



咖啡酸合成途径重构及其在大肠杆菌中的异源表达

刘蓉^{1,2}, 王美燕², 杜红毅¹, 刘硕², 栾孟澳², 唐游¹, 廖凤霞³, 牛国清^{2*}

1 重庆中烟工业有限责任公司 烟叶资源科学利用重庆市重点实验室, 重庆 400060

2 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400715

3 重庆太极集团股份有限公司 医药研究院, 重庆 401147

刘蓉, 王美燕, 杜红毅, 刘硕, 栾孟澳, 唐游, 廖凤霞, 牛国清. 咖啡酸合成途径重构及其在大肠杆菌中的异源表达[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4371-4387.

LIU Rong, WANG Meiyan, DU Hongyi, LIU Shuo, LUAN Meng'ao, TANG You, LIAO Fengxia, NIU Guoqing. Reconstruction and heterologous expression of a biosynthetic pathway for caffeic acid in *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4371-4387.

摘要: 【目的】通过咖啡酸合成途径重构, 在大肠杆菌中实现咖啡酸的从头合成; 通过优化合成基因的表达提升咖啡酸的合成效率, 为咖啡酸及其衍生物的高效合成奠定基础。【方法】克隆约氏黄杆菌(*Flavobacterium johnsoniae*)酪氨酸氨解酶编码基因 *FjTAL* 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) 4-羟基苯乙酸-3-单加氧酶/核黄素氧化还原酶复合体编码基因 *EchpaBC*, 通过基因共表达重构咖啡酸合成途径, 导入常用大肠杆菌中进行表达。通过组成型启动子筛选、对香豆酸生物传感器动态调控和关键基因拷贝数增加相结合的方式, 构建一系列工程菌株, 并利用 HPLC 分析这些菌株中对香豆酸和咖啡酸的产生情况。随后比较添加不同氮源和底物对咖啡酸产量的影响。【结果】在大肠杆菌中实现了咖啡酸的从头合成; 通过启动子工程大幅提升了咖啡酸的合成效率, 以葡萄糖为底物时咖啡酸产量从 1.40 mg/L 提升到 96.40 mg/L, 以酪氨酸为底物时咖啡酸从 1.78 mg/L 提升到 123.31 mg/L; 将驱动 *EchpaBC* 表达的组成型启动子替换为对香豆酸生物传感器, 咖啡酸产量达到 162.73 mg/L; 额外增加一个 *EchpaBC* 的拷贝数促进对香豆酸的转化, 咖啡酸产量提高到 185.15 mg/L。【结论】本研究采用组成型启动子改造、生物传感器调控和关键基因拷贝数增加相结合的策略, 优化了 *FjTAL* 和 *EchpaBC* 的表达, 成功获得了咖啡酸高产工程菌株, 为咖啡酸的高效合成奠定了基础。

关键词: 咖啡酸; 大肠杆菌; 启动子工程; 生物传感器; 动态调控

资助项目: 重庆中烟工业有限责任公司科技项目(HX20220204)

This work was supported by the Technology Project of China Tobacco Chongqing Industrial Co., Ltd. (HX20220204).

*Corresponding author. E-mail: niu062376@swu.edu.cn

Received: 2024-06-11; Accepted: 2024-07-22; Published online: 2024-07-24

Reconstruction and heterologous expression of a biosynthetic pathway for caffeic acid in *Escherichia coli*

LIU Rong^{1,2}, WANG Meiyang², DU Hongyi¹, LIU Shuo², LUAN Meng'ao², TANG You¹, LIAO Fengxia³, NIU Guoqing^{2*}

1 Chongqing Key Laboratory of Scientific Utilization of Tobacco Resources, China Tobacco Chongqing Industrial Co., Ltd., Chongqing 400060, China

2 College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

3 Institutes of Biomedical Research, Chongqing Taiji Group Co., Ltd., Chongqing 401147, China

Abstract: [Objective] To realize the *de novo* biosynthesis of caffeic acid from glucose by reconstruction of its biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. Fine-tuning gene expression allows us to improve caffeic acid production, which paves a way for the high production of caffeic acid and its derivatives in *E. coli*. [Methods] The biosynthetic pathway of caffeic acid was reconstructed based on *FjTAL* and *EchpaBC*, which encoded the tyrosine ammonia lyase in *Flavobacterium johnsoniae* and the 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase complex in *E. coli*, respectively. The reconstructed pathway was then introduced into commonly used *E. coli* strains. We improved the expression levels of *FjTAL* and *EchpaBC* by screening constitutive promoters, utilizing an intermediate-based biosensor, and increasing the copy number of the key gene. Thus, a total of fourteen recombinant strains were obtained, and the production of caffeic acid and the intermediate *p*-coumaric acid in these strains was quantified by HPLC. Moreover, the effects of different nitrogen sources and substrate concentrations on the production of caffeic acid were investigated. [Results] We realized *de novo* biosynthesis of caffeic acid from glucose in *E. coli*. The use of constitutive promoters other than the commonly used T7 promoter contributed to the yield increase of caffeic acid. When glucose was used as the substrate, the yield of caffeic acid was increased from 1.40 mg/L to 96.40 mg/L. When tyrosine was used as the substrate, the yield of caffeic acid was increased from 1.78 mg/L to 123.31 mg/L. Furthermore, the yield of caffeic acid reached 162.73 mg/L when a *p*-coumaric acid biosensor instead of a constitutive promoter was used to drive the expression of *EchpaBC*. Moreover, the yield of caffeic acid was improved to 185.15 mg/L in the case of introducing an extra copy of *EchpaBC*. [Conclusion] We constructed the strains with high production of caffeic acid by promoter engineering, using an intermediate-base biosensor, and increasing copy number of the key gene. Our study laid a solid foundation for the high production of caffeic acid.

Keywords: caffeic acid; *Escherichia coli*; promoter engineering; biosensor; dynamic regulation

咖啡酸(3,4-二羟基肉桂酸)是一种天然酚类化合物,具有强抗氧化活性,市场需求在食品、化妆品和化工等领域均十分巨大。同时,咖啡酸具有抗病毒、抑菌、抗感染和抗肿瘤等多种生物活性^[1-3],已应用于白细胞减少症和心脑血管疾病的治疗。此外,咖啡酸是合成多种高价值酚酸类化合物的关键前体,如迷迭香酸、咖啡酸苯乙酯、咖啡酸苯乙胺和白皮杉醇等^[4-6]。目前,咖啡酸主要通过植物提取、化学合成和微生物发酵3种方法制备。然而植物中咖啡酸的含量偏低,生长周期长,提取工艺复杂,导致生产成本较高。化学合成法存在有毒试剂使用和副产物残留等不足。相较而言,微生物合成具有以下优势:(1)常用工业微生物菌株,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等,能以葡萄糖为底物产生酪氨酸,可为咖啡酸合成提供直接前体;(2)微生物合成兼具绿色环保、周期短和成本低等特性。因此,微生物合成已成为咖啡酸生产最具竞争力的方式。

微生物利用葡萄糖通过莽草酸途径形成酪氨酸,后者经酪氨酸氨解酶(tyrosine ammonia lyase, TAL)和4-羟基苯乙酸3-羟基化酶(4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase, HpaB)/核黄素氧化还原酶[NAD(P)H-flavin oxidoreductase, HpaC]复合体(HpaBC)依次催化合成咖啡酸^[7-8]。为了提高咖啡酸的产量,国内外学者已在外源酶筛选、辅因子再生和发酵条件优化等方面开展了一系列研究工作^[8-10],如Zhou等比较了不同来源的HpaBC酶,并从中筛选了来自肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)的KpHpaBC进行咖啡酸催化反应,减少了酪氨酸到副产物的转化^[11]。Wang等通过敲除合成酪氨酸的竞争途径、增强辅因子水平和引入咖啡酸外排基因等手段提高了咖啡酸产量^[12]。此外,启动子工程和生物传感器介导的动态调控是实现天然产物微生物

合成的重要手段^[13-15],如Pan等将L-缬氨酸合成关键基因的原始启动子替换为不同的组成型启动子,获得的工程菌株显著提升了L-缬氨酸的产量^[14]。Guo等通过基于酪氨酸生物传感器的群体筛选策略,提高了酪氨酸高产菌株在群体中的相对比例,将苯酚的产量提高了3.9倍^[15]。Zhou等在大肠杆菌中构建基于对香豆酸和柚皮素生物传感器的动态调控网络,并对柚皮素合成相关的多个基因进行协调控制,显著提高了柚皮素的产量^[16]。

本研究选择了约氏黄杆菌(*Flavobacterium johnsoniae*)的酪氨酸解氨酶FjTAL和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的4-羟基苯乙酸-3-单加氧酶/核黄素氧化还原酶复合体EcHpaBC重构咖啡酸合成通路,在大肠杆菌中进行咖啡酸的从头合成。在此基础上,综合应用启动子工程、生物传感器介导的动态调控和增加关键基因拷贝数的策略,对咖啡酸异源合成途径进行优化,提升了咖啡酸产量,这些研究成果有助于咖啡酸及其高值衍生物的高效合成和绿色生产。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所用菌株见表1,所涉及质粒见表2。本研究所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列如表3所示。

1.1.2 培养基

大肠杆菌JM109和DH5 α 主要用于质粒构建,BL21 Star(DE3)作为咖啡酸合成宿主细胞。

LB培养基(g/L):胰蛋白胨10.0,酵母粉5.0,氯化钠10.0。LB培养基用于大肠杆菌常规培养。

M9培养基(g/L):M9 Broth 11.30,葡萄糖5.00,氯化钙0.014 7,硫酸镁0.246,硫酸亚铁0.003,盐酸硫胺素0.01, CaCO₃ 5.00。M9培养基用于咖啡酸合成重组菌株发酵培养。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Bacterial strains used in this study

