



研究报告

3 个植物源苯甲醇酰基转移酶合成乙酸肉桂酯的研究

胡田东¹ 殷华² 毕慧萍² 刘浩¹ 庄以彬^{*2} 刘涛²

1 天津科技大学生物工程学院 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308

摘要:【背景】乙酸肉桂酯是一种重要的香料化合物,在化妆品和食品工业上具有广泛的应用,传统的生产方法主要依靠植物提取和化学合成。【目的】通过筛选不同植物源的酰基转移酶,利用大肠杆菌从头合成乙酸肉桂酯。【方法】首先,通过在苯丙氨酸高产菌 BPHE 中表达异源基因苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Arabidopsis thaliana*, AtPAL)、对羟基肉桂酰辅酶 A 连接酶(Hydroxycinnamate:CoA Ligase from *Petroselinum crispum*, Pc4CL)和肉桂酰辅酶 A 还原酶(Cinnamyl-CoA Reductase from *Arabidopsis thaliana*, AtCCR),并结合大肠杆菌自身的内源性醇脱氢酶(Alcohol Dehydrogenases, ADHs)或醛酮还原酶(Aldo-Keto Reductases, AKRs)的催化作用构建了从苯丙氨酸到肉桂醇的生物合成途径。然后,苯甲醇苯甲酰转移酶(Benzyl Alcohol *O*-Benzoyltransferase from *Nicotiana tabacum*, ANN09798; Benzyl Alcohol *O*-Benzoyltransferase from *Clarkia breweri*, ANN09796)或苯甲醇乙酰转移酶(Benzyl Alcohol Acetyltransferase from *Clarkia breweri*, BEAT)被引入到上述重组大肠杆菌中发酵培养生产乙酸肉桂酯。最后,在大肠杆菌中过表达乙酰辅酶 A 合成酶(Acetyl Coenzyme A Synthetase, ACS)来提高底物乙酰辅酶 A 的量。【结果】探讨了 3 个植物源苯甲醇酰基转移酶生物合成乙酸肉桂酯的能力,并应用于合成乙酸肉桂酯的细胞工厂,最终使乙酸肉桂酯最高产量达到 166.9±6.6 mg/L。【结论】植物源苯甲醇酰基转移酶具有一定的底物宽泛性,能以肉桂醇为底物催化合成乙酸肉桂酯。首次利用植物源的苯甲醇酰基转移酶合成乙酸肉桂酯,为微生物细胞工厂以葡萄糖作为碳源生产乙酸肉桂酯提供参考。

关键词: 乙酸肉桂酯, 生物合成, 大肠杆菌, 苯甲醇酰基转移酶, 发酵生产

Biosynthesis of cinnamyl acetate by three plant-derived benzyl acyltransferases in engineered *Escherichia coli*

HU Tiandong¹ YIN Hua² BI Huiping² LIU Hao¹ ZHUANG Yibin^{*2} LIU Tao²

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: [Background] Cinnamyl acetate is an important flavor compound and widely used in cosmetics and food industries. The traditional production methods include direct extraction from plants and chemical synthesis. [Objective] In this work, we aim to achieve *de novo* biosynthesis of cinnamyl acetate in

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31970065)

***Corresponding author:** Tel: 86-22-24828719; E-mail: zhuang_yb@tib.cas.cn

Received: 01-02-2021; **Accepted:** 28-03-2021; **Published online:** 14-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31970065)

***通信作者:** Tel: 022-24828719; E-mail: zhuang_yb@tib.cas.cn

收稿日期: 2021-02-01; **接受日期:** 2021-03-28; **网络首发日期:** 2021-04-14

Escherichia coli by screening benzyl alcohol *O*-acyl transferases from different plants and constructing biosynthetic pathway for cinnamyl acetate. **[Methods]** First, a biosynthetic pathway of aglycon cinnamyl alcohol from phenylalanine was constructed in the high-phenylalanine-producing *E. coli* strain named BPHE by expressing the enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), hydroxycinnamate:CoA ligase (4CL), and cinnamyl-CoA reductase and endogenous alcohol dehydrogenases or aldo-keto reductases in *E. coli*. Subsequently, the benzyl alcohol *O*-benzoyltransferase from *Nicotiana tabacum* (ANN09798) or benzyl alcohol *O*-benzoyltransferase from *Clarkia breweri* (ANN09796) or benzyl alcohol acetyltransferase from *Clarkia breweri* (BEAT) were introduced into the above recombinant *E. coli* strain to produce cinnamyl acetate. We further improved the acetyl-CoA production by overexpressing endogenous acetyl-CoA synthetase (ACS) in *E. coli*. **[Results]** We investigated the ability of three plant-derived benzyl alcohol acyltransferase to biosynthesize cinnamyl acetate, which were further applied for synthesizing cinnamyl acetate in *E. coli*. The production of cinnamyl acetate by the engineered *E. coli* reached 166.9 ± 6.6 mg/L. **[Conclusion]** Plant derived benzyl alcohol acyltransferase demonstrate flexibility to a wide range of substrates and can catalyze the synthesis of cinnamyl acetate by using cinnamyl alcohol as substrate. This study provides a foundation for microbial production of cinnamyl acetate and its derivatives using glucose as the renewable carbon source.

