DOI:10.12441/spyswjs.20250312001 [文章编号] 1673-1689(2025)12-0018-12

大肠杆菌中酪醇高效生物合成体系的构建与优化

熊艺哲[1,2] 王守钢[1,2] 饶志明[1,2] 徐美娟[1,2*]

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2.江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】在大肠杆菌中构建高效的生物合成系统,实现酪胺及其关键衍生物酪醇的高效生产。**【方法】**通过分析蛋白质表达、酶学性质和全细胞催化结果,确定源自粪肠球菌的酪氨酸脱羧酶(TDC)作为合成酪胺的关键酶,并以酪胺氧化酶(TYO)来构建合成酪醇的TDC-TYO合成途径。同时,构建LAAD-PDC酪醇合成途径,建立了双酶共表达系统,对比双酶串联顺序、生产途径和关键酶来源对酪醇产量的影响。通过全细胞催化得到携带质粒pET28a-*Ef*TDC-TYO的高产酪醇的重组菌株B1,并对反应条件进行优化。**【结果】**在最佳反应参数下,24 h内重组菌株B1酪醇产量达3.96 g/L,底物转化率为51.9%。**【结论】**为生物法合成酪醇及其衍生物提供了参考。

关键词:酪醇;酪胺;酪氨酸脱羧酶;全细胞催化;大肠杆菌

Construction and Optimization of an Efficient Tyrosol Biosynthesis System in *Escherichia coli*

XIONG Yizhe[1,2] *WANG Shougang*[1,2] *RAO Zhiming*[1,2] *XU Meijuan*[1,2*]

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

Abstract: [**Objective**] An efficient biosynthetic system was constructed in *Escherichia coli* to achieve high-yield production of tyramine and its key derivative tyrosol. [**Method**] Through the analysis of protein expression, enzymatic properties, and whole-cell catalysis results, tyrosine decarboxylase (TDC) derived from *Enterococcus faecalis* was selected as the key enzyme for tyramine synthesis. Subsequently, tyramine oxidase (TYO) was introduced to construct the TDC-TYO pathway for tyrosol production. Meanwhile, the LAAD-PDC pathway for tyrosol synthesis was established. A dual-enzyme co-expression system was established, and the effects of tandem enzyme order, production pathways, and key enzyme sources on tyrosol yield were analyzed. The recombinant strain B1, carrying the plasmid pET28a-*Ef*TDC-TYO, was obtained through whole-cell catalysis, and the reaction conditions were optimized. [**Result**] Under optimal reaction parameters, the recombinant strain B1 achieved a tyrosol yield of 3.96 g/L within 24 h, with a substrate conversion rate of 51.9%. [**Conclusion**] This study provides valuable insights for the biosynthesis of tyrosol and its derivatives.

Keywords: tyrosol; tyramine; tyrosine decarboxylase; whole-cell catalysis; *Escherichia coli*

酪醇是一种苯乙醇类化合物,具有显著的药理活性,在食品、化妆品及医药等多个领域有重要的应用价值[1]。酪醇的天然获取途径主要包括橄榄油、绿茶以及红景天等一系列植物资源[2]。在

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2023YFD1300700);国家自然科学基金面上项目(32270036);中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP221012,JUSRP622022)。

通信作者:徐美娟(1982—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物发酵菌种的系统代谢工程选育、合成生物学及关键酶改造方面的研究。E-mail:xumeijuan@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2025-03-12 **修回日期:**2025-04-30

食品工业中，酪醇作为功能性添加剂，不仅能提升食品风味，还能有效延长食品的保质期[3]。在化妆品领域，酪醇有良好的抗氧化和抗炎性能，能够有效清除自由基，进而保护皮肤组织[4]。酪醇及其衍生物在医药领域表现出多种生物活性，如抗癌、抗炎和保护神经系统等[5-6]，具有巨大的开发与应用潜力。酪胺作为一种在植物与动物中普遍存在的化合物，能够被多种单胺氧化酶代谢，是合成酪醇的关键前体[7]。

目前酪醇的工业化制备主要有3种途径：从植物中提取、通过化学方法制备以及利用微生物进行生物合成[8]。其中，植物提取法由于原料来源受限，面临着提取过程烦琐、产物收率不理想以及生产成本较高等挑战。化学合成法虽然可实现较高产量，但面临原料价格昂贵、催化剂制备复杂、反应条件严苛以及环境污染严重等挑战。相比之下，微生物合成法通过利用大肠杆菌（*Escherichia coli*）[9]或酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）[10]等底盘细胞进行生产，具有环境友好和原料可再生等优势，但其生产效率仍有待提升，达不到工业化生产的要求。在酪醇生物合成机制研究领域，Hazelwood等[11]揭示了酿酒酵母中酪醇的生物合成途径：首先，在芳香族氨基酸氨基转移酶（ARO8）的作用下，酪氨酸经历脱氨基过程，转化为4-羟基苯丙酮酸（4HPP）；之后，4HPP在脱羧酶的作用下转化为4-羟基苯乙醛（4HPAA）；最终，4HPAA经历还原反应，生成最终产物酪醇。Satoh等[12]采用TDC-TYO途径在大肠杆菌JW1380中提高酪醇产量至2.42 g/L。Xia等[13]利用计算机辅助设计筛选出最优ARO10突变体，酪醇产量达到了2.04 g/L。Chung等[14]异源表达芳香醛合酶（AAS），发酵36 h后得531 mg/L酪醇。Liu等[15]通过构建*L*-氨基酸转氨酶（LAAD）全细胞催化体系，在大肠杆菌中酪醇产量达到9.56 mmol/L。Ruan等[16]基于Ehrlich途径开发四酶级联系统，及时分离缓解酪醇产物对酶活力的抑制。在3 L生物反应器中酪醇产量达35.7 g/L，转化率达93.6%，这是目前生物法合成酪醇所能达到的最高产量。

传统酪醇合成领域的研究多集中于单一酶催化途径的精细优化或特定菌株的定向改造，而对全细胞催化体系下不同合成途径的比较研究较少。作者尝试构建高效的大肠杆菌细胞工厂用于酪胺[17]与酪醇的生物合成。通过筛选获得粪肠球菌来源的酪氨酸脱羧酶（TDC），将其与酪胺氧化酶（TYO）组合，构建TDC-TYO级联催化途径以实现酪醇的生产。同时，构建含芳香族氨基酸氨基转移酶（LAAD）[18]和丙酮酸脱羧酶（PDC）[19]的双酶共表达系统，即LAAD-PDC酪醇合成途径，优化酶的表达顺序，筛选获得高产酪醇的重组菌株B1。在此基础上，系统优化关键反应参数，采用分批补加底物酪氨酸的形式来缓解底物抑制并提高转化率，为实现酪醇的高效生物合成提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

