

# 重组酿酒酵母合成白藜芦醇的研究

于跃, 郭辉力, 薛飞燕, 彭程, 姜梦嫣, 马兰青

(农业部华北都市农业重点实验室, 北京农学院生物科学与工程学院, 北京 102206)

**摘要:** 为了获得一种酵母快速合成白藜芦醇的体系, 本研究分别从虎杖和烟草中克隆获得白藜芦醇合成途径的关键酶基因: 芪合酶基因 *STS* 和 4-香豆酰辅酶 A 连接酶基因 *4CL*, 引入 3 个连续重复的 GSG 作为连接肽, 采用 Overlap PCR 扩增技术构建了融合基因 *4CL-(GSG)<sub>3</sub>-STS*, 进一步获得重组表达载体 pESC-TRP-*4CL-(GSG)<sub>3</sub>-STS* 后转化至酿酒酵母中, 之后利用 HPLC 分析检测重组酿酒酵母代谢产物, 最后对重组菌合成白藜芦醇的诱导时间、底物添加浓度和添加方式进行了优化研究。结果表明: 所构建的重组酿酒酵母菌体生长 48 h 后进行诱导表达, 同时添加浓度为 6 mg/L 底物 4-香豆酸, 并且每隔 2 h 添加一次, 8 h 后白藜芦醇产量即可达 7.01 mg/L。利用本体系合成白藜芦醇具有操作简单、生产周期短的特点, 为进一步实现微生物大规模生产白藜芦醇提供了基础。

**关键词:** 融合基因; 酿酒酵母; 白藜芦醇; 发酵优化

文章编号: 1673-9078(2019)05-184-190

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.026

## Study on the Synthesis of Resveratrol by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

YU Yue, GUO Hui-li, XUE Fei-yan, PENG Cheng, JIANG Meng-yan, MA Lan-qing

(Key Laboratory of Urban Agriculture (North China), Ministry of Agriculture, College of Biological Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract:** In order to obtain a system for rapid synthesis of resveratrol by *Saccharomyces cerevisiae*, the key enzyme genes of the resveratrol synthesis pathway were cloned in this study, stilbene synthase gene (*STS*) from *Polygonum cuspidatum* and 4-coumaroyl-CoA ligase (*4CL*) from *Nicotiana tabacum*, to construct the fusion gene of *4CL-(GSG)<sub>3</sub>-STS* by overlap PCR amplification technology through introducing three consecutive repeats of GSG as a linker peptide. The recombinant expression vector pESC-TRP-*4CL-(GSG)<sub>3</sub>-STS* obtained was then transformed into *S. cerevisiae*. The metabolites of the recombinant *S. cerevisiae* were analyzed by HPLC. Finally, the induction time, and substrate concentration and addition method for the synthesis of resveratrol by the recombinant *S. cerevisiae* were further optimized. The result showed that the yield of resveratrol could reach 7.01 mg/L 8 h after the established recombinant *S. cerevisiae* cells, which had grown for 48 h, were induced to express while the substrate 4-coumarate was added at 6 mg/L once every 2 h. The synthesis of resveratrol using this current system is simple for operation and requires only a short production cycle, thus, provides a basis for realizing a large-scale microbial production of resveratrol.

**Key words:** fusion gene; *Saccharomyces cerevisiae*; resveratrol; optimization of fermentation

白藜芦醇, 分子式为  $C_{14}H_{12}O_3$ , 化学名为 3,4',5'-三羟基-1,2-二苯乙烯, 属于非黄酮类多酚化合物, 难溶于水, 易溶于有机溶剂, 是植物受到逆境胁迫时产生的次生代谢产物, 在紫斑牡丹种子和虎杖根中的含

收稿日期: 2018-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21606020); 大北农青年教师科研基金项目 (16ZK001)

作者简介: 于跃 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物法合成植物天然产物研究

通讯作者: 薛飞燕 (1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物发酵调控的研究; 共同通讯作者: 马兰青 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 细胞代谢工程

量较丰富<sup>[1,2]</sup>。越来越多的研究表明白藜芦醇具有多种药理活性、人体保健功能和农业植保作用<sup>[2]</sup>, 特别是作为功能食品的有效成分其需求量越来越大, 单纯依靠天然植物提取的方法已经无法满足, 化学合成法又因为污染严重和安全性受质疑而推广困难, 因而利用合成生物学技术开发微生物发酵法合成白藜芦醇目前被认为是可行性较好的途径之一<sup>[2-4]</sup>。

白藜芦醇的微生物合成技术主要是利用现代分子生物学手段获得其生物合成途径中 4-香豆酰辅酶 A 连接酶基因 (*4CL*) 和芪合酶基因 (*STS*), 并构建相应的重组工程菌株和在其培养体系中添加前体物而实现目标产物的合成。目前合成白藜芦醇的宿主微生物集

