

生物合成对香豆酸大肠杆菌工程菌的构建

梁景龙, 郭丽琼, 林俊芳, 何泽琪

(华南农业大学食品生物技术研究所, 食品学院生物工程系, 广东广州 510640)

摘要: 对香豆酸是一种具有预防心血管疾病、抗氧化和抗菌消炎等生物活性的酚类物质, 同时, 它也是高价值苯丙烷类保健营养品(如白藜芦醇)的前体。本研究希望创制出一种生物合成对香豆酸的方法, 以缓解对香豆酸的供求问题。把带有粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)酪氨酸解氨酶(*RgTAL*)基因的组成型表达载体转化大肠杆菌ATCC31884, 并通过PCR鉴定后, 获得重组菌株。对重组菌株进行发酵培养, 对发酵液进行高效液相色谱检测, 确定工程菌具有生物合成对香豆酸的能力。随后通过优化L-酪氨酸的添加量和工程菌的发酵时间, 最终确定, 底物L-酪氨酸的添加量为0.5 mM, 发酵时间为36 h, 检测发酵液中的对香豆酸含量最高, 为161.23 mg/L。这表明, *Rgtal*基因在重组大肠杆菌中成功得到了表达, 并且能利用自身代谢和外源添加的L-酪氨酸生物合成对香豆酸。

关键词: 对香豆酸; 大肠杆菌; 生物合成

文章编号: 1673-9078(2016)3-86-90

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.015

Construction of Engineering *Escherichia coli* for *p*-Coumaric Acid Bioproduction

LIANG Jing-long, GUO Li-qiong, LIN Jun-fang, HE Ze-qi

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

Abstract: *p*-Coumaric acid is a bioactive phenolic compound that can prevent cardiovascular disease, with antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties. It is also a precursor of high-value phenylpropanes nutraceuticals (such as resveratrol). A new method for *p*-coumaric acid bioproduction was developed in this study to increase production levels to meet the growing demand for this compound. The constitutive expression vector containing tyrosine ammonia lyase gene from *Rhodotorula glutinis* (*RgTAL*) was transformed into host strain, *Escherichia coli* ATCC31884. The recombinant strain was confirmed by polymerase chain reaction (PCR). Fermentation broth using the recombinant strain was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and *p*-coumaric acid bioproduction by the engineered *E. coli* strain was confirmed. Optimal concentration of L-tyrosine substrate to be added and fermentation time were identified; highest yield of *p*-coumaric acid (161.23 mg/L) was achieved with 0.5 mM L-tyrosine and 36 h fermentation. The results indicated that *Rgtal* gene was successfully expressed in the recombinant engineered *E. coli* strain, which was capable of *p*-coumaric acid biosynthesis via its own metabolism, using exogenously supplemented L-tyrosine.

Key words: *p*-coumaric acid; *Escherichia coli*; biosynthesis

对香豆酸(*p*-Coumaric acid), 化学名称为4-羟基肉桂酸, 广泛存在于自然界植物当中, 为白花蛇舌草、海金沙草、杜仲叶的有效成分之一。对香豆酸具有预防心血管疾病^[1]、抗氧化^[2]、防癌^[3]、抗菌消炎^[4]和利

收稿日期: 2015-05-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272217; 31071837); 广东省科技计划项目(2013B010404041)

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-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 食品微生物与天然产物

胆^[5]等对人体有益的生物活性。另外, 对香豆酸是植物苯丙氨酸次级代谢途径的中间产物, 是合成类黄酮、异黄酮、芪类等高价值保健营养品的中间体, 如杜鹃素、柚皮素、花青素、槲皮素、儿茶素和白藜芦醇等^[6]。而且, 它也是一种重要的有机化工原料, 广泛应用于药物、香精香料等精细化工产品的制备^[7]。现阶段获得对香豆酸的途径主要以化学合成和植物提取为主。化学合成面临反应时间长, 高能耗、有毒副产品及环境污染的难题。植物提取则面临成本高、生产力低, 生态资源环境等问题。近年来, 代谢工程在微生物合成植物次级代谢产物方面取得了重要进展^[8]。

