

DOI: 10.7612/j.issn.2096-5281.2018.04.005

基于细胞色素 P450 单加氧酶介导的 4-甲酚氧化降解途径的天麻素生物合成

钟贝芬^{1,2} 杜磊² 李众² 张伟² 张兴旺²,
李菁³ 黄淑兰¹ 胡翔^{1*} 李盛英² 刘琨^{2*}

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 中国长沙 410081;
2. 山东省合成生物学省级重点实验室, 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 中国青岛 266101;
3. 湖南云恒生物科技有限公司, 中国长沙 410005)

摘要 为实现天麻素的微生物异源生产, 将谷氨酸棒状杆菌中 4-甲酚降解相关基因 *creHIJED* 和药用植物红景天来源的尿苷二磷酸糖基转移酶基因 *ugt* 分别克隆至载体 pRSFDuet-1 和 pACYCDuet-1, 转化大肠杆菌后获得重组菌株 S1. 在 S1 中诱导关键酶表达后, 外源添加 4-甲酚, 生物转化后对产物进行定性和定量分析. 最终以 5 mmol/L 4-甲酚为底物, 重组菌株 S1 在 30 °C 诱导培养 48 h 后转化产物中有天麻素生成, 产量达到 1.5 mmol/L, 摩尔转化率为 30.3%. 本研究实现了从 4-甲酚到天麻素的生物转化, 可为芳烃化合物降解与天然药物分子生物合成相耦联提供新的思路, 并且具有一定的产业化应用前景.

关键词 4-甲酚; 天麻素; 芳烃生物降解; 生物合成; 细胞色素 P450 单加氧酶

中图分类号 R283

文献标识码 A

文章编号 2096-5281(2018)04-0033-08

Biosynthesis of Gastrodin Based on the Cytochrome P450-Mediated Oxidative Biodegradation of 4-Cresol

ZHONG Bei-fen^{1,2}, DU Lei², LI Zhong², ZHANG Wei², ZHANG Xing-wang², LI Jing³,
HUANG Shu-lan¹, HU Xiang^{1*}, LI Sheng-ying², LIU Kun^{2*}

(1. State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, School of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Synthetic Biology, Qingdao Institute of Bioenergy Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China; 3. Hunan Yunheng Biotechnology Co., Changsha 410005, China)

Abstract To establish the microbial production of gastrodin, the 4-cresol biodegradation gene *creHIJED* derived from *Corynebacterium glutamicum*, and the uridine diphosphate glycosyltransferase encoding gene *ugt*, originated from the medicinal plant *Rhodiola rosea*, were cloned into pRSFDuet-1 and pACYCDuet-1, respectively. These two recombinant plasmids were then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), resulting in the recombinant strain S1. The expression of key enzymes was induced with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), after which 4-cresol was added as a substrate for biotransformation. The products were subsequently analyzed by HPLC and LC-MS. We found that the recombinant strain S1 produced 1.5 mmol/L of gastrodin over 48 h at 30 °C when 5 mmol/L of 4-cresol was fed, representing a molar conversion rate of 30.3%. Our results show that gastrodin could successfully be produced in *E. coli* by utilizing 4-cresol as the starting material. It should provide a new path-

收稿日期: 2018-03-26

基金项目: 山东省自然科学基金重大基础研究项目 (ZR2017ZB0207); 湖南省教育厅产业化培育项目 (15CY006)

* 通讯作者, E-mail: huxiang@hunnu.edu.cn; liukun@qibebt.ac.cn

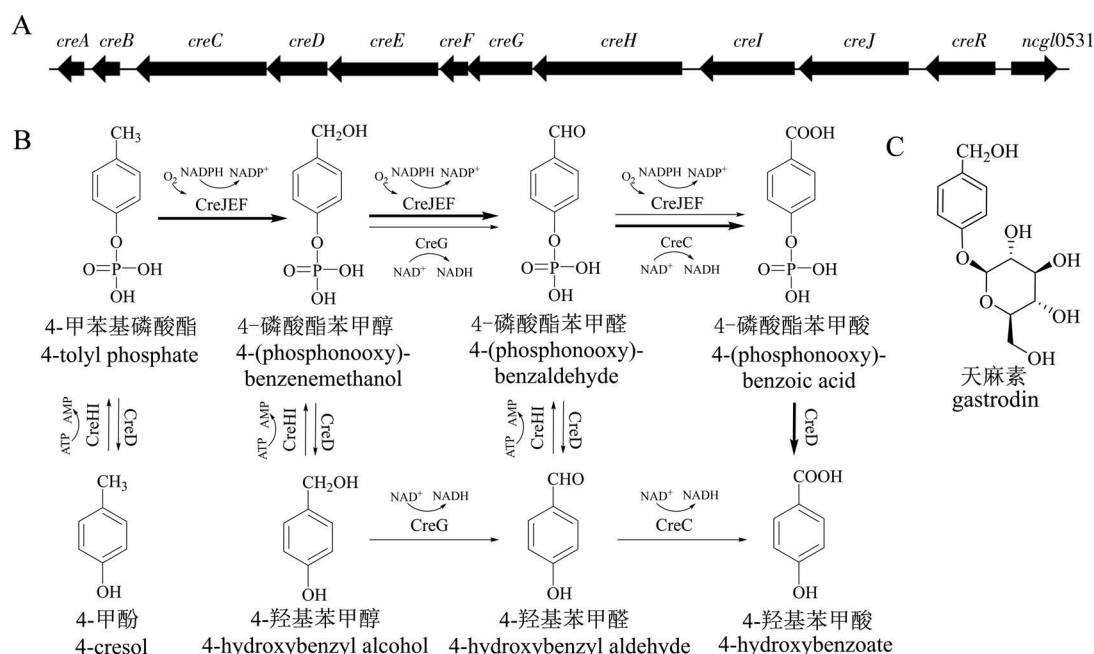
way to incorporate the biodegradation of aromatic compounds with the biosynthesis of medicinal natural products with the significant potential of applications.

