

## 研究报告

## 伞形酮产生菌的构建

宋佳<sup>1</sup>, 孙博<sup>2</sup>, 王荣香<sup>3</sup>, 闫雪<sup>4</sup>, 王大为<sup>2</sup>, 李光涛<sup>2</sup>, 张万忠<sup>3</sup>, 赵晨<sup>\*1</sup>

1 国家粮食和物资储备局科学研究院粮食储运研究所 粮食储运国家工程研究中心, 北京 100037

2 国家粮食和物资储备局科学研究院中心实验室, 北京 100037

3 沈阳化工大学制药与生物工程学院, 辽宁 沈阳 110142

4 新希望六和股份有限公司 畜禽饲料与畜禽产品质量安全控制四川省重点实验室, 四川 成都 610023

宋佳, 孙博, 王荣香, 闫雪, 王大为, 李光涛, 张万忠, 赵晨. 伞形酮产生菌的构建[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3079-3093  
Song Jia, Sun Bo, Wang Rongxiang, Yan Xue, Wang Dawei, Li Guangtao, Zhang Wanzhong, Zhao Chen. Construction of an umbelliferone-producing strain[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3079-3093

**摘要:**【背景】伞形酮为香豆素类化合物, 具有较广泛的药用价值, 也是重要的工业制品原料。传统的植物提取成本较高, 应开发更有效的获取技术。【目的】利用微生物为宿主异源合成伞形酮。【方法】对不同植物来源香豆素类化合物合成基因进行整合; 以酿酒酵母为宿主, 通过对宿主酪氨酸代谢通路的改造构建表达宿主, 进一步将表达基因转化到改造后的宿主中。【结果】获得产伞形酮的酵母菌株, 产量为 $(67.39 \pm 4.87) \mu\text{g/mL}$ 。【结论】通过整合生物合成基因可获得香豆素类天然产物表达菌株。

**关键词:** 香豆素; 伞形酮; 生物合成; 表达基因

## Construction of an umbelliferone-producing strain

SONG Jia<sup>1</sup>, SUN Bo<sup>2</sup>, WANG Rongxiang<sup>3</sup>, YAN Xue<sup>4</sup>, WANG Dawei<sup>2</sup>, LI Guangtao<sup>2</sup>, ZHANG Wanzhong<sup>3</sup>, ZHAO Chen<sup>\*1</sup>

1 National Engineering Research Center of Grain Storage and Logistics, Institute of Grain Storage and Logistics, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China

2 Central Laboratory, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China

3 College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, Liaoning, China

4 Key Laboratory of Quality Control for Feed and Products of Livestock and Poultry of Sichuan Province, New Hope Liuhe Limited Company, Chengdu 610023, Sichuan, China

**Abstract:** [Background] Umbelliferone, a compound of the coumarin family, demonstrates the medical

基金项目: 中央级公益性基本科研业务费专项(ZX1936, ZX2004, JY2102)

Supported by: Fundamental Research Funds of Non-Profit Central Institutes of China (ZX1936, ZX2004, JY2102)

\*Corresponding author: E-mail: zc@ags.ac.cn

Received: 2021-12-23; Accepted: 2022-03-27; Published online: 2022-04-13

value in a wide scope and is important raw material for industrial products. Due to the high cost of extraction from plants, more efficient methods for producing umbelliferone remain to be developed. **[Objective]** To heterogeneously produce umbelliferone by microorganisms. **[Methods]** In this study, the genes for the synthesis of coumarins were assembled from different plants. *Saccharomyces cerevisiae* was used as the expression host in which the metabolic pathway of tyrosine was modified. We then introduced the assembled genes to *S. cerevisiae*. **[Results]** The strain producing umbelliferone was successfully obtained, which showed the umbelliferone titer of  $(67.39 \pm 4.87) \mu\text{g/mL}$ . **[Conclusion]** The strains producing natural products of coumarins could be constructed via integration of the biosynthetic genes.

**Keywords:** coumarins; umbelliferone; biosynthesis; expression gene

伞形酮, 又名伞形内酯, 分子式为  $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$ , 分子量为 162.142 1 Da, 是一种广泛存在于植物中的香豆素, 也是自然界中一种重要的苯并吡喃酮类植物激素。伞形酮的命名是由于该化合物多产自伞形科植物, 其中包括重要的经济作物, 例如变豆菜、当归、细辛、芹菜、孜然、茴香、欧芹和大猪草等<sup>[1-2]</sup>。植物香豆素通常被称为植物抗毒素, 被认为是在生物和非生物胁迫条件下植物自身合成的防御性化合物<sup>[3-4]</sup>。

伞形酮具有多种药理作用。在抑菌方面, 伞形酮被证明对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌及对甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)和大肠杆菌均具有一定抑制活性<sup>[5]</sup>; 在抗氧化方面, 伞形酮具有清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼[1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl, DPPH]及一些氧自由基能力<sup>[6-8]</sup>; 动物实验表明, 该类化合物对糖尿病具有一定治疗作用<sup>[9-12]</sup>。伞形酮具有抗肿瘤活性<sup>[13-16]</sup>, 单独使用及与 5-氟尿嘧啶的协同作用是一种有效和潜在的化疗药物, 可对抗 1,2-二甲胂诱导的结肠癌, 伞形酮可减轻 5-氟尿嘧啶的副作用<sup>[13]</sup>; 伞形酮及其结构类似物对阿兹海默症具有一定的缓解作用<sup>[17-18]</sup>; 其对肝细胞也具有一定的保护作用<sup>[19]</sup>。同时, 伞形酮还是化妆品、工业品等的重要原料, 具有广阔的

需求空间。

目前, 伞形酮的获取主要靠植物提取和化学合成, 价格较高。然而通过整合不同植物中伞形酮合成路径基因, 在微生物中实现表达是获取该天然产物的另一种有效办法。伞形酮生物合成路径已基本明确, 可以苯丙氨酸和酪氨酸为合成前体, 经若干酶催化步骤获得伞形酮(图 1)<sup>[20]</sup>。近年来已有研究团队成功获得表达伞形酮的大肠杆菌工程菌株<sup>[20-21]</sup>。考虑到香豆素类天然产物的生物合成有 CYP450s 参与, 而酵母在表达 CYP450s 时相较原核微生物具有一定优势<sup>[21-22]</sup>, 可实现更多植物源天然产物的合成。因此, 本研究选取酵母作为表达宿主, 并通过整合相关生物合成基因获得伞形酮表达菌株, 以期通过微生物发酵获得该类高附加值天然产物提供前期基础及参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用菌株和质粒如表 1 所示。编码 RgTAL (*Rhodotorula glutinis* tyrosine ammonia lyase, AGZ04575.1)、Pc4CL (*Petroselinum crispum* 4-coumarate: CoA ligase, P14912.1)和 AdC2'H (*Angelica decursiva* p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase, QCY50327.1)的基因序列。使用 geneart 对其进行酿酒酵母密码子偏好性优化, 并由生工生物

