DOI:10.12441/spyswjs.20221201001 [文章编号] 1673-1689(2024)08-0112-07

酿酒酵母芳香族氨基酸合成途径相关基因对细胞SDS耐受性的影响

余培斌 饶志明 曹春蕾*

(江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心,江苏 无锡 214122)

摘要:酿酒酵母中芳香族氨基酸合成途径对于生产多种芳香族精细化学品至关重要,其中间产物如扁桃酸和4-羟基扁桃酸是重要的精细化学品,在食品、医药、饮料和化妆品等领域具有广泛应用。为了探索酿酒酵母中芳香族氨基酸合成途径及其基因调控机制和中间产物的合成途径,作者总结了从葡萄糖到芳香族氨基酸的完整合成路径及分支,并归纳了参与此过程的14个基因及其在细胞内的功能。在对其中12个基因的单基因缺失菌株进行十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)表型检测时,发现*aro2/aro2*、*aro1/aro1*、*aro7/aro7*、*trp1/trp1*和*trp5/trp5*这5个缺失菌株对质量分数0.03%的SDS表现出明显的敏感表型。对这几个敏感菌株进行了细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定,发现与野生型相比,*aro1/aro1*、*aro7/aro7*和*trp1/trp1*菌株的细胞内ROS水平显著升高。酿酒酵母中整个芳香族氨基酸合成途径及其分支受到严格的基因调控,对这些基因功能的系统研究,为提高芳香族精细化学品的生物合成产量和酿酒酵母基因组学研究提供理论基础。

关键词:酿酒酵母;芳香族氨基酸;合成途径;SDS;ROS

Effects of Aromatic Amino Acid Biosynthesis Pathway Related Genes on SDS Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*

*YU Peibin RAO Zhiming CAO Chunlei**

(National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The aromatic amino acid synthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* is very important for the production of many aromatic fine chemicals. Mandelic acid and 4-hydroxymandelic acid like intermediates are vital fine chemicals, which are widely used in foods, medicines, beverages and cosmetics. In order to explore the gene regulation mechanism in aromatic amino acid synthesis pathway in *S. cerevisiae* to explore the synthesis pathway of aromatic intermediates, this study summarized the whole aromatic amino acid synthesis pathway and its branches from glucose in *S. cerevisiae*, it also lists 14 genes and intracellular functions involved in the whole process. The phenotypes of 12 single gene deletion strains were detected in sodium dodecyl sulfate (SDS), while 5 deletion strains, including *aro2/aro2, aro1/aro1, aro7/aro7*, *trp1/trp1* and *trp5/trp5*, showed obvious sensitive phenotypes to 0.03% SDS. Moreover, the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels of five sensitive strains were measured. Results showed that the intracellular ROS levels of *aro1/aro1*, *aro7/aro7* and *trp1/trp1* strains were significantly increased, compared with the wild-type strain. The whole aromatic amino acid synthesis pathway and its branches in *S. cerevisiae* were strictly regulated by genes. A systematic study of these genes

基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划"揭榜挂帅"项目(2022BBF01003)。

通信作者:曹春蕾(1986年—),女,硕士,实验师,主要从事发酵工程研究。E-mail:caochunlei@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2022-12-01 **修回日期:**2022-12-06

functions will provide a theoretical basis for a high-yield biosynthesis of aromatic fine chemicals and genomics of *S. cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; aromatic amino acid; synthesis pathway; SDS; ROS

芳香族氨基酸是指分子结构中含有苯环结构的氨基酸，主要包括苯丙氨酸（*L*-phe）、酪氨酸（*L*-tyr）和色氨酸（*L*-trp），是生物体内的必需氨基酸，具有重要的生物学功能，在医药、食品、化妆品及饲料等领域广泛应用[1]。芳香族氨基酸生物合成过程中的中间产物，如扁桃酸和4-羟基扁桃酸也是重要的精细化学品。扁桃酸在化妆品行业及医药合成领域非常重要，它是半合成青霉素、头孢类药物、抗肥胖剂、抗艾滋病毒及抗白血病药物的合成前体[2-3]。另外，扁桃酸也是全球年产量分别超过397万t的对苯二甲酸和280万t的己二酸的前体，这两种物质分别用于生产聚乙烯中聚合物对苯二甲酸酯（phosphoenolpyruvate，PET）家族和作为尼龙-6，6、润滑剂及涂料的前体。此外，扁桃酸也可用于外消旋醇和胺的合成[4]。4-羟基扁桃酸主要用作合成芳香族药物和香料的芳香支架，其衍生物聚羟基扁桃酸酰胺已经被证明具有比α-生育酚更高的抗氧化活性，而α-生育酚是哺乳动物体内最重要的抗氧化剂之一[5]。另一种4-羟基扁桃酸的衍生物（*S*）-3-乙氧基-4-羟基扁桃酸，可通过重组大肠杆菌转化为食品、饮料和化妆品中的诱人风味物质乙基香兰素[6-9]。