Keywords: cinnamyl acetate, biosynthesis, *Escherichia coli*, benzyl acyltransferases, fermentation

乙酸肉桂酯作为一种香精香料类化合物广泛地应用在食品添加剂、化妆品等领域^[1-2]。不仅如此,它还是较为复杂化合物的重要合成前体,如木质素丁内酯、氯霉素等^[3-4]。目前全球每年对乙酰肉桂酯的需求达 100 t 左右^[5]。天然乙酸肉桂酯主要来源于一些植物的精油,如水仙花、番石榴、风信子、肉桂等^[6-7]。从植物中提取和纯化乙酸肉桂酯,面临提取效率低、纯化成本高的问题。目前,化学合成是乙酸肉桂酯主要的生产方式^[8],但该过程会涉及危险化合物,以及高温高压的苛刻反应条件。此外,该化合物的体外酶法合成也有报道^[9-10],这种方法需要对酶进行分离纯化及加工,过程复杂耗时而且工业化成本很高,从而在一定程度上限制了对该化合物的研究和应用。

随着科学技术的进步和社会的不断发展,发展低能耗、低污染、安全的生产方式成为研究热点^[11]。微生物发酵法,相对于污染严重、高温高压条件的化学合成来讲,具备反应条件温和简单、环境污染小等优势。近几年,由于生物信息、组学技术、基因合成与基因编辑技术的发展,合成生物学逐渐进入快速发展的阶段^[12-13]。

美国加州大学 Keasling 教授利用酵母发酵合成青蒿素前体青蒿酸是合成生物学里程碑工作之

一^[14]。Ajikumar 等以大肠杆菌为底盘细胞成功构建合成紫杉二烯的工程菌株,并对磷酸甲基赤藓醇(Methyl Erythritol Phosphate, MEP)途径及下游萜类相关合成途径进行了代谢调控,使紫杉醇的中间体紫杉二烯产量高达 1.0 g/L^[15]。利用微生物以较短的发酵周期快速高效地获得植物中的活性成分,是合成生物学的重要研究方向之一^[16]。因此,构建微生物工程菌株实现乙酸肉桂酯的生物合成具有重要的意义。

前期我们在苯丙氨酸高产菌 BPHE 中构建了肉桂醇的生物合成途径,以苯丙氨酸为前体引入拟南芥的苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Arabidopsis thaliana*, AtPAL)、欧芹的对羟基肉桂酰辅酶 A 连接酶(Hydroxycinnamate: CoA Ligase from *Petroselinum crispum*, Pc4CL)、拟南芥的肉桂酰辅酶 A 还原酶(Cinnamyl-CoA Reductase from *Arabidopsis thaliana*, AtCCR),并结合大肠杆菌自身的内源性醇脱氢酶(Alcohol Dehydrogenases, ADHs)或醛酮还原酶(Aldo-Keto Reductases, AKRs)的催化作用,构建出一条肉桂醇的生物合成途径^[17]。在此基础上,本文首次探索利用植物源苯甲醇酰基转移酶合成乙酸肉桂酯的研究,分别考察了烟草的苯甲醇苯甲酰转移酶

(ANN09798)^[18] (GenBank: AF500202.1)、仙女扇的苯甲醇苯甲酰转移酶(ANN09796)^[18] (GenBank: AF500200.1)及仙女扇的苯甲醇乙酰转移酶(BEAT)^[19] (GenBank: AF043464.1)对肉桂醇的乙酰化效率,在大肠杆菌中实现从葡萄糖合成乙酸肉桂酯;进一步采用过表达乙酰辅酶 A 合成酶(Acetyl Coenzyme A Synthetase, ACS)提高大肠杆菌乙酰辅酶 A 的供给。本研究以期微生物细胞工厂以葡萄糖作为碳源生产乙酸肉桂酯提供了重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及目的基因扩增模板

大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21(DE3)及其改造菌株均由本实验室保存; pCDFDuet 载体和 pET-28a 载体均由本实验室保存; 苯甲醇苯甲酰转移酶(ANN09798、ANN09796)及苯甲醇乙酰转移酶(BEAT)的基因序列均根据大肠杆菌密码子偏好性进行优化,并由苏州金唯智生物科技有限公司合成;以大肠杆菌 BL21(DE3)的基因组 DNA 为模板 PCR 扩增出乙酰辅酶 A 合成酶(ACS)的基因序列。

1.1.2 培养基

用于分子克隆、种子液培养、诱导蛋白表达、两步发酵的第 1 步培养的 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

用于两步法发酵的第 2 步发酵培养 M9Y 培养基(mL): 5 \times M9 缓冲液 200.0, 0.025%酵母粉母液 700.0, 20%葡萄糖母液 100.0, 1 mol/L MgSO₄ 2.0, 1 mol/L CaCl₂ 0.1。

