

代谢工程改造大肠杆菌合成羟基酪醇

刘春筱^{1,2}, 夏媛媛^{1,2}, 齐丽娜^{1,2}, 杨海泉^{1,2}, 陈磊^{1,2}, 沈微^{1,2}, 陈献忠^{1,2}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

刘春筱, 夏媛媛, 齐丽娜, 等. 代谢工程改造大肠杆菌合成羟基酪醇. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4243-4253.

Liu CX, Xia YY, Qi LN, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of hydroxytyrosol. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4243-4253.

摘要: 羟基酪醇是重要精细化学品, 作为天然抗氧化剂被广泛应用于食品、医药领域。利用合成生物学技术生产羟基酪醇具有重要意义。本文克隆并功能鉴定了来源于大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 的羟化酶编码基因 *HpaBC*, 结果表明该酶的两个亚基均能成功表达并能催化酪醇生成羟基酪醇。通过 CRISPR-Cas9 技术将由 *tac* 启动子调控的 *HpaBC* 基因表达盒整合到前期构建的酪醇高产菌株 YMG5A*R 基因组中, 同时删除副产物乙酸的合成途径, 获得大肠杆菌代谢工程菌株 YMGRD1H1。摇瓶发酵实验结果表明, 重组菌株能够直接利用葡萄糖生产羟基酪醇, 产量达到 1.81 g/L, 同时发现几乎没有副产物积累。5 L 发酵罐规模的流加补料发酵实验表明, 羟基酪醇最高产量达到 2.95 g/L, 是目前文献报道以葡萄糖从头合成羟基酪醇的最高水平。通过系统改造大肠杆菌, 实现了羟基酪醇的大量合成, 为进一步构建具有工业应用潜力的羟基酪醇细胞工厂奠定了基础, 也为拓展芳香族化合物的微生物制造路线提供了有益的参考。

关键词: 大肠杆菌, 羟化酶, 酪醇, 羟基酪醇, CRISPR-Cas9

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of hydroxytyrosol

Chunxiao Liu^{1,2}, Yuanyuan Xia^{1,2}, Lina Qi^{1,2}, Haiquan Yang^{1,2}, Lei Chen^{1,2}, Wei Shen^{1,2}, and Xianzhong Chen^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Hydroxytyrosol is an important fine chemical and is widely used in food and medicine as a natural antioxidant. Production of hydroxytyrosol through synthetic biology is of important significance. Here we cloned and functionally characterized a hydroxylase encoding gene *HpaBC* from *Escherichia coli* BL21, and both subunits of this enzyme can be successfully expressed to convert the tyrosol into hydroxytyrosol. A *HpaBC* gene integration expression cassette under the *tac*

Received: January 15, 2021; **Accepted:** March 27, 2021

Supported by: Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20171138).

Corresponding author: Xianzhong Chen. Tel: +86-510-85918122; E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

江苏省自然科学基金 (No. BK20171138) 资助。

网络出版时间: 2021-04-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210412.0946.004.html>

promoter was constructed, and integrated into the genome of a tyrosol hyper-producing *E. coli* YMG5A*R using CRISPR-Cas9 technology. Meanwhile, the pathway for production of acetic acid was deleted, resulting in a recombinant strain YMGRD1H1. Shake flask fermentation showed that strain YMGRD1H1 can directly use glucose to produce hydroxytyrosol, reaching a titer of 1.81 g/L, and nearly no by-products were detected. A titer of 2.95 g/L was achieved in a fed-batch fermentation conducted in a 5 L fermenter, which is the highest titer for the *de novo* synthesis of hydroxytyrosol from glucose reported to date. Production of hydroxytyrosol by engineered *E. coli* lays a foundation for further construction of hydroxytyrosol cell factories with industrial application potential, adding another example for microbial manufacturing of aromatic compounds.

Keywords: *Escherichia coli*, hydroxylase, tyrosol, hydroxytyrosol, CRISPR-Cas9

羟基酪醇 (Hydroxytyrosol, HT) 也称 3,4-二羟基苯乙醇 (3,4-DHPEA), 分子量为 154.164, 是一种天然的苯乙醇类化合物, 具有非常高的抗氧化活性^[1-2]。长期食用橄榄油有益于人体健康, 其主要功能成分为羟基酪醇^[3-4]。目前, 羟基酪醇可应用于营养保健品、饲料、化妆品和制药等多个行业, 在食品防腐剂和添加剂等领域也具有广阔的应用前景。目前, 羟基酪醇主要从制备橄榄油或其废水中提取^[1], 少量为化学合成, 微生物生产羟基酪醇的市场占有率极低。鉴于天然提取原料的匮乏

和化学合成严苛的反应条件, 利用微生物的细胞工厂安全高效地生产羟基酪醇成为必然趋势。

如图 1 所示, 在微生物细胞内以酪氨酸为底物引入不同的外源基因, 可以构建多种羟基酪醇的合成途径^[1,5-7]。Chen 等通过构建途径 1 和途径 2 两种混合途径生产羟基酪醇; 针对途径 3 通过筛选高活性的酪氨酸羟化酶和胺氧化酶构建出了高效的生产途径, 通过全细胞生物转化方法生产的羟基酪醇产量最高为 4.69 g/L; 同时针对途径 4 构建了酪氨酸和葡萄糖的双途径生产羟基酪醇,

