

群体感应动态调控促进大肠杆菌合成酪醇

沈玉平^{1,2}, 周紫微¹, 贺茜¹, 尹乐义¹, 何春兰¹, 张祖姣^{1,3*}

1 湖南科技学院化学与生物工程学院, 湖南 永州 425199

2 湖南南岭地区植物资源研究开发湖南省工程研究中心, 湖南 永州 425199

3 湖南省银杏工程技术研究中心, 湖南 永州 425199

沈玉平, 周紫微, 贺茜, 尹乐义, 何春兰, 张祖姣. 群体感应动态调控促进大肠杆菌合成酪醇[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3379-3393.

SHEN Yuping, ZHOU Ziwei, HE Xi, YIN Leyi, HE Chunlan, ZHANG Zujiao. Dynamic regulation using a quorum-sensing circuit enhances the production of tyrosol by *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3379-3393.

摘要:酪醇是一种多酚类天然产物, 广泛应用于化工、医药和食品等领域。目前大肠杆菌(*Escherichia coli*)从头合成酪醇存在发酵菌体密度低和产量低等问题。为此, 本研究将前期获得苯丙酮酸脱羧酶突变体 ARO10^{F138L/D218G} 与不同来源的醇脱氢酶融合表达, 最优组合 ARO10^{F138L/D218G}-L-YahK 酪醇产量达到 1.09 g/L。为进一步提高酪醇产量, 敲除了 4-羟基苯乙酸竞争途径关键基因 *feaB*, 使酪醇产量提高了 21.15%, 达到 1.26 g/L。针对酪醇发酵菌体密度低的问题, 通过群体感应系统动态调控酪醇合成途径, 减轻酪醇对底盘细胞的毒性作用, 缓解生长抑制, 使其产量提高了 33.82%, 达到 1.74 g/L。在 2 L 发酵罐中, 群体感应动态调控工程菌 TRFQ5 的酪醇产量达到 4.22 g/L, *OD*₆₀₀ 值达到 42.88, 分别较静态诱导表达工程菌 TRF5 提高了 38.58% 和 43.62%。本研究应用基因敲除技术, 阻断了酪醇合成竞争途径; 同时结合群体感应动态调控策略, 减轻了酪醇毒性对底盘细胞的生长抑制, 从而有效地提高了酪醇产量。本研究对其他高毒性化学品的生物合成具有良好的借鉴和应用价值。

关键词:酪醇; 大肠杆菌; 群体感应; 动态调控

资助项目: 湖南省自然科学基金(2022JJ30273, 2020JJ5204); 湖南省教育厅科学研究项目(22B0804); 湖南省应用特色学科建设项目

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2022JJ30273, 2020JJ5204), the Scientific Research Project of Hunan Education Department (22B0804), and the Construct Program of Applied Characteristic Discipline in Hunan Province.

*Corresponding author. E-mail: zhang_zujiao@126.com

Received: 2023-02-24; Accepted: 2023-05-04

Dynamic regulation using a quorum-sensing circuit enhances the production of tyrosol by *Escherichia coli*

SHEN Yuping^{1,2}, ZHOU Ziwei¹, HE Xi¹, YIN Leyi¹, HE Chunlan¹, ZHANG Zujiao^{1,3*}

1 College of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, Hunan, China

2 Hunan Engineering Research Center for Research and Development of Plant Resources in Nanling Area, Yongzhou 425199, Hunan, China

3 Hunan Provincial Engineering Research Center for *Ginkgo biloba*, Yongzhou 425199, Hunan, China

Abstract: Tyrosol is a natural polyphenolic product that is widely used in chemical, pharmaceutical and food industries. Currently, the *de novo* synthesis of tyrosol by *Escherichia coli* suffers from issues such as low cell density and poor yield. Therefore, the phenylpyruvate decarboxylase mutant ARO10^{F138L/D218G} obtained in our previous study was fused with an alcohol dehydrogenase from different microorganisms for fusion expression, and the optimal ARO^{10F138L/D218G}-L-YahK produced 1.09 g/L tyrosol in shake flasks. In order to further improve tyrosol production, *feaB*, a key gene in the competing pathway of 4-hydroxyphenylacetic acid, was knocked out, and the resulted strain produced 1.26 g/L tyrosol with an increase of 21.15% compared to that of the control. To overcome the low cell density in tyrosol fermentation, the quorum-sensing circuit was used to dynamically regulate the tyrosol synthesis pathway, so as to alleviate the toxic effect of tyrosol on chassis cells and relieve the growth inhibition. Using this strategy, the yield of tyrosol was increased to 1.74 g/L, a 33.82% increase. In a 2 L fermenter, the production of tyrosol in the engineered strain TRFQ5 dynamically regulated by quorum-sensing reached 4.22 g/L with an OD_{600} of 42.88. Compared with those in the engineered strain TRF5 statically regulated by induced expression, the yield was increased by 38.58% and the OD_{600} was enhanced by 43.62%. The combination of blocking the competing pathway using gene knockout technology, and reducing the inhibitory effect of tyrosol toxicity on chassis cells through quorum-sensing dynamic regulation increased the production of tyrosol. This study may facilitate the biosynthesis of other chemicals with high toxicity.

Keywords: tyrosol; *Escherichia coli*; quorum sensing; dynamic control

酪醇(tyrosol, C₈H₁₀O₂), 又名对羟基苯乙醇, 是一种多酚类天然产物, 主要存在于红景天、油橄榄、女贞等植物中, 广泛应用于医药、化工和食品等领域^[1]。在化工领域, 可作为中间体合成羟基酪醇、红景天苷和橄榄苦苷等活性天然产物^[2-3]; 在医药领域, 可用于合成倍他洛尔^[4]、美托洛尔^[5]等 β -受体阻滞剂类心血管药物; 在食品领域, 可作为食品添加剂改善风

味^[6-7]。此外, 酪醇还具有抗氧化^[8]、抗炎^[9]、抗癌^[10]、预防心血管疾病^[11]和神经保护^[12]等多种生理活性功能。随着酪醇生理功效和药理机制研究的不断深入, 市场需求与日俱增, 使得酪醇的生产面临极大的挑战。

目前, 植物提取和化学合成是主要的酪醇生产方法。但是, 植物原材料酪醇含量低, 提取工艺复杂, 且受固有生长周期制约, 难以持

续性、工业化、大规模生产^[13]。化学合成法则存在反应条件苛刻、得率低、分离纯化困难和污染环境等缺陷,与现今绿色可持续发展的理念相违背^[14]。微生物发酵法反应条件温和、产物分离纯化简单、生产不受时空限制和绿色环保,是未来天然产物生产的发展趋势,目前已有众多研究者进行了微生物合成酪醇的尝试和探索。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)自身无法合成酪醇,需引入外源酶催化 4-羟基苯丙酮酸(4-hydroxyphenylpyruvate, 4HPP)生成前体物 4-羟基苯乙醛(4-hydroxyphenylacetaldehyde, 4HPAAL),后者再经醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)还原生成酪醇。目前,基于不同的 4HPAAL 合

成方式,在大肠杆菌中建立的人工酪醇合成途径主要有 3 条(图 1): (1) 4HPP 经苯丙酮酸脱羧酶(如 IpdC 和 ARO10)脱羧生成 4HPAAL,后者经 ADH 还原生成酪醇^[15-17]; (2) 酪氨酸经芳香醛合成酶(aromatic aldehyde synthase, AAS)催化生成 4HPAAL,再经 ADH 还原生成酪醇^[18-19]; (3) 酪氨酸经酪氨酸脱羧酶(tyrosine decarboxylase, TDC)催化生成酪胺,后者再经酪胺氧化酶(tyramine oxidase, TYO)和 ADH 连续催化生成酪醇^[20]。通过优选外源酶、敲除竞争途径、过表达关键基因强化代谢流、解除负反馈调节以及启动子优化等代谢工程策略,研究者大幅度提高了大肠杆菌的酪醇发酵水平^[17,19,21],最高产量为江南大学陈献忠教授团队报道的 3.9 g/L^[17],但