5 \times M9 缓冲液(g/L): Na₂HPO₄·12H₂O 85.5, KH₂PO₄ 15.0, NaCl 2.5, NH₄Cl 5.0。

卡那霉素母液 50 mg/L 和链霉素母液 100 mg/L 按需添加到培养基中。

1.1.3 主要试剂和仪器

核酸 Marker 1 kb DNA Ladder, TaKaRa Biotechnology 公司; 高保真 DNA 聚合酶、PCR 试剂、Nde I 内切酶、BamH I 内切酶、Sac I 内切酶和 EcoR I 内切酶及 ClonExpress[®]多片段一步克隆技术试剂盒等, 南京诺唯赞生物科技有限公司; PCR 产物回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、凝胶回收试剂盒, 北京天根生化科技有限公司。

PCR 扩增仪, Eppendorf 公司; 核酸/垂直电泳仪, Bio-Rad 公司; 电转化仪和转化杯(2 mm), Eppendorf 公司; 紫外分光光度计、高效液相色谱仪, 岛津仪器有限公司; 安捷伦液质联用色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建

研究中使用的所有引物均列于表 1 中。BEAT、ANN09796、ANN09798 等 3 条基因的质粒构建, 分别利用引物对 BEAT-5F/BEAT-3R、ANN09796-5F/ANN09796-3R 和 ANN09798-5F/ANN09798-3R, 以根据大肠杆菌密码子偏好性优化的基因 BEAT、ANN09796、ANN09798 为模板进行 PCR 扩增, 通过 Nde I 和 BamH I 酶切基因, 并连接到 Nde I 和 BamH I 酶切的载体 pET-28a 中(表 2), 分别得到重组质粒 pET-28a-BEAT、

表 1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Sequence (5'→3')	Source
BEAT-5F	CATATGAACGTGACCATGCATAGC	This study
BEAT-3R	GGATCCTTAGCTCACATAGCTCAGCAG	This study
ANN09796-5F	CATATGGCTCACGACCAGTCTCTG	This study
ANN09796-3R	GGATCCTTACAGAGAAGACTGGGTGAAG	This study
ANN09798-3R	GGATCCTTACAGAGCCGGACGGATG	This study
ANN09798-5F	CATATGGACTCTAAACAGTCTTCTGAAC	This study
ACS-5F	GAATCAAGGAGATGAGCCAAATTCACAAACAC	This study
ACS-3R	GAGCTCTTACGATGGCATCGCATAG	This study

表 2 本研究使用的质粒及菌株

Table 2 Strains and plasmids used in this study

Plasmids/Strains	Description	Reference
Plasmids		
pCDFDuet	CDF ori with P _{T7} ; SM ^R	Novagen
pET-28a	pBR322 ori with P _{T7} ; Kan ^R	Novagen
pCDFDuet- <i>AtCCR-Pc4CL-AtPAL</i>	pCDFDuet carrying <i>AtCCR</i> , <i>Pc4CL</i> and <i>AtPAL</i>	[17]
pET-28a-BEAT	pET-28a carrying BEAT	This study
pET-28a-BEAT-ACS	pET-28a carrying BEAT and ACS	This study
pET-28a-ANN09796	pET-28a carrying ANN09796	This study
pET-28a-ANN09798	pET-28a carrying ANN09798	This study
Strains		
BPHE	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with gene <i>tyrR</i> , <i>tyrA</i> and <i>trpE</i> deleted	[17]
BPHE00	<i>E. coli</i> BPHE containing pET-28a	This study
BPHE01	<i>E. coli</i> BPHE containing pCDFDuet- <i>AtCCR-Pc4CL-AtPAL</i>	This study
BPHE02	<i>E. coli</i> BPHE01 containing pET-28a-BEAT	This study
BPHE03	<i>E. coli</i> BPHE01 containing pET-28a-ANN09798	This study
BPHE04	<i>E. coli</i> BPHE01 containing pET-28a-ANN09796	This study
BPHE05	<i>E. coli</i> BPHE01 containing pET-28a-BEAT-ACS	This study

pET-28a-ANN09796 (图 1A)和 pET-28a-ANN09798 (图 1B)。乙酰辅酶 A 合成酶基因 ACS 通过 PCR 从大肠杆菌 BL21(DE3)的基因组 DNA 中扩增而来。通过使用限制性位点 *Sac* I 和 *Eco*R I 将 ACS 片段酶连插入 pET-28a-BEAT 来构建 pET-28a-BEAT-ACS (图 1C)。关于构建重组质粒 pCDFDuet-*AtCCR-Pc4CL-AtPAL* (图 1D)的工作参见文献[17]。