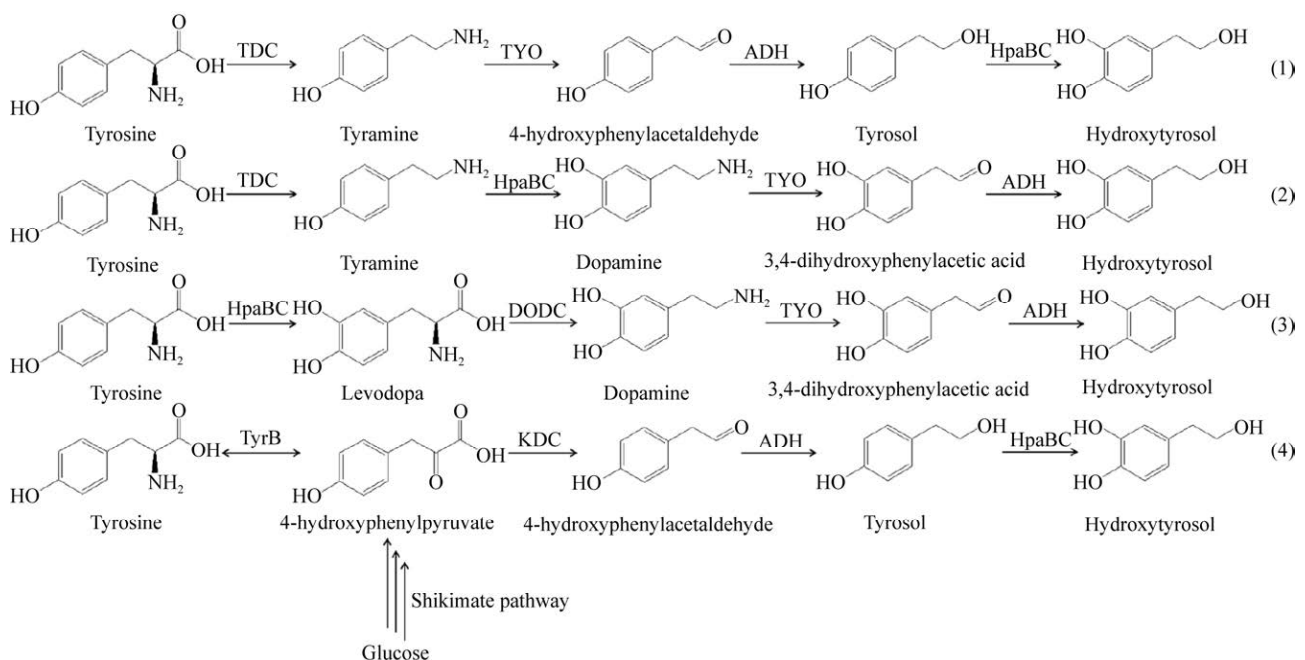


图 1 从酪氨酸出发生产羟基酪醇的代谢途径^[5-7]

Fig. 1 The metabolic pathways for the production of hydroxytyrosol from tyrosine^[5-7]. TDC: tyrosine decarboxylase; TYO: amine oxidase; ADH: alcohol dehydrogenase; HpaBC: hydroxylase; DODC: levodopa decarboxylase; TyrB: aromatic amino acid transaminase; KDC: keto acid decarboxylase.

但其产量依旧较低。上述代谢途径均对羟化酶等基因进行了分析及改造,或构建混合酶体系的生产方式,对后续研究具有借鉴意义^[7-8]。但上述途径均主要以价格高昂的酪氨酸为底物,生产成本低;代谢途径的构建在质粒基础上进行,菌株的不稳定性易造成质粒的缺失;抗生素的使用为后期提取工艺及产品成分的限定造成阻碍,微生物发酵技术生产羟基酪醇有待进一步的研究。

本研究在前期研究^[9]的基础上,将以葡萄糖为底物的酪醇高产菌株 YMG5A*R 作为出发菌株,

进一步构建羟基酪醇高产菌株。出发菌株 YMG5A*R 的主要代谢途径如图 2 所示,该菌株是以 *E. coli* MG1655 为宿主,在敲除相关分支途径基因、调控阻遏基因等基础上,整合表达 5 个拷贝的酿酒酵母菌株苯丙酮酸脱羧酶基因 *ARO10**。该重组菌能够不需要添加抗生素及诱导剂条件下利用葡萄糖生产酪醇^[10]。本研究在高产酪醇基础上,整合表达来源于 *E. coli* BL21 羟化酶基因 *HpaBC* 并进行乙酸副产物途径改造,实现了代谢工程菌株高效生产羟基酪醇。

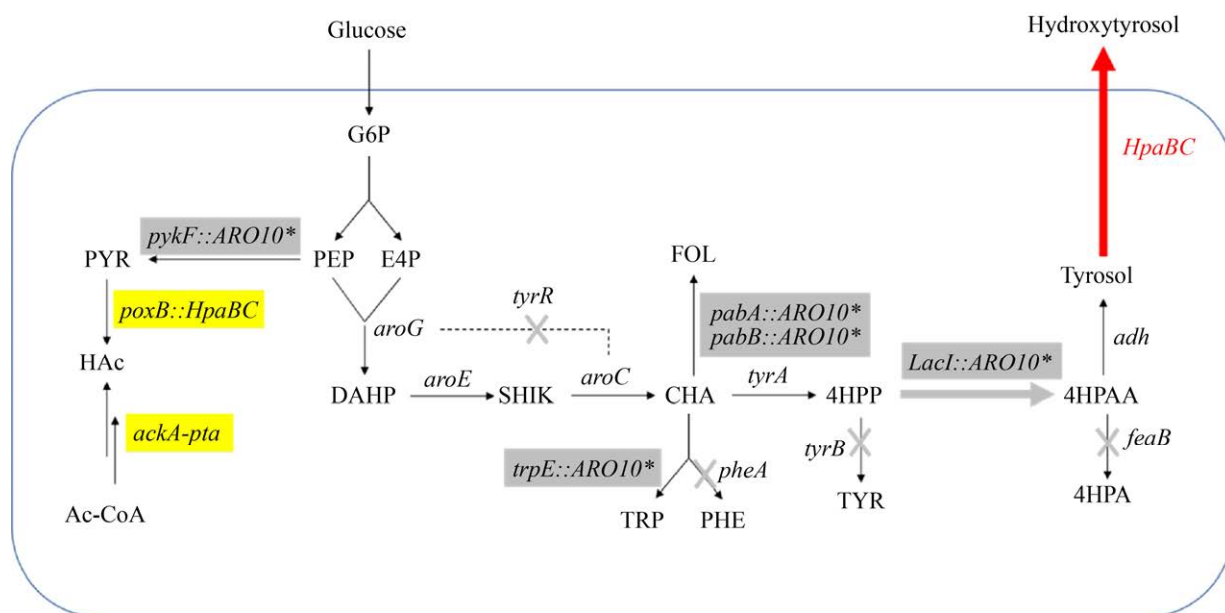


图 2 大肠杆菌利用葡萄糖生产羟基酪醇的代谢途径改造 (G6P: 6-磷酸葡萄糖; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; E4P: 4-磷酸赤藓糖; DAHP: 3-脱氧-阿拉伯-庚酸-7-磷酸酯; SHIK: 莽草酸; CHA: 分支酸; 4HPP: 4-羟基苯丙酮酸; 4HPAA: 4-羟基苯乙醛; PYR: 丙酮酸; HAc: 乙酸; Ac-CoA: 乙酰辅酶 A; FOL: 叶酸; TRP: 色氨酸; PHE: 苯丙氨酸; TYR: 酪氨酸; 4HPA: 4-羟基苯乙酸; *pykF*: 丙酮酸激酶; *aroG*: 3-脱氧-D-阿拉伯糖基庚酸 7-磷酸合酶; *aroE*: 莽草酸脱氢酶; *aroC*: 分支酸合成酶; *trpE*: 邻氨基苯甲酸合酶; *pheA*: 分支酸变位酶; *tyrA*: 分支酸变位酶; *tyrB*: 芳香族氨基酸转氨酶; *feaB*: 苯乙醛脱氢酶; *adh*: 醇脱氢酶; *poxB*: 丙酮酸氧化酶; *ackA*: 乙酸激酶; *pta*: 磷酸转乙酰酶; *ARO10**: 苯丙酮酸脱羧酶; *HpaBC*: 羟化酶)

