

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2025.80274

代谢工程改造酿酒酵母从 *D*-木糖合成柚皮苷

赵逸飞^{1,2} 李高阳^{1,2,3} 黄绿红^{2,3} 刘娟^{2,3} 肖志强^{1,2}

(1. 湖南大学研究生院隆平分院, 湖南 长沙 410125; 2. 湖南省农产品加工与质量安全研究所洞庭实验室, 湖南 长沙 410125; 3. 湖南省农业科学院, 湖南 长沙 410125)

摘要: [目的] 探索柑橘活性成分柚皮苷的生物合成方法。[方法] 通过酶筛选、多拷贝整合以及前体供给策略构建合成柚皮素的酿酒酵母工程菌株。在此基础上通过引入柚皮苷合成途径、优化 UDP-葡萄糖供应并最终实现从 *D*-木糖合成柚皮苷。[结果] 通过筛选柚皮素途径关键酶确认最优黄酮合成酶为 PhCHS。进一步将柚皮素合成途径整合至多拷贝位点, 构建的菌株 Z39M2 能够合成 36.53 mg/L 柚皮素; 过表达 *CAT2*、*xPK-PTA* 途径和 *ACC1m* 优化丙二酰辅酶 A 供应构建菌株 Z44, 其柚皮素产量提高至 72.96 mg/L; 通过引入柚皮苷合成途径成功合成了 35.60 mg/L 柚皮苷, 进一步过表达 *PGM1* 和 *UGP1* 将柚皮苷产量提升至 76.67 mg/L。[结论] 通过代谢工程策略构建了一株能够从 *D*-木糖合成柚皮苷的酿酒酵母工程菌株。

关键词: *D*-木糖; 柚皮苷; 柚皮素; 酿酒酵母; 代谢工程

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for *de novo* biosynthesis of naringin from *D*-xylose

ZHAO Yifei^{1,2} LI Gaoyang^{1,2,3} HUANG Luhong^{2,3} LIU Juan^{2,3} XIAO Zhiqiang^{1,2}

(1. Longping Branch Graduate School, Hunan University, Changsha, Hunan 410125, China; 2. Dong Ting Laboratory, Hunan Institute of Agricultural Product Processing and Quality Safety, Changsha, Hunan 410125, China; 3. Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China)

Abstract: [Objective] To explore the biosynthesis method of naringin, a bioactive compound in citrus. [Methods] Engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for naringenin biosynthesis are constructed through enzyme screening, multi-copy integration, and precursor supply. Subsequently, *de novo* biosynthesis of naringin from *D*-xylose is achieved by introducing the naringin biosynthetic pathway and optimizing UDP-glucose supply. [Results] The optimal flavonoid synthase is identified as PhCHS by screening the key enzymes of the naringenin pathway. The naringenin biosynthesis pathway is further integrated at multi-copy sites. The constructed strain Z39M2 can synthesize 36.53 mg/L naringenin. The overexpression of *CAT2*, *xPK-PTA* pathway, and *ACC1m* optimizes malonyl-CoA supply and constructs strain Z44, with a naringenin production increasing to 72.96 mg/L. Finally, the naringin biosynthesis pathway introduction enables the successful biosynthesis of 35.60 mg/L naringin. Further overexpression of *PGM1* and *UGP1* elevates naringin production to 76.67 mg/L. [Conclusion] An engineered *S. cerevisiae* strain capable of *de novo* biosynthesis of naringin from *D*-xylose is successfully constructed by metabolic engineering.

Keywords: *D*-xylose; naringin; naringenin; *Saccharomyces cerevisiae*; metabolic engineering

基金项目: 岳麓山实验室联合引进人才项目(编号: 2024RC2055); 洞庭实验室专项经费项目(编号: 2024-DTZZ-001)

通信作者: 李高阳(1971—), 男, 湖南大学研究员, 博士生导师, 博士。E-mail: lgy7102@163.com

黄绿红(1984—), 女, 湖南省农产品加工与质量安全研究所副研究员, 硕士。E-mail: huanglvhong26@163.com

收稿日期: 2025-01-28 改回日期: 2025-05-11

引用格式: 赵逸飞, 李高阳, 黄绿红, 等. 代谢工程改造酿酒酵母从 *D*-木糖合成柚皮苷[J]. 食品与机械, 2025, 41(6): 1-8.

Citation: ZHAO Yifei, LI Gaoyang, HUANG Luhong, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for *de novo* biosynthesis of naringin from *D*-xylose[J]. Food & Machinery, 2025, 41(6): 1-8.