1.2.2 微生物发酵生产乙酸肉桂酯

目标化合物采用两步发酵法生产。第 1 阶段,将重组大肠杆菌菌株 BPHE02 单克隆接种到含有 5 mL 液体 LB 培养基的玻璃试管中,37 °C、200 r/min 培养 12 h。然后用移液枪吸出 1 mL 的 BPHE02 种子液转移至 50 mL 液体 LB 培养基中,同时加入 50 μL 卡那霉素和链霉素。37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 时,添加终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside, IPTG)于菌液中,然后在 16 °C、200 r/min 诱导培养 12–16 h。最后收集细胞,即在冷冻离心机中 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min。然后,用 M9Y 液体培养基将细胞重悬至 OD_{600} 为 2.0。第 2 阶段,将上述重悬的细胞置于 30 °C、

200 r/min 连续发酵培养 96 h。以一定时间间隔取样,利用紫外分光光度计测量细胞 OD_{600} 值,并利用高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)检测发酵液中代谢物分析,进样量 20 μL。BPHE03、BPHE04、BPHE05 发酵同样采用 50 mL 体积两步发酵法。

1.2.3 化学分析与定量

使用配备 1260 Infinity UV 检测器和配备 ESI 电离探针的 Bruker microQ-TOF II 质谱仪的 Agilent 1260 系统对重组菌株的发酵液进行 LC-MS 分析,并使用 Innoval C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 粒径 5 μm)对重组菌株的发酵液进行 HPLC 分析。乙酸肉桂酯的洗脱条件如下:溶剂 A, H₂O (含 0.1% 甲酸);溶剂 B, 甲醇;流速, 1 mL/min; 0–5 min, 95% A 和 5% B; 5–45 min, 95% A 和 5% B 到 100% B (梯度洗脱); 45–55 min, 100% B; 55–65 min, 含 5% B。紫外检测波长在 254 nm 处。所采用的 MS 分析为阳离子模式。标准校准曲线是由一系列已知浓度乙酸肉桂酯化合物的生成。本研究所有实验都采用一式 3 份进行,而且重复至少 2 次,本实验中所涉及的滴度表示为平均值±SD。