中在大肠杆菌和酿酒酵母, 酿酒酵母作为宿主微生物生产白藜芦醇时因其生物安全性优势而更受青睐, 虽然其产量仍有待提高<sup>[3,4]</sup>。目前报道的影响重组酿酒酵母白藜芦醇产量的因素主要有: (1) 关键基因来源的影响: 如 Shi 等<sup>[5]</sup>通过重组拟南芥 *4CL* 和花生 *STS* 获得产量为 3.1 mg/L, Sydor 等<sup>[6]</sup>通过重组烟草 *4CL* 和葡萄 *STS* 获得产量为 5.8 mg/L, 而 Wang 等<sup>[7]</sup>通过重组拟南芥 *4CL* 和葡萄 *STS* 获得产量为 14.4 mg/L; (2) 关键酶表达方式的影响: 如 Zhang 等<sup>[8]</sup>通过 Gly-Ser-Gly 三个氨基酸 linker 连接融合表达拟南芥 *4CL* 和葡萄 *STS* 的方式与两个酶共表达的方式比较, 产量可以提高 15 倍, 达 5.25 mg/L; Guo 等<sup>[9]</sup>的研究结果再次证明融合表达拟南芥 *4CL* 和虎杖 *STS* 的方式优于两个酶共表达的方式, 并且不同长度的氨基酸 linker 对产量的影响不同, 因此还需要继续尝试不同来源关键酶基因和不同表达方式以便确定较优组合。另外, 发酵工艺对重组菌白藜芦醇产量影响也至关重要, 如 Watt 等<sup>[10]</sup>通过优化重组大肠杆菌发酵培养体系中的碳源实现了白藜芦醇产量的提高; Sydor 等<sup>[6]</sup>在重组酿酒酵母的培养过程中通过使用丰富培养基代替合成培养基、发酵初始添加底物 10 mM 的 4-香豆酸和发酵 120 h 后补加 5 mM 的方式大大提高了白藜芦醇产量。酵母体系异源表达植物基因实现白藜芦醇合成的报道中利用烟草 *4CL* 的研究较多<sup>[4,6]</sup>、虎杖 *STS* 的较少<sup>[9]</sup>, 而通过烟草 *4CL* 和虎杖 *STS* 组合表达合成白藜芦醇的报道更少。因此, 本研究尝试了烟草 *4CL* 和虎杖 *STS* 通过(Gly-Ser-Gly)<sub>3</sub> 九个氨基酸的 linker 融合构建重组酿酒酵母, 并通过发酵条件优化研究, 旨在提升白藜芦醇的生产效率为实现微生物法大规模可控生产白藜芦醇奠定基础, 同时也为现有重组酿酒酵母合成白藜芦醇的研究提供补充和参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、载体、关键酶(基因)、培养基及其它试剂

本研究所用菌株为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) WAT11; 所用的基因克隆载体为 pMD18-T, 酿酒酵母表达载体为 pESC-Trp(Stratagene, La Jolla, CA, USA); 重组载体构建所用的关键酶基因分别为来自烟草 (*Nicotiana tabacum*) 4-香豆酰辅酶 A 连接酶基因 *Nt4CL* (NCBI 登陆号 U50846) 和来自虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 的芪合酶基因 *PcSTS* (NCBI 登陆号 ACC76753), 分别保藏于质粒 pCRT7/CT-TOP-

*Nt4CL* 和 pET-30b-*PcSTS* 中; 重组体系构建过程中所用各种工具酶均购买于 TaKaRa 公司 (Shiga, Japan); 重组菌培养过程中所用的是色氨酸营养缺陷型基础培养基 (8 g/L, FunGenome Company, Beijing, China); 生长培养基是在基础培养基中添加 2% 葡萄糖 (Aladdin Chemistry Co. Ltd., Shanghai, China); 诱导培养基是在基础培养基中添加 2% 的半乳糖 (Aladdin Chemistry Co. Ltd., Shanghai, China), 所用底物为 4-香豆酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 产物萃取分离所用的乙酸乙酯和高效液相检测所用的甲醇等试剂均购买于 Fisher Scientific 公司 (Waltham, MA, USA), 白藜芦醇标准品购买于 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。

### 1.2 重组体系的构建

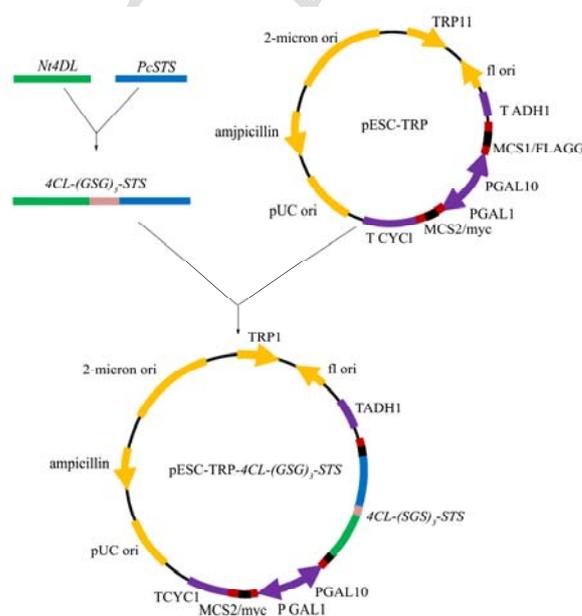


图1 pESC-TRP-4CL-(GSG)<sub>3</sub>-STS 重组载体构建框架图

Fig.1 Schematic diagram of the recombinant vector pESC-TRP-4CL-(GSG)<sub>3</sub>-STS