<i>Escherichia coli</i> strains	Description	Sources
DH5α	F ⁻ ϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-rgF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	ThermoFisher Scientific
JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>relA1 supE44 D (lac-proAB)</i> [F' <i>traD36 proAB laq1^qZ</i> ΔM15]	ThermoFisher Scientific
BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> , λ DE3=λ <i>sBamH</i> Io Δ <i>EcoR</i> I-B <i>int::(lacI::lacUV5::T7-gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs
BW25113/pIJ790	K-12 derivative; Δ <i>araBAD</i> Δ <i>rhaBAD</i> , Cam ^R	[17]
BL21 Star(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B) <i>gal dcm rne131</i> (DE3) <i>pLysS</i> , Cam ^R	ThermoFisher Scientific
CA01	BL21(DE3) containing pCTCQ-1	This work
CA02	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-1	This work
CA03	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-2	This work
CA04	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-3	This work
CA05	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-4	This work
CA06	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-5	This work
CA07	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-6	This work
CA08	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-7	This work
CA09	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-8	This work
CA10	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-9	This work
CA11	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-10	This work
CA12	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-15	This work
CA13	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-16	This work
CA14	BL21 Star(DE3) containing pCTCQ-17	This work
DH01	DH5α containing pCTCQ-11	This work
DH02	DH5α containing pCTCQ-12	This work
DH03	DH5α containing pCTCQ-13	This work

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant characteristics	Sources
pACYCDuet-1	p15A ori, T7, Cm ^R	Novagen
pET23a	pfl ori, T7, Amp ^R	Novagen
pACYCDuet-2	A derivative of pACYCDuet-1 containing kanamycin resistance gene (Kan ^R) replacing chloramphenicol resistance gene (Cm ^R)	This work
pCTCQ-1	pACYCDuet-2 containing <i>FjTAL</i> gene driven by T7 promoter and <i>EchpaBC</i> gene driven by T7 promoter	This work
pCTCQ-2	pCTCQ-1 with the promoter of <i>FjTAL</i> gene replaced by <i>glnSm</i> promoter	This work
pCTCQ-3	pCTCQ-1 with the promoter of <i>FjTAL</i> gene replaced by <i>J23101</i> promoter	This work
pCTCQ-4	pCTCQ-1 with the promoter of <i>FjTAL</i> gene replaced by <i>J23101</i> * promoter	This work
pCTCQ-5	pCTCQ-1 with the promoter of <i>FjTAL</i> gene replaced by <i>J23101</i> ** promoter	This work
pCTCQ-6	pCTCQ-1 with the promoter of <i>EchpaBC</i> gene replaced by <i>glnSm</i> promoter	This work
pCTCQ-7	pCTCQ-1 with the promoter of <i>EchpaBC</i> gene replaced by <i>J23101</i> promoter	This work
pCTCQ-8	pCTCQ-1 with the promoter of <i>EchpaBC</i> gene replaced by <i>J23101</i> * promoter	This work
pCTCQ-9	pCTCQ-1 with the promoter of <i>EchpaBC</i> gene replaced by <i>J23101</i> ** promoter	This work
pCTCQ-10	pCTCQ-8 with the promoter of <i>FjTAL</i> gene replaced by <i>glnSm</i> promoter	This work
pCTCQ-11	pET23a containing <i>padR</i> gene driven by <i>lpp0.2</i> promoter and <i>lacZ</i> gene driven by P9 promoter	This work
pCTCQ-12	pET23a containing <i>padR</i> gene driven by <i>oxb20</i> promoter and <i>lacZ</i> gene driven by P9 promoter	This work
pCTCQ-13	pET23a containing <i>padR</i> gene driven by <i>oxb20</i> promoter and <i>lacZ</i> gene driven by P9* promoter with two PadR binding boxes	This work
pCTCQ-14	pCTCQ-10 with the promoter of <i>EchpaBC</i> gene replaced by P9 promoter	This work
pCTCQ-15	pCTCQ-14 along with <i>padR</i> gene driven by <i>lpp0.2</i> promoter	This work
pCTCQ-16	pCTCQ-14 along with <i>padR</i> gene driven by <i>oxb20</i> promoter	This work
pCTCQ-17	pCTCQ-10 added with <i>EchpaBC</i> gene driven by <i>J23101</i> * promoter	This work

Kan^R: Kanamycin resistance; Amp^R: Ampicillin resistance; Cm^R: Chloramphenicol resistance.

表 3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Purpose (construction)
FjTAL-F	CATCACACAGCCAGGATCCATGAACACCATTAACGAATATCTG	pCTCQ-1
FjTAL-R	AATTGAGCTCTTAGTTGTAAATCAGATGATCTTTCACT	
EcHpaBC-F	AATT <u>CATATG</u> AAACCAGAAGATTTCCGCGCC	pCTCQ-1
EcHpaBC-R	AATT <u>CTCGAG</u> TAAATCGCAGCTTCCATT	
pACYC-glnSm-Up-F	tcagataaaatatttctagaTCTGCTTTATGCCTGATGCG	pCTCQ-2
FjTAL-glnSm-Dn-R	tattcgtaaatggtgttcacCGTGGATTCCCAAAGCGTA	
pACYC-J23101-Up-F	tcagataaaatatttctagaTTTACAGCTAGCTCAGTCCTA	pCTCQ-3
FjTAL-J23101-Dn-R	cagatattcgtaaatggtgttcacGGTATATCTCCTTCTCTAGTCTCTAG	
pACYC-J23101*-Up-F	tcagataaaatatttctagaTTTACAGCTAGCTCAGTCCTA	pCTCQ-4
FjTAL-J23101*-Dn-R	tattcgtaaatggtgttcacGGTATATCTCCTTCTCTAGTCTCTAG	
pACYC-J23101**-Up-F	tcagataaaatatttctagaTTTACACTAGCTCAGTCCTAGG	pCTCQ-5
FjTAL-J23101**-Dn-R	tattcgtaaatggtgttcacGGTATATCTCCTTCTCTAGTCTCTAG	
glnSm-F	AATT <u>GCGGCCGCT</u> CTGCTTTATGCCTGATGCG	pCTCQ-6
glnSm-R	TTAACATATGCGTGGATTCCCAAAGCGTA	
J23101-F	<u>GGCCGCTTTACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCTACTAG</u> AGACTAGAGAAGGAGATATACCCA	pCTCQ-7
J23101-R	<u>TATGGGTATATCTCCTTCTCTAGTCTCTAGTAGCTAGCATTATACCTAG</u> GACTGAGCTAGCTGTAAAGC	
J23101*-F	<u>GGCCGCTTTACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATATGCTAGCTACTAGA</u> GACTAGAGAAGGAGATATACCCA	pCTCQ-8
J23101*-R	<u>TATGGGTATATCTCCTTCTCTAGTCTCTAGTAGCTAGCATATACCTAG</u> GACTGAGCTAGCTGTAAAGC	
J23101**-F	<u>GGCCGCTTTACACTAGCTCAGTCCTAGGTATATGCTAGCTACTAGAG</u> ACTAGAGAAGGAGATATACCCA	pCTCQ-9
J23101**-R	<u>TATGGGTATATCTCCTTCTCTAGTCTCTAGTAGCTAGCATATACCTAG</u> GACTGAGCTAGTGTAAAGC	
LacZ-F	AATT <u>ACTAGT</u> TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGGTAG	pCTCQ-11
LacZ-R	TTAAGCATGCCCATGATTACGGATTCACTGG	
oxb20-PadR-Up-F	accgccagagataatttactcgagatcaaaCTATTTACAAGAGGGGGGCGTG	pCTCQ-12
PadR-oxb20-Dn-R	gcgtattttaatactctcatttttactcctgtcatGCCGGGTAAATACCGGATAGTC	
P9-F	AATT <u>GCGGCCGCT</u> AAATTATCTCTGGCGGTGTT	pCTCQ-14
P9-R	TTAA <u>CATATG</u> GATACCTTTCTCCTCTTTAATGAATT	
PadR-t0-Dn-R	gtccctcttcacactgctgacttaagATTTGTCCTACTCAGGAGAGCGTTC	pCTCQ-15
P9-lpp0.2-PadR-Up-F	acaccgccagagataatttagcgccgcAAAATATTGACAACATAAAAACTTTGT GTT	
oxb20-P9-Up-F	aacaccgccagagataatttagcgccgcCTATTTACAAGAGGGGGGCGTG	pCTCQ-16
t0-EcHpaBC-Up-F	aaatggaagctgcgatttaaaatGCATGCGTCCAGTAATGACCTCAGAA	pCTCQ-17
EcHpaBC-Dn-R	agcggtttctttaccagactcgagTTAAATCGCAGCTTCCATT	

Underlined sequences for restriction enzyme recognition sites, and lower-case letters for overlapping between DNA sequences.

