

大麻素前体物 2,4-二羟基-6-正庚基苯甲酸的生物合成及产量优化

裴俊伟, 魏阳, 邱娇, 孙贤赵, 王华峰, 纪丽莲, 白净*

苏州科技大学化学与生命科学学院, 江苏 苏州 215009

裴俊伟, 魏阳, 邱娇, 孙贤赵, 王华峰, 纪丽莲, 白净. 大麻素前体物 2,4-二羟基-6-正庚基苯甲酸的生物合成及产量优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4568-4582.

PEI Junwei, WEI Yang, QIU Jiao, SUN Xianzhao, WANG Huafeng, JI Lilian, BAI Jing. Biosynthesis and yield improvement of cannabinoid precursor sphaerophorolcarboxylic acid[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4568-4582.

摘要: 【背景】大麻素是植物的天然活性产物, 是一种重要的临床药物。目前药学相关大麻素的生产仍然依赖植物, 但植物生产效率低、周期长并且受安全等因素限制。利用生物方法合成大麻素及其类似物具有重要意义。【目的】在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) BJ5464-*npgA* 中重构大麻素前体物 2,4-二羟基-6-正庚基苯甲酸(sphaerophorolcarboxylic acid, SA)的生物合成途径, 优化发酵培养基组分, 利用生物合成途径高效生产 SA。【方法】从罗伯茨绿僵菌(*Matarhizium robertsii*) ARSEF 23 基因组扩增 *Mr_OvaA*、*Mr_OvaB*、*Mr_OvaC* 基因, 分别构建到不同酵母-大肠杆菌穿梭质粒中, 共同转化酿酒酵母 BJ5464-*npgA* 表达, 获得酵母工程菌株 CLB2。通过单因素试验及 Plackett-Burman、最陡爬坡试验和响应面法设计优化发酵培养基, 使用 Design Expert 8.0 对试验数据进行分析。【结果】酵母工程菌株 CLB2 可以合成 63.75 mg/L SA。培养基各成分中影响 SA 产量的 3 个主要因素为: 蔗糖、 KH_2PO_4 和维生素溶液, 其最佳浓度分别为蔗糖 7.26 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.08 g/L、维生素溶液 5.67 mL/L, 预测产量最大值为 93.15 mg/L, 实际产量为 93.75 mg/L, 较优化前提高了 47%。【结论】大麻素前体物 SA 可以在酿酒酵母中高效合成。试验获得的高产发酵培养基配方为后续 SA 及大麻素的研究提供了可靠的支持。

关键词: 2,4-二羟基-6-正庚基苯甲酸; 生物合成; Plackett-Burman; 响应面法

资助项目: 江苏省自然科学基金青年基金(BK20210864); 苏州科技大学自然科学类校级科研基金(国家自然科学基金培育项目)(XKZ2020005)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province Youth Fund (BK20210864) and the Natural Science Foundation of Suzhou University of Science and Technology (National Natural Science Foundation of China Cultivation Project) (XKZ2020005).

*Corresponding author. E-mail: baijing@mail.usts.edu.cn

Received: 2023-02-24; Accepted: 2023-04-07; Published online: 2023-05-23

Biosynthesis and yield improvement of cannabinoid precursor sphaerophorolcarboxylic acid

PEI Junwei, WEI Yang, QIU Jiao, SUN Xianzhao, WANG Huafeng, JI Lilian, BAI Jing*

School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Cannabinoids are natural active products of plants that serve as key clinical drugs. At present, the production of pharmaceutical cannabinoids still relies on plants, which has low yield, long cycles, and safety problems. Biosynthesis is of great significance to the production of cannabinoids and their analogues. **[Objective]** To reconstruct the biosynthetic pathway of the cannabinoid precursor sphaerophorolcarboxylic acid (SA) in *Saccharomyces cerevisiae* BJ5464-*npqA* and optimize the fermentation medium to increase the yield of SA. **[Methods]** *Mr_OvaA*, *Mr_OvaB*, and *Mr_OvaC* were amplified by PCR with the genomic DNA of *Matarhizium robertsii* ARSEF 23 as the template and respectively integrated into *S. cerevisiae*-*Escherichia coli* shuttle plasmids. All the three recombinant plasmids were transformed into *S. cerevisiae* BJ5464-*npqA* and the engineered strain CLB2 was obtained. Single factor experiments, Plackett-Burman design, method of steepest ascent, and response surface method were employed to optimize the fermentation medium. The experimental data were analyzed in Design Expert 8.0. **[Results]** The *S. cerevisiae* engineered strain CLB2 yielded 63.75 mg/L SA. The three main factors affecting SA yield were sucrose, KH_2PO_4 , and vitamin solution. The optimized medium was composed of 7.26 g/L sucrose, 6.08 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.67 mL/L vitamin solution, in which the predicted SA yield was 93.15 mg/L. The actual yield of SA in the optimized medium was 93.75 mg/L, which was 47% higher than that before optimization. **[Conclusion]** Cannabinoid precursor SA can be synthesized efficiently in *S. cerevisiae*. The fermentation medium formula for high production of SA in this study provides reliable support for the subsequent research on SA and cannabinoid.

Keywords: sphaerophorolcarboxylic acid (SA); biosynthesis; Plackett-Burman; response surface method

大麻素是从大麻植株中提取的有效成分, 是一种精神活性物质, 具有促进健康的作用, 广泛应用于疼痛、恶心、青光眼等疾病的治疗^[1-3]。大麻素的生产依赖于从大麻(*Cannabis sativa*)植物中提取和纯化, 但大麻种植受相关的法律限制, 并且大麻素的植物丰度低、结构复杂限制了其化学合成^[4-5]。因此, 近年来生物合成大麻素及其类似物成为相关学者的研究热点。生物

合成大麻素及其类似物具有安全、绿色等优势, 是替代化学合成的理想途径。

橄榄酸和 2,4-二羟基-6-正戊基苯甲酸(olivetolic acid, OA)是一类重要的聚酮化合物, 是植物合成大麻素的前体物质, OA 经大麻二酚酸合成酶(cannabi-gerolic acid synthase, CBGAS)催化合成大麻二酚酸, 再经大麻烯酸合成酶(cannabichromenic acid synthase, CBCAS)催化合成大麻素^[6]。已有

文献报道, 通过 OA 及其类似物 2,4-二羟基-6-正庚基苯甲酸(sphaerophorolcarboxylic acid, SA) 可以生物合成大麻素及其衍生物^[7-8]。在大肠杆菌中异源表达III型聚酮合酶 OA 合酶(olivetol synthase, OLS)和 OA 环化酶(olivetolic acid cyclase, OAC)可合成 OA^[9]; 将罗伯茨绿僵菌还原性聚酮合酶表达基因 *Mr_OvaA*、非还原性聚酮合酶表达基因 *Mr_OvaB* 和硫酯酶表达基因 *Mr_OvaC* 导入构巢曲霉, 可合成 140 mg/L SA 及副产物 8 mg/L OA, SA 产量约为 OA 的 17.5 倍, 此外, 哈茨木霉的 *Ti_OvaA* 与 *Ti_OvaB* 在构巢曲霉中共表达也可合成 OA, 但不能合成 SA^[10]。但大肠杆菌作为底盘细胞受其安全性、真核基因表达受限等因素影响, 而酵母等真核生物

具有发酵安全性高、易大规模生产、操作简便等特点, 使其在生物医药应用领域得到广泛研究。

真菌体内大麻素前体物合成途径如图 1 所示^[10], 本研究从罗伯茨绿僵菌(*Matarhizium robertsii*) ARSEF 23 基因组中克隆 *Mr_OvaA* (HRPK)、*Mr_OvaB* (NRPK)和*Mr_OvaC* (ψ ACP-TE) 基因, 转入酿酒酵母 BJ5464-*npaA* 异源表达, 以期在不同底盘细胞中合成 SA; 进一步通过设计单因素试验、Plackett-Burman、最陡爬坡试验和响应面优化试验, 以获得工程代谢菌株生产 SA 的最优培养基配方, 提高生物合成 SA 的产量, 为后续菌种优化、组合生物合成等进一步研究工作奠定基础。

