DOI:10.12441/spyswjs.20231208001 [文章编号] 1673-1689(2025)04-0032-10

基于代谢工程改造大肠杆菌的人工途径合成冰片研究

吴婷婷[1,2] 高 跃[1,2] 罗正山[1,2] 饶义剑[1,2*]

(1. 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】构建以异戊二烯醇为底物的人工简短异戊烯醇利用途径(isopentenol utilization pathway,IUP),解决传统MEP/MVA途径合成冰片存在的途径长、辅因子需求大等问题,提高冰片生物合成效率。**【方法】**以大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)BL21为底盘细胞,通过设计以异戊二烯醇为底物的两步酶促催化法,构建前体IPP/DMAPP的IUP,接着通过改善冰片二磷酸合酶*Cb*TPS1的可溶性表达水平、筛选不同来源异戊二烯基转移酶改善前体IPP/DMAPP合成GPP的通量、适配性优化冰片合成途径关键酶的表达水平、筛选高活性磷酸酶等策略,同时探索不同金属离子对冰片生物合成的影响。**【结果】**人工简短IUP合成冰片的效率较MEP途径提高了12.70%。通过酶工程和途径优化,冰片产量提升至2 642.8 μg/L。添加Mg^{2+}后,产量进一步提高至5 912.4 μg/L。**【结论】**利用人工简短IUP实现了冰片的生物合成,可为其他萜类化合物的生物合成提供参考。

关键词:冰片;大肠杆菌;代谢工程;异戊烯醇利用途径

Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Borneol Production Using an Artificial Pathway

WU Tingting[1,2] *GAO Yue*[1,2] *LUO Zhengshan*[1,2] *RAO Yijian*[1,2*]

(1. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to construct an artificial concise isopentenol utilization pathway (IUP) with isoprenol as the substrate, thus addressing the limitations (such as excessive pathway length and high cofactor demand) of the conventional MEP/MVA pathways and enhancing the biosynthesis efficiency of borneol. [**Method**] A two-step enzymatic catalysis pathway with isoprenol as the substrate was designed for the synthesis of precursor IPP/DMAPP in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 to synthesize borneol. Subsequently, metabolic engineering strategies were employed to further improve the synthesis of borneol, such as improving the soluble expression level of the bornyl diphosphate synthase *Cb*TPS1, screening different sources of prenyltransferases to enhance the metabolic flux of IPP/DMAPP to GPP, optimizing the expression levels of key enzymes in the borneol biosynthesis pathway, and screening highly active phosphatases. Finally, the effects of different metal ions on the biosynthesis of bornol were explored. [**Result**] The artificial IUP increased the borneol production efficiency by 12.70% compared with the MEP pathway. Through enzyme and pathway engineering, the titer of borneol reached 2 642.8 μg/L. Further supplementation with Mg^{2+} increased the borneol titer to 5 912.4 μg/L. [**Conclusion**] The biosynthesis of borneol was achieved *via* the artificial IUP, which can provide theoretical and methodological references for the biosynthesis of other terpenoids.

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2021YFC2102700);国家自然科学基金面上项目(32270082);国家自然科学基金青年基金项目(22108122)。

通信作者:饶义剑(1981—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事复杂天然产物(药物)的生物合成途径解析与绿色生物制造研究。E-mail:raoyijian@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-12-08 **修回日期:**2024-02-22

Keywords: borneol; *Escherichia coli*; metabolic engineering; isopentenol utilization pathway

冰片是一种双环单萜类天然产物，具有多种物理特性和生理活性，例如抗菌、抗肿瘤、抗炎镇痛、促进其他药物透过血脑屏障、提高其他药物生物利用度、保护心脑组织等，因此被广泛应用于医药、香料和化学领域[1-2]。此外，冰片已经被美国食品药品监督管理局批准作为食品风味添加剂使用[3]。随着对冰片生理与药理机制的研究不断深入，冰片的市场需求日益增长，给冰片的生产带来了极大挑战。

当前，冰片主要从肉桂树的鲜叶中提取，然而由于植物生长速度慢、冰片含量低、种植面积有限，冰片的产量远不能满足市场需求，且价格昂贵，纯度95%~98%的药用天然右旋冰片售价高达3 000~10 000 元/kg[1]。目前，冰片的工业生产主要采用化学合成法，然而，该方法存在反应条件苛刻、获得的产物光学纯度不够理想、许多催化剂含有剧毒成分、反应后不易分离等问题，极大限制了其应用[4]。因此，非常有必要开发绿色且高效的合成方法来生产冰片。随着合成生物学与代谢工程技术的快速发展，设计微生物细胞工厂合成冰片等萜类天然产物被认为是一种高效、可持续、有前景的替代方法。

微生物异源合成冰片的途径主要有2条，即大多数真核生物中存在的MVA途径和原核生物与叶绿体中发现的MEP途径[5-6]。利用这2种途径在大肠杆菌和酿酒酵母中均实现了冰片的异源合成。例如Ma等[7-8]在酿酒酵母中构建基于MVA途径的冰片生物合成途径，通过改善冰片二磷酸合酶表达、优化代谢途径等策略，实现了冰片在酿酒酵母中的合成。Lei等[9]在大肠杆菌中异源构建MVA途径，通过优化代谢途径、单萜合成酶的理性设计与定点突变以及发酵过程优化，实现了冰片在大肠杆菌中的合成。虽然先前研究利用MVA和MEP途径在微生物中实现了冰片的合成，但是前体IPP和DMAPP的足量合成通常被认为是类异戊二烯生物合成的主要瓶颈问题之一[10]。MVA和MEP途径包含超过17个酶促反应步骤和辅因子再生，且受到复杂的调控，这可能会导致IPP和DMAPP获取率低下[10]。Chatzivasileiou等[11]设计了一种人工简短新途径IUP，该途径通过2个连续的磷酸化步骤用异戊烯醇合成关键前体IPP和DMAPP，相较于MVA和MEP途径减少了15步酶促反应，且该途径能避开辅因子再生的瓶颈问题。当前，IUP已被应用于多种萜烯类化合物（如番茄红素[10]、香叶酸[12]、芳樟醇[13]、柠檬烯[14]）的生物合成，并取得了很好的效果。此外，也有文献报道冰片二磷酸合酶的活性提高及菌株代谢途径优化是生物合成冰片的另一个瓶颈问题[9]。

