



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Synthetic Biology—Article

利用异源酶组合构建酿酒酵母中咖啡酸的生物合成

刘岚清^{a,b,#}, 刘宏^{a,b,#}, 张伟^{a,b}, 姚明东^{a,b}, 李炳志^{a,b}, 刘夺^{a,b,*}, 元英进^{a,b}

^a Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

^b SynBio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), Tianjin University, Tianjin 300072, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2018

Revised 25 September 2018

Accepted 20 November 2018

Available online 02 March 2019

关键词

酿酒酵母

咖啡酸

异源酶

细胞色素 P450 酶

合成生物学

摘要

微生物中构建植物源天然产物的生物合成面临着许多挑战,尤其是当需要表达与激活植物源细胞色素 P450 酶的时候。通过从几种细菌中筛选 HpaB 和 HpaC 两种酶,本文在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中构建了具有活性的 4-羟基苯乙酸-3-羟化酶 (4HPA3H),它可以发挥植物源细胞色素 P450 酶的相似作用,用于生产咖啡酸。在与一个共同的酪氨酸氨裂合酶 (TAL) 协同作用下,不同的异源 HpaB 酶和 HpaC 酶组合在将底物 L-酪氨酸转化为目标产物咖啡酸上展现出不同能力。以铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 HpaB 酶和肠沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 的 HpaC 酶的异源酶组合可生产最高咖啡酸产量,摇瓶培养下可达到 $(289.4 \pm 4.6) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。酵母底盘细胞与异源酶的相容性得到了有效的改善,咖啡酸的产量比初始值提高了 40 倍。铜绿假单胞菌 HpaB 酶中黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 结合域周围的 6 个关键氨基酸残基与其他细菌来源的 HpaB 酶有明显区别,可能在影响酶活性方面起关键作用。综上,我们建立了一种有效的方法来构建高效的酵母系统用于合成非天然羟基苯丙烷类化合物。

© 2019 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

合成生物学的一个典型特征是从不同物种中招募特定的酶来执行多步生化反应,进而合成功能产品。这一过程最著名的例子之一是利用植物、哺乳动物、细菌和酵母本身的酶在酿酒 (*Saccharomyces cerevisiae*) 酵母细胞中构建植物源阿片类的生物合成途径,包括 20 多个反应步骤[1]。模式微生物大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和酿酒酵母也被优化用于合成其他植物源天然产物,如青蒿酸、紫杉醇前体、丹参酸 A 和人参皂苷[2–8]。为了达到理想的产物合成效率,必须仔细考虑异源酶的选择。在微生物中重建植物中的羟基化反应时,一项十分

艰巨但并非完全不可能的任务是从异源物种中筛选和修饰有功能的细胞色素 P450 酶。植物源细胞色素 P450 酶通常需要锚定在线粒体或内质网等细胞器的特殊膜结构上,并且需要 NADPH 和 FADH₂ 等辅因子的配合作用。这种高度专门化的酶作用模式限制了工程化微生物中重建植物源细胞色素 P450 酶的活性[9,10]。

咖啡酸作为一种有价值的产物也是由植物中细胞色素 P450 酶参与合成的。这种天然产物,也被称为 3,4-二羟基肉桂酸,以及其衍生物如绿原酸 (CGA)、咖啡酸苯乙酯 (CAPE),被广泛用于医药、食品和其他生命健康领域[11–14]。天然植物中咖啡酸含量较低,现有尚不成熟的提取方法进一步降低了其产量和纯度[15]。

* Corresponding author.

E-mail address: liuduo19870401@126.com (D. Liu).