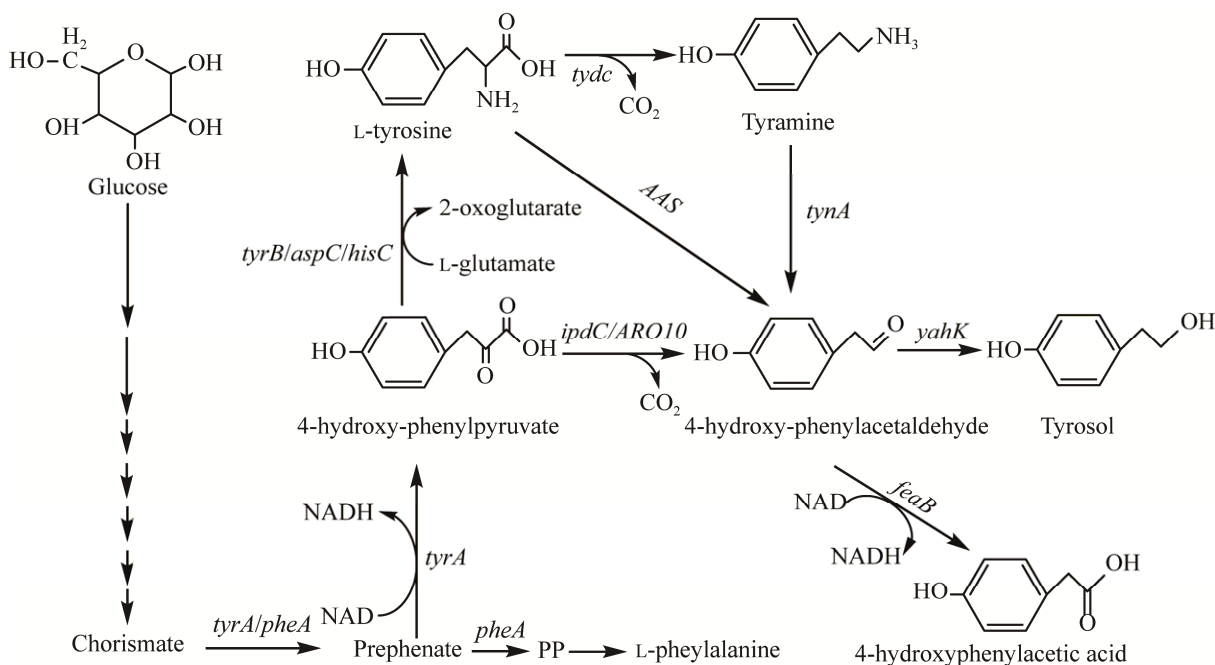


图 1 大肠杆菌中构建的人工酪醇合成途径

Figure 1 Synthetic tyrosol synthesis pathways constructed in *Escherichia coli*. AAS: Aromatic aldehyde synthase; *tyrA*: Fused chorismate mutase/prephenate dehydrogenase; *pheA*: Prephenate dehydratase; *tyrB*: Tyrosine aminotransferase; *aspC*: Aspartate aminotransferase; *hisC*: Histidinol-phosphate aminotransferase; *ipdC*: Indolepyruvate/Phenylpyruvate decarboxylase; *ARO10*: Phenylpyruvate decarboxylase ARO10; *yahK*: NADPH-dependent aldehyde reductase YahK; *feaB*: Phenylacetaldehyde dehydrogenase; *tydc*: Tyrosine decarboxylase; *tynA*: Copper-containing amine oxidase.

与酪氨酸 55 g/L^[22]的发酵水平相比,仍然有很大差距。作者在分析文献时发现,酪醇发酵的菌体密度远低于正常水平,如 Satoh 等^[20]摇瓶发酵的 OD_{600} 不超过 1.5, Xu 等^[17]在 5 L 发酵罐中发酵的最高 OD_{600} 值竟小于 30。此外, Casadey 等^[23]和 Canal 等^[24]研究证实酪醇具有良好的抑菌作用, González 等^[25]亦研究发现酪醇可抑制细菌和酵母生长,影响细胞形态和生理状态。因此,作者推测,酪醇对菌体生长的抑制是导致产量偏低的主要原因,解除酪醇对细胞的毒性作用是提升发酵水平的关键。

群体感应是细菌通过信号分子分泌、识别和响应,调控基因表达、调节多个生理过程和表现行为的一种细胞间通讯系统。细菌通过分泌到胞外的群体感应信号分子(又称自诱导物, autoinducer, AI)感知菌群密度,信号分子随菌群密度的增加而不断提高,当达到阈值后,与胞内受体蛋白结合调控一系列靶基因的表达,调节生物发光、芽孢形成、毒素产生、生物膜形成和共生关系建立等生理行为^[26]。群体感应信号-受体具有专一性,系统启动具有阈值性,调控过程具有级联性,因此合成生物学家将其改造用于调控和构建菌群,目前已成功应用于大肠杆菌提升异丙醇^[27-28]、红没药烯^[29]、肌醇和葡糖二酸^[30]产量。作者前期曾利用 Esa 群体感应系统动态调控 4-羟基苯乙酸合成途径,以减轻 4-羟基苯乙酸对宿主大肠杆菌的毒性作用,使得 4-羟基苯乙酸产量提高了 46.4%^[31]。酪醇和 4-羟基苯乙酸的直接前体物均为 4HPAAL,作者前期在 4-羟基苯乙酸生物合成研究中对比了 ARO10/lpdC、AAS 和 TycD-L-TynA [L:linker (GSG)] 三条 4HPAAL 合成途径,发现 ARO10 催化效率最高,随后对 ARO10-L-feaB 定向进化,获得的最优突变体 ARO^{10F138L/D218G}-L-FeaB^{I24M} 催化

效率提高 93%^[31]。因此,本研究以 ARO10^{F138L/D218G} 为基础,通过优选 ADH,敲除竞争途径 *feaB*,应用群体感应系统动态减轻酪醇对底盘细胞的毒性,以实现酪醇的高效合成。研究结果可为后续微生物发酵生产酪醇及相关下游产物奠定良好的基础,并为其他高毒性化合物的生物合成提供有益的参考和借鉴。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所用质粒和菌株见表 1,引物见表 2。*E. coli* DOPA 30N^[32]为 L-多巴高产菌,由中山大学刘建忠教授惠赠,本研究中命名为 DP,DP 及其衍生菌株作为酪醇生产的底盘细胞。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5, NaCl 10, 胰蛋白胨 10, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0-7.2, 121 °C 灭菌 20 min, 固体培养基加入 1.5% 的琼脂粉。

SOC 培养基(g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 20, 葡萄糖 3.6, MgCl₂ 0.95, NaCl 0.5, KCl 0.186; 蒸馏水 1 000 mL, 116 °C 灭菌 20 min, 电转化复苏时使用。

LBGT 培养基^[32] (g/L): 葡萄糖 25, 酵母提取物 5, NaCl 10, 胰蛋白胨 10, 微量元素 10 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0-7.2, 116 °C 灭菌 20 min。微量元素(g/L): FeSO₄·7H₂O 10, ZnSO₄·7H₂O 2.2, CuSO₄·5H₂O 1.0, MnSO₄·4H₂O 0.58, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.2, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.1, 35% HCl 10 mL, 过滤除菌,接种前添加至发酵培养基。