Key words 4-cresol; gastrodin; aromatics biodegradation; biosynthesis; cytochrome P450 monooxygenase

天麻素(gastrodin, 又名天麻苷, 化学名称为对羟基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷, 图 1C) 是从兰科植物天麻(*Gastrodia elata*) 的块茎中提取的一种天然药物^[1], 是天麻的主要活性成分. 天麻素的含量是评价天麻质量的首要指标, 被《中国药典》定为质量控制目标^[2]. 在临床上天麻素已广泛被用于眩晕症、神经痛、头痛、神经衰弱及癫痫的辅助治疗^[3], 且无明显毒副作用^[4]. 天麻素的生产主要通过植物提取或化学合成^[4-6], 但由于这两种方式均存在较多弊端, 而生物合成具有专一性强、反应条件温和、污染低等优点, 因此, 通过合成生物学手段实现微生物生产天麻素具有重要的学术研究价值和实际应用前景.

天麻素是 4-羟基苯甲醇的酚羟基糖基化产物. 糖基化、乙酰化、甲基化、羟基化、卤化等修饰可改善天然产物的生物活性及成药性, 特别是糖基化修饰对于增加溶解性和稳定性效果显著^[7]. 由于化学方法很难实现特定位点的选择性糖基化修饰, 因此基于糖基转移酶(glycosyltransferase) 的天然产物特异性糖基化修饰受到了广泛关注^[8]. 2016 年, Bai 等^[9] 利用药用植物红景天(*Rhodiola rosea*) 来源的尿苷二磷酸糖基转移酶和诺卡氏菌(*Nocardia iowensis*) 来源的羧酸还原酶在大肠杆菌(*Escherichia coli*) 中构建了天麻素合成途径, 并对糖基转移酶进行突变, 得到了能优先识别酚羟基的突变体 UGT73B6^{FS}, 该突变酶可作为天麻素生物合成中的理想糖基化元件.

4-甲酚是重要的化工中间体, 在生产和生活方面应用广泛, 但 4-甲酚是一种高毒芳香化合物, 对中枢神经有毒害作用, 且是潜在的人类致癌物^[10-11]. 因此, 4-甲酚的微生物降解及生物修复研究一直倍受重视. 近期, 谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) 中发现了 4-甲酚生物降解基因簇 *cre* 如图 1A, 首次阐明了 4-甲酚生物降解的全新机制, 如图 1B^[12]. 由于该降解途径中的中间产物 4-羟基苯甲醇可作为天麻素的合成前体, 因此 4-甲酚降解途径可为天麻素微生物合成提供重要的催化元件.



注: 图 B 中: CreHI 为 4-甲基磷酸酯合酶, CreJ 为细胞色素 P450 氧化酶, CreF 为铁氧化还原蛋白, CreE 为铁氧化还原蛋白还原酶, CreD 为磷酸酯水解酶, CreG 为醛脱氢酶, CreC 为醇脱氢酶

图 1 谷氨酸棒状杆菌 *cre* 基因簇图谱 (A)、谷氨酸棒状杆菌中 4-甲酚降解途径 (B) 及天麻素结构式 (C)

Fig. 1 The *cre* gene cluster of *C. glutamicum* (A), 4-cresol degradation pathway in *C. glutamicum* (B), the structure of gastrodin (C)

本研究通过整合谷氨酸棒状杆菌来源的 *cre* 基因簇中部分基因和红景天来源的糖基转移酶基因 *ugt* (UGT73B6^{FS} 编码基因) 构建以 4-甲酚为原料生产天麻素的重组大肠杆菌。这是一条新型的基于 P450 酶催化活性的天麻素人工生物合成途径, 将芳烃化合物 4-甲酚的降解途径应用于天麻素的微生物合成, 是环境污染生物降解途径应用于药用天然产物生物合成的一次成功探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株和质粒见表 1, 研究中所使用的各个 *cre* 基因均从谷氨酸棒状杆菌 RES167^[13] 菌株中克隆, 原始序列信息来源于其野生型谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的基因组数据 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, 序列号 NC_003450), 尿苷二磷酸糖基转移酶突变体基因 *ugt* 由中国科学院天津工业生物技术研究所刘涛研究员馈赠^[9]。