因此, 利用合成生物学方法构建生产咖啡酸的微生物被认为是一种很有前景的选择[16]。一个直接的想法是吸收植物源的苯丙氨酸 (Phe) 脱氨反应, 在苯基环的4和3位置进行两步羟基化, 以获得肉桂酸和对香豆酸[17,18]。所涉及的酶是肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 和对香豆酸-3-羟化酶 (Coum3H), 它们都是植物源特异性细胞色素P450依赖的单加氧酶[19,20]。然而, 只有少数报道表明植物源C4H在微生物中发挥作用, 尚没有关于植物源Coum3H在微生物中有活性的例子[21,22]。另一种截然不同的想法是在大肠杆菌中构建细菌源的生物合成途径。Lin和Yan[9]证实, 大肠杆菌中天然的4-羟基苯乙酸-3-羟化酶 (4HPA3H) 能成功地将底物对香豆酸羟化为咖啡酸。Rodrigues等[10]用红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) 的细胞色素P450酶——CYP199A2成功将对香豆酸转化为咖啡酸。Zhang和Stephanopoulos[23]使用4-香豆酸: 辅酶A连接酶 (4CL) 和源自西班牙糖丝菌 (*Saccharothrix espanaensis*) 的编码Coum3H酶的Sam5基因, 将对香豆酸转化为咖啡酸。他们还研究了由酪氨酸 (Tyr) 合成咖啡酸的路径和Coum3H途径。本研究组的Yao[24]之前利用从大肠杆菌中克隆到的4-羟基苯乙酸-3-单加氧酶 (HpaB) 和NADPH-黄素氧化

还原酶 (HpaC), 从底物4-羟基苯基丙酮酸出发, 构建了一条非天然的丹参酸A合成途径。之前的研究已经证明了HpaB和HpaC的催化活性具有广泛的底物选择范围[9,24]。这些工作为在微生物中构建一个不依赖于植物源细胞色素P450酶的咖啡酸生物合成途径铺就了道路[25,26][图1 (a)]。

本研究利用异源酪氨酸氨裂合酶 (TAL) 和4HPA3H复合物 (由不同物种来源hpaB和hpaC基因经密码子优化后表达得到的酶组合而成), 成功在酿酒酵母中构建了咖啡酸的生物合成途径[图1 (b)]。通过共转化3个质粒, 包括一个共同的TAL转录单位 (TU) 所在质粒, 以及不同来源hpaB和hpaC的各种组合 (另两个质粒), 我们构建了多株产咖啡酸的酵母菌株。这种质粒共转化的方法能够方便快速地检测不同酶组合所引发的不同咖啡酸生产能力。结果表明, 在摇瓶发酵中, 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的hpaB酶和肠沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 的hpaC酶组合所生产的咖啡酸含量最高, 为 $(289.4 \pm 4.6) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。HpaB酶和HpaC酶的最佳组合与酵母底盘形成良好的相容性, 有望用于高效生产咖啡酸及其有价值的衍生物。

