

· 合成生物技术 ·

水飞蓟来源黄酮3-羟化酶鉴定及黄杉素发酵优化

高松^{1,2}, 周景文^{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

高松, 周景文, 陈坚. 水飞蓟来源黄酮3-羟化酶鉴定及黄杉素发酵优化. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2838–2849.

Gao S, Zhou JW, Chen J. Identification of flavonoids 3-hydroxylase from [*Silybum marianum* (L.) Gaertn] and its application in enhanced production of taxifolin. Chin J Biotech, 2020, 36(12): 2838–2849.

摘要: 黄杉素是一种重要的黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化等功效, 在医药及保健品行业有着广泛的应用。黄酮3-羟化酶(Flavone 3-hydroxylase, F3H)可以催化圣草酚合成黄杉素等3位羟基化的黄酮类化合物。一直以来, 由于黄酮3-羟化酶催化效率低, 使得利用微生物法合成黄杉素等多种3位羟基化黄酮的产量较低。文中从水飞蓟转录组中鉴定得到一个黄酮3-羟化酶SmF3H。发酵验证结果表明, SmF3H具有黄酮3位羟基化功能, 且催化效率显著高于常用的来源于番茄(*Solanum lycopersicum*)的SIF3H。选取6个转录强度不同的启动子优化从黄酮前体柚皮素到黄杉素的合成途径, 发现P_{GAL7}启动子起始转录SmF3H时黄杉素合成产量最高, 在摇瓶中产量达到695.90 mg/L; 在5-L发酵罐上进行发酵优化, 以柚皮素为底物发酵得到3.54 g/L黄杉素, 是目前可见报道的最高产量。

关键词: 黄酮3-羟化酶, 黄杉素, 圣草酚, 柚皮素, 酿酒酵母

Identification of flavonoids 3-hydroxylase from [*Silybum marianum* (L.) Gaertn] and its application in enhanced production of taxifolin

Song Gao^{1,2}, Jingwen Zhou^{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: (2S)-taxifolin is an important flavonoid that has anti-inflammatory and anti-oxidation effects. It is widely used in pharmaceutical and nutraceutical industries. Flavone 3-hydroxylase (F3H) can catalyze the synthesis of (2S)-taxifolin and other 3-hydroxylated flavonoids from (2S)-eriodictyol. Due to the low catalytic efficiency of F3H, the titer of many 3-hydroxyflavones, such as taxifolin, synthesized by microbial method is relatively low. In this study, a SmF3H was identified

Received: March 31, 2020; **Accepted:** May 26, 2020

Supported by: National Science Fund for Excellent Young Scholars (No. 21822806), National Natural Science Foundation of China (No. 31770097).

Corresponding author: Jian Chen. Tel: +86-510-85913660; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn
国家自然科学基金优秀青年基金 (No. 21822806), 国家自然科学基金 (No. 31770097) 资助。

from the transcriptome of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. The results of fermentation showed that *SmF3H* can catalyze the flavone 3'-hydroxylation reaction, and its catalytic efficiency was significantly higher than that of commonly used *SIF3H* from *Solanum lycopersicum*. Six promoters with different transcription strength were selected to optimize the synthesis pathway from the flavonoid precursor (2*S*)-naringenin to (2*S*)-taxifolin. The results showed that the highest titer of (2*S*)-taxifolin (695.90 mg/L in shake flask) could be obtained when the P_{GAL7} promoter was used to control the expression of *SmF3H*. The titer of (2*S*)-taxifolin was further improved to 3.54 g/L in a 5-L fermenter, which is the highest titer according to current available literatures.

Keywords: flavanone 3'-hydroxylase, taxifolin, eriodictyol, naringenin, *Saccharomyces cerevisiae*

黄杉素 ((2*S*)-taxifolin), 又名二氢槲皮素 (Dihydroquercetin), 最早由日本学者自花旗松中分离并鉴定^[1], 是一种重要的黄酮类化合物。黄杉素结构中含有多个酚羟基, 具有强抗氧化性^[2], 可以高效清除各种自由基。黄杉素具有多种重要的生理活性, 如保护肝脏^[3]、抗肾脏纤维化^[4]、抗肥胖^[5]、抗炎^[6]、抗肿瘤^[7]、治疗牛皮癣^[8]等, 被广泛应用于多种保护肝脏和治疗心血管疾病的药品中^[9]。此外, 黄杉素也是多种具有重要价值的黄酮类化合物的前体, 如二氢杨梅素 (Dihydromyricetin)、花青素 (Anthocyanins)^[10] 和黄酮木质素 (Flavonolignans)^[11]等。

目前黄杉素主要来源是从花旗松、落叶松等原生于俄罗斯和加拿大的植物中提取^[12]。植物提取法受季节性和产地影响较大, 存在效率较低、价格昂贵、产量难以满足市场需求等问题。采用微生物法生产黄杉素等黄酮类化合物, 不受季节影响, 对生长环境要求低, 且有利于质量控制。此外, 微生物还具有生长迅速、环境污染小、生产强度大、绿色环保等优势^[13]。利用微生物已经实现了多种高附加值植物天然产物的高水平积累, 如青蒿酸产量达到 25 g/L^[14]、番茄红素产量达到 3.2 g/L、 β -胡萝卜素产量达到 6 g/L^[15]。由于上述优势, 微生物法合成植物天然产物受到了广泛关注。酿酒酵母千百年来被广泛应用于食品行业, 具有高度的食品安全特性, 容易被消费者接受。同时, 酿酒酵母遗传背景清晰^[16]、基因操作工具完善^[17], 作为微生物法合成天然化合物的底盘细胞具有巨大潜力。

柚皮素经过黄酮 3'-羟化酶 (Flavanone 3'-hydroxylase, F3'H) 及其辅酶 P450 还原酶 (Cytochrome P450 reductase, CPR) 的催化可以合成圣草酚, 圣草酚进一步经过 F3H 的催化可以得到黄杉素 (图 1)。由于已经报道的 F3H 催化效率普遍较低, 目前微生物法合成黄杉素等 3 位羟基化黄酮的产量提升受到限制^[18], 在酿酒酵母和解脂亚洛酵母 *Yarrowia lipolytica* 中的最高产量仅为 336.8 mg/L^[19]和 110.5 mg/L^[20]。以儿茶素为前体, 使用嗜氧伯克霍尔德菌 *Burkholderia oxyphila* (OX-01) 全细胞经过两步催化生产黄杉素, 产量仅为 20 mg/L^[21-22]。黄杉素的低积累量也严重限制了其下游化合物的高效积累。如水飞蓟宾是典

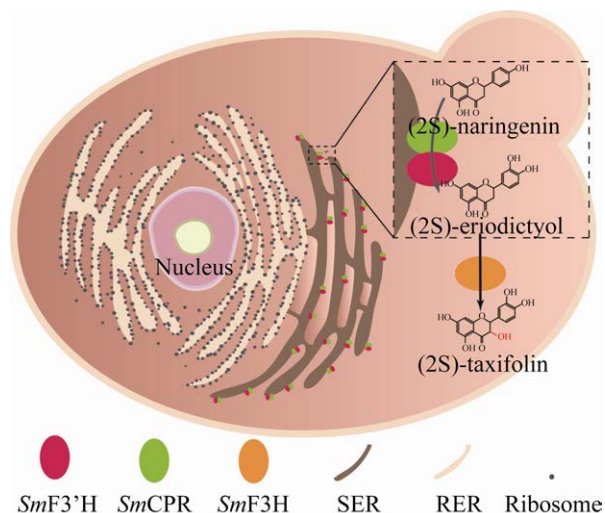


图 1 从柚皮素开始合成黄杉素路径示意图
Fig. 1 Biosynthesis pathway of (2*S*)-taxifolin from (2*S*)-naringenin. SER: smooth endoplasmic reticulum; RER: rough endoplasmic reticulum.