为探究不同氮源对重组菌株发酵合成咖啡酸产量的影响,本研究制备了含有不同氮源的3种

M9 培养基,即在 M9 培养基中分别添加 0.00–2.00 g/L 酵母提取物(yeast extract, YE)、

10.00 g/L 胰蛋白胨(tryptone, TP)和 10.00 g/L 玉米浆(corn steep liquor, CSL), 相应的培养基分别命名为 M9YE、M9TP 和 M9CSL。

必要时在培养基中加入抗生素, 氨苄青霉素和卡那霉素的使用浓度为 100.00 µg/mL, 氯霉素使用浓度为 25.00 µg/mL。

1.1.3 主要试剂和仪器

色谱级甲醇, 北京迪科马科技有限公司; 卡那霉素、氨苄青霉素和氯霉素和质粒快速小提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; TIANamp Bacteria DNA Kit, 天根生化科技(北京)有限公司; 高保真 GXL DNA 聚合酶(PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase), T4 DNA 连接酶和限制性内切酶, TaKaRa 公司; 同源重组酶(ClonExpress® II One Step Cloning Kit), 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

PCR 仪和电穿孔系统, Bio-Rad 公司; 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 恒温培养箱, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 溶剂蒸发工作站, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 高效液相色谱仪, 岛津企业管理(中国)有限公司。

1.2 咖啡酸合成相关质粒和菌株的构建

为了能够在含氯霉素抗性的 BL21 Star(DE3)中使用, 首先利用 λ-Red 介导的重组(λ-Red-mediated recombination)方法将 pACYCDuet-1 的氯霉素抗性编码基因替换为卡那霉素抗性编码基因, 得到重组质粒 pACYCDuet-2^[17]。来自约氏黄杆菌的酪氨酸氨解酶编码基因 *FjTAL* (WP_012023194.1)^[12], 由苏州金唯智生物科技有限公司经密码子优化后合成, *EchpaBC* 扩增自 BL21(DE3)基因组 DNA, 该基因组 DNA 采用 TIANamp Bacteria DNA Kit 提取, 具体步骤详见试剂盒说明书。为构建 pCTCQ-1, 以合成的携带 *FjTAL* 基因质粒为模板, 利用引物 FjTAL-F 和 FjTAL-R 进行 PCR 扩

增合成 *FjTAL* 片段, 其 PCR 扩增的反应体系(50.0 µL): PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (1.25 U/µL) 1.0 µL, 5×PrimeSTAR GXL Buffer 10.0 µL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4.0 µL, 上、下游引物(10 µmol/L)各 2.0 µL, 含 *FjTAL* 的质粒模板 1.0 µL, ddH₂O 30.0 µL。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 1.6 min, 共 30 个循环; 68 °C 终延伸 5 min。后续 PCR 扩增的反应体系和反应条件与该 PCR 扩增相似, 将不赘述。将 pACYCDuet-2 目标载体和所得 *FjTAL* 片段通过 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切连接后获得中间载体。随后, 通过引物 EcHpaBC-F 和 EcHpaBC-R 对 BL21(DE3)基因组 DNA 进行扩增, 获得 *EchpaBC* 片段, 经 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切连接到上述中间载体相应位置, 构建得到重组质粒 pCTCQ-1。本研究筛选了 4 种大肠杆菌常用组成型启动子(*glnSm*、*J23101*、*J23101**和 *J23101***), 分别替换驱动 *FjTAL* 和 *EchpaBC* 表达的 T7 启动子^[18-19], 得到相应的重组质粒 pCTCQ-2–pCTCQ-10, 相关重组质粒见表 2。最后, 将构建所得重组质粒转化至所需感受态细胞中, 获得对应的重组菌株见表 1。相关载体的构建和详细转化操作参考分子克隆实验指南^[20]。

为了构建以对香豆酸为响应信号、利用 *lacZ* 作为报告基因的生物传感器, 合成了 pET23a-*lpp0.2-padR*-P9 质粒^[21]。使用 *LacZ*-F 和 *LacZ*-R 引物从 BL21(DE3)基因组 DNA 上扩增 *lacZ* 片段, 通过 *Spe* I 和 *Sph* I 酶切连接至上述合成质粒中, 获得 pCTCQ-11 重组质粒。随后, 通过同源重组将 pCTCQ-11 中驱动 *padR* 表达的 *lpp0.2* 组成型弱启动子更换为 *oxb20* 组成型强启动子^[22], 得到重组质粒 pCTCQ-12。将 pCTCQ-12 重组质粒中的 P9 启动子改造为包含 2 个 *PadR* 特异性结合位点的 P9*启动子, 得到了重组质粒

pCTCQ-13。将上述 3 个重组质粒分别导入 DH5 α 中, 获得相应的工程菌株 DH01–DH03 (表 1)。此外, 以 pCTCQ-11 为模板, 利用引物 P9-F 和 P9-R 进行 PCR 扩增获得 P9 启动子片段, 经 *Nde* I 和 *Not* I 酶切后, 连入 pCTCQ-10 相应位置, 得到重组质粒 pCTCQ-14。采用 PadR-t0-Dn-R 和 P9-lpp0.2-PadR-Up-F 引物从 pCTCQ-11 上扩增了 *lpp0.2-padR* 片段, 通过同源重组方法将其插入到 pCTCQ-14 中, 获得重组质粒 pCTCQ-15; 利用相同策略构建重组质粒 pCTCQ-16。以 pCTCQ-10 为模板, 利用 t0-EcHpaBC-Up-F 和 EcHpaBC-Dn-R 引物扩增得到 *J2310*-EchpaBC* 片段, 通过同源重组方法连接至 pCTCQ-10 相应位置, 得到重组质粒 pCTCQ-17。PCR 扩增反应体系及程序参考 PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 操作说明书, 同源重组反应体系和流程见 ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 使用说明书。

1.3 β -半乳糖苷酶活性测定

参照文献[23]报道的 β -半乳糖苷酶活性测定方法进行样品前处理与分析, 具体操作如下: 分别挑取菌株 DH01–DH03 单菌落于 3 mL LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床培养 10 h, 待菌液 OD_{600} =1.0 后, 按 1:100 接种到 3 mL M9 液体培养基中培养 1 h, 然后加入不同浓度的对香豆酸, 继续培养 2 h 后进行 OD_{600} 测试。随后, 取一定量菌液 12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 加入 1 mL Z buffer (60 mmol/L Na₂HPO₄, 40 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO₄, pH 7.0) 重悬。加入 100 μ L 氯仿和 50 μ L SDS (sodium dodecyl sulfate, 0.1%), 剧烈涡旋裂解细胞, 并在 28 °C 下加入 200 μ L ONPG (2-nitrophenyl β -galactopyranoside, 4 mg/mL), 记录起始时间为 t_1 , 待溶液变黄后立即加入 500 μ L Na₂CO₃ (1 mol/L) 终止反应, 记录终止时间 t_2 。

最后, 以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 OD_{420} 测定, 记录数值后计算 β -半乳糖苷酶活性, 如公式(1)所示^[23]。

$$\beta\text{-半乳糖苷酶活性} = \frac{1000 \times OD_{420}}{[(t_1 - t_2) \times V \times OD_{600}]} \quad (1)$$

1.4 重组菌株的发酵培养

挑取单菌落于 3.00 mL LB 液体培养基, 在 37 °C、220 r/min 培养 10 h, 待菌液 OD_{600} =1.0 后, 按 1:100 接种到 10.00 mL LB 液体培养基中继续培养 4 h。随后, 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 M9 液体培养基重悬菌体沉淀, 转接到 100 mL 锥形瓶中(含 30.00 mL M9 液体培养基, OD_{600} 终浓度值约 0.1), 在 37 °C、220 r/min 发酵培养 48 h。

1.5 重组菌株发酵产物的 HPLC 分析

取 1.00 mL 发酵液加入等体积乙酸乙酯涡旋振荡 1 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 重复一次, 合并两次乙酸乙酯萃取液。利用溶剂蒸发工作站蒸发完溶剂后, 加入 0.30 mL 色谱纯甲醇溶解, 溶液样品过 0.22 μ m 滤膜后备用。用色谱纯甲醇制备对香豆酸和咖啡酸标准溶液, 取一定量的对香豆酸和咖啡酸标准溶液和上述预处理样品一起进行 HPLC 检测。HPLC 测定条件: 色谱柱为 ZORBAX SB-C18 反相色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 粒径为 5 μ m), 流动相 A 为 0.1% 甲酸的去离子水, 流动相 B 为色谱纯甲醇; 流速为 0.80 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μ L; 咖啡酸和对香豆酸检测波长分别为 324 nm 和 308 nm。本研究采用梯度洗脱的方法, 具体流程: 0–8 min, 5%–50% 甲醇; 8–10 min, 50%–100% 甲醇; 10–12 min, 100%–5% 甲醇; 12–24 min, 5% 甲醇。以上述标准品绘制标准曲线, 根据标准曲线计算重组菌株发酵产物中咖啡酸和对香豆酸的含量。

2 结果与分析

2.1 咖啡酸合成途径重构及其在大肠杆菌中的表达

在大肠杆菌中, 诱导型启动子 T7 常用于外源基因的表达^[7]。因此, 本研究首先选择带有 T7 启动子的 pACYCDuet-1 质粒用于咖啡酸合成途径重构。考虑到 BL21 Star(DE3) 具有氯霉素抗性, pACYCDuet-1 无法在该菌株中表征, 利用 λ -Red-mediated recombination 方法将该质粒的抗性基因替换为卡那霉素抗性基因, 得到重组质粒 pACYCDuet-2。随后, 分别将源自约氏黄杆菌的酪氨酸解氨酶编码基因 *FjTAL* 和大肠杆菌的 4-羟基苯乙酸-3-单加氧酶/核黄素氧化还原酶复合体编码基因 *EchpaBC* 克隆到 pACYCDuet-2 的相应位置, 得到重组质粒 pCTCQ-1 (图 1A)。将该质粒分别导入大肠杆菌 BL21(DE3) 和 BL21 Star(DE3) 中, 得到相应的重组菌株 CA01 和 CA02。所得菌株经发酵后进行 HPLC 分析, 结果显示: 在 M9 培养基中添加酪氨酸底物时, 在 2 种重组菌株发酵液中均检测到咖啡酸, 值得注意的是, CA02 的咖啡酸色谱峰远高于 CA01 (图 1B)。同时, 在 M9 培养基中添加葡萄糖底物进行发酵, 仅在 CA02 发酵液中检测到咖啡酸, 而 CA01 中并未检测到咖啡酸(图 1B)。上述结果表明, 本研究构建的合成途径仅在 BL21 Star(DE3) 中实现由葡萄糖从头合成咖啡酸, 该菌株是咖啡酸异源合成的最适表达宿主。