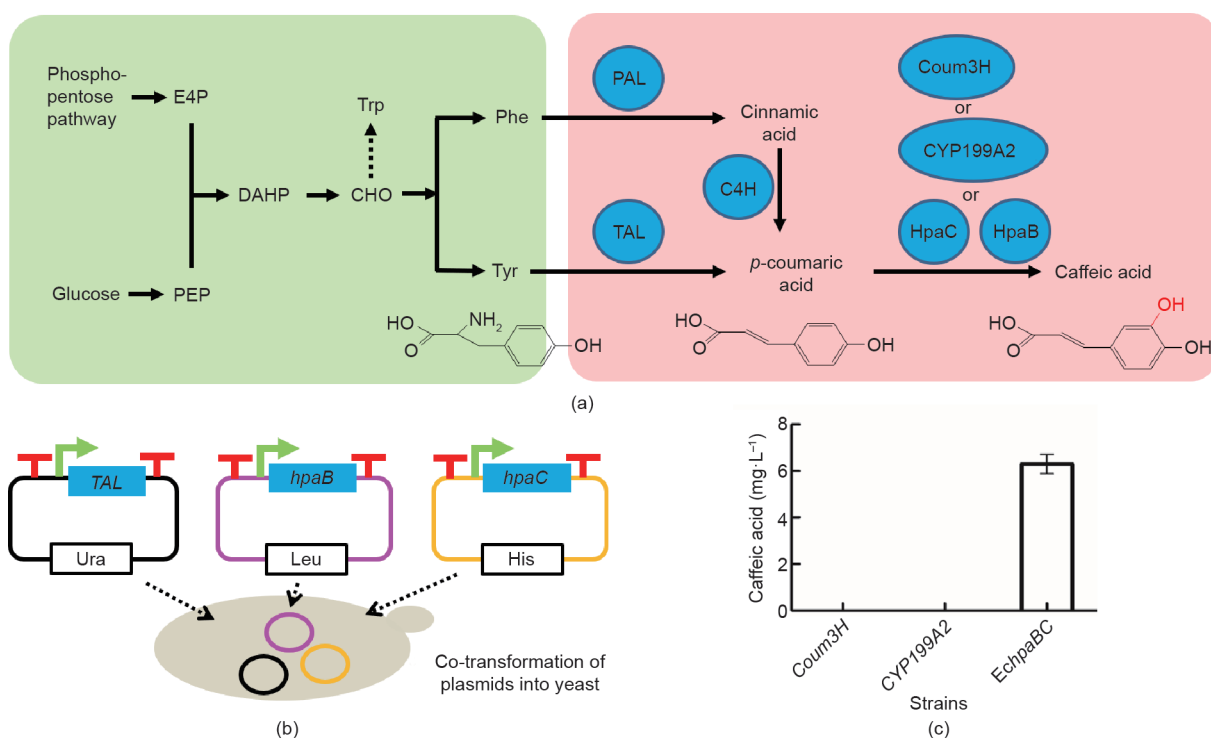


图1. 在酿酒酵母中构建咖啡酸的生物合成途径。(a) 已在工程大肠杆菌中成功构建的咖啡酸生物合成途径的示意图;(b) 用于检测酵母中构建途径的多个质粒共转化细胞示意图;(c) 含有不同途径的酵母中咖啡酸的合成情况检测。E4P: 4-磷酸赤藓糖; PEP: 磷酸烯醇丙酮酸; DAHP: 3-脱氧-D-阿拉伯庚酸-7-磷酸; CHO: 分支酸; Phe: 苯丙氨酸; Trp: 色氨酸; Ura: 尿嘧啶; Leu: 亮氨酸; HIS: 组氨酸。

2. 材料与方法

2.1. 异源基因合成及质粒构建

表1列出了本研究中使用的质粒。从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库上下载了罗氏酵母 (*Rhodospiridium toruloides*) *TAL* 基因序列, 经密码子优化后, 提交给 GenScript 生物技术公司进行基因的合成。从 NCBI 数据库中同样获得了多个物种来源的 *hpaB* 和 *hpaC* 基因的相应序列, 并以同样的方式进行合成。这些基因被分别放置于 pUC57-Simple-01 到 pUC57-Simple-15 这 15 个载体上 (质粒载体 pUC57-Simple 由 pUC57 中一个天然 *BsaI* 酶切位点发生突变后所得)。

我们从酿酒酵母 BY4741 的基因组中分别克隆了启动子 P_{PDC1} 、 P_{PGK1} 和 P_{TDH3} , 以及终止子 T_{ENO2} 、 T_{GPM1} 、 T_{GPD} 、 T_{CYC1} 和 T_{TEF1} 。之后, 我们设计特异性引物, 利用重叠延伸聚合酶链式反应 (OE-PCR) 将 T_{ENO2} 、 P_{PDC1} 和 T_{GPM1} 按顺序组装在一起, 形成新的基因表达盒 (或 TU) T_{ENO2} - P_{PDC1} - T_{GPM1} , 这是我们研究中所使用的“空白 TU”形式 [27]。我们在 P_{PDC1} 和 T_{GPM1} 之间设计了两个背靠背的 *BsaI* 酶识别和切割位点, 为后续酶切消化做了准备 [图 1 (b)]。我们还同步构建了 T_{GPM1} - P_{PGK1} - T_{GPD} 和 T_{CYC1} - P_{TDH3} - T_{TEF1} , 并利用 *NotI* 酶切, 将上述 3 个“空白 TU”分别连接到不同的质粒 pRS415、pRS413 和 pRS416 中, 产生了 pRS415-Blank、pRS413-Blank 和 pRS416-Blank 3 个新质粒。