Todd 等^[9]首次将 *Rhodotorulag lutinis* TAL 基因整合到大肠杆菌中,实现了由 TAL 途径将葡萄糖转化为香豆酸。Zhixiong 等^[10]成功地把来源于 *Rhodotorula glutinis* TAL 基因在大肠杆菌中表达,把 L-酪氨酸转化为香豆酸,但催化效率不高。利用 TAL 及其他关键酶转化 L-酪氨酸为相应活性物质的报道比较多。较新的一则报道为 Siyuan 等^[11]将 *Saccharothrix spanaensis* 克隆得到的 TAL 基因与其他来源的关键酶基因在大肠杆菌共表达,以 L-酪氨酸为底物,获得了多种活性物质,分别为对香豆酸、白藜芦醇、白皮杉醇、咖啡酸、阿魏酸和姜黄素。

微生物菌株随时可以从实验室到工业化的大规模发酵生产,具有生产周期短,培养条件的成本低,产物提纯简便,环境污染少等优势。为此,本研究尝试以一株经基因改造的大肠杆菌 ATCC31884 为出发菌株,利用它本身丰富的莽草酸代谢途径,使用基因工程的手段,引入来自粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 的酪氨酸解氨酶 (RgTAL),使菌体利用自身代谢和外源添加的 L-酪氨酸,生物合成对香豆酸,为日后工业化生产对香豆酸和生物合成苯丙烷类活性物质打下基础。

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 study

引物名称	引物序列 (5'-3')
pF_M1	AAGCTTGTGCGTAATGCTTAGGCACAGGA
pR_M1	CGGAGGGGGCCATATATTCCACCAGC
pF_M2	GCTGGTGGAAATATATGGCCCCCTCCGT
pR_M2	TCGTTTATTTGATGCCTCT ATGCCATCATCTTGA
pF_M3	CAAGATGATGGCATAGAGGC ATCAAATAAAAACGAA
pR_M3	TCTAGAGAACCATGAATTAC GAATTCGAGCTCG

大肠杆菌 ATCC31884, 购自美国 ATCC 菌种收藏中心 (*E. coli* ATCC31884: *aroH367*, *tyrR366*, *ma-2*, *lacY5*, *aroF394^{br}*, *malT384*, *pheA101^{br}*, *pheO352*, *aroG397^{br}*); 大肠杆菌 DH5 α , 由本实验室保存; pQE-30、pMD18-pGAP、pMD18-Rgtal, 由本实验室保存; 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、M9 改良培养基 (1 \times M9 盐, 酵母提取物 10 g/L, 3% 甘油, MOPS 42 g/L, 调

至 pH 为 7.0)。质粒快速提取试剂盒, 购自天根生化科技有限公司; Ex Taq[®], 购自 Takara 宝生物工程有限公司; Marker III, 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; 对香豆酸标准品, 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。

高效液相色谱仪, 配有可变波长紫外检测器和 LC2000 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; 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; Eppendorf 离心机 5810R, 德国 Eppendorf 公司; Nano Drop 分光光度计 ND-1000, 美国 Nano Drop 公司; 电泳仪 DYY-6C, 北京市六一仪器厂制造; Mettler-Toledo 电子天平 AB204-N, 上海 Mettler-Toledo 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

设计引物进行 PCR 扩增, 如表 1 所示, pF_M1 与 pR_M1 所对应的模板为质粒 pMD18-pGAP; pF_M2 与 pR_M2 所对应的模板为质粒 pQE-30; pF_M3 与 pR_M3 所对应的模板为质粒 pMD18-Rgtal。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 Tm 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 pF_M1 与 pR_M3 的 Tm 值和片段总长度设定, 三个回收片段等比例混合, 每 50 μ L 反应体系中 DNA 总模板量不超过 400 ng。PCR 产物回收纯化后, 最终得到连接片段 M1M2M3。参考 Takara 产品说明书, 连接 pMD18-T, 测序无误后, 通过 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切连接至 pQE-30 载体。

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 鉴定和酶切鉴定。其中, 使用引物 pF_M1 和 pR_M2 进行 PCR 鉴定质粒是否含有整个 Rgtal 基因表达框。菌落 PCR 反应条件与表达元件 PCR 条件类似。酶切鉴定使用 *Hind*III, *Xba*I 和 *Dra*I 进行三酶切反应。