在此基础上, 对 CA02 中的咖啡酸进行了产量测定。在 M9 培养基中添加葡萄糖时, CA02 的咖啡酸产量较低, 约为 1.40 mg/L (图 2)。为了探究咖啡酸产量偏低的原因, 分别添加了 *FjTAL* 和 *EchpaBC* 的直接作用底物酪氨酸和对香豆酸, 结果显示, 以酪氨酸为底物时, 咖啡酸产量

为 1.78 mg/L, 其含量与葡萄糖为底物时相当, 对香豆酸无积累; 添加对香豆酸底物时, 咖啡酸产量达到 67.60 mg/L, 对香豆酸含量约 1.22 mg/L (图 2)。上述结果表明, *FjTAL* 表达水平对咖啡酸的产量影响较大, 是咖啡酸合成的主要限制因素。

2.2 基于启动子工程的咖啡酸高产菌株构建

基于 T7 启动子重组菌株的咖啡酸从头合成能力较低, 本研究采用启动子工程优化 *FjTAL* 和 *EchpaBC* 的表达水平。首先, 筛选了 *glnSm*、*J23101*、*J23101** 和 *J23101*** 共 4 个不同强度的组成型启动子, 其中 *glnSm* 启动子是由谷氨酰-tRNA 合成酶(*glutaminyl-tRNA synthetase*)编码基因 *glnS* 的启动子改造所得^[18], *J23101*、*J23101** 和 *J23101*** 是 3 个人工合成的不同强度组成型启动子^[19]。首先利用这 4 个启动子分别驱动 *FjTAL* 的表达, 得到相应的重组菌株 CA03–CA06。这些菌株在 M9 培养基中发酵后, 通过 HPLC 分析发现所有重组菌株的咖啡酸产量均显著提升, 其中 *glnSm* 驱动 *FjTAL* 表达的 CA03 中咖啡酸产量最高, 以葡萄糖或酪氨酸为底物时, 产量分别达到 83.31 mg/L 和 98.46 mg/L (图 3A)。采用类似的策略, 将这 4 个启动子分别用于驱动 *EchpaBC* 的表达, 得到重组菌株 CA07–CA10。HPLC 结果显示, 含有 *J23101** 启动子的 CA09 中咖啡酸增产最高, 在添加葡萄糖或酪氨酸底物时, 咖啡酸产量分别为 8.87 mg/L 和 21.63 mg/L (图 3B)。与 CA02 相比, 启动子改造后工程菌株的咖啡酸产量均有所提升。结果表明, 启动子改造优化 *FjTAL* 和 *EchpaBC* 的表达水平可以有效提高咖啡酸的产量。在该研究基础上, 将 *FjTAL* 和 *EchpaBC* 的最佳启动子进行组合, 得到重组质粒 pCTCQ-10, 将其导入 BL21 Star(DE3) 后获得重组菌株 CA11。该菌株在添加 5.00 g/L 葡萄糖或 100.00 mg/L 酪氨酸的 M9 培养基中进行发酵,

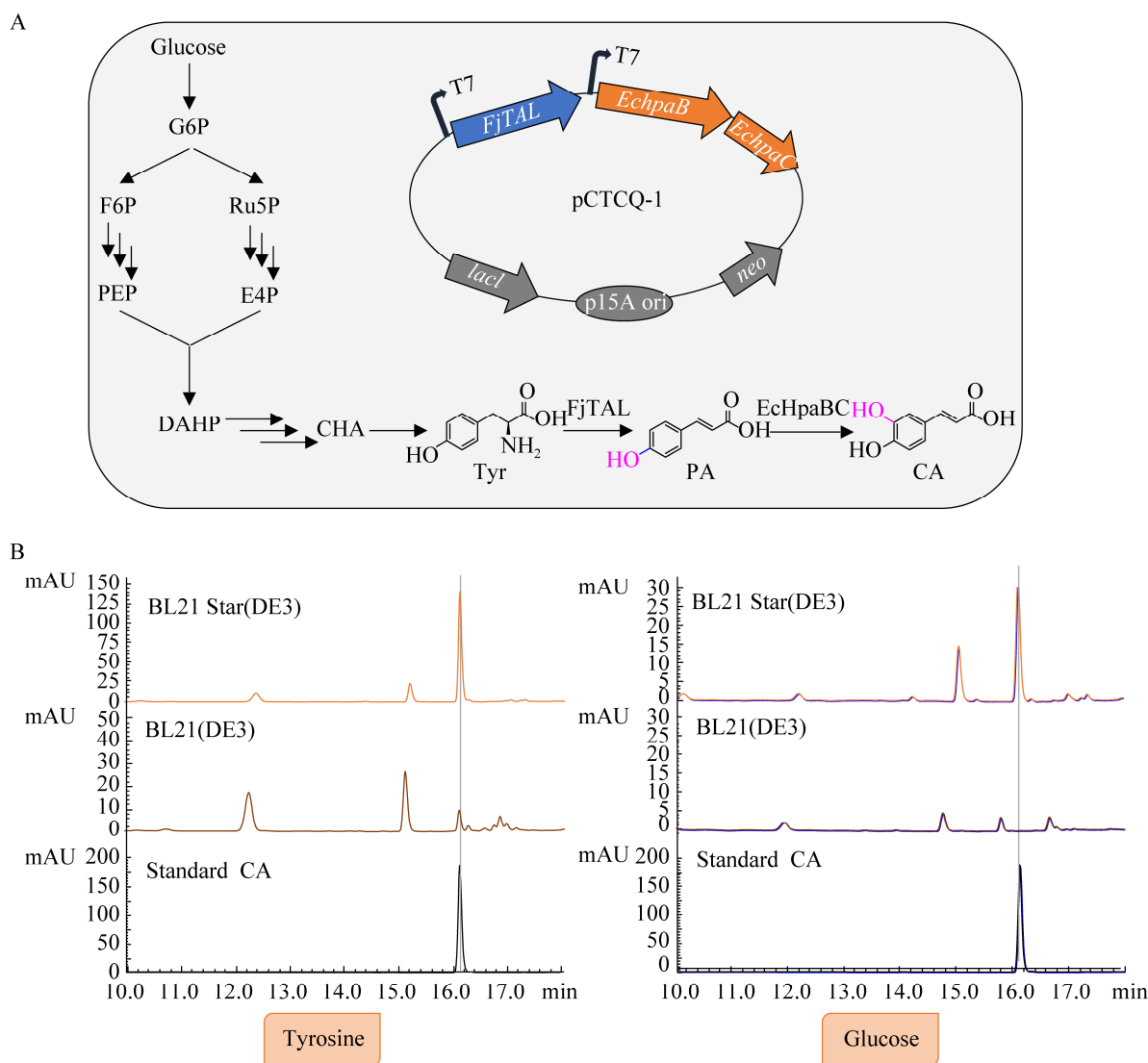


图 1 咖啡酸生物合成途径重构及其在大肠杆菌中的表达 **A**: 咖啡酸从头合成途径及重组质粒的示意图. G6P: 葡萄糖-6-磷酸; F6P: 果糖-6-磷酸; Ru5P: 核酮糖-5-磷酸; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; E4P: 赤藓糖-4-磷酸; DAHP: 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸; CHA: 分支酸. **B**: 含重组质粒 pCTCQ-1 的常用大肠杆菌发酵产物的 HPLC 分析, 葡萄糖和酪氨酸添加浓度分别为 5.00 g/L 和 100.00 mg/L. Tyr: 酪氨酸; PA: 对香豆酸; CA: 咖啡酸

Figure 1 Reconstruction and heterologous expression of the biosynthesis pathway of caffeic acid in commonly used *Escherichia coli* strains. **A**: Schematic diagram of the *de novo* synthesis pathway for caffeic acid containing the recombinant plasmid pCTCQ-1. G6P: Glucose-6-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate; Ru5P: Ribulose-5-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; E4P: Erythrose-4-phosphate; DAHP: 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; CHA: Chorismic acid. **B**: HPLC analysis of fermentation broths extracted from commonly used *Escherichia coli* strains containing the recombinant plasmid pCTCQ-1 with glucose and tyrosine added at concentrations of 5.00 g/L and 100.00 mg/L, respectively. Tyr: Tyrosine; PA: *p*-coumaric acid; CA: Caffeic acid.

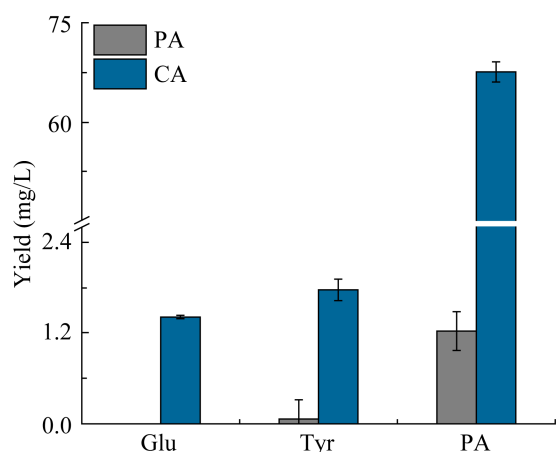


图 2 CA02 发酵产物的 HPLC 分析 葡萄糖 (Glu)、酪氨酸(Tyr)和对香豆酸(PA)添加浓度分别为 5.00 g/L、100.00 mg/L 和 100.00 mg/L. 产量测定均设置 3 次重复实验, 结果取平均值

Figure 2 HPLC analysis of CA and PA from CA02 strain. Glucose (Glu), tyrosine (Tyr), and *p*-coumaric acid (PA) were supplemented at 5.00 g/L, 100.00 mg/L, and 100.00 mg/L, respectively. Experiments were performed in triplicate with similar results. Bars display mean \pm SD.