Fig. 2 Engineering the metabolic pathway in *E. coli* for production of hydroxytyrosol from glucose. G6P: glucose 6-phosphate; PEP: phosphoenolpyruvate; E4P: erythrose 4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-arabin-heptanoic acid-7-phosphate; SHIK: shikimic acid; CHA: chorismate; 4HPP: 4-hydroxyphenylpyruvate; 4HPAA: 4-hydroxyphenylacetaldehyde; PYR: pyruvate; HAc: acetic acid; Ac-CoA: acetyl-CoA; FOL: folic acid; TRP: tryptophan; PHE: phenylalanine; TYR: tyrosine; 4HPA: 4-hydroxyphenylacetic acid; *pykF*: pyruvate kinase; *aroG*: 3-deoxy-D-arabinosylheptanoate 7-phosphate synthase; *aroE*: manganese oxalate dehydrogenase; *aroC*: chorismate synthase; *trpE*: anthranilate synthase; *pheA*: chorismate mutase; *tyrA*: chorismate mutase; *tyrB*: aromatic amino acid transaminase; *feaB*: phenylacetaldehyde dehydrogenase hydrogenase; *adh*: alcohol dehydrogenase; *poxB*: pyruvate oxidase; *ackA*: acetate kinase; *pta*: phosphotransacetylase; *ARO10**: phenylpyruvate decarboxylase; *HpaBC*: hydroxylase.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

YMG5A*R 为本研究的出发菌株, 研究中所用及构建的菌株和质粒如表 1 所示。

1.1.2 引物设计

研究中所用引物如表 2 所示。

1.1.3 试剂

研究中所用蛋白胨和酵母粉等试剂均购于赛默飞公司; 无机盐等试剂均购自国药化学试剂有限公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 葡萄糖、阿拉伯糖、壮观霉素、硫酸卡那霉素等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 酪醇、羟基酪醇等标准品均购自 Sigma-Aldrich (中国上海); 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 等均购自赛默飞世尔科技公司; 连接酶 Solution I、PrimeSTAR[®]DNA 聚合酶、Ex *Taq* 酶、*rTaq* 酶等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.1.4 培养基及缓冲液

LB 培养基 (g/L): 酵母粉 5、蛋白胨 10、NaCl 10。固体 LB 培养基含有 2.0% (W/V) 琼脂

粉。灭菌条件为 121 °C、15 min。

M9Y 培养基 (g/L): Na₂HPO₄·12H₂O 17.1、KH₂PO₄ 3、NaCl 0.5、NH₄Cl 1、葡萄糖 20、酵母粉 0.25、5 mmol/L MgSO₄·7H₂O。灭菌条件为 115 °C、15 min。其中, MgSO₄·7H₂O 母液需单独灭菌, 灭菌条件为 121 °C、15 min。

PBS 缓冲液 (g/L): NaCl 8、KCl 0.2、Na₂PO₄ 1.42、KH₂PO₄ 0.27。

1.2 菌株构建

1.2.1 羟化酶基因 *HpaBC* 的获取及重组质粒构建

以菌株 *E. coli* BL21 基因组为模板进行 PCR 扩增获得羟化酶基因 *HpaBC* (GenBank 登录号: CP053601.1), 通过引物将两个限制性酶切酶位点 *EcoR* I、*Hind* III 分别引入基因两端。

将 pEtac 质粒和 *HpaBC* 基因用限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 进行双酶切后, 用 Solution I 连接酶进行连接, 转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 筛选获得 JM109/pEtac-*HpaBC* 菌株。

1.2.2 重组菌株构建

采用化学转化法将构建的重组质粒 pEtac-*HpaBC* 转入酪醇高产菌株 YMG5A*R 中, 获得游离表达羟化酶的重组菌株 YMG5A*R/pEtac-*HpaBC*。

表 1 本研究所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids	Features	Sources
<i>E. coli</i> JM109	Gene cloning	This laboratory
YMG5A*R	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>feaB</i> Δ <i>pheA</i> Δ <i>tyrB</i> Δ <i>tyrR</i> <i>lacI::ARO10*</i> <i>trpE::ARO10*</i> <i>pabB::ARO10*</i> <i>pabA::ARO10*</i> <i>pykF::ARO10*</i>	This laboratory
YMGRD1	YMG5A*R Δ <i>poxB</i>	This study
YMGRD2	YMG5A*R Δ <i>ackA-pta</i>	This study
YMGRD1H1	YMG5A*R <i>poxB::HpaBC</i>	This study
pEtac	Ptac-KanR	This laboratory
pEtac- <i>HpaBC</i>	Ptac-KanR	This study
pCas	Kan Pcas-cas9	This laboratory
pTargetF	pMB1 <i>aadA</i>	This laboratory
pTargetF- <i>poxB</i>	pMB1 <i>aadA</i> sgRNA- <i>poxB</i>	This study
pTargetF- <i>ackA-pta</i>	pMB1 <i>aadA</i> sgRNA- <i>ackA-pta</i>	This study