所需菌株及质粒的详细信息见表1。*E. coli* BL21（DE3）、质粒pET28a：作者所在实验室保藏；从实验室保存的短乳杆菌（*Lactobacillus brevis*）和粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）中扩增出酪氨酸脱羧酶基因，分别命名为*LbTDC*（GenBank登录号：EU195891.1）和*EfTDC*（GenBank登录号：AF354231.1）；从实验室前期构建的重组质粒pET28a-*Pv*LAAD中获取了普通变形杆菌（*Proteus vulgaris*）来源的*PvLAAD*基因，该质粒已在前期研究中得到验证；奇异变形杆菌（*Proteus mirabilis*）来源的*PmLAAD*基因（GenBank登录号：MT682885.1）、藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）来源的*MlTYO*基因（GenBank登录号：AB010716.1）、热带假丝酵母（*Candida tropicalis*）来源的*CtPDC*基因（GenBank登录号：XM_002549483.1）：苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.2 酶和试剂

同源重组克隆试剂盒（ClonExpress II One Step Cloning Kit）、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒以及DNA聚合酶（2×Phanta Max Master Mix，Dye Plus）：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；质粒提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司；*L*-酪氨酸：生工生物工程（上海）股份有限公司；酪醇标准品、酪胺标准品：上海源叶生物科技有限公司；其他试剂：国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器与设备

电子天平：BSA4202S-CW型，苏州赛恩斯仪器有限公司；紫外-可见分光光度计：UV-1000

型，翱艺仪器（上海）有限公司；pH 计：S400-K 型，瑞士 Mettler-Toledo 有限公司；核酸电泳仪：WIX-liteDNA 型，韦克斯科技（北京）有限公司；PCR 仪：Mastercycler nexus X2 型，德国 Eppendorf 公司；超声细胞破碎仪：SCIENTZ-IID 型，宁波新芝生物科技有限公司；酶标仪：SynergyNEO2 型，美国伯腾仪器有限公司；恒温培养箱：BPX-272 型，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司；离心机：Sigma 1-14K 型，美国 Sigma 公司；超净工作台：SW-CJ-2FB 型，苏州净化设备有限公司；高效液相色谱仪：1260 Infinity 型，美国安捷伦科技有限公司。

表 1　菌株和质粒

Table 1　Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	特性	来源
Escherichia coli BL21（DE3）	表达宿主	作者所在实验室保藏
BL21/pET28a	菌株中含 pET28a 质粒	本研究
BL21/pET28a-*Ef*TDC	菌株中含 pET28a-*Ef*TDC 质粒	本研究
BL21/pET28a-*Lb*TDC	菌株中含 pET28a-*Lb*TDC 质粒	本研究
BL21/pET28a-*Ml*TYO	菌株中含 pET28a-*Ml*TYO 质粒	本研究
BL21/pET28a-*Pv*LAAD	菌株中含 pET28a-*Pv*LAAD 质粒	本研究
BL21/pET28a-*Pm*LAAD	菌株中含 pET28a-*Pm*LAAD 质粒	本研究
BL21/pET28a-*Ct*PDC	菌株中含 pET28a-*Ct*PDC 质粒	本研究
A1	菌株中含 pET28a-*Lb*TDC 质粒	本研究
A2	菌株中含 pET28a-*Ef*TDC 质粒	本研究
B1	菌株中含 pET28a-*Ef*TDC-*Ml*TYO 质粒	本研究
B2	菌株中含 pET28a-*Ml*TYO-*Ef*TDC 质粒	本研究
B3	菌株中含 pET28a-*Pv*LAAD-PDC 质粒	本研究
B4	菌株中含 pET28a-*Pm*LAAD-PDC 质粒	本研究
B5	菌株中含 pET28a-PDC-*Pv*LAAD 质粒	本研究
B6	菌株中含 pET28a-PDC-*Pm*LAAD 质粒	本研究
pET28a	卡那霉素抗性，表达载体	本研究
pET28a-TDC	含 TDC 的重组表达载体	本研究
pET28a-TYO	含 TYO 的重组表达载体	本研究
pET28a-LAAD	含 LAAD 的重组表达载体	本研究
pET28a-PDC	含 PDC 的重组表达载体	本研究
pET28a-TDC-TYO	含 TDC 和 TYO 的重组表达载体	本研究
pET28a-TYO-TDC	含 TYO 和 TDC 的重组表达载体	本研究
pET28a-PDC-LAAD	含 PDC 和 LAAD 的重组表达载体	本研究
pET28a-LAAD-PDC	含 LAAD 和 PDC 的重组表达载体	本研究

1.2　方法

1.2.1　重组菌株的构建

采用 *E. coli* BL21（DE3）作为表达宿主，用于转化重组质粒 pET28a-*Lb*TDC、pET28a-*Ef*TDC、pET28a-*Ef*TDC-TYO、pET28a-TYO-*Ef*TDC、pET28a-*Pv*LAAD-*Ct*PDC、pET28a-*Ct*PDC-*Pv*LAAD、pET28a-*Pm*LAAD-*Ct*PDC 和 pET28a-*Ct*PDC-*Pm*LAAD。将质粒导入 *E. coli* 感受态细胞，转化后的细胞涂布于相应抗生素筛选平板，37 ℃培养 12 h，筛选形态正常的单菌落。运用菌落 PCR 技术筛选阳性转化子，将筛选出的候选菌株样本送至苏州金唯智生物科技有限公司进行质粒测序。通过序列比对分析，测序结果正确的转化子即为成功构建的重组工程菌株。

1.2.2　酶的表达与纯化

将验证正确的重组菌株接种于含抗生素的平板上进行活化处理，随后转接至含 10 mL 抗生素的液体培养基中振荡培养 12 h。以体积分数 1% 将菌液转接入 50 mL 新鲜的液体培养基中。当培养液的 OD_{600} 值在 0.6~0.8 时加入 IPTG，使其终浓度为

0.5 mmol/L，然后在25 ℃、180 r/min的条件下诱导表达12 h。培养结束后，于4 ℃、8 000 r/min离心5 min，收集菌体，弃去上清液，用缓冲液洗涤菌体2次，在冰浴条件下用超声破碎仪对细胞进行裂解处理。将裂解后的液体于4 ℃、12 000 r/min离心20 min，收集上清液，即为粗酶液。首先用0.22 μm的滤膜对粗酶液进行过滤，然后采用镍柱亲和层析技术对粗酶液进行蛋白质纯化操作。分别取粗酶液和纯化样品，采用SDS-PAGE分析蛋白质的纯度和表达情况，并用Bradford法测定蛋白质质量浓度[20]。

1.2.3 酪氨酸脱羧酶的酶活力测定

TDC酶活力测定体系（1 mL）：反应体系包含10 μL酶液、20 μL PLP（4 mmol/L）以及970 μL 2 mmol/L的*L*-酪氨酸（溶于0.20 mol/L、pH 5.0的NaAc缓冲液，50 ℃预热）。将反应体系在50 ℃的水浴中孵育10 min发生酶促反应，随后将反应体系转移至沸水浴中加热5 min以终止反应。12 000 r/min离心10 min，用滤膜对离心后的上清液过滤来净化样品。用高效液相色谱（HPLC）技术对处理后的样品进行分析，通过检测底物和产物的含量变化，来计算酪氨酸脱羧酶的酶活力。酪氨酸脱羧酶的酶活力为：在50 ℃的条件下，每分钟能够催化生成1 μmol酪胺所需的酶量，记作1 U[21]。

1.2.4 酪氨酸脱羧酶的酶学性质测定

1）最适反应温度测定：在pH 7.0条件下，将反应体系置于20~60 ℃反应10 min，按照1.2.3方法测定酶活力。最高酶活力设定为100%，计算各温度下的相对酶活力，确定酪氨酸脱羧酶的最适反应温度。

