

DOI: 10.13376/j.cblls/2022026

文章编号: 1004-0374(2022)02-0220-08

微生物合成黄酮类化合物研究进展

杨文博, 彭 丹, 曹思邈, 刘宇辰, 王鹏超*

(东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要: 黄酮类化合物是一种广泛存在于植物体内的次生代谢产物, 有着抗病毒、抗菌、抗炎、抗癌和抗肥胖等生理活性, 具有广阔的生产应用前景, 但是直接从植物中提取黄酮类化合物的方法有着浓度低、提取难度大、生产周期长等问题。近年来, 随着微生物代谢工程和合成生物学研究的不断深入, 基于微生物合成黄酮类的生产方式可以提供一种低廉高效的替代方案。针对微生物合成黄酮类化合物, 文中简述了黄酮类化合物的合成途径, 总结了国内外对其生产宿主选择、前体合成优化以及微生物共培养技术等多种优化策略在黄酮类化合物生物合成中应用的研究, 并对其未来发展方向进行了展望。

关键词: 黄酮类化合物; 合成生物学; 微生物代谢工程

中图分类号: Q819 文献标志码: A

Research progress on microbial synthesis of flavonoids

YANG Wen-Bo, PENG Dan, CAO Si-Miao, LIU Yu-Chen, WANG Peng-Chao*

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Flavonoids are secondary metabolites that are widely found in plants and show antiviral, antibacterial, anti-inflammatory, anti-cancer and anti-obesity activities, and have broad production prospects. However, extracting flavonoids directly from plants faces problems such as low concentration, difficult extraction and long production cycle. In recent years, with the increasing research on microbial metabolic engineering and synthetic biology, the production of flavonoids based on microbial synthesis can provide a cheap and efficient alternative. In this paper, we briefly describe the synthetic pathways of flavonoids, summarize the application of various optimization strategies in the biosynthesis of flavonoids, such as host selection, precursor synthesis optimization and microbial co-culture technology at home and abroad, and provide an outlook on their future development.

Key words: flavonoids; synthetic biology; microbial metabolic engineering

黄酮类化合物是一种植物特有的次生代谢产物, 在植物中具有多种生物学功能, 包括使植物免受紫外线辐射与病原体的危害、参与结瘤期间的信号传递, 同时与生长素运输、雄性育性和植物的整体品质密切相关^[1]。此外, 黄酮类化合物在动物以及人体中具有抗病毒、抗菌^[2]、抗炎、抗癌和抗肥胖^[3]等功能, 且可用于治疗心脑血管疾病、糖尿病和肝病等^[4], 有良好的保健作用^[5]。研究表明, 目前鉴定的黄酮类化合物种类已超过 8 000 种^[6]。黄酮类化合物以 2- 苯基色原酮为基本母核, 分子中存在一个酮式羰基, 1 位上的氧原子具有碱性, 能与强酸反应成盐, 其羟基衍生物多为黄色, 故又称

黄碱素或黄酮。目前黄酮类化合物大多是从植物中提取的, 但过程耗时长, 且可能会污染环境^[1]。其次, 黄酮类物质在植物中含量较低, 并且极易受季节和气候变化的影响。此外, 很多有药物活性的黄酮类化合物都具有旋光性, 这极大地增加了分离纯化的难度, 因此基于植物提取的工业化过程存在污染大、供给不稳定、成本高、难度大等问题。

收稿日期: 2021-07-19; 修回日期: 2021-10-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31900064); 黑龙江省自然科学基金项目(LH2019C012)

*通信作者: E-mail: pengchaowang1990@163.com

随着合成生物学和微生物代谢工程的飞速发展, 通过对微生物的改造实现了多种黄酮类化合物的生物合成。然而, 微生物合成黄酮类化合物仍然存在生产效率较低、生产规模较小、提纯较复杂等问题, 无法实现高效合成进而产业化。本文将从宿主微生物的代谢途径调控、黄酮类化合物合成途径优化、微生物共培养和黄酮类化合物高效合成等方面讨论, 为黄酮类化合物的生物合成优化提供参考。

1 黄酮类化合物的合成代谢途径

黄酮类化合物 (flavonoids) 是一类存在于植物中的以 2-苯基色原酮为基本母核衍生出的活性多酚化合物。黄酮类化合物可分为下列几类: 黄酮类、黄酮醇类、异黄酮类、查尔酮类、花色素等 (图 1)。

黄酮类化合物是通过苯丙烷途径合成的。在植物中, 从苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe) 或酪氨酸 (tyrosine, Tyr) 起始, 由苯丙氨酸脱氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 或酪氨酸脱氨酶 (tyrosine ammonia-lyase, TAL) 催化, 脱氨形成反式肉桂酸或香豆酸, 这一步骤是许多代谢物生产的共同反应, 包括类黄酮、香豆素和木质素等。反式肉桂酸在依赖细胞色素 P450 的 4-肉桂酸羟化酶 (cinnamate 4-hydroxylase, C4H) 的作用下转化为香豆酸, 最后在香豆酸 CoA 连接酶 (4-cinnamate CoA ligase, 4CL) 作用下催化肉桂酸和香豆酸形成相应的酚酰-CoA 酯。查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 催化 3 分子丙二酰-CoA 和 1 分子 4-肉桂酰-CoA/4-香豆酰-CoA 缩合成生松素查尔酮/柚皮素查尔酮。而在微生物代谢工程生产类黄酮和其他苯丙烷类化合物的过程中,