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')
HpaBC-L	GGAATTCATGAAACCAGAAGATTTCCGCGC
HpaBC-R	CCCAAGCTTTTAAATCGCAGCTTCCATTTCCAGC
poxB-u-L	GAAGAACCGT CCACAGGCCG
poxB-u-R-q	TGACGGGAAA TGCCACCCTT GGTCTCCAT CTCCTGAATG
poxB-u-R-z	CATTTGCTGT CCACCAGTCA GGTCTCCAT CTCCTGAATG
poxB-d-L-q	CATTCAGGAG ATGGAGAACC AAGGGTGGCA TTTCCCGTCA
poxB-d-L-z	AAAGGAGGAA CTATATCCGG AAGGGTGGCA TTTCCCGTCA
poxB-d-R	TCCGCCAGCG AATGGCAC
poxB-u-HpaBC-L	CATTCAGGAG ATGGAGAACC TGACTGGTGG ACAGCAAATG
poxB-HpaBC-d-R	TGACGGGAAA TGCCACCCTT CCGATATAG TTCCTCCTTT
poxB-u-HpaBC-d-L	CCGGCTCCGT ATATGGATTG
poxB-u-HpaBC-d-R	GCTCGCGGGT AAATTCCCAT
Sg-poxB	GTCCTAGGTATAATACTAGTCCAAAACACTCGAATCGGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
testSg-poxB	CCAAAACACTCGAATCGGCA
ackA-pta-u-L	TGCCAACACCTGTCCAGACTC
ackA-pta-u-R-q	AGCTGCGGATGATGACGAGAGGAAGTACCTATAATTGATA
ackA-pta-d-L-q	TATCAATTATAGGTACTTCTCTCGTCATCATCCGCAGCT
ackA-pta-d-R	CCTCTTCTCCCATACCAAAT
ackA-pta-u-d-L	CGATCGGCGGCATAAAAACGG
ackA-pta-u-d-R	CGATCCTGAGGTTAATCCTTC
Sg-ackA-pta	GTCCTAGGTATAATACTAGTAATGGTGAAGAGTACCTTTTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
testSg-ackA-pta	AATGGTGAAGAGTACCTTTC
pTarget-R	CGGACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC

采用 CRISPR-Cas9 技术^[11]对出发菌株 YMG5A*R 基因组中产乙酸的关键基因 *poxB* 和 *ackA*、*pta*^[12]分别进行敲除。采用融合 PCR 的方法将 *poxB* 上下游同源臂进行连接, 获得 *poxB* 敲除盒, 将其与质粒 pTargetF 和 pCas 共同转入菌株 YMG5A*R 中筛选获得阳性克隆, 消除质粒后获得 *poxB* 基因敲除的菌株 YMGRD1。采用相同的方法构建 *ackA-pta* 基因敲除的菌株 YMGRD2。采用上述方法获得 *tac-HpaBC* 基因整合表达盒, 将其与质粒 pCas 和 pTargetF 共同转入菌株 YMG5A*R 中, 筛选获得阳性克隆 YMGRD1H1。

1.3 摇瓶发酵条件

将保藏的菌种在 LB 固体培养基上划线培养, 挑取单菌落接种于装有 20 mL LB 液体培养

基的 100 mL 锥形瓶中, 于 37 °C、200 r/min 培养过夜。按 1%接种量, 转接含有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 于 37 °C、200 r/min 培养 10 h 后收集菌体。将其用无菌水洗一次, 转接至装有 50 mL M9Y 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 于 30 °C、200 r/min 培养 48 h。每隔 12 h 取样检测 OD_{600} 和产物含量。其中, 游离表达羟化酶时, 菌体浓度 OD_{600} 达到 0.5 时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导。培养基中所需抗生素主要包括: 卡那霉素 (50 mg/L) 和壮观霉素 (100 mg/L)。

1.4 SDS-PAGE 电泳条件

将 YMG5A*R/pEtac-*HpaBC* 菌株在 LB 培养基中诱导培养 24 h 后, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。将菌体水洗一次后, 用 25 mL PBS 缓

冲液重悬，破壁后离心取上清及沉淀，分别进行 SDS-PAGE 电泳验证。

1.5 发酵罐发酵条件

将菌株活化培养，以 1% 接种量接种到装有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中，于 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 1.5–2.0 时，按照 10% 的接种量接种于装有 2 L M9Y 培养基的 5 L 发酵罐中。

发酵过程通气比恒定为 1.5 vvm，逐渐增加搅拌转速维持发酵液溶解氧 (Dissolved oxygen, DO) 值 30%–40% 至最高转速 600 r/min；流加 200 g/L 酵母粉母液 (8 mL/次) 补充菌株生长所需养分促进菌株生长，继续维持溶氧浓度。采用两阶段控温发酵，0–14 h 为 37 °C，14–48 h 为 30 °C。发酵过程中，通过流加氨水自动控制发酵液 pH 为 7.0。每间隔 4 h 取样检测 OD_{600} 、葡萄糖、酪醇和羟基酪醇产量。根据检测结果，控制流加葡萄糖至终浓度维持在 5 g/L。

1.6 检测方法

1.6.1 酪醇、羟基酪醇检测方法

将发酵液沸水浴 15 min，离心收集上清，并采用微孔滤膜过滤。高效液相色谱 (HPLC) 分析条件如下：流速 1 mL/min；流动相为 80% (V/V) 的甲酸 (0.1%, W/V) 和 20% (V/V) 的纯甲醇；博纳艾杰尔 C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；柱温 28 °C；波长为 280 nm；紫外检测器；进样量为 10 μL。

1.6.2 有机酸检测方法

样品处理同 1.6.1 方法。HPLC 分析条件如下：流速 0.5 mL/min；流动相为 5 mmol/L 稀硫酸；博纳艾杰尔有机酸分析柱 (7.8 mm×300 mm, 9 μm)；柱温 55 °C；RID 示差法检测器；进样量为 10 μL。

1.6.3 葡萄糖检测方法

葡萄糖采用生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所) 进行检测。

2 结果与分析

2.1 羟化酶 HpaBC 的表达

采用质粒 pEtac 表达羟化酶 HpaBC，将构建的重组菌 YMG5A*R/pEtac-HpaBC 进行诱导培养并 SDS-PAGE 电泳分析。如图 3 所示，重组菌的全细胞电泳 (泳道 3) 和细胞沉淀部分 (泳道 5) 均有两条显著的蛋白电泳条带，其大小分别在 58 kDa 和 19 kDa 左右，与 4-羟基苯乙酸 3-单加氧酶 (HpaB) 和黄素还原酶 (HpaC) 的理论分子

