

从头合成赤松素大肠杆菌工程菌的构建

梁景龙¹, 郭丽琼^{1,2}, 林俊芳^{1,2}, 蔡法及¹, 陆雅琴¹

(1. 华南农业大学食品学院, 食品生物技术研究所, 广东广州 510640)

(2. 广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510640)

摘要: 赤松素是高价值芪类保健营养品白藜芦醇的类似物, 具有预防心血管疾病、抗癌和治疗关节炎等与其相对应的多种生物活性。本研究采用基因工程手段创制出一种从头生物合成赤松素的方法, 以缓解目前赤松素供求不足的问题。把带有苯丙氨酸解氨酶(PAL), 肉桂酸辅酶A连接酶(4CL)和赤松素合酶(STS)编码基因的组成型表达载体转化高产L-苯丙氨酸大肠杆菌ATCC31884, 并通过PCR鉴定后, 获得重组工程菌株。工程菌进行摇瓶培养, 对培养液进行高效液相色谱检测, 确定工程菌具有生物合成赤松素的能力。随后通过对工程菌在不同培养时间产物生成量的比较, 结果表明, 赤松素在发酵12 h后增长缓慢, 24 h培养液中的赤松素含量最高, 为0.32 mg/L, 而其中间体肉桂酸的积累最高达到52.92 mg/L。这表明, 大肠杆菌工程菌在不添加任何前体物的情况下, 利用自身代谢从头合成赤松素, 但中间体肉桂酸的转化能力不足, 有待下一步实验进行改善。

关键词: 赤松素; 大肠杆菌; 从头合成

文章编号: 1673-9078(2017)3-74-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.012

De Novo Biosynthesis of Pinosylvin Using Engineered Escherichia coli

LIANG Jing-long¹, GUO Li-qiong^{1,2}, LIN Jun-fang^{1,2}, CAI Fa-ji¹, LU Ya-qin¹

(1. College of Food Science & Institute of Food Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

(2. Research Center for Micro-Ecological Agent Engineering & Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Pinosylvin, a stilbenoid analog of the valuable nutrient resveratrol, exhibits many biological effects, such as cardiovascular disease prevention and anticancer and anti-arthritic activities. Herein, genetic engineering procedures were used to develop a *de novo* method for pinosylvin synthesis in order to ease the current problem of low pinosylvin supply. A constitutive vector containing the phenylalanine ammonia-lyase, cinnamoyl-coenzyme A ligase, and stilbene synthase genes was transformed into the L-phenylalanine-overproducing host strain *Escherichia coli* ATCC31884. PCR identification confirmed that a recombinant bacterial strain was obtained. The engineered bacterial cells were grown in shaking culture, and the culture medium was measured by HPLC to confirm that an engineered strain with *de novo* pinosylvin biosynthetic ability had been successfully created. Testing of culture samples taken at different fermentation times revealed that the rate of pinosylvin production increased more slowly after 12 h of culture, the highest pinosylvin yield of 0.32 mg/L was reached after a 24 h fermentation, and the maximum accumulated amount of cinnamic acid was 52.92 mg/L. These results suggest that the engineered *E. coli* can employ its own metabolism to synthesize pinosylvin *de novo* without addition of any other substances. However, the conversion efficiency of cinnamic acid was low, and thus further studies are needed to improve the strain.

Key words: pinosylvin; *Escherichia coli*; *de novo* biosynthesis

赤松素(Pinosylvin), 别名银松素, 化学名称为3,5-二羟芪, 分子式为C₁₅H₁₄O₂, 分子量为226.2, 其结构和在植物中的合成途径与白藜芦醇类似(图1)。

收稿日期: 2016-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272217, 31572178); 广东省科技计划项目(2013B010404041, 2014B050505018, 2014B050505018)

作者简介: 梁景龙(1988-), 男, 博士生, 研究方向: 微生物基因组学与基因工程

通讯作者: 林俊芳(1962-), 研究员, 博士生导师, 研究方向: 食品微生物与天然产物

赤松素是一种植物次生代谢的抗毒素, 被发现存在于松树、桉树和云杉树中。近年来, 许多研究已证实白藜芦醇有众多的生物活性, 而赤松素也同样有类似的健康效用被报道, 如预防心血管疾病^[1]、抗氧化^[2]、防癌^[3]和治疗关节炎^[4]等生物活性。因此, 在保健食品和药品应用方面有着广阔的市场前景。现阶段获得赤松素的途径主要以植物提取和化学合成为主。赤松素大多数是从松树树心中进行提取, 其含量低下, 只有1~40 mg/g干重, 另外因许多结构类似物难以分离, 使得提取工艺复杂和成本昂贵^[5]。化学合成则面临反