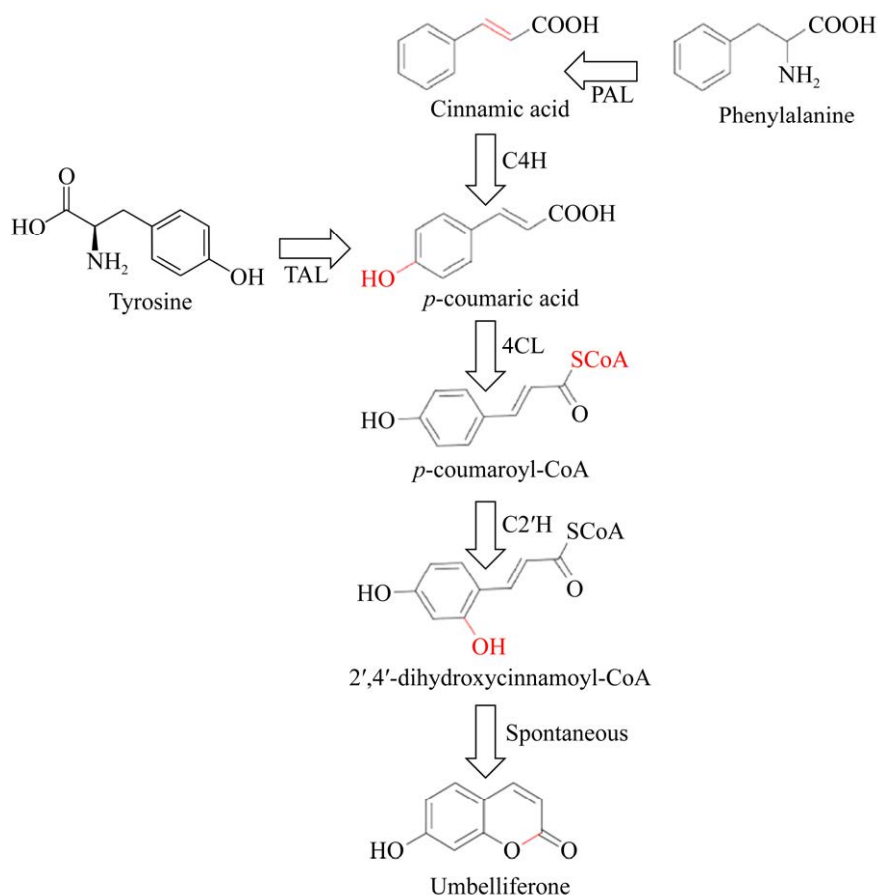


图 1 伞形酮生物合成路径

Figure 1 Pathway of umbelliferone biosynthetic pathway.

工程(上海)股份有限公司合成。本研究中所涉及的载体、菌株构建所用引物如表 1 所示。

本研究中所使用的大肠杆菌及酿酒酵母培养基参照文献[20-22]制备。

## 1.2 表达宿主的改造

宿主改造所用引物如表 2 所示。

### 1.2.1 基因敲除

以菌株 CEN.PK2-1C 基因组 DNA 为模板, 在待敲除基因 *aro10*、*PDC5* 上下游分别设计一对引物 *aro10L*-F/*aro10L*-R、*aro10R*-F/*aro10R*-R 和 *PDC5L*-F/*PDC5L*-R、*PDC5R*-F/*PDC5R*-R, 每对引物 PCR 扩增 500 bp 左右片段, 分别为 *aro10L*、*aro10R* 和 *PDC5L*、*PDC5R*。以质粒 pUG66 和 pESC-LEU 为模板, 利用引物对 *bleR*-F/*bleR*-R

和 *PDC5L*-F/*PDC5L*-R 扩增获得 *ble<sup>R</sup>* 与 LEU 片段。片段 *ble<sup>R</sup>* 与片段 *aro10* 和 *PDC5* 通过重叠 PCR 连接获得 *aro10-bleR* 片段; LEU 与 *PDC5L*、*PDC5R* 通过重叠 PCR 连接获得 *PDC5-LEU*。

### 1.2.2 Aro4 与 Aro7 的点突变

以菌株 CEN.PK2-1C 基因组 DNA 为模板, 使用引物对 *aro4* large-F/*aro4* large-R 和 *aro7* large-F/*aro7* large-R 扩增 *aro4* 和 *aro7* 全长基因, 利用 *EcoR* I/*Hind* III 和 *EcoR* I/*Sph* I 酶识别位点将 *aro4* 和 *aro7* 基因分别整合到 pUC57 中, 获得 pUC57-*aro4* 和 pUC57-*aro7*。利用引物对 *aro4* K229L-F/*aro4* K229L-R, 以 pUC57-*aro4* 为模板进行扩增, 将 229 位的赖氨酸(K)替换为亮氨酸(L); 同样地, 利用引物 *aro7* G141S-F/*aro7*

表 1 本研究所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids in this study

菌株/质粒 Strains/Plasmids	基因型/用途 Genotype/Use	来源 Source
<i>Escherichia coli</i> Top10	F' [ <i>lacIq</i> , <i>Tn10</i> (TetR)] <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i>	实验室保存
	<i>recA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Kept in our laboratory
CEN.PK2-1C	MATa $\Delta$ <i>his3 leu2-3_112 ura3-52 trp1-289</i> MAL2-8c SUC2	euroscarf
CEN.PK2-1C-1	CEN.PK2-1C $\Delta$ <i>aro10-bleR</i> $\Delta$ PDCC5-LEU	本研究
		This study
CEN.PK2-1C-2	CEN.PK2-1C-1 <i>pESCtp01-aro4K229L-aro7G141S</i>	本研究
		This study
CEN.PK2-1C-3	CEN.PK2-1C-2 TAL-4CL-C2'H	本研究
		This study
pUC57	用于常规载体构建 For routine vector construction	实验室保存 Kept in our laboratory
pUC-TAL	含有 RgTAL 密码子优化后序列的质粒 Vector containing codon optimized RgTAL	基因合成 Gene synthesis
pUC-4CL	含有 Pc4CL 密码子优化后序列的质粒 Vector containing codon optimized Pc4CL	基因合成 Gene synthesis
pUC-C2'H	含有 AdC2'H 密码子优化后序列的质粒 Vector containing codon optimized AdC2'H	基因合成 Gene synthesis
pESC-TRP	用于表达基因整合及 TRP1 筛选标签的扩增 For genes assembly and amplification of the TRP1 selection tag	实验室保存 Kept in our laboratory
pESC-LEU	用于 LEU2 筛选标签的扩增 For amplification of the LEU selection tag	实验室保存 Kept in our laboratory
pESCtp01	将 pESC-HIS 上的启动子 GAL1-Gal10 更换为 TEF1-PGK1 Replacing the promoter GAL1-Gal10 with TEF1-PGK1 in pESC-HIS	实验室保存 Kept in our laboratory
pESCtp01-aro4K229L- aro7G141S	用于表达点突变的 <i>aro4K229L</i> 和 <i>aro7G141S</i> For expression of the site muted <i>aro4K229L</i> and <i>aro7G141S</i>	本研究 This study
pESC-TAL-4CL	将 TAL 和 4CL 编码基因插入到 pESC-TRP 中 Integration of the genes coding for TAL and 4CL in pESC-TRP	本研究 This study
pESC-C2'H	将 C2'H 编码基因插入到 pESC-TRP 中 Integration of the gene coding for C2'H in pESC-TRP	本研究 This study
pUC57-Y15site1-1L1	同源臂 Y15site1 和 L1 的整合 Assembly of the homologous arms Y15site1 and L1	本研究 This study
pUC57-Y15site1- TRP-1L1	在 pUC57-Y15site1-1L1 中插入筛选标签 TRP1 Integration of the TRP1 selection tag in pUC57-Y15site1-1L1	本研究 This study
pUC57-2L1-2L2	同源臂 2L1 和 2L2 的整合 Assembly of the homologous arms 2L1 and 2L2	本研究 This study
pUC57-2L1-TAL- 4CL-2L2	在 pUC57-2L1-2L2 中插入 TAL-4CL 诱导表达原件 Integration of the inducible expression elements TAL-4CL in pUC57-2L1-2L2	本研究 This study
pUC57-3L2-3L3	同源臂 3L2 和 3L3 的整合 Assembly of the homologous arms 3L2 and 3L3	本研究 This study
pUC57-3L2-C2'H-3L3	在 pUC57-3L2-3L3 中插入 C2'H 诱导表达原件 Integration of the inducible expression element C2'H in pUC57-3L2-3L3	本研究 This study