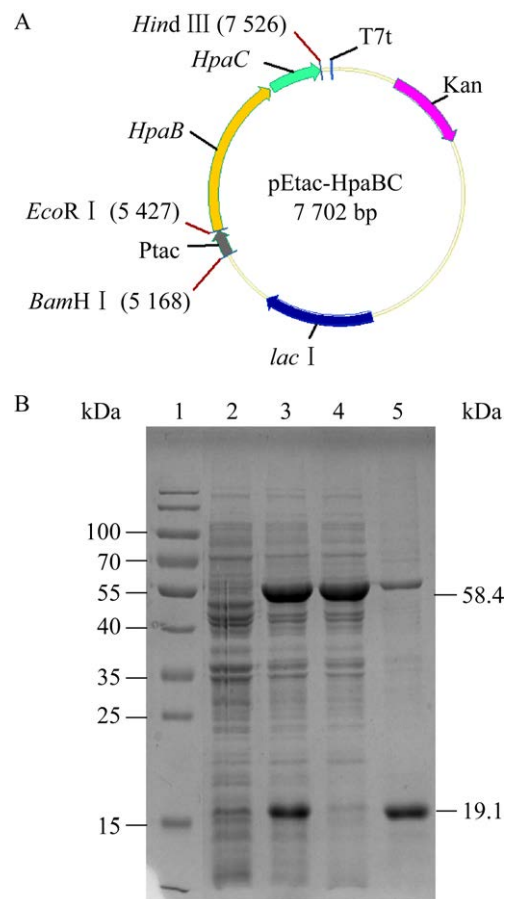


图 3 pEtac-HpaBC 质粒图谱 (A) 及 HpaBC 羟化酶 SDS-PAGE 电泳分析图 (B)

Fig. 3 pEtac-HpaBC plasmid map (A) and SDS-PAGE analysis of HpaBC (B). 1: marker; 2: YMG5A*R whole cells; 3: YMG5A*R/pEtac-HpaBC whole cells; 4: the cell-free supernatant and 5: the precipitate of YMG5A*R/pEtac-HpaBC cells.

量一致,表明 HpaBC 成功表达。由泳道 4 可以看出,在细胞破碎液的上清部分中,仅有明显的 HpaB 蛋白条带,表明 HpaC 基因表达产物多为包涵体。

2.2 羟化酶 HpaBC 活性验证

研究中进一步验证了 *HpaBC* 基因表达产物是否具有催化生产羟基酪醇的活性。如图 4 所示,重组菌株 YMG5A*R/pEtac-*HpaBC* 发酵 48 h,羟基酪醇产量达 0.15 g/L。但对照菌株 YMG5A*R 发酵液中未检测到羟基酪醇积累,证明表达的 HpaBC 酶具有催化活性。但游离表达 HpaBC 酶时,重组菌的羟基酪醇产量较低,需要进一步改造提升羟基酪醇产量。

2.3 乙酸合成途径敲除

在羟基酪醇发酵生产过程中,重组菌株 YMG5A*R/pEtac-*HpaBC* 存在乙酸积累和 pH 降低等现象。大肠杆菌中的乙酸途径主要包括两个:①丙酮酸经 *poxB* 基因表达的丙酮酸氧化酶转化为乙酸;②乙酰辅酶 A 经 *ackA*、*pta* 基因表达的乙酸激酶和磷酸转乙酰酶转化为乙酸。分别敲除菌株 YMG5A*R 中基因 *poxB*、*ackA-pta*,构建了重组菌株 YMGRD1 和 YMGRD2 并考察乙酸合成水平。

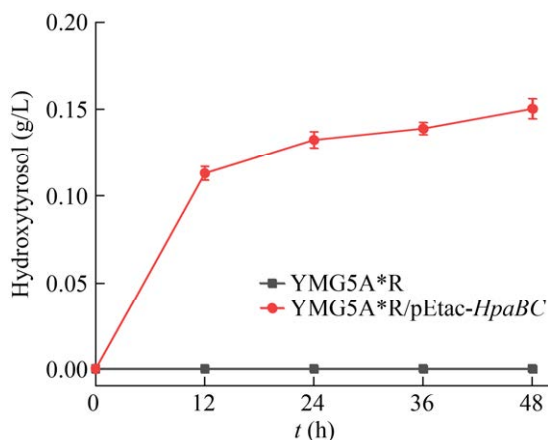


图 4 YMG5A*R/pEtac-*HpaBC* 菌株发酵产羟基酪醇
Fig. 4 Production of hydroxytyrosol by strain YMG5A*R/ pEtac-*HpaBC*.

如表 3 所示,与出发菌株 YMG5A*R 相比,*poxB* 基因和 *ackA-pta* 基因的敲除均降低了乙酸积累。其中,*poxB* 基因敲除菌株 YMGRD1 的乙酸积累显著降低。在发酵前期菌株 YMGRD1 的菌体浓度高于菌株 YMG5A*R 和 YMGRD2 (图 5A),表明乙酸合成的减少有利于细胞生长。但随着发酵时间的延长, YMGRD1 菌株的生长相对变缓,分析原因可能是过高的酪醇积累对细胞具有一定毒性^[7]。考察了重组菌的葡萄糖利用情况(图 5B),发酵 12 h 时残留葡萄糖仅剩 5 g/L;发酵 24 h 时,葡萄糖耗尽,这也是酪醇在发酵后期产量增幅变缓的重要原因之一。如图 5C 所示,*poxB* 基因的敲除显著促进了酪醇的积累,提高至 1.28 g/L,与对照菌株 YMG5A*R 相比提高了 22.38%;但 *ackA-pta* 基因的敲除对酪醇产量的积累影响较小。这说明降低乙酸积累有利于酪醇的合成。

2.4 HpaBC 基因的整合表达

构建 tac 强启动子调控 *HpaBC* 基因的表达盒并整合到 YMGRD1 菌株的 *poxB* 基因位点,获得菌株 YMGRD1H1。与对照菌株相比较, YMGRD1H1 的细胞生长速度降低(图 5A),其原因可能是 HpaBC 羟化酶的表达对胞内多种物质都有羟化作用,因而对细胞代谢产生一定的负担^[13]。YMGRD1H1 菌株的酪醇产量随时间呈现先上升后下降的趋势(图 5C),表明发酵中期酪醇产量大幅提高,羟化酶 HpaBC 无法及时将酪醇转化为羟基酪醇。YMGRD1H1 菌株发酵液中羟基酪醇产量持续增加,48 h 时羟基酪醇产量达到了 1.81 g/L(图 5D),相对于游离表达菌株增幅明显。