型的黄酮木脂素, 由一分子黄杉素和一分子松柏醇 (Coniferyl alcohol) 耦合而成, 具有保肝护肝等功效^[23]。虽然微生物法合成松柏醇的产量高达 22.9 g/L^[24], 但是由于黄杉素产量仅数百毫克, 使得微生物法合成水飞蓟宾难以实现产业化应用^[11]。因此, 获得高活性的 F3H 是获得黄杉素高产菌株的关键。

黄杉素是水飞蓟宾合成的前体之一, 因此我们推测在水飞蓟中必定存在催化柚皮素合成黄杉素的基因。实验室在前期研究中获得了水飞蓟不同组织的 RNA-seq 数据, 并成功进行拼接^[25]。本研究以已知功能的 F3H 的氨基酸序列为模板, 通过 tBLASTN, 从水飞蓟 RNA-seq 数据库中获得潜在的同源基因, 通过逆转录获得 DNA 序列, 并在酿酒酵母中发酵验证其功能。以柚皮素为底物进行催化反应, 通过与已知来源的常用 SIF3H 比较, 证明来自于水飞蓟的 SmF3H 具有更高的催化效率。在验证 SmF3H 的功能后, 使用不同转录强度的启动子优化 SmF3H 表达, 获得最佳启动子组合。将获得的最佳菌株在 5 L 发酵罐水平进行发酵优化, 以柚皮素为前体最终黄杉素产量达到 3.54 g/L, 是已知报道的最高产量。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株、质粒和试剂: 大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 用于分子克隆。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* C800 (CEN.PK2-1D; MAT α ; *ura3-52*; *leu2-3,112*; *trp1-289*; *his3 Δ 1*; *MAL2-8^C*; *SUC2*; *gal80::KanMX*)^[26] 用于表达黄酮合成相关基因。包含 SmF3'H 和 SmCPR 表达框的质粒 pY26-THGR、pY26-P05mut12、pUC57-SIF3H 和 pMD-T-GAL7 为本实验室保存^[27]。(2S)-黄杉素、(2S)-圣草酚、(2S)-柚皮素标准品购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 公司。限制性内切酶购自 Thermo 公司。高保真 DNA 聚合酶购自南京诺唯赞生物科技有限

公司。RNA 提取试剂盒 Plant RNA Extraction kits 购自 QIAGEN 公司。Oligo(dT)₁₈ 引物和逆转录酶 M-MuLV 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。其他试剂购自上海国药集团。

1.2 培养基

LB 培养基 (Luria Broth): 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L; YPD 培养基: 蛋白胨 20 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L。10 \times YNB 培养基: 酵母氮源 (无氨基酸和硫酸铵) 17.4 g/L, 硫酸铵 50 g/L, 过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存。10 \times 葡萄糖培养基: 200 g/L 葡萄糖, 高温高压灭菌, 备用。1 \times YNB: 100 mL 10 \times YNB 培养基, 100 mL 10 \times 葡萄糖培养基, 加水定容至 1 L。如有需要可添加 1% 氨基酸母液。氨基酸母液: 5 g/L 各种氨基酸, 溶解在水中, 加热或超声助溶, 待完全溶解后过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存。固体培养基添加 2% 的琼脂。

流加培养基 A: (2S)-柚皮素溶解在乙醇中, 终浓度为 50 g/L, 过滤除菌后保存备用。流加培养基 B 根据之前报道进行优化^[14], 含量分别为: 葡萄糖 400 g/L, KH₂PO₄ 18 g/L, MgSO₄·7H₂O 10.24 g/L, K₂SO₄ 7 g/L, Na₂SO₄ 0.56 g/L, 金属盐母液 20 mL/L, 维生素母液 24 mL/L, 亮氨酸、色氨酸、组氨酸各 1 g/L。金属盐母液含量分别为: ZnSO₄·7H₂O 5.75 g/L, MnCl₂·4H₂O 0.32 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.47 g/L, NaMoO₄·2H₂O 0.48 g/L, CaCl₂·2H₂O 2.9 g/L, FeSO₄·7H₂O 2.8 g/L, 80 mL 的 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)。维生素母液含量分别为: 生物素 0.05 g/L, 泛酸钙 1 g/L, 烟酸 1 g/L, myo-肌醇 25 g/L, 盐酸硫胺 1 g/L, 盐酸吡哆醛 HCl 1 g/L, *p*-氨基苯甲酸 0.02 g/L。

1.3 水飞蓟来源黄酮 3-羟化酶的预测

以来源于拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 AtF3H (GenBank 登录号: AEE78767.1, NCBI 蛋白质登录号 GI (Geninfo identifier): 332645246, 358 aa) 的氨基酸序列作为模板, 经 TBLASTN (TBLASTN

2.2.31+)^[28]从水飞蓟转录组中预测获得了一个评分最高的序列 Contig68823, 长度为 1 321 bp, 在各组织中的 FPKM (Fragments per kilobase per million) 值^[29]结果见表 1。

1.4 扩增和鉴定 *SmF3H*

水飞蓟种子由吉林农业大学杨世海教授赠送。FPKM 的值可以反映 RNA 的丰度, 由于 Contig68823 在花蕊中的 FPKM 值较高, 因此从花蕊中提取总 RNA。剪下盛花期的水飞蓟花朵, 置于液氮中速冻后取出, 剪下花蕊置于焦碳酸二乙酯 (Diethyl pyrocarbonate, DEPC) 处理后, 于 -20 °C 过夜的研钵中, 快速研磨成粉末。快速取约 50 μL 粉末至 1.5 mL 离心管中, 按照植物 RNA 提取试剂盒说明书提取出总 RNA。按照逆转录酶说明书逆转录水飞蓟 mRNA 获得 cDNA 库。

使用引物 F3H-F/F3H-R 扩增 Contig68823, 获得的基因命名为 *SmF3H*。将扩增得到的序列插入到 T 载体中, 得到 pMD-T-*SmF3H*。以 pMD-T-*SmF3H*、pMD-T-GAL7 和 T 载体为模板分别扩增, 将 PCR 产物经 Gibson 组装后获得 pMD-G7*SmF3H*、pMD-G7SIF3H。使用 *BsiW I*/*Pac I* 对 pMD-G7*SmF3H* 和 pMD-G7SIF3H 进行双酶切, 将得到的片段分别连接到 pY26-THGR 的 *BsiW I*/*Pac I* 酶切位点, 依次获得 pY26-THGRGF 和 pY26-THGRGF2。将 pY26-THGRGF/pY26-THGRGF2 转化至菌株 C800 中, 得到菌株 C800THGRGF 和 C800THGRGF2。