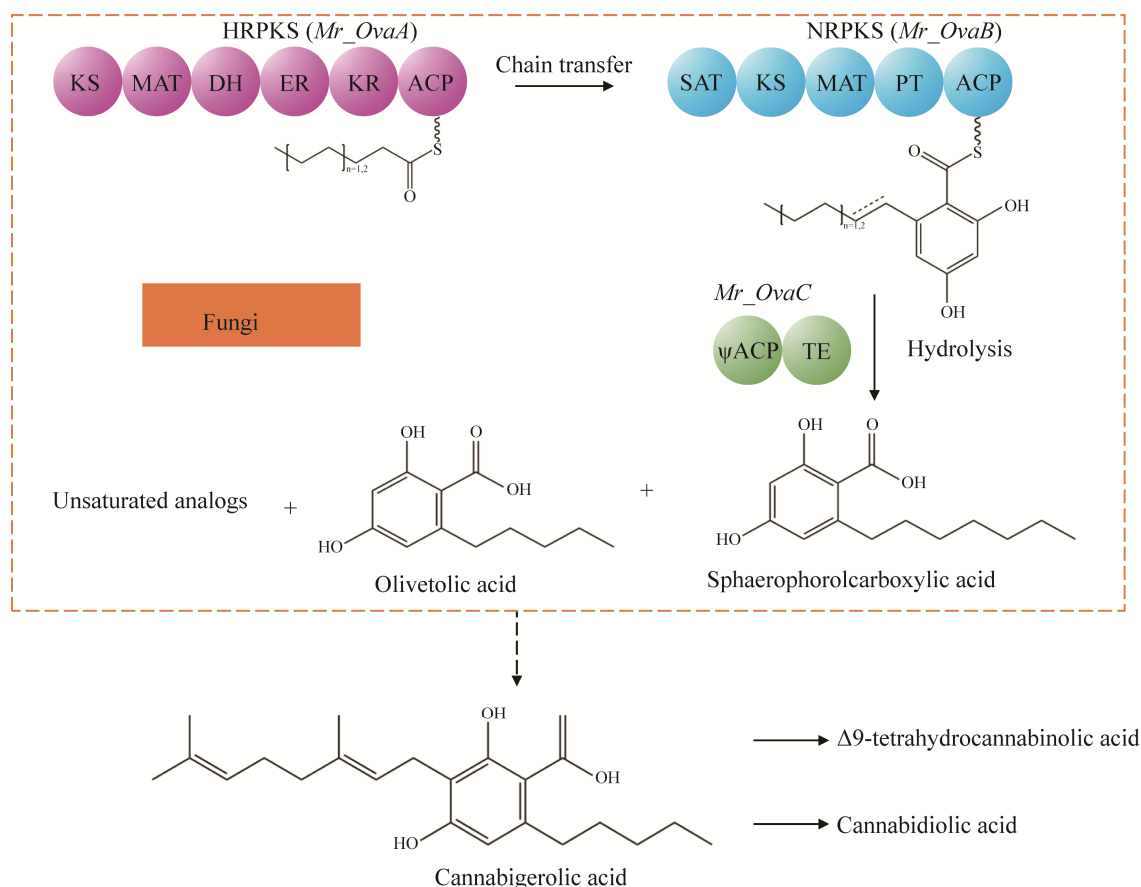


图 1 大麻素前体物生物合成途径

Figure 1 Biosynthetic pathway of cannabinoid precursors.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

酿酒酵母 BJ5464-*npgA* 由本实验室保藏, 罗伯茨绿僵菌(*Metarhizium robertsii*) ARSEF 23 由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所王成树研究员馈赠。质粒 YEpADH2-Trp-FLAGLink (pXW06F)、YEpADH2-Ura-FLAGLink (pXK30F)和 YEpADH2p-Leu-FLAGLink (pRS425) 由本实验室保存。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

种子培养基 SC-3aa (Trp-Leu-Ura) 培养基(g/L): 葡萄糖 20.00, 氨基酸混合物 1.47, 无氨基酸酵母氮源 6.70, 琼脂(固体培养基加入) 2.00。115 °C灭菌 15 min。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.00, (NH₄)₂SO₄ 15.00, KH₂PO₄·7H₂O 8.00, MgSO₄·7H₂O 6.15, 维生素溶液 12 mL, 微量元素溶液 10 mL。使用 NH₃·H₂O 调节 pH 值至 5.0, 121 °C灭菌 15 min^[11]。

昆虫体壁培养基(g/L): 蝗虫体壁 20.0, KNO₃ 3.0, M-100 盐母液 62.50 mL。调节 pH 值至 7.0, 121 °C灭菌 15 min。

1% YPD 培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 酵母提取物 10.0, 葡萄糖 10.0。121 °C灭菌 15 min。

色谱级乙腈、甲醇、水、分析级乙酸乙酯和甲醇, 江苏强盛功能化学股份有限公司; 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa 公司; 酵母转化试剂盒 Frozen EZ Yeast Transformation II, ZYMO Research 公司。

高效液相色谱仪、半制备液相色谱仪, 安捷伦公司; 核磁共振波谱仪, Bruker 公司; 数字旋光仪, Jasco 公司; 光谱仪, Stellarnet 公司。

1.2 方法

1.2.1 酿酒酵母工程菌株 CLB2 的构建及发酵

在昆虫体壁培养基上培养罗伯茨绿僵菌 ARSEF 23, 采用 Trizol 法提取 RNA, 使用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 反转录 PCR 反应体系: RNA 10.0 μL, RNase Free dH₂O 4.0 μL, 5×PrimeScript buffer 2 4.0 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix1 1.0 μL, RT Primer Mix 1.0 μL, 反转录 PCR 反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 保存。设计引物(表 1)分别扩增 *ova* 基因簇上的 *Mr_OvaA*、*Mr_OvaB* 和 *Mr_OvaC* 基因(序列两端带有 *Nde* I和 *Pme* I酶切位点)^[12], 使用 *Nde* I和

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Primers information used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>Mr_OvaA</i> -F1	GATGACGACAAGCTTCATATGATGAAACTGCGTGTCGCAA	2 011
<i>Mr_OvaA</i> -R1	ACGAGATGCTGTTGGCCTCT	
<i>Mr_OvaA</i> -F2	AGAGGCCAACAGCATCTCGTACGTGGAGATGCATG GAACTGG	3 130
<i>Mr_OvaA</i> -R2	GTGATGGTGATGTCCGTTTAAACCTACCCTACCGCC GCAAT	
<i>Mr_OvaB</i> -F1	GATGACGACAAGCTTCATATGATGCAAGCGCCAGCA CCA	3 858
<i>Mr_OvaB</i> -R1	GATTGCTGGCTTCCACTCGA	
<i>Mr_OvaB</i> -F2	TCGAGTGGAAGCCAGCAATCGACTTGTTGACCGGT GAGCA	3 710
<i>Mr_OvaB</i> -R2	GTGATGGTGATGTCCGTTTAAACCTAGTTCAATTTC ACCAAAGT	
<i>Mr_OvaC</i> -F	GATGACGACAAGCTTCATATGATGGCCGTCACCGTG TGG	1 182
<i>Mr_OvaC</i> -R	GTGATGGTGATGTCCGTTTAAACTCATGACTGGCTC ACTCGC	

Pme I酶切 pXK30F、pXW06F 和 pRS425m 质粒, 获得的载体片段分别与上述基因片段连接, 得到重组质粒 pXK30F-*Mr_OvaA*、pXW06F-*Mr_OvaB* 和 pRS425m-*Mr_OvaC*。将 3 个重组质粒共同导入酿酒酵母 BJ5464-*npqA* 中, 筛选获得阳性转化子 CLB2。

挑取上述筛选获得的酵母阳性转化子单菌落转接至 SC-3aa 液体培养基中, 于 30 °C、200 r/min 培养 48 h 获得种子液, 以 1% 的比例转接 7 L 发酵培养基, 30 °C、200 r/min 培养 72 h。使用等体积乙酸乙酯反复萃取 3 次, 合并有机相后旋蒸去除乙酸乙酯获得 CLB2 次级代谢产物粗提物。粗提物使用色谱级甲醇复溶, 采用高效液相色谱仪 Agilent 1100 检测, 色谱柱型号为 SepaxHP-C18 (4.6 mm×250 mm, Waters), 流动相为乙腈和水, 洗脱条件为 10%–95% 乙腈(0–27 min), 流速 0.8 mL/min, 柱温 30 °C, 波长 254 nm 下检测, 进样量 20 μ L。

