合片段。如若进行基因敲除,只 需要从基因组上扩增对应基因的上下同源片段 (500-1 000 bp),然后将它们连接起来形成基因 敲除盒即可。

#### 1.2.3 树干毕赤酵母重组菌株构建

本研究使用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术辅助树干毕赤酵母完成基因编辑<sup>[21]</sup>,如图 2 所示。 以构建 Ss02 菌株为例,首先将靶向 Trp1 位点的 Cas9 质粒与 *TRP1* 基因敲除盒电击转化到用 醋酸锂和二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)法制 备的 *S. stipitis* 感受态细胞中<sup>[22]</sup>,然后用含有 400 μg/mL 潮霉素抗性的 SD 固体培养基筛选。 长出菌落后,可以通过菌落 PCR 和用有无色氨 酸的 SD 平板进一步筛选,得到性状稳定的色 氨酸缺陷菌株。

#### 1.2.4 发酵方法

摇瓶发酵:将在平板上活化的菌株接种到 含有 3 mL YPD 培养基的摇菌管中,在 30 ℃、 220 r/min 条件下培养 12–16 h,得到一级种子 液;将一级种子液转接到 5 mL 新鲜 YPD 培养 基中,按照上述条件过夜培养 12–16 h,得到二 级种子液;按照  $OD_{600}$ =0.1 的初始接种量,用移 液器将二级种子液转接到含有 50 mL 发酵培养基 的 250 mL 挡板三角瓶中,在 30 ℃、220 r/min 条件下发酵培养 120 h,每隔 24 h取样检测菌 种生物量  $OD_{600}$ 、残糖及产物积累情况。

发酵罐发酵:采用 5 L 全自动搅拌发酵罐 进行发酵,发酵初始装液量为 1.8 L,将种子液 以 10%接种量接种至发酵培养基中,发酵温度 为 30 ℃,维持初始转速 220 r/min,通入 100% 无菌干燥空气进行发酵,过程中流加 500 g/L 葡 萄糖,通过调整搅拌转速及通气速率维持溶解氧 浓度为 30%-40%,通过流加氨水将 pH 维持在 6.5 左右,发酵至 144 h 结束。每隔 8 h 取样检测 发酵液中的生物量、底物消耗及产物生成情况。

## 1.2.5 检测方法

细胞浓度检测:取细胞培养液,稀释至 *OD*<sub>600</sub>为 0.2–0.8,通过紫外分光光度计检测其 在波长 600 nm 处的吸光度。



#### 图 2 树干毕赤酵母中 CRISPR-CAS9 辅助 TRP1 位点整合

Figure 2 The integration of Trp1 with CRISPR-Cas9 in Scheffersomyces stipitis.

残糖和乙醇检测:使用 S-10 生物传感器分析仪,测量发酵液中葡萄糖和乙醇浓度,数值 控制在 0.03-1.0 g/L 范围内。

对香豆酸与白藜芦醇检测:使用 Agilent C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 µm),柱温为 35 ℃,检测波长 290 nm;流动相为 30%乙腈(含 0.1%三氟乙酸),流速为 1 mL/min;每次进样量 为 10 µL,标准品的标准曲线绘制至少 5 个点,  $R^2 \ge 0.99$ 。

## 2 结果与分析

## 2.1 白藜芦醇合成途径建立

由橙色滑柱菌的酪氨酸氨裂解酶基因 HaTAL1、拟南芥的对香豆酰 CoA 连接酶基因 At4CL2 和葡萄的二苯乙烯合酶基因 VvSTS 构成 从 L-Tyr 到白藜芦醇合成途径。将表达载体 pYBY08电转化到菌株 Ss02 中,得到菌株 Ss03, 将该菌株按照 1.2.4 中的方法摇瓶发酵 120 h, 结果如图 3A 所示, Ss03 成功合成了 20.80 mg/L 白藜芦醇;采用整合表达的方式,将含有 HaTAL1、At4CL2、VvSTS 基因的整合片段通过 Cas9 质粒辅助整合到 S. stipitis 的 Trp1 位点, 得到菌株 Ss04, 经发酵验证, 结果如图 3B 所 示,该菌株合成了35.10 mg/L 白藜芦醇。为了 研究前体 L-Tyr 是否限制白藜芦醇合成,添加 200 mg/L的 L-Tyr 进行发酵验证,结果如图 3C所 示,2个菌株白藜芦醇的产量都得到了提高,其中 菌株 Ss04 的白芦藜醇产量增加到了 44.25 mg/L, 但在发酵液中没有检测到对香豆酸的剩余,可 能是供应不足。