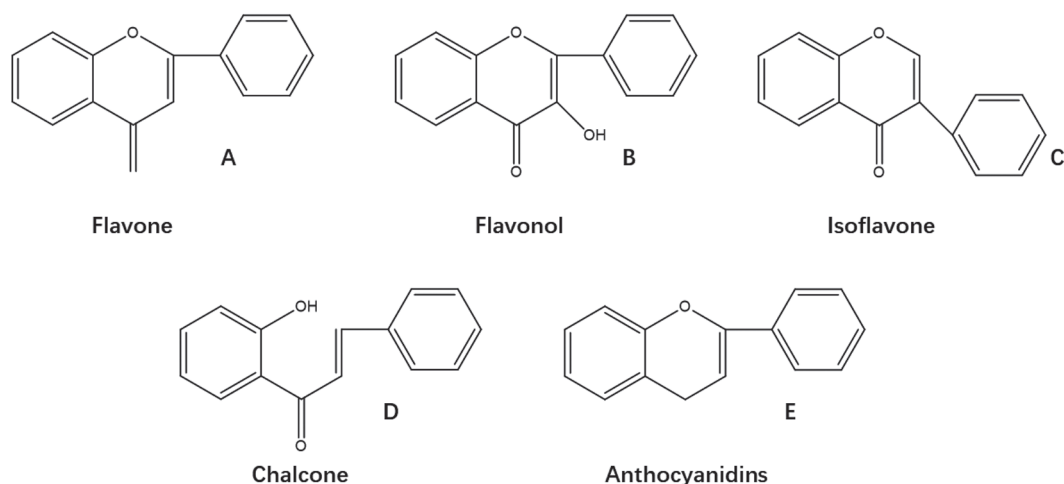
CHS 催化的反应是关键的一步^[7]。然后, 查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 催化生松素查尔酮/柚皮素查尔酮分子内环化反应生成生松素/柚皮素等类黄酮母核, 这些母核可进一步修饰为广泛的不同类黄酮结构 (图 2)。

2 黄酮类化合物生物合成的优化策略

2.1 黄酮类化合物生产宿主的选择

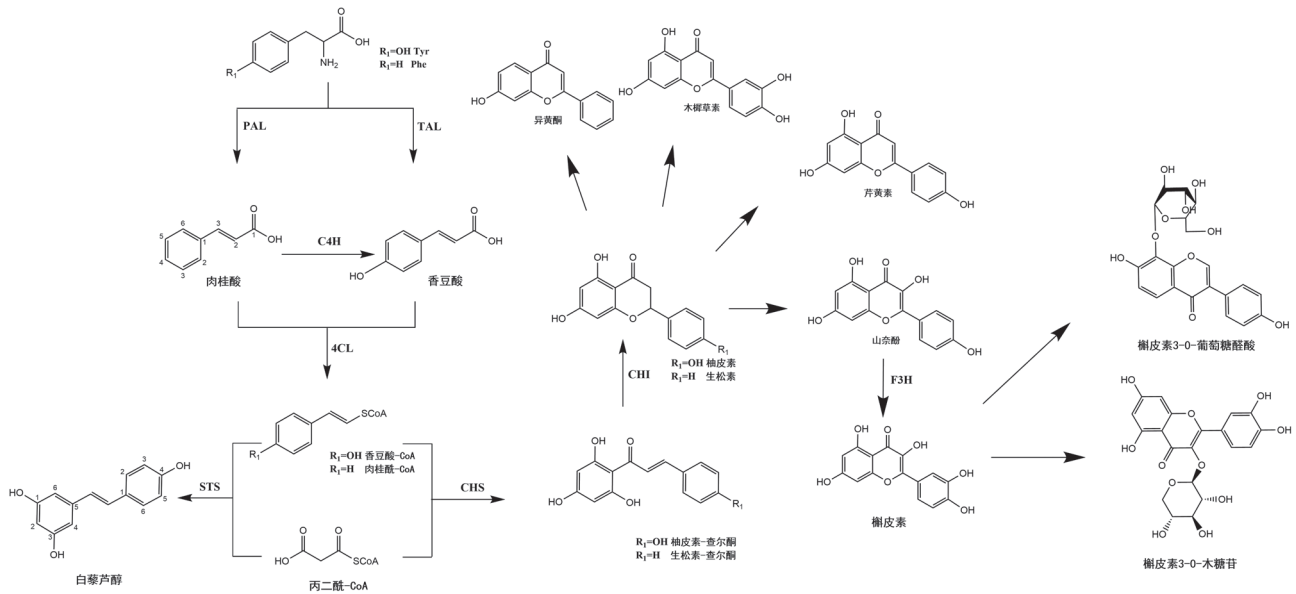
生物体的代谢系统通常是复杂的, 有多种代谢物参与其中, 且受到多种因素的影响。因此, 深入了解生产宿主的合成途径及调控机制才能实现产物的高效合成, 选择合适的生产宿主是实现微生物生产黄酮类化合物的第一步。