表 1 菌株与质粒一览表
Tab. 1 Bacterial strains and plasmids

菌株(质粒)名称	相关特性	来源或参考文献
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	基因克隆, 质粒保存宿主菌	本实验室
BL21(DE3)	蛋白表达宿主菌	本实验室
S0	携带 pRSFDuet-1 + pACYCDuet-1 质粒; T7 启动子; Km ^r ; Cm ^r	本研究
S1	携带 pRSFDuet- <i>creHIJ-creFED</i> + pACYC- <i>ugt</i> 质粒; T7 启动子; Km ^r ; Cm ^r	本研究
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
RES167	ATCC 13032 的限制酶缺陷株	[13]
pRSFDuet-1	表达载体; T7 启动子; Km ^r	Novagen
PACYCDuet-1	表达载体; T7 启动子; Cm ^r	Novagen
pET28a-U	含有突变型尿苷二磷酸糖基转移酶突变体 UGT73B6 ^{FS} 基因	[9]
pACYC- <i>ugt</i>	表达尿苷二磷酸糖基转移酶 UGT73B6 ^{FS} , T7 启动子; Cm ^r	本研究
pRSFDuet- <i>creHIJ</i>	表达 CreHIJ; T7 启动子; Km ^r	本研究
pRSFDuet- <i>creHIJ-creFED</i>	表达 CreHIJFED; T7 启动子; Km ^r	本研究

1.1.2 引物 克隆构建、引物设计方法参照 ClonExpress II One Step Cloning Kit 产品说明书。根据 GenBank 收录的谷氨酸棒状杆菌 *cre* 基因簇(Gene ID: *ncgl0521-ncgl0531*) 和红景天来源的尿苷二磷酸糖基转移酶突变体基因 *ugt*^[9] 的序列, 分别设计一步克隆引物见表 2。

1.1.3 培养基 LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10. LB 培养基用于大肠杆菌培养及蛋白诱导表达。

M9Y 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 0.25, MgSO₄ · 7H₂O 0.49, CaCl₂ 0.01, 1 × M9 盐, 5 × M9 盐(g/L): Na₂HPO₄ · 12H₂O 85.50, KH₂PO₄ 15, NaCl 2.50, NH₄Cl 5. M9Y 培养基用于大肠杆菌生物转化 4-甲酚阶段。

1.1.4 主要试剂 4-甲酚(≥98%) 购自上海国药集团化学试剂有限公司; 4-羟基苯甲醇(≥98.5%) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 4-羟基苯甲醛(>98%)、4-羟基苯甲酸(>98%) 购自上海生工生物工程(上海)股份有限公司; 2 × PCR bestaqTM MasterMix 购自加拿大 abm 公司; 质粒小量提取试剂盒、PCR 引物合成和测序服务均来自青岛擎科梓熙生物技术有限公司; 色谱级甲醇(≥99.9%) 购自德国 Merck kGaA 公司; 连接试剂盒采用南京诺唯赞 ClonExpress II One Step Cloning Kit。

1.2 克隆载体和重组表达菌株的构建

用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒构建 pRSFDuet-*creHIJ-creFED* 和 pACYCDuet-*ugt-creHIJ* 与 *ugt* 分别连接到载体 pRSFDuet-1 与 pACYCDuet-1 的第一个多克隆位点, *creFED* 连接到载体 pRSFDuet-1 的第二个多克隆位点。 *creHIJ* 和 *creFED* 以谷氨酸棒状杆菌 RES167 菌落为模板扩增, 以 pET28a-U^[9] 为模板扩增 *ugt*。

表 2 PCR 引物
Tab. 2 PCR primers

名称	引物序列(5'→3')
UGT-F	<u>CTTTAATAAGGAGATATA</u> CCATGGGCAGCAGCCATCATC
UGT-R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTCTAGACTTTCTTTAACTTGAGTTCCTGC
pRSFDuet-1-F	GACAAGCTTGC GGCCGCA
pRSFDuet-1-R	GTGGTGATGATGGTGATGGCT
RSFDuet-2-F	GGTACCCTCGAGTCTGG
RSFDuet-2-R	ATGTATATCTCCTTCTTATAC
ACYC-1-F	AAGCTTGC GGCCGCA
ACYC-1-R	GGTATATCTCCTTATTTAAAGTTAAACAAAATTA
CreHIJ-F	<u>GCCATCACCATCATCACCAC</u> ATGACAATGACTTCCCAGAC
CreHIJ-R	<u>TATGCGGCCGCAAGCTTGT</u> CCTAGGCATGTGTATCCACCC
CreFED-F	<u>TATAAGAAGGAGATATA</u> TACATATGTCTACTATTTCATTGATC
CreFED-R	<u>TTACCAGACTCGAGGGTAC</u> CTCATCGGATCGCATCC
ACYCDuetUP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT
DuetDOWN	GATTATGCGGCCGTGTACAA
DuetUP2	TTGTACACGGCCGCATAATC
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

注:下划线序列表示与线性化载体末端互补的序列

菌落 PCR 反应体系(50 μ L) 参见 2 \times PCR bestaqTM MasterMix 说明书,延伸温度 60 $^{\circ}$ C.