为了弥补对香豆酸前体的不足,引入源自 拟南芥的苯丙氨酸氨裂解酶(*AtPAL2*)与反式肉 桂酸-4-羟化酶(*AtC4H*)构成从 L-Phe 到白藜芦 醇的合成途径,如图 4B 所示。将表达载体 pYBY11 导入上一步所获得的重组菌株 Ss04 中, 如图 4A 所示,获得菌株 Ss05。发酵结果如图 4C 所示,菌株 Ss05 合成了 55.28 mg/L 白藜芦醇,比 单独表达 L-Tyr 途径的菌株 Ss04 产量提高了 57%。



图 3 白藜芦醇初始合成菌株发酵结果 A: 游离表 达 HaTAL1、At4CL2和 VvSTS的 Ss03菌株; B: 整合 表达 HaTAL1、At4CL2和 VvSTS的 Ss04菌株; C: 在 发酵培养基中添加 200 mg/L 酪氨酸的发酵结果。

Figure 3 Fermentation results of resveratrolproducing strains. A: The Ss03 strain with free expression of *HaTAL1*, *At4CL2* and *VvSTS*; B: The Ss04 strain with integrated expression of *HaTAL1*, *At4CL2* and *VvSTS*; C: The fermentation results with the addition of 200 mg/L tyrosine in the fermentation medium. 发酵结束后,在发酵液中检测到少量的对 香豆酸剩余,表明引入 L-Phe 分支途径可以弥 补 L-Tyr 途径对香豆酸供应不足的问题。后续 实验选择菌株 Ss04 进行下一步优化。

## 2.2 解除 L-酪氨酸反馈抑制

本研究通过过表达反馈不敏感的 DAHP 合成酶突变体 SsARO4<sup>K221L</sup> 以及分支酸变位酶突变体 SsARO7<sup>G139S</sup>,解除 L-Tyr 的反馈抑制,以此改善莽草酸途径。

将含有 SsARO4<sup>K221L</sup>、ARO7<sup>G139S</sup>突变体的 整合片段分别整合到 Ss04 的 Ade2 位点,长出 菌落后,经过菌落 PCR 验证,得到 SsARO4<sup>K221L</sup>、 SsARO7<sup>G139S</sup> 突变体单独过表达以及组合过表 达的菌株 Ss06、Ss07 和 Ss08。将这些工程菌株 按照 1.2.4 中的方法进行发酵,结果如图 5 所示。 单独过表达 SsARO4<sup>K221L</sup> 的菌株 Ss06 的白藜芦 醇产量仅有 21.71 mg/L,但对香豆酸积累了 23.24 mg/L;单独过表达 SsARO7<sup>G139S</sup> 的菌株 Ss07 合成了 46.05 mg/L 白藜芦醇,比初始合成菌 株 Ss04 提高了 31%;过表达组合体的菌株 Ss08 效果最明显,白藜芦醇产量提高了47.6%,达到了51.82 mg/L,同时对香豆酸也有一定的积累。

## 2.3 增强前体丙二酰辅酶 A 供应

本研究通过 CRISPR-Cas9 技术辅助 PDC1 与 ARO10 基因的敲除,同时参考酿酒酵母中乙 酰辅酶 A 羧化酶 1 (acetyl-CoA carboxylase 1, ACC1)的 突变位点,将树干毕赤酵母内源 SsACC1 基因的第 650 位与第 1 152 位编码丝氨 酸的密码子 TCT 突变为编码丙氨酸的密码子 GCT,并用强启动子 P<sub>TEF1</sub>来启动,以此增加乙 酰辅酶 A 的供应和增强 ACC1 的催化活性。

发酵结果如图 6A 所示,单独敲除 PDC1 基因的菌株 Ss09 成功合成白藜芦醇 62.22 mg/L,产量提高了 20%;单独敲除 ARO10 基因的菌株 Ss10 合成白藜芦醇 59.60 mg/L,产量提高了 15%;同时敲除 PDC1 与 ARO10 基因的菌株 Ss11,白藜芦醇产量只有 58.15 mg/L,对香豆酸的产量略有提升,表明单敲除 PDC1 效果更好。同时,为了提高基因的表达效果,将 L-Phe 分支途径的相关基因(AtPAL2、AtC4H、AtATR2、