表1 本研究中所用的质粒

Plasmid	Description	Source
pRS415	Single copy plasmid with <i>LEU2</i> and <i>ampR</i> marker	—
pRS413	Single copy plasmid with <i>HIS3</i> and <i>ampR</i> marker	—
pRS416	Single copy plasmid with <i>URA3</i> and <i>ampR</i> marker	—
pUC57-simple	Blunt cloning vector, <i>kanR</i> marker	GenScript
pUC57-Simple-01	<i>hpaB</i> from <i>E. coli</i> (protein accession No.: AAR11357.1)	GenScript
pUC57-Simple-02	<i>hpaB</i> from <i>Klebsiella pneumoniae</i> (CDO16163.1)	GenScript
pUC57-Simple-03	<i>hpaB</i> from <i>Photobacterium luminescens</i> (AAO17197.1)	GenScript
pUC57-Simple-04	<i>hpaB</i> from <i>P. aeruginosa</i> (PKG21040.1)	GenScript
pUC57-Simple-05	<i>hpaB</i> from <i>P. putida</i> (ADA63516.1)	GenScript
pUC57-Simple-06	<i>hpaB</i> from <i>Sulfobacillus acidophilus</i> TPY (AEJ40622.1)	GenScript
pUC57-Simple-07	<i>hpaB</i> from <i>Enterobacter cloacae</i> (PJM38870.1)	GenScript
pUC57-Simple-08	<i>hpaC</i> from <i>E. coli</i> (AAR11356.1)	GenScript
pUC57-Simple-09	<i>hpaC</i> from <i>Klebsiella pneumoniae</i> (CDO16164.1)	GenScript
pUC57-Simple-10	<i>hpaC</i> from <i>Photobacterium luminescens</i> (AAO17198.1)	GenScript
pUC57-Simple-11	<i>hpaC</i> from <i>P. aeruginosa</i> (PKG21041.1)	GenScript
pUC57-Simple-12	<i>hpaC</i> from <i>P. putida</i> (ADA63517.1)	GenScript
pUC57-Simple-13	<i>hpaC</i> from <i>Salmonella enterica</i> (GAR62209.1)	GenScript
pUC57-Simple-14	<i>hpaC</i> from <i>Achromobacter</i> sp. (CUJ32851.1)	GenScript
pUC57-Simple-15	<i>TAL</i> from <i>R. toruloides</i> (CDR39392.1)	GenScript
pUC57-Simple-101	<i>Coum3H</i> from <i>Saccharothrix espanaensis</i> (ABC88666.1)	GenScript
pUC57-Simple-102	<i>CYP199A2</i> from <i>Rhodospseudomonas palustris</i> (OPF94131.1)	GenScript
pRS415-Blank	The cassette T_{ENO2} - P_{PDC1} -(back-to-back <i>BsaI</i> sites)- T_{GPM1} was cloned and inserted into the <i>NotI</i> site of pRS415	This study
pRS413-Blank	The cassette T_{GPM1} - P_{PGK1} -(back-to-back <i>BsaI</i> sites)- T_{GPD} was cloned and inserted into the <i>NotI</i> site of pRS413	This study
pRS416-Blank	The cassette T_{CYC1} - P_{TDH3} -(back-to-back <i>BsaI</i> sites)- T_{TEF1} was cloned and inserted into the <i>NotI</i> site of pRS416	This study
pRS415-hpaB-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07	<i>hpaB</i> was digested from pUC57-Simple-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07 by <i>BsaI</i> and inserted between the digested back-to-back <i>BsaI</i> sites in pRS415-Blank	This study
pRS413-hpaC-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07	<i>hpaC</i> was digested from pUC57-Simple-08, 09, 10, 11, 12, 13, 14 by <i>BsaI</i> and inserted between the digested back-to-back <i>BsaI</i> sites in pRS413-Blank	This study
pRS416-TAL	<i>TAL</i> was digested from pUC57-Simple-15 by <i>BsaI</i> and inserted between the digested back-to-back <i>BsaI</i> sites in pRS416-Blank	This study
pRS415-Coum3H	<i>Coum3H</i> was ligated into pRS415-Blank	This study
pRS415-CYP199A2	<i>CYP199A2</i> was ligated into pRS415-Blank	This study