近年来, 大肠杆菌广泛应用于次级代谢产物的生物合成, 其优势在于生长迅速、遗传背景清晰和遗传操作方法成熟, 因此广泛应用于化合物的异源合成。目前, 利用大肠杆菌作为底盘生物合成黄酮类化合物已取得一定进展。例如, 在合成柚皮素的过程中, CRISPR/dCas9 策略用于在转录水平上抑制大肠杆菌中心代谢途径中关键酶的作用并将碳流重新引导到乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 的生产中, 通过选择最有效的酶组合, 使柚皮素的产量可达 421.6 mg/L^[8]。基于此研究, Gao 等^[8]利用 RNA-Seq 数据库筛选了一系列启动子, 将其用于绿色荧光蛋白 (EGFP) 的表达, 使用荧光激活细胞分选 (FACS) 表征 EGFP 蛋白的表达水平, 获得了一个包括 66 个不同表达水平的启动子库。在此启动子库的基础上, 选择 30 个启动子与 4CL、CHS 和 CHI 随机组装成载体, 构建并优化了 (2S)-柚皮素生物合成途



A: 黄酮; B: 黄酮醇类; C: 异黄酮类; D: 查尔酮类; E: 花青素

图1 常见的黄酮类化合物



PAL: 苯丙氨酸脱氨酶; TAL: 酪氨酸脱氨酶; C4H: 4-肉桂酸羟化酶; 4CL: 4-香豆酸CoA连接酶; STS: 芪合酶; CHS: 查尔酮合成酶; CHI: 查尔酮异构酶; FSI/FSII: 黄酮合成酶; IFS: 异黄酮合成酶; F3H: 类黄酮3-羟化酶

图2 苯丙烷的代谢途径

径。最后采用高通量的 (2S)- 柚皮素检测方法, 发现 (2S)- 柚皮素的产量最高可达到 1.21 g/L。翟逸等^[9] 将白藜芦醇合酶 (resveratrol synthase, RS) 和 4CL 的编码基因整合共表达到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 在加入 4- 香豆酸的 M9 培养基中诱导培养, 得到的白藜芦醇产量高达 8.6 mg/L。大肠杆菌工程菌不仅可以合成不同的黄酮苷元, 还可通过改造葡萄糖转移酶和核苷酸途径来生产植物特有的黄酮糖苷, 如木犀草素-7-O- 葡萄糖醛酸、槲皮素 3-O- 阿拉伯糖苷和槲皮素 3-O- 木糖苷等。例如, 利用花青素合成酶 ANS 和 3-O- 葡萄糖基转移酶之间的蛋白融合, 在大肠杆菌中以儿茶素为底物合成氰基 3-O- 葡萄糖苷 (CN3-G)^[10]。大肠杆菌在生产黄酮类化合物中应用广泛, 但是也存在明显的短板, 即原核生物中缺乏与黄酮类化合物生产有关的真核植物细胞器, 如与细胞色素 P450 氧化酶相结合的内质网 (ER) 等, 这些附着在细胞器上的酶不仅对于黄酮类化合物实现功能化和多样化起着十分重要的作用, 而且是异源合成天然产物的关键, 植物中就含有大量主要用于合成复杂的次生代谢物质的 P450 基因, 若缺少了这些基因与酶类, 将难以合成结构更加复杂的黄酮类化合物^[11]。

相对而言, 具有高等真核生物细胞器的酿酒酵母能够表达有功能的植物源的 P450 酶系基因, 因此在合成复杂结构的黄酮类化合物时也独具优势,

被广泛应用^[12]。研究者在酿酒酵母中构建了苯丙氨酸和酪氨酸这两条异源合成白藜芦醇的途径, 成功把它构建为异源合成白藜芦醇的微生物工厂^[13]。此外, Li 等^[14] 发现在 (2S)- 柚皮素代谢途径中酿酒酵母必需基因 4CL 和 CHS 的拷贝数越高, 它们的转录量越高, 柚皮素的生产效率越高, 对 (2S)- 柚皮素代谢途径的基因多拷贝整合可以有效提高黄酮产量。除酿酒酵母外, 解脂耶氏酵母也是一种优秀的黄酮类化合物生产宿主。对其实施从头生产策略, 在通过以异源途径从酪氨酸生产 4- 香豆酰辅酶 A 的同时, 使丙二酰辅酶 A 高通量和抗反馈地生产酪氨酸, 使柚皮素的生产量达到了 (898 ± 19) mg/L^[15]。这是在真核系统中目前发现的柚皮素产量最高的方法。由此可见, 真核生物酵母菌很适合承载不同的次生代谢产物合成途径, 可以用来生产黄酮类化合物。然而, 酵母菌也存在一定的缺陷, 如生长较慢、操作复杂。

2.2 黄酮类化合物生物合成前体的优化

黄酮类化合物属于次级代谢产物, 合成途径较长, 通过理性改造代谢途径, 引导更多的代谢流向黄酮类化合物的合成是实现高效合成的重要前提条件。其中, 芳香族前体苯丙氨酸、酪氨酸和丙二酰辅酶 A 的充足供应对黄酮类化合物的合成至关重要。