表 1 在水飞蓟不同组织中 Contig68823 的 FPKM 值
Table 1 The FPKM of Contig68823 in different tissues of *Silybum marianum*

UniGene name	Contig68823
Embryo	0.25
Flower	940.34
Leaf	7.11
Root	0.12
Seed coat	24.00
Stem	40.18

将菌株进行发酵验证, 以柚皮素为底物, 检测黄杉素的产量。本节所用菌株和质粒见表 2。

1.5 基于启动子优化基因表达水平

在实验室保存的高产圣草酚的质粒 pY26-P05mut12 基础上, 融合 *SmF3H* 表达框, *SmF3H* 由不同启动子起始转录。首先在 T 载体上构建 *SmF3H* 与不同启动子融合的表达框, 经过 Gibson 组装获得 pMD-P1*SmF3H*、pMD-P2*SmF3H*、pMD-P3*SmF3H*、pMD-P4*SmF3H*、pMD-P5*SmF3H* 和 pMD-P6*SmF3H*。依次扩增上述 6 个质粒中 *SmF3H* 的表达框并与线性化的 pY26-P05mut12 经 Gibson 组装依次获得 pY26-P5m1、pY26-P5m2、pY26-P5m3、pY26-P5m4、pY26-P5m5 和 pY26-P5m6。测序正确后将上述 6 个质粒转化至菌株 C800 中, 得到菌株 C800P5m1–C800P5m6。将启动子优化的 6 株菌进行发酵, 检测最佳启动子组合。本实验所有引物在表 3 中列出。

1.6 培养条件

菌株 C800THGRGF 和 C800THGRGF2 在 250 mL 摇瓶中的发酵条件为: 挑取至少 10 个单菌落接种在含有 20 mL YNB+LEU+HIS+TRP 液体培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、220 r/min 培养 16–18 h, 获得种子培养基。将种子培养基以 2% (V/V) 转接到含有 20 mL 新鲜 YNB+LEU+HIS+TRP 液体培养基的 250 mL 摇瓶中, 培养基中含有 250 mg/L 柚皮素, 30 °C、220 r/min 培养 72 h 后检测黄杉素及中间产物圣草酚的产量。如有添加碳酸钙, 则其浓度为 10 g/L。

菌株 C800P5m1–C800P5m6 在 250 mL 摇瓶中发酵条件: 种子培养基同菌株 C800THGRGF, 将种子培养基以 2% (V/V) 转接到含有 20 mL 新鲜 YPD 液体培养基的 250 mL 摇瓶中, 在第 0、12、24、36 h 时, 分别向培养基中添加 250 mg/L 柚皮素。30 °C、220 r/min 培养 72 h 后, 检测黄杉素和中间产物圣草酚的产量。

表 2 本研究所用质粒和菌株

Table 2 Plasmids and strains used in this section

Plasmids or strains	Characteristics
C800	CEN.PK2-1D; <i>MATα</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-289</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>MAL2-8C</i> ; <i>SUC2</i> ; <i>gal80::KanMX</i>
pMD-T-SmF3H	<i>SmF3H</i>
pUC57-SIF3H	<i>SIF3H</i>
pMD-T-PGAL7	<i>P_{GAL7}</i>
pMD-G7SmF3H	pMD- <i>BsiWI</i> - <i>P_{GAL7}</i> - <i>SmF3H</i> - <i>PacI</i>
pMD-G7SIF3H	pMD- <i>BsiWI</i> - <i>P_{GAL7}</i> - <i>SIF3H</i> - <i>PacI</i>
pY26-THGR	pY26- <i>P_{TEF1}</i> - <i>SmCPR</i> - <i>P_{GPD1}</i> - <i>SmF3'</i> H
pY26-P05mut12	pY26- <i>P_{INO1}</i> - <i>SmF3'</i> H ^{D285N} - <i>P_{TDH1}</i> - <i>SmCPR</i> ^{I453V}
pY26-THGRGF	pY26- <i>P_{TEF1}</i> - <i>SmCPR</i> - <i>P_{GPD1}</i> - <i>SmF3'</i> H- <i>P_{GAL7}</i> - <i>SmF3H</i>
pY26-THGRGF2	pY26- <i>P_{TEF1}</i> - <i>SmCPR</i> - <i>P_{GPD1}</i> - <i>SmF3'</i> H- <i>P_{GAL7}</i> - <i>SIF3H</i>
C800THGRGF	C800; pY26-THGR
C800THGRGF2	C800; pY26-THGRGF2
pMD-P1SmF3H	<i>P_{PGK1}</i> - <i>SmF3H</i>
pMD-P2SmF3H	<i>P_{TPH1}</i> - <i>SmF3H</i>
pMD-P3SmF3H	<i>P_{ACS2}</i> - <i>SmF3H</i>
pMD-P4SmF3H	<i>P_{GAL7}</i> - <i>SmF3H</i>
pMD-P5SmF3H	<i>P_{LEU2}</i> - <i>SmF3H</i>
pMD-P6SmF3H	<i>P_{ARO7}</i> - <i>SmF3H</i>
pY26-P5m1	pY26- <i>P_{INO1}</i> - <i>SmF3'</i> H ^{D285N} - <i>P_{TDH1}</i> - <i>SmCPR</i> ^{I453V} - <i>P_{PGK1}</i> - <i>SmF3H</i>
pY26-P5m2	pY26- <i>P_{INO1}</i> - <i>SmF3'</i> H ^{D285N} - <i>P_{TDH1}</i> - <i>SmCPR</i> ^{I453V} - <i>P_{TPH1}</i> - <i>SmF3H</i>
pY26-P5m3	pY26- <i>P_{INO1}</i> - <i>SmF3'</i> H ^{D285N} - <i>P_{TDH1}</i> - <i>SmCPR</i> ^{I453V} - <i>P_{ACS2}</i> - <i>SmF3H</i>
pY26-P5m4	pY26- <i>P_{INO1}</i> - <i>SmF3'</i> H ^{D285N} - <i>P_{TDH1}</i> - <i>SmCPR</i> ^{I453V} - <i>P_{GAL7}</i> - <i>SmF3H</i>
pY26-P5m5	pY26- <i>P_{INO1}</i> - <i>SmF3'</i> H ^{D285N} - <i>P_{TDH1}</i> - <i>SmCPR</i> ^{I453V} - <i>P_{LEU2}</i> - <i>SmF3H</i>
pY26-P5m6	pY26- <i>P_{INO1}</i> - <i>SmF3'</i> H ^{D285N} - <i>P_{TDH1}</i> - <i>SmCPR</i> ^{I453V} - <i>P_{ARO7}</i> - <i>SmF3H</i>
C800P5m1	C800; pY26-P5m1
C800P5m2	C800; pY26-P5m2
C800P5m3	C800; pY26-P5m3
C800P5m4	C800; pY26-P5m4
C800P5m5	C800; pY26-P5m5
C800P5m6	C800; pY26-P5m6