为了克服上述冰片生物合成中的问题，作者在大肠杆菌中引入人工的IUP来提高生物合成冰片的产量。同时改善冰片二磷酸合酶的活性，并结合代谢途径系统优化与发酵过程优化策略协调菌株生长与产物合成，以期达到提高冰片生物合成产量的目的，也为单萜类化合物等天然产物的生物合成提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株、质粒与引物

研究中使用的菌株见表1，质粒见表2，引物见表3。

1.1.2 培养基制备

LB培养基主要用于大肠杆菌细胞培养。LB液体培养基的成分为：5 g/L酵母粉、10 g/L胰蛋白胨、10 g/L氯化钠。LB固体培养基需额外加入20 g/L琼脂粉。2YT培养基主要用于大肠杆菌发酵合成冰片。2YT培养基的成分为：10 g/L酵母粉、16 g/L胰蛋白胨、5 g/L氯化钠。上述培养基均在121 ℃灭菌15 min。

1.1.3 主要试剂

异丙基-*β*-*D*-硫代半乳糖苷（isopropyl-*β*-*D*-thiogalactopyranoside，IPTG）、100 μg/mL氨苄青霉素钠、50 μg/mL硫酸卡那霉素、34 μg/mL氯霉素、34 μg/mL链霉素：生工生物工程（上海）股份有限公司；质粒小量快速提取试剂盒、DNA回收试剂盒：苏州优逸兰迪生物科技有限公司；PCR引物：亦欣生物科技（无锡）有限公司；扩增片段的Phanta

表 1 研究中使用的菌株

Table 1 Strains used in this study

菌株	菌株特征	来源
E. coli BL21（DE3）	Wild-type *E. coli* strain	作者所在实验室保存
E. coli TG1	Wild-type *E. coli* strain	作者所在实验室保存
Bn01	*E. coli* BL21（DE3）harboring pET-21b-1	本研究
TB01	*E. coli* BL21（DE3）harboring pET-21b-2	本研究
TB02	*E. coli* BL21（DE3）harboring pET-21b-3	本研究
Bn02	Bn01 harboring pRSF-1	本研究
Bn03	*E. coli* BL21（DE3）harboring pET-21b-2 and pRSFDuet-a	本研究
Bn04	*E. coli* BL21（DE3）harboring pET-21b-3 and pRSFDuet-a	本研究
Bn05	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-a and pRSFDuet-a	本研究
Bn06	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-b and pRSFDuet-a	本研究
Bn07	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-c and pRSFDuet-a	本研究
Bn08	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-d and pRSFDuet-a	本研究
Bn09	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-e and pRSFDuet-b	本研究
Bn10	*E. coli* BL21（DE3）harboring pACYCDuet-a and pRSFDuet-a	本研究
Bn11	*E. coli* BL21（DE3）harboring pACYCDuet-b and pRSFDuet-b	本研究
Bn12	*E. coli* BL21（DE3）harboring pRSFDuet-a and pCDFDuet-a	本研究
Bn13	*E. coli* BL21（DE3）harboring pCDFDuet-b and pRSFCDuet-b	本研究
Bn14	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-e and pACYCDuet-a	本研究
Bn15	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-b and pACYCDuet-b	本研究
Bn16	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-e and pCDFDuet-a	本研究
Bn17	*E. coli* BL21（DE3）harboring pCDFDuet-b and pETDuet-b	本研究
Bn18	*E. coli* BL21（DE3）harboring pACYCDuet-b and pcdFDuet-a	本研究
Bn19	*E. coli* BL21（DE3）harboring pCDFDuet-b and pACYCDuet-a	本研究
Bn20	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-e and pACYCDuet-c	本研究
Bn21	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-e and pACYCDuet-d	本研究
Bn22	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-e and pACYCDuet-e	本研究
Bn23	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-e and pACYCDuet-f	本研究
Bn24	*E. coli* BL21（DE3）harboring pETDuet-e and pACYCDuet-g	本研究

Flash Master Mix：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；无缝克隆试剂 Multif Seamless Assembly Mix：ABclonal 公司；高纯氮气、高纯空气（纯度≥99.999%）、高纯氢气：无锡鑫锡仪科技有限公司；异丙醇、肉豆蔻酸异丙酯（isopropyl myristate，IPM）：国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建

采用无缝克隆试剂盒构建重组质粒。使用的异戊烯基磷酸激酶（AAN12957.1）、基因 *CbTPS1*（MW196671）由亦欣生物科技（无锡）有限公司进行密码子优化和合成。基因 *IDI*（AAD26812.1）、*IspA*（WP_097750737.1）、*nudJ*（EFE2267343.1）、*nudF*（HAN1889814.1）和 *nudC*（EIG4019151.1）来源于 *E. coli* BL21；基因 *BsnudF*（NP_390242.1）来源于 *Bacillus subtilis* 168（BS168）；胆碱激酶（AAA34499.1）、基因 *GPP2*（CP026299.1）来源于 *S. cerevisiae* BY4742。所有表达载体的 Sanger 测序均由生工生物工程（上海）股份有限公司进行。基因 *IspA* 的 PCR 扩增以大肠杆菌为模板，通过引物对 WTT04/WTT05 扩增，基因 *CbTPS1* 以及载体片段 pETDuet 以对应质粒为模板进行扩增，得到正确的片段后回收 PCR 产物，并用无缝克隆试剂 Multif Seamless Assembly Mix 连接片段与载体获得重组质粒 pETDuet-a。同理，以相同的方法构建表 2 中其他质粒。