表 2 本研究所用引物列表

Table 2 Primers list in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')
aro10L-F	CCAAAGTGTCGGTTACCTAC
aro10L-R	GTCGACCTGCCTGATTTCGTATCGATGGACA
aro10R-F	CCACTAGTGGCGAACAGCTAAAGTGCATG
aro10R-R	CTAAGTTAGCAGACATTTAG
bleR-F	ACGAAATCAGGCAGGTGACAACCC
bleR-R	TAGCTGTTCGCCACTAGTGGATCTGATATCAC
PDC5L-F	CTATTACTGTCGCTAACACC
PDC5L-R	TAGACGAAACTTGACTTGGCTCAATCTTTCAAATAAA
PDC5R-F	GATATTTCTTGCTAGAACTACGAAACCCACAG
PDC5R-R	GGTATGGTTAAAGATCACAC
LEU-F	GCCAAGTCAAGTTTCGTCTACCCTATGAACATATTC
LEU-R	CGTAGTTTCTAGCAAGAAATATCTTGACCGCAG
aro4 large-F	GTCAGAATTCGAATCTATCAGAAATGAGTG
aro4 large-R	GATCAAGCTTGAGGAAAGAATGTACGTTAC
aro4 K229L-F	GGGTGTTACTTTGCATGGTGTGCTGCTATCACCCTAC
aro4 K229L-R	CAACACCATGCAAAGTAACACCCATGAAATGGTGAGAATG
aro7 large-F	GTCAGAATTCGCTAACAAATAGCACTCAGC
aro7 large-R	GACTGCATGCGAATTGTTACCGTGATAGCC
aro7 G141S-F	GAATAACTTCAGTTCTGTTGCCACTAGAGATATAGAATG
aro7 G141S-R	GTGGCAACAGAACTGAAGTTATTCTTATCATCACCCTCTC
aro4 L229-F	GTCAGAATTCAAAACAATGAGTGAATCTCCAATGTTC
aro4 L229-R	GATCGAGCTCCTATTTCTTGTTAACTTCTC
aro7 S114-F	GTCAGGATCCAAAACAATGGATTTCACAAAACCAG
aro7 S114-R	GATCGAGCTCTTACTCTTCCAACCTTCTTAG
RgTal-F	CAGTGCGGCCGCAAAAACAATGGCTCCAAGACCAACTTC
RgTal-R	CAGTGAGCTCTTAGGCCAACATCTTCAACAAG
Pc4CL-F	CAGTGGATCCAAAACAATGGGTGATTGTGTTGCTCC
Pc4CL-R	CAGTGCTAGCTTATTTAGGCAAATCACCAG
AdC2'H-F	CAGTGAATTCAAAACAATGGCTCCATCTACTACTGA
AdC2'H-R	CAGTGAGCTCTTACATCTTAGCAAAATCCA
Y15site1-F	CAGTGAATTCGCCAGGCGCCTTTATATCAT
Y15site1-R	CAGTGGTACCGGTCTCACATCCTACAAAATGAATCTA CATTTC
L1-F	CAGTGTCGACGGTCTCAAGGTCCCCGGTCCGTTTGTCTAT
L1-R	CAGTGCAATGCAGGCAATTTTAGAGGGGA CT
TRP1-F	CAGTGGTCTCAACCTGAGAGTGCACCATAAACGAC
TRP1-R	CAGTGGTCTCAGATGGCGGTATTTTCTCCTTACGC
2L1-F	CAGTGAATTCGCCCGGTCCGTTTGTCTAT
2L1-R	CAGTGGTACCGGTCTCACATCAGGCAATTTTAGAGGGGACT
2L2-F	CAGTGTCGACGGTCTCAAGGTGACAAAGCGCCAAGGAAGT
2L2-R	CAGTGCAATGCTAGTCCGCGAGTTGGATAGC

(待续)

(续表 2)

TADH1-F	CAGT <b><u>GGTCTCAGATG</u></b> GAGCGACCTCATGCTATACC
TCYC1-R	CAGT <b><u>GGTCTCAACCT</u></b> CTTCGAGCGTCCCAAAACCT
3L2-F	CAGTGAATTCGACAAAGCGCCAAGGAAGT
3L2-R	CAGT <b><u>GGTACCGGTCTCACATC</u></b> TAGTCCGCGAGTTGGATAGC
3L3-F	CAGT <b><u>GTCGACGGTCTCAAGGT</u></b> AACGACGGTAGACGCCAAC
3L3-R	TCAGAAAGCTTGC GGACTTAGTCCGTTTCTC
4L3-F	CAGTGAATTC AACGACGGTAGACGCCAAC
4L3-R	CAGT <b><u>GGTACCGCGGACT</u></b> TAGTCCGTTTCTC
Y15site2-F	CAGT <b><u>GGATCCAATGGAAGGTCGGGATGAGC</u></b>
Y15site2-R	CAGT <b><u>GCATGCATAAAGCAGCCGCTACCAAAC</u></b>
TAL-verif-F	GGTGGTTCTGCTGATACAAG
TAL-verif-R	GTGGCCTAGTAACATCATGC
4CL-verif-F	GGTTAAGGATTATGCTGCCG
4CL-verif-R	CATAGCTAAACTGGACCAG
C2'H-verif-F	CCAAATCGTTAACCACGGTG
C2'H-verif-R	TCCAAGTATCAGTTTCCATC

注：下划线序列为酶识别位点，加粗字体为 *Bsa* I 酶切位点

Note: Underline indicates restriction site, bold fonts represents *Bsa* I restriction site.

G141S-R, pUC57-aro7 为模板进行 PCR 扩增, 将 141 位的甘氨酸(G)替换为丝氨酸(S)。点突变 PCR 产物经 *Dpn* I 酶切后进行自连接并转化大肠杆菌, 获得的质粒 pUC57-aro4K229L 和 pUC57-aro7G141S 经测序验证正确性后, 用引物对 aro4 L229-F/aro4 L229-R 和 aro7 S114-F/aro7 S114-R 扩增获得 aro4K229L 和 aro7G141S 片段, 通过 *Eco*R I/*Sac* I 和 *Bam*H I/*Sal* I 整合到载体 pESCtp01(HIS)中, 获得 pESCtp01-aro4K229L-aro7G141S。

### 1.2.3 菌株转化

将 aro10-bleR 线性片段通过电转化的方式导入到酿酒酵母 CEN.PK2-1C 中, 使用含有 10  $\mu$ g/mL 腐草霉素(phleomycin)的 YPD 培养基进行筛选, 获得  $\Delta$ aro10-bleR 菌株; 再将 PCD5-LEU 导入  $\Delta$ aro10-bleR 菌株中, 以 SC-LEU+phleomycin 培养基进行筛选, 获得 CEN.PK2-1C-1 菌株(表 1)。

同样地, 将质粒 pESCtp01-aro4K229L-aro7G141S 导入 CEN.PK2-1C-1 菌株中, 以

SC-LEU-HIS+phleomycin 为筛选培养基, 获得表达宿主 CEN.PK2-1C-2 (表 1)。

## 1.3 表达载体的构建

表达载体构建所用引物如表 2 所示。

### 1.3.1 合成基因的克隆

编码酪氨酸解氨酶、4-香豆酸辅酶 A 连接酶、香豆酰辅酶 A 羟化酶的核酸片段是以密码子优化后的 RgTAL、Pc4CL 和 AdC2'H 核酸序列(pUC-TAL、pUC-4CL、pUC-C2'H)为模板, 分别利用引物对 RgTal-F/RgTal-R、Pc4CL-F/Pc4CL-R、AdC2'H-F/AdC2'H-R 扩增获得。通过 *Not* I/*Sac* I 和 *Bam*H I/*Nhe* I 将 RgTAL 和 Pc4CL 插入到载体 pESC-TRP 中, 构建 pESC-TAL-4CL; 通过 *Eco*R I/*Sac* I 将片段 AdC2'H 插入 pESC-TRP, 构建 pESC-C2'H。

### 1.3.2 同源臂的克隆

根据文献[23]报道, 本研究以酿酒酵母染色体 XVI 中的 site15 作为外源片段整合位点。以酿酒酵母基因组 DNA 为模板, 利用引物对 Y15site1-F/Y15site1-R 扩增获得片段 Y15site1;