1.2.2 SA 的分离纯化及结构鉴定

使用硅胶柱层析法对 SA 进行分离。使用正己烷-乙酸乙酯进行洗脱(组分 A, 正己烷, 300 mL; 组分 B, 正己烷:乙酸乙酯 50:1; 组分 C, 正己烷:乙酸乙酯 30:1; 组分 D, 正己烷:乙酸乙酯 20:1; 组分 E, 正己烷:乙酸乙酯 10:1; 组分 F, 正己烷:乙酸乙酯 5:1; 组分 G, 正己烷:乙酸乙酯 2:1; 组分 H, 乙酸乙酯, 300 mL)。组分 F 通过 Waters Delta Prep 4000 半制备液相色谱仪(5 μ m×10 mm×250 mm)进一步分离, 乙腈(0.1% TFA):水(0.1% TFA)从 10%至 95%梯度洗脱 30 min, 收集获得 SA。

采用核磁共振波谱仪获取 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、1D-NOESY 和 2D NMR (^1H - ^1H COSY, HSQC 和 HMBC)光谱。 ^1H NMR 在 400 MHz 检测, ^{13}C NMR 在 100 MHz 检测。化学位移值(δ)以百万分率(mg/L)为单位, 耦合常数(J 值)以

Hz 为单位。化学位移值分别参考 CD_3OD 、 CD_3COCD_3 和 CDCl_3 的残留溶剂峰。使用 Jasco DIP-370 数字旋光仪测量旋光度, 微量比色池 10 cm。精确质量测量使用 Mariner ESI-TOF 光谱仪联合 Agilent 1200 HPLC 进行。

1.2.3 SA 标准溶液配制

使用甲醇溶解 SA 标准品, 分别配制成浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0 和 4.0 g/L 的 SA 标准溶液, 进行 HPLC 分析, 进样量 20 μ L, 以 SA 浓度为横坐标、以峰面积为纵坐标绘制 SA 标准曲线。

1.2.4 单因素试验

试验所用 20 mL 的发酵液在 50 mL 锥形瓶中进行摇瓶发酵, 加入等体积乙酸乙酯获得粗提物, 使用 1 mL 甲醇复溶。以 1 mL 甲醇中 SA 浓度为评价指标, 对发酵培养基中碳源种类(葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乙醇和甘油), 氮源(NH_4) $_2$ SO $_4$ 添加量(2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 和 15.00 g/L), MgSO $_4$ 添加量(0.512 5、1.025、1.537、2.050、4.010 和 6.150 g/L), KH $_2$ PO $_4$ 添加量(4.00、6.00、8.00、10.00 和 12.00 g/L), 维生素溶液添加量(2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 和 12.00 mL/L), 以及微量元素添加量(3.00、6.00、9.00、12.00 和 15.00 mL/L)这 6 个因素进行单因素试验筛选, 分析各个因素对 CLB2 产 SA 的影响。

1.2.5 Plackett-Burman 试验设计

根据酿酒酵母的发酵特点和单因素试验结果, 以影响 SA 发酵的 6 个因素(碳源、氮源、MgSO $_4$ 、KH $_2$ PO $_4$ 、维生素溶液和微量元素)作为 PB 设计的 6 个因子(A、B、C、D、E 和 F), 每个因素选取 2 个水平, 表示为低水平(-1)和高水平(+1)。试验选用 $n=11$ 的 PB 设计, 预留 5 个虚拟项(G、H、I、J 和 K)做误差分析, 试验重复 3 次取平均值, 试验因素水平设计见表 2。

表 2 PB 试验设计的因素与水平

Table 2 Factors and levels of PB design experiment

Factor	-1	1
A: Carbon source (g/L)	5.000	15.00
B: Nitrogen source (g/L)	2.000	6.00
C: MgSO ₄ (g/L)	1.537	4.01
D: KH ₂ PO ₄ (g/L)	6.000	10.00
E: Vitamin solution (mL/L)	6.000	12.00
F: Trace metal element (mL/L)	8.000	12.00

1.2.6 最陡爬坡试验设计

根据 Plackett-Burman 试验结果设计显著影响因子合适的步长和爬坡方向, 其他因子的浓度为初始添加浓度, 试验重复 3 次取平均值, 以此找到响应面试验的中心点。

1.2.7 响应面设计

根据最陡爬坡试验确定的中心点, 通过中心组合针对显著影响因子设计三因素三水平的响应面分析试验, 其他次要因素均取初始浓度进行试验, 重复 3 次取平均值。

1.2.8 数据处理

采用 Design Expert 8.0 软件进行 Plackett-Burman 试验、CCD 响应面优化试验设计和试验数据处理。

2 结果与分析

2.1 重组酿酒酵母 CLB2 的构建及产物鉴定

将质粒 pXK30F-*Mr_OvaA*、pXW06F-*Mr_OvaB* 和 pRS425m-*Mr_OvaC* 转化酿酒酵母 BJ5464-*npaA*, 涂布在 SC-3aa 营养缺陷型培养基上, 筛选获得阳性转化子 CLB2。使用 7 L 1% YPD 培养基发酵 3 d, 发酵液分离提纯后得到 2.5 g 粗提物, 粗提物使用色谱级甲醇复溶, 进样浓度为 5 g/L, 使用高效液相色谱检测, 结果如图 2A 所示。相较于空酵母对照组, CLB2 主要可以合成化合物 1 及一系列副产物(化合物 2-4, 波长 254 nm 下检测)。紫外吸收光谱显示化合物 1 在波长 214、262 和 300 nm 处有吸收(图 2B)。

对化合物 1 进行分离纯化和结构鉴定。化合物 1 为白色无定形粉末。HR ESI-MS 在 m/z 251.135 0 处出现 $[M-H]^-$ 峰(理论计算值为 252.136 2, 实验值 253.145 6 与之接近), 分子式为 C₁₄H₂₀O₄ (图 3)。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 谱中(图 4)提示结构中存在一个 1,2,3,5-四取代苯环片段、一个甲基质子信号及一系列饱和脂

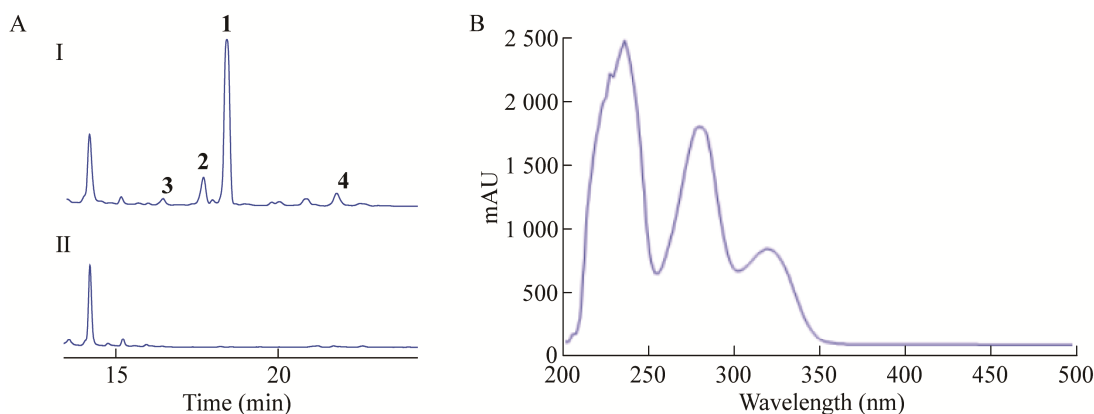


图 2 酿酒酵母次级代谢产物图谱 A: BJ5464-*npaA* 转化提取物 HPLC 分析, I: CLB2, II: BJ5464. B: 化合物 1 紫外吸收光谱

Figure 2 *Saccharomyces cerevisiae* secondary metabolite. A: HPLC profiles of extracts of BJ5464-*npaA* transformants, I: CLB2, II: BJ5464. B: UV absorption spectrum of compound 1.