补料培养基(g/L): 葡萄糖 500, MgSO₄·7H₂O 30, 116 °C 灭菌 20 min。

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Plasmids and strains	Characteristics/Descriptions	Sources
Plasmids		
pBbB2k-GFP	Expressing vector, BglBrick vectors, tet promoter, BBR1 <i>ori</i> , Kan ^R , Addgene plasmid #35345	[33]
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-feaB	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>Ecf</i> eaB	[31]
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G}	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G}	This study
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-yqhD	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>Ecy</i> qhD	This study
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-yiaF	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>Ecy</i> iaF	This study
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-frmA	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>Ecf</i> rmA	This study
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-yjgB	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>Ecy</i> jgB	This study
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-yahK	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>Ecy</i> ahK	This study
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-adhP	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>Ecad</i> hP	This study
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-aldB	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>Ecal</i> dB	This study
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-adhE	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>Ecad</i> hE	This study
pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-ADH6	Derivative of pBbB2k, BBR1 <i>ori</i> , P _{tet} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>ScADH</i> 6	This study
pCas	<i>E. coli</i> cas9 expression vector, pSC 101 <i>ori</i> , Kan ^R , <i>Pcas</i> , cas9, <i>P_{anaF}</i> -Red lacI ^q , <i>P_{trc}</i> , sgRNA, <i>pMB1</i> , addgene plasmid #35345	[34]
pTargetF	sgRNA expression vector, pBR322 <i>ori</i> , Spe ^R	[34]
pTargetF-feaB	Derivative of pTargetF, P _{J23119} , sgRNA of <i>feaB</i>	This study
pZBK-P _{esaS} IC-P _{esaR} AS	Quorum sensing plasmid, pBBR1 <i>ori</i> , P ₃₇ , <i>esaI</i> , P ₀₈ , <i>esa</i> ^{RI70V} , P _{esaS} , MCS1, P _{esaR} , MCS2, kan ^R	[31]
pZBK-P _{esaR} AS-TR	Derivative of pZBK-P _{esaS} IC-P _{esaR} AS, pBBR1 <i>ori</i> , P ₃₇ , <i>esaI</i> , P ₀₈ , <i>esa</i> ^{RI70V} , P _{esaS} , MCS1, P _{esaR} , <i>ScARO10</i> ^{F138L/D218G} -L- <i>Ecy</i> ahK, kan ^R	This study
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 (Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BW 25113	<i>lacI^q rrmB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>	Lab store
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	<i>MATα SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	Lab store
DP	<i>E. coli</i> DOPA 30N, L-dopa overproducer. <i>E. coli</i> BW 25113 Δ <i>tyrR</i> , Δ <i>csrA</i> , Δ <i>ptsHI</i> , Δ <i>crr</i> , P ₃₇ - <i>galP</i> -P ₃₇ - <i>glk</i> , Δ <i>zwf</i> , Δ <i>pheLA</i> , <i>aroG^{abr}</i> , <i>attP₂₁::7P37-tyrA^{abr}-tyrB</i>	[32]
TRF	DP with deletion of <i>feaB</i>	This study
TR0	DP/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G}	This study
TR1	DP/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-yqhD	This study
TR2	DP/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-yiaY	This study
TR3	DP/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-frmA	This study
TR4	DP/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-yjgB	This study
TR5	DP/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-yahK	This study
TR6	DP/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-adhP	This study
TR7	DP/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-aldB	This study
TR8	DP/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-adhE	This study
TR9	DP/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-ADH6	This study
TRF5	TRF/pBbB2k-ARO10 ^{F138L/D218G} -L-yahK	This study
TRQ5	TRF/pZBK-P _{esaR} AS-TR	This study

ScARO10^{F138L/D218G} means the evolved *ARO10*^{F138L/D218G} from *Saccharomyces cerevisiae*, *EcyqhD* means the *yqhD* from *Escherichia coli*, and the rest is the same as this.

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Name	Oligonucleotides (5'→3')	Purpose
adhEF	CCGGAATTCAAAAGATCTGGTATGGCTGTTACTAATGTCGCTGAACCTAACG	PCR for <i>adhE</i>
adhER	CGCGGATCCTTAAGCGGATTTTTTCGCTTTTTTCTCAGCTTTAG	
adhEO1R	CGATCCAGCCGATCAGGTCTTTTCGGAGCACCGGCAGCG	PCR for deleting <i>Bgl</i> II site of <i>adhE</i>
adhEO2F	CGGTGCTCCGAAAGACCTGATCGGCTGGATCGATCAACCTTC	
adhPF	CCGGAATTCAAAAGATCTGGTATGAAAGGCTGCAGTTGTACGAAGGATC	PCR for <i>adhP</i>
adhPR	CGCGGATCCTTAGTGACGGAAATCAATCACCATGCGGC	
frmAF	CCGGAATTCAAAAGATCTGGTATGAAATCACGTGCTGCCGTTGCATTTG	PCR for <i>frmA</i>
frmAR	CGCGGATCCTCAGTAACGAATTACGGTTCGAATGGATTTGCCTTC	
yqhDF	CCGGAATTCAAAAGATCTGGTATGAACAACCTTAATCTGCACACCCCAACCCG	PCR for <i>yqhD</i>
yqhDR	CGCGGATCCTTAGCGGGCGGCTTCGTATATACGGC	
aldBF	CCGGAATTCAAAAGATCTGGTATGACCAATAATCCCCCTTCAGCACAG	PCR for <i>aldB</i>
aldBR	CGCGGATCCTCAGAACAGCCCAACGGTTTATCCG	
yaiYF	CCGGAATTCAAAAGATCTGGTATGGCAGCTTCAACGTTCTTTATTCCTC	PCR for <i>yaiY</i>
yaiYR	CGCGGATCCTTACATCGCTGCGCGATAAATCGCCAC	
yahKF	CCGGAATTCAAAAGATCTGGTATGAAGATCAAAGCTGTTGGTGCATATTCCG	PCR for <i>yahK</i>
yahKR	CGCGGATCCTCAGTCTGTTAGTGTGCGATTATCGATAACAAAAC	
yjgBF	CCGGAATTCAAAAGATCTGGTATGTGCGATGATAAAAAGCTATGCCG	PCR for <i>yjgB</i>
yjgBR	CGCGGATCCTCAAAAATCGGCTTCAACACCACGC	
ADH6F	CCGGAATTCAAAAGATCTGGTATGTCTTATCCTGAGAAATTTGAAGGTATCGC	PCR for <i>ADH6</i>
ADH6R	CGCGGATCCCTAGTCTGAAAATTTCTTGTGCTAGCCGACTAAGGTAAATC	
pBKDF	ACCTTCGATTCCGACCTCATTAAGC	For diagnostic PCR
pBKDR	GAGCGTTCACCGACAAACAACAGAT	and sequencing
ARO10F	CCGGAATTCAAAAGATCTTTTCGGAATTAAGGAGGTAATAAATATGGCACCTGTTAC	PCR for
ARO10R	CGCGGATCCACCACTACCTTTTTTATTCTTTTAAGTGCCGCTG	<i>ARO10^{F138L/D218G}</i>
feaBuF	GACGCTCATCCTGCTCCATTATGCTGACCAC	PCR for upstream
feaBuR	CTTATGAGCGAACCAGACACTTTTCCTTATTATTTACCCAGTGTGATTTACAG	homologous arm of <i>feaB</i>
feaBdF	TAATAAGGAAAAGTGTCTGGTTCGCTCATAAGTAAAAAACGGC	PCR for downstream
feaBdwR	ATCCGGGCACGATTCGTCTGTTGAGTAACCCG	homologous arm of <i>feaB</i>
pTfeaBF	CTAG ACTAGTGATCCGCAATGGGTTATTGA GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	For construction of
pTfeaBR	GTGAACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAGGATCCAG	pTfeaBF
PTargetS	CCTTTGAGTGAGCTGATACCGC	For sequencing of pTfeaBR
QSF	CCGGGTACCAAAAAGATCTTTTCGGAATTAAGGAGGTAATAAATATGGCACCTGTTAC	For construction of
QSR	CGCAAGCTTTCAGTCTGTTAGTGTGCGATTATCGATAACAAAAC	pZBK-PesaRAS-TR

1.1.3 主要试剂

胰蛋白酶和酵母提取物, 购自 OXOID 公司; 限制性内切酶, 购自 ThermoFisher Scientific 公司; Prime Star Max DNA 聚合酶, 购自 TaKaRa 公司; 质粒提取和 DNA 纯化试剂盒, 购自广州美基生物科技有限公司; 抗生素, 购

自生工生物工程(上海)股份有限公司。L-酪氨酸、L-多巴、酪醇、4-羟基苯乙酸、红景天苷和脱水四环素, 购自北京百灵威科技有限公司; 色谱级甲醇和三氟乙酸, 购自上海安谱实验科技股份有限公司; 其余均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

采用酶切连接法构建质粒,重组质粒经过菌落 PCR、酶切图谱验证和测序正确后使用。

构建酪醇合成途径质粒:采用 BglBrick^[33] 组装技术,将 ARO^{10F138L/D218G} 和 ADH 进行融合表达。在 5'端添加 *EcoR* I-*Bgl* II 酶切位点,3'端添加 *Bam*H I 酶切位点,从酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) S288C 基因组 PCR 扩增 *ADH6* 片段,从 *E. coli* BW 25113 基因组 PCR 扩增 *yqhD*、*yaY*、*frmA*、*yjgB*、*yahk*、*adhP*、*aldB* 和 *adhE* 片段,连接到 pBbB2k-GFP 的 *EcoR* I/*Bam*H I 间,得到 pBbB2K-ADH 系列质粒。在 5'端添加 *EcoR* I-*Bgl* II 酶切位点,3'端添加 *Bam*H I 酶切位点,以 pBbB2k-ARO10^{F138L/D218G}-*L-feaB* 为模板 PCR 扩增 ARO10^{F138L/D218G},连接到 pBbB2K-ADH 系列质粒 *EcoR* I/*Bgl* II 间,即得 9 个酪醇合成途径质粒。