黄酮类化合物作为植物界广泛存在的活性次级代谢产物,具有抗癌、抗氧化及抗炎等多重生物活性,被广泛应用于食品、医药等领域^[1-2]。柑橘类水果是黄酮类化合物的重要来源,其活性成分主要以糖苷形式存在,例如存在于蜜柚、葡萄柚等植物果皮中的柚皮苷^[3-4]。此外,柚皮苷还具有多种药理活性:在神经系统保护方面,柚皮苷能够通过抑制小胶质细胞促炎受体、调控免疫平衡及维持下游通路稳态^[5-6],显著延缓阿尔茨海默病等神经退行性病变进程^[7]。同时,柚皮苷可以通过调节糖脂代谢和抑制慢性炎症,对糖尿病、肥胖及非酒精性脂肪肝等代谢综合征展现出显著干预效果,具有重要临床转化价值^[8]。

传统柚皮苷生产依赖植物提取工艺,面临资源利用率低、分离成本高等瓶颈^[9]。微生物合成法因其显著的环境友好性、可持续生产优势及高效分离特性,逐渐成为柚皮苷等天然产物生产领域的研究焦点^[10-11]。作为模式微生物,酿酒酵母具有遗传背景清晰、代谢工程改造技术成熟等优势,为柚皮苷的异源合成提供了理想平台^[10, 12-13]。目前,主要通过“推—拉—阻”策略提高酿酒酵母工程菌株中黄酮类化合物产量,包括提高前体物质对香豆酸或丙二酰辅酶 A 供给(推)、提高下游黄酮类化合物合成途径通量(拉)、阻断或抑制副产物合成途径(阻)。Li 等^[14]通过引入异源 ATP-柠檬酸裂解酶将胞内柠檬酸转化为丙二酰辅酶 A,推动上游前体物质供应并将柚皮素产量提升了 9.6%。Du 等^[15]通过在酿酒酵母中引入大肠杆菌的 PDH 途径并结合内源 ACC1 基因用于合成丙二酰辅酶 A,推动柚皮素产量从 79.2 mg/L 提升至 126.0 mg/L。Wang 等^[16]通过将黄酮类化合物合成途径整合至酿酒酵母的多拷贝位点,增强下游合成途径通量并合成了 122.9 mg/L 的柚皮素以及 11.75 mg/L 的染料木素。Liu 等^[17]通过筛选较弱启动子替换酿酒酵母的脂肪酸合成途径,减少乙酰辅酶 A 的快速消耗并提高了下游异黄酮产量。

在生物制造绿色转型背景下,木质纤维素衍生碳源(如 D-木糖)的高效利用受到关注^[18-19]。针对酿酒酵母 D-木糖的代谢缺陷,已有多种方法实现了 D-木糖的快速同化^[20-21],并以 D-木糖为底物合成了多种天然产物。Sun 等^[22]通过结合 D-木糖代谢途径和乙酸同化途径,实现了菌株的 D-木糖代谢和乙酸的自解毒,并成功利用 D-木糖和乙酸合成了 23.91 mg/L 的三乙酸内酯。Lee 等^[23]结合 D-木糖代谢途径的中间产物优势,通过组装 2'-岩藻基乳糖合成途径成功从 D-木糖合成了 25.5 g/L 的 2'-岩藻基乳糖。Borja 等^[24]通过引入酪氨酸解氨酶途径,从 D-木糖合成了黄酮类化合物前体对香豆酸。由于柚皮苷合成依赖 UDP-葡萄糖的供应,目前研究主要集中于从 D-葡萄糖合成柚皮苷^[25]或以 D-葡萄糖和柚皮素作为共底物合成柚皮苷^[26],以 D-木糖作为底物合成柚皮苷的研究较少。试验拟通过代谢工程策略构建从 D-木糖合成柚皮

苷的酿酒酵母细胞工厂;通过筛选不同来源的关键酶,确立柚皮素合成的核心催化模块,并采用多拷贝整合技术对途径酶进行表达量强化,显著提升柚皮素合成通量。在此基础上,通过强化乙酰辅酶 A 代谢模块优化前体供应,进一步提升柚皮素产量。通过引入柚皮苷合成途径并进行 UDP-葡萄糖供应优化,实现从 D-木糖合成柚皮苷。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

酿酒酵母 Z32:以衍生于野生菌株 C800 为出发菌株,试验所用酿酒酵母菌株见表 1;

表 1 试验所用菌株
Table 1 Strains used for test

名称	描述或基因型
Z32	衍生于菌株 <i>S.cerevisiae</i> C800, 可以从 D-木糖合成对香豆酸
Z33	<i>pRS426-pGAL10-PhCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL, Z32</i>
Z34	<i>pRS426-pGAL10-EbCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL, Z32</i>
Z35	<i>pRS426-pGAL10-HaCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL, Z32</i>
Z36	<i>pRS426-pGAL10-SjCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL, Z32</i>
Z37	<i>pRS426-pGAL10-MdCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL, Z32</i>
Z38	<i>pRS426-pGAL10-SbCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL, Z32</i>
Z39M1~Z39M5	<i>Ty2: :pGAL10-PhCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL, Z32</i>
Z40	<i>X4: :pPGK1-CAT2, Z39M2</i>
Z41	<i>XII5: :pTDH3-xPK-pTEF1-PTA, Z39M2</i>
Z42	<i>XII5: :pTDH3-xPK-pTEF1-PTA, Z40</i>
Z43	<i>X2: :pTEF1-ACC1m, Z40</i>
Z44	<i>X2: :pTEF1-ACC1m, Z42</i>
Z45	<i>XII3: :pTDH1-AtRHM1-pADH6-AtGT-pSHM2-CmRhaT</i>
Z46	<i>pRS426-pTDH1-PGM1, Z45</i>
Z47	<i>pRS426-pTDH1-PGM2, Z45</i>
Z48	<i>pRS426-pTDH1-PGM1-pINO-UGP1, Z45</i>