转化子构建、培养与鉴定和其他分子克隆手段均按照《分子克隆实验手册》第 4 版进行^[14].菌落 PCR 筛选阳性转化子 pACYCDuet-ugt 和 pRSFDuet-creHIJ 菌落 PCR 的引物为 ACYCDuetUP1 和 DuetDOWN, pRSF-Duet-creHIJ-creFED 的引物是 DuetUP1 和 T7 Terminator. 阳性克隆载体送擎科基因测序,确定序列的正确性.

pRSFDuet-creHIJ-creFED 与 pACYCDuet-ugt 质粒共转化到 *E. coli* BL21(DE3),再涂布带有卡那霉素(Km)和氯霉素(Cm)双抗性的固体培养基,筛选获得阳性重组子 S1. 用同样的方式共转化 pRSFDuet-1 与 pACYCDuet-1 空载体,构建作为阴性对照的空载重组菌 S0.

1.3 菌株培养和生物转化

将表达菌株 S0 与 S1 分别接种到含有卡那霉素和氯霉素双抗性的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养;种子液以 1:100 的比例转接到 100 mL LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 下 220 r/min 摇床振荡培养至 OD_{600} 约为 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,18 $^{\circ}$ C 下 180 r/min 诱导培养 24 h 后测菌液 OD_{600} ,5 000 r/min 离心 6 min,菌体用 M9Y 培养基重悬至最终菌浓度 OD_{600} 约 20 左右;向菌液中加入底物 4-甲酚,30 $^{\circ}$ C 下 220 r/min 摇床振荡培养,进行生物转化.

1.4 生物转化产物的提取与检测

添加底物后按指定时间点取样,样品处理流程如下:取 500 μ L 菌液,加入 500 μ L 甲醇,快速振荡混匀,14 650 r/min 离心 10 min,取上清进行高效液相色谱(HPLC)定性和定量分析.

HPLC 分析条件:选用安捷伦公司 1260 系列,紫外检测器,天津博纳艾杰尔科技有限公司 Innoval ODS-2 色谱柱(5 μ m,4.6 mm \times 250 mm).分析条件:A 为 ddH₂O+0.1% TFA;B 为甲醇;梯度洗脱,第 0~6 min 10% B;第 6~21 min 90%B;第 21~25 min 90%B;第 25~30 min 10%B;第 30~35 min 10%B;总时间 35 min;流速 1.0 mL/min;进样体积 10 μ L;检测波长为 225 nm 和 275 nm,扫描波长 190~400 nm.

标准曲线绘制:ddH₂O 溶解天麻素、4-羟基苯甲醇标准品,分别配制 0.1,0.3,0.6,0.9,1.2,1.5 mmol/L 标准品溶液,进行 HPLC 分析,数据经由 Microsoft Excel 绘制标准曲线.

液相色谱-高分辨质谱联用(LC-HRMS)分析:流动相条件基本同上,色谱柱改用 Waters symmetry 色谱柱(4.6 μ m,150 mm,RP18),流速 0.2 mL/min;高分辨质谱选用 Bruke 公司 MaxIs Impact UHR-QTOF system,采集模式为阳离子模式,对样品产物成分进行定性分析.

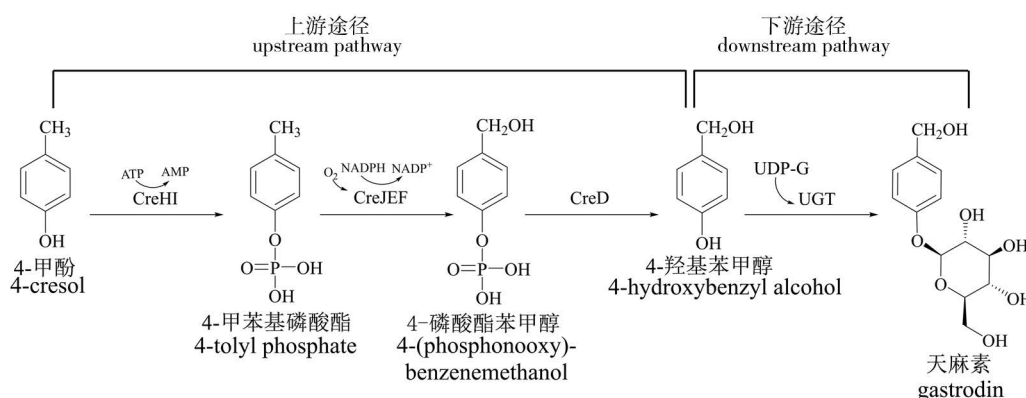
天麻素生成时间曲线绘制:分别在 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,28,30 h 时取样,进行 HPLC 分析,根据标准曲