以 L1 序列为模板<sup>[24]</sup>, 利用引物对 L1-F/L1-R 扩增获得 1L1 片段。将这 2 个片段先后通过 *EcoR* I/ *Kpn* I、*Sal* I/*Sph* I 位点整合到 pUC7 载体中, 获得 pUC57-Y15site1-1L1, 同时通过 Y15site1-R 和 L1-F 引入 *Bsa* I 酶切位点。以 pESC-TRP 为模板, 利用引物对 TRP1-F/TRP1-R 扩增 *trp* 片段, 通过 *Bsa* I 酶切位点插入到载体 pUC57-Y15site1-1L1 中, 获得 pUC57-Y15site1-TRP-1L1。利用同样的方法, 使用引物对 2L1-F/2L1-R 和 2L2-F/2L2-R 构建 pUC57-2L1-2L2。以 pESC-TAL-4CL 为模板, 利用引物对 TADH1-F/ TCYC1-R 扩增获得 TADH1-TAL-Gal10-(UAS)-Gal1-4CL-TCYC1 片段, 通过 *Bsa* I 位点整合到 pUC57-2L1-2L2 中, 获得 pUC57-2L1-TAL-4CL-2L2。

类似地, 以 L2 和 L3<sup>[24]</sup>片段为模板, 使用引物对 3L2-F/3L2-R 和 3L3-F/3L3-R 获得的扩增产物先后通过 *EcoR* I/*Kpn* I、*Sal* I/*Hind* III 位点整合到 pUC7 载体中, 获得 pUC57-3L2-3L3。以 pESC-C2'H 为模板, 利用引物对 TADH1-F/ TCYC1-R 扩增获得 TADH1-C2'H-Gal10-(UAS)-Gal1-TCYC1 片段, 该片段通过 *Bsa* I 位点整合到 pUC57-3L2-3L3, 获得 pUC57-3L2-C2'H-3L3。

以 L3 片段为模板, 利用引物对 4L3-F4/L3-R 扩增获得 4L3 片段。再以酿酒酵母基因组为模板, 利用引物 Y15site2-F/Y15site2-R 扩增获得 Y15site2 片段。这 2 个片段通过 *EcoR* I/*Kpn* I、*Bam*H I/*Sph* I 酶识别位点先后插入到 pUC57 载体中, 获得 pUC57-4L3-Y15site2。

### 1.3.3 表达菌株的构建

以 pUC57-Y15site1-TRP-1L1、pUC57-2L1-TAL-4CL-2L2、pUC57-3L2-C2'H-3L3 和 pUC57-4L3-Y15site2 为模板, 使用引物对 Y15site1/1L-R、2L1-F/2L2-R、3L2-F/3L3-R 和 4L3-F/Ysite15-R 扩增片段 Y15site1-TRP-1L1、2L1-TAL-4CL-2L2、3L2-C2'H3L3 和 4L3-Y15site2。将 4 个片段以

同摩尔数同时转化宿主 CEN.PK2-1C-2。以 SC-LEU-HIS-TRP+phleomycin 为筛选培养基, 获得表达菌株 CEN.PK2-1C-3。

### 1.4 菌株的发酵

菌株 CEN.PK2-1C-3 在 SC-LEU-HIS-TRP+phleomycin 中进行种子培养, 30 °C、240 r/min 培养 24 h。按 2%转接到 50 mL 相同培养基进行发酵培养, 当发酵进行到 12 h 时, 5 000 r/min 常温离心 10 min, 用不含葡萄糖的种子培养基洗 2 次, 细胞沉淀用相同培养基悬浮后培养 5 h。再次离心, 并用含有半乳糖不含葡萄糖的 SC-LEU-HIS-TRP+phleomycin 培养基悬浮细胞, 进行诱导培养。

### 1.5 代谢产物的检测

样品处理: 取 3 mL 发酵液到 10 mL 离心管中, 置于冰上。使用超声破碎仪进行破碎, 振幅 10%, 处理时间为 10 min, 运行 5 s, 静置 5 s。之后再加入适量玻璃珠(直径 400–600 nm)到破碎后的发酵液中, 使用漩涡振荡仪高速振荡 1 min, 冰上静置 1 min, 重复 10 次, 使细胞进一步破碎。加入等体积乙腈后充分混匀, 4 °C 静置过夜。取 2 mL 混合液在 4 °C、12 000 r/min 下离心 10 min, 重复一次。取 1 mL 进行液相和质谱检测。

液相检测。仪器: Thermo UltiMate 3000。COSMOSIL 色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μm), 日本 Nacai Tesque 公司; 流动相: 0.05% (体积分数) 三氟乙酸水溶液(A), 乙腈(B); 梯度洗脱, 0–2 min, 10% B; 2–4 min, 15% B; 4–10 min, 45% B; 10–14 min, 75% B; 14–20 min, 90% B; 20–25 min, 90% B; 25–30 min, 10% B; 30–35 min, 10% B; 流速, 1.0 mL/min; 进样体积, 10 μL, 检测波长 330 nm。

质谱检测。仪器: 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪, 1290-6545 Q-TOF LC/MS,

安捷伦科技(中国)有限公司。Hypersil GOLDTM 色谱柱, 100 mm×2.1 mm×1.9 μm, 赛默飞世尔科技公司; 流动相: 0.1% (体积分数)甲酸水溶液(A), 乙腈(B); 梯度洗脱, 0–1.0 min, 5% B, 1.0–3.0 min, 5%–95% B, 3.0–5.0 min, 95% B, 5.0–8.0 min, 95%–5% B, 8.0–9.0 min 5% B; 流速, 0.3 mL/min; 进样体积, 5 μL。

离子源, Dual AJS ESI, 正离子模式; 干燥气温度 300 °C; 干燥气流速 5 L/min; 雾化器压力 45 psi; 鞘气温度 250 °C; 鞘气流速 11 L/min; 毛细管电压 4 000 V; 锥孔电压 65 V; 分别采用 MS 模式和 Targeted MSMS 模式测定; MS 模式, 设置数据采集范围  $m/z$  100–500; Targeted MSMS 模式, 设置一级质谱数据采集范围  $m/z$  100–500, 设置二级质谱数据采集范围  $m/z$  20–300; 数据采集及处理分别采用安捷伦 MassHunter Workstation Data Acquisition B.06.01 和 Qualitative Analysis B.07.00 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达宿主的改造

#### 2.1.1 *aro10* 和 *PDC5* 的基因敲除

为了避免芳香族醇的产生并将其转化为芳香族氨基酸<sup>[24]</sup>, 本研究对 Aro10 (phenylpyruvate decarboxylase)、PDC5 (pyruvate decarboxylase) 依次进行敲除, ble<sup>R</sup> 和 LEU 分别为片段敲除菌株筛选标签。从筛选培养基上选取菌落较大的克隆, 对 *aro10* 和 *PDC5* 的基因敲除部分分别通过两对引物进行 PCR 验证, 确认 *aro10* 和 *PDC5* 双敲除菌株 CEN.PK2-1C-1 (图 2、图 3)。

#### 2.1.2 Aro4 和 Aro7 反馈抑制的解除

芳香氨基酸途径中的 DAHP 合成酶 Aro4 和 chorismate 异构酶 Aro7 受到 L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸的反馈抑制<sup>[25]</sup>。为了提高这些酶的

活性, 参照文献[25]的实验方案, 通过点突变引物将 Aro4 中 229 位的 K 替换为 L, 将 Aro7 中 141 位的 G 替换为 S, 通过测序验证点突变的正确性。将 Aro4K229L 和 Aro7G141S 编码基因整合到 pESCtp01 中, 分别置于酿酒酵母强启动子 PGK1 和 TEF1 启动子下游, 获得 pESCtp01-aro4K229L-aro7G141S。将该质粒导入 CEN.PK2-1C-1 菌株中, 获得 CEN.PK2-1C-2 表达宿主。在 *aro4* 和 *aro7* 基因内部选取引物, 对所获得的菌株进行 PCR 验证(图 4)。