2）最适反应pH测定：将反应体系置于pH 5.0~10.0的不同缓冲液中，在50 ℃下反应10 min，在不同pH下测定酪氨酸脱羧酶的相对酶活力。

3）温度稳定性测定：将适量纯酶液分别于恒定温度的水浴孵育12 h，每隔一定时间取样，定期测定残余酶活力，以初始酶活力为100%计算相对酶活力，评估酪氨酸脱羧酶的温度稳定性。

4）pH稳定性测定：将适量纯酶液添加到一定pH的缓冲体系中，并在50 ℃进行12 h的孵育。在试验过程中，按照预设的时间点取样，并检测各孵育时段后的酶活力。将初始酶活力设为100%，据此计算各时间点的相对酶活力，从而系统评估酪氨酸脱羧酶的pH稳定性。

1.2.5 全细胞催化及条件优化

采用平板划线法对重组菌株进行活化处理，从活化后的平板上挑选单菌落，并将其接种于10 mL的液体培养基，随后将其置于37 ℃、200 r/min的摇床振荡培养16 h。以体积分数1%将培养物转接至250 mL的新鲜液体培养基中进行扩大培养。当培养液的OD_{600}值达到0.6~0.8时，加入IPTG，使其终浓度达到0.5 mmol/L，于25 ℃、180 r/min的条件下培养12 h，诱导目标蛋白质的表达。培养结束后，将菌液在4 ℃、8 000 r/min条件下离心10 min以收集菌体。用缓冲液对收集到的菌体洗涤2次，并重新悬浮，最终制得适用于全细胞催化反应的菌悬液。为优化催化条件，采用单因素试验法考察关键参数，包括菌体生物量（OD_{600}值）、反应温度、反应pH和底物浓度。在反应进程中，定期采集反应液样品，经0.22 μm孔径滤膜进行过滤处理，之后用高效液相色谱定量分析酪醇质量浓度。

1.2.6 检测方法

采用分光光度计于600 nm波长处测定菌体生物量（OD_{600}值）。采用反相Diamonsil C18色谱柱（150 mm×4.6 mm×5 μm），通过高效液相色谱（HPLC）测定产量[22]，检测器为DAD紫外检测器。色谱分离条件如下：流动相中*V*（甲醇）∶*V*（水）∶*V*（三氟乙酸）为10∶90∶0.10，流量0.8 mL/min，柱温30 ℃，检测波长278 nm。分别配制系列质量浓度的酪醇和酪胺标准品溶液，绘制标准曲线，线性相关系数（R^2）大于0.999。

1.2.7 数据分析

全细胞催化试验中的底物转化率和产物产量通过高效液相色谱（HPLC）进行定量分析，由设置的梯度质量浓度标准品绘制出的标准曲线来计算样品的具体数值。蛋白质表达水平通过SDS-PAGE条带进行灰度分析，以相对表达量表示。使用Origin软件进行图表绘制，确保数据可视化清晰直观，统计分析结果均经过正态性检验和方差齐性检验。

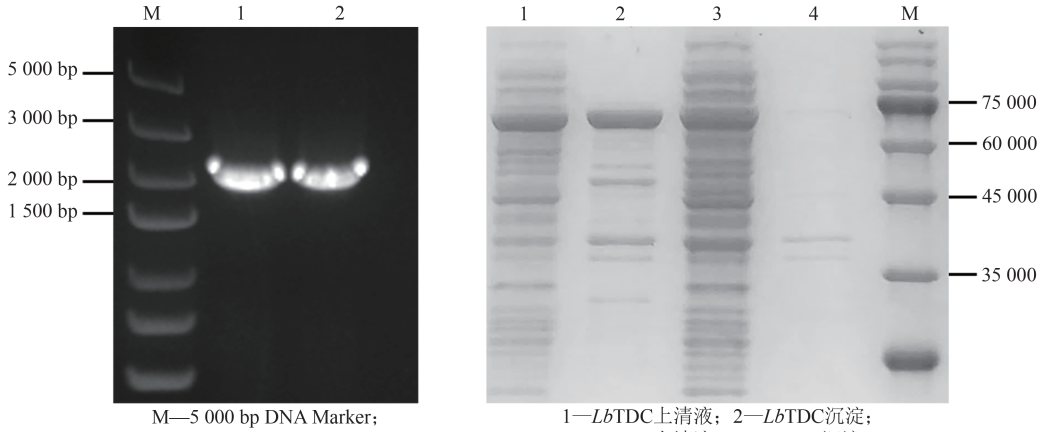
2 结果与讨论

2.1 酪胺生产菌株的构建以及相关酶的表达验证

经酪氨酸脱羧酶（TDC）的催化使酪氨酸发生脱羧反应生成酪胺。TDC在自然环境分布广泛，

现已成功克隆了多种来源的TDC，涵盖红景天、粪肠球菌、拟南芥以及短乳杆菌等[23]。基于前期的研究，作者选取短乳杆菌[24]和粪肠球菌[25]作为TDC的来源并构建了相应的菌株。

首先，构建了质粒pET28a-*Lb*TDC和pET28a-*Ef*TDC，随后将其转化至大肠杆菌中，并进行了菌落PCR验证，发现目的条带大小正确，表明菌株构建成功，见图1(a)。将携带pET28a-*Lb*TDC质粒的菌株命名为A1，携带pET28a-*Ef*TDC质粒的菌株命名为A2，随后对A1和A2菌株进行了蛋白质表达与细胞破碎处理，分离得到酪氨酸脱羧酶*Lb*TDC和*Ef*TDC的上清液与沉淀部分。SDS-PAGE分析酶的表达情况，结果见图1(b)。2种来源的TDC均可表达，但短乳杆菌来源的TDC在沉淀中表达更多，在可溶性成分中表达相对较少，这种低溶解性可能与其蛋白质折叠效率或大肠杆菌表达系统的兼容性有关。随后对酶进行了纯化[26]，并测定了其酶活力，如表2所示，*Ef*TDC的酶活力为0.82 U/mg，高于*Lb*TDC的0.54 U/mg，这种酶活性差异可能与2种酶的活性中心结构或底物结合能力有关。*Ef*TDC不仅在表达上有良好的可溶性，而且在催化效率上也明显优于*Lb*TDC。这一结果为后续选择*Ef*TDC作为酪胺及酪醇生物合成途径的关键酶提供了重要依据。



M—5 000 bp DNA Marker；
1—*E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*Ef*TDC；
2—*E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*Lb*TDC。

(a) 酪氨酸脱羧酶基因的菌落PCR验证

1—*Lb*TDC上清液；2—*Lb*TDC沉淀；
3—*Ef*TDC上清液；4—*Ef*TDC沉淀；
M—标准蛋白质。

(b) 酪氨酸脱羧酶的SDS-PAGE分析

图1 酪氨酸脱羧酶基因的菌落PCR验证和酪氨酸脱羧酶的SDS-PAGE分析

Fig. 1 Colony PCR verification of tyrosine decarboxylase gene and SDS-PAGE analysis of tyrosine decarboxylase