大肠杆菌 JM109:生工生物工程(上海)股份有限公司;基因、质粒:均来自实验室,所有基因已针对酿酒酵母进行了密码子优化,试验所用质粒见表 2;

LB 培养基(大肠杆菌培养基):蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, 氨苄青霉素 100 μg/mL;

表2 试验所用质粒

Table 2 Plasmid used for test

名称	描述
<i>pRS426-PhCHS</i>	<i>pRS426-pGAL10-PhCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL</i>
<i>pRS426-EbCHS</i>	<i>pRS426-pGAL10-EbCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL</i>
<i>pRS426-HaCHS</i>	<i>pRS426-pGAL10-HaCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL</i>
<i>pRS426-SjCHS</i>	<i>pRS426-pGAL10-SjCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL</i>
<i>pRS426-MdCHS</i>	<i>pRS426-pGAL10-MdCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL</i>
<i>pRS426-SbCHS</i>	<i>pRS426-pGAL10-SbCHS-pALD5-MsCHI-pARO7-Pc4CL</i>
<i>pRS426-PGM1</i>	<i>pRS426-pTDH1-PGM1</i>
<i>pRS426-PGM2</i>	<i>pRS426-pTDH1-PGM2</i>
<i>pRS426-PGM1-UGPI</i>	<i>pRS426-pTDH1-PGM1-pINO1-UGPI</i>

YPD培养基(酿酒酵母发酵培养基):D-木糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L;

YNB培养基(酿酒酵母筛选培养基):D-木糖 20 g/L, 酵母无氮氨基酸氮源 10 g/L, 氨基酸(按需添加 50 mg/L 尿嘧啶、50 mg/L 组氨酸或 50 mg/L 色氨酸);

所有固体培养基额外添加 20 g/L 琼脂粉, 所有培养基在高压灭菌锅中以 121 °C 灭菌 20 min; 为了避免美拉德反应, 培养基中的 D-木糖需配制为 200 g/L 的母液单独灭菌。

1.1.2 主要仪器设备

PCR仪: TOne96型, 德国 Biometra 公司;

核酸电泳仪: JY-ECP3000型, 北京君意东方电泳设备有限公司;

凝胶成像仪: Fire reader型, 英国 UVItec 公司;

振荡培养箱: ZQPZ-115型, 天津莱玻特瑞仪器设备有限公司;

金属浴: GY-2101型, 美国 Crystal 公司;

灭菌锅: LDZM-80L型, 上海申安医疗器械厂;

高效液相色谱仪: LC-20A型, 日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 酿酒酵母的质粒转化 根据文献[16], 使用醋酸锂化学法进行酿酒酵母的质粒转化。

1.2.2 酿酒酵母的多拷贝基因组整合 基于同源重组原理和 Ty 转座系统对酿酒酵母进行多拷贝基因组整合^[16]。通过将 一个供体 DNA 转化至酿酒酵母中, 由转座子系统实现对基因表达盒的多拷贝整合。其中, 供体 DNA 包含待整合基因的表达盒、筛选标签(如 *HIS3* 基因)以及 Ty 位点上下游 300 bp 左右同源臂, 用于将基因表达盒同源整合至 Ty 转座子靶点。

1.2.3 酿酒酵母的单拷贝基因组整合 基于 CRISPR/Cas9 技术和同源重组原理对酿酒酵母进行单拷贝基因组整合^[16]。通过共同转化 pCas9 质粒以及供体 DNA, 实现对靶点的编辑和基因表达盒的单拷贝整合。其中, pCas9

包含一个 *Cas9* 基因的表达盒以及特异性的 SgRNA, 用于识别靶点并进行剪切; 供体 DNA 包含待整合基因的表达盒以及目标靶点上下游 300~500 bp 同源臂, 用于将基因表达盒同源整合至靶点。

1.2.4 酿酒酵母的培养方法

(1) 48 孔板筛选培养: 在平板上挑选单菌落至装有 1 mL YPD 发酵培养基的 48 孔板中, 摇床温度 30 °C, 转速 220 r/min。培养 120 h 后取 500 μL 发酵液用于发酵产物的检测。

(2) 摇瓶发酵培养: 在平板上挑选单菌落至装有 5 mL YNB 筛选培养基或 YPD 发酵培养基(取决于菌株是否包含质粒)的 50 mL 烧瓶中, 摇床温度 30 °C, 转速 220 r/min。预培养 16~24 h 后, 按 2% 的接种量转接至含有 25 mL YPD 发酵培养基的 250 mL 烧瓶中, 摇床温度 30 °C, 转速 220 r/min。

1.2.5 发酵产物检测 向 500 μL 发酵液中加入 500 μL 甲醇, 充分振荡混匀。12 000 r/min 离心 2 min, 取上清过滤至液相瓶中。使用反相 C_{18} 柱进行分析, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈, 以 1 mL/min 的流速进行梯度洗脱。检测器为紫外检测器, 检测波长 308, 290 nm, 洗脱程序见表 3。