如图 1, 重组体系的构建过程: 首先根据 *Nt4CL* 编码序列设计上游引物引入 *Bam*HI 酶切位点, 根据 *PcSTS* 编码序列设计下游引物引入 *Xho*I 酶切位点, 将 *Nt4CL* 编码区的终止密码子去除; Yang 等<sup>[11]</sup>研究表明长度为 5~15 个氨基酸的 linker 中使用最长 linker (即: 15 个氨基酸) 时融合蛋白的生物活性最强, 而 Guo 等<sup>[9]</sup>研究表明长度为 3~20 个氨基酸的 linker 中使用最短 linker (即: 3 个氨基酸) 时获得的白藜芦醇产量最高, 可见不同蛋白融合 linker 长度影响不同, 据此本研究折中考虑, 取 9 个氨基酸作为 linker (即: 3 个 GSG 重复) 如表 1, 采用 overlap PCR 扩增技术获得融合基因 *4CL*-(GSG)<sub>3</sub>-*STS*; 将融合基因连接至酿酒酵

母表达载体 pESC-TRP 的 *Gal10* 启动子下游的多克隆位点 1 (MCS1) 的 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切位点之间, 从而获得重组表达载体 pESC-TRP-4CL-(*GSG*)<sub>3</sub>-*STS*; 利

用 LiCl 转化法<sup>[12]</sup>将所得重组表达载体转化至酿酒酵母 WAT11 中获得重组菌株。

表 1 融合基因扩增所用引物

Table 1 Primers for fusion genes amplification

| 名称                             | 序列(5'-3')   |
|--------------------------------|---|
| F                              | ATTTGGATCCATGGCGCCACAAGAACAA                                |
| R                              | TGATCTCGAGTTAAATGATGGGCACACT                                |
| ( <i>GSG</i> ) <sub>3</sub> -R | CAGTTGAAGCTGCCATGCCAGATCCGCCAGATCCGCCAGATCCCAATCCATTTGCTAGT |
| ( <i>GSG</i> ) <sub>3</sub> -F | ACTAGCAAATGGATTGGGATCTGGCGGATCTGGCGGATCTGGCATGGCAGCTTCAACTG |

注: 1.引物 F 和 R 中的黑体序列表示酶切位点 *Bam*HI 和 *Xho*I; 2.引物(*GSG*)<sub>3</sub>-F 和(*GSG*)<sub>3</sub>-R 中的下划线序列表示链接氨基酸。

### 1.3 重组菌的发酵培养

菌体细胞培养: 挑取重组菌的单菌落于(如 1.1 所述)生长培养基中, 30 °C, 200 r/min, 培养 48 h 后获得菌体细胞培养液。

重组基因诱导表达及目标产物合成: 菌体细胞培养液于 5000 r/min 离心 1 min, 无菌水洗 3 次后, 重悬于(如 1.1 所述)诱导培养基中, 按照预设发酵条件的优化策略进行诱导重组蛋白的表达、添加 4-香豆酸和催化目标产物白藜芦醇的合成。

### 1.4 重组蛋白检测

SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) 检测: 诱导培养结束后, 将 50 μL 培养液与对应体积上样缓冲液混合后煮沸 5 min, 12000 r/min 离心 30 s, 取 10 μL 上清样品进行 120 V 恒压电泳分离、考马斯亮蓝染色检测。

Western Blot 检测: SDS-PAGE 电泳分离结束后, 50 mA 稳流电转 2 h 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 加入 5%脱脂奶粉的 TBS 缓冲液 (0.02 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5) 37 °C 封闭 1 h; 将 STS 和兔抗血清在 TBS 中混和并稀释 1000 倍, 于 37 °C 封闭 1 h; 用 TBS-Tween 缓冲液 (TBST: 含 0.05%吐温-20 的 TBS) 洗涤三次, 以 HRP 标记山羊抗鼠 IgG, 于 37 °C 孵育 1 h; TBST 洗涤 3 次后用含有 6 mg 甲氧基萘酚的甲醇溶液 2 mL 和添加 6 μL 30%双氧水的 TBS 溶液 10 mL 处理膜后获得免疫印迹图像, 使用计算机软件 ImageMaster (Pharmacia Biotech)进行图像分析处理。

### 1.5 产物提取和检测

发酵结束后, 用等量的乙酸乙酯萃取。萃取溶液待乙酸乙酯溶剂挥发后, 用 50%的甲醇溶解, 过滤膜后, 进 10 μL 样品于 Waters 1525 型高效液相色谱仪(美