线进行定量, 采用 Microsoft Excel 绘制时间曲线。

2 结果与分析

2.1 基于 4-甲酚烷基氧化的天麻素合成途径设计

4-羟基苯甲醇是 4-甲酚降解途径的一个中间产物, 同时也是天麻素的合成前体。在药物合成与开发中有很多与 4-羟基苯甲醇结构类似的酚类化合物可以作为苷元, 其酚羟基上连接糖基后形成的糖基化合物即为植物的活性成分或药物类似物, 如对苯二酚中一个酚羟基糖基化后形成的熊果苷就是熊果 (*Arctostaphylos uvaursi*) 的活性成分^[15], 水杨酸的酚羟基糖基化后形成具有生物活性的阿司匹林类似物——水杨酸-2-葡萄糖苷^[16]。本研究以 4-羟基苯甲醇为桥梁, 利用谷氨酸棒状杆菌中的 4-甲酚降解途径及红景天来源的糖基转移酶构建天麻素的生物合成途径, 该条途径可分解为上游途径和下游途径两个部分。上游途径: 利用 6 个酶蛋白 CreHI/CreJEF/CreD 分步将 4-甲酚转化为 4-羟基苯甲醇(图 2)^[12, 17]。下游途径: 以尿苷二磷酸葡萄糖 (UDP-葡萄糖) 作为糖基供体, 利用尿苷二磷酸糖基转移酶催化糖基从 UDP-葡萄糖转移到 4-羟基苯甲醇的酚羟基上, 形成天麻素(图 2)。



注: CreHI 为 4-甲苯基磷酸酯酶, CreJ 为细胞色素 P450 氧化酶, CreF 为铁氧化还原蛋白, CreE 为铁氧还原蛋白还原酶, CreD 为磷酸水解酶, UDP-G 为二磷酸尿苷葡萄糖

图 2 基于 4-甲酚氧化降解的天麻素生物合成途径

Fig. 2 Biosynthesis of gastrodin based on the oxidative biodegradation of 4-cresol

2.2 天麻素生物合成关键基因表达载体的构建与鉴定

上游途径基因克隆: 首先经 PCR 扩增分别获得 *creHIJ* (4.4 kb) 和 *creFED* (2.3 kb) 片段(图 3A) 然后连接 *creHIJ* 与 pRSFDuet-1 重组质粒经菌落 PCR(图 3A) 和 DNA 测序鉴定表明重组质粒 pRSFDuet-*creHIJ* 构建成功。接着对 pRSFDuet-*creHIJ* 进行线性化扩增并得到 8.3 kb 的片段, 将其与片段 *creFED* 连接并转化 *E. coli* DH5 α , 经菌落 PCR(图 3B) 与 DNA 测序鉴定表明重组质粒 pRSFDuet-*creHIJ-creFED* 构建成功。至此生物合成天麻素上游途径关键酶基因克隆完成。

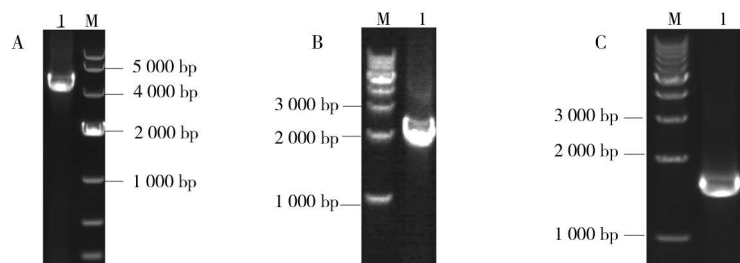


图 A 中: M 为 Trans2 K Plus II DNA marker, 1 为 *creHIJ* 阳性转化子; 图 B 中: M 为 1 kb DNA ladder (Dye Plus), 1 为 *creFED* 阳性转化子; 图 C 中: M 为 1 kb DNA ladder (Dye Plus), 1 为 *ugt* 阳性转化子

图 3 *creHIJ* (A) *creFED* (B) 和 *ugt* (C) 阳性转化子的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR verification of the positive transformants of *creHIJ* (A), *creFED* (B), and *ugt* (C)

下游途径基因克隆:以 pET28a-U^[9] 为模板扩增 *ugt*, 得到约 1.4 kb 片段, 将其与载体 pACYCDuet-1 相连接, 同样经过转化、菌落 PCR 鉴定(图 3C) 及测序, 成功构建 pACYC-*ugt*. 至此天麻素生物合成相关基因均克隆成功.