表 3 不同菌株发酵液 pH 及乙酸含量

Table 3 pH and acetic acid content in fermentation broth of different strains

Strains	pH	Acetic acid (g/L)
YMG5A*R	4.88	3.09
YMGRD1	5.83	1.27
YMGRD2	4.95	2.69
YMGRD1H1	5.84	0.73

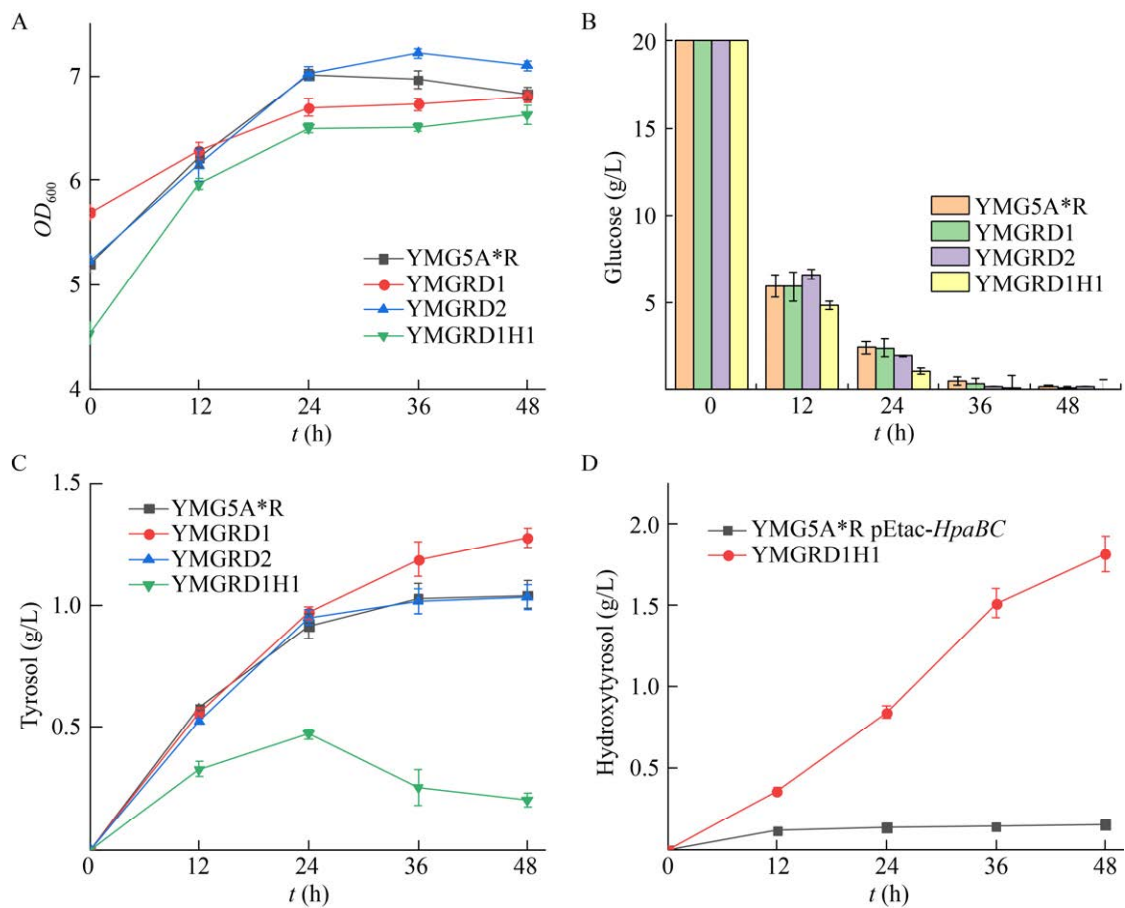


图5 不同菌株发酵结果

Fig. 5 Fermentation results of different strains. (A) Cell growth. (B) Residual glucose. (C) Tyrosol production. (D) Hydroxytyrosol production.

针对 YMGRD1H1 菌株, 考察了温度 (苯丙酮酸脱羧酶 ARO10* 的最适温度 30 °C, 羟化酶 HpaBC 的最适温度 37 °C) 对羟基酪醇生产的影响。结果表明, 30 °C 更适合 YMGRD1H1 菌株发酵生产羟基酪醇; 37 °C 发酵时发酵液中羟基酪醇在发酵前期 (12 h) 快速积累, 增速远远超过 30 °C 培养时的产量。但后期产量维持稳定, 仅为 1.07 g/L, 相比于 30 °C 发酵时的羟基酪醇产量降低了 40.88% (图 6)。由此可以看出, YMGRD1H1 菌株也可采用两阶段控温发酵方法, 即 37 °C 培养细胞生长, 后期采用 30 °C 发酵更有利于羟基酪醇的积累。

2.5 YMGRD1H1 菌株发酵中间产物的检测

考察了 YMGRD1H1 菌株的发酵过程中莽草酸

途径中间产物的积累 (表 4): 莽草酸在整个发酵过程中未检出; 4-羟基苯丙酮酸含量低于 10 mg/L。前期工作还对醇脱氢酶基因 *adh* 进行了多拷贝表达^[9], 经过对发酵液中酪醇的产量对比, 发现酪醇产量并未提高, 说明转化底物 4-羟基苯乙醛并未剩余。综合对上述中间产物的分析, 说明莽草酸途径涉及的多种酶促反应都能够将底物及时进行转化, 无需增加相应基因的拷贝数。

2.6 YMGRD1H1 菌株的 5 L 发酵罐发酵

在 5 L 发酵罐中考察 YMGRD1H1 代谢工程菌的羟基酪醇合成能力。如图 7 所示, 发酵过程中, 细胞在 24 h 内快速生长, OD_{600} 约为 35, 其后趋于稳定; 酪醇浓度在发酵 12 h 达到最高, 仅

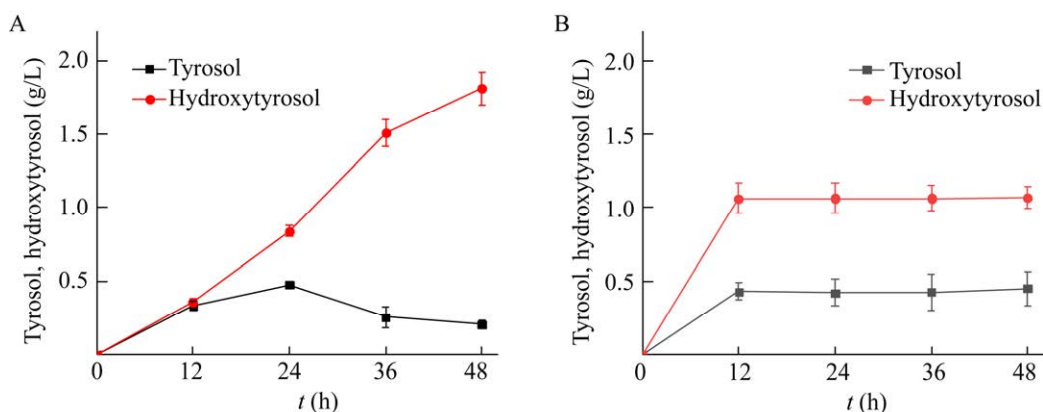


图 6 不同温度对 YMGRD1H1 菌株产酪醇和羟基酪醇的影响

Fig. 6 Effect of temperature on tyrosol and hydroxytyrosol production by strain YMGRD1H1. (A) 30 °C. (B) 37 °C.