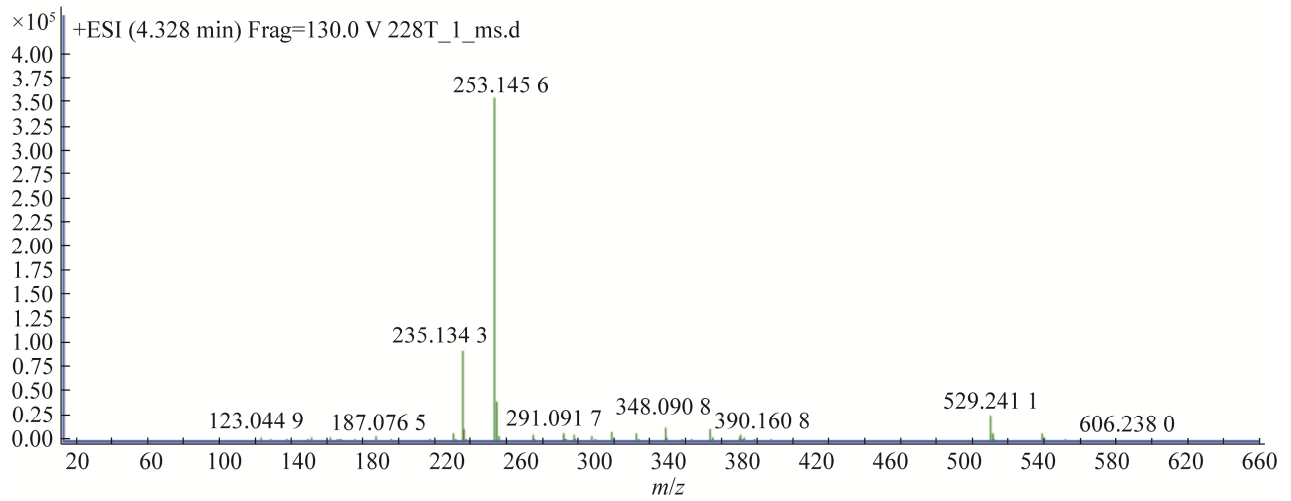


图3 化合物1的高分辨ESI质谱分析

Figure 3 High-resolution ESI mass spectrometry analysis of compound 1.

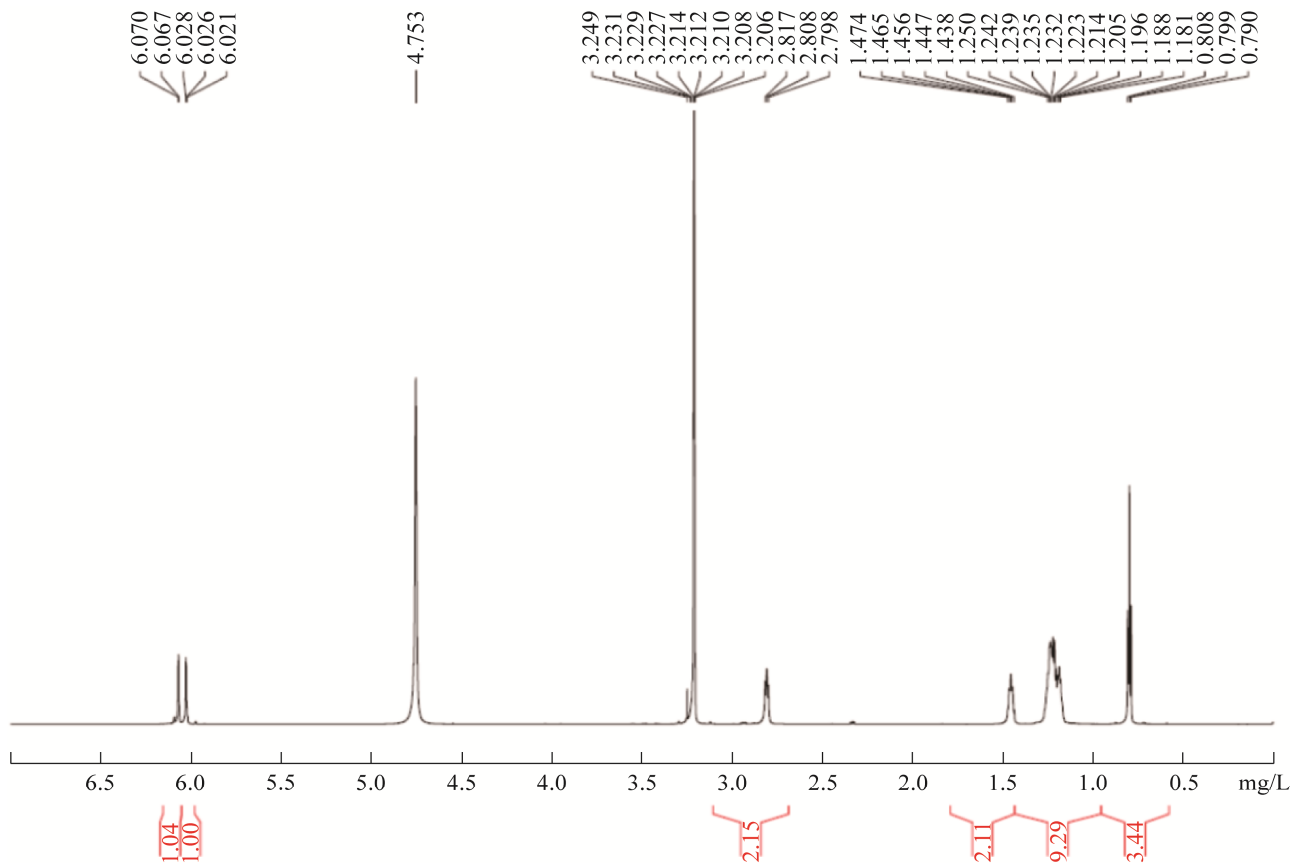


图4 化合物1的氢谱(400 MHz)数据(CD₃OD)

Figure 4 ¹H NMR spectrum (400 MHz) of compound 1 in CD₃OD.

肪烃质子信号。 ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)谱(图 5)中显示 14 个碳信号。结合已报道文献[13], 鉴定化合物 **1** 为 SA (图 6)。

2.2 SA 标准曲线

将配制的不同浓度 SA 标准溶液进行 HPLC 分析, 以 SA 浓度为横坐标、以峰面积为纵坐标绘制 SA 标准曲线, 如图 7 所示, 峰面积(y)=SA 浓度(x) $\times 0.4487 + 0.0297$, 确定系数 $R^2 = 0.9982$ 。SA 在 0–4.5 g/L 之间时具有良好的线性关系, 可以用于定量分析。

2.3 单因素试验结果

2.3.1 碳源对 SA 产量的影响

碳源对微生物生长代谢具有关键作用, 可为细胞提供骨架及能量^[14]。确定合适的碳源不仅可以促进菌体生长, 还可提高 SA 的产量。

本试验分别以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乙醇、甘油为唯一碳源, 确定合适的碳源。

碳源优化结果如图 8A 所示, 不同碳源对 SA 的合成影响较大, 当蔗糖作为唯一碳源时, 1 mL 甲醇中 SA 的浓度最高为(1.274 \pm 0.018) g/L, 即 SA 产率为(63.70 \pm 0.09) mg/L。进一步探究不同蔗糖浓度(5.00、10.00、15.00、20.00 和 25.00 g/L)对 SA 合成产量的影响, 结果如图 8B 所示, 当蔗糖浓度为 10.00 g/L 时, 1 mL 甲醇中 SA 浓度提高到(1.294 \pm 0.020) g/L, 即 SA 产率为(64.70 \pm 0.10) mg/L。本试验发现蔗糖的 SA 合成产量相较于其他碳源更高, 可能是由于蔗糖为二糖, 相同浓度下提供的能量较单糖多; 并且产生的次生代谢产物如乙醇含量高, 更有利于酵母表达载体上 ADH2p 启动子的激活, SA 合成相