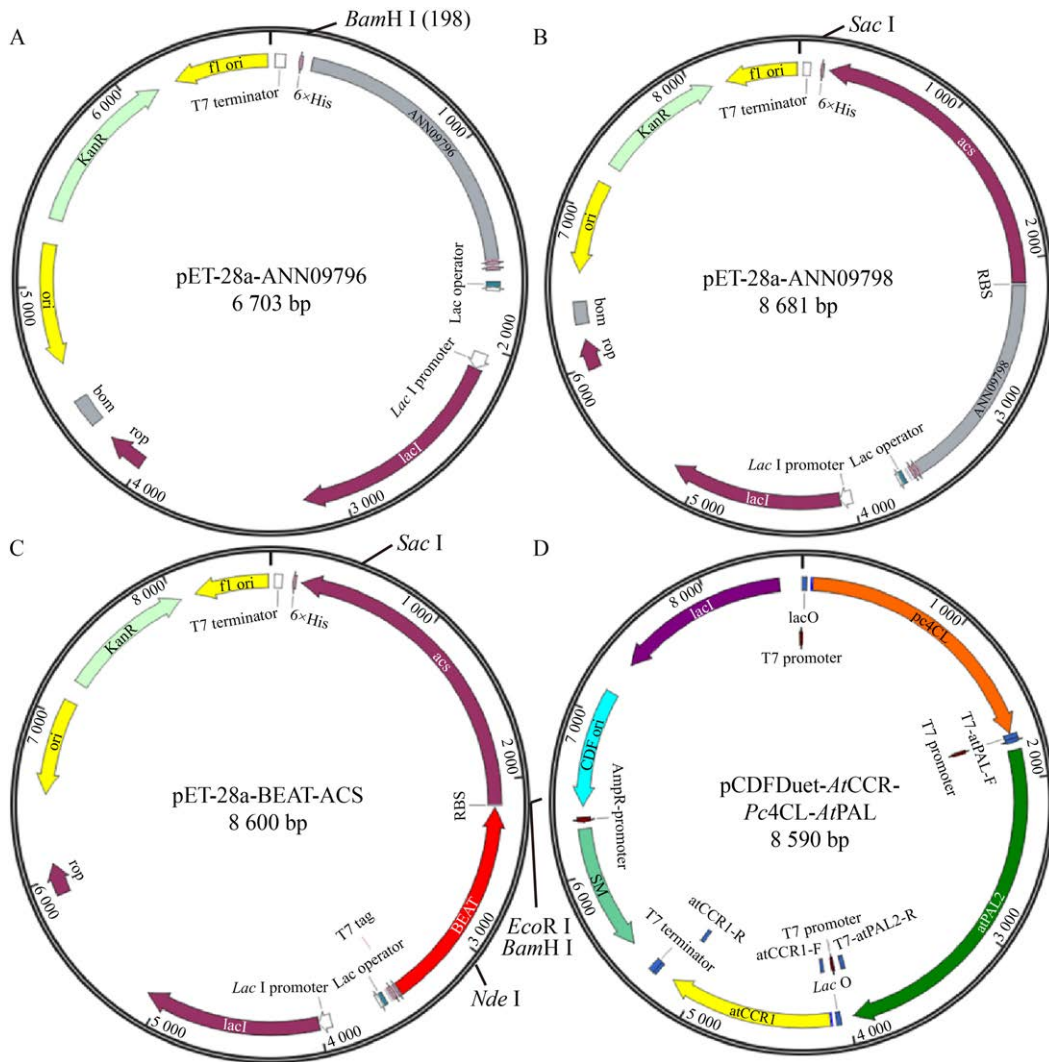


图 1 重组质粒图谱

Figure 1 Maps of recombinant plasmids

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌发酵生产肉桂醇

根据植物中木质素单体的生物合成途径,我们构建了肉桂醇的生物合成途径(图 2),通过选择欧芹来源的对羟基肉桂酰辅酶 A 连接酶(*Pc4CL*)和拟南芥来源的苯丙氨酸解氨酶(*AtPAL*)及肉桂酰辅酶 A 还原酶(*AtCCR*)构建出肉桂醛的生物合成途径。大肠杆菌 BL21(DE3)中内源的 ADHs 或 AKRs 酶具有较高的酶活性,因此没有进一步对这些还原酶进行过表达。这些酶能够帮助我们将重组大肠杆

菌所产生的肉桂醛还原成肉桂醇,为下一步合成乙酸肉桂酯提供底物。

对含有质粒 pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* 的重组大肠杆菌菌株 BPHE01 进行两步发酵法发酵。以肉桂醇标品为阳性对照,采用 LC-MS 法对肉桂醇进行了定性分析,并对其产量进行了 HPLC 定量分析。BPHE01 生产肉桂醇的滴度在 24 h 内达到 285.3 ± 15.2 mg/L(图 3A)。同时定量了细胞内外的肉桂醇,发现几乎所有的肉桂醇都被运输到细胞外^[17]。