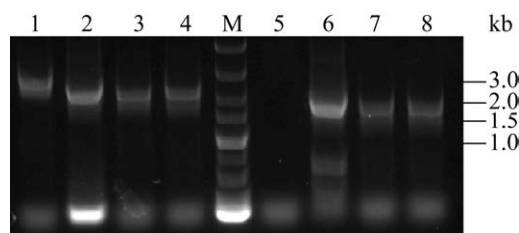
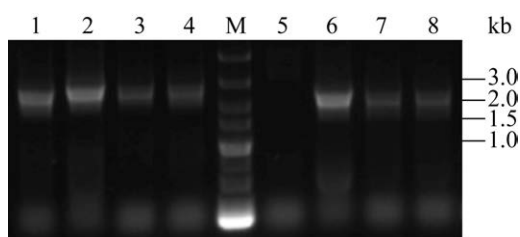


图 2 CEN.PK2-1C-1 菌株中 *aro10* 基因敲除的验证 1–4 使用的引物为 *aro10L-F*、*aro10R-R*, 野生型菌株扩增片段大小为 2.7 kb, 突变株为 2.2 kb。5–8 使用的引物为 *aro10L-F* 和 *ble-R*, 野生型无扩增片段, 突变株为 1.7 kb。1、5 为 CEN.PK2-1C 菌株 gDNA 作为扩增模板; 2、6 为 *aro10-ble<sup>R</sup>* 片段; 3 和 7、4 和 8 分别为 2 个 CEN.PK2-1C-1 转化子 gDNA 作为扩增模板; M: DL5000 DNA Marker

Figure 2 Verification of the *aro10* gene deletion in the strain CEN.PK2-1C-1. Primers *aro10L-F* and *aro10R-R* were used for 1–4, the amplicon of the wild-type strain was 2.7 kb, 2.2 kb for the mutant. Primers *aro10L-F* and *ble-R* were used for 5–8, non amplicon for the wild-type strain, 1.7 kb for the mutant. gDNA of CEN.PK2-1C was used as amplification template for 1 and 5; Fragment *aro10-ble<sup>R</sup>* for 2 and 6; gDNAs of two CEN.PK2-1C-1 transformants were used as amplification template for 3/7 and 4/8, respectively; M: DL5000 DNA Marker.





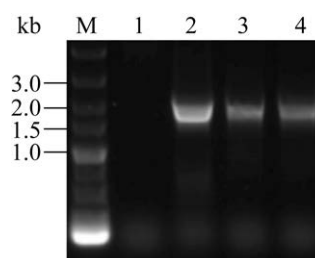
**图3** CEN.PK2-1C-1 菌株中 *pdcs* 基因敲除的验证 1–4 使用的引物为 PDC5L-F、PDC5R-R, 野生型菌株扩增片段大小为 2.5 kb, 突变株为 2.2 kb。5–8 使用的引物为 PDC5L-F、LEU-R, 野生型无扩增片段, 突变株为 2.2 kb。1、5 为 CEN.PK2-1C 菌株 gDNA 作为扩增模板; 2、6 为 PDC5-LEU 片段; 3 和 7、4 和 8 分别为 2 个 CEN.PK2-1C-1 转化子 gDNA 作为扩增模板; M: DL5000 DNA Marker

Figure 3 Verification of the *pdcs* gene deletion in the strain CEN.PK2-1C-1. Primers PDC5L-F and PDC5R-R were used for 1–4, the amplicon of the wild-type strain was 2.5 kb, 2.7 kb for the mutant. Primers PDC5L-F and LEU-R were used for 5–8, non amplicon for the wild-type strain, 2.2 kb for the mutant. gDNA of CEN.PK2-1C was used as amplification template for 1 and 5; Fragment PDC5-LEU for 2 and 6; gDNAs of two CEN.PK2-1C-1 transformants were used as amplification template for 3/7 and 4/8, respectively; M: DL5000 DNA Marker.

## 2.2 载体与菌株的构建

### 2.2.1 表达载体的构建

将 RgTAL、Pc4CL 和 AdC2'H 编码基因按照 1.3.1 中的方法进行克隆, 整合到 pESC-TRP 中, 获得质粒 pESC-TAL-4CL、pESC-C2'H; 同时, 选取酿酒酵母 15 号染色体上的片段 site1 和 site2 作为整合位点, 以同源臂片段 L1、L2、L3 片段为模板, 构建质粒 pUC57-Y15site1-TRP-1L1、pUC57-2L1-2L2、pUC57-3L2-3L3、pUC57-4L3-Y15site2。以 pESC-TAL-4CL、pESC-C2'H 为模板扩增 TAL-4CL、C2'H 片段, 分别整合到质粒 pUC57-2L1-2L2、pUC57-3L2-3L3 中, 获得 pUC57-2L1-TAL-4CL-2L2、pUC57-



**图4** CEN.PK2-1C-2 菌株中 *aro4K229L-aro7G141* 片段的验证 1–4 使用的引物为 *aro4/7-F*、*aro4/7-R*, 野生型菌株无扩增片段, 突变株为 1.9 kb。1 为 CEN.PK2-1C 菌株 gDNA 作为扩增模板; 2 中 pESCtp01-*aro4K229L-aro7G141S*; 3 和 4 分别为 2 个 CEN.PK2-1C-2 转化子总 DNA 作为扩增模板; M: DL5000 DNA Marker

Figure 4 Verification of the *aro4K229L-aro7G141S* fragment in the strain CEN.PK2-1C-2. Primers *aro4/7-F* and *aro4/7-R* were used for 1–4, non amplicon for the wild-type strain, 1.9 kb for the mutant. gDNA of CEN.PK2-1C was used as amplification template for 1; pESCtp01-*aro4K229L-aro7G141S* was used as amplification template for 2; Total DNA of two CEN.PK2-1C-2 transformants were used as amplification template for 3 and 4, respectively; M: DL5000 DNA Marker.

3L2-C2'H-3L3 (图 5)。因此, TAL、4CL 和 C2'H 编码基因启动子分别为 pESC-TRP 所带的 Gal1 和 Gal10, 终止子分别为 TADH1 和 TCYC1 (图 5)。

### 2.2.2 表达菌株的构建

按照 1.3.3 中的实验方法, 获得 Y15site1-TRP-1L1、2L1-TAL-4CL-2L2、3L2-C2'H3L3 和 4L3-Y15site2 这 4 个片段, 将其同时转化表达宿主 CEN.PK2-1C-2。4 个片段利用酵母同源重组机制通过同源臂整合在一起, 并通过 Y15site1 和 Y15site2 位点, 将片段整合到宿主基因组上(图 6A), 转化后通过 SC-TRP-LEU-HIS+phleomycin 营养缺陷培养基筛选获得转化子 CEN.PK2-1C-2-TAL-4CL-C2'H, 将该菌株命名为 CEN.PK2-1C-3, 并对该菌株中整合的 3 个基因 TAL、4CL 和 C2'H 进行 PCR 验证(图 6B)。