2.3 由 4-甲酚到天麻素的生物合成途径在大肠杆菌中的异源表达

重组菌 S1 与 S0 经诱导表达后, 取 500 μ L 培养液离心, 沉淀用 100 μ L 蛋白 loading buffer 重悬, 上样 10 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果如图 4 所示, 重组菌 S1 诱导后分别在约 64, 53, 46 和 45 kD 处有明显特征条带, 分别与 *creH*, *ugt*, *creJ* 和 *creE* 所编码蛋白的理论相对分子质量相符, 表明重组质粒在大肠杆菌中表达成功, 未能观测到 CreI (39 kD), CreD (25 kD) 和 CreF (11 kD) 的明显条带可能是因为蛋白表达量未达到 SDS-PAGE 检测限所致.

2.4 重组菌株 S1 以 4-甲酚为原料生产天麻素的检测

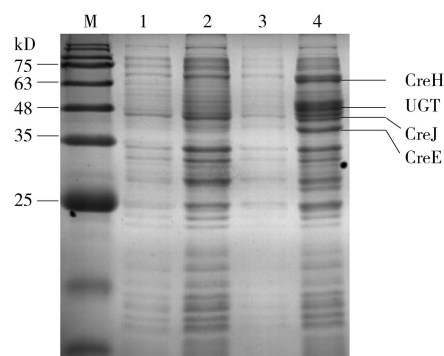
重组菌 S1 以终浓度为 5 mmol/L 的 4-甲酚为底物进行生物合成, 添加底物 48 h 后取样进行高效液相色谱 (HPLC) 产物分析, 如图 5A 所示, 发酵液的 HPLC 曲线在约 5 min 处出现了一个新峰, 其与天麻素标准品的保留时间完全符合; UV 吸收光谱与天麻素标准品相同, 在 220 nm 及 270 nm 处有两个吸收峰. 在液相-高分辨质谱联用 (LC-HRMS) 检测发现该化合物 $[M+Na]^+$ 的相对分子质量为 309.098 1, 与天麻素标准品 $[M+Na]^+$ (309.099 4) 相符合, 证实该物质即为天麻素(图 5B). 以上检测结果表明重组大肠杆菌 S1 (pRSFDuet-*creHIJFED* + pACYC-*ugt*) 成功实现了 4-甲酚到天麻素的生物转化. 此外, 产物中同时检测到痕量的 4-羟基苯甲酸与 4-羟基苯甲醛, 因为在图 1B 所示的代谢通路中, 当 *CreHIJFED* 同时存在时, 4-羟基苯甲醇可以部分被 *CreJEF* 氧化为 4-羟基苯甲酸与 4-羟基苯甲醛. 对照菌株 S0 培养液中加入 4-甲酚未发生任何变化(图 5A).

将天麻素标准品配制成为 0.1, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 和 1.5 mmol/L 浓度梯度样品, 进行 HPLC 检测, 计算不同浓度下相应天麻素吸收峰面积, 得到标准曲线如图 5C 所示, 其回归方程为 $Y=4753.8X+228.68$, $R^2=0.9987$. 根据标准曲线拟合对不同时间点 S1 发酵液中的天麻素进行定量分析, 绘制时间依赖曲线(图 5D), 发现天麻素产量在添加底物后 4~14 h 增幅明显, 14 h 后趋于平稳, 最高积累量出现在 40~48 h. 4-羟基苯甲醇也通过上述方式得到标准曲线回归方程: $Y=4372X+127.84$, $R^2=0.9991$. 经计算, 5 mmol/L 4-甲酚被菌株 S1 生物转化 48 h 后, 最终产生了 433.3 mg/L 天麻素, 摩尔转化率为 30.3%. 同时检测到 45.7% 未被转化完全的中间产物 4-羟基苯甲醇.

3 结论与讨论

生物合成不仅对能源和原材料需求少, 同时与国家号召的环境友好型发展战略相适应, 使得近年来合成生物学发展迅速, 微生物被广泛应用于生产植物来源的天然药物、高附加值天然产物及其前体, 如抗疟疾药物青蒿素的前体青蒿酸^[18]、抗癌药物紫杉醇的前体紫杉二烯^[19]、医用麻醉药剂阿片类药物前体蒂巴因^[20]等. 大肠杆菌是用于生物合成和微生物代谢工程改造的常用宿主, 目前许多植物来源的天然产物都由重组大肠杆菌发酵生物合成^[21-24]. 天然产物种类繁多、结构复杂多样, 许多活性天然产物已经发展为治疗各种疾病的药物或潜在候选药物. 总之, 天然药物已经成为、并将继续成为国内外合成、开发和应用研究的热点.