酿酒酵母作为真菌模式生物，因其在恶劣工业条件下的高稳定性和在低pH下发酵糖的能力等优势，近年来被广泛用于芳香族氨基酸生物合成途径。目前，它已成功用于生产原本只能通过化学合成或从植物提取的芳香精细化学品[10]。在酿酒酵母中，芳香化合物是通过芳香族氨基酸生物合成途径产生的。在磷酸戊糖途径中，磷酸烯醇式丙酮酸和赤藻糖被Aro3和Aro4合成3-脱氧-*D*-阿拉伯糖庚酸盐7-磷酸（3-deoxy-*D*-arabinoheptulosonate 7-phosphate，DAHP），再经莽草酸途径和芳香族氨基酸途径合成扁桃酸和4-羟基扁桃酸的前体，即苯丙酮酸盐和羟苯丙酮酸[11]。然而，通过基因工程改造酿酒酵母生产芳香族精细化合物仍面临很多挑战，如产量低，以及需要平衡菌株产量与其对芳香族氨基酸原营养物的需求等。Ward等[3]通过基因改造实现的扁桃酸产量仅为1.56 mg/L。大量研究报告显示，总异源产物扁桃酸的产量低于合成途径中间体的积累产量。

表面活性剂是环境中广泛存在的有机污染物，其毒性已引起广泛关注。SDS是合成的阴离子表面活性剂之一，其主要通过破坏细胞膜来触发细胞壁完整性信号通路，这一通路是通过激酶级联反应来维持细胞完整性，并且能被那些破坏细胞壁或细胞膜的化学物质所激活。研究发现，SDS对细胞的毒性主要与细胞膜通透性改变导致的细胞内离子失衡以及诱导的细胞氧化应激有关。氧化应激会引发其他的生理和生化应激反应，进而干扰细胞内正常的代谢途径[12]。也有报道指出，SDS能够引起细胞内谷胱甘肽分泌增加、脂质过氧化及碳代谢变化等效应[13]。

在酿酒酵母中，芳香族氨基酸的合成途径对于生产芳香族精细化学品至关重要。因此，科研机构和企业都在不断探索和开发更好的菌株以及新的代谢途径，以提高芳香族精细化学品的产量。鉴于整个芳香族氨基酸合成途径及其分支都受到严格的基因调控，作者总结了酿酒酵母中芳香族氨基酸合成途径及其相关分支，并对这些基因在细胞内对SDS的耐受性和抗氧化活性进行了深入研究。初步探索了酿酒酵母芳香族氨基酸生物合成途径及相关基因的功能，为高产量生物合成芳香族精细化学品及酿酒酵母基因组学研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

酿酒酵母菌株（野生型BY4743，双倍体）、酿酒酵母单基因缺失株：美国Invitrogen公司已构建好的双倍体单基因缺失株库。该库以BY4743为背景，保存于含有G418的酵母浸出粉葡萄糖培养基（yeast extract peptone dextrose medium，YPD）中[14]。

1.1.2 培养基

YPD培养基：蛋白胨20 g，葡萄糖20 g，酵母提取物10 g，蒸馏水1 L。固体培养基每升加入20 g的琼脂粉[14]。

1.1.3 药品

SDS：国药集团药业股份有限公司。

1.1.4 仪器

酶标仪：Trans-Blot Turbo 型，美国 Bio-Rad 公司；多功能酶标仪：synergy H4 型，美国 Biotek 公司；高速冷冻离心机：5804R 型，德国 Eppendorf 公司；全温振荡摇瓶柜：HYL-C 型，江苏省太仓市实验设备厂；单人净化工作台：SW-CJ-ID 型，苏州净化设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 倍比稀释表型试验