应底物昂贵、有毒副产品、副产物分离纯化困难及环境污染的难题^[6]。与之相比,使用微生物进行赤松素的生物制备显得十分环境友好,生产周期短,培养成本低,产物提纯简便,避免了大量的有机溶剂、重金属和强酸强碱的使用。至今,利用分子生物学手段,把代谢相关酶基因导入微生物体内,进行赤松素的生物合成已取得了一定进展。

的 *sts* 基因转化到大肠杆菌中,宿主能利用 3 mM 肉桂酸转化成 20 mg/L 的赤松素。Siyuan 等^[8]成功地把来源于三叶草 (*Trifolium pretense*) 的 *pal* 基因、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 *4cl* 基因和花生的 *sts* 基因转化到大肠杆菌中,宿主能把 3 mM L-苯丙氨酸转化为 13 mg/L 的赤松素,成功降低了底物成本。Philana 等^[9]使用了价格昂贵的浅蓝菌素抑制脂肪酸代谢,最终使大肠杆菌把 3 mM L-苯丙氨酸转化为 91 mg/L 的赤松素,此报道也是目前使用微生物表达赤松素能得到的最高产量。

然而,所有已报道的研究基本都需要在培养过程中额外地添加昂贵的底物和有毒的诱导物,并不适合大规模的工业化生产。为此,我们构建了无需诱导物的组成型表达载体,该载体带有大肠杆菌甘油醛三磷酸脱氢酶基因的启动子 (pGAP),粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 的 *pal* 基因、拟南芥的 *4cl* 基因和酿酒葡萄 (*Vitis vinifera*) 的 *sts* 基因。表达宿主则选用一株经遗传改造的大肠杆菌 ATCC31884,利用它本身丰富的 L-苯丙氨酸代谢池,使其从头生物合成赤松素。我们相信,此研究能为日后工业化生产赤松素及其类似活性物打下基础。

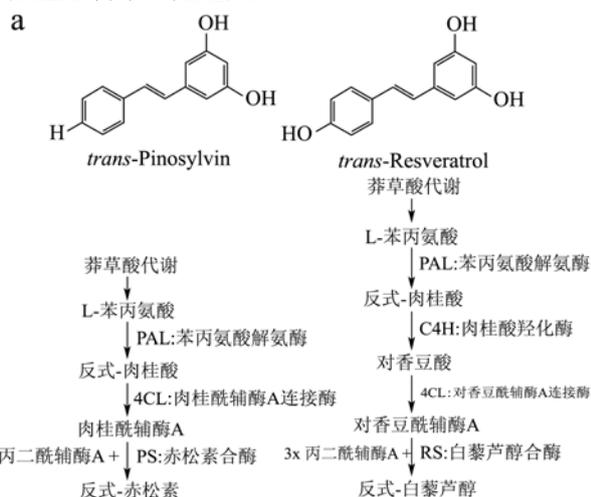


图1 赤松素和白藜芦醇的结构与生物合成过程比较

Fig.1 Comparison of the structures and biosynthetic processes of pinosylvin and resveratrol

注: a, 左: 赤松素, 右: 白藜芦醇; b, 赤松素和白藜芦醇分别在植物中的生物合成过程。

Yohei 等^[7]首次将来源于紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*) 的 *4cl* 基因和花生的 (*Arachis hypogaea*)

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

表1 本实验中所使用的引物

Table 1 Primers used in the present study

引物名称	引物序列(5'-3')
pF_4CL_M1	CCAAGCTTGTCGCGTAATG
pR_4CL_M1	ATGTATATCTCCTTCTAGTGAATAAAAGG
pF_4CL_M2	GAGATATACATATGGCGCCACAA
pR_4CL_M2	GTTTTATTTGATGCCTTACAATCCATTGCTAG
pF_4CL_M3	AGGCATCAAATAAAACGAAAGGC
pR_4CL_M3	CCTCTAGAGATTTTACAGACAAGCT
pF_STS_M1	CGGGATCCGTCGCGTAATGCTT
pR_STS_M1	ATGTATATCTCCTTCTAGTGAATAAAAGGTTGCCTGT
pF_STS_M2	GAAGGAGATATACATATGGCTTCAGTCGAGGAATT
pR_STS_M2	TATTTGATGCCTTTAATTTGTAACCATAGG
pF_STS_M3	AGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCG
pR_STS_M3	CGGGATCCTCTAGAGATTTTACAGACAAGCTGT
pF_PAL	CCTTTCGTCTTCACCGTCGCGTAATGCTTA
pR_PAL	TTTATGATTCTCGAGATTTTACAGACAAGCTGTGACCG
pF_PAL_YZ	ATGGCCCCCTCCGTCGACTC