表2 研究中使用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

质粒	质粒特征	来源
pET-21b-1	pET-21b derivative with *CbTPS1*	本研究
pRSFDuet-a	pRSFDuet derivative with *CK*、*IPK*、*idi*	本研究
pET-21b-2	pET-21b derivative with 32t-*CbTPS1**	本研究
pET-21b-3	pET-21b derivative with 37t-*CbTPS1*	本研究
pETDuet-a	pETDuet derivative with 32t-*CbTPS1** and *IspA*	本研究
pETDuet-b	pETDuet derivative with 32t-*CbTPS1** *a*nd *IspA*(*S80F*)	本研究
pETDuet-c	pETDuet derivative with 32t-*CbTPS1** and *ERG20*(*F96WN127W*)	本研究
pETDuet-d	pETDuet derivative with 32t-*CbTPS1** and *tNPP*	本研究
pRSFDuet-b	pRSFDuet derivative with 32t-*CbTPS1** and *IspA*(*S80F*)	本研究
pETDuet-e	pETDuet derivative with *CK*、*IPK*、*idi*	本研究
pCDFDuet-a	pCDFDuet derivative with 32t-*CbTPS1** and *IspA*(*S80F*)	本研究
pCDFDuet-b	pCDFDuet derivative with *CK*、*IPK*、*idi*	本研究
pACYCDuet-a	pACYCDuet derivative with 32t-*CbTPS1** and *IspA*(*S80F*)	本研究
pACYCDuet-b	pACYCDuet derivative with *CK*、*IPK*、*idi*	本研究
pACYCDuet-c	pACYCDuet derivative with 32t-*CbTPS1**、*nudJ and IspA*(*S80F*)	本研究
pACYCDuet-d	pACYCDuet derivative with 32t-*CbTPS1**、*nudF* and *IspA*(*S80F*)	本研究
pACYCDuet-e	pACYCDuet derivative with 32t-*CbTPS1**、*nudC* and *IspA*(*S80F*)	本研究
pACYCDuet-f	pACYCDuet derivative with 32t-*CbTPS1**、*BsnudF* and *IspA*(*S80F*)	本研究
pACYCDuet-g	pACYCDuet derivative with 32t-*CbTPS1**、*GPP2* and *IspA*(*S80F*)	本研究

注：“*”表示第32位丝氨酸的密码子突变为TCT。

1.2.2 培养方法

平板划线：将甘油管保存的菌株接种到相应抗性平板上，在37 ℃培养12 h。

种子培养：平板单菌落接种到含有相应抗生素的液体LB培养基中，37 ℃下200 r/min培养10~12 h，至培养液OD_{600}值达到1.6~1.9。

摇瓶培养：取1 mL的种子培养液接种至50 mL含相应抗生素的2YT发酵培养基中，接种后培养3.5 h，加入终浓度0.1 mmol/L的IPTG、30 mmol/L的3-甲基-2-丁烯-1-醇、体积分数10%的IPM，发酵72 h后测定发酵液中冰片产量。

1.2.3 冰片浓度测定

利用气相色谱火焰离子化检测器（GC-FID）检测冰片浓度。流程如下：将发酵液离心，收集上层IPM液封层2 mL，并用无水硫酸钠进行脱水处理，然后进行分析。检测参数如下：采用Rtx-Wax色谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）；柱温250 ℃；进样体积1 μL；气化室温度250 ℃；分流比50；升温程序为以8 ℃/min的速度从70 ℃升高到220 ℃，然后保持恒温10 min。

2 结果与讨论

2.1 IUP的构建与评价

为了实现冰片的生物合成，作者设计了以异戊二烯醇为底物的冰片合成通路，见图1（a）。先前研究表明，在体外试验中*Cb*TPS1的主要产物为（+）-冰片，其在总产物中占比达到88.70%[8]。因此，首先在*E. coli* BL21中表达冰片二磷酸合酶的基因*CbTPS1*，获得能利用本源MEP途径合成冰片的菌株Bn01。在Bn01的基础上进一步引入*S. cerevisiae*来源的胆碱激酶和*Arabidopsis thaliana*来源的异戊烯基磷酸激酶，构建IUP合成通路，获得了以异戊二烯醇为底物合成冰片的菌株Bn02。通过比较菌株Bn01和Bn02的发酵效果来评价IUP合成冰片的潜力，结果如图1所示。通过72 h发酵，菌株Bn02合成冰片的比产量为391.0 μg/L（按OD_{600}值=1标准化），与仅靠内源性MEP途径获取前体IPP/DMAPP的菌株Bn01相比，提高了12.70%，该结果说明IUP途径在冰片生物合成方面具有一定潜力。虽然先前文献已报道IUP可明显改善前体IPP/DMAPP的表达水