构建 sgRNA 表达质粒:采用反向 PCR 构建 *feaB* 敲除的 sgRNA 表达质粒 pTargetF-*feaB*。

构建群体感应调控酪醇合成途径质粒:以 pBbB2k-ARO10^{F138L/D218G}-*L-yahK* 为模板,PCR 扩增 ARO10^{F138L/D218G}-*L-yahK* 片段,插入到 pZBK-P_{esaR}IC-P_{esaR}AS 的 *Kpn* I/*Hind* III 间,即得群体感应调控酪醇合成途径质粒 pZBK-P_{esaR}AS-TR。

1.2.2 基因编辑

参照 Jiang 等^[34]报道的方法,利用 CRISPR/Cas9 技术,采用同源重组的方法,敲除 *feaB* 基因。

1.2.3 培养方法

种子培养:将工程菌在相应抗性的 LB 平板上划线,37 °C 培养 12–16 h 活化,挑取单菌落接种至装有 20 mL LB 培养基的 100 mL 摇瓶中,37 °C、200 r/min 振荡培养 10 h。

摇瓶发酵:以初始 OD_{600} 0.1 的接种量,接种至含 50 mL LBGT 培养基的 250 mL 摇瓶装

中,30 °C、200 r/min 培养 48 h,测定生物量 (OD_{600})和酪醇产量。

发酵罐分批补料发酵:在 2 L 发酵罐 [Minibox5 Intelli-Ferm 平行生物反应器,迪必尔生物工程(上海)有限公司]中进行,装液量为 1.2 L,按照初始 OD_{600} 为 0.2 左右的接种量接种,通气量 1.8 L/min,发酵温度 30 °C,发酵过程中以氨水调节 pH 值控制在 7.0 (死区设为 0.1)。整个发酵过程中,搅拌转速范围设定为 400–1 200 r/min,溶氧与转速关联控制在 25% (死区设为 5%)。初始葡萄糖浓度 5 g/L,以 pH-stat 策略补料,pH 死区设置为 0.1,即当 pH 开始上升至 7.1 时,表示葡萄糖已消耗完毕,开始补料。每隔 4 h 取样测定酪醇产量、 OD_{600} 和葡萄糖浓度。

发酵过程中,含质粒的菌株,在培养基中加入相应浓度的抗生素;需诱导表达的菌株,在 OD_{600} 值达到 2.5 时加入终浓度 120 ng/mL 的脱水四环素诱导表达。

1.2.4 酪醇的检测

参照 Shen 等^[31]前期检测 4-羟基苯乙酸的方法,高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测酪醇。取发酵液 1.5 mL,10 000×g 离心 1 min,0.22 μm 滤膜过滤上清液,滤液用于 HPLC 检测酪醇。分析条件:Shimadu LC20-AT 高效液相色谱系统,SPD-M20A 二极管阵列检测器,Inertsil ODS-SPC18 反相柱 (Shimadu GL Inertsil ODS-SP 150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相 A 为 0.2%三氟乙酸,流动相 B 为 100%甲醇,检测波长为 222 nm,柱温 30 °C,进样体积 10 μL;采用梯度洗脱分析程序,0–20 min 甲醇浓度由 14%上升至 45%,然后下降至 14%并保持至 30 min 结束,流速为 0.5 mL/min。在此条件下,L-酪氨酸、L-多巴、酪醇、4-羟基苯乙酸和红景天苷可以很好地分离开来(图 2A),发酵液中酪醇的保留时间与标准品一致(图 2B)。

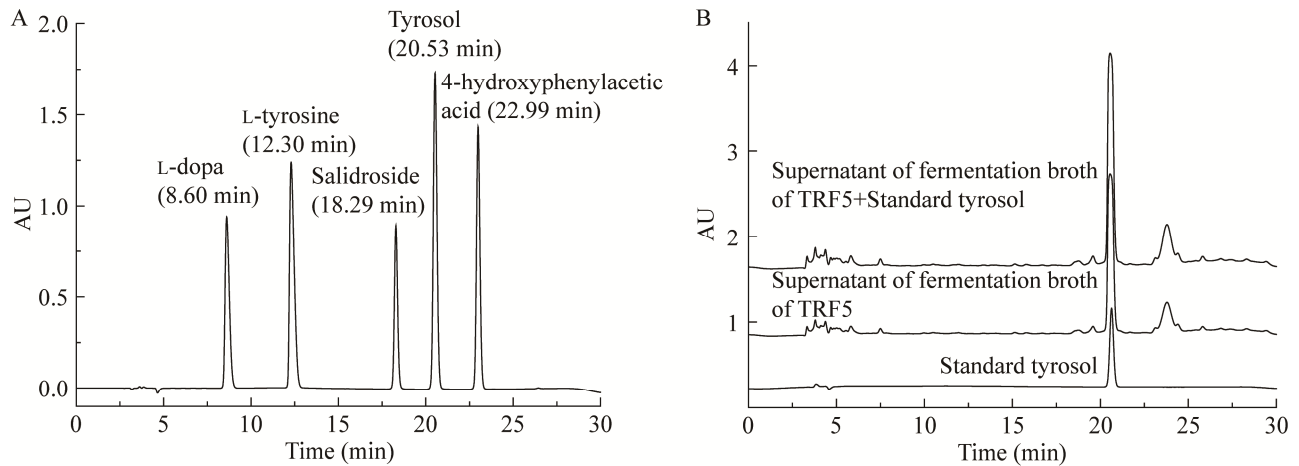


图2 酪醇标准品和工程菌发酵液液相色谱图 A: L-多巴、L-酪氨酸、红景天苷、酪醇和4-羟基苯乙酸液相色谱图. B: 工程菌 TRF5 发酵液液相色谱图

Figure 2 HPLC analysis of the standard tyrosol and fermentation broth of engineered TRF5. A: HPLC analysis of standard L-dopa, L-tyrosine, salidroside, tyrosol and 4-hydroxyphenylacetic acid. B: HPLC analysis of fermentation broth of engineered TRF5.

1.2.5 酪醇对底盘细胞生长的影响

挑取 TRF 单菌落接种至装有 20 mL LB 培养基的 100 mL 摇瓶中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h, 按照初始 OD_{600} 值为 0.1 的接种量, 接种至酪醇浓度为 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 g/L 和 20 g/L 的 5 mL LB 试管, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h, 测定 OD_{600} , 考察酪醇对菌体生长的影响。

1.2.6 数据统计分析

所有实验均 3 次重复, 数据取平均值, 以“平均值±标准差”的形式表示, 采用 SPSS 26.0 进行方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示具有显著性。

2 结果与分析

2.1 醇脱氢酶筛选和底盘细胞优化提高酪醇产量

2.1.1 醇脱氢酶基因的筛选

醇脱氢酶催化 4HPAAL 还原生成酪醇是酪醇合成途径的最后一步反应, 对酪醇的合成有着重要的影响。因此, 构建了 $ARO10^{F138L/D218G}$ 分

别与 8 个大肠杆菌来源的醇脱氢酶基因 *yqhD*、*yiaY*、*frmA*、*yjgB*、*yahk*、*adhP*、*aldB*、*adhE* 以及酿酒酵母来源的醇脱氢酶基因 *ADH6* 融合表达的重组质粒, 分别引入至 L-多巴生产菌 DP, 获得酪醇工程菌 TR1、TR2、TR3、TR4、TR5、TR6、TR7、TR8、TR9, 同时将不表达醇脱氢酶的质粒 $pBbB2k-ARO10^{F138L/D218G}$ 引入 DP, 获得工程菌 TR0, 发酵 48 h, 测定 OD_{600} 和酪醇产量, 结果如图 3 所示。

由图 3 可知, TR0 可产酪醇(0.69±0.03) g/L, 说明大肠杆菌可利用内源醇脱氢酶催化 4HPAAL 生成酪醇, Yang 等^[21]、Liu 等^[35]和薛宇翔等^[36]亦在大肠杆菌酪醇合成研究中发现了类似的现象。除 *frmA* 和 *adhP* 之外, 过表达醇脱氢酶均可提高酪醇产量, 其中 *yahk* 产量最高, 达 (1.09±0.05) g/L, 较未表达醇脱氢酶的菌株(TR0) 提高 57.98%。但是, 发酵液中仍存在副产物 4-羟基苯乙酸, 并与酪醇浓度呈相反趋势, 这是因为大肠杆菌中的 *FeaB* 可催化 4HPAAL 生成 4-羟基苯乙酸, 与酪醇共同竞争前体物 4HPAAL。