# **图 4** 引入 L-Phe 分支途径强化对香豆酸供应 A:表达载体 pYBY11 的组成结构; B: L-Phe 分支途径; C:强化对香豆酸供应的菌株 Ss05 发酵结果。

Figure 4 Introduce the L-phenylalanine branch pathway to enhance the supply of p-coumaric acid (p-CA). A: The map of vector pYBY11; B: L-phenylalanine branching pathway; C: Fermentation results of strain Ss05 fortified for p-coumaric acid supply.



**图 5 解除 L-Tyr 反馈抑制的发酵结果** A: 过表达 SsARO4<sup>K4221L</sup> 和 SsARO7<sup>G139S</sup> 的重组菌株发酵结果; B: 工程菌株 Ss08 生产白藜芦醇的时间过程。

Figure 5 The fermentation result of relieving the feedback inhibition of L-tyrosine. A: Fermentation results of recombinant strains overexpressing  $SsARO4^{K221L}$  and  $SsARO7^{G139S}$ ; B: Time course of production resveratrol by the engineered strain Ss08. \**P*<0.05; \*\**P*<0.01.



**图 6 增强前体供应促进白藜芦醇合成** A: 敲除 *PDC1、ARO10* 基因和整合表达 L-Phe 分支途径的 重组菌株发酵结果; B: 工程菌株 Ss13 生产白藜芦醇的时间过程。

Figure 6 Enhancing precursor supply to promote resveratrol synthesis. A: Fermentation results of recombinant strains with *PDC1* and *ARO10* genes knocked out and integrated expression of L-Phe branching pathway. B: Time course of production resveratrol by the engineered strain Ss13. \*P<0.05; \*\*P<0.01.

*SsCYB5*)整合到 Ss08 的 *PDC1* 位点,得到菌株 Ss12,结果白藜芦醇产量提高到了 70.20 mg/L。随后,将 SsACC1<sup>S650A,S1152A</sup> 突变体表达盒整合到 菌株 Ss12 的 Leu2 位点上,得到菌株 Ss13,发 酵结果如图 6B 所示。经检测,白藜芦醇的产量 提高到了 92.36 mg/L,是改造前菌株(Ss12)产量 的 1.32 倍。

敲除 PDC1 与 ARO10 基因后, 白藜芦醇的 产量有了一定的提高, 但菌株的生长速度也受 到了影响。后续整合表达 L-Phe 分支途径的相关 基因时, 得到的菌株 Ss12 没有像菌株 Ss05 提升 得那么明显, 可能是削弱乙醇合成增加的乙酰辅 酶 A 没能高效地转化为丙二酰辅酶 A, 限制了 白藜芦醇的合成。之后过表达 SsACC1<sup>S650A,S1152A</sup> 突变体时, 菌株 Ss13 的白藜芦醇产量有了较为 明显的提高。

## 2.4 增加关键基因拷贝数

增加关键基因的表达量是提高微生物细胞 工厂生产力的有效策略。本研究考虑增加关键 基因的拷贝数,以此促进白藜芦醇的合成。以 Xyl2 作为整合位点,设计构建靶向 Xyl2 的 Cas9 质粒以及含有 HaTAL1、At4CL2 和 VvSTS 基因 表达盒的整合片段。将其整合到此前构建的菌 株 Ss04、Ss08、Ss12 以及 Ss13 中,获得菌株 Ss14-Ss17,发酵结果如图7所示。含有 HaTAL1、 At4CL2 和 VvSTS 基因双拷贝的菌株 Ss14 合成 了 112.14 mg/L 的白藜芦醇,表明增加基因拷贝 数的效果十分明显;在菌株 Ss13 的基础上增加 关键基因拷贝数的菌株 Ss17,白藜芦醇产量达 到了 150.56 mg/L,比菌株 Ss13 的产量提高了 63%。以上结果证明,对于 L-Tyr 到白藜芦醇的 生物合成过程,增加关键基因拷贝数可以显著 提高白藜芦醇的产量。