2.2.1 芳香族化合物前体的合成

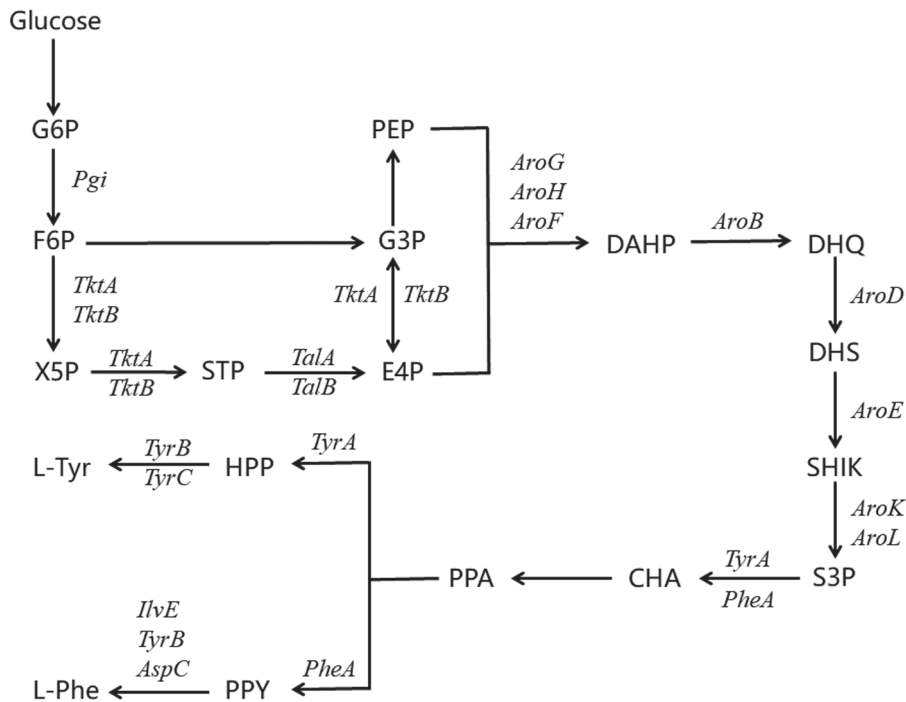
通过微生物代谢网络转化所需的黄酮类化合物

需要芳香族化合物前体, 如苯丙氨酸和酪氨酸^[16], 所以针对芳香族化合物前体的合成改良是微生物合成黄酮类化合物的重要工作之一。近年来, 通过提高细胞内前体水平、减轻关键酶的转录抑制和反馈抑制、改造全局调控因子和过量表达限速酶等手段, 已经成功在大肠杆菌中以葡萄糖为原料生产相对高效价的 L- 苯丙氨酸。在大肠杆菌中, L- 苯丙氨酸生物合成途径有两个前体, 分别是磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和 4- 磷酸赤藓糖 (E4P)。为了提高 E4P 的胞内浓度, 通常选择编码转酮醇酶的 *tktA* 和编码转醛醇酶的 *talb* 作为工程靶点^[17]。在经典的诱变过程中总会不可避免地产生无法预测的突变, 可能会对突变株的进一步改良产生一定影响, 因此可以使用代谢工程为菌株发育提供一种有效的替代随机突变的方法来获得高产突变菌株^[18]。如表 1 所示, 利用适当的工程技术可以实现目标基因的缺失、过表达和基因组整合, 可以提高大肠杆菌菌株中 L- 苯丙氨酸的产量。除此之外, 在苯丙氨酸的合成途径中, 3- 脱氧 -d- 阿拉伯庚酮糖 -7- 磷酸 (DAHP) 合成酶控制着流入 L- 苯丙氨酸生物合成途径的碳流量, 消除 DAHP 合成酶同工酶的反馈抑制也有助于提高

L- 苯丙氨酸的产量。随着结构分析的深入, 人们鉴定出多种 DAHP 合成酶同工酶的关键氨基酸残基, 由此获得了多种解除苯丙氨酸反馈抑制作用的酶基因, 如 *AroG*^{Leu76Val}、*AroF*^{Pro148Leu} 和 *AroF*^{Gln152Ile}^[19] (图 3)。近年来, 有研究发现可以利用热诱导表达质粒对大肠杆菌菌株进行代谢工程改造, 使其高产 L- 酪氨酸, 会更有利于大规模工业化生产^[20]。因为在酪氨酸解氨酶 (tyrosine ammonialyase, TAL) 的作用下酪氨酸可被催化生成对香豆酸, 因此提高 TAL 的催化活性可以增加对香豆酸产量。于是, 研究人员利用易错 PCR 技术对 TAL 基因进行随机突变, 构建随机突变体文库, 再进行高通量筛选, 结果发现第 9 位丝氨酸和第 11 位丙氨酸这两个氨基酸位点突变可以显著影响 TAL 催化活性。通过组合突变验证发现, S9Y 和 A11N 以及 S9N 和 A11Y 两种组合突变体极大地提高了香豆酸产量, 产量分别达 121.2 mg/L 和 122.3 mg/L^[21]。通过对合成途径中酶的改造能够有效提高前体进入黄酮类化合物的合成途径。