表 3　质粒构建引物

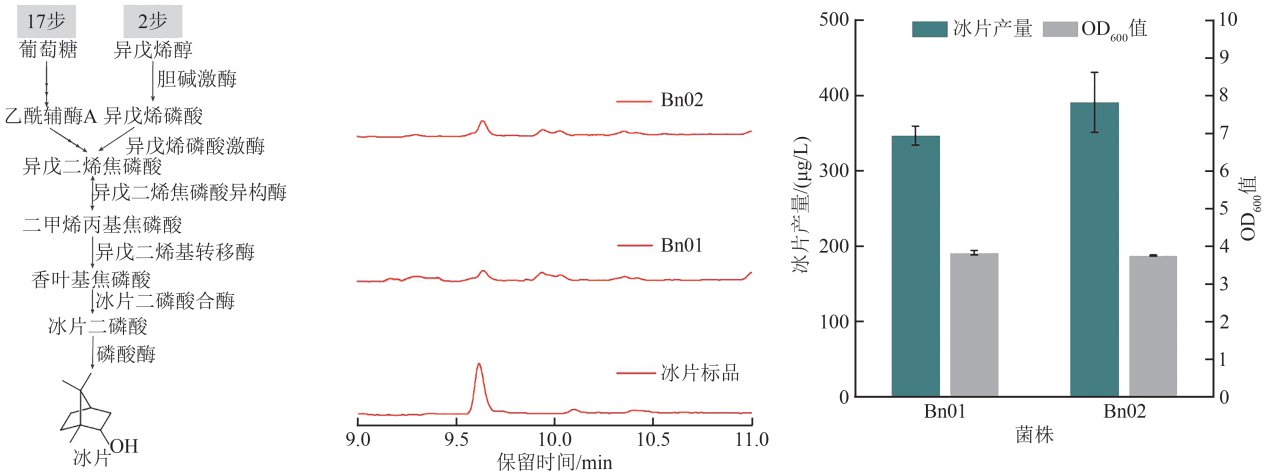
Table 3　Primers for plasmid construction

引物	引物序列（5′—3′）
WTT01	CATGGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTACAGG
WTT02	TGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTATTG
WTT03	CATATGTATATCTCCTTCTTATACTTAACTAATATACTAAGATGGG
WTT04	TAATTAACCTAGGCTGCTGCCACC
WTT05	ACTTTAATAAGGAGATATACCATGGACTTTCCGCAGCAAC
WTT06	TTCTGTTCGACTTAAGCATCATTTATTACGCTGGATGATGTAGTCCG
WTT07	GAAGGAGATATACATATGGCCTTACAGATGACAGTTCCATTTTTAAGTTC
WTT08	AGCAGCCTAGGTTAATTATGCATAGCCACCATCAACGC
WTT09	ATAAGGAGATATACCATGGTACAAGAATCACGTCCAGGGAG
WTT10	ATATCTCCTTCTTAAAGTTcACAAATAACTAGTATCGAGGAACTTGAAAGAGC
WTT11	TAAGAAGGAGATATACATATGCAAACGGAACACGTCATTTTATTGA
WTT12	TTCTGTTCGACTTAAGCATTATTTAAGCTGGGTAAATGCAGATAATCGTTTTCT
WTT13	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGGAGTTGAATATCTCAGAATCTCGCTCACG
WTT14	GGCAGCAGCCTAGGTTAATTATTTCGAGAAGCGAATGATGGTACCTAAC
WTT15	TAAGAAGGAGATATACATATGTGTTCTACAACCACGCCCACC
WTT17	TAAGAAGGAGATATACATATGTCTAAGCACATTAGTTGTTCTACAACCACG
WTT18	ATCATGAATTAAAAAGTAAGCGTGGATACACTCTACGGC
WTT19	GCTTACTTTTTAATTCATGATGATTTACCGGCGATGGAT
WTT20	ATAAGGAGATATACCATGGCTTCAGAAAAAGAAATTAGGAGAGAGAGATTCT
WTT21	TTTCTGTTCGACTTAAGCACTATTTGCTTCTCTTGTAAACTTTGTTCAAGAACG
WTT22	GACCAACCAGTAAGCCTGCAACAACTCAATGCA
WTT23	CAGGCTTACTGGTTGGTCGCCGATGATATGATGGAC
WTT24	TTGCCATCTGGGACGCATTCATGTTAGAGGCTGC
WTT25	ATGCGTCCCAGATGGCAATTTCCCCAACTTCAGG
WTT26	AACTTTAAGAAGGAGATATACATGAGCGCGCGCGG
WTT27	ACTTTCTGTTCGACTTAAGCATTAATAGGTATGGCCGCCAAAGCG
WTT28	ATATCTCCTTCTTAAAGTTCATTTATTACGCTGGATGATGTAGTCCG
WTT29	ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTTAAACCGCACGTTACCGT
WTT30	TTCTGTTCGACTTAAGCATTAGATGACACCCTTTGTAAAAGGCCAG
WTT31	ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCTTAAGCCAGACAACCTGC
WTT32	CTTTCTGTTCGACTTAAGCATTATGCCCACTCATTTTTTAACGCTTG
WTT33	ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGATCGTATAATTGAAAAATTAGATCACGG
WTT34	TTCTGTTCGACTTAAGCATCACTCATACTCTGCCCGACACAT
WTT35	ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGATTGACTACTAAACCTCTATCTTTGAAAG
WTT36	CTTTCTGTTCGACTTAAGCATTACCATTTCAACAGATCGTCCTTAGCATATAAGTA
WTT37	ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATCATTAGAAGAAAAAACAATTGCCAAAGAAC
WTT38	TTCTGTTCGACTTAAGCATCATTTTTGTGCTTGGAGCGCT

平[11]，但是菌株 Bn02 合成冰片的产量相对较低，可能是因为异源表达的冰片二磷酸合酶的量不足或酶活性较低。

2.2　冰片二磷酸合酶 *Cb*TPS1 活性对冰片生物合成的影响

据先前文献报道，冰片二磷酸合酶 *Cb*TPS1 是冰片生物合成的限速酶，植物来源的萜烯合成酶在 N 端存在转运肽，蛋白质定位到叶绿体后被水解，形成有活性的酶分子。由于大肠杆菌中缺乏植物信号肽加工系统，许多植物来源的酶异源表达时易出现蛋白质错误折叠、形成包涵体及催化活性降低等问题[8,15]。SDS-PAGE 分析发现（见图 2），