国 Waters 公司)进行检测。检测用色谱柱为 Sunfire™ C 18 反相柱 (5.0 μm, 4.6 mm×150 mm), 流动相为甲醇 (A) 和水 (B), 流速为 0.8 mL/min, 柱温为 25 °C, 采用梯度洗脱 (条件设定为 0~30 min: 10%~70% A, 30~40 min: 70% A), 检测波长为 306 nm。

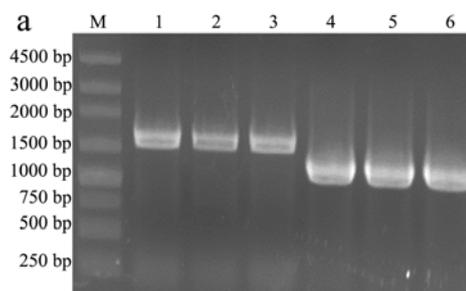
### 1.6 数据统计分析

采用 Microsoft Excel 2007 分析处理数据, 采用 Origin 8.0 软件绘制图表, 利用 SPSS 18 软件进行显著性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酿酒酵母重组载体的构建

分别以质粒 pCRT7/CT-TOP-*Nt4CL* 和 pET-30b-*PcSTS* 为模板, 以 F/(*GSG*)<sub>3</sub>-R 和(*GSG*)<sub>3</sub>-F/R 为上下游引物 PCR 扩增获得基因片段分别为~1600 bp 和~1200 bp, 分别与 *Nt4CL* 和 *PcSTS* 基因相符(图 2a); 将 PCR 产物回收混合作为模板, 以 F/R 为上下游引物进行 Overlap PCR 获得基因片段~2800 bp, 与理论 *Nt4CL* 和 *PcSTS* 的融合基因片段大小相符(图 2b); 将融合基因片段回收后连接至克隆载体 pMD18-T 上, 测序验证后与酿酒酵母表达载体 pESC-Trp 连接获得重组质粒 pESC-TRP-4CL-(*GSG*)<sub>3</sub>-*STS*, *Bam*HI/*Xho*I 双酶切重组质粒验证结果如图 2C, 表明重组表达体系构建成功。



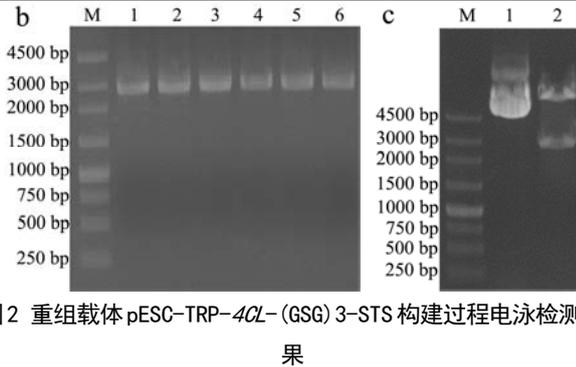


图2 重组载体 pESC-TRP-4CL-(GSG)<sub>3</sub>-STS 构建过程电泳检测结果

Fig.2 Electrophoresis analysis of the recombinant vector pESC-TRP-4CL-(GSG)<sub>3</sub>-STS construction

注: a. *Ni4CL*、*PcSTS* 基因扩增结果, M: DNA Marker, 1~3: *Ni4CL* 基因, 4~6: *PcSTS* 基因; b. 融合基因 PCR 鉴定结果, M: DNA Marker, 1~6: 融合基因; c. 重组质粒酶切鉴定结果, M: DNA Marker, 1: 重组质粒, 2: 重组质粒 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切产物。

### 2.2 重组酿酒酵母发酵产物分析验证

分别在诱导表达 4 h 和 8 h 取样, 并利用 SDS-PAGE 检测重组酿酒酵母全蛋白结果发现分子量约 100 ku 的蛋白条带 (图 3a) 与融合蛋白分子量大小相符, 但条带不是单一。为了进一步确认融合蛋白是否表达, 进行了 Western Blot 检测, 结果均出现了免疫印迹条带, 并且发现诱导 8 h 的条带与诱导 4 h 的相比显著变粗, 说明同样条件下适当增加诱导时间可以提高融合蛋白表达量 (图 3b)。

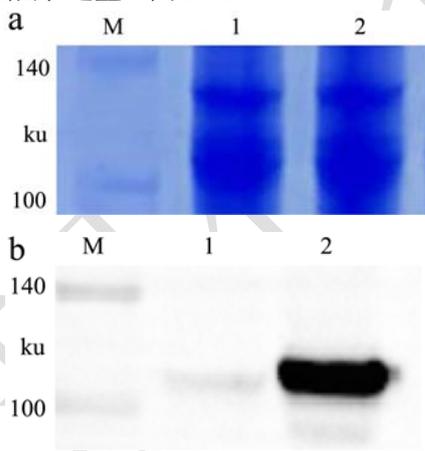


图3 重组蛋白检测结果

Fig.3 Analysis of the recombinant protein

注: a. SDS-PAGE 检测结果; b. Western Blot 检测结果。M: Protein Marke, 1: 重组菌诱导表达 4 h, 2: 重组菌诱导表达 8 h。