1.2.6 数据处理 所有试验均进行 3 次生物学重复, 采用 SPSS Statistics 21 软件进行显著性分析, 采用 Excel 2025、

表3 高效液相色谱梯度洗脱程序

Table 3 Gradient elution program for HPLC

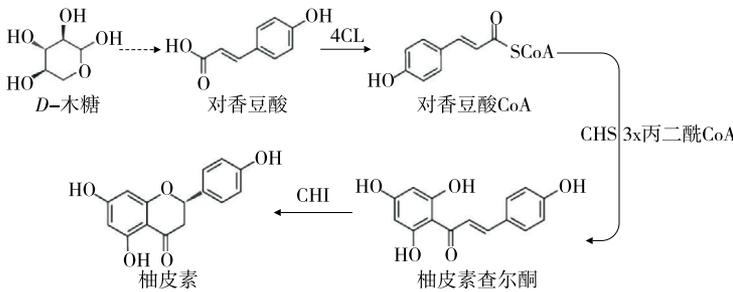
时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	90	10
1.5	90	10
3.0	70	30
30.0	45	55
33.0	90	10
40.0	90	10

Origin 2025 软件绘图, 采用 Adobe illustrator 2023、Chemdraw 20.0 软件绘制流程图和分子结构图。

2 结果与分析

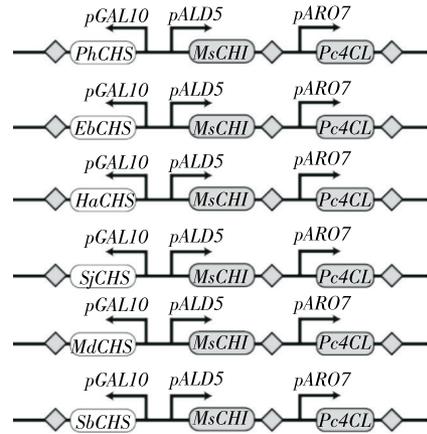
2.1 黄酮合成酶(CHS)的筛选

由图 1(a)可知, 对香豆酸经 4-香豆酰辅酶 A 连接酶(4CL)催化转化为对香豆酰辅酶 A, 在黄酮合成酶(CHS)的催化下与三分子丙二酰辅酶 A 结合转化为柚皮素查尔酮, 最后在查尔酮异构酶(CHI)的催化下转化为柚皮素。



(a) 柚皮素合成路径

其中, CHS 为柚皮素合成的关键酶, 不同来源的 CHS 对柚皮素产量有较大影响^[27]。因此, 筛选出可以用于催化柚皮素合成的黄酮合成酶 PhCHS、EbCHS、HaCHS、SjCHS、MdCHS 和 SbCHS。由图 1(b)可知, 在其他基因、启动子和终止子保持不变的情况下, 使用酿酒酵母内源强启动子 pGAL10 控制植物来源的 CHS, 得到的 6 个不同的质粒并分别转化至酿酒酵母 Z32 中, 得到菌株 Z32~Z38, 摇瓶培养 120 h 后, 检测柚皮素产量。



(b) 不同CHS的基因表达盒

图 1 从 D-木糖合成柚皮素的示意图

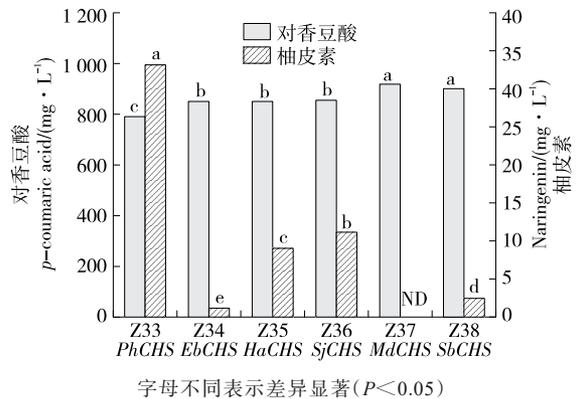
Figure 1 Biosynthesis of naringenin from D-xylose

由图 2 可知, 除菌株 Z37(过表达 MdCHS)外, 所有菌株的发酵液中均检测到不同浓度的柚皮素。其中, 表达了 PhCHS 的菌株 Z33 检测到的柚皮素产量最高, 为 33.25 mg/L。尽管不同植物来源的 CHS 均具有黄酮合成酶的催化活性, 但发酵试验表明不同来源的 CHS 在催化柚皮素合成过程中的效率并不相同, 这可能与不同来源的酶活性差异、酿酒酵母对不同来源酶的表达效率差异有关^[28]。此外, 柚皮素产量与对香豆酸产量呈负相关, 表明下游 CHS 催化效率更高时, 对香豆酸更多地被消耗用于合成柚皮素。综上, 选用催化效果最好的 PhCHS 进行后续试验。

2.2 4CL、CHS 和 CHI 的多拷贝位点整合

如图 3 所示, 将 4CL、CHS 和 CHI 基因的表达盒整合至菌株 Z32 的 Ty2 转座子上实现多拷贝整合。在 30 个平板上挑选共 240 个转化子于 48 孔板中, 发酵 120 h 后, 筛选出 5 个产量较高的备选菌株(Z39M1~Z39M5)进行摇瓶复筛。

由图 4 可知, 菌株 Z39M2 合成柚皮素产量最高, 为 36.53 mg/L, 相比菌株 Z33 提高了 9.86%。此外, 菌株 Z39M3 在对香豆酸产量降低的情况下并没有带来更高的柚皮素产量, 可能是由于多拷贝位点整合对菌株基因表