转下页

接上页

pR_PAL_YZ	CTATGCCATCATCTTGACGAGGACG
pF_4CL_YZ	ATGGCGCCACAAGAACAA
pF_4CL_YZ	TCACAATCCATTTGCTAGTTTT
pF_STS_YZ	ATGGCTTCAGTCGAGGAATT
pF_STS_YZ	GCTTAATTTGTAACCATAGGAATG

注：“-”表示限制性内切酶位点；“~”表示 pQE-30 中 *XhoI* 酶切位点左右两边的序列。

大肠杆菌 ATCC31884, 购自美国 ATCC 菌种保藏中心 (*E. coli* ATCC31884: *aroH367*, *tyrR366*, *tna-2*, *acY5*, *aroF394^{br}*, *malt384*, *pheA101^{br}*, *pheO352*, *aroG397^{br}*); 大肠杆菌 DH5a, 由本实验室保存; pQE-30、pMD18-pGAP、pQE-30-*Rgpal*、pMD18-*At4cl* 和 pMD18-*Vvsts* 由本实验室保存; *RgPAL* 的基因登陆号为 KF770992, *At4CL* 的基因登陆号为 NM_104046.2, *VvSTS* 的基因登陆号为 KC417319.1。本实验中所使用的引物 (见表 1) 合成由上海捷瑞生物公司完成。LB 培养基, YM9 改良培养基 (1×M9 盐, 酵母提取物 10 g/L, 5%甘油, MOPS 42 g/L, 调至 pH 为 7.0)。琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒和质粒快速提取试剂盒, 购自天根生化科技有限公司; 必克隆试剂盒, 购自中国南京爱必梦生物材料有限公司; Ex Taq[®], 限制性内切酶 *XhoI*、*BamHI*、*HindIII* 和 *XbaI*, 购自 Takara 宝生物工程有限公司; Marker III 和 *Pfu* DNA 高保真聚合酶, 购自东盛生物科技有限公司; 氨苄青霉素, 购自翔博生物有限公司; 赤松素标准品, 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 肉桂酸标准品, 购自广州齐云生物科技有限公司乙腈和甲醇为色谱纯, 其他一般化学试剂均为化学分析纯。

Biometra 热密闭 PCR 仪 T-1, 德国 Biometra 公司; Bio-Rad 凝胶成像系统 F1-F2, 美国 Bio-Rad 公司; 电泳仪 DYY-6C, 北京市六一仪器厂制造; Nano Drop 分光光度计 ND-1000, 美国 Nano Drop 公司; Eppendorf 离心机 5810R, 德国 Eppendorf 公司; 高效液相色谱仪, 配有可变波长紫外检测器和 LC 2000 色谱工作站, 上海天美科学仪器有限公司; 紫外可见分光光度计 UV1102, 上海天美科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 组成型表达载体的构建

4CL 和 STS 表达元件的串联: 设计引物进行 PCR 扩增, 如表 1 所示, M1 两对引物所对应的模板为 pMD18-pGAP; M3 两对引物所对应的模板为质粒 pQE-30; 4CLM2 引物对应的模板为 pMD18-*At4cl*; STSM2 引物对应的模板为 pMD18-*Vvsts*。各表达元件 PCR 反应条件如下: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30

s, 退火 30 s, 温度根据引物 T_m 值设定, 72 °C 延伸, 延伸时间根据序列长度设定, 35 个循环后在 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。三片段连接采用重叠延伸 PCR, 退火温度和延伸时间根据引物 pFM1 与 pRM3 的 T_m 值和片段总长度设定。PCR 产物回收纯化后, 最终得到连接片段 WZ4CL 和 WZSTS。参考 Takara 产品说明书, 连接 pMD18-T, 测序无误后, WZ4CL 通过 *HindIII* 和 *XbaI* 酶切连接至 pQE-30 载体, WZSTS 则通过 *BamHI* 酶切连接至 pQE-30 载体。最终, 得到含有 4CL 和 STS 完整表达框的载体 pQE-30-*At4cl-Vvsts*。