本研究通过大肠杆菌代谢途径改造以 4-甲酚为底物生物合成天麻素, 主要基于在谷氨酸棒状杆菌中发现的 4-甲酚降解相关基因簇^[25], 以及体外对 4-甲酚分解代谢途径关键酶进行的彻底功能鉴定^[12, 17]. 通过构建含有 *creHIJFED* 基因和尿苷二磷酸糖基转移酶基因 *ugt* 的重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 即 S1, 成功实现了 4-甲酚到天麻素的生物转化, 天麻素产量可达到 433.3 mg/L. 同时检测到 45.7% 未被转化完全的中间产物 4-羟



M: 彩虹 180 广谱蛋白 Marker; 1: 对照菌株 S0 诱导前样品; 2: S0 诱导后样品; 3: 重组菌株 S1 诱导前样品; 4: S1 诱导后样品. CreH: 64 kD; UGT: 53 kD; CreJ: 46 kD; CreE: 45 kD

图 4 重组大肠杆菌 S0 和 S1 的 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli* strains S0 and S1

基苯甲醇,其原因可能是 UDP-葡萄糖在脱掉糖基后的产物 UDP 对糖基转移酶的活性有反馈抑制^[26].本研究建立了一条新型的天麻素人工生物合成途径,为首要环境污染物烷基酚^[27-28]的资源化利用提供了新的思路,是芳烃化合物降解应用于天然产物生物合成的一次有益尝试.

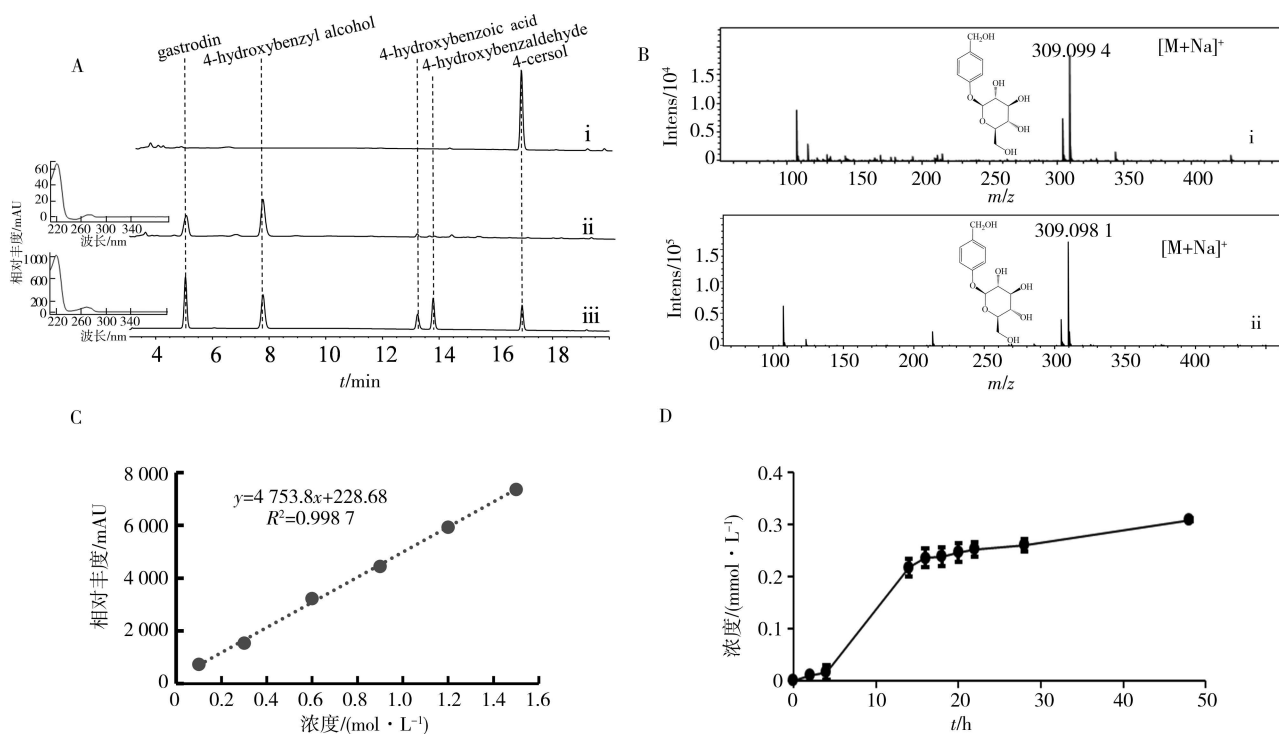


图 5 重组菌株 S0 和 S1 发酵液的 HPLC 分析图谱 (225 nm) 及天麻素的 UV 吸收光谱 (190~400 nm) (A), 重组菌株 S1 所产生的天麻素及天麻素标准品高分辨质谱, $[M+Na]^+$ (B), 天麻素浓度标准曲线 (C) 及重组菌株 S1 生物转化 4-甲酚形成天麻素随时间变化曲线 (D)

Fig. 5 The HPLC analysis of the product from recombinant *E. coli* S0 and S1 at 225 nm and UV absorption spectrum (190~400 nm) of gastrodin (A), mass spectra of gastrodin produced by recombinant *E. coli* S1 and gastrodin standard from LC-HRMS (B), standard curve of gastrodin (C) and gastrodin accumulation during biotransformation of 4-cresol analysis at different time points (D)

致谢 感谢中国科学院天津工业生物技术研究所刘涛研究员提供含有尿苷二磷酸糖基转移酶突变体基因的质粒.