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 不同来源 CHS 对柚皮素产量的影响

Figure 2 Effects of CHS from different sources on naringenin production

达带来了额外的不稳定因素, 抑制了菌株生长^[29], 进而导致 Z39M2 的柚皮素和对香豆酸产量均不如其他菌株。综上, 柚皮素的产量受到 4CL、CHS 和 CHI 3 个关键途径酶的表达量影响, 提高 3 个途径酶的表达量能够提高柚皮素产量, 推测可能是柚皮素合成途径的低通量、异源酶的低效率或者其余前体或辅因子(如丙二酰辅酶 A)供应不足等限制了柚皮素的产量^[14]。

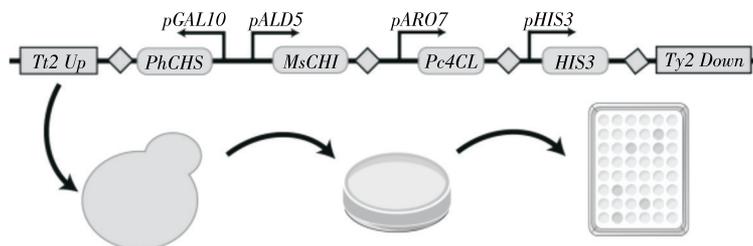


图3 4CL、CHS和CHI的多拷贝位点整合示意图

Figure 3 Multi-copy site integration of 4CL, CHS, and CHI

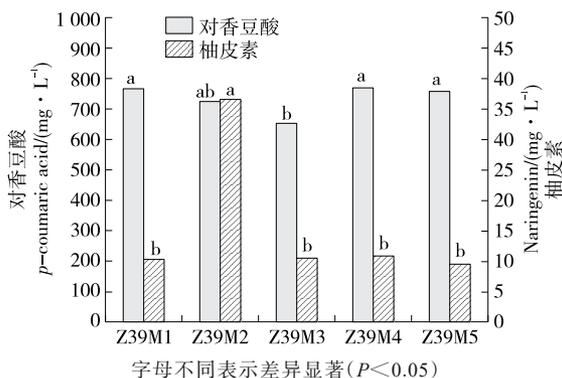


图4 4CL、CHS和CHI多拷贝位点整合对柚皮素产量的影响

Figure 4 Effects of 4CL, CHS, and CHI multi-copy site integration on naringenin production

2.3 乙酰辅酶A供应优化

柚皮素合成需要充足的丙二酰辅酶A供应,其直接前体为乙酰辅酶A。乙酰辅酶A是酿酒酵母生长代谢的重要中间体,可以通过多种策略调节其供应并进一步提升柚皮素的产量。由图5可知,酿酒酵母中的乙酰辅酶A主要存在于线粒体或过氧化物酶体。酿酒酵母线粒体/过氧化物酶体肉碱乙酰辅酶A转移酶(由*CAT2*编码)催化乙酰肉碱和乙酰辅酶A之间的转化,并实现乙酰辅酶A在线粒体和过氧化物酶体之间迁移。为了利用细胞器中的乙酰辅酶A,可以通过在细胞质过表达*CAT2*来截留乙酰辅酶A并用于柚皮素的合成。因此,在菌株Z39M2中通过单拷贝整合过表达了基因*CAT2*,构建得到菌株Z40。

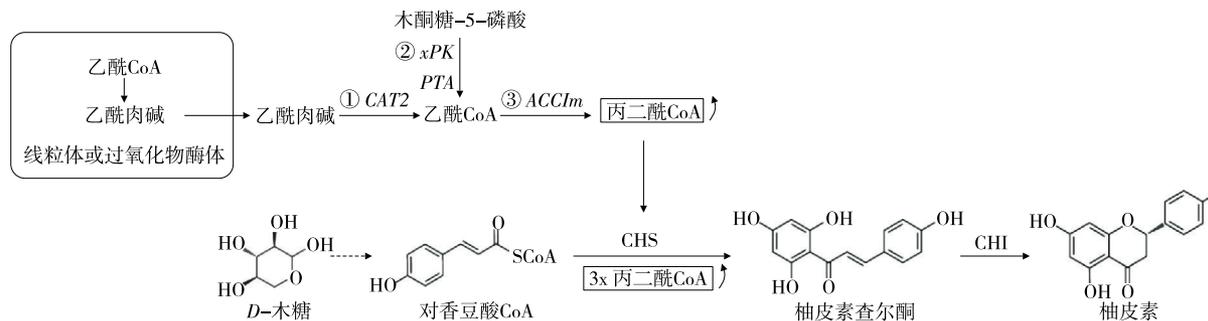


图5 乙酰辅酶A供应优化策略示意图

Figure 5 Optimization strategy for acetyl CoA supply

由图6可知,与对照菌株Z39M2相比,菌株Z40合成柚皮素产量提高了35.37%,达到49.45 mg/L,表明过表达*CAT2*能够通过将细胞质中的乙酰肉碱转化为乙酰辅酶A并显著提升柚皮素产量^[30]。如图5所示,木酮糖-5-磷酸特异性磷酸酮酶-磷酸转乙酰化酶途径(*xPK-PTA*途径)可以催化木酮糖-5-磷酸转化为乙酰辅酶A并用于柚皮素的合成。因此,在菌株Z39M2中通过单拷贝整合过表达了*Leuconostoc mesenteroides*来源的*xPK*和*Clostridium kluyveri*来源的*PTA*,构建得到菌株Z41。与对照菌株Z39M2相比,菌株Z41合成柚皮素产量提高了25.65%,达到45.90 mg/L,表明过表达异源