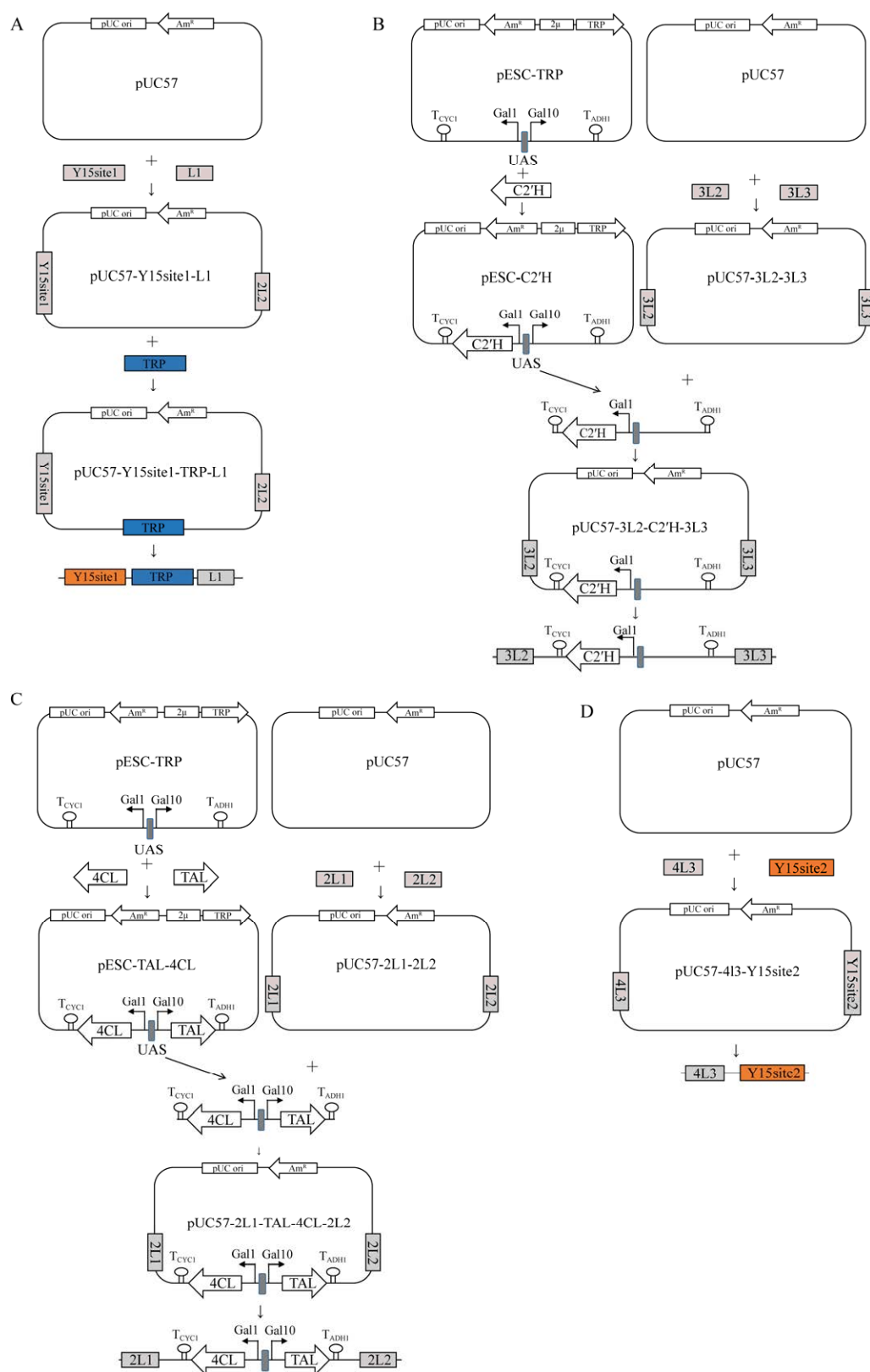
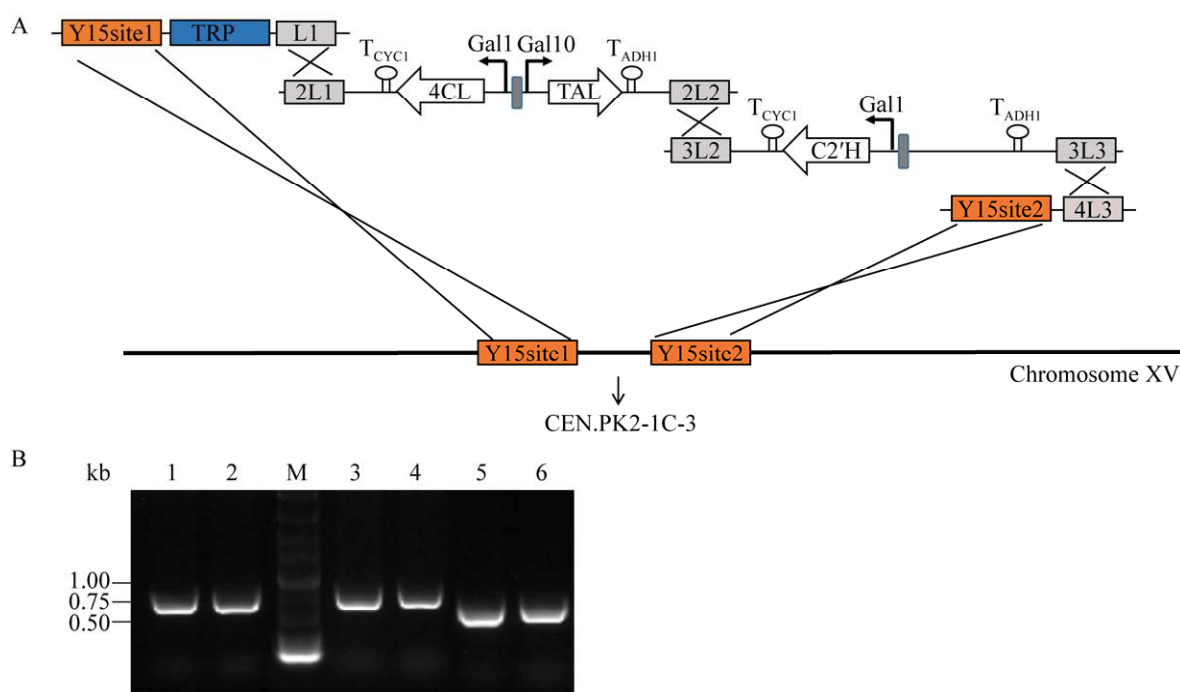


图 5 表达载体构建图

Figure 5 Schema of expression plasmid construction.



**图 6** 表达基因在酵母中的整合 A: 表达基因在酵母基因组整合示意图; B: 整合基因的 PCR 验证。1 和 2、3 和 4 及 5 和 6 分别使用引物对 TAL-verif-F/TAL-verif-R、4CL-verif-F/4CL-verif-R 和 C2'H-verif-F/C2'H-verif-R。1、3、5 分别以 pUC-TAL、pUC-4CL 和 pUC-C2'H 为模板, 2、4、6 以 CEN.PK2-1C-3 菌株 gDNA 为模板, 扩增大小分别为 0.6、0.6 和 0.5 kb; M: DL5000 DNA Marker

Figure 6 Integration of expression genes in yeast genome. A: Schema of integration of expression genes in yeast genome; B: Verification of integrated genes by PCR. Primers TAL-verif-F/TAL-verif-R, 4CL-verif-F/4CL-verif-R and C2'H-verif-F/C2'H-verif-R were used for 1-2, 3-4 and 5-6, respectively. pUC-TAL, pUC-4CL and pUC-C2'H were used as templates for the 1, 3 and 5, respectively. gDNA of the strain CEN.PK2-1C-3 was used as template for the 2, 4 and 6. The amplicon was 0.6, 0.6 and 0.5 kb, respectively; M: DL5000 DNA Marker.

### 2.3 表达菌株的发酵及质谱分析

发酵前需将表达菌株在筛选培养基上活化, 并以 TAL、4CL 和 C2'H 克隆引物进行扩增, 验证菌株的正确性。以 1.4 中的方法对菌株 3G 进行发酵。用 1.5 中的液相条件和质谱条件对发酵液进行分析。图 7 为检测处理后的发酵液中伞形酮的液相色谱图, 诱导 4 d 后伞形酮产量为  $(67.39 \pm 4.87) \mu\text{g/mL}$ 。进而通过质谱, 检测到发酵液中伞形酮准分子离子峰和特征碎片峰, 表达菌株中伞形酮质谱分析。根据一级质谱图(图 8A), 伞形酮母离子  $[M+H]^+$  荷质比为 163.038 6 (伞形酮

$[M+H]^+$  准确荷质比为 163.039 0, 误差为  $2.45 \times 10^{-6}$ ); 根据二级质谱图(图 8B), 特征碎片峰荷质比为 107.048 9。同时, 根据碎片峰分子量预测了伞形酮二级质谱中的裂解途径(图 8B)。质谱结果证明伞形酮在 CEN.PK2-1C-3 菌株中已成功合成。