表2 酪氨酸脱羧酶的酶活力

Table 2 Enzymatic activity of tyrosine decarboxylase

酪氨酸脱羧酶	酶活力/(U/mg)
*Lb*TDC	0.54
*Ef*TDC	0.82

2.2 TDC酶学性质测定及酪胺生产优选菌株的确定

为验证2种不同来源酪氨酸脱羧酶*Lb*TDC与*Ef*TDC的催化特性，对其酶学属性进行了系统测定。如图2(a)所示，不同温度下的酶活力测定表明，短乳杆菌来源的*Lb*TDC和粪肠球菌来源的*Ef*TDC的最适反应温度为50 ℃，而*Lb*TDC更耐高温，在60 ℃时的酶活力明显高于*Ef*TDC，这可能与其蛋白质结构的稳定性差异有关。如图2(b)所示，在各自的最适温度下孵育12 h后，*Lb*TDC保留了22.3%的初始酶活力，*Ef*TDC则保留了28.1%的初始酶活力，略高于*Lb*TDC，表明*Ef*TDC在长时间高温环境下的热稳定性更优。在不同pH条件下测定2种酶的相对酶活力，结果见图2(c)。*Lb*TDC在pH 6.0时表现出最大催化活性，而*Ef*TDC在pH 7.0时表现出最大催化活性，这种差异可能源于2种酶活性中心氨基酸残基的质子化状态不同。2种酶在相应最适pH条件下保存10 h后的结果见图2(d)。*Lb*TDC保持了57.6%的初始酶活力，*Ef*TDC则保持了54.3%的初始酶活力，均显示出良好的pH稳定性，这为其在工业化应用中的pH适应性提供了重要依据。综上所述，*Lb*TDC和*Ef*TDC在温度适应性和pH稳定性方面各有优势，随后对其全细胞催化结果进行了比较。

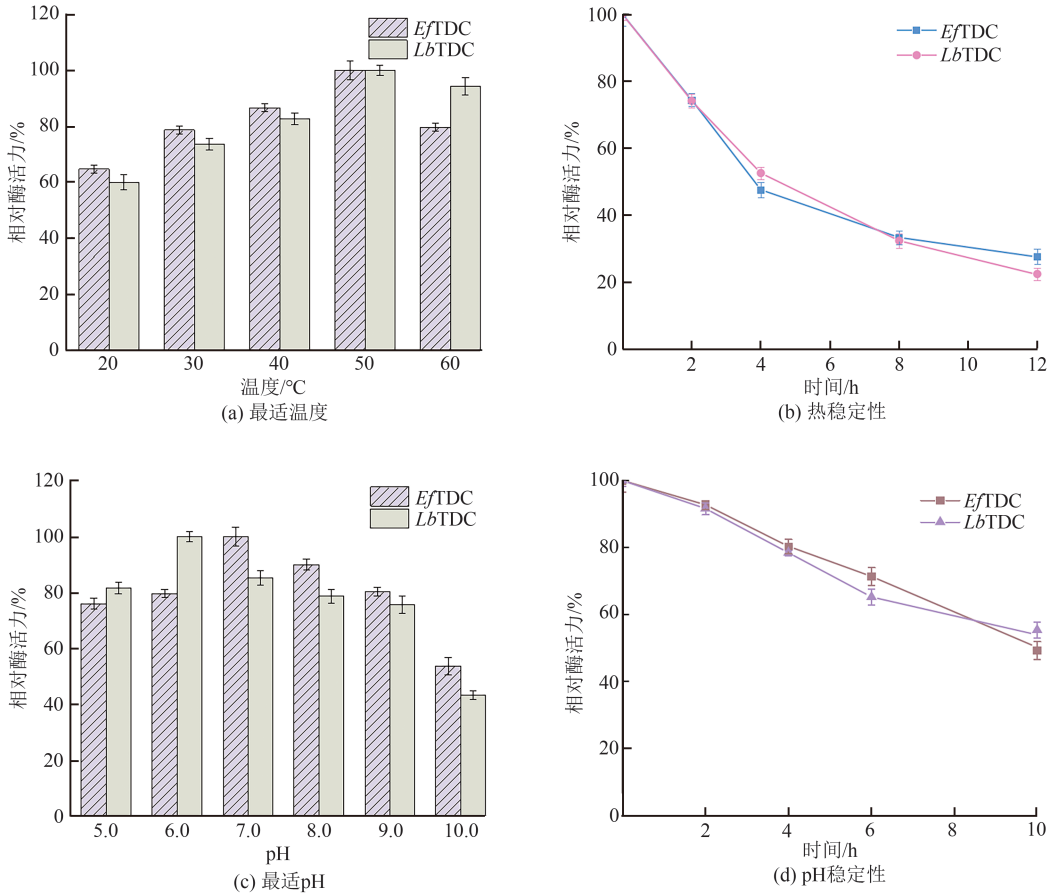


图 2　酪氨酸脱羧酶酶学性质测定

Fig. 2　Determination of enzymatic properties of tyrosine decarboxylase

为了探究这2种TDC在大肠杆菌中对酪胺产量的影响，以10 g/L酪氨酸为底物进行了全细胞催化试验。如图3所示，使用A1菌株（携带*Lb*TDC）时酪胺产量为3.23 g/L，而使用A2菌株（携带*Ef*TDC）时产量为4.12 g/L，其酪胺产量提高了27.6%。这一差异可能与*Ef*TDC具有更高的底物亲和力和更稳定的酶结构有关，使其在细胞内环境中能够维持较高的催化活性。此外，*Ef*TDC的最适pH为7.0，更接近大肠杆菌胞内pH环境，这可能是其催化效率优于*Lb*TDC的另一重要因素。综合上述比较结果，选择催化性能更优的A2菌株进行后续研究。

2.3　TDC-TYO级联催化酪醇合成途径构建

目前，基于大肠杆菌底盘细胞从*L*-酪氨酸转化为酪醇的生物合成主要包含3种途径：TDC-TYO途径、Ehrlich途径（LAAD-PDC途径）和AAS途径。基于前期对酪胺生物合成的研究基础，选择TDC-TYO途径进行系统优化与深入探究，见图4。该途径以*L*-酪氨酸为起始底物，首先在TDC的催化下生成酪胺，随后经酪胺氧化酶（TYO）的催化生成4-羟基苯乙醛（4HPAA）[27]，最终在大肠杆菌内源性醇脱氢酶（ADH）作用下，将4HPAA还原成目标产物酪醇。

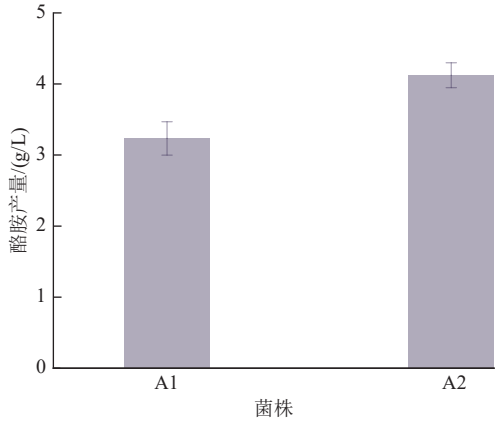


图 3　全细胞催化验证重组菌株A1、A2生产酪胺的能力

Fig. 3　Verification of the tyramine production ability of recombinant strains A1 and A2 by whole-cell catalysis