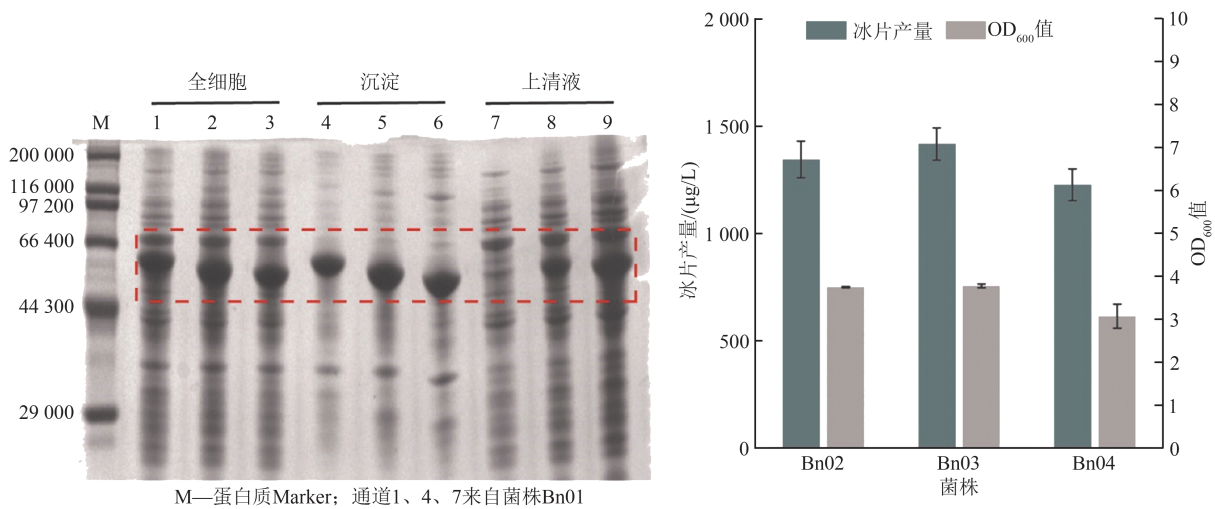
(a) 冰片的生物合成途径　(b) 菌株Bn01、Bn02和冰片标准品的GC-FID分析　(c) IUP对冰片合成的影响

图 1　设计 IUP 改善冰片的合成

Fig. 1　Design of the IUP to improve the synthesis of borneol

未截短 *Cb*TPS1 在 Bn01 菌株中呈现明显的可溶性表达缺陷，大多数蛋白质以包涵体形式存在，鉴于菌株 Bn02 采用相同的未截短 *Cb*TPS1，这种蛋白质可溶性差的特性很可能是制约冰片生物合成效率的主要原因。为了提高冰片二磷酸合酶 *Cb*TPS1 的活性，分别对冰片二磷酸合酶 *Cb*TPS1 进行 N 端 32 位与 37 位氨基酸截短表达[8]，获得菌株 TB01 和 TB02。采用 SDS-PAGE 分析菌株 TB01 和 TB02 表达 *Cb*TPS1 的情况，发现对 *Cb*TPS1 进行 N 端 32 位和 37 位截短后，*Cb*TPS1 的可溶性明显升高，说明 N 端转运肽会影响 *Cb*TPS1 的可溶性表达。

接着，为了确定氨基酸截短表达是否能够改善冰片合成效率，用截短后的 *Cb*TPS1 替换菌株 Bn02 中的 *Cb*TPS1，分别获得工程菌株 Bn03 和 Bn04。对工程菌株 Bn03、Bn04 及对照菌株 Bn02 的发酵情况进行对比，结果如图 2（b）所示。发酵 72 h 后，Bn03 合成冰片的产量达到 1 408.7 μg/L，较 Bn02 提升了 4.58%。而 Bn04 合成冰片的产量较 Bn02 没有明显改善，虽然 *Cb*TPS1 在 Bn04 中的表达水平有所提高，但可能因为截短表达使其活性受到影响，导致冰片产量有所下降。



M—蛋白质Marker；通道1、4、7来自菌株Bn01（表达未截短的*Cb*TPS1）；通道2、5、8来自菌株TB01（表达N端32位截短的*Cb*TPS1）；通道3、6、9来自菌株TB02（表达N端37位截短的*Cb*TPS1）。

(a) 不同截短方式表达的*Cb*TPS1的SDS-PAGE分析　(b) 不同截短方式表达的*Cb*TPS1对菌株合成冰片的影响

图 2　不同截短方式表达的 *Cb*TPS1 对冰片合成的影响

Fig. 2　Effects of *Cb*TPS1 expressed with different truncation strategies on synthesis of borneol

2.3 前体GPP合成通量的优化

为了提高菌株Bn03中IUP来源的IPP/DMAPP转化为GPP的合成通量，作者筛选了几种已经被报道的异戊二烯基转移酶及其突变体，如IspA（大肠杆菌来源）及其突变体IspA（S80F）、ERG20（F96W-N127W，酿酒酵母来源）、tNPP（番茄来源），研究这些酶对冰片生物合成的影响。将*IspA*、*IspA*（*S80F*）、*ERG20*（*F96W-N127W*）、*tNPP*基因分别构建在pETDuet-32t-*Cb*TPS1质粒上，获得相应的表达质粒（见表2）。将这些质粒分别替换菌株Bn03中的pETDuet-32t-*Cb*TPS1质粒，获得菌株Bn05、Bn06、Bn07、Bn08。上述工程菌株与对照菌株Bn03的发酵情况见图3，其中仅过表达大肠杆菌内源IspA（S80F）的菌株Bn06的冰片产量得到提升，达到1 441.9 μg/L，较Bn03提高了2.35%。而表达其他来源的异戊二烯基转移酶的菌株中，冰片产量有所降低，可能是由于合成的GPP流向了其他代谢通路，例如合成FPP，进而合成麦角固醇等[16]。