对 14 个与酿酒酵母芳香族氨基酸合成相关的基因缺失菌株及野生型对照菌株，采用倍比稀释点板试验检测其在 SDS 中的表型。首先从固体平板培养基中挑取已活化的 14 个相关基因缺失菌株及野生型菌株的单菌落，并将其接种到 3 mL 的 YPD 液体培养基中，在 220 r/min、30 ℃条件下过夜培养至菌体饱和。随后使用无菌水将菌液进行 10 倍梯度稀释，得到浓度梯度为 5×10^6、5×10^5、5×10^4、5×10^3、5×10^2 CFU/mL 的稀释菌液。然后用移液器分别吸取每个菌株不同梯度的稀释菌液 2 μL，并点植于预先配制好的 YPD 和 YPD+质量分数 0.03% SDS 固体平板培养基上，将野生型菌株放在第一行。将点板后的固体培养基平板置于 30 ℃下培养 48 h，观察菌落生长情况。

1.2.2 敏感菌株细胞内 ROS 测定

对倍比稀释表型试验中 SDS 敏感的基因缺失菌株进行细胞内 ROS 测定。首先将敏感菌株及野生型菌株在液体培养基中培养约 12 h，然后将每个菌株的菌液以 1/10 的体积比转接入 2 份 3 mL 的 YPD 液体培养基中，其中 1 份加入终质量分数 0.015% 的 SDS，在 2 份中均加入终质量浓度为 2 μg/mL 的二氢乙啶，并在避光条件下培养至对数生长期。取 1.5 mL 菌液，在室温下以 4 000 r/min 的转速收集菌体，然后用 500 μL 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次，并重悬于 500 μL 的 PBS 中。从每个菌液中取 200 μL 分别加到黑色和透明的 96 孔板中。使用荧光酶标仪对黑色 96 孔板进行荧光测定，设置激发波长为 490 nm，发射波长为 610 nm，并使用光电倍增管（photomultiplier tube，PMT）自动调节；透明 96 孔板用于测定 OD_{600} 值。将每个菌株的荧光值除以 OD_{600} 值，得到其细胞内 ROS 水平变化结果[14]。

1.2.3 数据分析

在细胞内 ROS 测定试验中，每个敏感菌株及野生菌株分别进行 3 次重复试验。使用 Excel 软件进行方差分析，$P<0.05$ 时表明各组差异显著，$P<0.01$ 时表明各组差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 酿酒酵母芳香族氨基酸合成途径及分支

在酿酒酵母中，芳香族氨基酸的合成途径及分支见图 1。这一途径的最初物质磷烯醇丙酮酸是糖酵解途径中后半阶段的中间产物，而赤藻糖来自磷酸戊糖途径，这两种物质在 DAHP 合成酶的催化下合成 DAHP，为芳香族氨基酸生物合成的第一步。*ARO3* 和 *ARO4* 基因编码酵母中的两种 DAHP 合成酶亚型，分别催化该反应的两种蛋白质异构体 Aro3 和 Aro4，而这些反应受到苯丙氨酸和酪氨酸的反馈抑制。*ARO1* 基因编码的功能酶 Arom 催化从 DAHP 到分支酸的过程，此过程属于莽草酸途径，该途径直接为异源产物如香兰素和黏液酸等提供前体物质。Arom 将 DAHP 转化为 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸盐（5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate，EPSP），这个过程包括：分子的环化，生成 3-脱氢喹啉（3-dehydroquinate，3-DHQ），并在芳香环上引入第一个双键，形成中间体 3-脱氢莽草酸酯（3-dehydroshikimate，3-DHS），然后将其转化为莽草酸酯。莽草酸酯与 ATP 反应合成 3-磷酸莽草酸酯，而 3-磷酸莽草酸酯与磷烯醇丙酮酸结合生成 EPSP。莽草酸途径的最后一步是由 *ARO2* 基因编码的分支酸合成酶 Aro2 催化合成的，其中 Aro2 需要辅助因子黄素单核苷酸，通过去除一个磷酸盐并引入第二个双键将 EPSP 转化为分支酸[15-16]。