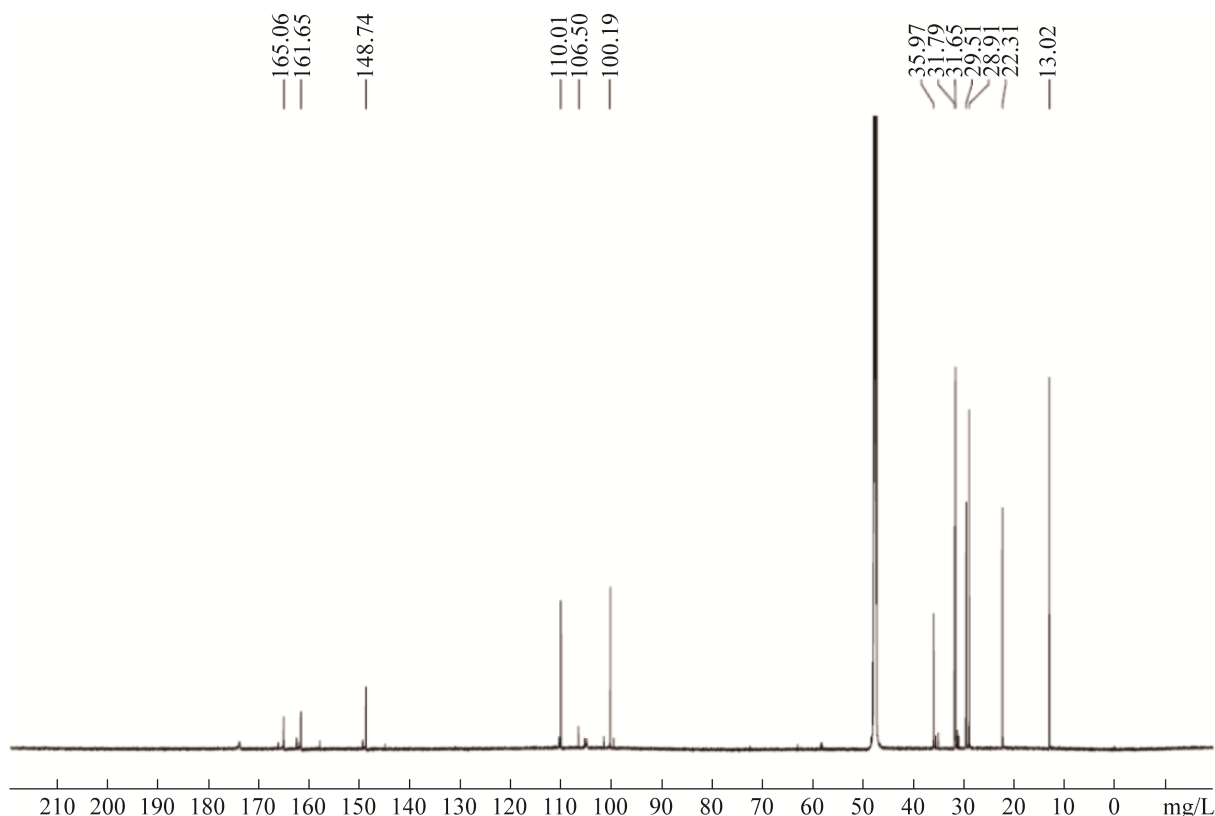


图 5 化合物 **1** 的碳谱(100 MHz)数据(CD_3OD)

Figure 5 ^{13}C NMR spectrum (100 MHz) of compound **1** in CD_3OD .

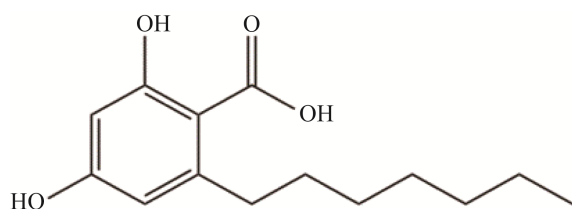


图 6 化合物 1 结构

Figure 6 Structure of compound 1.

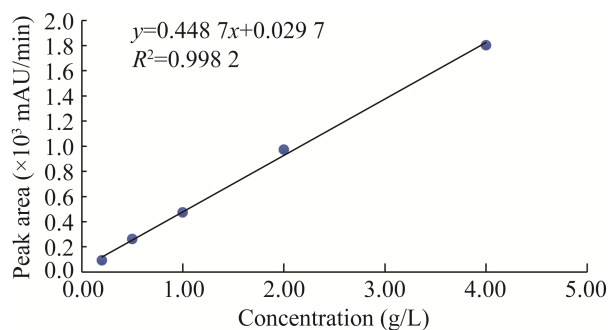


图 7 HPLC 法测定 SA 标准曲线

Figure 7 Determination of SA standard curve by HPLC.

关基因表达量提高^[15];此外,蔗糖作为碳源可更好地维持培养基内的低渗环境。

2.3.2 氮源对 SA 产量的影响

氮源主要用于菌体细胞物质和含氮代谢物的合成^[16]。本试验以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源,分别添加 2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 和 15.00 g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,探究其对发酵的影响。

氮源优化结果如图 9 所示,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量为 4.00 g/L 时,1 mL 甲醇中 SA 的浓度最高为 (0.700 ± 0.010) g/L,即 SA 产率为 (35.00 ± 0.05) mg/L。氮源过多会导致菌体生长旺盛,pH 值偏高,不利于代谢产物合成与积累,但如果氮源不足则会导致菌体量减少、SA 产量下降。

2.3.3 无机盐对 SA 产量的影响

二价阳离子如镁离子可以激活 SA 合成关键酶芳香族烯丙基转移酶,对酶的活性具有重要影响^[17]。研究不同浓度(0.512 5、1.025 0、

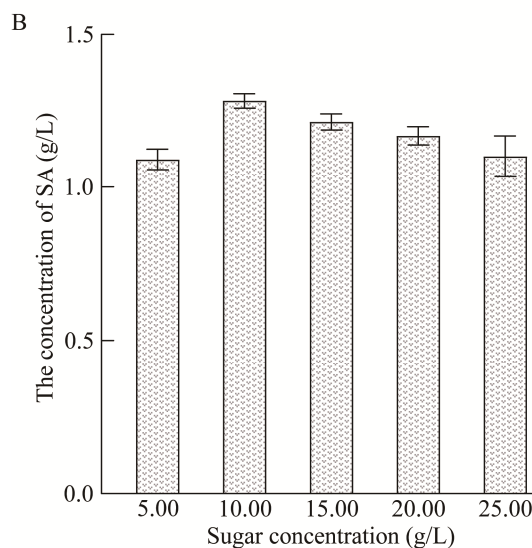
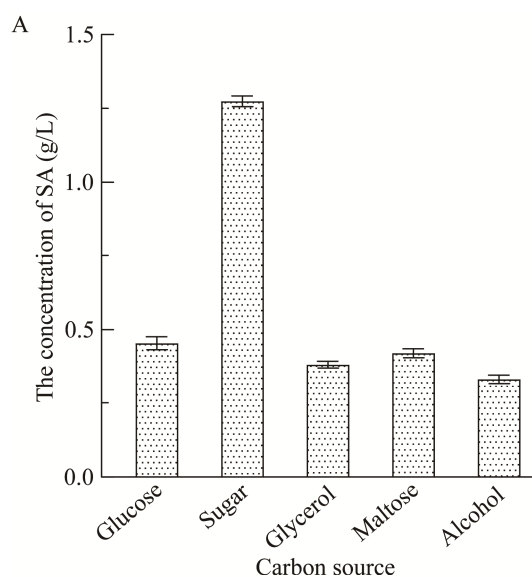


图 8 碳源种类对 SA 浓度的影响 A: 不同碳源对 SA 浓度影响. B: 蔗糖浓度对 SA 浓度影响

Figure 8 Effects of different carbon sources on the SA concentration. A: Influence of different carbon sources on SA concentration. B: Effect of sucrose concentration on SA concentration.

1.537 0、2.050 0、4.010 0 和 6.150 0 g/L) MgSO_4 对 SA 产量的影响,结果如图 10A 所示。当添加 2.050 0 g/L 硫酸镁时,1 mL 甲醇中 SA 浓度最高,达到 (0.555 ± 0.011) g/L,即 SA 产率为 (27.750 ± 0.055) mg/L。

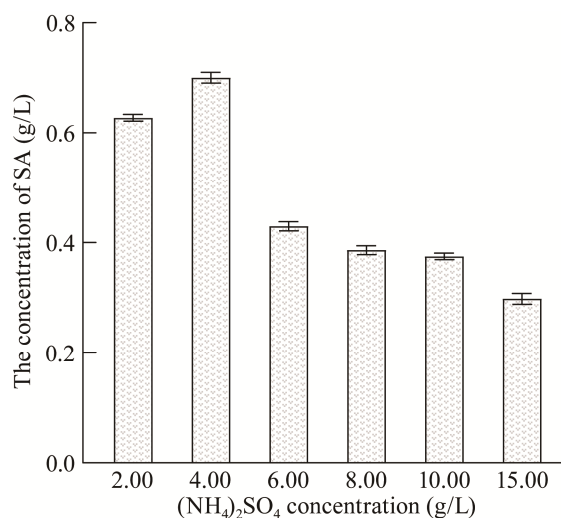


图 9 (NH₄)₂SO₄ 添加量对 SA 浓度的影响
Figure 9 Effects of (NH₄)₂SO₄ addition on the SA concentration.