乙酰辅酶A合成途径(*xPK-PTA*途径)能够显著提升柚皮素产量^[31]。

鉴于上述策略的正面效果,将*CAT2*和*xPK-PTA*途径同时通过单拷贝整合在菌株Z39M2中过表达,构建得到菌株Z42。菌株Z42的柚皮素产量并未显著提高,推测是下游乙酰辅酶A到丙二酰辅酶A的转化速率不足,所以组合策略并未提高柚皮素产量,需进一步提升丙二酰辅酶A的合成速率^[32]。因此,在菌株Z42中通过单拷贝整合过表达了酿酒酵母内源的乙酰辅酶A羧化酶变体(由*ACC1m*编码),得到菌株Z44。菌株Z44合成柚皮素产量显著提高,达到72.96 mg/L,相比出发菌株Z39M2提高了

99.73%, 表明提高乙酰辅酶 A 到丙二酰辅酶 A 的通量可以提高柚皮素的产量^[14]。因此, 使用菌株 Z44 进行后续试验。

2.4 柚皮苷合成与产量优化

如图 7 所示, 柚皮素在 UDP-葡萄糖依赖性 7-O 葡萄糖基转移酶(UGT)的催化下在 7-O 位接入一分子葡萄糖, 随后在 1,2-鼠李糖基转移酶(1,2-RhaT)的催化下在葡萄糖上通过 1,2-糖苷键接入一分子鼠李糖形成柚皮苷。由于酿酒酵母无法直接合成糖基供体 UDP-鼠李糖, 需要额外表达 UDP-鼠李糖合成酶(RHM)用于将 UDP-葡萄糖转化为 UDP-鼠李糖^[26]。因此, 在菌株 Z44 中通过单拷贝整合引入来自 *Arabidopsis thaliana* 的 *AtUGT*、*AtRHM1* 以及来自 *Citrus maxima* 的 *Cm1, 2-RhaT*, 构建得到菌株 Z45。

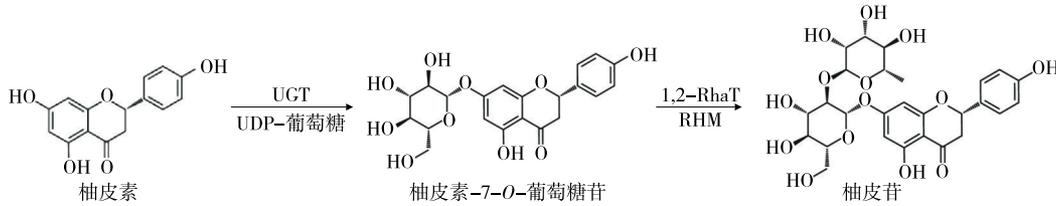
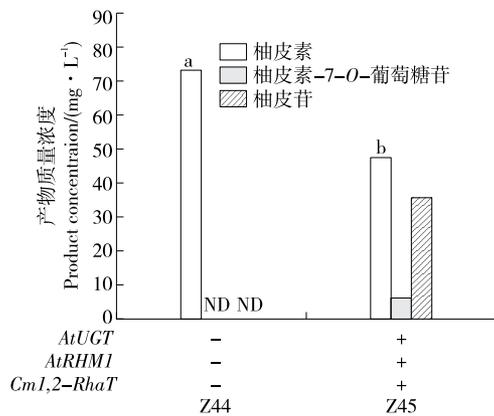


图 7 柚皮苷合成途径示意图

Figure 7 Naringin biosynthesis pathway

由图 8 可知, 菌株 Z45 成功从 *D*-木糖合成了 35.60 mg/L 的柚皮苷, 且柚皮素积累量较 Z44 降低了 25.52 mg/L, 表明柚皮素能够在 UGT、RHM 和 1,2-RhaT 的催化下成功转化为柚皮苷。菌株 Z45 仅产生了极少量的中间产物柚皮素-7-O-葡萄糖苷, 表明柚皮苷合成途径较为高效且中间副产物较少。