所得咖啡酸产量分别为 74.18 mg/L 和 103.26 mg/L (图 3C)。该菌株咖啡酸产量与 CA03 相当, 远高于其他启动子改造所得菌株 CA04–CA10。因此, 选择 CA11 进行咖啡酸高产菌株的后续试验。

2.3 咖啡酸高产菌株发酵培养基优化

前期研究发现发酵培养基的成分, 尤其是氮源对菌株生长和目标产物合成具有重要影响, 含有有机氮源酵母提取物(YE)的 M9YE 培养基常被用作咖啡酸的发酵培养基^[9]。因此, 先比较了 CA11 在添加了不同酵母提取物的 M9YE 培养基中发酵所得对香豆酸与咖啡酸含量, 发现酵母提取物添加量从 0.00 g/L 增加到 2.00 g/L 时, 咖啡酸产量从 71.18 mg/L 逐渐降低到 30.71 mg/L (图 4A), 说明酵母提取物在一定程度上会抑制咖啡酸的合成。为此, 本研究尝试了另外 2 个常用氮

源胰蛋白胨(TP)和玉米浆(CSL), 结果发现 CA11 在 M9TP 和 M9CSL 培养基中发酵所得咖啡酸产量分别为 10.31 mg/L 和 5.99 mg/L, 远低于 M9 培养基中目标产物的产量(图 4B)。随后, 比较了 M9 培养基中添加不同浓度的葡萄糖或酪氨酸对咖啡酸产量的影响。当葡萄糖含量从 5.00 g/L 增加到 20.00 g/L 时, 对香豆酸和咖啡酸的产量均随之增加, 对香豆酸积累量由 2.81 mg/L 提高到 4.41 mg/L, 咖啡酸产量由 76.32 mg/L 提高到了 92.89 mg/L; 当葡萄糖含量由 20.00 g/L 增加到 40.00 g/L 时, 咖啡酸产量略有增加, 最高可达 96.40 mg/L, 而对香豆酸的积累量并无明显增加(图 4C)。酪氨酸底物从 100.00 mg/L 增加到 200.00 mg/L 时, 咖啡酸产量由 102.35 mg/L 增加到 110.18 mg/L, 同时检测到大量的对香豆酸积累, 最高可达 83.36 mg/L (图 4D); 当酪氨酸底物由 200.00 mg/L 增加到 400.00 mg/L 时, 咖啡酸产量出现先增加(123.31 mg/L)后降低的趋势(119.13 mg/L), 对香豆酸转化也呈现下降趋势, 其含量分别为 60.48 mg/L 和 68.34 mg/L。综上所述, M9 培养基是咖啡酸合成的最佳发酵培养基, 最适葡萄糖和酪氨酸添加浓度分别为 20.00 g/L 和 200.00 mg/L。

2.4 对香豆酸生物传感器的构建与优化

如上所述, 通过发酵培养基优化, 显著提升了咖啡酸的合成能力, 但同时也检测到大量对香豆酸的积累。在早期研究中, 研究者利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的转录抑制因子 PadR 及其响应元件 P_{padC} 构建了对香豆酸生物传感器, 并成功应用于对香豆酸向原儿茶酚的高效转化^[24-25]。为此, 本研究合成了对香豆酸生物传感器, 该生物传感器由 *lpp0.2* 启动子驱动的 *padR* 和基于 P_{padC} 改造的 P9 启动子两部分组成, 其中 *lpp0.2* 启动子是由大肠杆菌脂蛋白编码基因 *lpp* 的启动子改造所得^[21]。将报告基因 *lacZ*

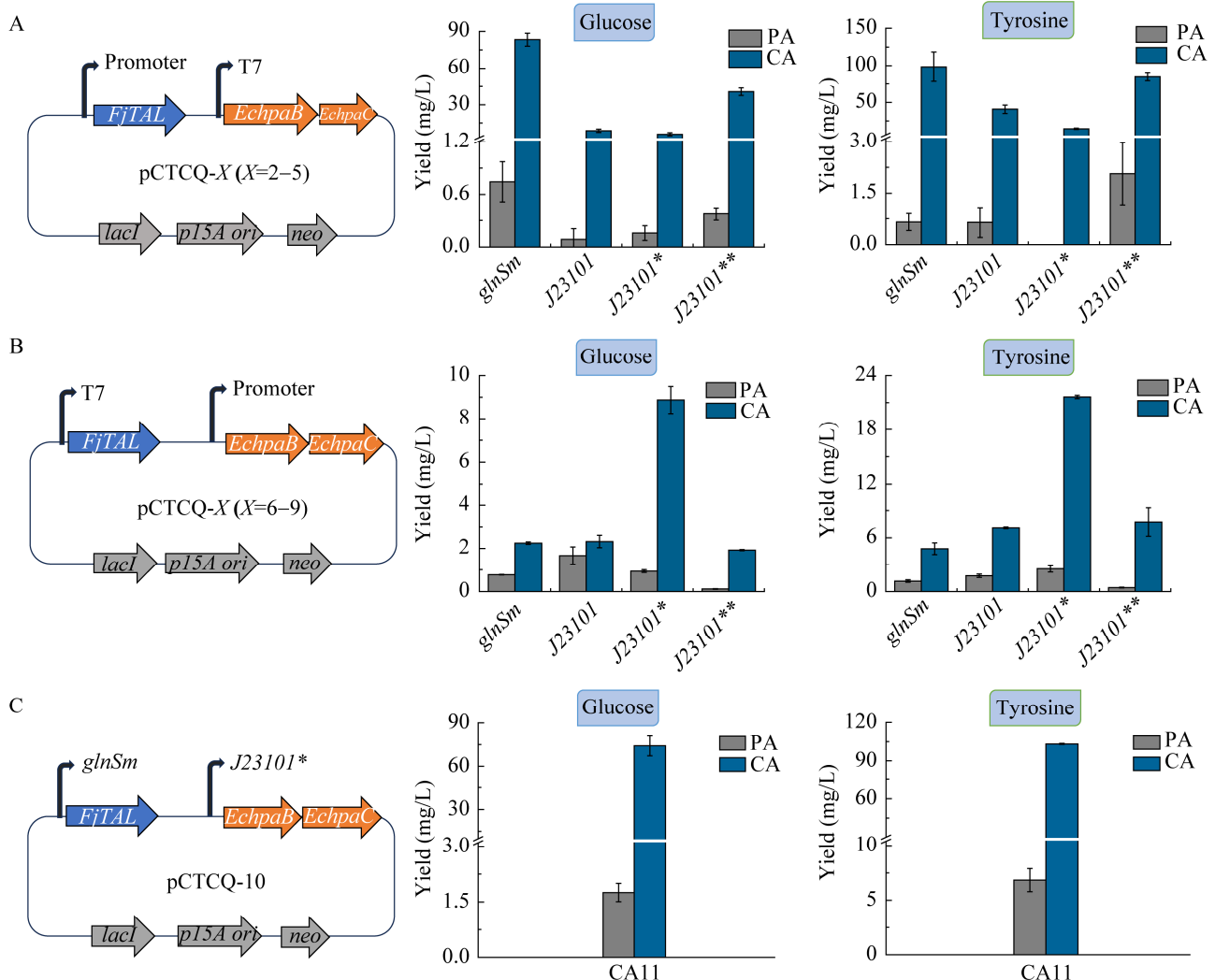


图 3 基于启动子改造的重组菌株 CA03-CA11 发酵产物的定量分析 A: *glnSm*、*J23101*、*J23101**和 *J23101***启动子分别驱动 *FjTAL* 表达所得重组菌株 CA03-CA06. B: 这 4 个启动子分别驱动 *EchpaBC* 表达所得重组菌株 CA07-CA10. C: *glnSm* 启动子驱动 *FjTAL* 表达同时, *J23101**启动子驱动 *EchpaBC* 表达所得重组菌株 CA11, 葡萄糖和酪氨酸底物添加浓度分别为 5.00 g/L 和 100.00 mg/L. 产量测定均设置 3 次重复实验, 结果取平均值

Figure 3 Quantification of CA and PA in the engineered strains CA03-CA11 obtained based on promoter engineering. CA03-CA06 with *FjTAL* (A) and CA07-CA10 with *EchpaBC* (B) driven by *glnSm*, *J23101*, *J23101** and *J23101***, respectively. CA11 was constructed with *FjTAL* driven by the *glnSm* promoter and *EchpaBC* driven by the *J23101** promoter. Glucose and tyrosine were supplemented at 5.00 g/L and 100.00 mg/L, respectively. Experiments were performed in triplicate with similar results. Bars display mean±SD.