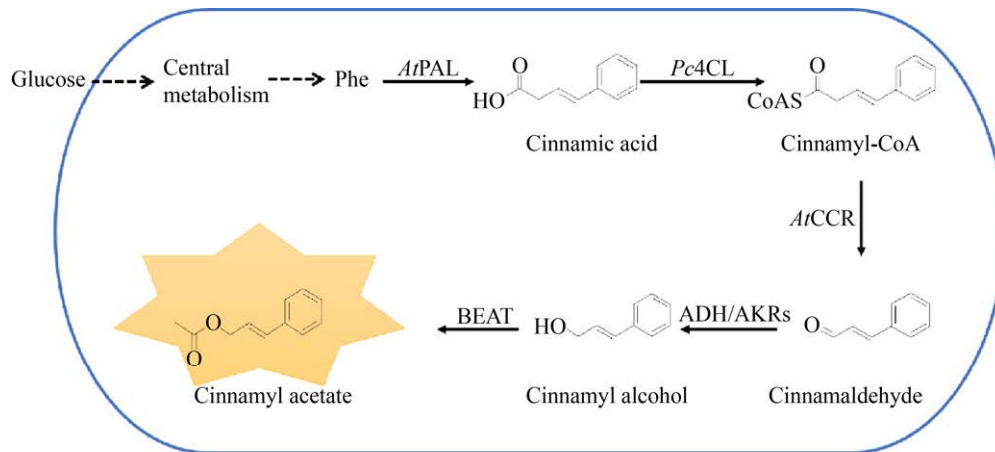


图 2 乙酸肉桂酯的生物合成途径

Figure 2 Biosynthetic pathway of cinnamyl acetate from glucose

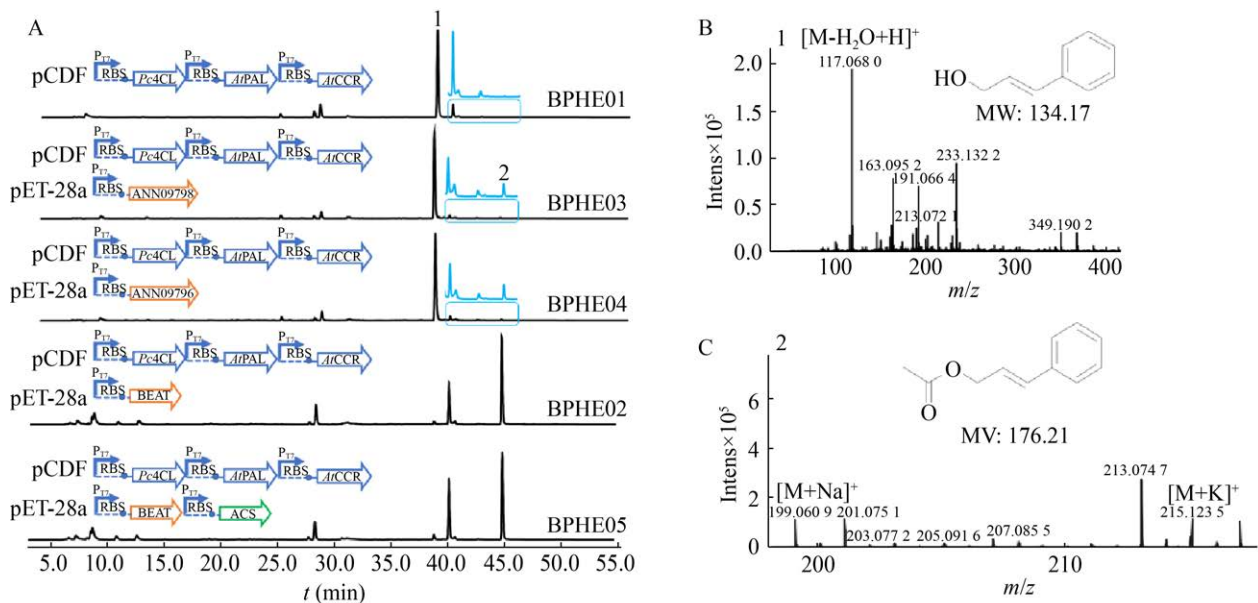


图 3 乙酸肉桂酯生物合成中酰基转移酶的筛选

Figure 3 Screening acyltransferases for producing cinnamyl acetate in engineered strains

注: A: 对各重组菌株的发酵液上清 HPLC 检测; 重组菌株 BPHE01 含有质粒 pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* (对照), 重组菌株 BPHE02 含有质粒 pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* 和 pET-28a-BEAT, 重组菌株 BPHE03 含有质粒 pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* 和 pET-28a-ANN09798, 重组菌株 BPHE04 含有质粒 pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* 和 pET-28a-ANN09796, 重组菌株 BPHE05 含有质粒 pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* 和 pET-28a-BEAT-ACS。B: 质谱检测在 39.5 min 时, 洗脱的化合物在 m/z 117.068 0 处一准分子离子峰 $[M-H_2O+H]^+$ 。C: 质谱检测在 44.5 min 时, 洗脱的化合物在 m/z 199.060 9 处一准分子离子峰 $[M+Na]^+$ 和在 m/z 215.123 5 处一准分子离子峰 $[M+K]^+$ 。

Note: A: HPLC analysis of the products in the fermentation supernatant of recombinant strains: strain BPHE01 harboring plasmid pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* (as control), strain BPHE02 harboring plasmids pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* and pET-28a-BEAT, strain BPHE03 harboring plasmids pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* and pET-28a-ANN09798, strain BPHE04 harboring plasmids pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* and pET-28a-ANN09796, strain BPHE05 harboring plasmids pCDFDuet-*AtCCR*-*Pc4CL*-*AtPAL* and pET-28a-BEAT-ACS. B: Mass spectrum of product 1 eluted at 39.5 min with a molecular ion $[M-H_2O+H]^+$ at m/z 117.068 0, representing cinnamyl alcohol. C: Mass spectrum of product 2 eluting at 44.5 min with a molecular ion $[M+Na]^+$ at m/z 199.060 9 and $[M+K]^+$ at m/z 215.123 5 representing cinnamyl acetate.

2.2 乙酸肉桂酯生物合成中酰基转移酶的筛选

我们将以下 3 组质粒 pET-28a-BEAT 与 pCDFDuet-*AtCCR-Pc4CL-AtPAL*、pET-28a-ANN09798 与 pCDFDuet-*AtCCR-Pc4CL-AtPAL*、pET-28a-ANN09796 与 pCDFDuet-*AtCCR-Pc4CL-AtPAL* 分别转入高效合成苯丙氨酸的重组大肠杆菌 BPHE01, 得到了 BPHE02、BPHE03 和 BPHE04 这 3 种重组菌株。经两步发酵法后, 对各重组菌株的发酵液 HPLC 检测, 结果显示上述 3 种重组细胞在 $t_R=44.5$ min 时有新化合物产生, 与标品乙酸肉桂酯的出峰时间相同。质谱分析表明, 该化合物在 m/z 199.060 9 处有一准分子离子峰($[M+Na]^+$), 在 m/z 215.123 5 处一准分子离子峰($[M+K]^+$), 提示化合物的分子量为 176.21, 同乙酸肉桂酯的相对分子质量一致, 该产物确定为乙酸肉桂酯(图 3C)。BPHE03 和 BPHE04 的产量很低, 分别仅有(3.5±0.6) mg/L 和 (2.5±0.3) mg/L, 而 BPHE02 的产量最高可达 135.9±18.4 mg/L (图 3B)。表明 ANN09796 和 ANN09798 这 2 个酰基转移酶对乙酸肉桂酯的生物合成效率非常低, BEAT 的生物合成效率大约是前两者 40 倍。利用 HPLC 检测 BPHE02 工程菌株发酵液, 发现除了乙酸肉桂酯($t_R=44.5$ min), 在 $t_R=40$ min 时也有新峰出现, BPHE01、BPHE03 和 BPHE04 等的发酵液也同样产生该化合物。通过质谱分析该化合物在分子离子量为 m/z 149.066 6 $[M+H]^+$, 对应为肉桂酸。该化合物与肉桂酸标品出峰时间也一致, 因此确定为肉桂酸。我们推测可能是乙酸肉桂酯对 *Pc4CL* 具有抑制作用, 引起了肉桂酸的积累。