我们对 *hpaB*、*hpaC* 和 *TAL* 的基因片段分别用 *BsaI* 酶切，将其从各自所在的 pUC57-Simple 质粒中回收出来，分别连接到 pRS415-Blank、pRS413-Blank 和 pRS413-Blank 中，构建出一系列完整的 TU。表 1 列出了所有已构建的 TU，分别为 pRS415-*hpaB*-01 至 pRS415-*hpaB*-07、pRS413-*hpaC*-01 至 pRS413-*hpaC*-07 和 pRS416-*TAL*，其中 pRS416-*TAL*-01 至 pRS416-*TAL*-05 分别指代大肠杆菌、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、发光杆菌 (*Photobacterium luminescens*)、铜绿假单胞菌和恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 来源的 *hpaB* 和 (或) *hpaC*。另外，*hpaB*-06 和 *hpaB*-07 表示嗜酸硫酸杆菌 *TPY* (*Sulfobacillus acidophilus TPY*) 来源的 *hpaB* 和阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) 来源的 *hpaB*，*hpaC*-06 和 *hpaC*-07 表示肠沙门氏菌来源的 *hpaC* 和无色杆菌属 (*Achromobacter* sp.) 的 *hpaC*。此外，我们将 *Coum3H* 和

CYP199A2 基因分别连接到 pRS415-Blank 中，形成 pRS415-*Coum3H* 和 pRS415-*CYP199A2*。

2.2. 质粒的共转化

我们将用于质粒克隆的大肠杆菌 TransT1 感受细胞在 37 °C 下置于添加了 100 μg·mL⁻¹ 卡那霉素或 100 μg·mL⁻¹ 氨苄青霉素的培养基中进行筛选与培养。新构建的质粒 (表 1) 均以 pRS416、pRS415 和 pRS413 为质粒骨架 (第 3 节)。我们利用 LiAC/PEG 法来转化酿酒酵母 BY4741，并利用营养缺陷型培养基对细胞进行筛选与培养 [28,29]。表 2 列出了本研究使用的所有菌株。除了 SyBE_Sc03020101 菌株和 SyBE_Sc03020102 菌株在 SC-Ura-Leu 培养基中进行培养，经质粒共转化后得到的酵母转化子可用不含尿嘧啶、亮氨酸和组氨酸的合