在酿酒酵母中, 葡萄糖-6-磷酸在葡萄糖磷酸变位酶



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 8 从 *D*-木糖合成柚皮苷

Figure 8 Biosynthesis of naringin from *D*-xylose

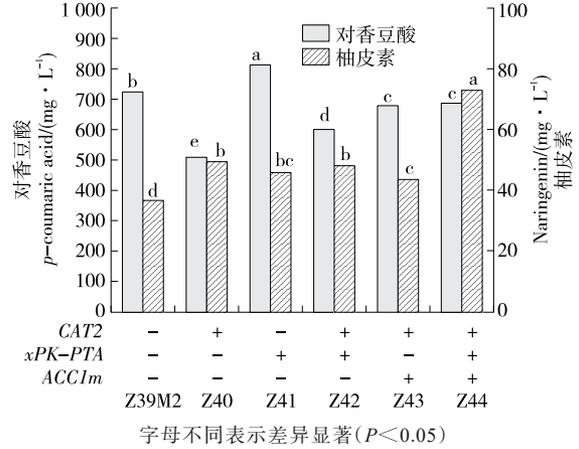
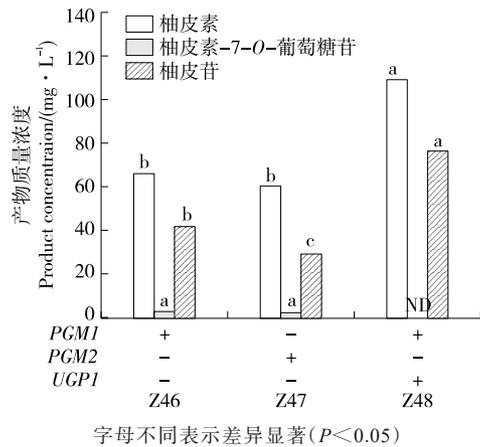


图 6 乙酰辅酶 A 供应优化对柚皮素产量的影响

Figure 6 Effect of acetyl-CoA supply optimization on naringenin production

(PGM) 的催化下转化为葡萄糖-1-磷酸, 随后在 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UGP)的催化下转化为 UDP-葡萄糖。为了进一步提高柚皮苷产量, 在菌株 Z45 中通过质粒分别过表达了酿酒酵母内源的葡萄糖磷酸变位酶(由 *PGM1*、*PGM2* 编码), 构建得到菌株 Z46 和 Z47。由图 9 可知, 过表达 *PGM1* 将柚皮苷产量提高至 42.21 mg/L, 而过表达



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 9 优化 UDP-葡萄糖供应对柚皮苷产量的影响

Figure 9 Effect of UDP-glucose supply optimization on naringin production

*PGM2*对柚皮苷合成有负面影响。此外,在菌株Z46(过表达*PGM1*)的基础上额外表达了UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(由*UGPI*编码),得到菌株Z48。组合过表达*PGM1*和*UGPI*对柚皮苷合成的影响最显著,菌株Z48从D-木糖合成了76.67 mg/L的柚皮苷,较优化前菌株Z45提高了115.36%。综上,UDP-葡萄糖为柚皮苷合成的重要前体,通过提高UDP-葡萄糖的供应可以提高柚皮苷产量^[33]。

3 结论

研究以一株可以从D-木糖合成对香豆酸的工程酿酒酵母菌株Z32出发,通过关键酶筛选、多拷贝整合提升表达量、提高乙酰辅酶A供应、引入柚皮苷合成途径和优化UDP-葡萄糖供应等策略实现了从D-木糖合成柚皮苷。结果表明,PhCHS能催化合成最高产量的柚皮素,结合多拷贝整合,菌株Z39M2合成柚皮素产量达到36.53 mg/L。提高丙二酰辅酶A供应可以进一步提升柚皮素产量,通过引入*CAT2*、*xPK-PTA*途径以及*ACC1m*得到菌株Z44将柚皮素产量提高至72.96 mg/L,相较优化前提升了99.73%。在Z44中共表达*AtUGT*、*AtRHMI*、*Cm1*、*2-RhaT*可以将柚皮素转化为35.60 mg/L的柚皮苷。最后通过引入*PGM1*和*UGPI*提高UDP-葡萄糖供应,得到的菌株Z48可将柚皮苷产量提升至76.67 mg/L,相比优化前提升了115.36%。尽管研究成功实现了在工程化酿酒酵母中从D-木糖合成柚皮苷,但最终产量仍难以满足工业化需求,可以针对柚皮素途径和柚皮苷途径进行进一步优化并推动柚皮苷的微生物合成向工业化应用迈进。