## 2.5 工程菌 5 L 发酵罐发酵

为了进一步探究工程菌株 Ss17合成白藜芦 醇的潜力,本研究将菌株 Ss17在5L发酵罐中 按照1.2.4中的方法进行分批补料发酵。结果如 图 8 所示,初始葡萄糖浓度为50g/L,发酵24h 葡萄糖消耗完毕,开始以10 mL/h的速度补充 葡萄糖。补料期间发酵液的生物量逐渐增加, 消耗糖的速度也逐渐增加,到第56小时,OD<sub>600</sub> 达到112,此时共补料葡萄糖523.6 mL,补料 速度为20 mL/h。56 h 以后,发酵罐生物量趋于 平稳,白藜芦醇的积累速度开始提升,菌株由 生长期转换为生产期,在此过程中灵活控制补 糖速度,使发酵罐内的葡萄糖稳定在2-5 g/L 左右。到128 h 共补料葡萄糖 1 163.3 mL,此时 白藜芦醇产量最高,达到558.40 mg/L。



**图 7 增加基因拷贝数促进白藜芦醇合成** A:整合片段的组成结构; B: 含有 *HaTAL1、At4CL2* 和 *VvSTS* 基因双拷贝的重组菌株发酵结果; C: 工程菌株 Ss17 生产白藜芦醇的时间过程。

Figure 7 Increase the copy number of genes to promote resveratrol synthesis. A: The map of Integration fragment; B: Fermentation results of recombinant strains containing double copies of *HaTAL1*, *At4CL2* and *VvSTS* genes; C: Time course of production resveratrol by the engineered strain Ss17. \*P<0.05; \*\*P<0.01; P<0.001.



图 8 工程菌株 Ss17 在 5 L 发酵罐生产白藜芦醇 的时间过程

Figure 8 Time course of production of resveratrol by the engineered strain Ss17 in 5 L bioreactor.

# 3 讨论与结论

本研究在 S. stipitis (GenBank 登录号: GCA\_000209165.1)菌株中构建了白藜芦醇的从 头合成途径,并通过解除 L-Tyr 的反馈抑制、敲 除 PDC1 基因、过表达突变体 SsACC1<sup>S650A,S1152A</sup> 及增加关键基因的拷贝数,得到工程菌株 Ss17。 该菌株在摇瓶中发酵 120 h,白藜芦醇产量为 150.56 mg/L,在5L发酵罐中通过分批补料葡 萄糖发酵 128 h,白藜芦醇产量达到了 558.40 mg/L, 为树干毕赤酵母中芳香族化合物的生物合成提 供了参考。

在白藜芦醇的生物合成中,对香豆酸和丙 二酰辅酶 A 前体的供应是限制白藜芦醇产量的 关键因素。为了弥补对香豆酸前体的不足,本 研究在 S. stipitis 中引入了 L-Phe 分支途径,由 于该途径中使用的 C4H 是一种来源于植物并且 是膜相关的 P450 酶,异源表达时活性较低,需 要有适合的电子载体才能发挥其活性<sup>[23-24]</sup>。因此, 本研究过表达了来源于拟南芥的细胞色素 P450 还原酶(AtATR2)和内源的细胞色素 b5 (SsCYB5) 基因<sup>[16]</sup>,使白藜芦醇的产量提高了 57%。莽草 酸途径合成了 3 种芳香氨基酸,为各种植物来 源的生物碱、黄酮类化合物和植物多酚提供了 关键前体<sup>[25]</sup>。改善莽草酸途径主要致力于消除 内源性反馈抑制,减少对关键中间体的内部竞 争,并协调来自各种来源的酶的表达<sup>[26-27]</sup>。本 研究通过解除 L-Tyr 的反馈抑制,使白藜芦醇 的产量提高了 47.6%,但对上游途径的改造仍 然不够完善,通过莽草酸途径合成的苯丙酮酸 可能会更多地流向苯乙醇,从而减少 L-Phe 的 生成。