2.2.2 丙二酰辅酶A的合成

丙二酰辅酶 A (malonyl-CoA) 是生产黄酮类化合物的另一个主要前体, 改善丙二酰辅酶 A 的胞内



Glucose: 葡萄糖; G6P: 6-磷酸葡萄糖; F6P: 6-磷酸果糖; X5P: 5-磷酸木糖; G3P: 3-磷酸甘油醛; STP: 磷酸景天庚酮糖; E4P: 4-磷酸赤藓糖; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; DAHP: 3-脱氧-d-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸; DHQ: 3-脱氢奎尼酸; DHS: 3-脱氢莽草酸; SHIK: 莽草酸; S3P: 3-磷酸莽草酸; CHA: 分支酸; PPA: 预苯酸; HPP: 对羟基苯丙酮酸; PPY: 苯丙酮酸; L-Tyr: L-酪氨酸; L-Phe: L-苯丙氨酸

图3 苯丙氨酸的合成途径

积累可以提高黄酮类化合物的生产效率。乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 催化乙酰辅酶 A 羧化形成丙二酰辅酶 A, 一般通过过表达 ACC 或者突变 ACC 增加其酶活来提高丙二酰辅酶 A 的积累量^[29]。除此之外, 外源泛酸激酶 (coaA) 也可将乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A, 并且谷氨酰胺梭菌的 Acc 活性很高。因此, 在大肠杆菌中引入外源 coaA 和谷氨酰胺梭菌的 Acc 能有效促进丙二酰辅酶 A 的合成^[30]。此外, Masuda 等^[31]发现了另一种思路, 大肠杆菌代谢需要几种基本营养素, 如氮、硫、镁和磷, 大肠杆菌的代谢行为取决于营养饥饿的类型。Li 等^[32]成功地证明了大肠杆菌在硫饥饿条件下适合于生产乙酰辅酶 A 衍生的甲羟戊酸以及 PEP 和 E4P 衍生的酪氨酸。同时, Masuda 等^[31]对生产甲羟戊酸的大肠杆菌进行了代谢通量分析, 结果表明硫饥饿可以抑制三羧酸循环通量和增加 NADPH 的合成, 提高了乙酰辅酶 A 的利用率; 他们的研究还发现, 在硫或镁饥饿条件下, 提高 ATP 浓度会增加丙二酰辅酶 A 的供应, 并导致 3-羟基丙酸的产生。Tokuyama 等^[33]的实验结果表明, 镁饥饿可导致最高的产量效价 [(144 ± 15) μmol/L] 和比生产能力 [(127 ± 21) μmol/gCDW], 因此镁饥饿是激活代谢状态以产生丙二酰辅酶 A 衍生物的有效途径。

除大肠杆菌外, 酿酒酵母也是常用的生产宿主, 在酿酒酵母中, 丙二酰辅酶 A 的浓度被严格控制在很低的水平, 从而限制了丙二酰辅酶 A 衍生物的产

生。通常, 通过过表达天然乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC1) 或取消其翻译后修饰可使酿酒酵母中的丙二酰辅酶 A 前体池升高, 同时, 也可以在转录水平上对 ACC1 进行调节^[34]。例如, 在菌株中 ACC1 过表达可导致脂肪酸含量和角鲨烯水平升高, 由于丙二酰辅酶 A 生物合成和角鲨烯生物合成时会竞争相同的前体乙酰辅酶 A, 因此在 ACC1 过表达菌株生物合成途径中应下调角鲨烯合成途径, 使丙二酰辅酶 A 代谢通量达到最大^[35]。表 2 为近年来改善丙二酰辅酶 A 前体池的一些策略对比, 从中可以看出随着合成生物学和基因工程等学科的发展, 在这一问题的解决上已取得了一定的进展。但是丙二酰辅酶 A 的产生和利用仍然是限制微生物生产黄酮的一个重要因素。只有让生产途径与这些池和宿主的新陈代谢保持良好的平衡, 前体或中间体才不会大量积累, 细胞生长才能保持最佳状态。此外仍需注意, 丙二酰辅酶 A 的过量生产应该与辅酶 A 合成的上调相结合, 以维持中枢代谢系统的平衡^[36]。

3 微生物共培养技术生产黄酮类化合物

传统的微生物代谢工程主要使用单一菌株组成的纯培养物生产化学产品, 这意味着每个过程都必须同时对执行生产路径中所有不同步骤的最佳生产菌株进行权衡。然而, 这些步骤可能需要不同的底物和辅助因子, 导致了单一菌株无法满足实际生产需求; 并且, 在生物合成途径很长或者过程很复杂

表1 苯丙氨酸产量提高的对比

菌株	菌株特征	转化率 (mol/mol)	产量 (g/L)	生产力 (g/L·h)	发酵模式	参考文献
<i>E. coli</i> aroF-wt	w3110 Fnr+ ($\Delta pheA \Delta tyrA \Delta aroF$)/ pJF119EH-aroF ^{WT} -pheA ^{FBR} -aro ^{LWT}	未提及	34.00	未提及	分批发酵	[22]
W3110-4 (pF20)	过表达aroF ^{FBR} 和pheA ^{FBR} 的W3110 ($\Delta pheA \Delta tyrA \Delta aroF$)	未提及	32.00	未提及	分批发酵	[23]
WSH-Z06 (pAP-B03)	L-酪氨酸缺乏的 <i>E. coli</i> K-12	26.00%	35.38	未提及	分批发酵	[24]
BR-42(pAP-B03)	<i>E. coli</i> WSH-Z06随机突变并且 aroF ^{WT} 和pheA ^{FBR} 过表达	26.40%	57.63	1.153	分批发酵	[25]
W3110 (pNpheABK15)	过表达 pheA ^{FBR} 、ydiB、aroK和 aroG15的W3110	16.80%	23.80	0.073	分批发酵	[26]
pR15BABKG	过表达 pheA、aroG15、ydiB、aroK、 tyrB和yddG 的WSH-Z06 Δcrr	27.50%	47.00	未提及	分批发酵	[26]
HD-A2	<i>E. coli</i> W3110 随机突变并且 aroF ^{WT} 、 pheA ^{FBR} 和aroA过表达	25.74%	62.74	未提及	分批发酵	[27]
Xllp21	通过过表达 aroF ^{WT} 、aroD和pheA ^{FBR} 、 tyrR(失活)并且整合基因组galP和 GLK而获得的L-酪氨酸缺陷型W3110	28.30%	72.90	未提及	分批发酵	[28]