1.2.3 对香豆酸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 100 mL M9 改良培养

液的250 mL三角瓶中, 并加入终浓度为80 μg/mL的氨苄青霉素在37 °C, 200 r/min过夜摇床培养。离心收集菌体后加入到装有100 mL M9改良培养液的500 mL三角瓶中, 并加入终浓度为80 μg/mL的氨苄青霉素, 和相应浓度的L-酪氨酸, 发酵培养72 h, 其中12、24、36、48、60和72 h各取样2 mL。其中0.5 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, 取上清液过孔径为0.22 μm的尼龙膜, 备HPLC检测使用。其余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对香豆酸的含量, 色谱条件如下: C18 反相柱 (5 μm, 250 mm×4.6 mm), 检测波长 308 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL; 流动相: 乙腈: 水 (含 0.1% 乙酸) (35:65)。对香豆酸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 M9 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

PCR 扩增结果如图 1 (a)、(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片段 (pGAP) M1, 大小为 127 bp; 来源于 pQE-30 的 *rrnB* T1 终止子片段 M2, 大小为 237 bp; 含有重叠区域的 *Rgtal* 片段 M3, 大小为 2175 bp。三个片段回收后进行降落重叠延伸 PCR, 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 如图 1 (c) 所示。成功得到三片段连接片段 M1M2M3, 大小为 2506 bp。回收三片段 PCR 连接产物后连接 pMD18-T, 测序无误后, 通过 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切连接至 pQE-30 载体, 最终得到表达载体 pQE30-Rgtal, 如图 2 所示, 大小为 5198 bp。

2.2 重组大肠杆菌的 PCR 鉴定和酶切鉴定

把已构建好的表达载体 pQE30-Rgtal 转化大肠杆菌 ATCC31884, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 3 (a)。含有完整表达元件片段大小为 2506 bp, 泳道 1 的条带与 Marker 相比较, 证实 PCR 产物与预期产物大小相一致。把该菌落进行扩增培养后提取质粒进行酶切鉴定。考虑到质粒框架与表达框架大小相似, 质粒框架中有

5 个 *Dra*I 的位点, 而表达框架没有该位点, 所以采取的验证策略为: 以该质粒为模板, 使用 *Hind*III, *Xba*I 和 *Dra*I 进行三酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 3 (b)。质粒框架被切成小片段, 而表达框架片段只被 *Hind*III 和 *Xba*I 切下, 大小为 2506 bp, 泳道 1 和 Marker 相比较, 证实酶切产物与预期产物大小相一致。通过 PCR 鉴定和酶切鉴定后, 证实重组工程菌株体内带有目的质粒。

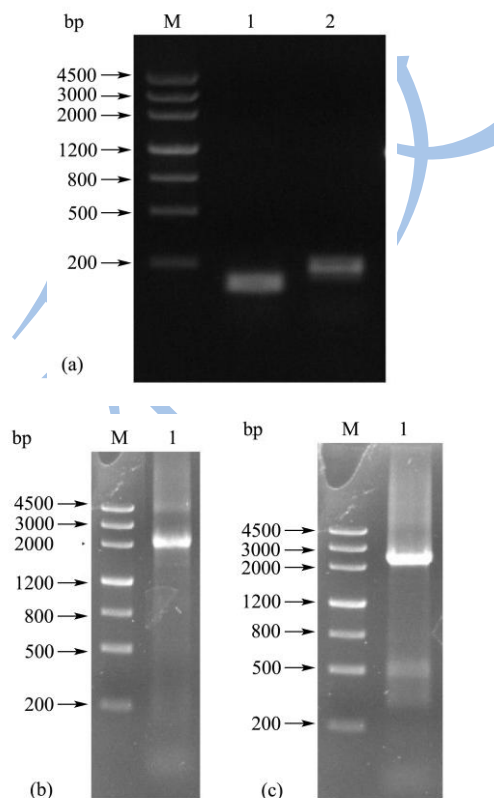


图 1 表达元件 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.1 Electrophoresis of PCR amplification products of expression elements

注: M: DNA Marker; (a) 1: 启动子M1片段; (a) 2: 终止子M2片段; (b) 1: *Rgtal*M3片段; (c) 1: M1M2M3连接片段。