2.1.2 *feaB* 基因敲除对酪醇合成的影响

分析酪醇合成途径(图 1)可知, 敲除 *feaB* 可以阻断 4-羟基苯乙酸合成途径, 使更多的前体物流向酪醇的合成, 理论上存在提高酪醇产量的可能。为此, 采用 Jiang 等^[34]报道的方法敲除 *feaB* 基因, 获得菌株 TRF, 将“2.1”中最高酪醇产量质粒 pBbB2k-ARO10^{F138L/D218G}-L-yahK 导入至 TRF 中, 获得酪醇工程菌 TRF5, 以未敲除 *feaB* 基因的工程菌 TR5 为对照, 发酵 48 h 后测定 OD_{600} 和酪醇产量, 结果如图 4 所示。

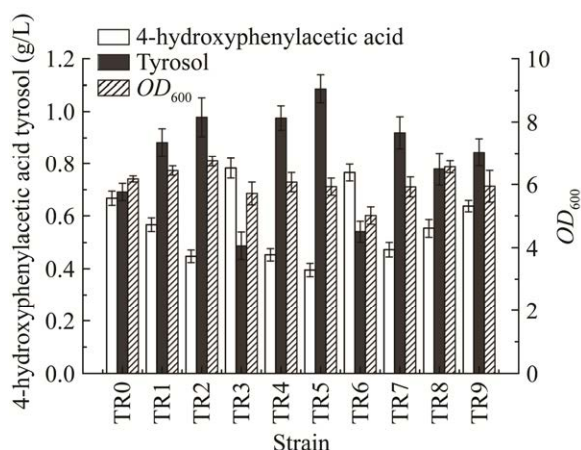


图 3 醇脱氢酶对酪醇合成的影响

Figure 3 Effect of alcohol dehydrogenases on the production of tyrosol.

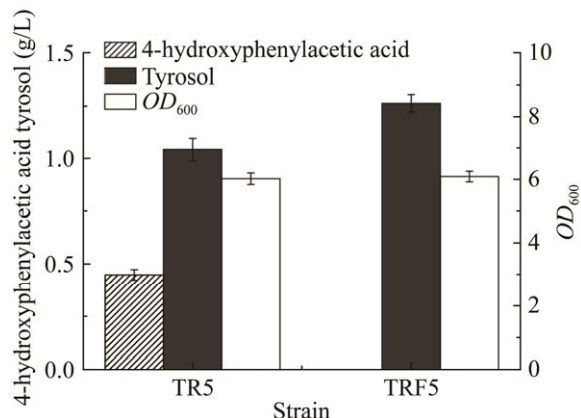


图 4 *feaB* 基因敲除对酪醇产量的影响

Figure 4 Effect of deleting *feaB* on the production of tyrosol.

由图 4 可知, 敲除 *feaB* 可显著($P=0.0118 < 0.05$) 提高酪醇产量。工程菌 TRF5 酪醇产量为 (1.26 ± 0.04) g/L, 较对照 TR5 提高 21.15%; 同时发现, 敲除 *feaB* 后, 消除了副产物 4-羟基苯乙酸, Li 等^[16]、Liu 等^[35]、Yang 等^[21]、Chung 等^[18]和薛宇翔等^[36]在大肠杆菌合成酪醇的研究中亦获得了类似的结果, 这说明敲除 *feaB* 阻断了 4-羟基苯乙酸竞争途径, 使更多的碳代谢流向酪醇的合成, 因而提高了酪醇产量。此外, 敲除株 TRF5 和出发菌株 TR5 相比, OD_{600} 无明显变化, 说明敲除 *feaB* 不影响细胞生长。

2.2 群体感应动态调控对酪醇合成的影响

2.2.1 酪醇对底盘细胞生长的影响

Satoh 等^[20]、Xu 等^[17]和 Liu 等^[35]多位研究者大肠杆菌发酵酪醇的菌体密度均远低于正常水平, 并且 Casadey 等^[23]、Canal 等^[24]和 González 等^[25]研究证实酪醇具有较强的抑菌活性, 影响酵母和细菌的形态和生理状态。因此, 推测酪醇对菌体细胞具有毒性作用, 抑制大肠杆菌生长, 进而影响酪醇的合成。为此, 考察了不同浓度酪醇对底盘细胞 TRF 生长的影响, 结果如图 5 所示。

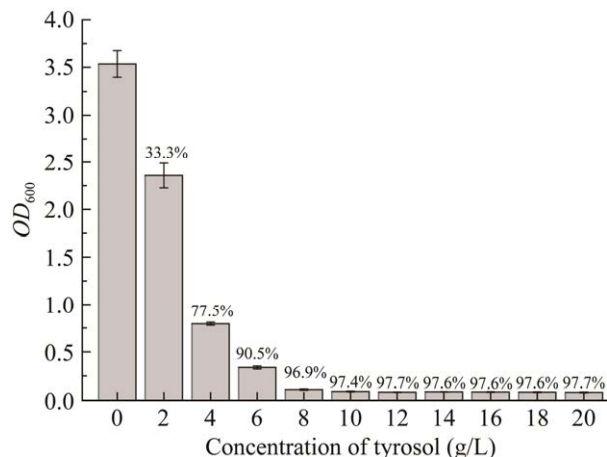


图 5 酪醇对底盘细胞 TRF 生长的影响

Figure 5 Effect of tyrosol on the growth of TRF chassis.

由图 5 可知,酪醇对底盘细胞 TRF 具有强烈的抑制作用,浓度为 2 g/L 时抑制率达到 33.3%,而浓度为 8 g/L 时菌体的生长几乎完全受到抑制。此外,全细胞生物催化合成酪醇的产量和底物转化效率均远高于从头合成^[37-38],间接证实了酪醇对菌体细胞生长的毒性作用。因此,解除酪醇对底盘细胞的毒性作用是提高酪醇产量的关键。

2.2.2 群体感应动态调控对酪醇合成的影响

群体感应系统是一种无需添加诱导剂的自诱导系统,当细胞密度积累到一定程度时,系统开始自动调控。在前期 4-羟基苯乙酸研究中,

作者构建了一个兼具激活和抑制功能群体感应质粒 pZBK-P_{esaS}IC-P_{esaR}AS (图 6A),可同时调控竞争途径和合成途径^[31]。因此,将酪醇合成途径 *ARO10^{F138L/D218G}-L-yahK* 置于群体感应激活启动子 P_{esaR} 控制之下,可动态激活酪醇合成途径的表达。发酵初期,细胞密度低时,合成途径的表达受到限制,促进菌体生长,随着菌体细胞密度的逐渐增大,合成途径的表达逐步增强,细胞密度越大,其表达越强,实现群体感应动态调控,以此减轻酪醇对细胞生长的毒性作用,平衡细胞生长与酪醇合成。将构建的酪醇群体感应调控质粒 pZBK-P_{esaR}AS-TR (图 6B)