分支酸在 Trp2 和 Trp3 的催化下通过色氨酸合成途径合成色氨酸，同时，分支酸也在 Aro7 酶的作用下合成预苯酸，Aro7 是分支酸变位酶，是芳香族氨基酸合成途径中受反馈调节的 3 个酶之一，其活性被酪氨酸抑制，而色氨酸则会增强其活性[17]。预苯酸在预苯酸脱水酶 Pha2 的催化下转化为苯丙酮酸，或在预苯酸脱氢酶 Tyr1 的催化下转化为 4-羟苯丙酮酸，这 2 种酸在对羟基扁桃酸合成酶（hydroxymandelate synthase，HmaS）的催化下可以合成扁桃酸和 4-羟基扁桃酸。它们也可以通过苯丙氨酸/酪氨酸合成途径，被 Aro8 和 Aro9

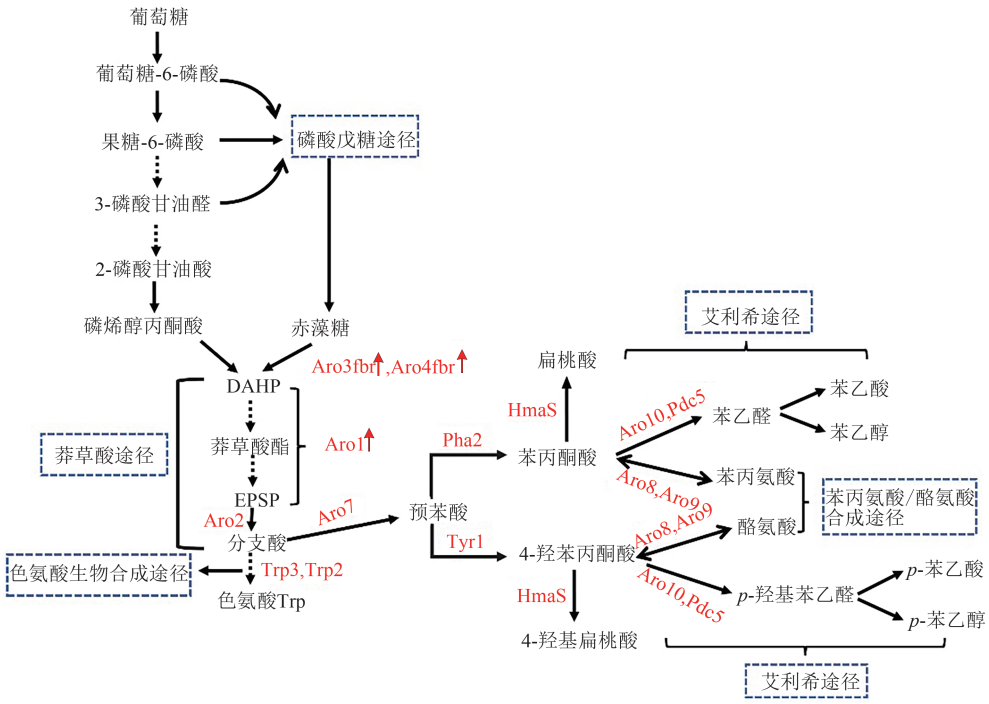


图1　酿酒酵母芳香族氨基酸合成途径及分支

Fig. 1　Synthesis pathway and branches of aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*

组成的芳香转氨酶复合体催化为苯丙氨酸和酪氨酸，芳香转氨酶复合体Aro8和Aro9受到其产物苯丙氨酸和酪氨酸的反馈抑制。此外，苯丙酮酸和4-羟苯丙酮酸也可以通过艾利希途径转化为苯乙醛和*p*-羟基苯乙醛。

2.2　酿酒酵母芳香族氨基酸合成途径相关基因

为了更全面地了解酿酒酵母芳香族氨基酸合成过程及提高芳香族精细化学品的产量，根据图1展示的芳香族氨基酸合成途径及分支，作者汇总整理了所有相关的基因。共有14个主要功能基因参与这一生物合成过程，包括*ARO1*、*ARO2*、*ARO3*、*ARO4*、*ARO7*、*ARO8*、*ARO9*、*TRP1*、*TRP2*、*TRP3*、*TRP4*、*TRP5*、*PHA2*和*TYR1*基因。通过访问酿酒酵母基因数据库网站（https://www.yeastgenome.org/）查询和总结了这些基因编码蛋白质的主要功能及参与的细胞过程，见表1。