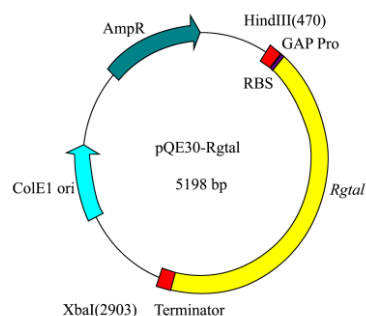


图 2 pQE30-Rgtal 组成型表达载体图

Fig.2 Schematic diagram of constitutive expression vector pQE30-Rgtal

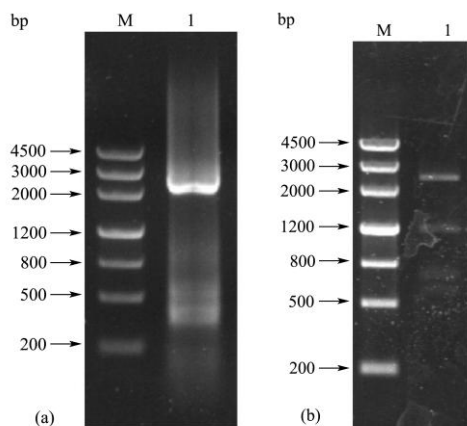


图3 重组大肠杆菌 PCR 鉴定和酶切鉴定图

Fig.3 Identification of recombinant *E.coli* with pQE30-Rgtal by PCR amplification and restriction enzyme digestion

注: M: DNA Marker; (a) 1: 菌落PCR产物; (b) 1: 质粒HindIII, XbaI和DraI三酶切产物。

2.3 发酵液中对香豆酸的高效液相色谱检测

把工程菌株进行发酵定性试验, 发酵过程中不额外添加底物 L-酪氨酸。结果如图 4 所示, 对香豆酸标准品 HPLC 色谱图 (a) 中, 对香豆酸的保留时间为 4.85 min。发酵液样品 HPLC 色谱图 (b) 中有一保留时间为 4.83 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, *Rgtal* 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-酪氨酸生物合成对香豆酸。

2.4 L-酪氨酸的不同添加量对工程菌株产对香豆酸含量的影响

在确定工程菌株能生产对香豆酸后, 设计实验考察外源添加 L-酪氨酸能否增加对香豆酸的合成量。首先, 需要制作对香豆酸的标准曲线以对产物的生成量进行测定。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, 对香豆酸的线性回归方程为 $Y = 4.5219 \times X^{-6} - 1.2806$, 相关系数 $R^2 = 0.9865$ 。其中 Y 为对香豆酸标准品浓度, 单位为 mg/L; X 为峰面积, 单位为 $\mu\text{AU} \cdot \text{s}$ 。

摸索底物添加量的实验发现, 实验室规模的摇瓶发酵条件下, 工程菌未能利用大量的 L-酪氨酸转化为对香豆酸, 而且高浓度的 L-酪氨酸会抑制工程菌对香豆酸的生物合成。为此, 考察最适底物添加量的试验选择了 0.25、0.5、0.75 和 1.0 mM 的 L-酪氨酸组合, 并不添加 L-酪氨酸为对照组, 发酵 24 小时后, 测定各组别的对香豆酸生成量。