最佳菌株 C800P5m4 在 5 L 发酵罐发酵条件优化为：种子培养基同 C800P5m1，按 2% V/V 转接到装有 2.5 L 新鲜 YPD 培养基的 5 L 发酵罐中，在第 0、12 h 时添加 250 mg/L 柚皮素。在葡萄糖浓度为 0 g/L 时（一般在第 12–15 h 之间）开始流加培养基 A 和流加培养基 B，设定流速分别为 2.5 mL/h 和 1.3 mL/h、3.8 mL/h 和 1.9 mL/L、6.3 mL/h 和 3.1 mL/L。根据起始流加时间不同，在第 55 h 左右停止所有培养基流加，添加的柚皮素总量分别为 2.5 g/L、3.5 g/L 和 5.5 g/L。每 3 h 取样检测

*OD*₆₀₀、柚皮素、圣草酚和黄杉素。

1.7 检测条件

取 100 μ L 的发酵液添加 900 μ L 甲醇，涡旋振荡 30 s 混合后，13 500 r/min 离心 5 min，取上清液过滤后备用检测。样品使用安捷伦高效液相检测 (Agilent 1200)，C18 反相色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, Thermo)，柱温 25 $^{\circ}$ C。流动相为甲醇：水 (41 : 59)，流速 1 mL/min，进样量 10 μ L，检测波长为 290 nm。所有菌株经过 3 次生物学平行发酵实验，结果图中显示数值均为 3 次平行实验的平均值。

表 3 本实验中使用的引物序列

Table 3 The primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
F3H-F	ATGCTTGAAAACAGGTTTCGTTTCGCGATGAAG
F3H-R	CTAAGCAAATATATTCTCGATTGG
SmF3H-homo1-F	TCCCTCAAAAATGCTTGAAAACAGGTTTCGTTTCGCGATG
SmF3H-homo1-R	TTTAAATTAACCTAAGCAAATATATTCTCGATTGGCTTC
PGAL7-homo1-F	GATTCGTACGTTTGCCAGCTTACTATCCTTCTTGAAAATATG
PGAL7-homo1-R	TTTCAAGCATTTTTGAGGGAATATTCAACTGTTTTTTTTTATC
pMD-homo1-F	AGTTAATTAATAATCGTTCGAACGGCAGGCGTGCAAAC
pMD-homo1-R	CAAACGTACGAATCTCTGGAAGATCCGCGCGTACCG
SIF3H-homo2-F	TCCCTCAAAAATGGCACCGAGCACCTGACCGCCCTG
SLF3H-homo2-R	GATTTAATTAATTATGCCAGGATTTCTTCAATCGGTTTAC
PGAL7-homo2-F	GATTCGTACGTTTGCCAGCTTACTATCCTTCTTGAAAATATG
PGAL7-homo2-R	TCGGTGCCATTTTTGAGGGAATATTCAACTGTTTTTTTTTATC
pMD-homo2-F	AATTAATTAATAATCGTTCGAACGGCAGGCGTGCAAAC
pMD-homo2-R	CAAACGTACGAATCTCTGGAAGATCCGCGCGTACCG
SmF3H-homo3-F	ATGCTTGAAAACAGGTTTCGTTTCGCGATG
SmF3H-homo3-R	AATCTCTGGAAGATCCGCGCGTACCGAG
PGK1-homo3-F	GCGCGGATCTTCCAGAGATTGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGGAACTATCGC
PGK1-homo3-R	ACGAACCTGTTTTCAAGCATTGTTTTATATTTGTTGTA AAAAGTAGATAATTAC
TPI1-homo3-F	GCGCGGATCTTCCAGAGATTACCCAAATGGACTGATTGTGAGGGAGACCTAAC
TPI1-homo3-R	AACGAACCTGTTTTCAAGCATTTTAGTTTATGTATGTGTTTTTTGTAGTTATAG
ACS2-homo3-F	GCGCGGATCTTCCAGAGATTACCTTCAGTAATGGCGCCATCCTCTCGGGAAAC
ACS2-homo3-R	ACGAACCTGTTTTCAAGCATAATTTATTATTGTATTGATTACTTTCCTG
GAL7-homo3-F	GCGCGGATCTTCCAGAGATTTTTGCCAGCTTACTATCCTTCTTGAAAATATGCA
GAL7-homo3-R	ACGAACCTGTTTTCAAGCATTTTTGAGGGAATATTCAACTGTTTTTTTTTATCATG
LEU2-homo3-F	GCGCGGATCTTCCAGAGATTTCCTGTACTTCCTTGTTTCATGTGTGTTCAAAAACG
LEU2-homo3-R	ACGAACCTGTTTTCAAGCATTAGAAATGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTG
ARO7-homo3-F	GCGCGGATCTTCCAGAGATTGGATTACATTTGATTTCAGTCATACACGAATTATGG
ARO7-homo3-R	ACGAACCTGTTTTCAAGCATACTTATACCAATTTTATGCAGGATGCTGAGTG
PGK1-homo4-F	TGTTTGGTAGGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGGAACTATC
SmF3H-homo4-R	CTCCCGTACGCTAAGCAAATATATTCTCGATTGGCTTC
TPI1-homo4-F	TGTTTGGTAGACCCAAATGGACTGATTGTGAGGGAG
ACS2-homo4-F	TGTTTGGTAGACCTTCAGTAATGGCGCCATCCTCTCGGGAAAC
GAL7-homo4-F	TGTTTGGTAGTTTGCCAGCTTACTATCCTTCTTGAAAATATGC
LEU2-homo4-F	TGTTTGGTAGTCTGACTTCCTTGTTTCATGTGTG
ARO7-homo4-F	GTGATGTTTGGTAGTGGATTACATTTGATTTCAGTCATAC
P51-homo4-F	CCTTACTCACCTACCAAACATCACGGAGGTATCTTCCTGAC
P51-homo4-R	ATTTGCTTAGCGTACGGGAGTCCCTTAATTAACAATTCTTC
P52-homo4-F	GTCCATTTGGGTCTACCAAACATCACGGAGGTATCTTCCTGAC
P53-homo4-F	ATTACTGAAGGTCTACCAAACATCACGGAGGTATCTTCCTGAC
P54-homo4-F	AGCTGGCAAACCTACCAAACATCACGGAGGTATCTTCCTGAC
P55-homo4-F	AAGTACAGGACTACCAAACATCACGGAGGTATCTTCCTGACA
P56-homo4-F	ATGTAATCCACTACCAAACATCACGGAGGTATCTTCCTGAC

2 结果与分析

2.1 *SmF3H* 的序列分析

将 Contig68823 的 DNA 序列分析后发现, 第一个起始密码子 ATG 在第 208 个碱基处, 第一个终止密码子在第 1 030 个碱基处, 中间表达框可以翻译成一段总长度为 274 个氨基酸的蛋白质。