### 2.3 重组酿酒酵母发酵产物分析验证

白藜芦醇标准品进行 HPLC 分析结果表明, 其出

峰时间为 22.3 min (图 4a), 重组酿酒酵母诱导培养基中添加 4-香豆酸, 培养 8 h 后的发酵液萃取相 HPLC 分析结果显示在相同时间也有目标峰出现 (图 4b), 表明利用(GSG)<sub>3</sub>的 linker 构建 *Ni4CL* 和 *PcSTS* 的融合基因, 同样可以在酿酒酵母中成功表达并且催化合成了目标产物白藜芦醇。

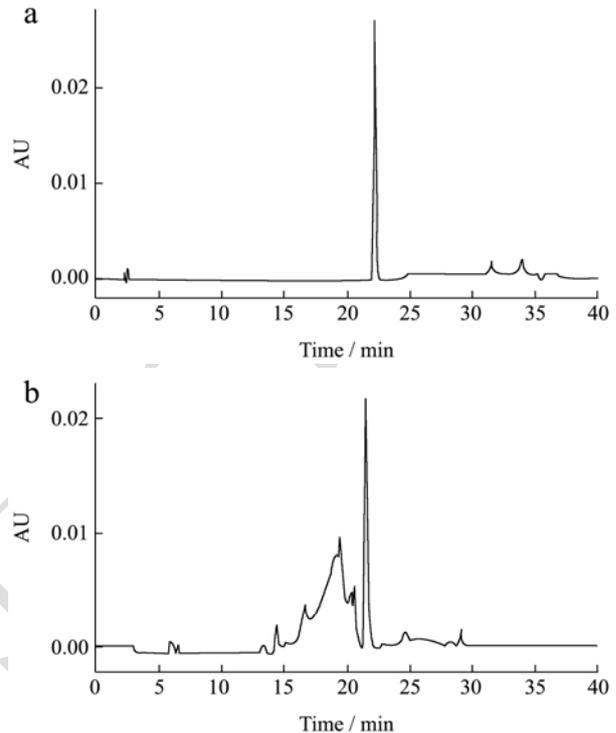


图4 重组酿酒酵母发酵产物高效液相色谱分析结果

Fig.4 HPLC analysis of the recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

注: a. 白藜芦醇标准品 HPLC 分析结果; b. 重组菌发酵产物 HPLC 分析结果。

### 2.4 重组酿酒酵母发酵条件优化

通过基因重组技术实现微生物合成白藜芦醇成为近几年的研究热点, 重组体系发酵条件的进一步优化对产量提高也是至关重要<sup>[3,4,13]</sup>。本研究在成功获得酿酒酵母工程菌株后, 根据相关文献信息<sup>[1-5,14]</sup>和研究课题组相关研究的经验<sup>[9,15-17]</sup>, 进一步进行了发酵条件的优化研究: 首先固定诱导时间为 18 h, 考察了增加底物 4-香豆酸的添加浓度对白藜芦醇产量的影响 (图 5a), 结果当浓度提高到 24 mg/L 时可将产量提高到 3.38 mg/L, 然后确定 4-香豆酸的添加浓度为 24 mg/L, 考察了诱导时间对产量的影响 (图 5b), 结果表明其对产量的提高并不明显, 而且诱导时间多于 8 h 后效果反而变差, 推测有可能是底物对酶存在一定的抑制效应, 因而又尝试了底物分批流加的方式 (图 5c), 结果表明: 当把 24 mg/L 的 4-香豆酸分两次 (0 h 和 4

h 分别加 12 mg/L) 时, 白藜芦醇产量可以提高到 5.27 mg/L, 分 4 次 (0 h、2 h、4 h 和 6 h 分别加 6 mg/L) 时, 其产量可以进一步提高到 7.01 mg/L。