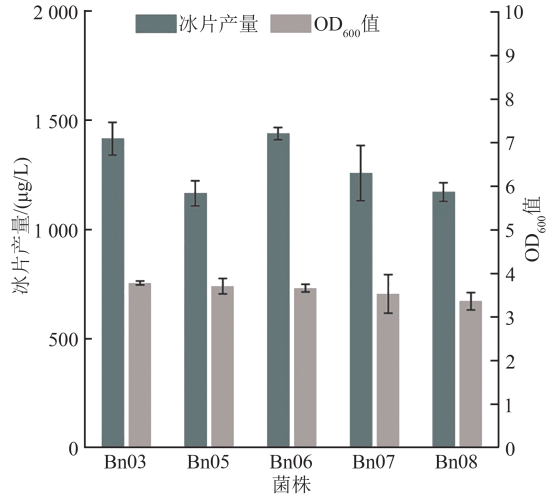
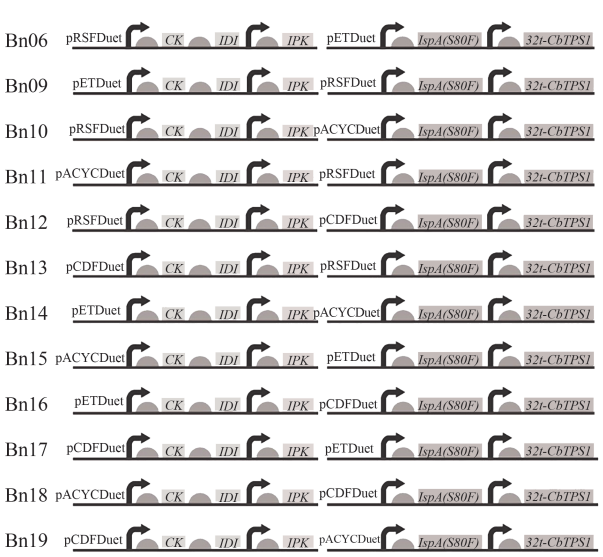


图3 不同来源异戊二烯基转移酶对冰片生物合成的影响

Fig. 3 Effects of prenyltransferases from different sources on the synthesis of borneol

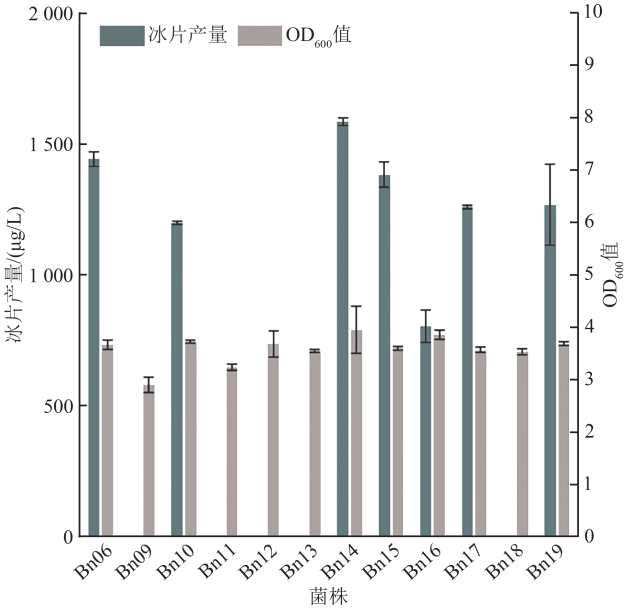
2.4 冰片合成途径关键基因的表达水平优化

合成途径关键基因表达水平的适配性优化对提升产物合成效率至关重要[17]。例如，通过将DXP合酶基因的表达载体从高拷贝数质粒转换到低拷贝数质粒，番茄红素的产量提高了2~3倍[18]。为进一步提高冰片的合成效率，利用不同拷贝数的表达质粒pETDuet-1、pRSFDuet、pCDFDuet、pACYCDuet对菌株Bn06中冰片合成途径关键基因*CK*、*IPK*、*IDI*、*IspA*（*S80F*）、*32t-CbTPS1*进行不同组合表达，获得12株工程菌株，见图4。对这些工程菌株进行摇瓶发酵，发现菌株Bn14合成冰片的产量达到1 584.9 μg/L，较Bn06提高了9.91%。



半圆—核糖体结合位点；箭头—T7启动子。

(a) 工程菌株的构建



(b) 菌株的冰片产量

图4 冰片合成途径关键基因表达水平的优化对冰片产量的影响

Fig. 4 Effects of optimization of the expression levels of key genes in the borneol synthesis pathway on borneol titer

但是，发酵结果也显示这些关键基因的其他组合表达方式导致冰片产量有所下降。进一步说明合成途径关键基因表达水平的适配性优化对提升菌株合成冰片的产量十分重要。

2.5　不同磷酸酶过表达对冰片生物合成的影响

冰片生物合成途径的最后一步是冰片二磷酸在磷酸酶的作用下脱磷酸生成冰片。尽管大肠杆菌中存在许多未知的内源性磷酸酶可以对冰片二磷酸进行去磷酸化，但是效率相对较低。为了进一步提高冰片的产量，作者选择大肠杆菌内源性Nudix家族磷酸酶nudF、nudC、nudJ，以及酿酒酵母来源的GPP2和枯草芽孢杆菌来源的*Bs*nudF，探索不同来源的磷酸酶对冰片产量的影响。将基因*nudJ*、*nudF*、*nudC*、*BsnudF*和*GPP2*分别在菌株Bn14中过表达，获得了菌株Bn20、Bn21、Bn22、Bn23、Bn24。对上述工程菌株和对照菌株Bn14进行摇瓶发酵，结果见图5。相较于对照菌株Bn14，过量表达nudJ磷酸酶的菌株Bn20合成冰片的产量明显提升，达到2 642.8 μg/L，提高了66.70%。已有研究表明，过表达磷酸酶可提高萜类化合物的合成效率。例如，过表达酿酒酵母来源的GPP2磷酸酶可以有效水解前体GPP，提高单萜类化合物α-蒎烯的产量[19]。*Bs*nudF磷酸酶具有水解DMAPP和IPP磷酸基团的活性[19-21]，同时Nudix家族磷酸酶也能够有效水解异戊烯焦磷酸前体，生成萜醇[9,20-23]。