## 3 讨论与结论

合成生物学是当今获取天然产物的一种新兴手段<sup>[26-29]</sup>, 很多类型代谢产物已获得表达菌株。相关宿主中前体也根据化合物合成需求进行通路优化<sup>[30]</sup>。

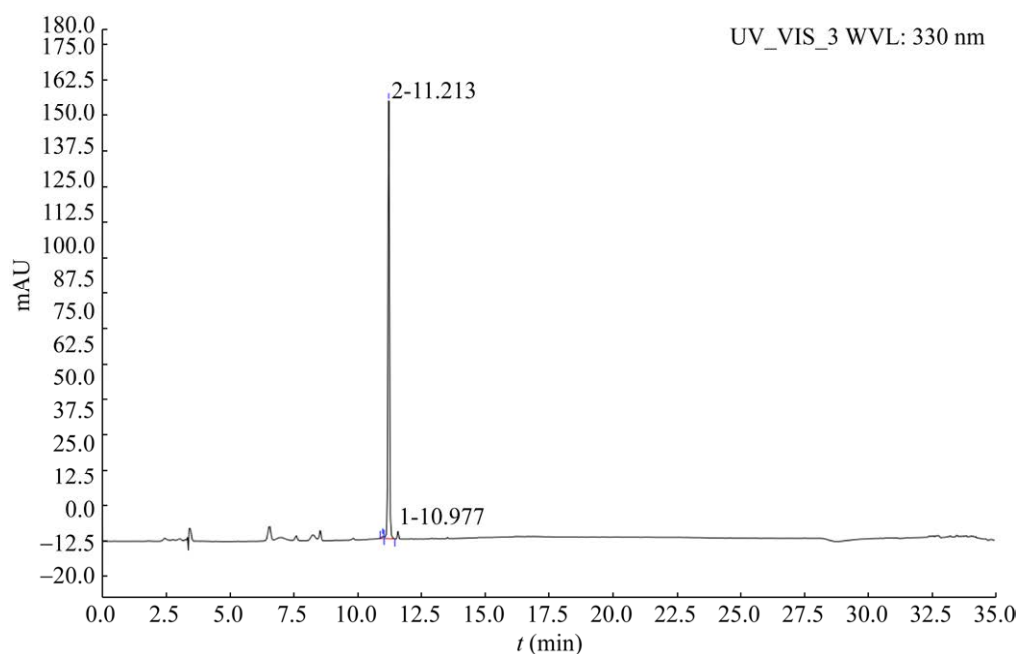


图 7 发酵液样品中伞形酮液相色谱图

Figure 7 Liquid chromatographic diagram of umbelliferone in fermentation liquid sample.

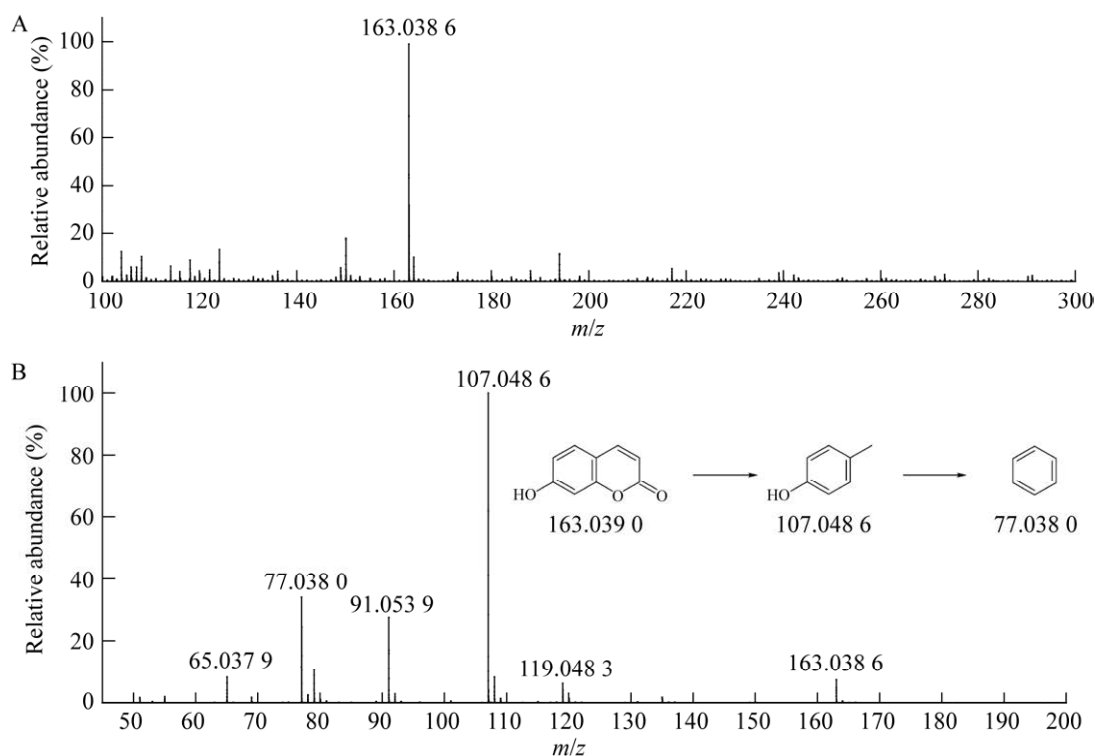


图 8 菌株 CEN.PK2-1C-3 发酵液中伞形酮的质谱检测结果 A: 一级质谱图; B: 二级质谱图

Figure 8 Mass spectrometry result of umbelliferone in the fermentation culture of the strain CEN.PK2-1C-3. A: MS; B: MS/MS.

本研究通过整合不同植物来源编码伞形酮生物合成路径基因, 成功在酿酒酵母中表达伞形酮菌株。本研究中表达基因的选择主要依据相关文献报道已知活性的酶<sup>[20-21]</sup>, 而对文献中不同来源的同功能催化酶和基于这些酶的氨基酸序列通过 BLAST 比对获得的具有同源性的蛋白未进行系统的酶活比对。然而不同植物来源的酶其催化活性一定存在差异, 因此, 筛选高活性的酶进行重新整合是提高靶标产物产量的重要环节。同时, 应用生物信息学对选取的催化酶与其底物进行分子对接, 模拟出酶关键活性中心。通过理性突变对酶进行氨基酸替换, 达到进一步提高酶对底物亲和力的目的, 加强催化效率。

伞形酮生物合成能以 2 种氨基酸作为合成前体(图 1)<sup>[20-21]</sup>。本研究选取 TAL, 主要因为可以跨过 PAL 和 C4H 的两步催化, 而通过一步 TAL 催化即可获得对香豆酸。菌株 CEN.PK2-1C-3 按照本研究中的发酵方法所产的伞形酮产量有限, 可能是因为宿主本身的酪氨酸更多地参与菌体本身其他生命活动, 而整合的外源催化路径需要参与获取酪氨酸的竞争。相关研究表明, 对合成芳香族氨基酸前体 PEP 和 4-磷酸赤藓糖的合成路径过表达可有效提高酪氨酸产量<sup>[25]</sup>; 而整合大肠杆菌莽草酸激酶 II AroL 可显著提升对香豆酸产量<sup>[24]</sup>。因此, 在接下来的工作中, 应进一步对宿主进行改造, 加强酪氨酸或苯丙氨酸等香豆素类天然产物前体的合成能力。同时, 可以尝试外源添加酪氨酸的方式, 检测是否可促进伞形酮的合成。本研究选取的是已报道有活性的催化酶, 但未对不同植物、微生物种类来源的酶活进行比较。目前国内外也缺乏对该类酶活性比较的报道, 因此, 将不同物种来源具有同源性的伞形酮生物合成路径中催化酶进行重组蛋白库构建, 进而通过高通量筛选获

得活性较优的酶, 对通过构建基因工程菌加强靶标产物的合成具有重要意义。对筛选出的高活性酶也可利用生物信息学模拟活性位点, 通过分子改造使酶活得到进一步增强。综上所述, 在本研究基础上, 可通过宿主代谢路径改造和酶活优化等, 进一步加强基因工程菌的伞形酮生物合成能力。