KH₂PO₄ 能够稳定培养基 pH, 维持细胞渗透压, 提供的磷元素可作为 ATP 等高能分子的成分^[18], 同时钾离子对细胞内酶活具有至关重要的作用。通过添加 4.00、6.00、8.00、10.00 和 12.00 g/L 的 KH₂PO₄, 确定最适添加量。结果如图 10B 所示, 当添加量为 8.00 g/L 时, 1 mL 甲醇中 SA 浓度最高, 达到(0.746±0.009) g/L, 即 SA 产率为(37.300±0.045) mg/L。

2.3.4 其他因素对 SA 产量的影响

维生素对微生物物质代谢、生长发育具有重要作用, 同时部分维生素也是酶的一种重要组成成分^[19]。本研究分别添加不同浓度的维生素溶液 (2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 和 12.00 mL/L), 检测 SA 产量以确定最适维生素添加量。结果如图 11A 所示, 当维生素溶液为 8.00 mL/L 时, 1 mL 甲醇中 SA 浓度最高达到(0.343±0.005) g/L, 即 SA 产率为(17.150±0.025) mg/L。

微量元素元素如铁、锰、钴等在细胞内可作为辅因子参与细胞代谢, 影响细胞活性。本试验探究了不同浓度(3.00、6.00、9.00、12.00

和 15.00 mL/L)微量元素对 SA 产量的影响, 结果如图 11B 所示。当微量元素溶液为 6.00 mL/L 时, 1 mL 甲醇中 SA 浓度最高达到(0.527±0.009) g/L, 即 SA 产率为(26.350±0.045) mg/L。

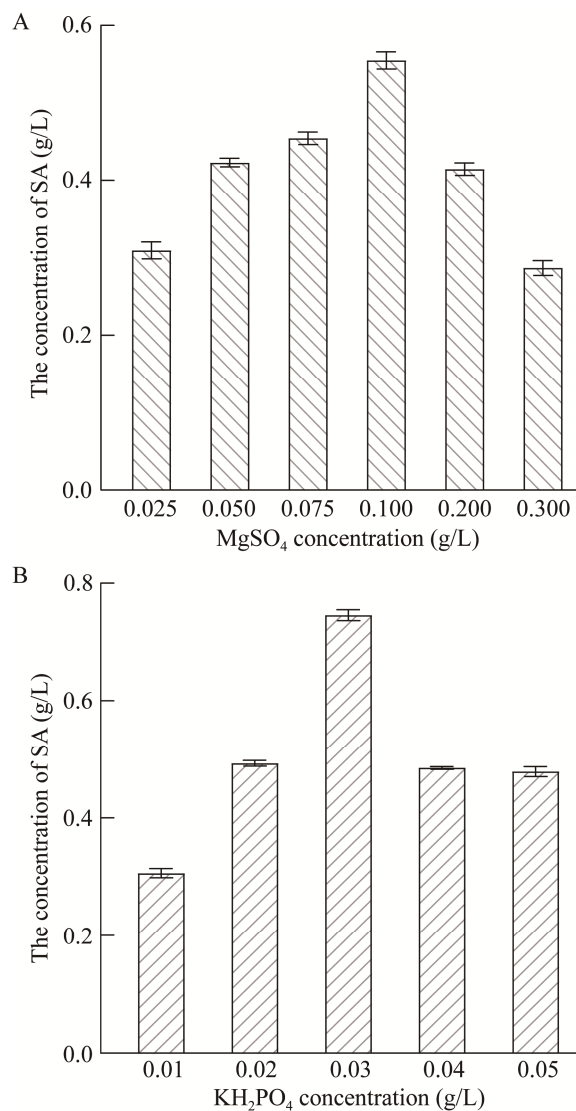


图 10 无机盐对 SA 浓度的影响 A: MgSO₄ 添加量对 SA 浓度的影响. B: KH₂PO₄ 添加量对 SA 浓度的影响

Figure 10 Effects of Inorganic salt on the SA concentration. A: Effect of MgSO₄ addition on SA concentration. B: Effect of KH₂PO₄ addition on SA concentration.

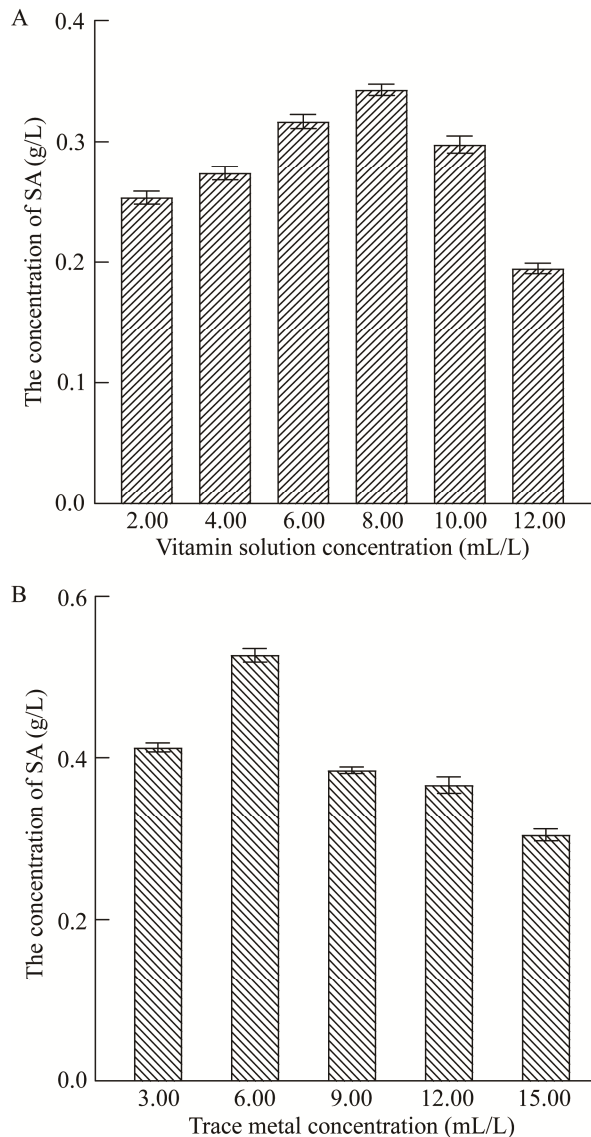


图 11 其他因素对 SA 浓度的影响 A: 维生素溶液添加量对 SA 浓度的影响. B: 微量金属溶液添加量对 SA 浓度的影响

Figure 11 Effects of other factors addition on the SA concentration. A: Effects of vitamin solution addition on the SA concentration. B: Effects of trace metal addition on the SA concentration.

通过单因素试验获得发酵培养基配方为: 蔗糖 10.00 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量 4.00 g/L, MgSO_4 添加量 2.05 g/L, KH_2PO_4 添加量 8.00 g/L, 维生素溶液添加量 8.00 mL/L, 微量金属元素添加量

6.00 mL/L。优化试验在此改良的发酵培养基基础上进行。

2.4 Plackett-Burman 设计

Plackett-Burman 试验结果见表 3, 以 SA 产量(R , g/L)作为响应值, 对数据进行回归分析得到关于响应值的多元一次回归方程: $R_1=1.58-0.034A-0.026B-0.00058C-0.045D-0.041E-0.013F$, 决定系数 $R_2=0.9927$ 。对表 3 数据进行方差分析, 结果见表 4。方差分析表明因素 A 、 D 和 E 均显著($\text{Prob}>F<0.05$), 变量 A 、 D 和 E 是构建模型的主要影响因子。

2.5 最陡爬坡试验结果

根据 Plackett-Burman 试验得到的多元一次方程可知, 因素 A 、 D 和 E 在方程中的系数为负值, 表明其在模型中为负效应, 最陡爬坡试

表 3 Plackett-Burman 设计试验结果

Table 3 Results of Plackett-Burman design experiment

No.	A	B	C	D	E	F	R (g/L)
1	15.0	2.0	4.010	10.0	12.0	3.0	1.501
2	15.0	2.0	4.010	10.0	6.0	9.0	1.538
3	5.0	6.0	1.537	10.0	12.0	3.0	1.506
4	5.0	2.0	1.537	10.0	6.0	9.0	1.625
5	15.0	6.0	1.537	10.0	12.0	9.0	1.425
6	5.0	6.0	4.010	6.0	12.0	9.0	1.568
7	5.0	2.0	4.010	6.0	12.0	9.0	1.636
8	5.0	6.0	4.010	10.0	6.0	3.0	1.593
9	15.0	6.0	4.010	6.0	6.0	3.0	1.620
10	15.0	2.0	1.537	6.0	12.0	3.0	1.580
11	15.0	6.0	1.537	6.0	6.0	9.0	1.591
12	5.0	2.0	1.537	6.0	6.0	3.0	1.736

表 4 Plackett-Burman 设计方差分析

Table 4 Analysis of variance (ANOVA) for Plackett-Burman design experiment

Factor	Low level (-1)	High level (+1)	F	P
A	5.000	15.00	138.5	<0.000 1
B	2.000	6.00	81.14	0.000 3
C	1.537	4.01	0.041	0.848 3
D	6.000	10.00	244.2	<0.000 1
E	6.000	12.00	196.43	<0.000 1
F	3.000	9.00	19.39	0.007 0