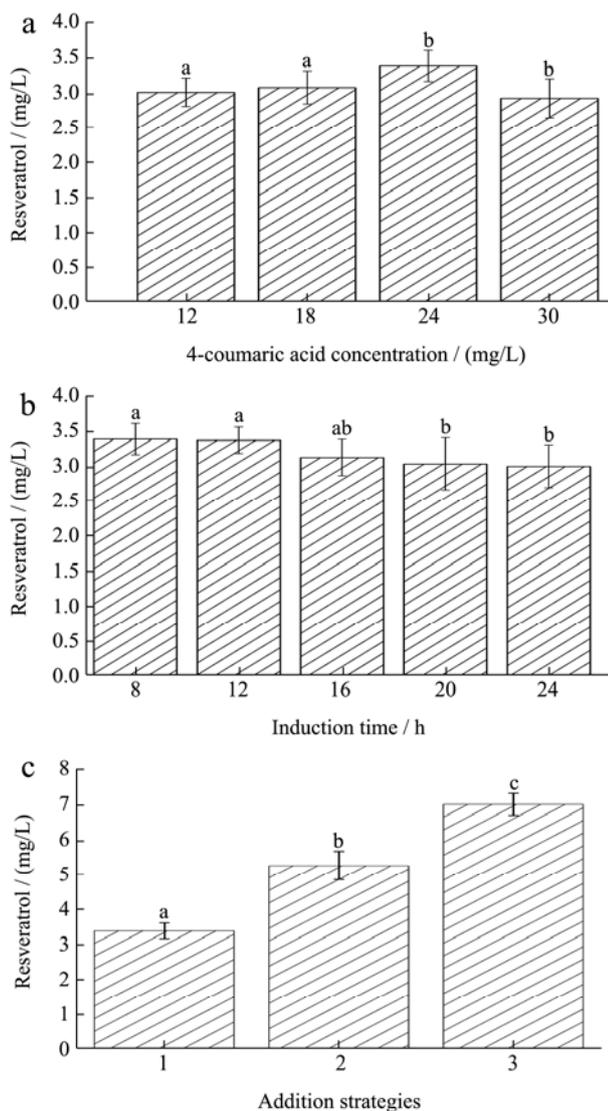


图5 重组酿酒酵母发酵条件优化结果

Fig.5 Optimization result of the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

注: a. 4-香豆酸添加浓度对白藜芦醇产量的影响 (诱导时间均为 18 h); b. 诱导时间对白藜芦醇产量的影响 (4-香豆酸添加浓度均为 24 mg/L); c. 4-香豆酸添加方式对白藜芦醇产量的影响 (4-香豆酸添加终浓度均为 24 mg/L) 诱导总时间为 8 h。误差线表示三次平行实验所的标准差; 不同字母表示差异显著, 即  $p < 0.05$ 。

## 2.5 重组酿酒酵母合成白藜芦醇体系的比较

表 2 总结了目前利用重组酿酒酵母合成白藜芦醇的研究现状, 采用不同生物技术手段获得白藜芦醇产量差异较大, 有不足 1 mg/L<sup>[14,18]</sup>, 也有高达 391 mg/L<sup>[6]</sup>, 多数处于 1~10 mg/L<sup>[4,8,19-22]</sup>。本研究则采用

基因融合技术, 通过在酿酒酵母融合表达来自烟草的 4CL 和来自虎杖的 STS, 成功实现了重组酿酒酵母合成白藜芦醇, 并且对重组菌合成白藜芦醇的发酵条件进行了优化研究, 最终通过优化调控诱导时间、底物添加浓度和添加方式可得到白藜芦醇产量 7.01 mg/L, 就重组菌构建难易程度、培养基组成复杂程度、转化率和产率等指标考虑, 本研究生产效率处于当前研究的较高水平。

基因来源不同对重组酿酒酵母合成白藜芦醇产量的影响有差异, 通常会引入 4CL 和 STS 基因实现重组菌由 4-香豆酸合成白藜芦醇: 4CL 的来源主要有拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、杨树 (*Populus*) 和大豆 (*Glycine max*), 产量比较高的是来自于拟南芥和烟草; STS 的来源主要有葡萄 (*Vitis vinifera*)、花生 (*Arachis hypogaea*) 和虎杖 (*Polygonum cuspidatum*), 产量比较高的是来自于葡萄和虎杖; 不同来源的 4CL 和 STS 组合会导致产量不同, 产量超过 5 mg/L 的有烟草 4CL 和葡萄 STS<sup>[4]</sup>、拟南芥 4CL 和葡萄 STS 组合<sup>[6,8]</sup> 及拟南芥 4CL 和虎杖 STS 组合<sup>[9]</sup>, 本研究则尝试了烟草 4CL 和虎杖 STS 并且最终得到了 7.01 mg/L 的白藜芦醇。4CL 和 STS 重组表达策略不同对白藜芦醇产量的影响也不同, 利用连接肽融合表达和蛋白脚手架集中表达有利于目标产物产量的提高<sup>[7-9]</sup>, 本研究则尝试的是利用较长的连接肽融合表达。另外, 尝试引入苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 和酪氨酸解氨酶 (TAL) 实现由较低成本底物氨基酸合成白藜芦醇也是个值得研究的方向<sup>[7,14,20-22]</sup>, 不过其生产效率 (包括转化率和产率等指标) 有待进一步提高。

不同发酵培养条件对重组酿酒酵母合成白藜芦醇生产效率的影响差异较显著, 通常使用的培养基有全营养混合型 (包括 YPD、YNB、CM、YP 及其它营养丰富的培养基) 和营养缺陷型 (SD 培养基), 营养丰富的混合型培养基可能大幅度提高产量而使其生产应用潜力增大<sup>[6]</sup>, 而缺陷型合成培养基 (SD 培养基) 有利于实现精确调控<sup>[7-9,19]</sup>, 本研究采用的是 SD 培养基; 一般营养丰富的混合培养基中添加的底物浓度较高<sup>[4,6,14,18,20-22]</sup>, 缺陷型合成培养基添加底物浓度不宜过高; 另外, 合成体系可能会存在底物抑制效应, 所以采取分批添加方式效果更好<sup>[6,7,18,20]</sup>, 本研究通过分批添加方式产量增加 1 倍的结果再次证实了底物抑制效应的存在, 因此选择分批添加可以显著提高目标产物的产量。