PAL 框架的整合: 参考“必克隆试剂盒”产品说明书进行实验。利用引物 pF_PAL 和 pR_PAL 把完整 PAL 表达框序列从 pQE30-*Rgpal* 上 PCR 扩增得到, 序列头尾加入同源臂; 对 pQE-30-*At4cl-Vvsts* 进行 *XhoI* 酶切并回收片段, 最后把两个片段相连接, 测序无误后, 得到表达载体 pQE-30-*Rgpal-At4cl-Vvsts*。

1.2.2 大肠杆菌的转化及鉴定

使用热击法转化大肠杆菌 ATCC31884 感受态细胞, 通过氨苄青霉素抗性筛选重组子。挑取转化子单菌落进行 37 °C 过夜培养后提取质粒。以质粒作为模板进行 PCR 鉴定。其中, 使用三对 YZ 引物进行 PCR 鉴定质粒是否含有整个 *tal*, *4cl* 和 *sts* 基因。确认无误后, 把重组子保存好并进行下一步的发酵实验。

1.2.3 合成赤松素的发酵条件及产物和菌体生长情况的测定方法

挑取重组菌株单菌落至装有 200 mL LB 改良培养液的 500 mL 三角瓶中, 并加入终浓度为 100 μg/mL 的氨苄青霉素在 37 °C、200 r/min 过夜摇床培养。离心收集菌体后重悬至装有 200 mL YM9 改良培养液的 500 mL 三角瓶中, 并加入终浓度为 100 μg/mL 的氨苄青霉素, 发酵培养 72 h, 其中 12、24、36、48、60 和 72 h 各取样 10 mL。其中 9.5 mL 样品用 2 倍体积的乙酸乙酯抽提 5 min, 12000 r/min 离心 1 min 后, 上清液使用旋转蒸发器把乙酸乙酯蒸干, 随后用 0.5 mL 甲醇溶解沉淀物并过孔径为 0.22 μm 的有机膜, 备 HPLC 检测使用。0.5 mL 样品的样品备菌体生长情况检测使用。另外, 设置带有 pQE-30 质粒的大肠杆菌 ATCC31884 作为空白对照。

采用高效液相色谱法测定发酵液中肉桂酸和赤松素的含量, 色谱条件如下: C18 反相柱 (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm); 流速: 1 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL ; 测定肉桂酸的流动相: 乙腈:水 (含 0.1% 乙酸)(50:50); 测定赤松素的流动相: 乙腈:水(40:60); 检测波长为 272 nm (肉桂酸) 和 297 nm (赤松素)。肉桂酸和赤松素标准品按常规方法配制, 用相同流动相进行测定并制作工作标准曲线, 采用面积外标法以对样品进行定量分析。菌体生长情况检测使用紫外分光光度计, 检测波长为 600 nm, 以 YM9 改良培养液作为空白。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌表达载体的构建分析

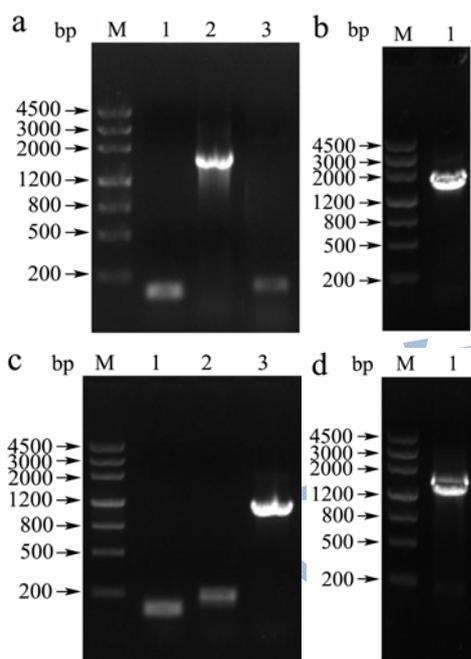


图 2 4CL 和 STS 表达元件 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2 Electrophoresis of PCR amplification about expression element 4CL and STS

注: M 代表 DNA Marker; a, 1 表示 4CL 启动子片段; 2 表示 4CL 编码序列片段; 3 表示 4CL 终止子片段; b, 1 表示 WZ4CL 片段; c, 1 表示 STS 启动子片段; 2 表示 STS 编码序列片段; 3 表示 STS 终止子片段; d, 1 表示 WZSTS 片段。