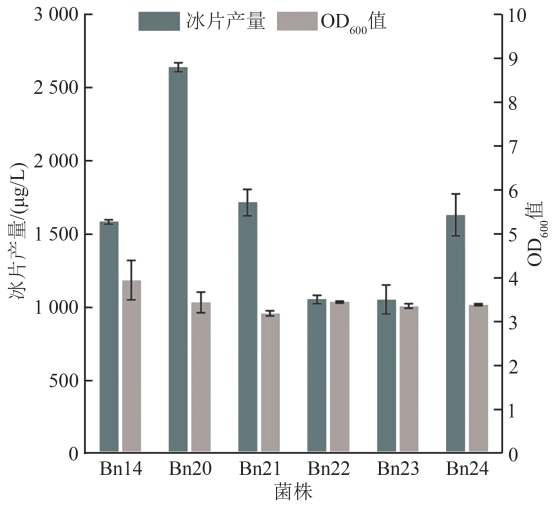


图5　不同磷酸酶过表达对冰片生物合成的影响

Fig. 5　Effects of overexpression of different phosphatases on the synthesis of borneol

2.6　金属离子对菌株合成冰片的影响

金属离子对菌体生长代谢具有显著影响[24]。例如金属离子对酶活性影响很大，有的金属离子是酶活性中心的组成部分，有的金属离子作为酶的辅基或激活剂参与酶反应。作者探索了不同金属离子对冰片生物合成的影响，选择在培养基中分别加入质量浓度为0.3 g/L的金属离子K^+、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}，结果见图6。添加Mg^{2+}提高了冰片的产量，达到5 912.4 μg/L，相较于未添加Mg^{2+}的培养基提高了123.70%。这可能与Mg^{2+}影响单萜合成酶的活性有关。研究表明，在培养基中添加Mg^{2+}可以提高解脂耶氏酵母合成柠檬烯的产量[25]以及酿酒酵母合成芳樟醇的产量[13]。

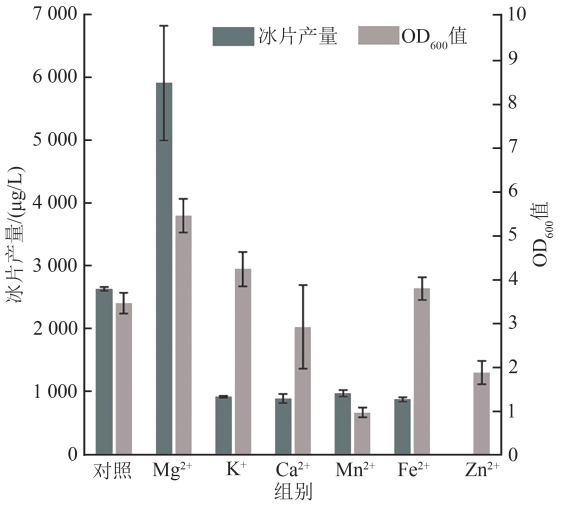


图6　不同金属离子对冰片生物合成的影响

Fig. 6　Effects of different metal ions on the synthesis of borneol

3　结论

以大肠杆菌*E. coli* BL21为底盘菌株，通过设计以异戊二烯醇为底物的两步酶促催化法，由外源引入的激酶和磷酸激酶将异戊二烯醇转化为IPP/DMAPP；随后表达冰片二磷酸合酶*Cb*TPS1，催化GPP环化生成冰片，构建了利用人工途径IUP合成冰片的通路，发现IUP在冰片生物合成方面具有一定潜力。此外，通过改善冰片二磷酸合酶*Cb*TPS1的可溶性表达水平、优化前体GPP合成效率、优化冰片合成途径关键基因的适配性表达、筛选不同来源磷酸化酶以及探索金属离子对菌株生

长与产物合成的影响等方式，使菌株以异戊二烯醇为底物时，合成冰片的产量达到5 912.4 μg/L，较仅在MEP途径基础上表达二磷酸合酶*Cb*TPS1的初始菌株提高了3.45倍。该研究利用人工IUP实现了冰片的生物合成，为单萜类化合物的生物合成奠定一定的理论与技术基础。

虽然作者对大肠杆菌进行代谢工程改造以及发酵过程优化，实现了基于人工IUP的冰片生物合成，但是现阶段冰片的产量与转化率依然与已报道的文献和理论值存在差距，导致该结果的原因可能有4条：1）关键酶*Cb*TPS1的活性不足。本研究中仅通过截短N端信号肽改善了*Cb*TPS1的可溶性表达水平，但对其活性改善不足，后续研究需要对*Cb*TPS1进行酶分子理性设计或者筛选高活性的同工酶。2）缺乏对冰片合成竞争代谢通路的优化。先前大量文献表明前体GPP可以被内源性IspA转化为FPP，进而合成麦角固醇等物质，导致IUP来源的前体IPP没法高效合成冰片，因此后续研究需要对冰片生物合成竞争代谢途径关键基因进行表达水平调控。3）发酵过程不同。已有研究对工程菌株的发酵过程进行了系统优化，并采用补料分批发酵策略，后续为了改善冰片合成，需要对本研究中获得的工程菌Bn20的发酵过程进行系统优化。4）冰片生物合成的潜在关键靶点尚不清楚。后续研究可以通过组学技术对冰片生产菌株进行分析，挖掘出新的改造靶点，提升菌株的整体生产性能。

参考文献

[1] 马青，马蕊，靳保龙，等. 天然冰片资源研究进展[J]. 中国中药杂志，2021，46(1)：57-61.
MA Q，MA R，JIN B L，et al. Research progress of natural borneol resources[J]. China Journal of Chinese Materia Medica，2021，46(1)：57-61.(in Chinese)

[2] MEI Y Q，LI L N，FAN L H，et al. The history，stereochemistry，ethnopharmacology and quality assessment of borneol[J]. Journal of Ethnopharmacology，2023，300：115697.