参考文献

- [1] 刘丹,郭欢,吴笛,等. 柑橘黄酮类化合物的提取新技术及生物活性研究进展[J]. 食品与机械, 2022, 38(11): 217-224.
LIU D, GUO H, WU D, et al. Research progress on new extraction technologies and bioactivities of flavonoids from orange[J]. Food & Machinery, 2022, 38(11): 217-224.
- [2] SHEN N, WANG T F, GAN Q, et al. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132531.
- [3] 张珊,黄雪松. 高效液相色谱法同时测定柚子中的4种黄酮苷和柠檬苦素[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 58-63.
ZHANG S, HUANG X S. Simultaneous determination of four flavonoid glycosides and limonin in pomelo by HPLC[J]. Food & Machinery, 2021, 37(3): 58-63.
- [4] BARRECA D, GATTUSO G, BELLOCCO E, et al. Flavanones: citrus phytochemical with health-promoting properties[J]. BioFactors, 2017, 43(4): 495-506.
- [5] WANG D, SHI L Y, XIN W, et al. Activation of PPAR γ inhibits pro-inflammatory cytokines production by upregulation of miR-124 *in vitro* and *in vivo*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 486(3): 726-731.
- [6] SHILPA V S, SHAMS R, DASH K K, et al. Phytochemical properties, extraction, and pharmacological benefits of naringin: a review[J]. Molecules, 2023, 28(15): 5 623.
- [7] SHEN Y Y, LIU F, ZHANG M J. Therapeutic potential of plant-derived natural compounds in Alzheimer's disease: targeting microglia-mediated neuroinflammation[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2024, 178: 117235.
- [8] CHEN J, QIN X, CHEN M Y, et al. Biological activities, molecular mechanisms, and clinical application of naringin in metabolic syndrome[J]. Pharmacological Research, 2024, 202: 107124.
- [9] LOU H H, HU L F, LU H Y, et al. Metabolic engineering of microbial cell factories for biosynthesis of flavonoids: a review [J]. Molecules, 2021, 26(15): 4 522.
- [10] WANG J, CHEN C, GUO Q, et al. Advances in flavonoid and derivative biosynthesis: systematic strategies for the construction of yeast cell factories[J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(9): 2 667-2 683.
- [11] 马玉玉,宋伟,冯小娜,等. 泛酸合成酶菌株筛选及其催化生产D-泛酸的研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(6): 28-35.
MA Y Y, SONG W, FENG X N, et al. Strain screening of pantothenate synthetase and catalysis to produce D-pantothenic acid[J]. Food & Machinery, 2020, 36(6): 28-35.
- [12] 成婷,苑帅,张晓元,等. 酿酒酵母异丁醇合成途径调控的研究进展[J]. 生物技术通报, 2023, 39(7): 80-90.
CHENG T, YUAN S, ZHANG X Y, et al. Research progress in the regulation of isobutanol synthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(7): 80-90.
- [13] 邢敏钰,冉滢侨,谭丹. 酿酒酵母中萜类化合物的生物合成与代谢调控研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1 661-1 693.
XING M Y, RAN G Q, TAN D. Advances in the biosynthesis and metabolic regulation of terpenoids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1 661-1 693.
- [14] LI H B, MA W J, WANG W G, et al. Synergetic engineering of multiple pathways for *De novo* (2S)-naringenin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2024, 12(1): 59-71.
- [15] DU Y, YANG B R, YI Z Q, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* coculture platform for the production of flavonoids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(7): 2 146-2 154.
- [16] WANG Y T, XIAO Z Q, ZHANG S Q, et al. Systematic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the *de novo* biosynthesis of genistein and glycosylation derivatives[J].

- Journal of Fungi, 2024, 10(3): 176.
- [17] LIU Q L, LIU Y, LI G, et al. *De novo* biosynthesis of bioactive isoflavonoids by engineered yeast cell factories[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 6 085.
- [18] KWAK S, JO J H, YUN E J, et al. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(2): 271-283.
- [19] QIU Y L, WU M L, BAO H D, et al. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for co-fermentation of glucose and xylose: current state and perspectives[J]. Engineering Microbiology, 2023, 3(3): 100084.
- [20] LI X W, WANG Y Y, LI G, et al. Metabolic network remodelling enhances yeast's fitness on xylose using aerobic glycolysis[J]. Nature Catalysis, 2021, 4(93): 783-796.
- [21] XU H Q, KIM S, SOREK H, et al. *PHO13* deletion-induced transcriptional activation prevents sedoheptulose accumulation during xylose metabolism in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 34: 88-96.
- [22] SUN L, LEE J W, YOOK S, et al. Complete and efficient conversion of plant cell wall hemicellulose into high-value bioproducts by engineered yeast[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 4 975.
- [23] LEE J W, KWAK S, LIU J J, et al. Enhanced 2'-fucosyllactose production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* using xylose as a co-substrate[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 322-329.
- [24] BORJA G M, RODRIGUEZ A, CAMPBELL K, et al. Metabolic engineering and transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* producing *p*-coumaric acid from xylose[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 191.
- [25] QIU Z T, HAN Y M, LI J, et al. Metabolic division engineering of *Escherichia coli* consortia for *de novo* biosynthesis of flavonoids and flavonoid glycosides[J]. Metabolic Engineering, 2025, 89: 60-75.
- [26] XIAO Z Q, WANG Y T, LIU J, et al. Systematic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* chassis for efficient flavonoid-7-*O*-disaccharide biosynthesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(9): 2 740-2 749.
- [27] 童颖佳. 代谢工程和酶工程改造酿酒酵母高效合成(2*S*)-柚皮素[D]. 无锡: 江南大学, 2022: 11-26.
- TONG Y J. Metabolic and enzymatic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to efficiently biosynthesize the (2*S*)-naringenin[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022: 11-26.
- [28] MAO J W, MOHEDANO M T, FU J, et al. Fine-tuning of *p*-coumaric acid synthesis to increase (2*S*)-naringenin production in yeast[J]. Metabolic Engineering, 2023, 79: 192-202.
- [29] DU F, LI Z J, LI X, et al. Optimizing multicopy chromosomal integration for stable high-performing strains[J]. Nature Chemical Biology, 2024, 20(12): 1 670-1 679.
- [30] YOCUM H C, BASSETT S, DA SILVA N A. Enhanced production of acetyl-CoA-based products *via* peroxisomal surface display in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(48): e2214941119.
- [31] MEADOWS A L, HAWKINS K M, TSEGAYE Y, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production[J]. Nature, 2016, 537(7 622): 694-697.
- [32] MOHEDANO M T, MAO J W, CHEN Y. Optimization of pinocembrin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(1): 144-152.
- [33] FENG Y Y, YAO M D, WANG Y, et al. Advances in engineering UDP-sugar supply for recombinant biosynthesis of glycosides in microbes[J]. Biotechnology Advances, 2020, 41: 107538.