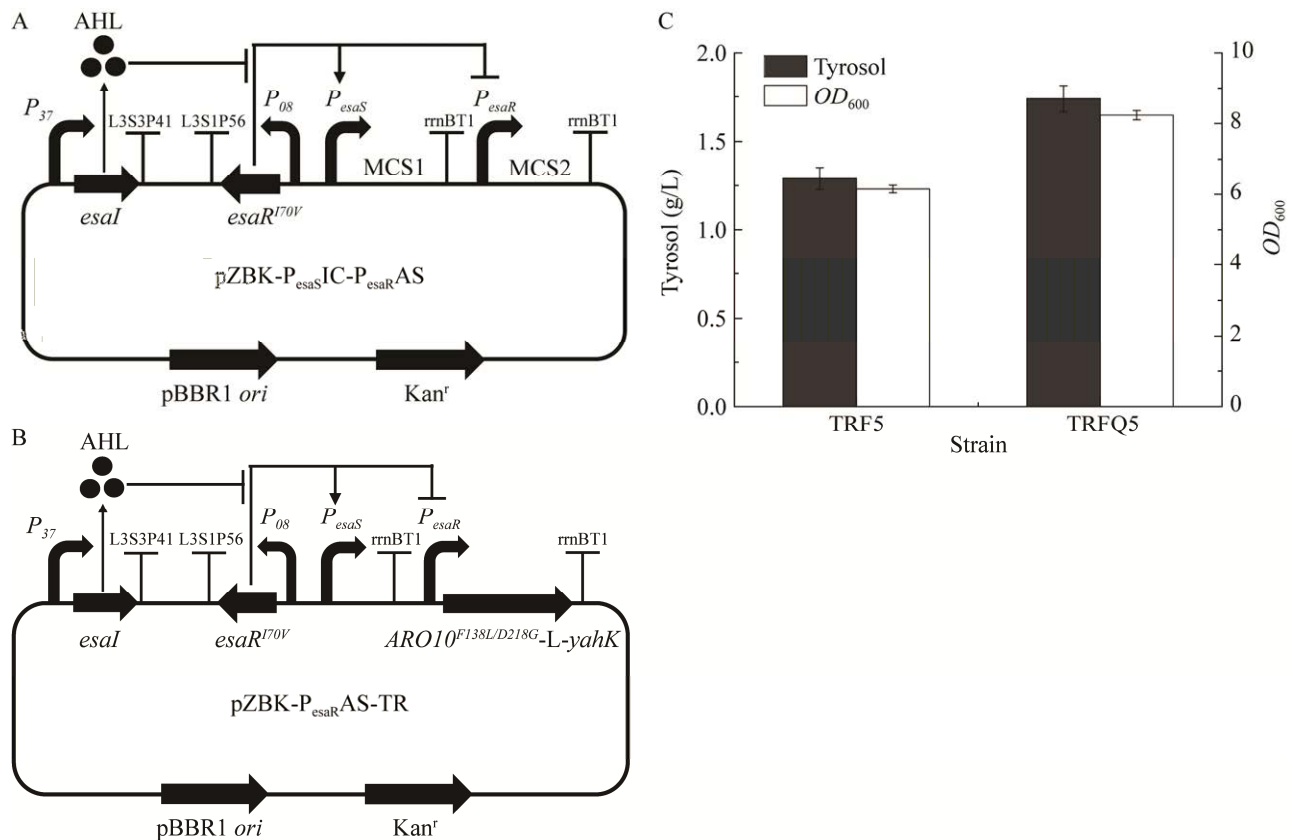


图 6 群体感应调控对酪醇合成的影响 A: 群体感应质粒 pZBK-P_{esaS}IC-P_{esaR}AS 图谱. B: 群体感应调控酪醇合成途径质粒图. C: 群体感应调控酪醇合成途径工程菌发酵结果

Figure 6 Effect of dynamic regulation of tyrosol synthesis pathway using a quorum-sensing circuit on the production of tyrosol. A: Plasmid map of pZBK-P_{esaS}IC-P_{esaR}AS. B: Plasmid map of pZBK-P_{esaR}AS-TR. C: Fermentation results of engineered TRF5 and TRFQ5.

引入底盘细胞 TRF，获得工程菌 TRFQ5，以 TRF5 为对照，发酵 48 h，考察其对酪醇合成的影响，结果如图 6C 所示。

由图 6 可知，群体感应动态调控工程菌 TRFQ5 酪醇产量和 OD_{600} 均明显高于对照 TRF5， OD_{600} 值达到 8.23 ± 0.13 ，较静态诱导表达工程菌 TRF5 提高 33.82%，说明群体感应动态调控可有效地减轻酪醇对细胞的毒性作用，缓解酪醇对底盘细胞的生长抑制；酪醇产量达到 (1.74 ± 0.08) g/L，较对照 TRF5 提高 34.78%，说明通过群体感应动态调控，可有效缓解酪醇对底盘细胞生长的毒性作用，促进酪醇合成。

2.3 2 L 发酵罐发酵水平

群体感应激活系统中基因表达强度随细胞密度增大而增强，为进一步验证群体感应调控工程菌 TRFQ5 的酪醇生产潜力，采用分批补料发酵的方式在 2 L 平行生物反应器系统上同时对 TRFQ5 和 TRF5 进行了发酵，结果如图 7 所示。

如图 7 所示，群体感应动态调控的酪醇工程菌 TRFQ5 酪醇产量和生物量均明显高于静

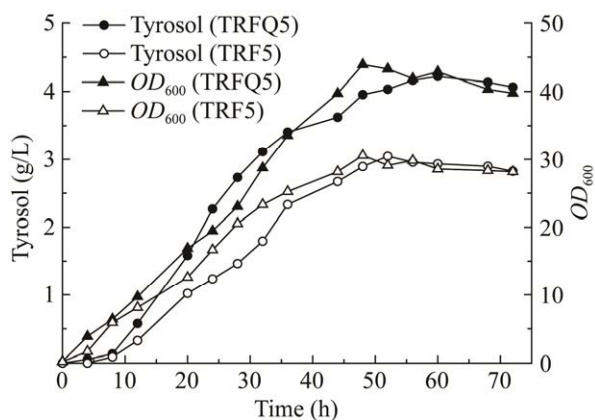


图 7 2 L 发酵罐中 TRFQ5 和 TRF5 酪醇生产性能比较

Figure 7 Comparison of the productivity of tyrosol between TRFQ5 and TRF5 in a 2 L fermentor.

态诱导工程菌 TRF5。其中， OD_{600} 达到 42.88，较对照 TRF5 提高 43.62%；酪醇产量达到 4.22 g/L，较 TRF5 提高 38.58%，为现有文献报道大肠杆菌合成酪醇最高水平 $(3.9 \text{ g/L})^{[17]}$ 的 1.08 倍。同时，在发酵液中并未检测到副产物 4-羟基苯乙酸，说明敲除 *feaB* 后有效地阻断了 4-羟基苯乙酸的合成。因此，群体感应系统作为一种自诱导系统，随菌体密度动态调控基因表达，可有效减轻酪醇对菌体细胞的毒性作用，缓解生长抑制，从而促进酪醇合成。

3 讨论

酪醇是一种重要的医药、化工中间体和生理活性物质，具有广阔的市场前景。它可用作抗氧化剂，亦可用于合成 β -受体阻滞剂心血管药物^[4-5]和羟基酪醇、红景天苷等生理活性物质^[2-3]。植物材料中酪醇含量低，提取工艺复杂，成本高；化学合成法则反应条件苛刻，得率低，易导致环境污染。因此，构建并改造基因工程菌，生物发酵生产酪醇具有重要的意义。

高效的合成途径是构建优良基因工程菌的基础，酪醇和 4-羟基苯乙酸的直接前体物均为 4HPAAL，基于不同的 4HPAAL 合成途径，主要的酪醇合成途径有 3 条。研究者们通过不同的合成途径在大肠杆菌中均实现了酪醇的从头合成，但是并未系统比较 3 条途径的效率^[15-20]。作者前期在 4-羟基苯乙酸研究中，系统比较了 3 条 4HPAAL 合成途径，发现 ARO10 催化效率最高，并获得一个催化效率大幅度提高的突变体 ARO10^{F138L/D218G}^[31]，在此基础上过表达不同来源的醇脱氢酶，酪醇产量最高达 (1.09 ± 0.05) g/L。但是，Liu 等^[35]研究发现，大肠杆菌内源醇脱氢酶即可充分饱和底物，过表达醇脱氢酶反而导致酪醇产量降低，与本研究结果相悖。这是因为本研究中的底盘细胞 DP^[32]经过多重遗

传修饰和改造, 代谢通量大幅度增加; 此外, ARO10^{F138L/D218G} 经过进化后催化效率大幅度提高^[31], 使得酪醇合成碳代谢流增大, 因而内源醇脱氢酶无法完全饱和底物。但是, 过表达 *frmA* 和 *adhP* 也导致了酪醇产量的下降, 其具体原因尚需设计实验进一步研究。为进一步提高酪醇产量, 敲除 *feaB*, 阻断了 4-羟基苯乙酸竞争支路, 酪醇产量提高 21.15%, 达到(1.26±0.04) g/L。针对大肠杆菌酪醇发酵普遍存在的菌体密度低的难题^[17,20,35], 采用群体感应系统动态激活酪醇合成途径, 减轻酪醇对底盘细胞的生长抑制, 摇瓶发酵菌体 OD_{600} 值达到 8.23±0.13, 酪醇产量达(1.74±0.08) g/L, 分别较对照 TRF5 提升 33.82%和 34.78%。最后, 为进一步验证群体感应调控工程菌 TRFQ5 的酪醇合成能力, 在 2 L 发酵

罐水平进行了发酵, 酪醇产量为 4.22 g/L, OD_{600} 达到 42.88, 分别较静态诱导表达提高 38.58%和 43.62%, 说明群体感应动态调控在一定程度上可以减轻酪醇对细胞的毒性作用, 缓解生长抑制, 从而提高酪醇产量。作者前期通过群体感应系统动态调控 4-羟基苯乙酸合成途径, 使 4-羟基苯乙酸产量提高 46.4%^[31], 本研究中群体感应调控酪醇合成途径亦使酪醇产量和生物量大幅度提高, 这证实群体感应作为一种自诱导系统, 可有效缓解毒性产物对底盘细胞的生长抑制, 较好地平衡生长和产物合成, 这对其他高毒性化学品的生物合成具有广泛的借鉴和应用价值。