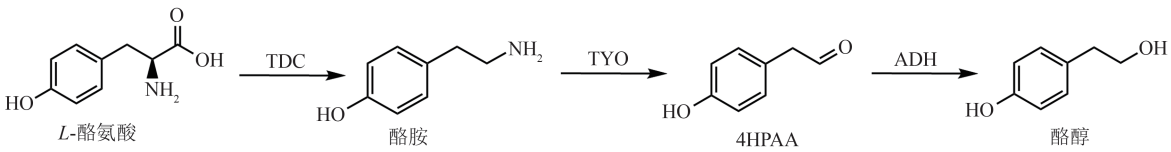


图 4　催化 *L*-酪氨酸合成酪醇的 TDC-TYO 路径设计

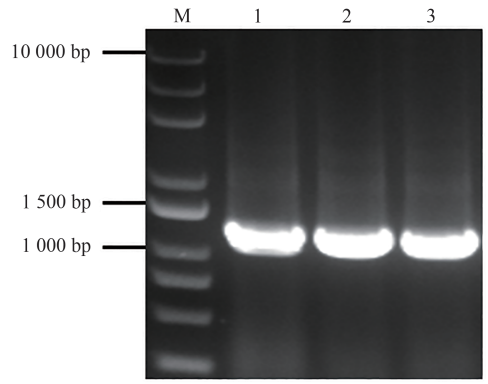
Fig. 4　Design of TDC-TYO pathway for catalytic synthesis of tyrosol from *L*-tyrosine

基于上述对酪胺转化合成的研究，选择粪肠球菌来源的 *Ef*TDC 构建酪醇生产菌株。研究表明，藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）来源的 TYO 具有较高的催化活性和广泛的工业应用前景[28]，因此将其作为酪胺氧化酶的来源。为构建高效酪醇合成系统，利用了双酶共表达策略。为探究酶表达顺序对代谢通量的影响，分别构建了 pET28a-*Ef*TDC-TYO 和 pET28a-TYO-*Ef*TDC 这 2 种重组质粒，菌落 PCR 验证结果见图 5。结果表明，目的基因条带大小正确，证明菌株构建成功。将其转化进大肠杆菌，所得重组菌株分别命名为 B1 和 B2。重组菌株经过诱导表达，利用 SDS-PAGE 对重组菌株的蛋白质表达进行了分析验证。如图 6 所示，B1 和 B2 重组菌株均成功表达目的蛋白质，且表达蛋白质的相对分子质量与理论相对分子质量相符，这说明重组表达系统的成功构建为后续研究奠定了基础。

2.4　LAAD-PDC 级联催化酪醇合成途径构建

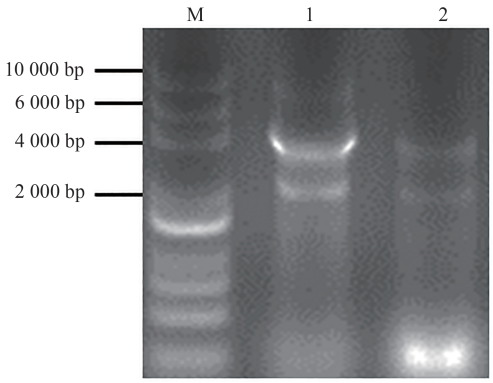
最初在酿酒酵母中揭示了酪醇的合成路径，鉴于此，选取这一应用最为广泛的途径来深入探究酪醇的生产工艺。酪醇在酿酒酵母的芳香醇合成途径（即 Ehrlich 途径）[11]见图 7。首先，在芳香族氨基酸氨基转移酶（LAAD）的催化下，*L*-酪氨酸经转氨作用转化为对羟基苯丙酮酸（4-HPP）；随后，在丙酮酸脱羧酶（PDC）的作用下发生脱羧反应，转化为对羟基苯乙醛（4HPAA）；最后，通过内源性醇脱氢酶的还原作用，4HPAA 转化为终产物酪醇。基于上述途径，构建了酪醇的第 2 条级联合成路径，作者利用奇异变形杆菌和普通变形杆菌来源的 LAAD，同时选择了热带假丝酵母来源的 PDC 进行研究。

首先，对这些途径中的关键基因进行了克隆，并成功构建了包含这些基因的菌株：pET28a-*Pm*LAAD、pET28a-*Pv*LAAD 和 pET28a-PDC。菌落 PCR 验证结果表明条带大小正确，证明了这些基因扩增成功，见图 8。随后，为了探究 LAAD 与 PDC 基因串联顺序对酪醇产量的潜在影响，设计了 4 种不同串联顺序的质粒：pET28a-*Pv*LAAD-PDC、pET28a-*Pm*LAAD-PDC、pET28a-PDC-*Pv*LAAD 和 pET28a-PDC-*Pm*LAAD。在成功构建这些质粒后，将其转入大肠杆菌，并分别命名为 B3、B4、B5 和 B6。之后将重组菌株诱导表达，通过 SDS-PAGE 电泳分析，验证了目的蛋白质的正常表达，且其相对分子质量大小正确，表明双酶级联系统构建成功，为后续生产酪醇路径的选择奠定了基础。



M—10 000 bp DNA Marker；
1~3—*E. coli* BL21（DE3）/pET28a-TYO。

(a) 酪胺氧化酶基因的菌落PCR验证

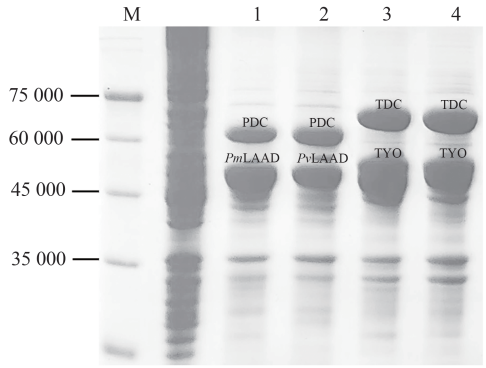


M—10 000 bp DNA Marker；
1—*E. coli* BL21（DE3）/pET28a-*Ef*TDC-TYO；
2—*E. coli* BL21（DE3）/pET28a-TYO-*Ef*TDC。

(b) TDC-TYO串联基因的菌落PCR验证

图 5　TDC-TYO 合成酪醇路径的基因菌落 PCR 验证

Fig. 5　Colony PCR validation of genes in the TDC-TYO pathway for tyrosol synthesis



M—标准蛋白质；1—*Pm*LAAD-PDC粗酶；2—*Pv*LAAD-PDC粗酶；3—*Ef*TDC-TYO粗酶；4—TYO-*Ef*TDC粗酶。

图6　LAAD-PDC和TDC-TYO双酶级联菌株基因表达蛋白质的SDS-PAGE分析

Fig. 6　SDS-PAGE analysis of genes expression in strains carrying LAAD-PDC and TDC-TYO dual-enzyme cascades