由于大部分已知 F3H 的长度在 364–377 个氨基酸之间: *InF3H* (牵牛花 *Ipomoea nil*, GenBank 登录号: BAA21897.1, GI: 2344781, 366 aa), *RaF3H* (茶藨子 *Ribes album*, GenBank 登录号: ANC98544.1, GI: 1026538506, 365 aa), *PeF3H* (余甘子 *Phyllanthus emblica*, GenBank 登录号: AGT79807.1, GI: 532164777, 364 aa), *HsF3H* (冬青树 *Hololachna songarica*, GenBank 登录号: AEY81365.1, GI: 374082390, 366 aa), *NuF3H* (莲 *Nelumbo nucifera*, GenBank 登录号: AGT56413.1, GI: 531063900, 377 aa), 因此 Contig68823 未拼接完全。继续分析 Contig 的 5'端 1–208 个碱基序列, 发现这段 DNA 序列可以翻译成 69 个连续的氨基酸序列, 并且经过序列比对后发现 69 个氨基酸序列基本与其他 F3H 的 N 端序列同源 (图 2)。将这段 69 个氨基酸序列添加一个蛋氨酸后总表达框可以翻译为长度 344 个氨基酸的蛋白质, 与上述不同来源的 F3H 平均氨基酸长度接近。因此在扩增 Contig68823 时, 在已知 DNA 序列前添加一个起始密码子 ATG, 将此补充后的序列作为一个开放阅读框, 长度为 1 035 bp, 命名为 *SmF3H*。*SmF3H* 的氨基酸序列与其他来源的 F3H 具有较多完全匹配区域 (图 2)。

2.2 *SmF3H* 的催化功能鉴定

菌株 C800THGRGF 和菌株 C800THGRGF2 在 YNB 培养基中发酵, 添加 250 mg/L 的柚皮素为前体。菌株 C800THGRGF 可以合成 (16.69±0.88) mg/L 的黄杉素, 同时积累 (9.85±0.50) mg/L 的圣草酚。

而菌株 C800THGRGF2 可以合成 (6.48±1.00) mg/L 的黄杉素, 无中间产物圣草酚积累。两株菌的柚皮素转化能力较低。经过检测菌株 C800THGRGF 和 C800THGRGF2 菌体 OD_{600} 在 3–4 之间, 较常规培养下 OD_{600} 在 6–8 之间相比, 菌体生长受到明显抑制。经检测发现, 培养基的 pH 在 1.5–2.0 之间, 较常规培养下 pH 在 5–6 之间下降显著。推测由于 pH 较低, 导致了菌体生长和酶活受到抑制^[30], 从而影响了催化效率。因此, 在培养基中添加碳酸钙控制 pH。添加碳酸钙后, 发酵结束时培养基 pH 维持在 4.0–4.5 之间, 菌体生长得到改善, OD_{600} 维持在 5–6 之间。在控制 pH 条件下, 菌株 C800THGRGF 可以合成 (73.38±4.25) mg/L 的黄杉素, 同时积累 (37.33±1.83) mg/L 的圣草酚。菌株 C800THGRGF2 可以合成 (60.68±2.82) mg/L 的黄杉素, 同时积累 (32.02±1.95) mg/L 的圣草酚。底物柚皮素消耗较不控制 pH 时显著提高 (图 3)。经过发酵检验, *SmF3H* 具有黄酮 3-羟化酶作用, 并且 *SmF3H* 较 *SIF3H* 的催化活性更高。

2.3 启动子优化合成黄杉素

选用 6 个不同强度的启动子起始转录 *SmF3H*, 通过检测黄杉素的积累量获得最佳启动子。所选用的 6 个启动子 P_{PGK1} 、 P_{TPII} 、 P_{ACS2} 、 P_{GAL7} 、 P_{LEU2} 、 P_{ARO7} 的转录强度从高到低, 积累的黄杉素依次为 (534.36±68.79) mg/L、(474.98±21.51) mg/L、(361.39±10.46) mg/L、(695.90±3.65) mg/L、(367.00±22.30) mg/L 和 (213.31±10.82) mg/L。中间代谢产物圣草酚积累量依次为 (414.76±14.64) mg/L、(585.68±17.07) mg/L、(569.42±34.74) mg/L、(334.30±5.42) mg/L、(592.58±34.55) mg/L 和 (693.87±25.00) mg/L。前体柚皮素的剩余量依次为 (76.41±4.96) mg/L、(57.94±5.65) mg/L、(108.10±14.10) mg/L、(67.33±16.59) mg/L、(153.00±27.09) mg/L 和 (160.99±53.76) mg/L (图 4)。