氨酸组合, 并不添加 L-酪氨酸为对照组, 发酵 24 小时后, 测定各组别的对香豆酸生成量。

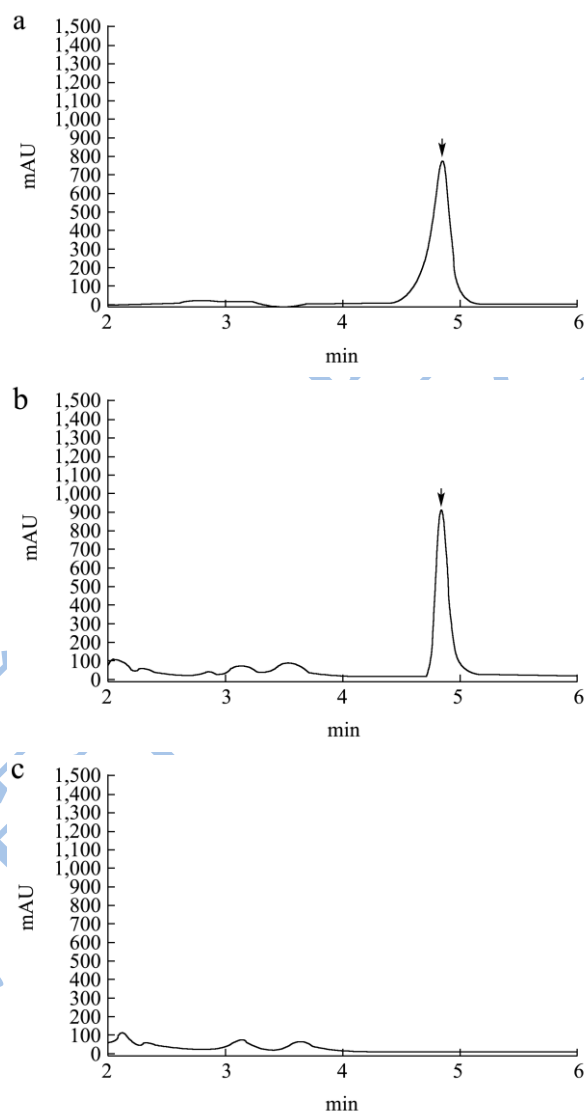


图4 对香豆酸标准品和重组菌株发酵液样品的 HPLC 图

Fig.4 HPLC chromatograms of broth sample of recombinant strain and p-coumaric acid standard

注: a: 对香豆酸标准品; b: 发酵液样品; c: 空白对照。

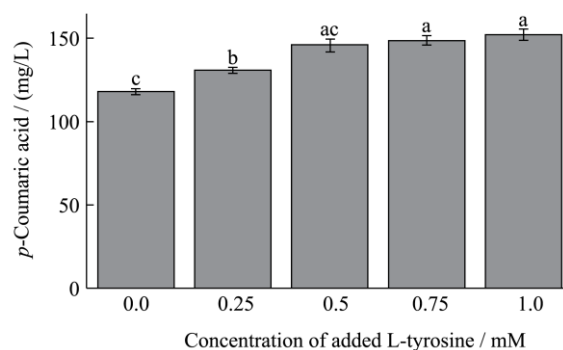


图5 不同添加量的 L-酪氨酸对发酵产物对香豆酸含量的影响
Fig.5 Effects of L-tyrosine concentration on p-coumaric acid bioproduction.

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

结果如图5所示，工程菌在不添加L-酪氨酸的发酵条件下，生物合成的对香豆酸量为 117.79 ± 1.59 mg/L。在外源添加0.5 mM的L-酪氨酸的发酵条件下，生物合成的对香豆酸量为 146.05 ± 3.11 mg/L，与0 mM和0.25 mM底物添加量相比差异显著。而在L-酪氨酸添加量达到1 mM时，生物合成的对香豆酸量为 152.22 ± 3.16 mg/L，与0.5 mM底物添加量相比差异不显著，说明多余的L-酪氨酸未能得到利用。考虑到效益与成本问题，最终确定L-酪氨酸的添加量为0.5 mM。

2.5 不同发酵时间对工程菌产对香豆酸含量的影响

外源添加0.5 mM L-酪氨酸发酵72 h，每隔12 h测定发酵液中对香豆酸的含量和 OD_{600} 。如图6所示，对香豆酸的含量在0~36 h的范围内呈增长趋势，36 h以后，对香豆酸的含量不再提高，并随着时间的推移，含量有所下降。其中，36 h的发酵液中测得的对香豆酸含量为 161.23 ± 3.71 mg/L。菌体生长情况如图所示，工程菌的浓度在发酵培养12 h后达到最高值，随着时间的推移，菌株开始进入平台期和衰亡期。所以，若要进一步提高对香豆酸的产量可以从发酵条件入手，通过增大菌体密度来提高产物产量。

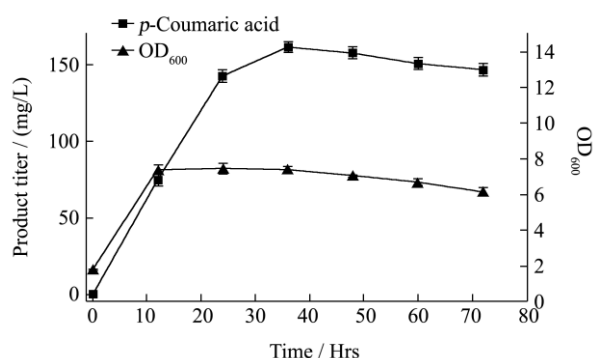


图6 不同发酵时间对香豆酸生成量和菌体生长的动态变化情况

Fig.6 Dynamic changes in the production of *p*-coumaric acid and the growth of recombinant *E. coli* with different fermentation times