综上, 本研究的优势在于发酵周期短、转化率和产率同时处于较高水平。

表2 重组酿酒酵母合成白藜芦醇的比较

Table 2 Comparison of resveratrol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

| 引入基因及来源  | 培养基               | 原料底物          | 添加量                         | 产量/<br>(mg/L) | 周期/h | 转化率    | 产率/<br>(mg/L/h) | 文献         |
|--|-------------------|---------------|-----------------------------|---------------|------|--------|-----------------|------------|
| 4CL ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )<br>RS ( <i>Vitis vinifera</i> )  | YPD               | 4-coumarate   | 0.1×4=0.4 mM<br>(65.6 mg/L) | 0.78          | 96   | 0.012  | 0.008           | [18]       |
| 4CL ( <i>Populus trichocarpa</i><br>× <i>Populus deltoides</i> )<br>STS ( <i>Vitis vinifera</i> )  | SD                | 4-coumarate   | 10 mg/L                     | 1.45          | 48   | 0.145  | 0.030           | [19]       |
| 4CL ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )<br>STS ( <i>Vitis vinifera</i> )   | SD                | 4-coumarate   | 12 mg/L                     | 5.25          | 78   | 0.438  | 0.067           | [8]        |
| 4CL ( <i>Nicotiana tabacum</i> )<br>STS ( <i>Vitis vinifera</i> )  | YNB               | 4-coumarate   | 5 mM<br>(820 mg/L)          | 5.8           | 96   | 0.007  | 0.060           | [4]        |
| 4CL ( <i>Nicotiana tabacum</i> )<br>STS ( <i>Polygonum cuspidatum</i> )  | SD                | 4-coumarate   | 6×4=24 mg/L                 | 7.01          | 56   | 0.292  | 0.125           | This study |
| 4CL ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )<br>STS ( <i>Polygonum cuspidatum</i> )   | SD                | 4-coumarate   | 0.075 mM<br>(12.3 mg/L)     | 12.2          | 72   | 0.992  | 0.169           | [9]        |
| 4CL ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )<br>STS ( <i>Vitis vinifera</i> )   | YPD               | 4-coumarate   | 10+5=15 mM<br>(2460 mg/L)   | 391           | 144  | 0.159  | 2.715           | [6]        |
| PAL, CPRa ( <i>Populus trichocarpa</i> × <i>P. deltoides</i> )<br>C4H, 4CL ( <i>Glycine max</i> )<br>STS ( <i>Vitis vinifera</i> )                 | CM                | Phenylalanine | 10 mM<br>(1650 mg/L)        | 0.29          | 120  | 0.0002 | 0.002           | [14]       |
| PAL, CPRa ( <i>Populus trichocarpa</i> × <i>P. deltoides</i> )<br>C4H, 4CL ( <i>Glycine max</i> )<br>STS ( <i>Vitis vinifera</i> )                 | CM                | 4-coumarate   | 1 mM<br>(164 mg/L)          | 0.31          | 75   | 0.002  | 0.004           | [14]       |
| TAL ( <i>Rhodobacter sphaeroides</i> )<br>area ( <i>Escherichia coli</i> )<br>4CL ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )<br>STS ( <i>Vitis vinifera</i> ) | sucrose<br>medium | 4-coumarate   | 10×9=90 mg/L                | 2.3           | 180  | 0.0256 | 0.013           | [20]       |
| PAL ( <i>Rhodospiridium toruloides</i> )<br>C4H / 4CL ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )<br>STS ( <i>Arachis hypogaea</i> )                           | YP                | Tyrosine      | 12 mM<br>(2172 mg/L)        | 5.8           | 80   | 0.003  | 0.073           | [21]       |
| TAL ( <i>Rhodobacter sphaeroides</i> )<br>4CL ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )<br>RS ( <i>Vitis vinifera</i> )                                      | YPD               | Tyrosine      | 3 mM<br>(543 mg/L)          | 6.2           | 120  | 0.011  | 0.052           | [22]       |
| TAL ( <i>Rhodobacter sphaeroides</i> )<br>4CL ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )<br>STS ( <i>Vitis vinifera</i> )                                     | SD                | 4-coumarate   | 100×4=400 μM<br>(25.6 mg/L) | 14.4          | 96   | 0.563  | 0.150           | [7]        |