<i>NuF3H</i>	maptlvesspaaqprfplptlneektresfvrderpkyayndfndvpvislagl	60
<i>PeF3H</i>	-----mpeattpfllptmsdeatlrasfvrdeeerpkvahdqfddipivslegl	49
<i>HsF3H</i>	-----msptrttltadvaeekslqskfirderpkyaynlfsdeipvislagi	48
<i>SmF3H</i>	-----mlenrfvrderpkyaynnfsneipvislegi	33
<i>RaF3H</i>	-----mapapttlalagetlqssfvrderpkyaynvfssdipvisldri	48
<i>AiF3H</i>	-----mapgtltelagesklnskfvrderpkyaynvfsdeipvislagi	46
<i>InF3H</i>	-----mttltlatalagetarssfvrderpkyaynefsdeipvislkgi	47
<i>SIF3H</i>	-----mapstltalanektletsfirdeeerpkyaynkfsdeipvislqgi	46
	*. *.***:*****.: *.**:*:*:* *	
<i>NuF3H</i>	dsddsrraeivrdaivraceewgvfgvvdhgvdaslvsmtemaaaffklppeeklrfdms	120
<i>PeF3H</i>	v--gkraeickkivdacedwgvfgvvdhgvdpelvtdmtrlareffslppeeklrfdms	107
<i>HsF3H</i>	ddh-skrgeickkivdacedwgvfgvvdhgvdtnlisdmtarnareffalpaeklrfdms	107
<i>SmF3H</i>	ddt--sraeicekivkacedwgvfgvvdhgvdnrliteamtrlateffmmppeeklrfdms	92
<i>RaF3H</i>	de--kskkgeickkiveacenwgvfgvvdhgvdgelvkemtrlarlarkfflppeeklrfdms	107
<i>AiF3H</i>	ddvdgkrgeicrqiveacenwgvfgvvdhgvdtnlvadmtlrdffalppedklrfdms	106
<i>InF3H</i>	ddvlgrrvqirkeivkacedwgvfgvvdhgvdagligemtrlskdfslppeeklrfdms	107
<i>SIF3H</i>	ddvngrrseicerivnacedwgvfgvvdhgvdagqlisqmtklakeffelppeeklrfdms	106
	. : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
<i>NuF3H</i>	ggkrggfivsshllqgeavkdwreivtffsyplagrdisrwpdvppegwraeraeryseelma	180
<i>PeF3H</i>	ggkkggfivsshllqgeavqdwreivtyfspyknrdysrwpdkpegwtavaerysdalmg	167
<i>HsF3H</i>	ggkkggfivsshllqgeavqdwreivtyfspyknrdytrwpdkpeswrkvteeyseunma	167
<i>SmF3H</i>	ggkkggfivsshllqgetvqdwreivtffsyptkardysrwpdkpkewravteeyskvlmg	152
<i>RaF3H</i>	ggkkggfivsshllqgeavqdwreivtyfspyirndrfsrwpdkpeskavteeqyseklms	167
<i>AiF3H</i>	ggkkggfivsshllqgeavqdwreivtyfspyvrndrdsrwpdkpegwkvteeyserlms	166
<i>InF3H</i>	ggkkggfivsshllqgeavkdwreivtyfspyvrardysrwpdkpegwraavtekyseklmd	167
<i>SIF3H</i>	ggkkggfivsshllqgevvdwreivtyfspyirardysrwpdkpegwigvteeqyseklmd	166
	:**.*:***** :**** **::**** * : * * :*.** . : *	
<i>NuF3H</i>	lackllglvseamglpsdalrdacrdmdqkmvnyyppcpqpdltlglkrhtdpgtitll	240
<i>PeF3H</i>	lacrlllglvseamgletealtkacvdmqkmvnyfypkcpqpdltlglkrhtdpgtitll	227
<i>HsF3H</i>	lackllglvseamgletealtkacvdmqklvnyfypkcpqpdltlglkrhtdpgtitll	227
<i>SmF3H</i>	lacklllevseamgletealtkacvdmqkvnyyppkcpqpdltlglkrhtdpgtitll	212
<i>RaF3H</i>	lacklllevseamgletealtkacvdmqkvnyyppkcpqpdltlglkrhtdpgtitll	227
<i>AiF3H</i>	lacklllevseamgletealtkacvdmqkvnyyppkcpqpdltlglkrhtdpgtitll	226
<i>InF3H</i>	lacklllevseamgletealtkacvdmqklvnyfypkcpqpdltlglkrhtdpgtitll	227
<i>SIF3H</i>	lacklllevseamgletealtkacvdmqkvnyfypkcpqpdltlglkrhtdpgtitll	226
	: ***** . : * * . * * : * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
<i>NuF3H</i>	lqdlvqglqatrdggktwitvqpviegafvvnlgdhghylsngrfknadhqavvnansrsl	300
<i>PeF3H</i>	lqdsvqglqatkdggktwitvqpviegafvvnlgdhghylsngrfknadhqavvnanssrsrsl	287
<i>HsF3H</i>	lqdqvqglqatrdggktwitvqpviegafvvnlgdhghylsm-evqndadhqavvnansrsl	286
<i>SmF3H</i>	lqdqvqglqatrdggktwitvqpviegafvvnlgdhghylsngrfknadhqavvnansrsl	272
<i>RaF3H</i>	lqdqvqglqatrdggktwitvqpviegafvvnlgdhghylsngrfknadhqavvnansrsl	287
<i>AiF3H</i>	lqdqvqglqatrdngktwitvqpviegafvvnlgdhghylsngrfknadhqavvnansrsl	286
<i>InF3H</i>	lqdqvqglqatkdggktwitvqpviegafvvnlgdhghylsngrfknadhqavvnansrsl	287
<i>SIF3H</i>	lqdqvqglqatkdngktwitvqpviegafvvnlgdhghylsngrfknadhqavvnansrsl	286
	*** *****:*.*:*****: *****:*** .. *****:.. **:	
<i>NuF3H</i>	siatfqnpdpdaivypkiregeksimdepitfaemykrkmardlelarlkkklakedkse	360
<i>PeF3H</i>	siatfqnpapeavvypkiregeksimdepitfaemykrkmardlelarlkkklakedkse	347
<i>HsF3H</i>	siatfqnpapeatvypkiregeksimdepitfaemykrkmardlelarlkkklakedkse	346
<i>SmF3H</i>	siatfqnpdpdaivypkiregeksimdepitfaemykrkmardlelarlkkklakedkse	330
<i>RaF3H</i>	siatfqnpapeavvypkiregeksimdepitfaemykrkmardlelarlkkklakedkse	347
<i>AiF3H</i>	siatfqnpdpdatvypkiregeksimdepitfaemykrkmardlelarlkkklakedkse	343
<i>InF3H</i>	siatfqnpapeavvypkiregeksimdepitfaemykrkmardlelarlkkklakedkse	347
<i>SIF3H</i>	siatfqnpdpdvypkiregeksimdepitfaemykrkmardlelarlkkklakedkse	346
	*****: * * * * * . : * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
<i>NuF3H</i>	eqv---deiakaksineila	377
<i>PeF3H</i>	dle---kskleskpieeila	364
<i>HsF3H</i>	qqnqdnkdnldskpieqila	366
<i>SmF3H</i>	-----qdlekekpienifa	344
<i>RaF3H</i>	efe--kdklevpkpieqifa	365
<i>AiF3H</i>	----rdhkevdkpvdqifa	358
<i>InF3H</i>	kaa-agdtnletkpidqila	366
<i>SIF3H</i>	t----eeakleskpieeila	362
	. * : * * * *	

图 2 *SmF3H* 与不同来源 *F3H* 序列对比

Fig. 2 The alignment of *SmF3H* and other *F3H*. Peptides in black rectangles were the 69 amino acids in N-terminal; * means exactly matched amino acids.

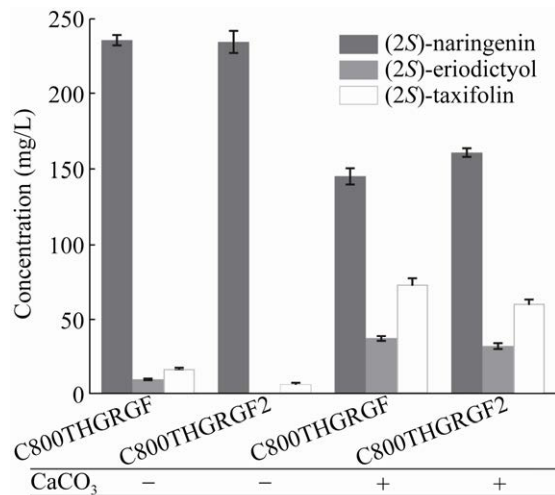


图3 *SmF3H* 的催化能力验证

Fig. 3 The verification of *SmF3H* catalytic ability.

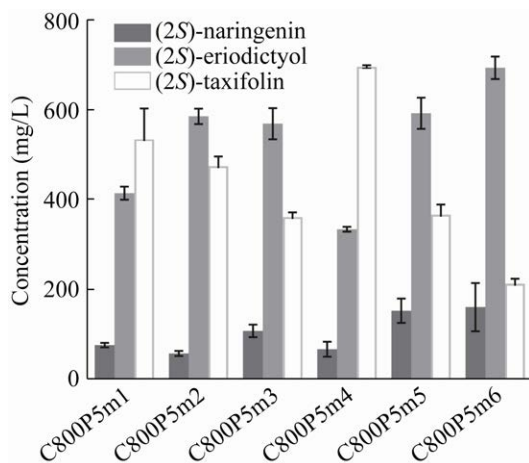


图4 基于启动子优化 *SmF3H* 的表达水平

Fig. 4 Optimize *SmF3H* expression level through promoter adjustment.