参考文献:

- [1] 胡一冰, 崔佳, 韩笑, 等. 中药天麻研究进展 [J]. 贵阳中医学院学报, 2001, 22(4): 48-51.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 1995 版. 广州: 广东科技出版社, 1995.
- [3] 韩文霞, 刘迪, 陈二方, 等. 氦氛激光、紫外复合诱变天麻素产生菌华根霉 LN-A 的原生质体 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(12): 1849-1855.
- [4] WANG M W, HAO X, CHEN K. Biological screening of natural products and drug innovation in China [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007, 362(1482): 1093-1105.
- [5] HSIEH C L, CHIANG S Y, CHENG K S, et al. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Bl. in kainic acid-treated rats [J]. Am J Chin Med, 2001, 29(2): 331-341.
- [6] ZHOU J. Bioactive glycosides from Chinese medicines [J]. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 1991, 86(2): 231-234.
- [7] CHOI S H, KIM H S, YOON Y J, et al. Glycosyltransferase and its application to glycodiversification of natural products [J]. J Ind Eng Chem, 2012, 18(4): 1208-1212.
- [8] 金月, 吴旭日, 陈依军. 糖基转移酶在改善天然产物成药性方面的应用 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(5): 529-535.
- [9] BAI Y, YIN H, BI H, et al. De novo biosynthesis of Gastrodin in *Escherichia coli* [J]. Metab Eng, 2016, 35: 138-147.

- [10] FAY M , LLADOS F , RISHER J , *et al.* Toxicological profile for cresols [M]. Atlanta: US Public Health Service , Agency for Toxic Substances and Disease Registry , 2008.
- [11] BACK K C , THOMAS A A , MACEWEN J D. Reclassification of materials listed as transportation health hazards [R]. Washington DC: 6570th Aerospace Medical Research Laboratory , Wright-Patterson Air Force Base , Fairborn , OH ,1972: TSA-20-72-3.
- [12] DU L , MA L , QI F , *et al.* Characterization of a unique pathway for 4-cresol catabolism initiated by phosphorylation in *Corynebacterium glutamicum* [J]. J Biol Chem 2016 291(12) : 6583-6594.
- [13] TAUCH A , KIRCHNER O , LÖFFLER B , *et al.* Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1 [J]. Curr Microbiol 2002 45(5) : 362-367.
- [14] GREEN M R , SAMBROOK J. Molecular cloning: a laboratory manual [J]. Immunology 2012 49(1) : 895-909.
- [15] SHEN X , JIA W , JIAN W , *et al.* High-level De novo biosynthesis of arbutin in engineered *Escherichia coli* [J]. Metab Eng , 2017 42: 52-58.
- [16] AHMADI M K , FANG L , MOSCATELLO N , *et al.* *E. coli* metabolic engineering for gram scale production of a plant-based anti-inflammatory agent [J]. Metab Eng 2016 38: 382-388.
- [17] DU L , DONG S , ZHANG X , *et al.* Selective oxidation of aliphatic C-H bonds in alkylphenols by a chemomimetic biocatalytic system [J]. Proc Natl Acad Sci U S A 2017 114(26) : E5129-E5137.
- [18] RO D K , PARADISE E M , OUELLET M , *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. Nature 2006 440(7086) : 940-943.
- [19] AJIKUMAR P K , XIAO W H , TYO K E , *et al.* Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. Science 2010 330(6000) : 70-74.
- [20] GALANIE S , THODEY K , TRENCHARD I J , *et al.* Complete biosynthesis of opioids in yeast [J]. Science 2015 349(6252) : 1095-1100.
- [21] PFEIFER B A , ADMIRAAL S J , GRAMAJO H , *et al.* Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli* [J]. Science 2001 291(5509) : 1790-1792.
- [22] MARTIN V J , PITERA D J , WITHERS S T , *et al.* Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids [J]. Nat Biotechnol 2003 21(7) : 796-802.
- [23] HUANG Q , ROESSNER CA , CROTEAU R , *et al.* Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene , a key intermediate in the biosynthesis of taxol [J]. Bioorg Med Chem 2001 9(9) : 2237-2242.
- [24] DRATHS K M , KNOP D R , FROST J W. Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis [J]. J Am Chem Soc ,1999 ,121(7) : 1603-1604.
- [25] LI T , CHEN X , CHAUDHRY M T , *et al.* Genetic characterization of 4-cresol catabolism in *Corynebacterium glutamicum* [J]. J Biotechnol 2014 ,192: 355-365.
- [26] HUANG F-C , HINKELMANN J , HERMENA U A , *et al.* Enhanced production of β -glucosides by *in-situ* UDP-glucose regeneration [J]. J Biotechnol 2016 224: 35-44.
- [27] BERGÉ A , CLADIÈRE M , GASPERI J , *et al.* Meta-analysis of environmental contamination by alkylphenols [J]. Environ Sci Pollut Res 2012 ,19(9) : 3798-3819.
- [28] YING G G , WILLIAMS B , KOOKANA R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review [J]. Environ Int 2002 28(3) : 215-226.

(编辑 WJ)