置于 P9 启动子之后, 得到重组质粒 pCTCQ-11, 将其转入 DH5 α 中得到重组菌株 DH01。随后, 对 DH01 的 β -半乳糖苷酶活性进行了检测, 结果显示 DH01 具有较强的渗漏表达(图 5B)。为降低

该系统的渗漏表达, 本研究将 pCTCQ-11 中的 *lpp0.2* 启动子替换为由大肠杆菌中 *recA* 启动子改造所得 *oxb20* 组成型强启动子^[22], 得到重组质粒 pCTCQ-12; 将 pCTCQ-12 中的 P9 启动子替

换为包含 2 个 PadR 特异性结合位点的 P9*启动子, 得到 pCTCQ-13。将重组质粒 pCTCQ-12 和 pCTCQ-13 分别转入 DH5 α 中, 获得重组菌株 DH02 和 DH03 (图 5A)。对 DH01–DH03 这 3 个菌株的 β -半乳糖苷酶活性进行了比较分析发现: 随着对香豆酸浓度的增加(0.00–200.00 mg/L), 3 个菌株的半乳糖苷酶活性也随之增加, 其中菌株 DH01 的 β -半乳糖苷酶活性信号强度从 1 140.91 增加到 5 241.66, DH02 由 228.15 增加到 1 537.41,

DH03 从 717.21 增加到 2 244.96; 当对香豆酸浓度为 300.00 mg/L 及以上时, 3 个菌株的 β -半乳糖苷酶的活性明显降低, 说明它们都可以响应对香豆酸, 但高浓度的对香豆酸具有细胞毒性(图 5B)。因此, 对这 3 个菌株的细胞生长密度进行了测定, 发现所有菌株的生长随着对香豆酸浓度的增加而受到明显的抑制(图 5C)。综上所述, DH01 在 3 个菌株中半乳糖苷酶活性最高, DH02 本底渗漏最少, 而 DH03 整体性能最差。

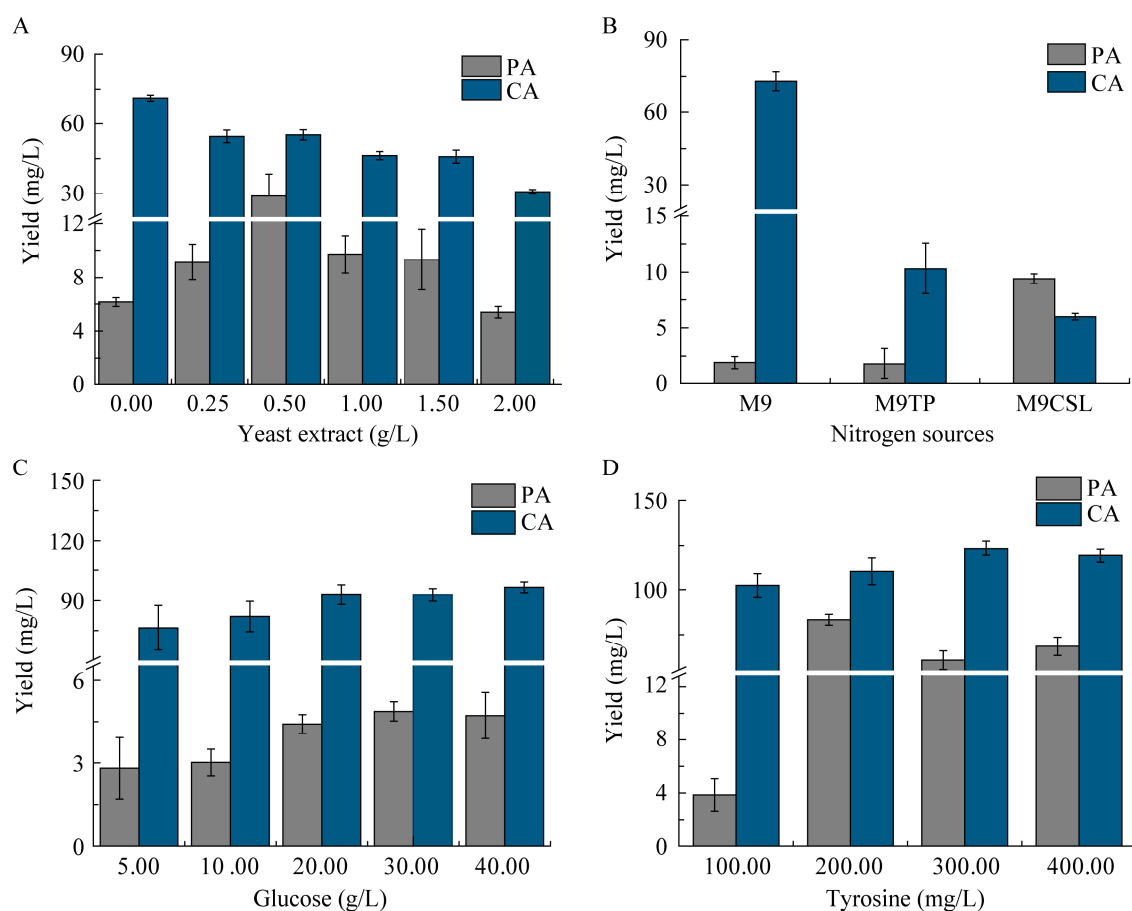


图 4 不同发酵条件下 CA11 发酵产物的定量分析 A: 添加不同浓度酵母提取物的 M9YE 培养基. B: M9 培养基、含有 10.00 g/L 胰蛋白胨的 M9TP 培养基与 10.00 g/L 玉米芯(CSL)的 M9CSL 培养基. C: 添加不同浓度葡萄糖的 M9 培养基. D: 添加不同浓度酪氨酸的 M9 培养基. A 和 B 中葡萄糖添加浓度为 5.00 g/L, 产量测定均设置 3 次重复实验, 结果取平均值

Figure 4 Quantification of CA and PA obtained from CA11 in different M9 fermentation media. A: M9YE medium containing different concentrations of yeast extract. B: M9 medium, M9TP medium supplemented with 10.00 g/L tryptone (TP) and M9CSL medium with 10.00 g/L corn steep liquor (CSL). C: M9 medium supplemented with different concentrations of glucose. D: M9 medium supplemented with different concentrations of tyrosine. Glucose was supplied at 5.00 g/L in both A and B. Experiments were performed in triplicate with similar results. Bars display mean \pm SD.

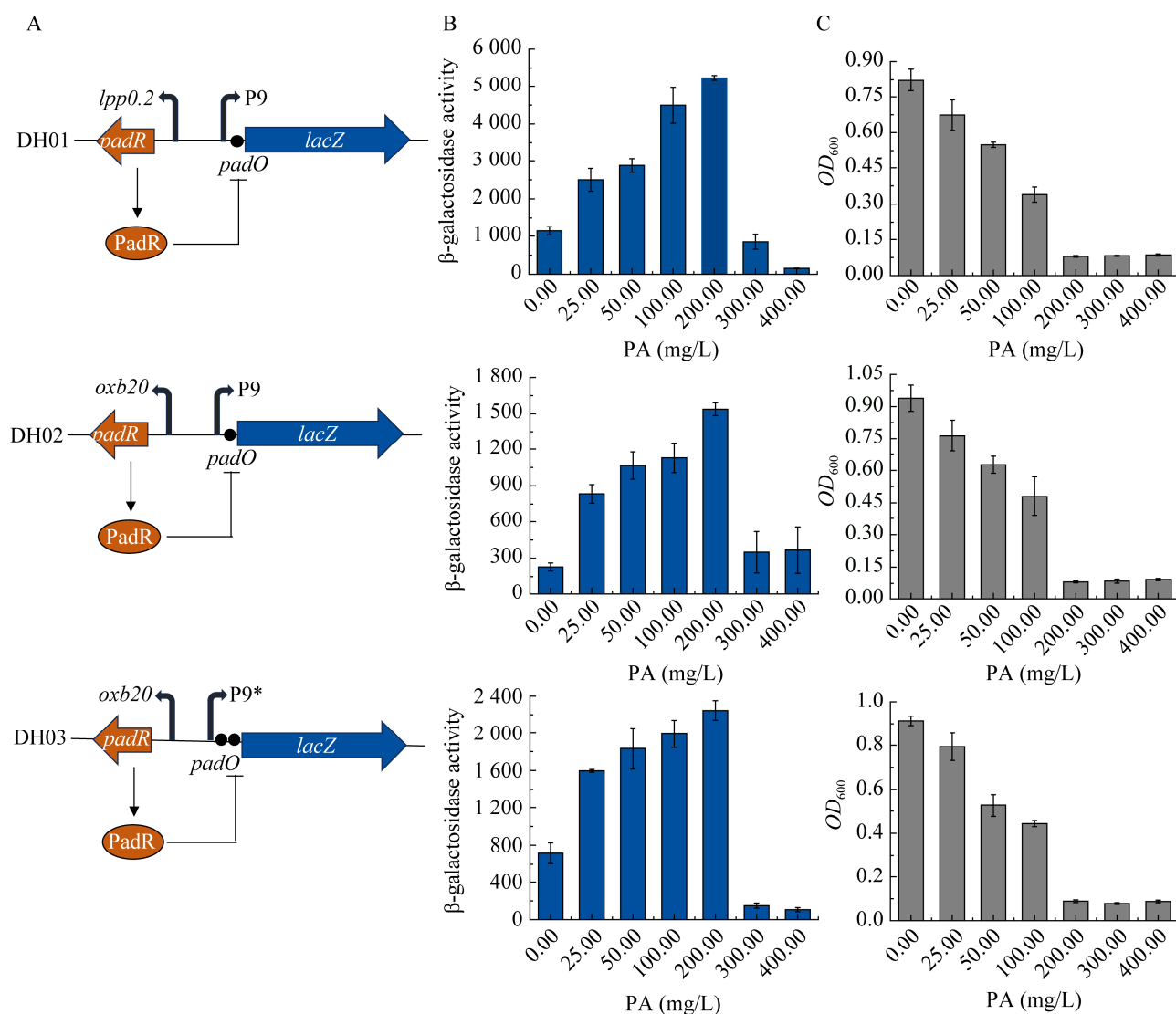


图 5 对香豆酸生物传感器的构建及性能测试 A: 3 个生物传感器构建示意图. B: 在不同对香豆酸浓度下 DH01–DH03 的 β -半乳糖苷酶活性测试. C: 在不同对香豆酸浓度下 DH01–DH03 对应的细胞密度. 产量测定均设置 3 次重复实验, 结果取平均值

Figure 5 Construction and evaluation of PA biosensors. A: Schematic diagrams showing the construction of the three PA biosensors. B: Evaluation of β -galactosidase activities of DH01–DH03 supplemented with different concentrations of *p*-coumaric acid. C: Measurement of cellular growth of DH01–DH03 supplemented with different concentrations of *p*-coumaric acid. Experiments were performed in triplicate with similar results. Bars display mean \pm SD.