验需减少其实际浓度。最陡爬坡试验的设计结果见表 5。由表 5 可知, 试验 3 的 SA 浓度最高, 因此以试验 3 的培养基配方作为响应面设计的中心点。

2.6 响应面设计结果

响应面试验设计的因素与水平见表 6, 试验设计及结果见表 7。使用 Design Expert 8.0 软件对试验结果进行二次回归, 得到的响应值拟合方程为 $R_1=1.77+0.094\ 8A+0.2485B+0.055\ 2C-0.118\ 5AB-0.090\ 5AC+0.147\ 3BC-0.099\ 0A^2-0.240\ 8B^2-0.168\ 2C^2$, 决定系数 $R^2=0.982\ 9$ 。

对表 7 数据进行方差分析, 结果见表 8。由表 8 可知, 模型的 P 值 $<0.000\ 1$, 表明自变量和因变量之间的线性关系极显著, 所建立的回归方程和曲面有较好的拟合。模型的决定系数 $R^2=0.982\ 9$, 表明模型拟合度高、可信性高, 可以利用此模型分析 SA 产量的变化。回归使用 3-D Surface 绘制响应面三维曲线, 如图 8 所示, 可直观地表现各因素对响应值的影响趋势, 此响应面的最高点在模型的设计范围之内, 说

表 5 最陡爬坡设计试验结果

Table 5 Results of the steepest ascent design experiment

No.	<i>A</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>R</i> (g/L)
1	10.00	8.0	8.0	1.476
2	8.75	7.0	7.0	1.561
3	7.50	6.0	6.0	1.863
4	6.25	5.0	5.0	1.250
5	5.00	4.0	4.0	1.180
6	5.00	3.0	3.0	0.726

表 6 CCD 设计试验的因素与水平

Table 6 Factors and levels of CCD design experiment

Factor	Level		
	-1	0	1
<i>A</i> (g/L)	6.25	7.5	8.75
<i>D</i> (g/L)	5.00	6.0	7.00
<i>E</i> (mL/L)	5.00	6.0	7.00

表 7 CCD 试验设计及结果

Table 7 Design and results of CCD design experiment

No.	<i>A</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>R</i> (g/L)
1	7.50	6.0	6.0	1.800
2	7.50	6.0	6.0	1.872
3	7.50	6.0	6.0	1.836
4	7.50	5.0	5.0	1.753
5	6.25	7.0	6.0	1.795
6	7.50	7.0	5.0	1.659
7	8.75	7.0	6.0	1.523
8	7.50	6.0	6.0	1.875
9	6.25	6.0	7.0	1.657
10	6.25	6.0	5.0	1.722
11	8.75	6.0	5.0	1.755
12	7.50	7.0	7.0	1.655
13	8.75	5.0	5.0	1.630
14	7.50	6.0	5.0	1.818
15	6.25	5.0	5.0	1.587
16	7.50	5.0	7.0	1.435
17	8.75	6.0	7.0	1.400

表 8 响应面二次模型的方差分析

Table 8 Analysis of variance (ANOVA) for response surface second-order polynomial equation

Source	Sum of squares	Mean square	<i>F</i>	<i>P</i> (Prob> <i>F</i>)
Model	0.325 9	0.036 2	44.63	<0.000 1
<i>A-A</i>	0.014 4	0.014 4	17.71	0.004 0
<i>B-B</i>	0.020 3	0.020 3	24.97	0.001 6
<i>C-C</i>	0.001 5	0.001 5	1.81	0.220 0
<i>AB</i>	0.025 0	0.025 0	30.77	0.000 9
<i>AC</i>	0.021 0	0.021 0	25.84	0.001 4
<i>BC</i>	0.024 7	0.024 7	30.43	0.000 9
<i>A</i> ²	0.041 3	0.041 3	50.91	0.000 2
<i>B</i> ²	0.048 2	0.048 2	59.46	0.000 1
<i>C</i> ²	0.048 8	0.048 8	60.16	0.000 1

明此响应面的变量设计较好, 可以进行后续分析以求得响应值最高点。

图 12A 为维生素溶液添加量处于中心水平 6.00 mL/L 时蔗糖浓度与 KH_2PO_4 添加量之间的交互作用, 可知 SA 产量随蔗糖浓度和 KH_2PO_4 添加量的提高先增加后降低。图 12B 为 KH_2PO_4

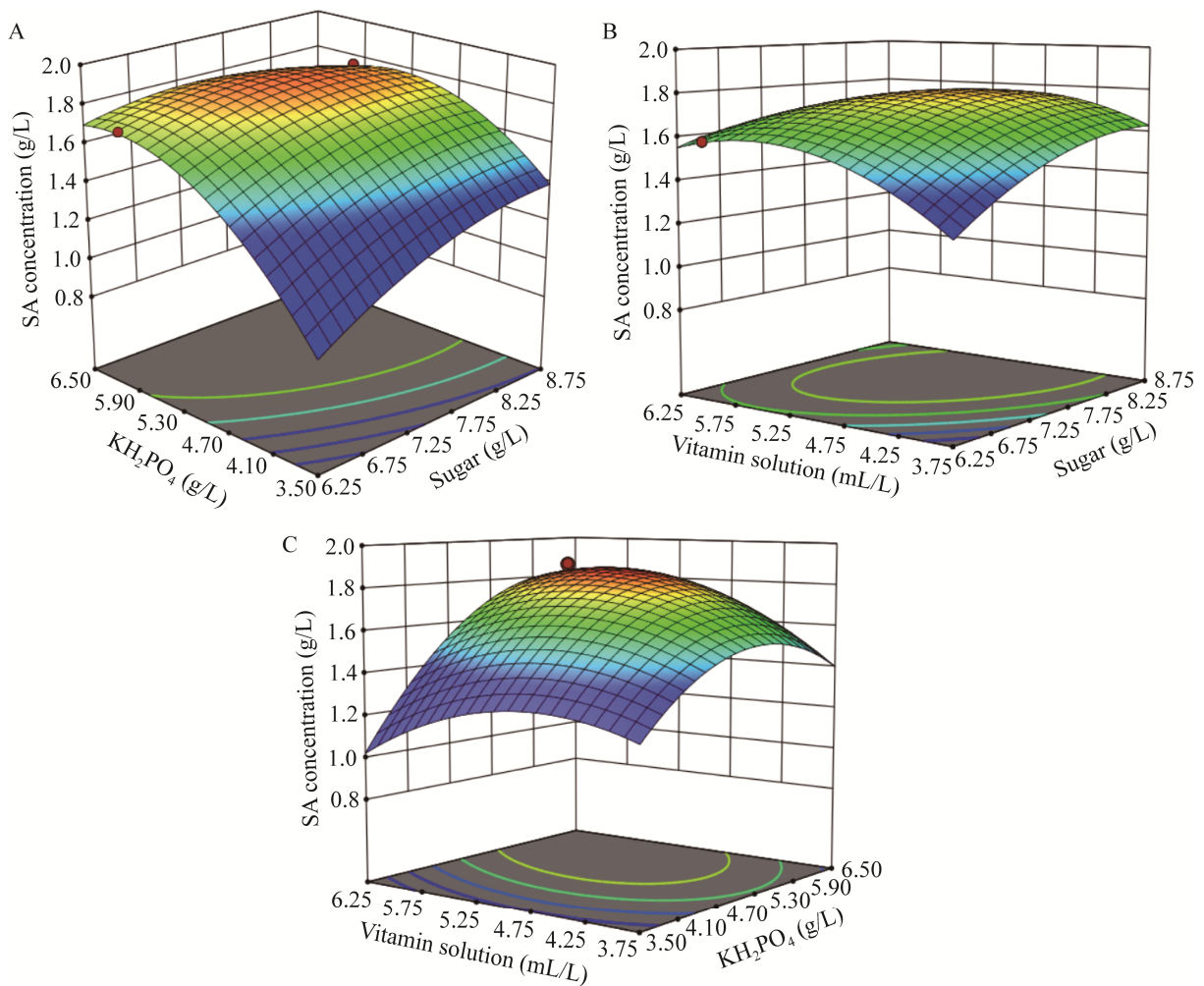


图 12 各因素对 SA 浓度交互影响的三位曲面图 A: 蔗糖和 KH_2PO_4 添加量的相互影响. B: 蔗糖和维生素溶液添加量的相互影响. C: KH_2PO_4 添加和维生素溶液添加量的相互影响

Figure 12 Surface of mutual-influence for different factors on the SA concentration. A: Mutual-influence for sugar and KH_2PO_4 addition. B: Mutual-influence for sugar and vitamin solution addition. C: Mutual-influence for KH_2PO_4 addition and vitamin solution addition.