2.3 提高乙酸肉桂酯前体供应

乙酰 CoA 为肉桂醇酰基化的乙酰提供体, 为了增加乙酰 CoA 的供应, 我们过表达大肠杆菌内源的乙酰辅酶 A 合成酶, 这一方法已经成功应用于提高乙酰辅酶 A 的供给^[20]。我们通过 PCR 从大肠杆菌 BL21(DE3)的基因组 DNA 中扩增出乙酰辅酶 A 合成酶(ACS)的基因, 然后构建重组质粒

pET-28a-BEAT-ACS 并将该质粒转化 BPHE01 菌株得到重组菌株 BPHE05。该重组菌株两步发酵法发酵后经 HPLC 检测发酵液, 乙酸肉桂酯产量达 166.9±6.6 mg/L, 相比 BPHE02 重组菌株的产量 135.9±18.4 mg/L 提升了 20% (图 4)。另外, 在 BPHE05 中也观察到了肉桂酸的积累。

3 讨论与结论

天然产物的微生物异源合成是一种重要的生产方式, 具有绿色可持续发展的优点。苯丙氨酸衍生的化合物具有广泛的工业和商业应用, 随着代谢工程的发展, 用于合成苯丙氨酸衍生物的工程微生物也已经取得了重要进展^[21]。这些研究的快速发展为乙酸肉桂酯的从头合成工程菌构建奠定了基础。本研究中, 我们在前期创建了肉桂醇工程细胞的基础上构建乙酸肉桂酯的工程细胞。乙酸肉桂酯形成由酰基转移酶催化。植物中 BAHD 酰基转移酶是催化酰基化反应的重要酶类之一。BAHD 名称是根据该家族的 4 种代表性的酶的英文首字母所组成的, 分别是苯甲醇乙酰转移酶(BEAT)、花青素羟化肉桂酰基转移酶(Anthocyanin Hydroxylated Cinnamyl Transferase, AHCT)、邻氨基苯甲酸盐 N-羟化桂皮酰基/苯甲酰基转移酶、去乙酰化 Vindoline 4-O-乙酰基转移酶(Deacetylated Vindoline 4-O-Acetyltransferase, DAT)^[22]。BAHD 家族酰基

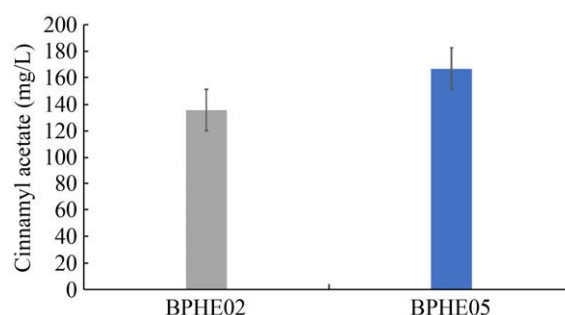


图 4 BPHE02 和 BPHE05 菌株合成乙酸肉桂酯产量的比较

Figure 4 Comparison of the production of cinnamyl acetate in strains BPHE02 and BPHE05

转移酶具有较好的底物宽泛性。该类酰基转移酶家族是植物中特有的对植物次级代谢产物进行酰基化修饰的一类蛋白,能够利用酰基辅酶 A 作为底物,产生各种挥发性脂类、修饰后的花青素以及与植物抵抗病原微生物侵害的相关的化合物。我们测试了来自烟草的苯甲醇苯甲酰转移酶(ANN09798)、仙女扇的苯甲醇苯甲酰转移酶(ANN09796)和苯甲醇乙酰转移酶(BEAT)等 3 种 BAHD 家族的酰基转移酶,以肉桂醇和乙酰辅酶 A 作为底物合成乙酸肉桂酯的研究,发现 3 种酶均可合成目标产物。相对于前两者,发现仙女扇的苯甲醇乙酰转移酶(BEAT)对肉桂醇的酰基化催化活性要高出 40 倍左右。此外,我们通过前体代谢通量增强来进一步增加乙酸肉桂酯的生产能力。乙酰辅酶 A 合成酶(ACS)的主要作用是将大肠杆菌发酵产生的乙酸转化为乙酰 CoA,我们采用过表达大肠杆菌 BL21(DE3)内源的 ACS 提高乙酰 CoA 产量,从而提高苯甲醇乙酰转移酶(BEAT)的前体供应。最终,乙酸肉桂酯的产量达到(166.9±6.6) mg/L。我们探讨了苯甲醇乙酰转移酶等 BAHD 酰基转移酶的底物宽泛性,能够以肉桂醇为底物催化合成乙酸肉桂酯。本文首次研究了植物源苯甲醇酰基转移酶合成乙酸肉桂酯的能力,为创建合成乙酸肉桂酯的细胞工厂提供参考。