丙酮酸脱羧酶 (pyruvate decarboxylase, PDC)是乙醇发酵的关键酶, 敲除该基因能够减 少乙醇产生<sup>[28]</sup>,进而增加乙酰辅酶 A 通量。丙 二酰辅酶 A 是合成白藜芦醇的重要前体, 它主 要由 ACC1 催化乙酰辅酶 A 得到<sup>[29]</sup>, Shi 等<sup>[30]</sup> 在酿酒酵母中,通过在ACCI基因中引入S659A 和 S1157A 这 2 个位点突变, 增强了 ACC1 的 表达活性。本研究在 PDC1 位点上整合 L-Phe 分支途径的相关基因后, 白藜芦醇的产量得到 了提高,但由于削弱了乙醇的合成,菌株的生 长速度也受到了影响。上一步改造增强了乙酰 辅 酶 A 的 供 应 , 因 此 过 表 达 突 变 体 SsACC1<sup>S650A,S1152A</sup>后, 菌株 Ss13 的白藜芦醇产 量提高了 32%。最后,含有 HaTAL1、At4CL2 和 VvSTS 基因双拷贝的菌株 Ss14 比单拷贝菌株 Ss04 的白藜芦醇产量提高了 225%, 菌株 Ss17 产量也比菌株 Ss13 提高了 63%, 表明增加关键 基因拷贝数的效果较为显著。

据文献报道,目前已有多种微生物被改造为 生产白藜芦醇的宿主(表 4)。与其他微生物宿主 相比<sup>[31-36]</sup>,树干毕赤酵母具有生长稳定、磷酸戊 糖途径代谢通量高和 E4P 供应丰富等优点,仅仅 引入 TAL、4CL、STS 单拷贝的菌株 Ss04 就获得 了较高的白藜芦醇产量。此外,树干毕赤酵母具有 代谢多种碳源的能力,特别是对木糖能够高效利 用<sup>[12]</sup>,为木质纤维素的生物转化提供了基础。但 木质纤维素的预处理和葡萄糖等碳源在发酵过 程中会产生乙酸、糠醛等副产物<sup>[37-38]</sup>,这些化合 物会对菌株的生长造成不良的影响。树干毕赤酵 母还存在着发酵周期长,发酵过程中对氧气的需 求较为严格等缺点,增加了发酵过程的复杂性。

本研究的白藜芦醇产量仍低于解脂耶氏酵母、酿酒酵母等宿主中的最高水平,未来的研究还可以参考以下策略:(1) *ARO* 基因编码的 DAHP 合成酶受到 L-Phe 的反馈抑制,可以参考酿酒酵母中 ARO3 突变位点<sup>[39]</sup>,构建 SsARO3 突变体并将其过表达,以此消除 L-Phe 的反馈抑制。(2) 增强丙酮酸脱氢酶旁路的碳通量,增强乙酰辅酶 A 的供应<sup>[40]</sup>。乙醛是产生乙醇和乙酰辅酶 A 的代谢分支点,可以通过过表达乙醛脱氢酶(acetaldehyde

dehydrogenase, ALD6), 使乙醛更多地转化为乙酸盐, 同时,可以通过过表达来源于沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)的乙酰辅酶 A 合成酶突变体 SeACS<sup>L641P</sup>, 增强乙酸盐转化为乙酰辅酶 A 的效率。(3) 引入磷酸酮醇酶(phosphoketolase, FPK)/ 磷酸转移酶(phosphotransacetylase, PTA)途径<sup>[17]</sup>, FPK 将果糖-6-磷酸和木酮糖-5-磷酸转化为乙 酰磷酸和 E4P, PTA 催化乙酰磷酸转化为乙酰 辅酶 A, 突破莽草酸上游途径的瓶颈, 促进白 藜芦醇的合成。

#### 表 4 不同微生物生产白藜芦醇

TC 1 1 4	D 1 /	<u> </u>	1 1	1.00	•	•
	Uno du otron	ot montromotion	1 6 7 7	dittoront	100101000	D COLO 1 CLOSO C
Tame 4	PIOUICIION	or resverance	1 111/	annerem	1111111111111111	roanteine
	riouuçuon	or resverano	101	uniterent	moroo	'i zamomo
			2			0