近年来, 研究者采用不同的代谢工程策略改造大肠杆菌和酿酒酵母, 提高了不同底物生产酪醇的产量(表 3)。

表 3 代谢工程改造微生物合成酪醇典型案例和产量

Table 3 Typical cases of metabolically engineered microorganisms for tyrosol production

Host	Genetic modifications	Culture conditions	Titer (g/L)	Substrates	References
<i>E. coli</i>	L-dopa overproducer <i>E. coli</i> DOPA 30N Δ <i>feaB</i> (pZBK-P _{esrA} -AS-ScARO10 ^{F138L/D218G} -L-EcyahK)	Fed-batch fermentation	4.220	Glucose	This study
<i>E. coli</i>	<i>tyrR</i> ::T7p- <i>aroF</i> ^{fbr} - <i>tyrA</i> ^{fbr} <i>mtlA</i> ::T7p- <i>ipdC</i> <i>acs</i> ::T7p- <i>yahK</i> <i>feaB pheA</i>	Shake-flask fermentation	1.150	Glucose	[15]
<i>E. coli</i>	BW25113 (pZE-ScARO10-ScADH6)	Shake-flask fermentation	1.469	L-tyrosine	[16]
<i>E. coli</i>	MG1655 Δ <i>feaB</i> Δ <i>pheA</i> Δ <i>tyrB</i> Δ <i>tyrR</i> <i>lacI</i> ::ARO10* <i>trpE</i> ::ARO10* <i>pabB</i> ::ARO10*, <i>pabA</i> ::ARO10* <i>pykF</i> ::ARO10*	Fed-batch fermentation	3.900	Glucose	[17]
<i>E. coli</i>	BL21(DE3) Δ <i>pykF</i> Δ <i>pheA</i> Δ <i>tyrR</i> Δ <i>crr</i> Δ <i>ptsG</i> Δ <i>feaB</i> (pRSFDuet-P _{cspA} -P _{CAAS} -P _{yjeFE} -ScADH6)	Shake-flask fermentation	2.120	Glucose	[19]
<i>E. coli</i>	MG1655 Δ <i>feaB</i> Δ <i>pheA</i> Δ <i>tyrB</i> Δ <i>tyrR</i> (pKK223-3-ARO10*)	Shake-flask fermentation	1.316	Glucose	[21]
<i>E. coli</i>	BL21(DE3) (pET-PmLAAD-CtPDC, pACYC-ScADH6-BmGDH)	Whole-cell biocatalysis	21.840	L-tyrosine	[38]
<i>S. cerevisiae</i>	MATa <i>ura3-52 his3-Δ1 leu2-3_112 trp1-289, MAL2-8c SUC2, ZWF1</i> ::P _{HXT7} -TKL1-T _{ADHI} -P _{TEFI} -RKII-T _{PGK1} , TRP1, <i>URA3</i> ::P _{PGK1} -ARO2-T _{GPD} -P _{TEFI} -ARO10-T _{PGK1} , Δ <i>pdcl</i> Δ <i>pha2</i> 308a::P _{ARO4} -ARO4 ^{K229L} -T ^{ARO4} -P _{ARO7} -ARO7 ^{G141S} -T _{ARO7} -P _{ARO3} -ARO3 ^{K222L} -T _{ARO3}	Fed-batch fermentation	9.900	Glucose	[39]
<i>S. cerevisiae</i>	<i>PDC1</i> :: <i>EcTyrA</i> ^{M53I/A354V} ; <i>YJRWdelta12</i> ::P _{CAAS} ; <i>PHA2</i> :: <i>Bbxjpk</i> ; <i>TRP3</i> :: <i>ugt85a1</i>	Fed-batch fermentation	8.480	Glucose	[40]

本研究构建的基因工程菌在 2 L 发酵罐可产酪醇 4.22 g/L, 虽是目前大肠杆菌从头合成酪醇的最高水平, 但与酿酒酵母中 Liu 等^[39] 9.90 g/L 和 Guo 等^[40] 8.48 g/L 的发酵水平相比, 仍有一定差距。因此, 后续的改造可结合机器学习对酶进行定向进化提高催化效率^[41-43]。群体感应动态调控在一定程度上缓解了酪醇的生长抑制作用, 但无法从根本上解除酪醇的毒性作用, 这也是限制酪醇产量继续提升的瓶颈。实验室适应性进化是一种简单有效的提高底盘细胞耐受性的手段, 若结合室温常压等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)等诱变技术则可大大提高进化效率, 目前 ARTP 结合适应性进化已成功提高了扭脱甲基杆菌的甲醇^[44]、大肠杆菌的蒽烯^[45]和谷氨酸棒杆菌的丁二胺^[46]耐受性, 后续可通过 ARTP 结合适应性进化提高底盘细胞的酪醇耐受性, 以解除酪醇对底盘细胞的毒性作用。NADPH 和 ATP 是生物合成的重要辅因子, 目前已有众多辅因子改造促进产物高效合成的案例^[47-48], 因此可通过重构 NADPH 合成途径或 CRISPRi 抑制 NADPH、ATP 消耗相关基因等方式, 提升 NADPH 和 ATP 的供给, 以此促进酪醇的合成, 使其成为优良的酪醇生产菌或羟基酪醇等高价值衍生物的优良平台菌株。

REFERENCES

- [1] CELANO R, PICCINELLI AL, PUGLIESE A, CARABETTA S, DI SANZO R, RASTRELLI L, RUSSO M. Insights into the analysis of phenolic secoiridoids in extra virgin olive oil[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(24): 6053-6063.
- [2] ZHAO MT, HONG XL, ABDULLAH, YAO RL, XIAO Y. Rapid biosynthesis of phenolic glycosides and their derivatives from biomass-derived hydroxycinnamates[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(2): 838-847.
- [3] CHOO HJ, KIM EJ, KIM SY, LEE Y, KIM BG, AHN JH. Microbial synthesis of hydroxytyrosol and hydroxysalidroside[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2018, 61(3): 295-301.
- [4] IPPOLITO RM, VIGMOND S. Process for preparing substituted phenol ethers via oxazolidine-structure intermediates: US4760182[P]. 1988-07-26.
- [5] YOO, SE. Antihypertensive polyhalohydroxyisopropyl phenylalka(e)noic acid esters of alkylaminohydroxypropyloxyphenylalkyl alcohols: US4450172[P]. 1984-05-22.
- [6] SOEJIMA H, TSUGE K, YOSHIMURA T, SAWADA K, KITAGAKI H. Breeding of a high tyrosol-producing sake yeast by isolation of an ethanol-resistant mutant from a *trp3* mutant[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2012, 118(3): 264-268.
- [7] SILVA LR, ANDRADE PB, VALENTÃO P, SEABRA RM, TRUJILLO ME, VELÁZQUEZ E. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: effect of *Dekkera bruxellensis* yeast[J]. *Food Chemistry*, 2005, 89(2): 185-9.
- [8] GABBIA D, CARPI S, SARCOGNATO S, ZANOTTO I, SAYAF K, COLOGNESI M, POLINI B, DIGIACOMO M, MACCHIA M, NIERI P, CARRARA M, CAZZAGON N, RUSSO FP, GUIDO M, de MARTIN S. The phenolic compounds tyrosol and hydroxytyrosol counteract liver fibrogenesis via the transcriptional modulation of NADPH oxidases and oxidative stress-related miRNAs[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 157: 114014.
- [9] KIM YY, LEE S, KIM MJ, KANG BC, DHAKAL H, CHOI YA, PARK PH, CHOI H, SHIN TY, CHOI HG, KWON TK, KHANG D, KIM SH. Tyrosol attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the inflammatory response and maintaining the alveolar capillary barrier[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 109: 526-533.
- [10] TORIĆ J, MARKOVIĆ AK, BRALA CJ, BARBARIĆ M. Anticancer effects of olive oil polyphenols and their combinations with anticancer drugs[J]. *Acta Pharmaceutica*, 2019, 69(4): 461-482.
- [11] BORONAT A, MATEUS J, SOLDEVILA-DOMENECH N, GUERRA M, RODRÍGUEZ-MORATÓ J, VARON C, MUÑOZ D, BARBOSA F, MORALES JC, GAEDIGK A, LANGOHR K, COVAS MI, PÉREZ-MAÑÁ C, FITÓ M, TYNDALE RF, de la TORRE R. Cardiovascular benefits of tyrosol and its endogenous conversion into hydroxytyrosol in humans. A randomized, controlled trial[J]. *Free Radical Biology*