2.5　酪醇生产级联路径的验证及菌株催化性能比较

通过全细胞催化试验来验证所构建的2条酪醇生产级联路径的可行性，并对比了6株重组菌株将*L*-酪氨酸转化为酪醇的能力。试验条件为：在pH 7.0的缓冲液中加入10 g/L的*L*-酪氨酸作为底物，添加体积分数1%的曲拉通X-100，将菌体的OD_{600}值控制在30。在30 ℃以160 r/min的转速进行搅拌，反应持续24 h。反应结束后经HPLC对酪醇的产量进行检测。

试验结果如图9所示，在LAAD-PDC路径的生产菌株中，携带质粒pET28a-*Pm*LAAD-PDC的重组菌株B4展现出了最高的酪醇产量，达到了1.89 g/L。然而，在TDC-TYO路径中的菌株催化能力更强，其中B1菌株的产量为2.75 g/L，B2菌株的产量为2.12 g/L，均超过了LAAD-PDC路径的最高产量。相比之下，LAAD-PDC路径的产量较低，可能受到中间产物积累或酶活性不足的限制。这一结果证明了TDC-TYO路径在酪醇生产方面的优越性。进一步对比B1和B2菌株的产量发现，B1菌株的产量比B2菌株高了29.7%，这可能与B1菌株中关键酶的稳定性或表达水平更高有关，表明B1菌株具有更高的转化效率和更优的生产性能，因此利用携带有重组质粒pET28a-TDC-TYO的菌株B1进行后续研究。

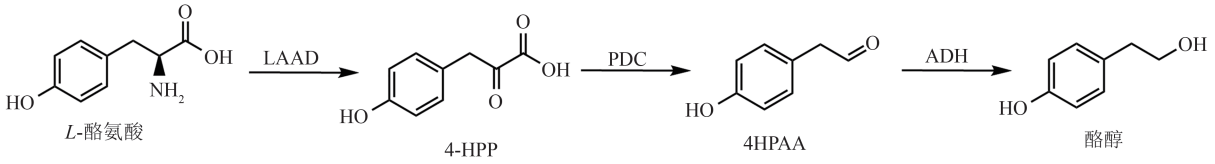


图7　催化*L*-酪氨酸合成酪醇的LAAD-PDC路径设计

Fig. 7　Design of LAAD-PDC pathway for catalytic synthesis of tyrosol from *L*-tyrosine

2.6　全细胞催化法合成酪醇的条件优化

通过对级联路径的筛选，作者成功获得了重组菌株B1。为了全面评估B1的催化性能，将其作为全细胞催化剂应用于酪醇的生物合成过程中。在此基础上，采用单因素试验法，对一系列关键参数进行了系统优化[29]，这些参数包括反应温度、pH、菌体量以及底物质量浓度等。

2.6.1　温度对酪醇全细胞生物合成的影响

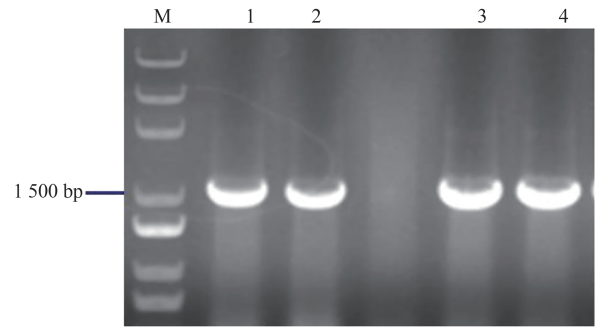
温度是影响酪醇生物合成效率的关键参数，其通过调控细胞代谢活性及酶促反应动力学特性来影响产物合成效率[30]。作者系统考察了20、25、30、35、40、45 ℃对酪醇产量的影响。如图10(a)所示，温度为30 ℃时酪醇产量最高，为2.84 g/L，温度过高或过低都会对酶活力造成影响，因此确定30 ℃是酪醇生物合成的最适反应温度。

2.6.2　pH对酪醇全细胞生物合成的影响

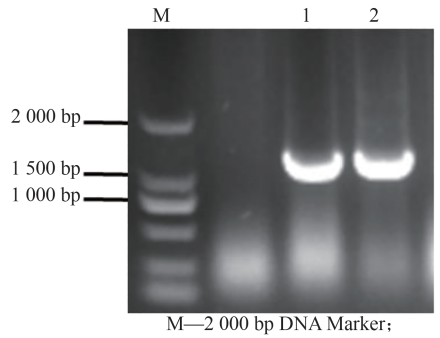
培养基pH是影响酪醇生物合成的重要环境因子，其通过改变细胞生长环境的渗透压，影响细胞生长和代谢活性，并调节酶蛋白的空间构象，影响酶促反应效率[31]。作者考察了pH 6.0~10.0对酪醇产量的影响，结果表明，在pH 7.0时酪醇产量达到最大值，为3.01 g/L，见图10(b)。

2.6.3　菌体量对酪醇全细胞生物合成的影响

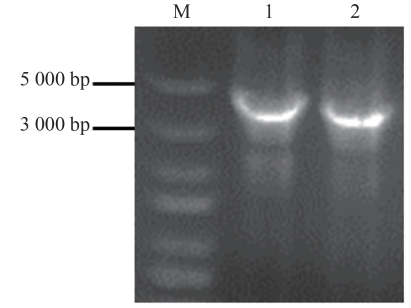
在工业化生产过程中，优化菌体浓度是提高产物得率、降低生产成本的关键策略之一。为确定最佳菌体浓度，作者考察了不同OD_{600}值(20、30、40、50、60)对酪醇产量的影响。如图10(c)所示，当OD_{600}值为50时，酪醇产量达到最大值，为



M—5 000 bp DNA Marker； 1~2—*E. coli* BL21（DE3）/pET28a-*Pm*LAAD；
3~4—*E. coli* BL21（DE3）/pET28a-*Pv*LAAD。
(a) LAAD基因的菌落PCR验证



M—2 000 bp DNA Marker；
1~2—*E. coli* BL21（DE3）/pET28a-PDC。
(b) PDC基因的菌落PCR验证



M—5 000 bp DNA Marker；
1—*E. coli* BL21（DE3）/pET28a-*Pv*LAAD-PDC；
2—*E. coli* BL21（DE3）/pET28a-*Pm*LAAD-PDC。
(c) LAAD-PDC串联基因的菌落PCR验证

图 8 LAAD-PDC 合成酪醇路径的基因菌落 PCR 验证

Fig. 8 Colony PCR validation of genes in the LAAD-PDC pathway for tyrosol synthesis

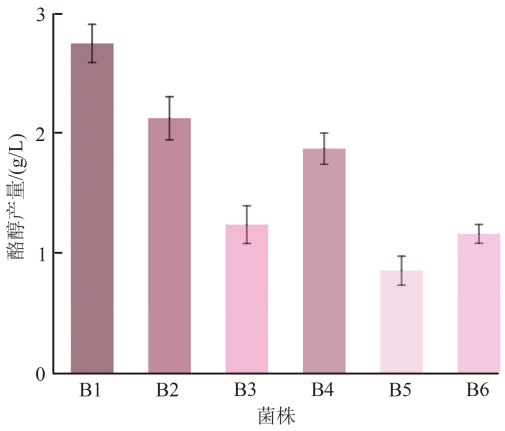


图 9 全细胞催化验证重组菌株 B1~B6 转化 *L*-酪氨酸为酪醇的能力

Fig. 9 Verification of the ability of recombinant strains B1~B6 to convert *L*-tyrosine to tyrosol by whole-cell catalysis