可以看出，*ARO1*、*ARO2*、*ARO3*、*ARO4*、*ARO7*、*ARO8*、*ARO9*、*PHA2*和*TYR1*主要参与莽草酸途径以及苯丙氨酸和酪氨酸的合成过程。*ARO3*和*ARO4*编码形成的两种DAHP合成酶亚型催化酵母芳香族氨基酸生物合成的第一步，并受到苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的反馈抑制，这与*ARO8*与*ARO9*的功能类似。*ARO8*和*ARO9*编码形成的芳香族氨基转移酶Ⅰ和Ⅱ将苯丙酮酸和4-羟苯丙酮酸转化为苯丙氨酸和酪氨酸，同样受苯丙氨酸和酪氨酸的反馈抑制。*PHA2*编码的预苯酸脱水酶在苯丙氨酸生物合成途径中催化预苯酸转化为苯丙酮酸，*TYR1*编码的预苯酸脱氢酶参与酪氨酸生物合成。*TRP1*、*TRP2*、*TRP3*、*TRP4*和*TRP5*主要参与色氨酸的合成过程。

在酿酒酵母中，基因表达和蛋白质水平变化严格调控着整个芳香族氨基酸合成途径。因此，为了将碳源重新定向到期望的代谢分支以提高目标产物产量，同时保证菌株的活力和营养需求，需要对整个芳香族氨基酸生物合成过程进行精确调控。Reifenrath等[18]通过基因工程把来自东方拟无枝酸菌（*Amycolatopsis orientalis*）的HmaS导入酿酒酵母中，从而使该菌的4-羟基扁桃酸产量达到了119.0 mg/L，HmaS也以苯丙酮酸为底物，生产了0.7 mg/L的扁桃酸。为了提高产量，研究团队增强了莽草酸途径中相关酶（Aro1↑，$Aro3^{K222L}$↑，$Aro4^{K220L}$↑）的活性，从而增加了前体供应。同时，通过敲除*ARO10*基因，减少了碳源进入艾利希途径，从而使4-羟基扁桃酸产量提升到465.0 mg/L，扁桃酸的产量也提升到2.9 mg/L。

此外，通过敲除 *trp2* 基因来阻止竞争色氨酸分支，敲除 *PDC5* 和 *ARO8/ ARO9* 基因以进一步减少艾利希途径的碳流，避免了苯丙酮酸和4-羟基苯丙酮酸的氨化，敲除 *PHA2* 基因防止苯丙酮酸的生成，这使得4-羟基扁桃酸的产量超过了1.0 g/L。而当敲除 *TYR1* 基因以阻止4-羟基苯丙酮酸的形成时，扁桃酸的产量达到了 236.0 mg/L。与野生型相比，其扁桃酸产量增加了 200 多倍。

表 1　酿酒酵母芳香族氨基酸合成途径相关基因

Table 1　Genes related to biosynthesis of aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*

序号	系统名	标准名	基因功能及参与的细胞过程
1	*ARO1*	YDR127W	催化芳香族氨基酸前体分支酸生物合成第2步到第6步
2	*ARO2*	YGL148W	双功能团的分支酸合成酶及黄素还原酶，催化EPSP转化合成分支酸
3	*ARO3*	YDR035W	DAHP合成酶，催化芳香族氨基酸生物合成的第1步，并被苯丙氨酸或高浓度的酪氨酸或色氨酸反馈抑制
4	*ARO4*	YBR249C	DAHP合成酶，催化芳香族氨基酸生物合成的第1步，并被苯丙氨酸或高浓度的酪氨酸或色氨酸反馈抑制
5	*ARO7*	YPR060C	分支酸变位酶，催化分支酸转变为预苯酸，从而启动酪氨酸/苯丙氨酸的芳香氨基酸生物合成分支
6	*ARO8*	YGL202W	芳香转氨酶I，与Aro9p一起产生犬尿喹啉酸，从而解除细胞内过量色氨酸
7	*ARO9*	YHR137W	芳香氨基转移酶II，参与酪氨酸、苯丙氨酸和蛋氨酸的代谢；与Aro8p一起产生犬尿喹啉酸，从而解除细胞内过量色氨酸
8	*TRP1*	YDR007W	Phosphoribosylanthranilate异构酶，催化色氨酸生物合成的第3步
9	*TRP2*	YER090W	邻氨基苯甲酸盐合成酶，催化色氨酸生物合成的第1步
10	*TRP3*	YKL211C	吲哚-3-甘油磷酸合成酶，形成双功能异低聚邻氨基甲酸酯合酶，与Trp2p形成吲哚-3-甘油磷酸合酶复合体
11	*TRP4*	YDR354W	邻氨基苯甲酸盐磷酸核糖转移酶，色氨酸生物合成途径转移酶，催化邻氨基苯甲酸酯的磷化
12	*TRP5*	YGL026C	色氨酸合成酶，催化色氨酸生物合成的最后一步
13	*PHA2*	YNL316C	预苯酸脱水酶，催化苯丙氨酸生物合成途径中预苯酸转化为苯丙酮酸
14	*TYR1*	YBR166C	预苯酸脱氢酶，参与酪氨酸生物合成