表 4 YMGRD1H1 菌株发酵过程中的中间产物含量
Table 4 The content of intermediate products in the fermentation process of YMGRD1H1 strain

Mid product (mg/L)	Time (h)				
	0	12	24	36	48
Shikimic acid	—	—	—	—	—
4-hydroxyphenylpyruvate	1.23	2.36	5.68	6.01	7.97

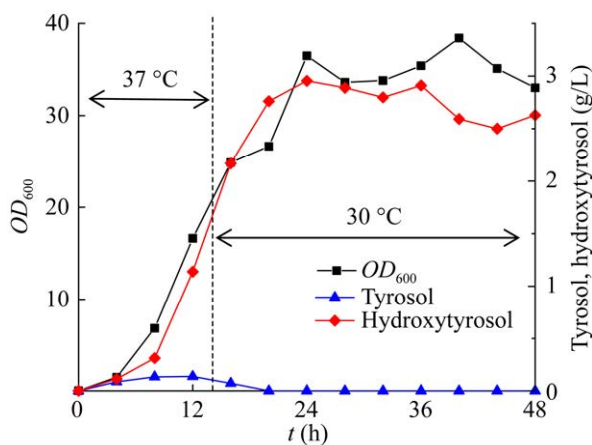


图 7 YMGRD1H1 菌株在 5 L 发酵罐中发酵生产羟基酪醇

Fig. 7 Hydroxytyrosol production of strain YMGRD1H1 in a 5 L fermenter.

为 0.14 g/L, 其后逐渐下降, 20 h 后酪醇检测结果为 0, 在发酵过程中完全转化为羟基酪醇; 羟基酪醇产量在发酵前 24 h 不断增加, 并在 24 h 时达到最高产量 2.95 g/L, 相比摇瓶发酵, 发酵

罐中羟基酪醇产量提高了 62.98%。

3 讨论

羟基酪醇因其超强的抗氧化活性和多种有益于人体健康的功能, 成为近年来的研究热点。本研究主要以前期构建的酪醇高产菌株为出发菌株, 首先对羟化酶基因 *HpaBC* 进行表达及酶活验证; 敲除该菌株的乙酸合成途径关键基因; 然后将验证的羟化酶基因 *HpaBC* 整合到乙酸敲除菌株基因组中, 构建获得可高效转化葡萄糖生产羟基酪醇的重组菌株。采用 5 L 发酵罐发酵验证, 羟基酪醇产量最高达到 2.95 g/L。

通过敲除产乙酸途径中的 *poxB*、*ackA-pta* 基因对出发菌株发酵液产酸问题进行了研究^[12,14], 其中 *poxB* 基因的敲除更不利于发酵液乙酸的积累, 其酪醇产量也更高。乙酸含量由出发菌株 YMGRD1H1 的 3.09 g/L 降低到 YMGRD1 菌株的 1.27 g/L; 酪醇产量由出发菌株 YMGRD1H1 的 1.04 g/L 提升到 1.28 g/L。同时发现, 发酵前期 37 °C 有利于细胞的快速生长, 发酵后期降低发酵温度, 更利于产物羟基酪醇的积累。因此, 针对 YMGRD1H1 菌株采用两阶段控温发酵的方法。

发酵罐培养 24 h 时羟基酪醇达最高, 其后菌体浓度和羟基酪醇均趋于稳定并略有降低。其原

因可能有以下几点：①羟基酪醇对大肠杆菌具有毒性，高浓度的羟基酪醇抑制菌体生长，降低菌体的转化能力^[15-17]；②菌体生长达到稳定期后活力不足；③羟基酪醇作为高效抗氧化剂。针对上述问题，在后续的研究中可以考虑萃取发酵法，以进一步提高羟基酪醇产量。同时，近年来也有多项关于羟基酪醇生产的研究报道，研究者采用不同方法针对菌株进行相关改造，提高了不同底物生产羟基酪醇的产量（表 5）。Bouallagui 等采用静息细胞催化酪醇生产羟基酪醇产量达到 5.75 g/L，是目前较高的催化水平^[22]。本文以葡萄糖为底物生产羟基酪醇产量高于目

前文献报道的水平（表 5）。

本研究的出发菌株 YMG5A*R 针对上游代谢分支途径中的可催化磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸的丙酮酸激酶基因 *pykF* 进行了敲除，对中央碳代谢途径还未进行有效的研究及改造。Rodriguez 等和侯建岫等研究发现，增加莽草酸途径的直接前体磷酸烯醇式丙酮酸和 4-磷酸赤藓糖的利用率，将对莽草酸途径的碳代谢通量产生有利影响^[18-19]。增加莽草酸途径的第一个酶促反应 3-脱氧-阿拉伯-庚酸-7-磷酸酯也有利于碳代谢流向目的产物^[18]。在后续的研究中，将对上述代谢途径进行改造进一步增加羟基酪醇的产量。

表 5 近 5 年生物合成羟基酪醇的产量比较

Table 5 Comparison of biosynthetic production of hydroxytyrosol in recent 5 years