2.5 生物传感器介导的动态调控提高咖啡酸的产量

通过同源重组的方法, 分别用对香豆酸响应元件 *lpp0.2-padR-P9* 和 *oxb20-padR-P9* 替换 pCTCQ-10 中驱动 *EchpaBC* 表达的 *J23101**, 得

到重组质粒 pCTCQ-15 和 pCTCQ-16, 将其导入 BL21 Star(DE3) 中获得菌株 CA12 和 CA13. 随后, 将这 2 种菌株分别在添加葡萄糖或酪氨酸的 M9 培养基中进行发酵. HPLC 分析发现, CA12 中咖啡酸产量分别为 72.16 mg/L 和 162.73 mg/L,

对香豆酸产量仅为 1.84 mg/L 和 3.62 mg/L (图 6A); CA13 中咖啡酸产量分别为 1.78 mg/L 和 9.89 mg/L, 对香豆酸产量为 28.89 mg/L 和 120.88 mg/L (图 6B)。上述两种不同生物传感器调控咖啡酸合成的菌株中, 以 *lpp0.2* 启动子驱动 *padR* 表达的 CA12 能更有效地促进对香豆酸向咖啡酸的高效转化。此外, CA11 中酪氨酸底物转化效率为 0.55 g/g, 而 CA12 的酪氨酸底物转化效率为 0.81 g/g, 相较于 CA11 提高了 47.27%。由此可见, 生物传感器介导的动态调控有助于调节胞内中间代谢流平衡, 提升咖啡酸的合成效率。

2.6 增加 *EchpaBC* 的拷贝数提高咖啡酸产量

为了进一步促进对香豆酸的转化, 本研究还

尝试了额外增加 *EchpaBC* 拷贝数的策略。在 pCTCQ-10 中增加一个由 *J23101**启动子驱动表达的 *EchpaBC*, 得到重组质粒 pCTCQ-17 (图 7A), 并将其导入 BL21 Star(DE3) 中获得菌株 CA14。HPCL 检测结果显示(图 7B): 以 20.00 g/L 葡萄糖为底物时, CA14 发酵产物中咖啡酸产量与 CA11 相比无明显变化; 而以 200.00 mg/L 酪氨酸为底物时, CA14 咖啡酸的产量大幅提升, 同时对香豆酸的积累量明显降低。CA14 中咖啡酸含量最高可达 185.15 mg/L, 酪氨酸底物转化效率为 0.93 g/g, 相较于 CA11 提高了 69.09%。由此可见, 增加 *EchpaBC* 的拷贝数能够显著提高对香豆酸的转化效率。

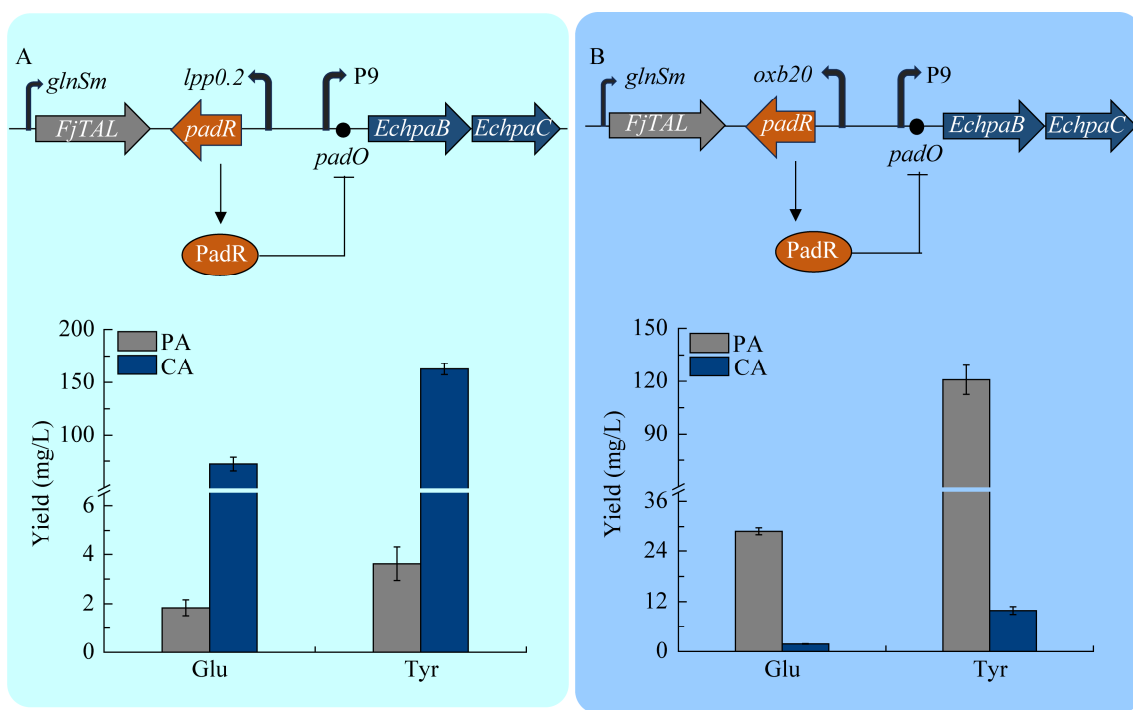


图 6 对香豆酸生物传感器调控 *EchpaBC* 表达的示意图及其对应重组菌株 CA12 和 CA13 发酵产物的定量分析 A: *lpp0.2* 启动子驱动 *padR* 表达的 CA12. B: *oxb20* 启动子驱动 *padR* 表达的 CA13. 葡萄糖和酪氨酸添加浓度分别为 20.00 g/L 和 200.00 mg/L. 产量测定均设置 3 次重复实验, 结果取平均值

Figure 6 Schematic diagram showing regulation of *EchpaBC* expression based on PA biosensors and quantification of CA and PA from the engineered strains CA12 and CA13. A: CA12 containing *padR* gene driven by the *lpp0.2* promoter. B: CA13 containing *padR* gene driven by the *oxb20* promoter. Glucose and tyrosine were supplemented at 20.00 g/L and 200.00 mg/L, respectively. Experiments were performed in triplicate with similar results. Bars display mean±SD.

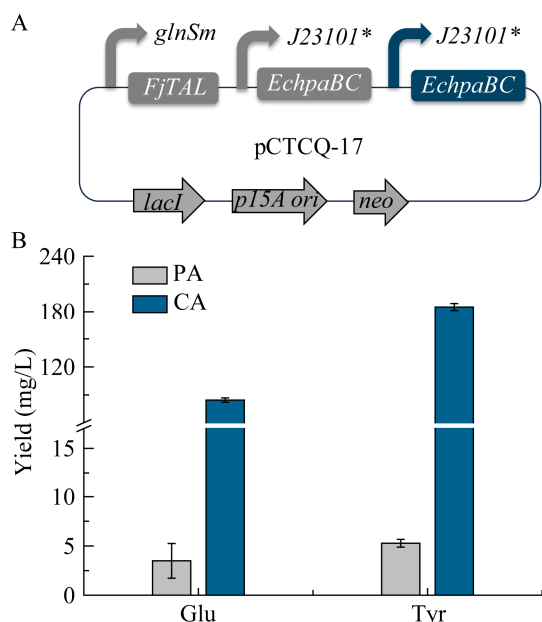


图7 增加 *EchpaBC* 拷贝数的重组质粒示意图(A)与对应重组菌株 CA14 发酵产物的定量分析(B) 葡萄糖和酪氨酸添加浓度分别为 20.00 g/L 和 200.00 mg/L. 产量测定均设置 3 次重复实验, 结果取平均值

Figure 7 A schematic diagram showing the construction of recombinant plasmid pCTCQ-17 containing two copies of *EchpaBC* genes (A) and quantification of CA and PA (B). Glucose and tyrosine were supplemented at 20.00 g/L and 200.00 mg/L, respectively. Experiments were performed in triplicate with similar results. Bars display mean \pm SD.