2.3　倍比稀释结果

为了更深入研究酿酒酵母中芳香族氨基酸合成途径中相关基因的功能，从作者所在实验室的酿酒酵母双倍体单基因缺失株文库中找出12个与酵母芳香族氨基酸合成相关的单基因缺失菌株。以野生型BY4743菌株为对照，在YPD固体培养基和含有质量分数0.03% SDS的YPD固体培养基平板上进行倍比稀释表型试验，结果见图2。与野生型对照相比，基因 *ARO2*、*ARO7*、*ARO1*、*TRP1* 和 *TRP5* 缺失菌株在含有质量分数0.03%的SDS平板上几乎不生长，表现出对SDS明显的敏感表型。而基因 *ARO3*、*ARO4*、*ARO8*、*ARO9*、*TRP2*、*TRP3*、*TRP4*、*PHA2* 和 *TYR1* 的缺失菌株在含有质量分数0.03%的SDS平板上并没有表现出任何敏感表型，与野生型对照菌株的生长状态类似。从倍比稀释结果可以看出，对SDS具有明显敏感表型的基因缺失菌株中，*TRP1* 基因编码的酶催化色氨酸生物合成的第3步，*TRP5* 催化色氨酸生物合成的最后一步，*ARO2* 基因编码的酶催化EPSP转化合成分支酸，分支酸是色氨酸合成的前体。这3个基因分别缺失后，相应的单基因缺失菌株对SDS的毒性非常敏感，以至于无法在含有质量分数0.03% SDS的YPD固体培养基上生长。据之前的报道，当腺嘌呤、组氨酸、亮氨酸和尿嘧啶的营养缺陷型菌株在富足培养基上生长时，与没有敲除 *TRP1* 基因的菌株相比，敲除了 *TRP1* 基因的菌株表现出对SDS的敏感性。表明缺失了Trp1催化色氨酸生物合成的第3步，导致细胞不能合成色氨酸，从而无法抵抗SDS的毒性。通过外源添加色氨酸也无法缓解这种生长限制，表明细胞的生长受限并非由于缺乏色氨酸[19-20]。这一结果与该研究结果一致，即色氨酸及其生物合成途径对抵御SDS引起的细胞膜的损伤具有保护作用。此外，研究人员还利用其他可以影响细胞壁完整性途径的药物如刚果红、荧光增白剂及温度压力进行验证，结果显示敲除了 *TRP1* 基因的菌株在这些药物和压力下的生长并未受到抑制，说明SDS诱导的细胞膜受损与细胞壁完整性信号途径无关，是两个独立的过程。基于这些结果，可以推测色氨酸可能具有帮助细胞抵抗SDS毒性的作用。