总体看来,随着启动子强度的增强,黄杉素的积累也随之增加,但是黄杉素积累量最高时,*SmF3H*是由P_{GAL7}起始转录的。可能是由于P_{GAL7}自带强终止子序列T_{GAL10},影响了上游基因*SmCPR*的终止转录,提高了基因总体的表达强度^[31]。在最强启动子P_{PGK1}起始转录时,发酵结果并不稳定,黄杉素产量波动较大,而由P_{GAL7}起始转录时黄杉素的产量波动小,鲁棒性强。在不同启动子起始转录下,柚皮素的剩余量基本在50–150 mg/L

左右,可见*SmF3H/SmCPR*的表达强度很高,对底物柚皮素的催化能力较强,即使在黄杉素积累最低的菌株C800P5m6中,柚皮素大部分被转化。可见,圣草酚到黄杉素的转化效率是影响柚皮素到黄杉素转化的限制因素。

2.4 在5 L发酵罐水平进行黄杉素发酵优化

最佳菌株C800P5m4在5 L发酵罐水平进行补料速度的优化。当柚皮素流加速度控制在1 mL/(L·h)时,菌株OD₆₀₀最高达到(179.17±4.86),黄杉素的最高产量达到(1.60±0.06) g/L,中间产物圣草酚的积累为(0.32±0.02) g/L,而柚皮素剩余约(0.55±0.04) g/L。黄杉素的摩尔转化率约为57.3% (图5A)。当柚皮素流加速度控制在1.5 mL/(L·h)时,菌株OD₆₀₀最高达到(235.18±4.34),黄杉素的最高产量达到(2.28±0.07) g/L,中间产物圣草酚的积累为(0.92±0.02) g/L,而柚皮素剩余约(0.40±0.03) g/L。黄杉素的摩尔转化率约为58.4% (图5B)。当柚皮素流加速度控制在2.5 mL/(L·h)时,菌株OD₆₀₀最高达到(159.60±2.85),黄杉素的最高产量达到(3.54±0.07) g/L,中间产物圣草酚的积累为(0.30±0.02) g/L,而柚皮素最终剩余约(2.33±0.10) g/L。黄杉素摩尔转化率约为57.6% (图5C)。随着底物流加速度的提高,黄杉素的产量明显提高,但是黄杉素的转化率并未明显提高,维持在60%左右。当底物流加速度提高到2.5 mL/(L·h)时,黄杉素的积累速度明显提高,但是当黄杉素积累超过3.0 g/L后,黄杉素的合成速率显著下降,底物柚皮素则迅速积累,OD₆₀₀较1.5 mL/(L·h)流速时下降32.1%。这表明随着柚皮素及黄杉素浓度增加,菌体生长受到严重抑制。

3 讨论

黄杉素具有重要的生理功能,而且是水飞蓟宾、花青素等复杂黄酮类化合物合成的重要前体。来源和价格问题严重限制了黄杉素及其下游产物的广泛应用。以往的研究表明,F3H是黄杉素合

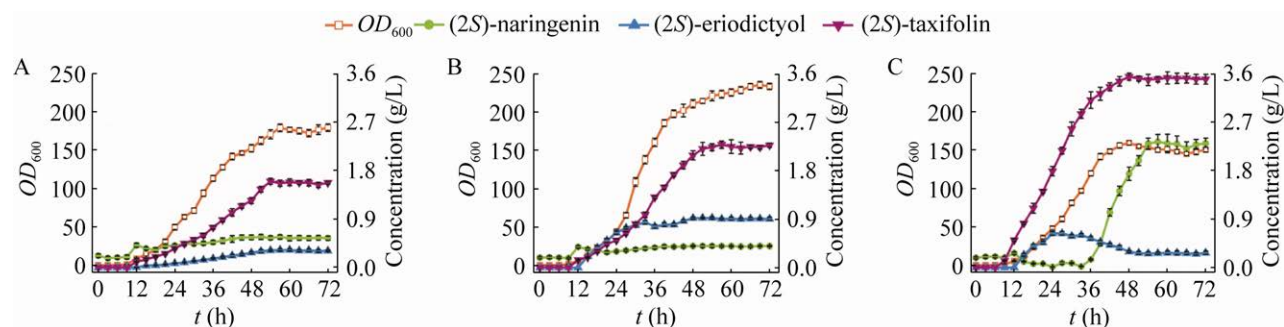


图5 在5 L发酵罐水平优化黄杉素合成

Fig. 5 Optimize taxifolin fermentation in 5 L bioreactor.

成的限速步骤。在本研究中,从水飞蓟中鉴定得到一个催化性能较好的 *SmF3H*,通过启动子工程优化 *SmF3H* 的表达水平,获得了克级别的黄杉素积累,是已知报道最高产量的 10.5 倍^[19]。本研究为高效、经济合成黄杉素及其下游高附加值化合物奠定了良好基础。

微生物法合成化合物的本质是酶催化反应,不同来源的同工酶活性差距较大,高活性的同工酶可以显著提高催化效率。如来源于水蛭的透明质酸酶可以高效催化获得低分子量透明质酸^[32]。在相同催化条件下,本研究获得的 *SmF3H* 催化活性较常用的 *SIF3H* 高 20.93%。在获得高活性 *F3H* 后,本研究采用了 6 个不同转录强度的启动子协调酶的表达水平,使酶的表达水平处在最佳比例,提高产物的积累量。最终通过发酵优化验证了最佳启动子组合,并进一步在 5 L 发酵罐中验证了菌株扩大培养的稳定性,最终得到 3.54 g/L 的产量,是目前可见报道的最高产量。说明了启动子工程策略能有效地在酿酒酵母中优化基因的表达水平^[33-34]。

本研究中作为前体的柚皮素,虽然相对价格依然高昂,但目前酿酒酵母中从头合成柚皮素的最高产量已经达到 898 mg/L^[35]。随着近年来在酿酒酵母中合成柚皮素的机理不断被解析,如有研究多次验证了 *CHS* 是酿酒酵母中合成柚皮素的主要限速步骤^[36]。而柚皮素的另一个限制因素对香豆酸在酿酒酵母中的积累量已经高达 12.5 g/L^[37]。通

过整合上述研究结果,有望大幅度提高黄杉素前体物质柚皮素的产量,将为低成本获得黄杉素及其下游高附加值化合物奠定良好基础。综上所述,酿酒酵母作为合成黄酮类化合物等植物天然产物的底盘生物,具有巨大的开发和应用潜力。