Strains	Precursor/scale	Genetic modifications	Titer	References
<i>Eescherichia coli</i> C41(DE3)	Glucose/flask	SeTAL, Sco4CL, AhSTS	5.2 mg/L	[31]
E. coli BL21(DE3)	Glucose/flask	<i>TcTAL</i> , <i>Pc4CL</i> , <i>VvSTS</i> , <i>RtmatB</i> , <i>RtmatC</i> ; Overexpression of <i>tyrA</i> <sup>fbr</sup> and aroG <sup>fbr</sup> ; Down-regulation of fabD, fabH, fabB, fabF, fabI	304.5 mg/L	[32]
Saccharomyces cerevisiae W303-1A	Tyrosine/flask	<i>RtPAL, At4CL, AhSTS</i> ; Overexpression of <i>ACC1</i>	5.8 mg/L	[33]
S. cerevisiae ST4990	Glucose/ bioreactor	AtPAL, AtC4H, At4CL, VvSTS, SeACS, AtATR2; Overexpression of $ARO4^{fbr}$ , $ARO7^{fbr}$ , CYB5 and ACC1; $\Delta aro10$	812.0 mg/L	[16]
S. cerevisiae BRT10	Glucose/ bioreactor	<i>RtPAL/TAL</i> , <i>AtC4H</i> , <i>Pc4CL</i> , <i>VvSTS</i> , <i>AtCPR1</i> , <i>EcaroL</i> ; Overexpression of $ARO4^{K229L}$ , $ARO7^{G141S}$ , <i>ScARO2</i> and $ScACC1^{S659A/S1157A}$ ; $\Delta pdc6$	4.1 g/L	[34]
Yarrowia lipolytica T2P2	Glycerol/ bioreactor	2 copies integration of ( <i>FjTAL</i> , <i>VvPAL</i> , <i>AtC4H</i> , <i>At4CL1</i> , and <i>VvSTS</i> )	430.0 mg/L	[35]
Y. lipolytica ST890	Glucose/ bioreactor	<i>FjTAL</i> , <i>Pc4CL1</i> , <i>VvSTS</i> , <i>AtPAL</i> , <i>AtC4H</i> , <i>CaFPK</i> , <i>BsPTA</i> , multi-copy integration ( <i>Pc4CL1-VvSTS</i> fusion); Overexpression of <i>YlARO1</i> , <i>YlARO3<sup>K225L</sup></i> , <i>YlARO4<sup>K221L</sup></i> and <i>YlARO7<sup>G139S</sup></i> ; Δ <i>dga1</i>	22.5 g/L	[17]
Ogataea polymorpha	Tyrosine/flask	multi-copy integration (HaTAL1, At4CL2 and VvSTS)	97.2 mg/L	[36]
Scheffersomyces	Glucose/flask	HaTAL1, At4CL2 and VvSTS; Overexpression of	237.6 mg/L	[15]
<i>stipitis</i> Ss-T4V-aro7m	Molasses/flask	SsAR07 <sup>G139S</sup>	1 076.0 mg/L	[37]
S. stipitis Ss17	Glucose/ bioreactor	2 copies integration of ( <i>HaTAL1</i> , <i>At4CL2</i> and <i>VvSTS</i> ), <i>AtPAL2</i> , <i>AtC4H</i> , <i>AtATR2</i> ; Overexpression of <i>SsARO4<sup>K221L</sup></i> , <i>SsARO7<sup>G139S</sup></i> , <i>SsCYB5</i> and <i>SsACC1<sup>S650A,S1152A</sup></i> . <i>Andc1</i>	558.4 mg/L	This study

Se: Saccharothrix espanaensis; Sco: Streptomyces coelicolor; Ah: Arachis hypogasa; Tc: Trichosporon cutaneum; Pc: Petroselinum crispum; RtmatB, RtmatC: Two malonate assimilation genes from Rhizobium trifolii; RtPAL: PAL from Rhodosporidium toruloides; SeACS: Acetyl-CoA synthase from Salmonella enterica; ScARO10: Transaminated amino acid decarboxylase; CPR1: Cytochrome P450 reductase; Fj: Flavobacterium johnsoniae; Ca: Clostridium acetobutylicum; Bs: Bacillus subtilis; ScARO2: Chorismate synthase; YlARO1: Pentafunctional AROM polypeptide; YlARO3: DAHP synthase; YlDGA1: Diacylglycerol O-acyltransferase 1.