表2 本研究中所用的酿酒酵母菌株

Strain	Description: Chassis strain (plasmids contained)
BY4741	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>
SyBE_Sc03020001	BY4741(pRS416-TAL, pRS415-Blank and pRS413-Blank)
SyBE_Sc03020002	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -01, pRS413- <i>hpaC</i> -01)
SyBE_Sc03020003	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -02, pRS413- <i>hpaC</i> -02)
SyBE_Sc03020004	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -03, pRS413- <i>hpaC</i> -03)
SyBE_Sc03020005	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -04, pRS413- <i>hpaC</i> -04)
SyBE_Sc03020006	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -05, pRS413- <i>hpaC</i> -05)
SyBE_Sc03020007	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -01, pRS413- <i>hpaC</i> -04)
SyBE_Sc03020008	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -02, pRS413- <i>hpaC</i> -04)
SyBE_Sc03020009	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -03, pRS413- <i>hpaC</i> -04)
SyBE_Sc03020010	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -05, pRS413- <i>hpaC</i> -04)
SyBE_Sc03020011	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -06, pRS413- <i>hpaC</i> -04)
SyBE_Sc03020012	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -07, pRS413- <i>hpaC</i> -04)
SyBE_Sc03020013	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -04, pRS413- <i>hpaC</i> -01)
SyBE_Sc03020014	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -04, pRS413- <i>hpaC</i> -02)
SyBE_Sc03020015	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -04, pRS413- <i>hpaC</i> -03)
SyBE_Sc03020016	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -04, pRS413- <i>hpaC</i> -05)
SyBE_Sc03020017	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -04, pRS413- <i>hpaC</i> -06)
SyBE_Sc03020018	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -04, pRS413- <i>hpaC</i> -07)
SyBE_Sc03020019	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -01, pRS413- <i>hpaC</i> -06)
SyBE_Sc03020020	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -02, pRS413- <i>hpaC</i> -06)
SyBE_Sc03020021	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -03, pRS413- <i>hpaC</i> -06)
SyBE_Sc03020022	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -05, pRS413- <i>hpaC</i> -06)
SyBE_Sc03020023	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -06, pRS413- <i>hpaC</i> -06)
SyBE_Sc03020024	BY4741 (pRS416-TAL, pRS415- <i>hpaB</i> -07, pRS413- <i>hpaC</i> -06)
SyBE_Sc03020101	BY4741(pRS416-TAL, pRS415- <i>Coum3H</i>)
SyBE_Sc03020102	BY4741(pRS416-TAL, pRS415- <i>CYP199A2</i>)

All strains were sourced by this study.

成型培养基 (SC-Ura-Leu-His) 进行培养与筛选。所有菌株均在 30 °C 下以 250 r·min⁻¹ 条件过夜培养。在相同条件下, 将预培养液转接入 20 mL 新鲜培养基中, 直至细胞生长至对数生长期 (约 20 h)。将第二次培养的细胞再次接种于 50 mL SC 培养基中, 初始 OD₆₀₀ (光密度测定波长为 600 nm) 为 0.2, 在 30 °C 和 250 r·min⁻¹ 条件下, 用 12 层无菌纱布封住摇瓶瓶口, 进行细胞好氧发酵 96 h。所有上述发酵中, 培养基中均添加了额外 0.5 g·L⁻¹ 酪氨酸。所有发酵试验均进行 3 个平行实验。

2.3. 咖啡酸与对香豆酸的提取与定量检测

发酵完成后, 收集酵母细胞并离心。将等量的乙酸乙酯分别加入到上清液培养基和细胞颗粒中, 将这两管混合物分别剧烈涡旋以提取咖啡酸和对香豆素酸, 该步骤进行两次。将有机相收集在新的管中并用氮气流吹干, 之后将残余物溶解在甲醇中作为提取的产物样品。使用配备了分离模块 e2695 和 2487 检测器 (Waters Corporation, 美国) 的 Alliance[®] 高效液相色谱 (HPLC) 系统对样品进行检测。所使用的色谱软件为 MassLynx V4.0, 色谱柱为 ASCIS[®] Express C18 (10 cm×2.1 mm, 2.7 μm, Sigma-Aldrich Corporation, 美国)。色谱流动相包括溶剂 A (甲醇) 和 C [含有 0.1% (V/V) 甲酸的水]; 所使用的梯度洗脱程序见表 3。样品检测流速为 0.2 mL·min⁻¹, 柱温为 35 °C, 进样体积为 5 μL。咖啡酸的检测波长为 326 nm, 对香豆酸的检测波长为 310 nm。经与标准品的保留时间对比确认样品中对应组分的出峰。

2.4. *hpaB* 的生物信息学分析和结构模拟

我们利用 ClustalW2 在线工具对比分析了源于大肠杆菌 (*EchpaB*)、肺炎克雷伯菌 (*KphpaB*)、发光杆菌 (*PlhpaB*)、铜绿假单胞菌 (*PahpaB*)、绿脓杆菌 (*PphpaB*)、嗜酸硫杆菌 *TPY* (*SahpaB*) 和阴沟肠杆菌 (*EphpaB*) 的 7 种来源 *hpaB* 对应酶的氨基酸序列。HpaB 与配