REFERENCES

- [1] Fukui Y, Nakadome K, Ariyoshi H. Studies on the monomer flavonoides of the plants of coniferae. II. Isolation of a new taxifolin glucoside from the leaves of *Chamaecyparis obtusa* Endlicher. *Yakugaku Zasshi*, 1966, 86(3): 184–187.
- [2] Topal F, Nar M, Gocer H, et al. Antioxidant activity of taxifolin: an activity-structure relationship. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31(4): 674–683.
- [3] Chen JJ, Sun X, Xia TT, et al. Pretreatment with dihydroquercetin, a dietary flavonoid, protected against concanavalin A-induced immunological hepatic injury in mice and TNF- α /ActD-induced apoptosis in HepG2 cells. *Food Funct*, 2018, 9(4): 2341–2352.
- [4] Wang W, Ma BL, Xu CG, et al. Dihydroquercetin protects against renal fibrosis by activating the Nrf2 pathway. *Phytomedicine*, 2020, 69: 153185.
- [5] Elsbaey M, Amen Y, Nakagawa T, et al. White poplar: targeted isolation of pancreatic lipase inhibitors. *Ind Crops Prod*, 2019, 141: 111778.
- [6] Jha JC, Banal C, Chow BSM, et al. Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(12): 657–684.
- [7] Hossain MM, Ray SK. EWS knockdown and taxifolin treatment induced differentiation and

- removed DNA methylation from p53 promoter to promote expression of puma and noxa for apoptosis in ewing's sarcoma. *J Cancer Ther*, 2014, 5(12): 1092–1113.
- [8] Yuan XH, Li N, Zhang MM, et al. Taxifolin attenuates IMQ-induced murine psoriasis-like dermatitis by regulating T helper cell responses via Notch1 and JAK2/STAT3 signal pathways. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109747.
- [9] Sunil C, Xu BJ. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry*, 2019, 166: 112066.
- [10] Owens DK, Crosby KC, Runac J, et al. Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis* flavanone 3 β -hydroxylase. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46(10): 833–843.
- [11] Lv YK, Xu S, Lyu YB, et al. Engineering enzymatic cascades for the efficient biotransformation of eugenol and taxifolin to silybin and isosilybin. *Green Chem*, 2019, 21(7): 1660–1667.
- [12] Liu WC, Liu XL, Meng LQ, et al. Research progress of dihydroquercetin. *J Jilin Agric Univ*, 2018, 40(4): 444–448 (in Chinese).
刘文丛, 刘兴龙, 孟令全, 等. 二氢槲皮素的研究进展. *吉林农业大学学报*, 2018, 40(4): 444–448.
- [13] Wang XW, Xiang L, Xu T, et al. Construction and high-density fermentation of alkaline pectate lyase high-yield yeast. *Chin J Biotech*, 2017, 33(12): 2017–2027 (in Chinese).
望潇文, 向腊, 徐婷, 等. 碱性果胶酶高产菌株的构建和高密度发酵. *生物工程学报*, 2017, 33(12): 2017–2027.
- [14] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496(7446): 528–532.
- [15] Ma T, Chen ZL, Huang MJ, et al. Promotion of synthetic microbial technology in carotenoids overproduction. *Biotechnol Business*, 2019, (1): 27–33 (in Chinese).
马田, 陈智莉, 黄敏坚, 等. 合成微生物技术促进类胡萝卜素产品的高效合成. *生物产业技术*, 2019, (1): 27–33.
- [16] Ye C, Xu N, Gao C, et al. Comprehensive understanding of *Saccharomyces cerevisiae* phenotypes with whole-cell model WM_S288C. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(5): 1562–1574.
- [17] 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.
- [18] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KEJ, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330(600): 70–74.
- [19] Yang JZ, Liang JC, Shao L, et al. Green production of silybin and isosilybin by merging metabolic engineering approaches and enzymatic catalysis. *Metab Eng*, 2020, 59: 44–52.
- [20] Lv YK, Marsafari M, Koffas M, et al. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(11): 2514–2523.
- [21] Matsuda M, Otsuka Y, Jin S, et al. Biotransformation of (+)-catechin into taxifolin by a two-step oxidation: primary stage of (+)-catechin metabolism by a novel (+)-catechin-degrading bacteria, *Burkholderia* sp. KTC-1, isolated from tropical peat. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(2): 414–419.
- [22] Otsuka Y, Matsuda M, Sonoki T, et al. Enzymatic activity of cell-free extracts from *Burkholderia oxyphila* OX-01 bio-converts (+)-catechin and (-)-epicatechin to (+)-taxifolin. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80(12): 2473–2479.
- [23] Wu XM, Liu GM, Feng YB, et al. Silybin-derived flavonolignans and their structure-activity relationships: research advances. *Int J Pharm Res*, 2010, 37(3): 187–197 (in Chinese).
巫秀美, 刘光明, 冯玉冰, 等. 水飞蓟宾类黄酮木质素衍生物的研究进展. *国际药学研究杂志*, 2010, 37(3): 187–197.
- [24] Lv YK, Cheng XZ, Wu D, et al. Improving bioconversion of eugenol to coniferyl alcohol by *in situ* eliminating harmful H₂O₂. *Bioresour Technol*, 2018, 267: 578–583.
- [25] Lv YK, Gao S, Xu S, et al. Spatial organization of silybin biosynthesis in milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn]. *Plant J*, 2017, 92(6): 995–1004.
- [26] Entian KD, Kötter P. Yeast genetic strain and

- plasmid collections. *Methods Microbiol*, 2007, 36: 629–666.
- [27] Gao S, Lyu YB, Zeng WZ, et al. Efficient biosynthesis of (2S)-naringenin from *p*-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(4): 1015–1021.
- [28] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389–3402.
- [29] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 2008, 5(7): 621–628.
- [30] Dos Santos JP, Zavareze EDR, Dias ARG, et al. Immobilization of xylanase and xylanase- β -cyclodextrin complex in polyvinyl alcohol via electrospinning improves enzyme activity at a wide pH and temperature range. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118(Pt 13): 1676–1684.
- [31] Wei LN, Wang ZX, Zhang GL, et al. Characterization of terminators in *Saccharomyces cerevisiae* and an exploration of factors affecting their strength. *Chem Bio Chem*, 2017, 18(24): 2422–2427.
- [32] Jin P, Kang Z, Yuan PH, et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168. *Metab Eng*, 2016, 35: 21–30.
- [33] Hammer K, Mijakovic I, Jensen PR. Synthetic promoter libraries - tuning of gene expression. *Trends Biotechnol*, 2006, 24(2): 53–55.
- [34] Redden H, Morse N, Alper HS. The synthetic biology toolbox for tuning gene expression in yeast. *FEMS Yeast Res*, 2014, 15(1): 1–10.
- [35] Palmer CM, Miller KK, Nguyen A, et al. Engineering 4-coumaroyl-CoA derived polyketide production in *Yarrowia lipolytica* through a β -oxidation mediated strategy. *Metab Eng*, 2019, 57: 174–181.
- [36] Jiao TT, Zhou JW, Xu S. Quantitative effect of the expression level of key genes in naringenin synthesis on the accumulation level of target products. *Chin J Biotech*, 2019, 35(7): 1256–1265 (in Chinese).
焦亭亭, 周景文, 徐沙. 柚皮素合成关键基因表达水平对目标产物积累水平的量化影响. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1256–1265.
- [37] Liu QL, Yu T, Li XW, et al. Rewiring carbon metabolism in yeast for high level production of aromatic chemicals. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4976.

(本文责编 郝丽芳)