# 作者贡献声明

颜丙扬:方案设计、实验操作、初稿写作; 韩禹梅:方案设计、稿件润色修改;李伟国:提 供材料、数据管理;隋玉鑫:实验操作、数据管 理;乔建军:经费支持、提供材料;赵广荣:监 督指导、稿件润色修改。

# 作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告 工作的已知经济利益或个人关系。

#### REFERENCES

- HOU CY, TAIN YL, YU HR, HUANG LT. The effects of resveratrol in the treatment of metabolic syndrome[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3): 535.
- [2] LANGCAKE P, PRYCE RJ. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury[J]. Physiological Plant Pathology, 1976, 9(1): 77-86.
- [3] LV X, CONG ZX, LIU ZH, MA XD, XU M, TIAN Y, ZHANG XY, XU BQ, ZHANG JB, TANG ZY. Improvement of the solubility, photostability, antioxidant activity and UVB photoprotection of trans-resveratrol by essential oil based microemulsions for topical application[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2018, 48: 346-354.
- [4] PANDEY KB, RIZVI SI. Role of red grape polyphenols as antidiabetic agents[J]. Integrative Medicine Research, 2014, 3(3): 119-125.
- [5] PANNU N, BHATNAGAR A. Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 109: 2237-2251.
- [6] HARIKUMAR KB, AGGARWAL BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases[J]. Cell Cycle, 2008, 7(8): 1020-1035.
- [7] CRAVENS A, PAYNE J, SMOLKE CD. Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 2142.
- [8] NIELSEN J, KEASLING JD. Engineering cellular metabolism[J]. Cell, 2016, 164(6): 1185-1197.
- [9] SPARVOLI F, MARTIN C, SCIENZA A, GAVAZZI G, TONELLI C. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.)[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 24(5): 743-755.
- [10] WINKEL-SHIRLEY B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology[J]. Plant Physiology, 2001, 126(2): 485-493.
- [11] HE SL, ZHENG JG, LIN M, WANG YH. Advances of biological function, regulatory mechanism of

biosynthesis and genetic engineering of stilbenes in plant[J]. Agric Biotechnol, 2004, 12(1): 102-108.

- [12] JEFFRIES TW, GRIGORIEV IV, GRIMWOOD J, LAPLAZA JM, AERTS A, SALAMOV A, SCHMUTZ J, LINDQUIST E, DEHAL P, SHAPIRO H, JIN YS, PASSOTH V, RICHARDSON PM. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(3): 319-326.
- [13] CAO MF, GAO MR, LOPEZ-GARCIA CL, WU YT, SEETHARAM AS, SEVERIN AJ, SHAO ZY. Centromeric DNA facilitates nonconventional yeast genetic engineering[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(8): 1545-1553.
- [14] GAO MR, CAO MF, SUÁSTEGUI M, WALKER J, RODRIGUEZ QUIROZ N, WU YT, TRIBBY D, OKERLUND A, STANLEY L, SHANKS JV, SHAO ZY. Innovating a nonconventional yeast platform for producing shikimate as the building block of high-value aromatics[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(1): 29-38.
- [15] KOBAYASHI Y, INOKUMA K, MATSUDA M, KONDO A, HASUNUMA T. Resveratrol production from several types of saccharide sources by a recombinant *Scheffersomyces stipitis* strain[J]. Metabolic Engineering Communications, 2021, 13: e00188.
- [16] LI MJ, SCHNEIDER K, KRISTENSEN M, BORODINA I, NIELSEN J. Engineering yeast for high-level production of stilbenoid antioxidants[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 36827.
- [17] LIU MS, WANG C, REN XF, GAO S, YU SQ, ZHOU JW. Remodelling metabolism for high-level resveratrol production in *Yarrowia lipolytica*[J]. Bioresource Technology, 2022, 365: 128178.
- [18] PAPON N, COURDAVAULT V, CLASTRE M. Biotechnological potential of the fungal CTG clade species in the synthetic biology era[J]. Trends in Biotechnology, 2014, 32(4): 167-168.
- [19] LAPLAZA JM, TORRES BR, JIN YS, JEFFRIES TW. Sh ble and Cre adapted for functional genomics and metabolic engineering of *Pichia stipitis*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(6): 741-747.
- [20] SHAO ZY, ZHAO H, ZHAO HM. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(2): e16.
- [21] PLOESSL D, ZHAO YX, CAO MF, GHOSH S, LOPEZ C, SAYADI M, CHUDALAYANDI S, SEVERIN A, HUANG L, GUSTAFSON M, SHAO ZY. A repackaged CRISPR platform increases homology-directed repair for yeast engineering[J]. Nature Chemical Biology, 2022, 18(1): 38-46.
- [22] THOMPSON JR, REGISTER E, CUROTTO J, KURTZ M, KELLY R. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation[J]. Yeast, 1998, 14(6): 565-571.
- [23] GUENGERICH FP, GILLAM EMJ, OHMORI S, SANDHU P, BRAIN WR, SARI MA, IWASAKI M. Expression of human cytochrome P450 enzymes in yeast and bacteria and relevance to studies on catalytic specificity[J]. Toxicology, 1993, 82(1/2/3): 21-37.
- [24] URLACHER VB, LUTZ-WAHL S, SCHMID RD.