2.4　敏感菌株细胞内ROS测定结果

在YPD液体培养基中添加质量分数0.015%的SDS，检测倍比稀释表型试验中对SDS敏感的

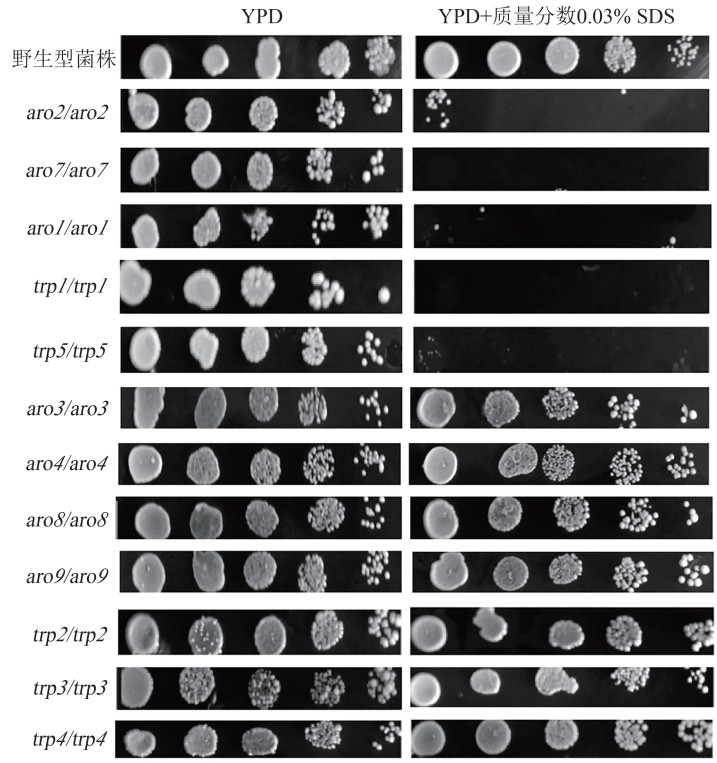
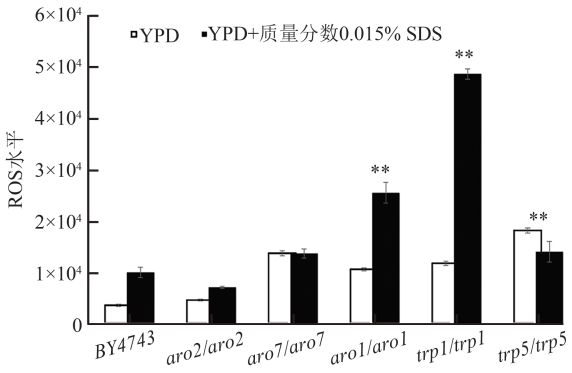


图2　酿酒酵母芳香族氨基酸合成途径中相关基因缺失菌株在质量分数0.03% SDS中的表型结果

Fig. 2　Phenotypes of the genes deletion mutants related to biosynthesis of aromatic amino acids of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.03% SDS

基因（*ARO2*、*ARO7*、*ARO1*、*TRP1* 和 *TRP5*）缺失菌株细胞内的ROS水平，结果见图3。与野生型菌株相比，菌株 *aro1/aro1*、*aro7/aro7* 和 *trp/trp1* 细胞内ROS水平显著升高，而 *aro2/aro2* 及 *trp5/trp5* 菌株细胞内的ROS水平无显著变化。



**—P<0. 01；*—P<0. 05。

图3　5个SDS敏感基因缺失菌株细胞内的ROS水平

Fig. 3　ROS level of 5 SDS-sensitivity gene deletion mutants

3　结论

作者总结了酿酒酵母中从葡萄糖到芳香族氨基酸的整个合成途径及其分支过程，并梳理了该途径涉及的基因及其在细胞内的功能。对其中12个相关基因的单基因缺失菌株进行了SDS表型检测，发现有5个缺失菌株即 *aro2/aro2*、*aro1/aro1*、*aro7/aro7*、*trp1/trp1* 和 *trp5/trp5* 对质量分数0.03%的SDS表现出显著的敏感性。进一步测定了这些敏感菌株的细胞内ROS水平，结果显示，与野生型相比，*aro1/aro1*、*aro7/aro7* 和 *trp/trp1* 的细胞内ROS水平显著升高。在合成途径中，Aro2催化EPSP转化合成分支酸，Aro1催化芳香族氨基酸前体分支酸生物合成步骤中的第2步至第6步，Aro7催化分支酸转化为预苯酸，Trp1催化色氨酸生物合成的第3步，而Trp5催化色氨酸生物合成最后一步。这些发现表明，色氨酸及其生物合成过程对于保护细胞膜免受SDS破坏具有重要作用。

参考文献

[1] 于金龙．大肠杆菌芳香族氨基酸生物合成途径的代谢调控研究[D]．北京：军事医学科学院放射与辐射医学研究所，2008.