- and Medicine, 2019, 143: 471-481.
- [12] ATOCHIN DN, CHERNYSHEVA GA, SMOLYAKOVA VI, OSIPENKO AN, LOGVINOV SV, ZHDANKINA AA, SYSOLYATIN SV, KRYUKOV YA, ANFINOGENOVA Y, PLOTNIKOVA TM, PLOTNIKOV MB. Neuroprotective effects of p-tyrosol after the global cerebral ischemia in rats[J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(7): 784-792.
- [13] SERRELI G, DEIANA M. Biological relevance of extra virgin olive oil polyphenols metabolites[J]. *Antioxidants*, 2018, 7(12): 170.
- [14] ZHU LH, WANG JH, XU S, SHI GY. Improved aromatic alcohol production by strengthening the shikimate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 103: 18-30.
- [15] KOMA D, YAMANAKA H, MORIYOSHI K, OHMOTO T, SAKAI K. Production of aromatic compounds by metabolically engineered *Escherichia coli* with an expanded shikimate pathway[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2012, 78(17): 6203-6216.
- [16] LI XL, CHEN ZY, WU YF, YAN YJ, SUN XX, YUAN QP. Establishing an artificial pathway for efficient biosynthesis of hydroxytyrosol[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(2): 647-654.
- [17] XU W, YANG C, XIA YY, ZHANG LH, LIU CX, YANG HQ, SHEN W, CHEN XZ. High-level production of tyrosol with noninduced recombinant *Escherichia coli* by metabolic engineering[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(16): 4616-23.
- [18] CHUNG D, KIM SY, AHN JH. Production of three phenylethanoids, tyrosol, hydroxytyrosol, and salidroside, using plant genes expressing in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 2578.
- [19] 曾娇娇, 余世琴, 周景文. 代谢工程改造大肠杆菌增产酪醇[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(22): 8-15.
ZENG JJ, YU SQ, ZHOU JW. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving tyrosol production[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(22): 8-15 (in Chinese).
- [20] SATOH Y, TAJIMA K, MUNEKATA M, KEASLING JD, LEE TS. Engineering of a tyrosol-producing pathway, utilizing simple sugar and the central metabolic tyrosine, in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(4): 979-984.
- [21] YANG C, CHEN XZ, CHANG JZ, ZHANG LH, XU W, SHEN W, FAN Y. Reconstruction of tyrosol synthetic pathways in *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2018, 26(12): 2615-2621.
- [22] PATNAIK R, ZOLANDZ RR, GREEN DA, KRAYNIE DF. L-tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: fermentation optimization and recovery[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99(4): 741-752.
- [23] CASADEY R, CHALLIER C, ALTAMIRANO M, SPESIA MB, CRIADO S. Antioxidant and antimicrobial properties of tyrosol and derivative-compounds in the presence of vitamin B2. Assays of synergistic antioxidant effect with commercial food additives[J]. *Food Chemistry*, 2021, 335: 127576.
- [24] CANAL C, OZEN B, BAYSAL AH. Characterization of antimicrobial activities of olive phenolics on yeasts using conventional methods and mid-infrared spectroscopy[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56: 149-158.
- [25] GONZÁLEZ B, VÁZQUEZ J, CULLEN PJ, MAS A, BELTRAN G, TORIJA MJ. Aromatic amino acid-derived compounds induce morphological changes and modulate the cell growth of wine yeast species[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 670.
- [26] PAPPENFORTH K, BASSLER BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576-88.
- [27] SOMA Y, HANAI T. Self-induced metabolic state switching by a tunable cell density sensor for microbial isopropanol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 7-15.
- [28] HONJO H, IWASAKI K, SOMA Y, TSURUNO K, HAMADA H, HANAI T. Synthetic microbial consortium with specific roles designated by genetic circuits for cooperative chemical production[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 268-275.
- [29] KIM EM, WOO HM, TIAN T, YILMAZ S, JAVIDPOUR P, KEASLING JD, LEE TS. Autonomous control of metabolic state by a quorum sensing (QS)-mediated regulator for bisabolene production in engineered *E. coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 44: 325-336.
- [30] GUPTA A, REIZMAN IMB, REISCH CR, PRATHER KLJ. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(3): 273-279.

- [31] SHEN YP, FONG LS, YAN ZB, LIU JZ. Combining directed evolution of pathway enzymes and dynamic pathway regulation using a quorum-sensing circuit to improve the production of 4-hydroxyphenylacetic acid in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 94.
- [32] WEI T, CHENG BY, LIU JZ. Genome engineering *Escherichia coli* for L-DOPA overproduction from glucose[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30080.
- [33] LEE TS, KRUPA RA, ZHANG F, HAJIMORAD M, HOLTZ WJ, PRASAD N, LEE SK, KEASLING JD. BglBrick vectors and datasheets: a synthetic biology platform for gene expression[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2011, 5: 12.
- [34] JIANG Y, CHEN B, DUAN CL, SUN BB, YANG JJ, YANG S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [35] LIU X, LI XB, JIANG JL, LIU ZN, QIAO B, LI FF, CHENG JS, SUN XC, YUAN YJ, QIAO JJ, ZHAO GR. Convergent engineering of syntrophic *Escherichia coli* coculture for efficient production of glycosides[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 243-253.
- [36] 薛宇翔, 陈献忠, 杨翠, 沈微, 樊游. 代谢工程改造大肠杆菌合成酪醇[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(10): 152-159.
XUE YX, CHEN XZ, YANG C, SHEN W, FAN Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for tyrosol synthesis[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(10): 152-159 (in Chinese).
- [37] LIU JB, WANG KP, WANG M, DENG HX, CHEN XD, SHANG YL, LIU XC, YU XH. Efficient whole cell biotransformation of tyrosol from L-tyrosine by engineered *Escherichia coli*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2022, 160: 110100.
- [38] 吴静, 阮小波, 刘佳, 宋伟, 陈修来, 高聪. 一种多酶级联转化L-酪氨酸生产酪醇的方法: CN202110292484.1[P]. 2021-06-25.
WU J, RUAN XB, LIU J, SONG W, CHEN XL, GAO C. Method for producing tyrosol by multi-enzyme cascade conversion of L-tyrosine: CN202110292484.1[P]. 2021-06-25 (in Chinese).
- [39] LIU HY, TIAN YJ, ZHOU Y, KAN YY, WU TT, XIAO WH, LUO YZ. Multi-modular engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-titre production of tyrosol and salidroside[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(6): 2605-2616.
- [40] GUO W, HUANG QL, FENG YH, TAN TC, NIU SH, HOU SL, CHEN ZG, DU ZQ, SHEN Y, FANG X. Rewiring central carbon metabolism for tyrosol and salidroside production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(8): 2410-2419.
- [41] ZHAO HM, CHOCKALINGAM K, CHEN ZL. Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(2): 104-110.
- [42] 蒋迎迎, 曲戈, 孙周通. 机器学习助力酶定向进化[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 1-11.
JIANG YY, QU G, SUN ZT. Machine learning-assisted enzyme directed evolution[J]. *Journal of Biology*, 2020, 37(4): 1-11 (in Chinese).
- [43] WAN ZY, WANG QD, LIU DC, LIANG JH. Accelerating the optimization of enzyme-catalyzed synthesis conditions via machine learning and reactivity descriptors[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2021, 19(28): 6267-6273.
- [44] CUI LY, WANG SS, GUAN CG, LIANG WF, XUE ZL, ZHANG C, XING XH. Breeding of methanol-tolerant *Methylobacterium extorquens* AM1 by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis combined with adaptive laboratory evolution[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(6): e1700679.
- [45] NIU FX, XIN H, WU YQ, LIU JZ. Enhancing production of pinene in *Escherichia coli* by using a combination of tolerance, evolution and modular co-culture engineering[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1623.
- [46] LI Z, SHEN YP, JIANG XL, FENG LS, LIU JZ. Metabolic evolution and a comparative omics analysis of *Corynebacterium glutamicum* for putrescine production[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(2): 123-139.
- [47] SHEN YP, LIAO YL, LU Q, HE X, YAN ZB, LIU JZ. ATP and NADPH engineering of *Escherichia coli* to improve the production of 4-hydroxyphenylacetic acid using CRISPRi[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 1-10.
- [48] 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(5): 520-529.

(本文责编 郝丽芳)