3.29 g/L。这一结果表明，适当的菌体浓度可有效平衡细胞催化能力与底物传质效率，从而实现最优的生产效率，于是确定最佳 OD_{600} 值为 50。

2.6.4 底物质量浓度和分批补加策略对酪醇全细胞生物合成的影响

在优化的反应体系（30 ℃、pH 7.0、OD_{600} 值为 50、体积分数 1% 的 Triton X-100）基础上，分析了底物 *L*-酪氨酸质量浓度对酪醇生物合成的影响。由于 *L*-酪氨酸在水中的溶解度相对较低[32]，作者采取分批补加 *L*-酪氨酸的策略，既维持了体系的高效反应，同时最大化利用底物。将初始底物 *L*-酪氨酸的质量浓度设定为 2.5 g/L。随着反应的进行，每隔 2 h 补加 2.5 g/L 的 *L*-酪氨酸，逐步将 *L*-酪氨酸的质量浓度提升至 5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 g/L，记录了各个质量浓度下酪醇的产量变化，结果见图 10（d）。随底物质量浓度增加，酪醇产量呈先升高后降低的趋势：当 *L*-酪氨酸质量浓度从 5.0 g/L 增至 10.0 g/L 时，酪醇产量明显提升，在 10.0 g/L 时达到最大值 3.96 g/L，对应转化率为 51.9%。但是当底物质量浓度超过 10.0 g/L 后，酪醇的产量呈现下降趋势。这一现象可能是由于高质量浓度的底物对酶活力的抑制作用，进而影响了酪醇的合成效率。HPLC 测定酪醇产量，见图 11。基于以上结果，10.0 g/L 的 *L*-酪氨酸为最佳底物质量浓度，该条件下既实现了最高的产物得率，同时保持了良好的底物转化效率，为工业化放大生产提供了重要工艺参数。

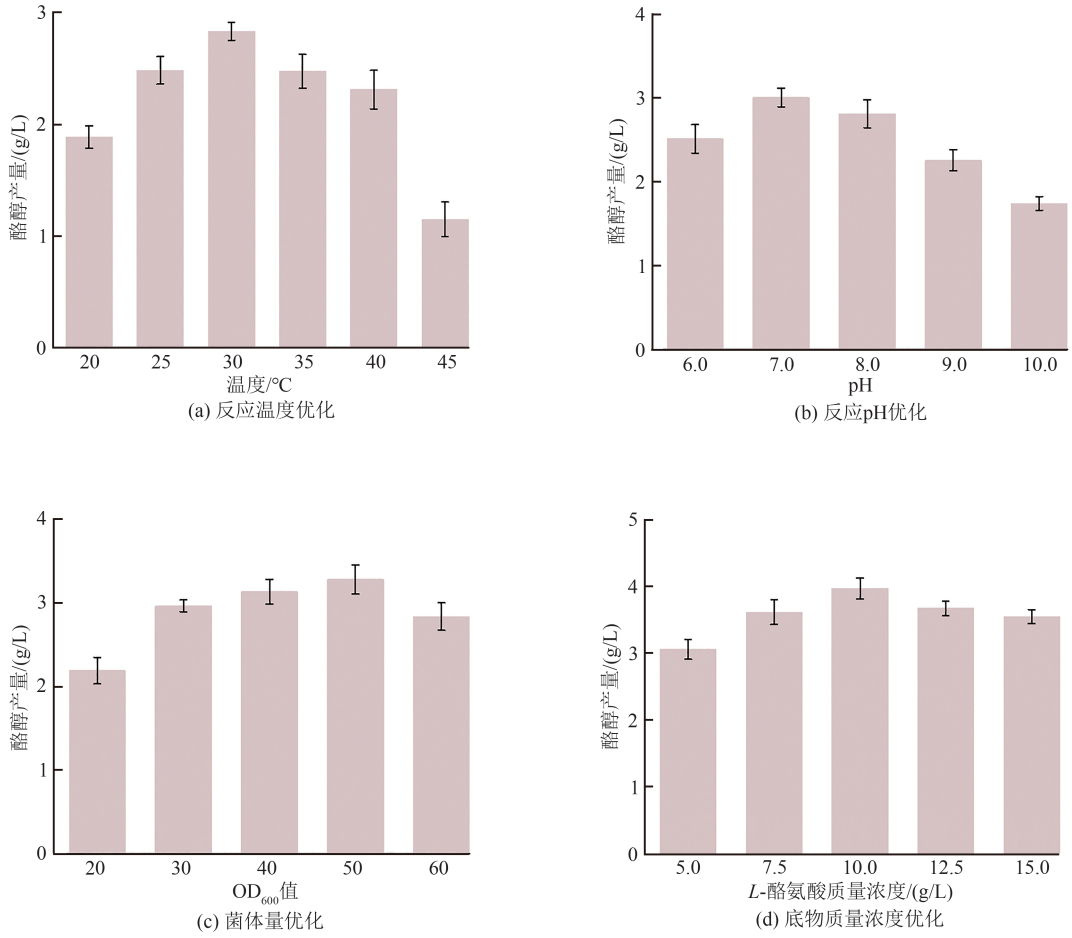


图 10　重组菌株全细胞催化生产酪醇的条件优化

Fig. 10　Optimization of whole-cell catalytic production of tyrosol by recombinant strain

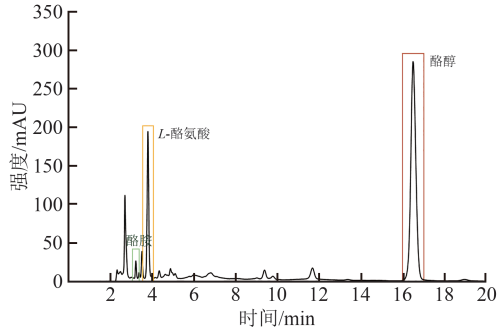


图 11　HPLC 对全细胞催化合成酪醇结果的检测

Fig. 11　Detection of tyrosol synthesized through whole-cell catalysis by HPLC

3　结论

作者成功地在大肠杆菌中构建了一个高效的生物合成系统，用于酪胺与酪醇的生产。构建了TDC-TYO和LAAD-PDC共2条酪醇合成途径，并构建了相应的双酶共表达系统。随后，对2种途径中酶的串联顺序进行了优化。经过筛选，鉴定出了酪醇产量相对最高的携带质粒pET28a-*Ef*TDC-TYO的重组菌株。经过全细胞催化条件优化，最终确定了最优的转化条件：反应温度30 ℃、pH 7.0、OD_{600}值为50、分批补料方式使*L*-酪氨酸的质量浓度为10.0 g/L，体积分数1%的Triton X-100增加细胞通透性。在该条件下，重组菌株B1在24 h催化反应中实现了3.96 g/L的酪醇产量，底物转化率为51.9%。这一结果验证了所构建生物合成系统的有效性，并对TDC-TYO和LAAD-PDC这2条途径全细胞催化合成酪醇进行了全面评估，为酪醇的工业化生产提供了工艺参数参考。在后续试验中将筛选具有更高耐受酪醇的底盘菌株[33]，未来将依托现有研究成果，进一步深化酪醇的合成研究。

参考文献

[1] KARKOVIĆ MARKOVIĆ A，TORIĆ J，BARBARIĆ M，

et al. Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health[J]. Molecules, 2019, 24(10): 2001.