4CL 完整表达框 PCR 扩增结果如图 2a 和 b 所示, 分别得到带有 RBS 的大肠杆菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的启动子 (pGAP) 片段, 大小为 130 bp; 来源于 pQE-30 的 *rrnB* T1 终止子片段, 大小为 203 bp; 含有重叠区域的 4CL 编码片段, 大小为 1686 bp。三个片段回收后进行降落重叠延伸 PCR, 成功得到完整的 4CL 表达框片段, 大小为 2019 bp。STS 完整表达框

PCR 扩增结果如图 2c 和 d 所示, 分别得到带有 RBS 和 pGAP 的启动子片段, 大小为 130 bp; 终止子片段, 大小为 203 bp; 含有重叠区域的 STS 编码片段, 大小为 1179 bp。三个片段回收后进行降落重叠延伸 PCR, 成功得到完整的 STS 表达框片段, 大小为 1512 bp。三片段 PCR 连接产物连接 pMD18-T, 测序无误后, 分别得到 pMD18-WZ4CL 和 pMD18-WZSTS。

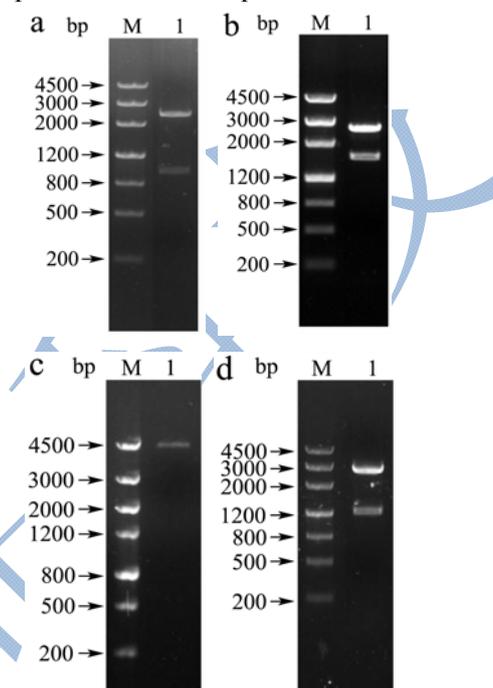


图 3 各序列酶切产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.3 Electrophoresis of the restriction enzyme-digested DNA product

注: M 代表 DNA Marker; a, 1 表示 pQE-30 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切产物; b, 1 表示 pMD18-WZ4CL *Hind*III 和 *Xba*I 酶切产物; c, 1 表示 pQE-30-*At4cl* *Bam*HI 酶切产物; d, 1 表示 pMD18-WZSTS *Bam*HI 酶切产物。

图 3a 所示, 把 pQE-30 载体进行 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切, 回收框架片段, 大小为 2485 bp。图 3b 所示, pMD18-WZ4CL 进行 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切, 回收 4CL 框架片段, 大小为 2019 bp。通过 T4 连接酶连接后得到 pQE-30-*At4cl*。图 3c 所示, pQE-30-*At4cl* 进行 *Bam*HI 酶切, 回收框架片段, 大小为 4504 bp。图 3d 所示, pMD18-WZSTS 进行 *Bam*HI 酶切, 回收 STS 框架片段, 大小为 1512 bp。通过 T4 连接酶连接后得到 pQE-30-*At4cl*-*Vvsts*。

PAL 整个表达框架在之前的实验已经完成, 考虑到 pQE-30-*At4cl*-*Vvsts* 载体上没有合适的酶切位点使用, 固使用同源互补的办法, 使 PAL 表达框插入到表达载体中。图 4a 所示, 把 pQE-30 载体进行 *Xho*I 酶切, 回收框架片段, 大小为 6019 bp。图 4b 所示, 扩

增带有同源臂的 PAL 框架, 回收框架片段, 大小为 2488 bp。通过连接试剂盒的操作后, 再经过测序验证 PAL 框架无突变后, 最终得到表达载体 pQE-30-*Rgpal-At4cl-Vvsts*, 载体具体信息可见图 5。

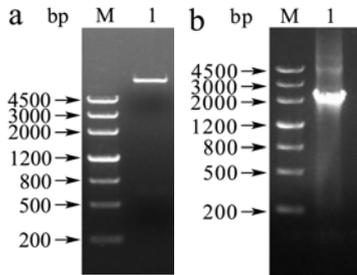


图 4 PAL 表达元件 PCR 产物和 pQE-30-*At4cl-Vvsts* 酶切产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.4 Electrophoresis of the PCR-amplified expression element PAL, and of restriction enzyme-digested pQE-30-*At4cl-Vvsts*