表2 改善前体丙二酰辅酶A产量的策略对比

前体	菌株	目的基因	产物及产量	发酵模式	参考文献
Malonyl-CoA	<i>E. coli</i>	<i>fabF</i> ↑	25.80 mg/L生松素	分批发酵	[37]
Malonyl-CoA	<i>E. coli</i>	ACC↑、MCR↑	1800 mg/L 3-羟基丙酸	分批发酵	[38]
Malonyl-CoA	<i>E. coli</i>	<i>fabD</i> ↓	91.31 mg/L柚皮素	分批发酵	[39]
Malonyl-CoA	<i>E. coli</i>	<i>adhE</i> ↓、 <i>fabF</i> ↓、 <i>fabB</i> ↓、 <i>sucC</i> ↓、 <i>fumC</i> ↓	421.6 mg/L柚皮素	分批发酵	[7]
Malonyl-CoA	<i>E. coli</i>	<i>matB</i> ↑、 <i>matC</i> ↑	100.6 mg/L (2S)-柚皮素	分批发酵	[40]
Malonyl-CoA	<i>E. coli</i>	<i>matB</i> ↑、 <i>matC</i> ↑	40.02 mg/L (2S)-生松素	分批发酵	[41]
Malonyl-CoA	<i>S. cerevisiae</i>	ACCI*↑	235.0 mg/L白藜芦醇	分批发酵	[42]

注: ↑: 过表达; ↓: 下调; *: 突变

的时候, 单一菌株的代谢负担会很大。因此, 为了追求更高效的生物合成, 人们想到了共培养^[43]。

从2007年开始, 陆续有人开始使用共培养法生产黄酮类化合物。比如, 利用酪氨酸高效产柚皮苷元的大肠杆菌菌株与携带异黄酮合成酶的改良酵母菌株共同培养, 酪氨酸先被大肠杆菌菌株高效转化为柚皮素, 从而被酵母菌株吸收, 转化为染料木素。但二者的生态关系复杂, 所以两种菌株仍旧是各自培养, 只是在最终的生产培养基中一起培养。因此, 严格意义上来讲这种方式并不是共培养^[44]。

近年来, 随着研究的不断深入, 已经在研究中首次应用共培养方法生产黄烷-3-醇并提出优化方法^[45], 黄烷-3-醇的效价与之前的最佳值相比提高了65%, 达到(40.7 ± 0.1) mg/L。即使现在具备有效生产黄烷酮的菌株以及将黄烷酮高效转化为黄烷-3-醇的菌株^[46], 但是当在一个菌株中表达完整的代谢途径时, 产品的产量会急剧下降。经分析发现, 这种结果的产生可能是由于菌株对底物和辅因子的需求不同, 其代谢途径的第一部分依赖于丙二酰辅酶A, 而黄烷酮向黄烷-3-醇的转化却依赖于还原型辅酶II (NADPH)。于是, Jones等^[47]尝试了新的优化大肠杆菌菌株的共培养方法生产对香豆酸, 优化了菌株的相容性、碳源、温度、诱导点和接种率, 与Chemler等^[48]描述的纯培养方法相比, 这种共培养方法使生产的黄烷-3-醇的效价提高了970倍。通过对大肠杆菌进行工程改造, 能够把参与柚皮素生物合成途径的不同部分的两种独立的大肠杆菌结合起来, 减少代谢压力, 优化催化反应, 简化了共培养菌株之间相关生物合成步骤的调控, 使共培养中的柚皮素产量显著提高^[49]。还有研究将来自不同植物和微生物的15个外源基因整合到4个大肠杆菌菌株中, 获得的四元混合培养体系能够从葡萄糖从头合成花青素^[50]。Lu等^[51]利用从葡萄内生菌*Alternaria* sp. MG1中克隆的4-香豆酰CoA连

接酶(*AI4CL*)和查尔酮合成酶(*AICH5*)两个基因, 以两株含*AI4CL*和*AICH5*的酿酒酵母为原料建立了酿酒酵母培养体系, 将*AI4CL*引入酿酒酵母中, 提高了苹果酸、黄酮和花青素等化合物的产量; 其中, 经过改造的菌株E1对比商用酵母, 苹果酸提高了24.8%, 黄酮提高了32%, 花青素提高了13.5%。它的优点在于简化了反应体系和步骤, 不需要引入*CHI*基因或修改其他基因就可以直接生产柚皮素。此外, 该共培养体系能够同时合成黄酮类化合物和二苯乙烯类化合物, 产生大量柑橘素和少量白藜芦醇。由此可见, 利用微生物共培养技术能减轻代谢负担, 多种菌株混合可以提供多种适宜的环境包括酶类和辅因子等, 还可以高效利用多种底物产生多种产物, 对于优化黄酮类化合物生产体系很有潜力。但共培养技术还需要考虑各菌株之间的物种关系, 避免产生竞争, 同时需要解决不同菌株之间物质转运的问题。