[3] WANG S，ZHANG D，HU J S，et al. A clinical and mechanistic study of topical borneol-induced analgesia[J]. EMBO Molecular Medicine，2017，9(6)：802-815.

[4] YANG M Y，KHINE A A，LIU J W，et al. Resolution of isoborneol and its isomers by GC/MS to identify “synthetic” and “semi-synthetic” borneol products[J]. Chirality，2018，30(11)：1233-1239.

[5] LI M J，HOU F F，WU T，et al. Recent advances of metabolic engineering strategies in natural isoprenoid production using cell factories[J]. Natural Product Reports，2020，37(1)：80-99.

[6] NAGEGOWDA D A，GUPTA P. Advances in biosynthesis，regulation，and metabolic engineering of plant specialized terpenoids[J]. Plant Science，2020，294：110457.

[7] MA R，SU P，MA Q，et al. Identification of (−)-bornyl diphosphate synthase from *Blumea balsamifera* and its application for (−)-borneol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology，2021，7(1)：490-497.

[8] MA R，SU P，GUO J，et al. Bornyl diphosphate synthase from *Cinnamomum burmanni* and its application for (+)-borneol biosynthesis in yeast[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology，2021，9：631863.

[9] LEI D W，QIU Z T，WU J H，et al. Combining metabolic and monoterpene synthase engineering for *de novo* production of monoterpene alcohols in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology，2021，10(6)：1531-1544.

[10] LUO Z S，LIU N，LAZAR Z，et al. Enhancing isoprenoid synthesis in *Yarrowia lipolytica* by expressing the isopentenol utilization pathway and modulating intracellular hydrophobicity[J]. Metabolic Engineering，2020，61：344-351.

[11] CHATZIVASILEIOU A O，WARD V，EDGAR S M，et al. Two-step pathway for isoprenoid synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2019，116(2)：506-511.

[12] PAN Q C，MA X Q，LIANG H，et al. Biosynthesis of geranate *via* isopentenol utilization pathway in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering，2023，120(1)：230-238.

[13] ZHANG Y Y，CAO X S，WANG J，et al. Enhancement of linalool production in *Saccharomyces cerevisiae* by utilizing isopentenol utilization pathway[J]. Microbial Cell Factories，2022，21(1)：212.

[14] ZHAO M L，CAI W S，ZHENG S Q，et al. Metabolic engineering of the isopentenol utilization pathway enhanced the production of terpenoids in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Marine Drugs，2022，20(9)：577.

[15] 何冰芳，米兰，陈文华. 大肠杆菌蛋白质分泌机理及其

重组蛋白分泌表达新进展[J]. 食品与生物技术学报，2012，31(6)：561-569.
HE B F，MI L，CHEN W H. Research advances in mechanisms of protein secretion and secretory expression of recombinant protein in *E. coli*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2012，31(6)：561-569.(in Chinese)

[16] MENDEZ-PEREZ D，ALONSO-GUTIERREZ J，HU Q J，et al. Production of jet fuel precursor monoterpenoids from engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering，2017，114(8)：1703-1712.

[17] 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 J J，YU S Q，ZHOU J W. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving tyrosol production[J]. Food and Fermentation Industries，2021，47(22)：8-15.(in Chinese)

[18] JONES K L，KIM S W，KEASLING J D. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria[J]. Metabolic Engineering，2000，2(4)：328-338.

[19] MA T F，ZONG H，LU X Y，et al. *Candida glycerinogenes*-promoted *α*-pinene and squalene co-production strategy based on *α*-pinene stress[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2023，71(13)：5250-5260.

[20] ZHENG Y N，LIU Q，LI L L，et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-specificity production of isoprenol and prenol as next generation of biofuels[J]. Biotechnology for Biofuels，2013，6：57.

[21] GEORGE K W，THOMPSON M G，KANG A，et al. Metabolic engineering for the high-yield production of isoprenoid-based C_5 alcohols in *E. coli*[J]. Scientific Reports，2015，5：11128.

[22] ZADA B，WANG C L，PARK J B，et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed isoprenoid alcohols and their derivatives[J]. Biotechnology for Biofuels，2018，11：210.

[23] CHOU H H，KEASLING J D. Synthetic pathway for production of five-carbon alcohols from isopentenyl diphosphate[J]. Applied and Environmental Microbiology，2012，78(22)：7849-7855.

[24] 纪凯，刘杰，秦苏东，等. 金属离子促进 *Gluconobacter oxydans* 高效合成2-酮基-*L*-古龙酸[J]. 食品与生物技术学报，2010，29(1)：139-144.
JI K，LIU J，QIN S D，et al. Enhancement of 2-keto-*L*-gulonic production in *Gluconobacter oxydans* through feeding metalions[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2010，29(1)：139-144.(in Chinese)

[25] PANG Y R，ZHAO Y K，LI S L，et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil[J]. Biotechnology for Biofuels，2019，12：241.

（责任编辑：史润东东）