注: M 表示 DNA Marker; a, 1 表示 pQE-30-*At4cl-Vvsts* 载体 *XhoI* 酶切片段; b, 1 表示完整 PAL 表达元件 PCR 产物。

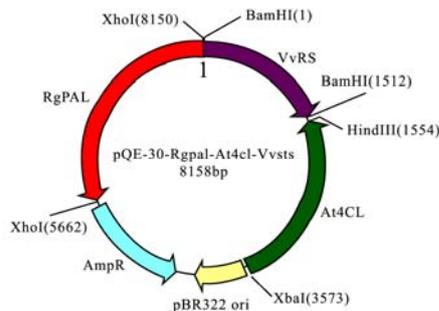


图 5 pQE30-*Rgtal-At4cl-Vvsts* 组成型表达载体图

Fig.5 Map of constitutive vector pQE30-*Rgtal-At4cl-Vvsts*

2.2 重组子的质粒 PCR 鉴定

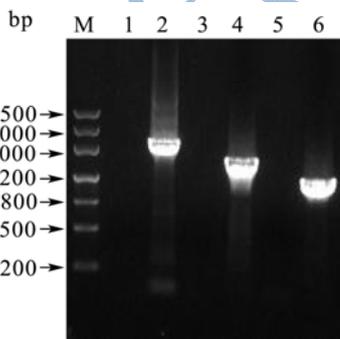


图 6 质粒 PCR 鉴定图

Fig.6 Identification of the plasmid by PCR amplification

注: M 表示 DNA Marker; 1 表示空白验证 PAL; 2 表示质粒验证 PAL; 3 表示空白验证 4CL; 4 表示质粒验证 4CL; 5 表示空白验证 STS; 6 表示质粒验证 STS。

把已构建好的表达载体转化大肠杆菌 ATCC31884, 把筛选出来的拟转化子进行质粒提取,

考虑到三个表达框架存在多个不同的酶切位点, 使用酶切的方法进行验证比较困难, 固选用质粒 PCR 鉴定, 验证引物分别根据 PAL、4CL 和 STS 编码框设计, 序列详情见表 1。如图 6 所示, 泳道 1、3 和 5 为空白对照, 均无任何条带被扩增。泳道 2、4 和 6 的条带与 Marker 相比较, PCR 产物与预期产物大小相一致。证实重组工程菌株体内带有相应的表达载体, 可进行下一步的发酵实验。

2.3 发酵液中赤松素和肉桂酸的高效液相色谱

检测

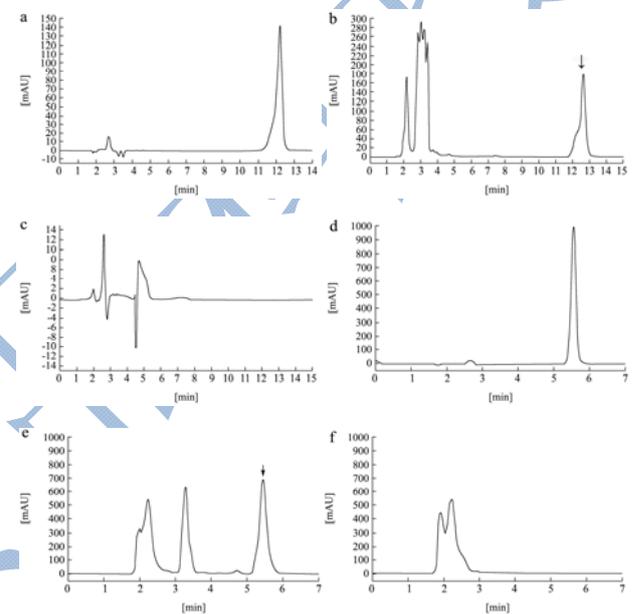


图 7 对香豆酸标准品和重组菌株发酵液样品的 HPLC 图

Fig.7 HPLC of the fermentation sample and standard

注: a 表示赤松素标准品; b 表示测量赤松素的发酵液样品; c 表示测量赤松素的空白对照; d 表示肉桂酸标准品; e 表示测量肉桂酸的发酵液样品; f 表示测量肉桂酸的空白对照。