Methods	Strains	Scale (L)	Substrates (mmol/L)	Titer (g/L)	Reaction time (h)	References
Active cell	MG1655 $\Delta feaB \Delta pheA \Delta tyrB \Delta tyrR lacI::ARO10^* trpE::ARO10^* pabB::ARO10^* pabA::ARO10^* pykF::ARO10^* poxB::HpaBC$	2	Glucose	2.95	48	This study
Active cell	BW25113 $\Delta feaB/pZE-Aro10-ADH6/pCS-TPTA-HpaBC$	0.05	Glucose (13.8) Glycerin (108.7)	0.65	48	[7]
Active cell	BL21(DE3) $DtyrR::FRT-DPheA::FRT-DfeaB::FRT-kanR-FRT/pA-aroGfbr-tyrA^{fbr}/pC-TDC-TYO/pE-HpaBC$	–	Glucose	0.27	30	[20]
Active cell	HMS174(DE3) [BBR] <i>ori cat PlacUV5-aroE-aroD-aroBOP PLtetO-1-aroG*-ppsA-<i>tktA</i> dbl term</i> [p15a <i>ori bla PlacUV5-tyrB-tyrA*-aroC T1 term P_{trc}-aroA-aroL dbl term</i>] [RSF <i>ori kan lacI T7prom-PcTDC-T7prom-RsTYR-T7term</i>]	0.05	Glucose (50)	0.27	48	[21]
Active cell	BW25113 $\Delta feaB/pZE-Aro10-ADH6/pCS-HpaBC$	0.05	L-tyrosine (16.56)	1.24	48	[7]
Active cell	BL21(DE3) $\Delta tyrR::FRT-\Delta PheA::\Delta feaB-FRT/pC-PcAAS-HpaBC$	–	L-tyrosine	0.21	30	[1]
Active cell	BW25113 $\Delta feaB/pRSF-HpaBC-tyo-tdc$	0.05	Tyrosine (15)	1.89	36	[5]
Active cell	BW25113 $\Delta feaB/pRSF-tyoMUT1-22-HpaB23F9-M4C-dodc$	5	Tyrosine (30)	3.37	48	[6]
Resting cell	BW25113 $\Delta feaB/pRSF-tyoMUT1-22-HpaB23F9-M4C-dodc$	1	Tyrosine (45)	4.69	48	[6]
Resting cell	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	Tyrosol (43.43)	5.75	18–27	[22]

REFERENCES

- [1] Britton J, Davis R, O'Connor KO. Chemical, physical and biotechnological approaches to the production of the potent antioxidant hydroxytyrosol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(15): 5957-5974.
- [2] Zulueta A, Esteve MJ, Frigola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem*, 2009, 114(1): 310-316.
- [3] Pastor A, Rodríguez-Morató J, Olesti E, et al. Analysis of free hydroxytyrosol in human plasma following the administration of olive oil. *J Chromatogr A*, 2016, 1437: 183-190.
- [4] Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, et al. Hydroxytyrosol: bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res Int*, 2018, 105: 654-667.
- [5] Chen W, Yao J, Meng J, et al. Promiscuous enzymatic activity-aided multiple-pathway network design for metabolic flux rearrangement in hydroxytyrosol biosynthesis. *Nat Commun*, 2019, 10: 960.
- [6] Yao J, He Y, Su NN, et al. Developing a highly efficient hydroxytyrosol whole-cell catalyst by de-bottlenecking rate-limiting steps. *Nat Commun*, 2020, 11: 1515.
- [7] Li XL, Chen ZY, Wu YF, et al. Establishing an artificial pathway for efficient biosynthesis of hydroxytyrosol. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(2): 647-654.
- [8] Satoh Y, Tajima K, Munekata M, et al. Engineering of L-tyrosine oxidation in *Escherichia coli* and microbial production of hydroxytyrosol. *Metab Eng*, 2012, 14(6): 603-610.
- [9] Xu W, Yang C, Xia YY, et al. High-level production of tyrosol with noninduced recombinant *Escherichia coli* by metabolic engineering. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(16): 4616-4623.
- [10] Angelino D, Gennari L, Blasa M, et al. Chemical and cellular antioxidant activity of phytochemicals purified from olive mill waste waters. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(5): 2011-2018.
- [11] Jiang Y, Chen B, Duan CL, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [12] 周丽. 高产高纯 D-乳酸的 *E. coli* 代谢工程菌的构建[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [13] Zhou L. Construction of metabolically engineered *E. coli* producing high titer of pure D-lactate[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012 (in Chinese).
- [14] Deng YF, Faivre B, Back O, et al. Structural and functional characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Escherichia coli*. *Chem Bio Chem*, 2020, 21(1/2): 163-170.
- [15] 周丽, 田康明, 左志锐, 等. 大肠杆菌琥珀酸和乙酸合成途径的删除及其重组菌株的 D-乳酸发酵. *生物工程学报*, 2011, 27(1): 31-40.
- [16] Zhou L, Tian KM, Zuo ZR, et al. Elimination of succinate and acetate synthesis in recombinant *Escherichia coli* for D-lactate production. *Chin J Biotech*, 2011, 27(1): 31-40 (in Chinese).
- [17] Aissa I, Kharrat N, Aloui F, et al. Valorization of antioxidants extracted from olive mill wastewater. *Biotechnol Appl Biochem*, 2017, 64(4): 579-589.
- [18] Diallinas G, Rafailidou N, Kalpaktsi L, et al. Hydroxytyrosol (HT) analogs act as potent antifungals by direct disruption of the fungal cell membrane. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2624.
- [19] Koolen HHF, Pral EMF, Alfieri SC, et al. Antiprotozoal and antioxidant alkaloids from *Alternanthera littoralis*. *Phytochemistry*, 2017, 134: 106-113.
- [20] Rodriguez A, Martnez JA, Flores N, et al. Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 126.
- [21] 侯建岫, 高聪, 陈修来, 等. 使用动态分子开关调控大肠杆菌生产莽草酸. *生物工程学报*, 2020, 36(10): 149-157.
- [22] Hou JS, Gao C, Chen XL, et al. Using dynamic molecular switches for shikimic acid production in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2020, 36(10): 149-157 (in Chinese).
- [23] Choo HJ, Kim EJ, Kim SY, et al. Microbial synthesis of hydroxytyrosol and hydroxysalidroside. *Appl Biol Chem*, 2018, 61(3): 295-301.
- [24] Trantas EA, Navakoudis E, Pavlidis T, et al. Dual pathway for metabolic engineering of *E. coli* metabolism to produce the highly valuable hydroxytyrosol. *BioRxiv*, 2019. DOI: 10.1101/536458.
- [25] Bouallagui Z, Sayadi S. Bioconversion of p-tyrosol into hydroxytyrosol under bench-scale fermentation. *Bio Med Res Int*, 2018: 7390751.

(本文责编 郝丽芳)