[2] CHANG T L，TELESHOVA N，RAPISTA A，et al. SAMMA，a mandelic acid condensation polymer，inhibits

dendritic cell-mediated HIV transmission[J]. FEBS Letters, 2007,581(24):4596-4602.

[3] WARD M,YU B,WYATT V,et al. Anti-HIV-1 activity of poly(mandelic acid) derivatives[J]. Biomacromolecules, 2007,8(11):3308-3316.

[4] BROWNLEE J,HE P Q,MORAN G R,et al. Two roads diverged: the structure of hydroxymandelate synthase from *Amycolatopsis orientalis* in complex with 4-hydroxymandelate [J]. Biochemistry,2008,47(7):2002-2013.

[5] RODRIGUEZ A, CHEN Y, KHOOMRUNG S, et al. Comparison of the metabolic response to over-production of *p*-coumaric acid in two yeast strains[J]. Metabolic Engineering,2017,44:265-272.

[6] PAN X X, LI J J, WANG M G, et al. Oxidative decarboxylation of mandelic acid derivative by recombinant *Escherichia coli*: a novel method of ethyl vanillin synthesis [J]. Biotechnology Letters,2013,35(6):921-927.

[7] LI F F,ZHAO Y,LI B Z,et al. Engineering *Escherichia coli* for production of 4-hydroxymandelic acid using glucose-xylose mixture[J]. Microbial Cell Factories,2016,15:90.

[8] MÜLLER U, ASSEMA F,GUNSIOR M,et al. Metabolic engineering of the *E. coli L*-phenylalanine pathway for the production of *D*-phenylglycine (*D*-Phg)[J]. Metabolic Engineering,2006,8(3):196-208.

[9] SUN Z T, NING Y Y, LIU L X, et al. Metabolic engineering of the *L*-phenylalanine pathway in *Escherichia coli* for the production of *S*- or *R*-mandelic acid[J]. Microbial Cell Factories,2011,10:71.

[10] GOTTARDI M, REIFENRATH M, BOLES E, et al. Pathway engineering for the production of heterologous aromatic chemicals and their derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*: bioconversion from glucose[J]. FEMS Yeast Research,2017,17(4):1-22.

[11] PYNE M E, NARCROSS L, MELGAR M, et al. An engineered Aro1 protein degradation approach for increased *cis*,*cis*-muconic acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84 (17):e01095.

[12] LEVIN D E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews:MMBR,2005,69(2):262-291.

[13] MESSINA C M, FAGGIO C, LAUDICELLA V A, et al. Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on stress response in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*): regulatory volume decrease (Rvd) and modulation of biochemical markers related to oxidative stress[J]. Aquatic Toxicology,2014,157:94-100.

[14] 赵运英,曹正锋,曹春蕾. 酿酒酵母中对抗真菌药物酮康唑敏感的突变菌株的筛选[J]. 基因组学与应用生物学,2020,39(7):3093-3102.
ZHAO Y Y, CAO Z F, CAO C L. Screening of antifungal drug set oconazole sensitive mutant strains in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genomics and Applied Biology,2020,39(7):3093-3102.(in Chinese)

[15] MAO J W, LIU Q L, SONG X F, et al. Combinatorial analysis of enzymatic bottlenecks of *L*-tyrosine pathway by *p*-coumaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Letters,2017,39(7):977-982.

[16] SUASTEGUI M,MATTHIESEN J E,CARRAHER J M, et al. Combining metabolic engineering and electrocatalysis: application to the production of polyamides from sugar [J]. Angewandte Chemie International Edition,2016,55 (7):2368-2373.

[17] TRENCHARD I J,SIDDIQUI M S,THODEY K,et al. *De novo* production of the key branch point benzylisoquinoline alkaloid reticuline in yeast[J]. Metabolic Engineering,2015,31:74-83.

[18] REIFENRATH M, BOLES E. Engineering of hydroxymandelate synthases and the aromatic amino acid pathway enables *de novo* biosynthesis of mandelic and 4-hydroxymandelic acid with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering,2018,45:246-254.

[19] SCHROEDER L,IKUI A E. Tryptophan confers resistance to SDS-associated cell membrane stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS One,2019,14(3):e0199484.

[20] CAO C L, CAO Z F, YU P B, et al. Genome-wide identification for genes involved in sodium dodecyl sulfate toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BMC Microbiology,2020,20(1):34.

(责任编辑:刘冬梅)