4 总结与展望

黄酮类化合物是重要的植物次生代谢物, 在人类健康与医疗领域具有巨大的应用潜力, 对其微生物合成途径的研究具有重要意义和经济价值, 目前传统生产方法产量低、难度大、周期长, 难以开发。近年来, 得益于分子生物学与合成生物学的快速发展, 微生物合成黄酮类化合物已取得很多成果, 包括前体物质的产量有所提升, 并且得到了较高的柚皮素和香豆素酸产量, 以及针对多种关键酶类有所解析和优化, 但是仍然无法满足微生物合成黄酮类化合物的工业化需求。为了进一步优化黄酮类化合物生物合成, 可以从以下方向开展研究: (1) 应用代谢组学和基因组学等分析, 进一步解析黄酮类化合物合成过程中的关键酶类, 并利用适当的工程技术对其基因进行修饰; (2) 扩展生物合成的底盘细胞范围, 比如对非常规酵母(包括解脂耶氏酵母和

巴斯德毕赤酵母等)的应用;(3)针对微生物共培养技术进行优化,包括调控菌株间的动态相互作用、增加共培养体系的菌株种类、进行模块化设计来进一步提高生产效能;(4)开发高通量筛选与动态调节检测技术,比如利用生物传感器高效解析酶类作用及检测产量。相信随着研究逐渐深入,微生物合成黄酮类化合物的工业化指日可待。

[参 考 文 献]

- [1] Delmulle T, Maeseleire SLD, Mey MD. Challenges in the microbial production of flavonoids. *Phytochem Rev*, 2018, 17: 229-47
- [2] Jin YS. Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29: 126589
- [3] Sung J, Suh JH, Wang Y. Effects of heat treatment of mandarin peel on flavonoid profiles and lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *J Food Drug Anal*, 2019, 27: 729-35
- [4] Ruan SF, Xiang SJ, Wu WF, et al. Potential role of mTORC1 and the PI3K-Akt pathway in anti-acne properties of licorice flavonoids. *J Funct Foods*, 2020, 70: 103968
- [5] Jin X, Lu Y, Chen S, et al. UPLC-MS identification and anticomplement activity of the metabolites of *Sophora tonkinensis* flavonoids treated with human intestinal bacteria. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 184: 113176
- [6] Alseikh S, de Souza LP, Benina M, et al. The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. *Phytochemistry*, 2020, 174: 112347
- [7] Wu J, Du G, Chen J, et al. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 13477
- [8] Gao S, Zhou H, Zhou J, et al. Promoter library based pathway optimization for efficient (2S)-naringenin production from p-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2020, 68: 6884-91
- [9] 翟逸, 李明, 赵秀敏, 等. 以4-香豆酸为底物转化白藜芦醇大肠杆菌工程菌的构建. *生物资源*, 2021, 43: 194-9
- [10] Nabavi SM, Šamec D, Tomczyk M, et al. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnol Adv*, 2020, 38: 107316
- [11] Ayabe SI, Akashi T. Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochem Rev*, 2006, 5: 271-82
- [12] Guengerich FP, Munro AW. Unusual cytochrome p450 enzymes and reactions. *J Biol Chem*, 2013, 288: 17065-73
- [13] 王鹤蓉. 利用酿酒酵母生物合成白藜芦醇途径的构建及优化[D]. 长春: 吉林大学, 2020
- [14] Li H, Gao S, Zhang S, et al. Effects of metabolic pathway gene copy numbers on the biosynthesis of (2S)-naringenin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 2021, 325: 119-27
- [15] Palmer CM, Miller KK, Nguyen A, et al. Engineering 4-coumaroyl-CoA derived polyketide production in *Yarrowia lipolytica* through a β -oxidation mediated strategy. *Metab Eng*, 2020, 57: 174-81
- [16] Wang S, Zhang S, Xiao A, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of various phenylpropanoid derivatives. *Metab Eng*, 2015, 29: 153-9
- [17] Zhao G, Winkler ME. An *Escherichia coli* K-12 *tktA tktB* mutant deficient in transketolase activity requires pyridoxine (vitamin B6) as well as the aromatic amino acids and vitamins for growth. *J Bacteriol*, 1994, 176: 6134-8
- [18] Dong X, Quinn PJ, Wang X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine. *Biotechnol Adv*, 2011, 29: 11-23
- [19] Ger YM, Chen SL, Chiang HJ, et al. A single Ser-180 mutation desensitizes feedback inhibition of the phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthetase in *Escherichia coli*. *J Biochem*, 1994, 116: 986-90
- [20] Dixon NE. Stable high-copy-number bacteriophage λ promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, 1996, 176: 49-53
- [21] Huo Y, Wu F, Song G, et al. Directed evolution of tyrosine ammonia-lyase to improve the production of p-coumaric acid in *Escherichia coli*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2020, 36: 2367-76
- [22] Gerigk M, Bujnicki R, Ganpo-Nkwenkwa E, et al. Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant *Escherichia coli* strains. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 80: 746-54
- [23] Gerigk M, Maass D, Kreutzer A, et al. Enhanced pilot-scale fed-batch L-phenylalanine production with recombinant *Escherichia coli* by fully integrated reactive extraction. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2002, 25: 43-52
- [24] Zhou H, Liao X, Wang T, et al. Enhanced L-phenylalanine biosynthesis by co-expression of *pheA^{ibr}* and *aro^{Fwt}*. *Bioresour Technol*, 2010, 101: 4151-6
- [25] Zhou H, Liao X, Liu L, et al. Enhanced l-phenylalanine production by recombinant *Escherichia coli* BR-42 (pAP-B03) resistant to bacteriophage BP-1 via a two-stage feeding approach. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38: 1219-27
- [26] Liu SP, Xiao MR, Zhang L, et al. Production of L-phenylalanine from glucose by metabolic engineering of wild type *Escherichia coli* W3110. *Process Biochem*, 2013, 48: 413-9
- [27] Ding D, Liu Y, Xu Y, et al. Improving the production of L-phenylalanine by identifying key enzymes through multi-enzyme reaction system *in vitro*. *Sci Rep*, 2016, 6: 32208
- [28] Liu Y, Xu Y, Ding D, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production. *BMC Biotechnol*, 2018, 18: 5
- [29] 王凯峰, 丁颖, 纪晓俊. 微生物合成丙二酰辅酶A衍生物的代谢工程. *生物加工过程*, 2020, 18: 35-43