Microbial P450 enzymes in biotechnology[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(3): 317-325.

- [25] AVERESCH NJH, KRÖMER JO. Metabolic engineering of the shikimate pathway for production of aromatics and derived compounds-present and future strain construction strategies[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2018, 6: 32.
- [26] KOOPMAN F, BEEKWILDER J, CRIMI B, van HOUWELINGEN A, HALL RD, BOSCH D, van MARIS AJA, PRONK JT, DARAN JM. *De novo* production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 155.
- [27] LI MJ, KILDEGAARD KR, CHEN Y, RODRIGUEZ A, BORODINA I, NIELSEN J. *De novo* production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2015, 32: 1-11.
- [28] RODRIGUEZ A, KILDEGAARD KR, LI MJ, BORODINA I, NIELSEN J. Establishment of a yeast platform strain for production of p-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 181-188.
- [29] LI SY, ZHANG QY, WANG J, LIU YL, ZHAO YY, DENG Y. Recent progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of malonyl-CoA derivatives[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 325: 83-90.
- [30] SHI SB, CHEN Y, SIEWERS V, NIELSEN J. Improving production of malonyl coenzyme A-derived metabolites by abolishing Snf1-dependent regulation of Acc1[J]. mBio, 2014, 5(3): e01130-14.
- [31] KANG SY, LEE JK, CHOI O, KIM CY, JANG JH, HWANG BY, HONG YS. Biosynthesis of methylated resveratrol analogs through the construction of an artificial biosynthetic pathway in *E. coli*[J]. BMC Biotechnology, 2014, 14: 67.
- [32] WU JJ, ZHOU P, ZHANG X, DONG MS. Efficient *de* novo synthesis of resveratrol by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(7): 1083-1095.

- [33] SHIN SY, JUNG SM, KIM MD, HAN NS, SEO JH. Production of resveratrol from tyrosine in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(4): 211-216.
- [34] MENG LJ, DIAO MX, WANG QY, PENG LY, LI JX, XIE NZ. Efficient biosynthesis of resveratrol via combining phenylalanine and tyrosine pathways in Saccharomyces cerevisiae[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 46.
- [35] HE Q, SZCZEPAŃSKA P, YUZBASHEV T, LAZAR Z, LEDESMA-AMARO R. *De novo* production of resveratrol from glycerol by engineering different metabolic pathways in *Yarrowia lipolytica*[J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 11: e00146.
- [36] WANG LY, DENG AH, ZHANG Y, LIU SW, LIANG Y, BAI H, CUI D, QIU QD, SHANG XL, YANG Z, HE XP, WEN TY. Efficient CRISPR-Cas9 mediated multiplex genome editing in yeasts[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 277.
- [37] KOBAYASHI Y, INOKUMA K, MATSUDA M, KONDO A, HASUNUMA T. Resveratrol production of a recombinant *Scheffersomyces stipitis* strain from molasses[J]. Biotechnology Notes, 2022, 3: 1-7.
- [38] SAUCEDO-GUTIERREZ JJ, ESCAMILLA-GARCÍA M, AMARO-REYES A, CARRILLO-GARMENDIA A, MADRIGAL-PÉREZ LA, REGALADO-GONZÁLEZ C, GRANADOS-ARVIZU JÁ. Differential impacts of furfural and acetic acid on the bioenergetics and fermentation performance of *Scheffersomyces stipitis*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2024, 174: 103914.
- [39] LIU HY, XIAO QJ, WU XX, MA H, LI J, GUO XF, LIU ZY, ZHANG Y, LUO YZ. Mechanistic investigation of a D to N mutation in DAHP synthase that dictates carbon flux into the shikimate pathway in yeast[J]. Communications Chemistry, 2023, 6(1): 152.
- [40] SHIBA Y, PARADISE EM, KIRBY J, RO DK, KEASLING JD. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids[J]. Metabolic Engineering, 2007, 9(2): 160-168.