[2] GABBIA D. Beneficial effects of tyrosol and oleocanthal from extra virgin olive oil on liver health: insights into their mechanisms of action[J]. Biology, 2024, 13(10): 760.

[3] KOUKA P, TSAKIRI G, TZORTZI D, et al. The polyphenolic composition of extracts derived from different Greek extra virgin olive oils is correlated with their antioxidant potency[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 1870965.

[4] PLOTNIKOV M B, PLOTNIKOVA T M. Tyrosol as a neuroprotector: strong effects of a "weak" antioxidant[J]. Current Neuropharmacology, 2021, 19(4): 434-448.

[5] ČERNÁKOVÁ L, MACKOVÁ M, KLEMPOVÁ T, et al. Enzymatic methoxycarbonylation of tyrosol and hydroxytyrosol [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(18): 10057.

[6] XIONG T Z, LI X M, LIU W, et al. Multienzyme cascade for synthesis of hydroxytyrosol *via* engineered *Escherichia coli*[J]. Scientific Reports, 2025, 15: 471.

[7] VAN KESSEL S P, FRYE A K, EL-GENDY A O, et al. Gut bacterial tyrosine decarboxylases restrict levels of levodopa in the treatment of Parkinson's disease[J]. Nature Communications, 2019, 10: 310.

[8] 刘英杰, 符长春, 张学鹏, 等. 酪醇及其衍生物的微生物代谢工程调控研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2604-2625.
LIU Y J, FU C C, ZHANG X P, et al. Recent advances in metabolic engineering of microorganisms for production of tyrosol and its derivatives [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2604-2625. (in Chinese)

[9] ZENG W Z, WANG H J, CHEN J B, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient *de novo* synthesis of salidroside [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(51): 28369-28377.

[10] LIU H Y, TIAN Y J, ZHOU Y, et al. Multi-modular engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-titre production of tyrosol and salidroside [J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(6): 2605-2616.

[11] HAZELWOOD L A, DARAN J M, VAN MARIS A J A, et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(8): 2259-2266.

[12] SATOH Y, TAJIMA K, MUNEKATA M, et al. 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.

[13] XIA Y Y, QI L N, SHI X L, et al. Construction of an *Escherichia coli* cell factory for *de novo* synthesis of tyrosol through semi-rational design based on phenylpyruvate decarboxylase ARO10 engineering [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 127385.

[14] CHUNG D, KIM S Y, AHN J H. Production of three phenylethanoids, tyrosol, hydroxytyrosol, and salidroside, using plant genes expressing in *Escherichia coli* [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 2578.

[15] LIU J B, WANG K P, WANG M, et al. Efficient whole cell biotransformation of tyrosol from *L*-tyrosine by engineered *Escherichia coli*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 160: 110100.

[16] RUAN X B, ZHANG S, SONG W, et al. Efficient synthesis of tyrosol from *L*-tyrosine *via* heterologous Ehrlich pathway in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2022, 47: 18-30.

[17] 张月, 裴慧洁, 何维, 等. 发酵食品中酪胺的形成机制及其控制研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(15): 263-271.
ZHANG Y, PEI H J, HE W, et al. Research progress on the formation mechanism and control of tyramine in fermented foods[J]. Food Science, 2024, 45(15): 263-271. (in Chinese)

[18] LIU J, LIU J M, YANG B, et al. Production of phenylpyruvic acid by engineered l-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*[J]. Biotechnology Letters, 2022, 44(5): 635-642.

[19] SUTIONO S, CARSTEN J, SIEBER V. Structure-guided engineering of *α*-keto acid decarboxylase for the production of higher alcohols at elevated temperature[J]. ChemSusChem, 2018, 11(18): 3335-3344.

[20] CROWE J, MASONE B S, RIBBE J. One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin[J]. Molecular Biotechnology, 1995, 4(3): 247-258.

[21] PEREZ M, LADERO V, DEL RIO B, et al. The relationship among tyrosine decarboxylase and agmatine deiminase pathways in *Enterococcus faecalis* [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2107.

[22] 张慧, 曹慧, 王瑾, 等. 高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法分析奶酪中5种生物胺[J]. 食品与机械, 2023, 39(10): 80-86.
ZHANG H, CAO H, WANG J, et al. Determination of 5 kinds of biogenic amines in cheeses by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food & Machinery, 2023, 39(10): 80-86. (in Chinese)

[23] ANDERSEN G，MARCINEK P，SULZINGER N，et al. Food sources and biomolecular targets of tyramine[J]. Nutrition Reviews，2019，77(2)：107-115.

[24] LUCAS P，LANDETE J，COTON M，et al. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809：characterization and conservation in tyramine-producing bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters，2003，229(1)：65-71.

[25] KANG H R，KIM H S，MAH J H，et al. Tyramine reduction by tyrosine decarboxylase inhibitor in *Enterococcus faecium* for tyramine controlled *cheonggukjang*[J]. Food Science and Biotechnology，2018，27(1)：87-93.

[26] 殷方荣，翟李欣，田乔鹏，等. 贝莱斯芽孢杆菌角蛋白酶的克隆表达、纯化及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(6)：57-66.
YIN F R，ZHAI L X，TIAN Q P，et al. Gene cloning，expression，purification，and enzymatic properties study of keratinase from *Bacillus velezensis*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(6)：57-66.(in Chinese)

[27] YU T Q，YIN Y F，GE Y H，et al. Enzymatic production of 4-hydroxyphenylacetaldehyde by oxidation of the amino group of tyramine with a recombinant primary amine oxidase[J]. Process Biochemistry，2020，92：105-112.

[28] SHEN N，SATOH Y，KOMA D，et al. Optimization of tyrosol-producing pathway with tyrosine decarboxylase and tyramine oxidase in high-tyrosine-producing *Escherichia coli*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering，2024，137(2)：115-123.

[29] 郑蝶，杨海泉，夏媛媛，等. 重组大肠杆菌全细胞催化法生产*N*-乙酰神经氨酸[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(2)：38-46.
ZHENG D，YANG H Q，XIA Y Y，et al. Production of *N*-acetylneuraminic acid from fermentation broth using recombinant *Escherichia coli* whole cells biotransformation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(2)：38-46.(in Chinese)

[30] KNAPP B D，HUANG K C. The effects of temperature on cellular physiology[J]. Annual Review of Biophysics，2022，51：499-526.

[31] GUO J，MA Z P，GAO J S，et al. Recent advances of pH homeostasis mechanisms in *Corynebacterium glutamicum*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology，2019，35(12)：192.

[32] LI X B，LI K H，FARAJTABAR A，et al. Solubility of *d*-tryptophan and *l*-tyrosine in several organic solvents：determination and solvent effect[J]. Journal of Chemical & Engineering Data，2019，64(7)：3164-3169.

[33] WANG J L，MA W J，ZHOU J W，et al. Microbial chassis design and engineering for production of amino acids used in food industry[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing，2023，3(1)：28-48.

（责任编辑：李春丽）