把工程菌株进行发酵定性试验, 发酵过程中不添加任何的底物。结果如图 7 所示, 赤松素标准品 HPLC 色谱图 a 中, 赤松素的保留时间为 12.32 min。发酵液样品 HPLC 色谱图 b 中有一保留时间为 12.43 min 的峰, 该峰出峰时间与标准品出峰时间相一致, 空白对照 HPLC 色谱图 c 中在相应位置未有保留峰的出现。此结果表明, *pal*, *4cl* 和 *sts* 基因在重组大肠杆菌 ATCC31884 中成功得到了表达, 并且能利用自身代谢的 L-苯丙氨酸生物合成赤松素。此外, 为了更进一步研究产物的生成情况, 我们还对发酵液中的肉桂酸进行了检测。色谱图 e 为肉桂酸标准品, 保留时间为 5.56 min, 图谱 f 为发酵样品在相应位置也出现了峰, 空白对照则没有相应的峰, 证明此方法能检测发酵样品中

肉桂酸的含量。

2.4 不同发酵时间对工程菌产赤松素含量的影响

在确定工程菌株能生产赤松素后,我们要对发酵样品中的物质进行定量检测。首先,需要制作赤松素和肉桂酸的标准曲线。根据方法中的液相条件,以色谱峰面积对质量浓度作图,得工作标准曲线,赤松素的线性回归方程为 $Y=11.807X-0.6288$, 相关系数 $R^2=0.9905$ 。其中 Y 为赤松素标准品浓度,单位为 mg/L ; X 为峰面积,单位为 AU ; 肉桂酸的线性回归方程为 $Y=5.0105X+0.371$, 相关系数 $R^2=0.9997$ 。其中 Y 为肉桂酸标准品浓度,单位为 mg/L ; X 为峰面积,单位为 AU 。

工程菌进行 72 h 发酵,每隔 12 h 测定发酵液中赤松素和肉桂酸的含量以及菌体 OD_{600} 值。如表 2 所示,赤松素的含量在发酵 12 h 后达到 0.27 mg/L , 在随后的其他测量点范围内增长不显著, 24 h 以后,生成量达 0.32 mg/L , 并随着时间的推移,含量有所下降。从菌体 OD_{600} 情况看,赤松素的生物合成对其生长影响不大。为了探索赤松素生成量随发酵时间变化而没有任何提高的原因,我们也对赤松素合成的中间物肉桂酸进行检测。发现了肉桂酸的含量明显高出产物赤松素的含量,而且随着发酵时间的推移,肉桂酸的含量一直在提高,至 48 h 后达到 52.92 mg/L 。实验结果证明了,大量的肉桂酸不能转化成赤松素且在培养基中形成了累积,导致了赤松素含量不能进一步地提高,这可能与三个外源基因能否相互协调发挥作用有关。

表 2 不同发酵时间产物量和菌体生长的动态变化情况

Table 2 Product amounts from recombinant *E. coli* and its growth at different fermentation times

发酵时间 /h	肉桂酸含量 /(mg/L)	赤松素含量 /(mg/L)	OD_{600}
0	0.00	0.00	1.31 ± 0.19
6	22.58 ± 1.92^c	0.18 ± 0.03^b	3.21 ± 0.08
12	33.34 ± 3.64^b	0.27 ± 0.02^a	4.84 ± 0.11
24	46.19 ± 5.11^a	0.32 ± 0.02^a	5.23 ± 0.12
36	50.77 ± 2.27^a	0.31 ± 0.02^a	5.68 ± 0.09
48	52.92 ± 4.96^a	0.30 ± 0.04^a	5.09 ± 0.07
60	49.32 ± 3.79^a	0.29 ± 0.06^a	4.95 ± 0.25
72	48.62 ± 3.55^a	0.28 ± 0.04^a	4.53 ± 0.15

注: 试验结果测定 3 次, 表示为 $\bar{x} \pm \text{SE}$, 图中相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

3 结论

3.1 在抗生素滥用的当今,在人们开始越发关注自身健康的年代,植物苯丙烷类天然活性物质会因为其具有广谱的生物活性而备受关注 and 开发。在保健食品、辅助性药物和饲料添加剂等生产领域的需求越发强烈之时,传统的植物提取模式已满足不了现今国家提倡的环保、无污染和低能耗的生产模式。建立起庞大的工程微生物库,合理科学地分析所需产物的合成途径,并筛选适合的工程菌,利用单体发酵或组合发酵的方法生成所需的活性物质,将是天然活性物质生物制备今后研究的趋向。