注: YPD 培养基: 酵母提取物、蛋白胨和葡萄糖培养基, SD 培养基: 缺陷型合成培养基, YNB 培养基: 酵母氮源基础培养基, CM 培养基: 基础型完全培养基, YD 培养基: 酵母提取物和蛋白胨培养基。在底物“添加浓度”栏里的表达式“a×n=x”代表底物添加总浓度为 x, 分 n 次加入, 每次加 a。如“0.1×4=0.4 mM”表示 4-香豆酸添加总浓度为 0.4 mM, 分 4 次添加, 每次添加 0.1 mM。“a+b=x”代表底物添加总浓度为 x, 分 2 次加入, 添加浓度分别为 a 和 b。如“10+5=15 mM”表示 4-香豆酸添加总浓度为 15 mM, 分 2 次添加, 添加浓度分别为 10 mM 和 5 mM。转化率=产量/添加量。产率=产量/周期。

### 3 结论

白藜芦醇具有多种生物活性,对人类健康有多方面积极作用,为了满足其日益增长的需求,研究开发一种有效的微生物合成白藜芦醇方法成为重点。通过优化调整基因组合方式、表达策略、培养基组成和底物流添加方式等有望进一步提高重组酿酒酵母生产白藜芦醇的效率。本研究提供了一种操作简单、生产周期短的酵母合成白藜芦醇的方法,为实现其规模化生产提供基础。

### 参考文献

- [1] 李先宽,李赫宇,李帅,等.白藜芦醇研究进展[J].中草药,2016,47(14):2568-2577  
LI Xian-kuan, LI He-yu, LI Shuai, et al. Advances in study on resveratrol [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(14): 2568-2577
- [2] Konstantin V. Kiselev. Perspectives for production and application of resveratrol [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90: 417-425
- [3] 王长松,赵莹,赵广荣.微生物合成白藜芦醇的研究进展[J].微生物学通报,2014,41(2):352-357  
WANG Chang-song, ZHAO Ying, ZHAO Guang-rong. Advances on resveratrol production of engineered microorganisms [J]. Microbiology China, 2014, 41(2): 352-357
- [4] Jules Beekwilder, Rianne Wolswinkel, Harry Jonker, et al. Production of resveratrol in recombinant microorganisms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5670-5672
- [5] Shin So-Yeon, Han Nam Soo, Park Yong-Cheol, et al. Production of resveratrol from *p*-coumaric acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing 4-coumarate: Coenzyme a ligase and stilbene synthase genes [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 48(1): 48-53
- [6] Sydor Tobias, Schaffer Steffen, Boles Eckhard. Considerable increase in resveratrol production by recombinant industrial yeast strains with use of rich medium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 10(76): 3361-3363
- [7] Wang Ye-chun, Yu Oliver. Synthetic scaffolds increased resveratrol biosynthesis in engineered yeast cells [J]. Journal of Biotechnology, 2012, 157(1): 258-260
- [8] Zhang Yan-sheng, Li Song-zhe, Li Jia, et al. Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells [J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(40): 13030-13031
- [9] Guo Hui-li, Yang Ya-dong, Xue Fei-yan, et al. Effect of flexible linker length on the activity of fusion protein 4-coumaroyl-coa ligase: Stilbene synthase [J]. Molecular Bio Systems, 2017, 13(3): 598-606
- [10] Watts Kevin T, Lee Pyung C, Claudia Schmidt-Dnnert. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. BMC Biotechnology, 2006, 6(22): 1-12
- [11] Yang GG, Xu XY, Ding Y, et al. Linker length affects expression and bioactivity of the onconase fusion protein in *Pichia pastoris* [J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(4): 19360-19370
- [12] R Daniel Gietz, Robin A Woods. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method [J]. Methods in Enzymology, 2002, 350(350): 87-96
- [13] 郑世刚,李臻,赵善仓,等.白藜芦醇合成酶基因在基因工程中的应用及功能研究进展[J].生物工程学报,2014,30(3): 341-354  
ZHENG Shi-gang, LI Zhen, ZHAO Shan-cang, et al. Advances of resveratrol synthase gene in the application of genetic engineering and biofunctional investigation [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(3): 341-354
- [14] Emmanouil Trantas, Nickolas Panopoulos, Filippos Ververidis. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metabolic Engineering, 2009, 11(6): 355-366
- [15] Xue Fei-yan, Guo Hui-li, Hu Ying-ying, et al. Expression of codon-optimized plant glycosyltransferase UGT72B14 in *Escherichia coli* enhances salidroside production [J]. Biomed Research International, 2016: 9845927
- [16] 郭辉力,罗在柒,杨亚东,等.两种不同植物来源白藜芦醇生物合成关键酶-芪合酶催化效率比较[J].生物工程学报,2014,30(10):1622-1633  
GUO Hui-li, LUO Zai-qi, YANG Ya-dong, et al. Comparison of stilbene synthase from different plant sources for resveratrol biosynthesis [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(10): 1622-1633
- [17] Wang Miao-miao, Sun Jing-feng, Xue Fei-yan, et al. The effect of intracellular amino acids on GSH production by high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2012, 168(1): 198-205

(下转第 150 页)

现代食品科技