3 讨论与结论

为了在大肠杆菌中重构咖啡酸的合成通路, 选择了约氏黄杆菌来源 *FjTAL* 和大肠杆菌内源性 *EchpaBC*, 分别用 T7 启动子驱动其表达得到重组菌株 CA02, 实现了由葡萄糖从头合成咖啡酸, 但其产量仅为 1.40 mg/L。进一步分析发现, 添加酪氨酸时, 对香豆酸(0.06 mg/L)和咖啡酸(1.78 mg/L)产量均较低, 而添加对香豆酸时咖啡酸产量为 67.60 mg/L, 其咖啡酸转化效率约 61.59%, 说明 *FjTAL* 的催化效率是导致合成咖啡酸偏低的主要限制因素。为进一步提高咖啡酸

产量, 我们有必要继续筛选不同来源的 *TAL* 和 *HpaBC*, 以增强这 2 种酶的催化活性。另外, 可以通过多轮定点饱和突变、组合突变及随机突变技术对现有的 *FjTAL* 和 *EcHpaBC* 进行改造, 筛选出高催化活性和底物选择性的突变酶, 合成相应的基因用于咖啡酸的高效合成^[26-28]。

选取了 4 个大肠杆菌常用的组成型启动子 *glnSm*、*J23101*、*J23101**和 *J23101***分别驱动 *FjTAL* 和 *EchpaBC* 的表达, 结果显示组成型启动子不同程度地提高了咖啡酸的产量。另外, 发现启动子 *glnSm* 最适于驱动 *FjTAL* 的表达, 而 *J23101**最适于驱动 *EchpaBC* 的表达, 将这 2 个启动子组合后, 所得菌株 CA11 的咖啡酸从头合成产量达到 96.40 mg/L。这些结果表明, 启动子工程是提高咖啡酸产量的有效手段, 可以扩大启动子的筛选范围, 进一步提高咖啡酸的产量。此外, HPLC 检测发现 CA11 发酵过程中有较高的对香豆酸积累, 因而尝试了利用对香豆酸生物传感器驱动 *EchpaBC* 的表达, 其在一定程度上促进了对香豆酸向咖啡酸的转化, 与此同时, 采用了额外增加 *EchpaBC* 拷贝数的策略, 对香豆酸积累量显著降低, 咖啡酸产量大幅提升。由此可见, 增加关键基因的拷贝数有助于提升咖啡酸的产量, 而本研究所用的 pACYCDuet-1 在大肠杆菌中的拷贝数约 10–15, 选择不同拷贝数的质粒用于 *FjTAL* 和 *EchpaBC* 的表达, 有望进一步提高咖啡酸的合成效率。

如前所述, 对香豆酸和咖啡酸具有一定的细胞毒性^[12], 高产的有毒目标产物会对其重组菌株的生长和目标产物合成造成不利影响。为了解决这一难题, 本研究构建了感应对香豆酸的生物传感器, 用于动态调控 *EchhpaBC* 的表达, 显著减少了有毒中间体对香豆酸的积累, 从而在一定程度上提高了 CA12 的耐受性, 并进一步提升了咖啡酸产量。此外, 在 CA12 菌株基础上, 增加

一个由对香豆酸生物传感器调控表达的咖啡酸外排基因,增强对香豆酸转化的同时减少咖啡酸在胞内的积累^[12],有望进一步提高该重组菌株的耐受性。我们也可选取鲁棒性较强的宿主如恶臭假单胞菌替换大肠杆菌宿主来消除这一不利影响^[24]。适应性进化是一种提高宿主耐受性的有效方法^[29-30],后续研究中,将以高浓度的对香豆酸为选择压力,进行多次传代。在传代过程中,利用对香豆酸生物传感器监测连续繁殖群体的适应性变化,从而筛选出对香豆酸耐受性强的宿主细胞。随后,采用相同的策略进行咖啡酸耐受性的进化实验,获得对香豆酸和咖啡酸耐受性均增强的菌株,应用于咖啡酸的高效合成。

作者贡献声明

刘蓉:实验设计,方案实施,数据处理,论文撰写;王美燕:菌株构建,论文修改;杜红毅:发酵培养基筛选;刘硕:质粒构建;栾孟澳:发酵培养基优化;唐游:生物传感器构建;廖凤霞:课题指导,论文修改;牛国清:课题设计,组织实施,论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] ESPÍNDOLA KMM, FERREIRA RG, NARVAEZ LEM, SILVA ROSARIO ACR, Da SILVA AHM, SILVA AGB, VIEIRA APO, MONTEIRO MC. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 541.
- [2] ALAM M, ASHRAF GM, SHEIKH K, KHAN A, ALI S, ANSARI MM, ADNAN M, PASUPULETI VR, HASSAN MI. Potential therapeutic implications of caffeic acid in cancer signaling: past, present, and future[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 845871.
- [3] BAI X, LI ST, LIU XY, AN HL, KANG XJ, GUO S. Caffeic acid, an active ingredient in coffee, combines with DOX for multitarget combination therapy of lung cancer[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(27): 8326-8337.
- [4] WANG L, WANG HJ, CHEN JB, QIN ZJ, YU SQ, ZHOU JW. Coordinating caffeic acid and salvianic acid A pathways for efficient production of rosmarinic acid in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 76: 29-38.
- [5] WANG J, GU SS, CUI HS, WU XY, WU FA. A novel continuous flow biosynthesis of caffeic acid phenethyl ester from alkyl caffeate and phenethanol in a packed bed microreactor[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 158: 39-47.
- [6] SHRESTHA A, PANDEY RP, SOHNG JK. Biosynthesis of resveratrol and piceatannol in engineered microbial strains: achievements and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(7): 2959-2972.
- [7] HERNÁNDEZ-CHÁVEZ G, MARTINEZ A, GOSSET G. Metabolic engineering strategies for caffeic acid production in *Escherichia coli*[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2019, 38: 19-26.
- [8] CHEN RB, GAO JQ, YU W, CHEN XH, ZHAI XX, CHEN Y, ZHANG L, ZHOU YJ. Engineering cofactor supply and recycling to drive phenolic acid biosynthesis in yeast[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18: 520-529.
- [9] SAKAE K, NONAKA D, KISHIDA M, HIRATA Y, FUJIWARA R, KONDO A, NODA S, TANAKA T. Caffeic acid production from glucose using metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2023, 164: 110193.
- [10] HASLINGER K, PRATHER KLJ. Heterologous caffeic acid biosynthesis in *Escherichia coli* is affected by choice of tyrosine ammonia lyase and redox partners for bacterial cytochrome P450[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 26.
- [11] ZHOU Z, ZHANG XY, WU J, LI XL, LI WN, SUN XX, WANG J, YAN YJ, SHEN XL, YUAN QP. Targeting cofactors regeneration in methylation and hydroxylation for high level production of ferulic acid[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 247-255.
- [12] WANG L, LI N, YU SQ, ZHOU JW. Enhancing caffeic acid production in *Escherichia coli* by engineering the

- biosynthesis pathway and transporter[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 368: 128320.
- [13] JIN LQ, JIN WR, MA ZC, SHEN Q, CAI X, LIU ZQ, ZHENG YG. Promoter engineering strategies for the overproduction of valuable metabolites in microbes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(21): 8725-8736.
- [14] PAN XW, TANG M, YOU JJ, HAO YN, ZHANG X, YANG TW, RAO ZM. A novel method to screen strong constitutive promoters in *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* for industrial applications[J]. *Biology*, 2023, 12(1): 71.
- [15] GUO XY, LI ZH, WANG XN, WANG J, CHALA J, LU YH, ZHANG HR. *De novo* phenol bioproduction from glucose using biosensor-assisted microbial coculture engineering[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(12): 3349-3359.
- [16] ZHOU SH, YUAN SF, NAIR PH, ALPER HS, DENG Y, ZHOU JW. Development of a growth coupled and multi-layered dynamic regulation network balancing malonyl-CoA node to enhance (2S)-naringenin biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67: 41-52.
- [17] GUST B, CHALLIS GL, FOWLER K, KIESER T, CHATER KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [18] RYU Y, SCHULTZ PG. Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in *Escherichia coli*[J]. *Nature Methods*, 2006, 3: 263-265.
- [19] ROMANO E, BAUMSCHLAGER A, AKMERİÇ EB, PALANISAMY N, HOUMANI M, SCHMIDT G, ÖZTÜRK MA, ERNST L, KHAMMASH M, VENTURA BD. Engineering AraC to make it responsive to light instead of arabinose[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17: 817-827.
- [20] BERTERO A, BROWN S, VALLIER L. Chapter 2-Methods of Cloning[M]. Boston: Academic Press, 2017: 19-39.
- [21] JIANG T, LI CY, YAN YJ. Optimization of a *p*-coumaric acid biosensor system for versatile dynamic performance[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(1): 132-144.
- [22] ZHU YL, HUA Y, ZHANG B, SUN LH, LI WJ, KONG X, HONG J. Metabolic engineering of indole pyruvic acid biosynthesis in *Escherichia coli* with *tdiD*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 2.
- [23] HE WZ, JIANG K, QIU H, LIAO LJ, WANG SS. 16-membered ring macrolides and erythromycin induce *ermB* expression by different mechanisms[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 152.
- [24] LI J, YUE C, WEI WP, SHANG YZ, ZHANG P, YE BC. Construction of a *p*-coumaric and ferulic acid auto-regulatory system in *Pseudomonas putida* KT2440 for protocatechuate production from lignin-derived aromatics[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126221.
- [25] WANG J, LI CY, JIANG T, YAN YJ. Biosensor-assisted titratable CRISPRi high-throughput (BATCH) screening for over-production phenotypes[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 75: 58-67.
- [26] TONG YJ, LI N, ZHOU SH, ZHANG L, XU S, ZHOU JW. Improvement of chalcone synthase activity and high-efficiency fermentative production of (2S)-naringenin *via in vivo* biosensor-guided directed evolution[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(5): 1454-1466.
- [27] CHAN SK, LAI JY, GAN CY, LIM TS. A semi-rational mutagenesis approach for improved substrate activity of microbial transglutaminase[J]. *Food Chemistry*, 2023, 419: 136070.
- [28] GAO HF, ZHU RT, LI ZL, WANG WY, LIU ZD, HU N. Improving the catalytic efficiency and substrate affinity of a novel esterase from marine *Klebsiella aerogenes* by random and site-directed mutation[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(6): 106.
- [29] ZHOU XJ, ZHANG XX, WANG D, LUO RS, QIN Z, LIN FZ, XIA X, LIU XM, HU G. Efficient biosynthesis of salidroside *via* artificial *in vivo* enhanced UDP-glucose system using cheap sucrose as substrate[J]. *ACS Omega*, 2024, 9(20): 22386-22397.
- [30] WANG M, WANG HM, GAO C, WEI WQ, LIU J, CHEN XL, HU GP, SONG W, WU J, ZHANG F, LIU LM. Efficient production of protocatechuic acid using systems engineering of *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 82: 134-146.