目前,化学合成法利用溴化肉桂酯和乙酸钠,在季铵盐作为催化剂下可以实现乙酸肉桂酯的合成,但该合成方法需要高温等条件而且还存在副反应^[8]。体外酶法合成乙酸肉桂酯通过底物肉桂醇和醋酸乙烯,在脂肪酶的作用下转化率高达 93%,但该方法需要大量原料肉桂醇、醋酸乙烯及反应溶剂己烷^[9],这些有机化合物的获取不具有可持续性,并且脂肪酶的生产增加了成本。以葡萄糖为原料一步法微生物合成乙酸肉桂酯,具有绿色及可持续发展的优点。目前该技术离工业化生产还具有较大的距离,主要受限于乙酸肉桂酯对微生物的毒性,抑制大肠杆菌生长等宿主细胞的

生长。以后研究可采用两相发酵的方法减少目标产物的积累,降低毒性,并结合驯化筛选对乙酸肉桂酯耐受性更高的菌株来实现这一目标。

REFERENCES

- [1] Dong H, Secundo F, Xue CH, Mao XZ. Whole-cell biocatalytic synthesis of cinnamyl acetate with a novel esterase from the DNA library of *Acinetobacter hemolyticus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(10): 2120-2128
- [2] Schrader J, Etschmann MMW, Sell D, Hilmer JM, Rabenhorst J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds-current industrial processes and future prospects[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(6): 463-472
- [3] Fodor G, Toth J, Kovacs E, Kiss J. Synthesis of chloramphenicol[J]. Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of Chemical Science, 1955, 4(3): 391-399
- [4] Singh B, Sharma S, Taneja SC, Shankar R, Sangwan PL. B-(Methoxy-(substitutedphenyl)-methyl)- γ -butyrolactones: a short synthesis from cinnamyl acetate[J]. Synthetic Communications, 2016, 46(4): 361-366
- [5] Bhatia SP, Wellington GA, Cocchiara J, Lalko J, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on methyl cinnamate[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(1): S113-S119
- [6] Kamaliroosta L, Ghavami M, Gharachorloo M, Azizinezhad R. Isolation of cinnamon extract and assessing its effect on the stability of sunflower oil[J]. Iranian Journal of Nutrition Food Science and Technology, 2011, 6: 13-22
- [7] Steinhaus M, Sinuco D, Polster J, Osorio C, Schieberle P. Characterization of the key aroma compounds in pink guava (*Psidium guajava* L.) by means of aroma Re-engineering experiments and omission tests[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(7): 2882-2888
- [8] Devulapelli VG, Weng HS. Synthesis of cinnamyl acetate by solid-liquid phase transfer catalysis: kinetic study with a batch reactor[J]. Catalysis Communications, 2009, 10(13): 1638-1642
- [9] Cai XH, Wang W, Lin L, He DN, Shen YL, Wei W, Wei DZ. Cinnamyl esters synthesis by lipase-catalyzed transesterification in a non-aqueous system[J]. Catalysis Letters, 2017, 147(4): 946-952
- [10] Yadav GD, Devendran S. Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(3): 496-502
- [11] Khalil AS, Collins JJ. Synthetic biology: applications come of age[J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(5): 367-379
- [12] Chubukov V, Mukhopadhyay A, Petzold CJ, Keasling JD, Martín HG. Synthetic and systems biology for microbial production of commodity chemicals[J]. Npj Systems Biology and Applications, 2016, 2: 16009

- [13] Kim E, Moore BS, Yoon YJ. Reinvigorating natural product combinatorial biosynthesis with synthetic biology[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(9): 649-659
- [14] Nielsen J, Keasling JD. Engineering cellular metabolism[J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1185-1197
- [15] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KEJ, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 70-74
- [16] Smanski MJ, Zhou H, Claesen J, Shen B, Fischbach MA, Voigt CA. Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(3): 135-149
- [17] Bi HP, Wang S, Zhou W, Zhuang YB, Liu T. Producing gram-scale unnatural rosavin analogues from glucose by engineered *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(8): 1931-1940
- [18] D'Auria JC, Chen F, Pichersky E. Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1): 466-476
- [19] Dudareva N, D'Auria JC, Nam KH, Raguso RA, Pichersky E. Acetyl-CoA: benzylalcohol acetyltransferase: an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*[J]. *The Plant Journal*, 1998, 14(3): 297-304
- [20] Lin H, Castro NM, Bennett GN, San KY. Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(6): 870-874
- [21] Huccetogullari D, Luo ZW, Lee SY. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 41
- [22] Liu YY, Mo T, Wang XH, Shi SP, Liu X, Tu PF. Research progress of plant BAHD acyltransferase family[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(12): 2175-2182 (in Chinese)
- 刘雨雨, 莫婷, 王晓晖, 史社坡, 刘晓, 屠鹏飞. 植物来源 BAHD 酰基转移酶家族研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(12): 2175-2182