添加量处于中心水平 6 g/L 时蔗糖浓度和维生素溶液添加量之间的交互作用, 可知 SA 产量随蔗糖浓度和维生素溶液添加量的提高先增加后降低。图 12C 为蔗糖浓度处于中心水平 7.5 g/L 时 KH_2PO_4 添加量和维生素溶液添加量之间的交互作用, 可知 SA 产量随 KH_2PO_4 添加量和维生素溶液添加量的提高先增加后降低。

利用软件预测响应值最大值, 模型各因素

组合为蔗糖 7.26 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.08 g/L、维生素溶液 5.67 mL/L, 1 mL 甲醇中 SA 预测浓度最大值为 1.862 g/L, 即 SA 产率最大为 93.10 mg/L。

2.7 验证试验结果

为了验证响应面设计结果的可靠性, 以响应面试验确定的主要因素的最优组合配制培养基进行摇瓶发酵, 重复 3 次。最优培养基发酵结果如图 13 所示, 结果显示在 0–20 h, 工程菌

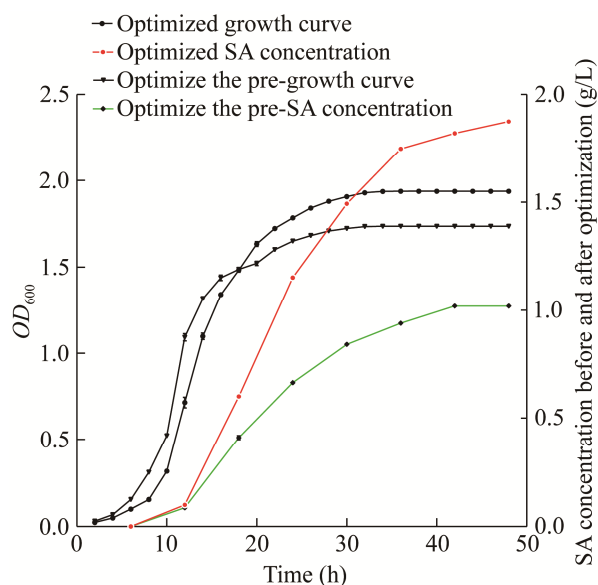


图 13 工程菌株生长曲线及 SA 浓度变化
Figure 13 Growth curve of engineering strain and change of SA concentration.

株在最优培养基中生物量相较于初始培养基中生物量低,但最终生物量最优培养基较初始培养基高 12%,在最优条件下,1 mL 甲醇中 SA 的浓度可达(1.875±0.043) g/L,即 SA 产率最大为 93.75 mg/L。

3 讨论与结论

SA 作为大麻素前体物在临床医药中有重要的作用,但植物大麻素的生产受法律限制,丰度低、大麻素结构的复杂性导致了化学合成受限,而对大麻素生物合成的研究目前较少,仅在构巢曲霉、大肠杆菌、毕赤酵母中有报道,且依然存在效率低、发酵周期长等问题^[5,8]。另外,目前对大麻素生物合成的研究主要集中在高效产大麻素前体物工程菌株的构建上,需要从植物大麻中克隆 OA 合酶和 OA 环化酶编码基因,这存在较大的局限性。

本试验从罗伯茨绿僵菌中克隆聚酮合酶编码基因,在酿酒酵母中成功构建了大麻素合成

中间产物 OA 及其类似物 SA 的工程菌株 CLB2,为生物合成大麻素提供了新的策略。另外,对大麻素生物合成工程菌株发酵工艺的研究较少,本试验通过单因素试验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和响应面设计等方法优化发酵培养基,优化后发酵培养基各组分最佳浓度分别为:蔗糖 7.26 g/L、KH₂PO₄·7H₂O 6.08 g/L、维生素溶液 5.67 mL/L、(NH₄)₂SO₄ 4.00 g/L、MgSO₄ 2.05 g/L 和微量金属元素溶液 6.00 mL/L,使用优化后的培养基培养工程菌株较优化前培养基中工程菌株生物量提高了 12%,SA 产量提高到 93.75 mg/L,较优化前 SA 产量 63.75 mg/L 提高了 47%。本研究构建的酿酒酵母工程菌株 CLB2 具有发酵周期短、安全性高、易操作等优点,且后续仍可通过宿主细胞改造、基因编辑等方法来提高 SA 产量。本试验结果可为后续 SA 和大麻素及其衍生物的研究提供可靠的理论支持。

REFERENCES

- [1] RUSSO EB. Beyond *Cannabis*: plants and the endocannabinoid system[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2016, 37(7): 594-605.
- [2] RUSSO EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects[J]. British Journal of Pharmacology, 2011, 163(7): 1344-1364.
- [3] JÄRVINEN T, PATE DW, LAINE K. Cannabinoids in the treatment of glaucoma[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2002, 95(2): 203-220.
- [4] ANDRE CM, HAUSMAN JF, GUERRIERO G. *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 19.
- [5] LIU XN, DING WT, JIANG HF. Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 125.
- [6] GÜLCK T, BOOTH JK, CARVALHO, KHAKIMOV B, CROCOLL C, MOTAWIA MS, MØLLER BL, BOHLMANN J, GALLAGE NJ. Synthetic biology of cannabinoids and cannabinoid glucosides in *Nicotiana*

- benthamiana* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Natural Products, 2020, 83(10): 2877-2893.
- [7] ISMED F, FARHAN A, BAKHTIAR A, ZAINI E, NUGRAHA YP, DWICHANDRA PUTRA O, UEKUSA H. Crystal structure of olivetolic acid: a natural product from *Cetrelia sanguinea* (Schaer.)[J]. Acta Crystallographica Section E, Crystallographic Communications, 2016, 72(Pt 11): 1587-1589.
- [8] GAGNE SJ, STOUT JM, LIU EW, BOUBAKIR Z, CLARK SM, PAGE JE. Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(31): 12811-12816.
- [9] TAN ZG, CLOMBURG JM, GONZALEZ R. Synthetic pathway for the production of olivetolic acid in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(8): 1886-1896.
- [10] LUO XZ, REITER MA, D'ESPAUX L, WONG J, DENBY CM, LECHNER A, ZHANG YF, GRZYBOWSKI AT, HARTH S, LIN WY, LEE H, YU CH, SHIN J, DENG K, BENITES VT, WANG G, BAIDOO EEK, CHEN Y, DEV I, PETZOLD CJ, KEASLING JD. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast[J]. Nature, 2019, 567(7746): 123-126.
- [11] SHI B, MA T, YE ZL, LI XW, HUANG YL, ZHOU ZY, DING YK, DENG ZX, LIU TG. Systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lycopene overproduction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(40): 11148-11157.
- [12] OKORAFOR IC, CHEN MB, TANG Y. High-titer production of olivetolic acid and analogs in engineered fungal host using a nonplant biosynthetic pathway[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(9): 2159-2166.
- [13] RUIZ B, CHÁVEZ A, FORERO A, GARCÍA-HUANTE Y, ROMERO A, SÁNCHEZ M, ROCHA D, SÁNCHEZ B, RODRÍGUEZ-SANOJA R, SÁNCHEZ S, LANGLEY E. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2010, 36(2): 146-167.
- [14] JONES TH, BRUNNER SR, EDWARDS AA, DAVIDSON DW, SNELLING RR. 6-alkylsalicylic acids and 6-alkylresorcylic acids from ants in the genus *Crematogaster* from Brunei[J]. Journal of Chemical Ecology, 2005, 31(2): 407-417.
- [15] DASHKO S, ZHOU N, COMPAGNO C, PIŠKUR J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?[J]. FEMS Yeast Research, 2014, 14(6): 826-832.
- [16] ALBERS E, LARSSON C, LIDÉN G, NIKLASSON C, GUSTAFSSON L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(9): 3187-3195.
- [17] ZHAO JZ, BAO XM, LI C, SHEN Y, HOU J. Improving monoterpene geraniol production through geranyl diphosphate synthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(10): 4561-4571.
- [18] PÉREZ-RODRÍGUEZ N, OLIVEIRA F, PÉREZ-BIBBINS B, BELO I, DOMÍNGUEZ JM. Optimization of xylanase production by filamentous fungi in solid-state fermentation and scale-up to horizontal tube bioreactor[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 173(3): 803-825.
- [19] van HOEK P, de HULSTER E, van DIJKEN JP, PRONK JT. Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 68(5): 517-523.