- [30] Shusaku S, Miho O, Saki M, et al. Enhancement of fatty acid biosynthesis by exogenous acetyl-CoA carboxylase and pantothenate kinase in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2020, 42: 1-11
- [31] Masuda A, Toya Y, Shimizu H. Metabolic impact of nutrient starvation in mevalonate-producing *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 1634-40
- [32] Li S, Jendresen CB, Nielsen AT. Increasing production yield of tyrosine and mevalonate through inhibition of biomass formation. *Process Biochem*, 2016, 51: 1992-2000
- [33] Tokuyama K, Toya Y, Matsuda F, et al. Magnesium starvation improves production of malonyl-CoA-derived metabolites in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2018, 52: 215-23
- [34] Ga-Hee S, Markus V, Ulf S, et al. Overexpression of genes of the fatty acid biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2012, 29: 371-83
- [35] Lian J, Zhao H. Recent advances in biosynthesis of fatty acids derived products in *Saccharomyces cerevisiae* via enhanced supply of precursor metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42: 437-51
- [36] Lindner AB. Designing and using RNA scaffolds to assemble proteins *in vivo*. *Nature Protocol*, 2012, 7: 1797-1807
- [37] Cao W, Ma W, Zhang B, et al. Improved pinocembrin production in *Escherichia coli* by engineering fatty acid synthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43: 557-66
- [38] Cheng Z, Jiang J, Wu H, et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glucose via malonyl-CoA pathway by engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2016, 200: 897-904
- [39] Yang Y, Lin Y, Li L, et al. Regulating malonyl-CoA metabolism via synthetic antisense RNAs for enhanced biosynthesis of natural products. *Metab Eng*, 2015, 29: 217-26
- [40] Wu J, Zhou T, Du G, et al. Modular optimization of heterologous pathways for *de novo* synthesis of (2S)-naringenin in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2017, 9: e101492
- [41] Wu J, Du G, Zhou J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy. *Metab Eng*, 2013, 16: 48-55
- [42] Li M, Kildegaard KR, Chen Y, et al. *De novo* production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2015, 32: 1-11
- [43] Xu P, Marsafari M, Zha J, et al. Microbial coculture for flavonoid synthesis. *Trends Biotechnol*, 2020, 38: 686-8
- [44] Katsuyama Y, Miyahisa I, Funa N, et al. One-pot synthesis of genistein from tyrosine by coincubation of genetically engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 73: 1143-9
- [45] Jones JA, Vernacchio VR, Sinkoe AL, et al. Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids. *Metab Eng*, 2016, 35: 55-63
- [46] Xu P, Ranganathan S, Fowler ZL, et al. Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA. *Metab Eng*, 2011, 13: 578-87
- [47] Jones JA, Vernacchio VR, Sinkoe AL, et al. Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids. *Metab Eng*, 2016: 55-63
- [48] Chemler JA, Lock LT, Koffas MA, et al. Standardized biosynthesis of flavan-3-ols with effects on pancreatic beta-cell insulin secretion. *App Microbiol Biotechnol*, 2007, 77: 797-807
- [49] Ganesan V, Li Z, Wang X, et al. Heterologous biosynthesis of natural product naringenin by co-culture engineering. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2: 236-42
- [50] Jones JA, Vernacchio VR, Collins SM, et al. Complete biosynthesis of anthocyanins using *E. coli* polycultures. *Mbio*, 2017, 8: e00621-17
- [51] Lu Y, Song Y, Zhu J, et al. Potential application of *CHS* and *4CL* genes from grape endophytic fungus in production of naringenin and resveratrol and the improvement of polyphenol profiles and flavour of wine. *Food Chem*, 2021, 347: 128972