3.2 本研究尝试探讨一种无需添加诱导物和底物的赤松素从头合成的方法。分析了大肠杆菌 ATCC31884 的特性,经过对体内莽草酸代谢的遗传改造后,宿主能产较多的赤松素前体物 L-苯丙氨酸。引入赤松素合成相关酶基因,重组子成功地利用自身代谢生物合成赤松素。本实验室对赤松素和白藜芦醇合成途径有一定的研究,之前我们构建的携带单基因 PAL 完整表达框的工程菌宿主,其在相同发酵条件下产肉桂酸的含量要比本研究所构建的宿主的生成量多两倍多。很大原因是三个基因在同一载体上面进行串联表达,对三个基因能否完全功能性翻译折叠成相对应的酶有很大的关系。另外一方面,与宿主自身的丙二酰辅酶 A 含量有关。丙二酰辅酶 A 是芪类化合物合成的前体物,而且合成 1 分子的产物就需要 3 分子的丙二酰辅酶 A 参与。Yang 等^[10]设计了一种反义小 RNA 干扰技术,抑制大肠杆菌 *fabD* (丙二酰辅酶 A-ACP 转移酶) 基因表达,从而提高了丙二酰辅酶 A 的积累,并使产物白藜芦醇的含量提高了 1.7 倍。Namita 等^[11]对大肠杆菌基因通路进行模拟预测,敲除了旁路基因和过量表达关键基因,提高了丙二酰辅酶 A 的积累量,也使产物白藜芦醇的含量提高了 0.6 倍。还有,4CL 和 STS 两种酶均为多底物催化酶,寻找底物适应性高的氨基酸结构也能有效提高转化效率。Philana 等^[9]对拟南芥 2 型 4CL 酶进行点突变研究,把 256 号位的天冬酰胺突变成丙氨酸,293 号位的甲硫氨酸突变成脯氨酸,320 号位的赖氨酸突变成亮氨酸后,体外酶活检测,催化肉桂酸的能力提高了 30 倍。

3.3 大肠杆菌表达系统因其遗传背景清楚,基因操作技术成熟而优于其他的遗传转化系统,用其以生产赤松素及其相关代谢产物具有很大的可行性和应用前景。在日后的研究中我们将进一步对工程菌株进行代谢调控和重组酶的理性设计优化,希望能提高赤松素的产量,并为日后工业化生产赤松素及其相关苯丙烷类活性物质打下基础。

参考文献

- [1] Eunsil Jeong, Hye-Rim Lee, Jaeho Pyee, et al. Pinostylin induces cell survival, migration and anti-adhesiveness of endothelial cells via nitric oxide production [J]. *Phytotherapy Research*, 2012, 27(4): 610-617
- [2] Sandra Stojanović, Helmut Sprinz, Ortwin Brede. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of *trans*-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 391(1): 79-89
- [3] Eun-Jung Park, Hwa-Jin Chung, Hyen-Joo Park, et al. Suppression of *Src*/ERK and GSK-3/ β -catenin signaling by pinostylin inhibits the growth of human colorectal cancer cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 55: 424-433
- [4] Viera Jančinová, Tomáš Perečko, Rado Nosáň, et al. The natural stilbenoid pinostylin and activated neutrophils: effects on oxidative burst, protein kinase C, apoptosis and efficiency in adjuvant arthritis [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2012, 33(10): 1285-1292
- [5] Julie Chonga, Anne Poutaraudb, Philippe Huguency. Metabolism and roles of stilbenes in plants [J]. *Plant Science*, 2009, 177(3): 143-155
- [6] Karine Ferré-Filmon, Lionel Delaude, Albert Demonceau, et al. Catalytic methods for the synthesis of stilbenes with an emphasis on their phytoalexins [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2004, 248(21): 2323-2336
- [7] Yohei Katsuyama, Nobutaka Funa, Sueharu Horinouchi. Precursor-directed biosynthesis of stilbene methyl ethers in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology Journal*, 2007, 2(10): 1286-1293
- [8] Si-yuan Wang, Shu-wei Zhang, An-feng Xiao, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of various phenylpropanoid derivatives [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29(9): 153-159
- [9] Philana Veronica van Summeren-Wesenhagen, Jan Marienhagen. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of the plant polyphenol pinostylin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(3): 840-849
- [10] Ya-ping Yang, Yu-heng Lin, Ling-yun Li, et al. Regulating malonyl-CoA metabolism via synthetic antisense RNAs for enhanced biosynthesis of natural products [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 217-226
- [11] Namita Bhan, Peng Xu, Omar Khalidi, et al. Redirecting carbon flux into malonyl-CoA to improve resveratrol titers: Proof of concept for genetic interventions predicted by optforce computational framework [J]. *Chemical Engineering Science*, 2013, 103(22): 109-114