注：试验结果测定3次，表示为 $\bar{x} \pm SE$ 。

3 结论

3.1 近年来，随着生产的需要，对香豆酸的需求量不断上升。以对香豆酸为中间体的苯丙烷类天然活性物质因具有广谱的生物活性而备受关注和开发。目前传

统制备对香豆酸的化学合成与植物提取法已满足不了绿色、环保、低能耗的生产模式，因此对香豆酸和苯丙烷类物质的微生物制造已成为当前天然活性物质研究的热点。

3.2 本研究利用一株富有莽草酸代谢产物的大肠杆菌 ATCC31884 为出发菌株，引入酪氨酸解氨酶基因，重组子利用自身代谢和外源添加的 L-酪氨酸生物合成对香豆酸。实验结果显示工程菌株利用 L-酪氨酸的能力比较低，主要原因是 L-酪氨酸并非此酶的最佳底物，RgTAL 在宿主体内主要起苯丙氨酸氨作用，Todd 等^[9]曾测定了一株粘红酵母 TAL 的酶活力为 0.0143 U/mg，最低的 PAL/TAL 活性比系数为 1.68，证实了酶活能力的低下。对 RgTAL 进行密码子偏好性优化可增加菌体的转化能力，Sun-Young 等^[12]对 RgTAL 进行了密码子优化，在 pET 表达系统下生成对香豆酸量最大提高了 3.3 倍。Qin 等^[13]使用了 RgTAL 和其他关键酶基因在大肠杆菌共表达，利用自身代谢的 L-酪氨酸高产咖啡酸 766.68 mg/L。其次，我们的实验均以摇瓶条件进行，菌体 OD 值在 7.66 ± 0.32 就无法提高了，在之后的实验，我们将对培养基配方、培养条件、培养规模等进一步地优化，以望能提高工程菌产对香豆酸的能力。

3.3 大肠杆菌表达系统用以生产对香豆酸及其代谢产物具有很大的可行性和应用前景。在日后的研究中还需要进一步对大肠杆菌重组菌株进行遗传改造并优化其发酵条件，为日后工业化生产对香豆酸和生物合成苯丙烷类活性物质打下基础。

参考文献

- [1] Jin-Chun Cheng, Fang Dai, Bo Zhou, et al. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: mechanism and structure-activity relationship [J]. Food Chemistry, 2007, 104: 132-139
- [2] Nsangou M, Fifen J J, Dhaouadi Z, et al. Hydrogen atom transfer in the reaction of hydroxycinnamic acids with (OH)-O-center dot and (HO₂)-H-center dot radicals: DFT study [J]. Journal of Molecular Structure-theochem, 2008, 862: 53-59
- [3] Abdel-Wahab M H, El-Mahdy M A, Abd-Ellah M F, et al. Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart [J]. Pharmacological Research, 2003, 48(5): 461-465
- [4] Bodini S F, Manfredini S, Epp M, et al. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and *p*-coumaric acid [J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49(5): 551-555

- [5] 冉桂梅,何彬,杨凌,等.对香豆酸在大鼠体内的药动学研究[J].中国药学杂志,2005,40(24):1889-1891
RAN Gui-mei, HE bin, YANG ling, et al. Study on pharmacokinetics of *p*-coumaric acid in rat [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2005, 40(24): 1889-1891
- [6] Vogt Thomas. Phenylpropanoid biosynthesis [J]. Molecular Plant, 2010, 3(1): 2-20
- [7] 胡铮璐,刘玉环,阮榕生,等.阿魏酸、对香豆酸碱法制备及应用研究进展[J].食品科学,2009,30(21):438-442
HU Zheng-rong, LIU Yu-huan, Roger Ruan, et al. Ferulic acid and *p*-coumaric acid: applications in various fields and preparation [J]. Food Science, 2009, 30(21): 438-442
- [8] Zhou Jingwen, Du Guocheng, Chen Jian. Novel fermentation processes for manufacturing plant natural products [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 25: 17-23
- [9] Todd Vannelli, Zhixiong Xue, Sabine Breinig, et al. Functional expression in *Escherichia coli* of the tyrosine-inducible tyrosine ammonia-lyase enzyme from yeast *Trichosporon cutaneum* for production of *p*-hydroxycinnamic acid [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41: 413-422
- [10] Zhixiong Xue, Michael McCluskey, Keith Cantera, et al. Improved production of *p*-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia-lyase enzyme [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 42: 58-64
- [11] Siyuan Wang, Shuwei Zhang, Anfeng Xiao, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of various phenylpropanoid derivatives [J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 153-159
- [12] Sun-Young Kang, Oksik Choi, Jae Kyung Lee, et al. Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 153
- [13] Qin Huang, Yuheng Lin, Yajun Yan. Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing *Escherichia coli* strain [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(12): 3188-3196