## REFERENCES

- [1] Li ZH, Wang Q, Ruan X, Pan CD, Zhang JC, Jiang DA, Wang GG. Biological activity and quantification of potential autotoxins from *Picea schrenkiana* leaves[J]. Allelopathy Journal, 2011, 27: 245-252
- [2] Silva FL, Moreno PRH, Braz-Filho R, Tavares JF, Barbosa-Filho JM. Chemical constituents of *Cardiospermum corindum* L. and their distribution in Sapindaceae[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 57: 137-140
- [3] Repčák M, Suvák M. Methyl jasmonate and *Echinothrips americanus* regulate coumarin accumulation in leaves of *Matricaria chamomilla*[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 47: 38-41
- [4] Repčák M, Imrich J, Franeková M. Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert[J]. Journal of Plant Physiology, 2001, 158(8): 1085-1087
- [5] Shakeel-U-Rehman, Khan R, Bhat KA, Raja AF, Shawl AS, Alam MS. Isolation, characterisation and antibacterial activity studies of coumarins from *Rhododendron lepidotum* Wall. ex G. Don, Ericaceae[J]. Revista Brasileira De Farmacognosia, 2010, 20(6): 886-890
- [6] Singh R, Singh B, Singh S, Kumar N, Kumar S, Arora S. Umbelliferone-an antioxidant isolated from *Acacia nilotica* (L.) willd. ex. del[J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 825-830
- [7] Mazimba O, Majinda RRT, Modibedi C, Masesane IB, Cencič A, Chingwaru W. *Tylosema esculentum* extractives and their bioactivity[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011, 19(17): 5225-5230
- [8] Kanimozhi G, Prasad NR, Ramachandran S, Pugalendi KV. Umbelliferone modulates gamma-radiation induced reactive oxygen species generation and subsequent oxidative damage in human blood

- lymphocytes[J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 672(1/2/3): 20-29
- [9] Gao D, Zhang YL, Xu P, Lin YX, Yang FQ, Liu JH, Zhu HW, Xia ZN. *In vitro* evaluation of dual agonists for PPAR $\gamma$ / $\beta$  from the flower of *Edgeworthia gardneri* (wall.) Meisn[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 162: 14-19
- [10] Ramu R, Shirahatti PS, Zameer F, Ranganatha LV, Nagendra Prasad MN. Inhibitory effect of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale) flower extract and its constituents umbelliferone and lupeol on  $\alpha$ -glucosidase, aldose reductase and glycation at multiple stages[J]. South African Journal of Botany, 2014, 95: 54-63
- [11] Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2005, 26(5): 244-251
- [12] Ramesh B, Pugalendi KV. Antihyperglycemic effect of umbelliferone in streptozotocin-diabetic rats[J]. Journal of Medicinal Food, 2006, 9(4): 562-566
- [13] Muthu R, Thangavel P, Selvaraj N, Ramalingam R, Vaiyapuri M. Synergistic and individual effects of umbelliferone with 5-fluorouracil on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis[J]. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2013, 3(1): 74-82
- [14] Kielbus M, Skalicka-Wozniak K, Grabarska A, Jeleniewicz W, Dmoszynska-Graniczka M, Marston A, Polberg K, Gawda P, Klatka J, Stepulak A. 7-substituted coumarins inhibit proliferation and migration of laryngeal cancer cells *in vitro*[J]. Anticancer Research, 2013, 33(10): 4347-4356
- [15] Yu SM, Hu DH, Zhang JJ. Umbelliferone exhibits anticancer activity via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells[J]. Molecular Medicine Reports, 2015, 12(3): 3869-3873
- [16] Stefanova TH, Nikolova NJ, Toshkova RA, Neychev HO. Antitumor and immunomodulatory effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin against sarcoma 180 in mice[J]. Journal of Experimental Therapeutics & Oncology, 2007, 6(2): 107-115
- [17] Guesne S, Connole L, Kim S, Motevalli M, Robson L, Michael-Titus AT, Sullivan A. Umbelliferoyloxymethyl phosphonate compounds-weakly binding zinc ionophores with neuroprotective properties[J]. Dalton Transactions: Cambridge, England: 2003, 2021, 50(46): 17041-17051
- [18] Hindam MO, Sayed RH, Skalicka-Wozniak K, Budzyńska B, EL Sayed NS. Xanthotoxin and umbelliferone attenuate cognitive dysfunction in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease: the role of JAK2/STAT3 and Nrf2/HO-1 signalling pathway modulation[J]. Phytotherapy Research, 2020, 34(9): 2351-2365
- [19] Wu ZM, Geng YN, Buist-Homan M, Moshage H. Scopoletin and umbelliferone protect hepatocytes against palmitate- and bile acid-induced cell death by reducing endoplasmic reticulum stress and oxidative stress[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2022, 436: 115858
- [20] Lin YH, Sun XX, Yuan QP, Yan YJ. Combinatorial biosynthesis of plant-specific coumarins in bacteria[J]. Metabolic Engineering, 2013, 18: 69-77
- [21] Zhao YC, Jian XY, Wu JL, Huang WC, Huang CL, Luo J, Kong LY. Elucidation of the biosynthesis pathway and heterologous construction of a sustainable route for producing umbelliferone[J]. Journal of Biological Engineering, 2019, 13: 44
- [22] Villard C, Munakata R, Kitajima S, van Velzen R, Schranz ME, Larbat R, Hehn A. A new P450 involved in the furanocoumarin pathway underlies a recent case of convergent evolution[J]. New Phytologist, 2021, 231(5): 1923-1939
- [23] Li SW, Ding WT, Zhang XL, Jiang HF, Bi CH. Development of a modularized two-step (M2S) chromosome integration technique for integration of multiple transcription units in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 232
- [24] Rodriguez A, Kildegaard KR, Li MJ, Borodina I, Nielsen J. Establishment of a yeast platform strain for production of p-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 181-188
- [25] Mao JW, Liu QL, Song XF, Wang H, Feng H, Xu HJ, Qiao MQ. 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
- [26] 李冰, 张传波, 宋凯, 卢文玉. 生物合成稀有人参皂苷的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(6): 71-88
- Li B, Zhang CB, Song K, Lu WY. Research progress in

- biosynthesis of rare ginsenosides[J]. China Biotechnology, 2021, 41(6): 71-88 (in Chinese)
- [27] 李兴, 韩舒婷, 马婧贤, 陶美凤, 康前进, 白林泉, 邓子新. 福林霉素生物合成基因簇的组装和异源表达[J]. 微生物学报, 2022, 62(1): 291-304
- Li X, Han ST, Ma JX, Tao MF, Kang QJ, Bai LQ, Deng ZX. Assembly and heterologous expression of the pholipomycin biosynthetic gene cluster[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(1): 291-304 (in Chinese)
- [28] 宋富强, 陈五九, 吴凤礼, 王晓霜, 路福平, 王钦宏. 异源表达多巴脱羧酶促进大肠杆菌从头合成多巴胺[J]. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4266-4276
- Song FQ, Chen WJ, Wu FL, Wang XS, Lu FP, Wang QH. Heterogeneous expression of DOPA decarboxylase to improve the production of dopamine in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(12): 4266-4276 (in Chinese)
- [29] 张发光, 曲戈, 孙周通, 马军安. 从化学合成到生物合成: 天然产物全合成新趋势[J]. 合成生物学, 2021, 2(5): 674-696
- Zhang FG, Qu G, Sun ZT, Ma JN. From chemical synthesis to biosynthesis: trends toward total synthesis of natural products[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(5): 674-696 (in Chinese)
- [30] 段珍, 吴凡, 闫启, 张吉宇. 植物香豆素生物合成途径及关键酶基因研究进展[J]. 草业学报, 2022, 31(1): 217-228
- Duan Z, Wu F, Yan Q, Zhang JY. Research progress on plant coumarin biosynthesis pathway and the genes encoding the key enzymes[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(1): 217-228 (in Chinese)