表3 咖啡酸和对香豆酸的HPLC梯度洗脱条件

Time (min)	Mobile phase proportion (%)				Flow (mL·min ⁻¹)	Curve
	A	B	C	D		
0.00	15	0	85	0	0.2	1
2.00	35	0	65	0	0.2	6
5.00	55	0	45	0	0.2	6
8.00	55	0	45	0	0.2	6
8.50	15	0	85	0	0.2	1
15.00	15	0	85	0	0.2	6

体黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 的晶体结构分析则参考 SWISS-MODEL 网站上嗜热菌 HB8 (PDB ID: 2YYL, 蛋白质数据库, 美国) 与一个类似结构的结合。根据同源性结构分析, 确定/预测了 HpaB 的一个结合域 [30,31]。

3. 结果与讨论

3.1. 酵母中初始咖啡酸生物合成途径的构建

第一个使用细胞色素 P450 酶的挑战是应对肉桂酸-4-羟化酶 (C4H), 它以苯丙氨酸为原料合成对香豆酸。由于酪氨酸同样具有 4-羟基结构, 它可以被 TAL (非细胞色素 P450 酶) 直接转化为对香豆酸 [图 1 (a)]。在前人工作的基础上, 我们证明了一种来自香菇的 TAL 在酿酒酵母中能够合成对香豆酸, 并以此为基础构建除了下白藜芦醇和柚皮素的生物合成途径 [32,33]。因此, 我们改用 TAL 来合成对香豆酸, 产量为 117.5 mg·L⁻¹, 与其他文献 [33] 相当。

下一个挑战是应对细胞色素 P450 酶 Coum3H 将对香豆酸转化为咖啡酸。如前所述, 除了使用 Coum3H 外, 已证明利用其他多种酶也可以将大肠杆菌中的对香豆酸转化为咖啡酸。为了测试这些酶在酿酒酵母中作为异源酶的可用性 (图 1), 我们在质粒上构建了不同酶的 TU 并将质粒共转化于酵母中 (见第 2 节, 表 1 和表 2)。如图 1 (c) 所示, 红假单胞菌中的密码子优化的 *Coum3H* 酶和来自西班牙糖丝菌的 *CYP199A2* 都不能在酵母中工作, 均无产物咖啡酸被检测到。为了测试来自大肠杆菌的 *hpaB* 和 *hpaC* 的功能, 我们设计了 3 种用于酵母细胞转化的方案: ① 仅转化位于 pRS415 质粒上的 T_{ENO2}-P_{PDC1}-*EchpaB*-T_{GPM1} 的 TU; ② 仅转化位于 pRS413 质粒上的 T_{GPM1}-P_{PGK1}-*EchpaC*-T_{GPD} 的 TU; 以及 ③ 共转化上述两个质粒。在每种情况下, 也同时共转化一个通用质粒: 位于 pRS416 质粒上的 T_{CYC1}-P_{TDH3}-*TAL*-T_{TEF1}。结果显示, 仅当同时转化 TAL 以及 *hpaB* 和 *hpaC* 两个基因时才能检测到细胞提取样品中包含咖啡酸的微小的色谱峰。酵母中咖啡酸的初始生产量较低, 约为 (6.3 ± 0.3) mg·L⁻¹ (Appendix A, Fig. S1)。自此, 初步证明了 HpaB 酶和 HpaC 酶的同时存在对于酵母中合成咖啡酸产物是必要的。

Coum3H 和 *CYP199A2* 的单个酶不起作用, 而 HpaB 和 HpaC 的组合在酵母中能起作用, 这样的结果表明, 异源酶组合可能具有潜在的重要作用。一个单一的异源酶通常含有多个结构域, 可能与酵母不能形成很好

的相容性。相比之下, HpaB和HpaC可能具有分工的优势, 这一想法稍后将得到验证。我们推测, 其他物种来源的 $hpaBC$ 基因组合可能比来自大肠杆菌的基因工作得更好, 它们可能会显示出与酵母底盘之间更好的相容性。此外, 关键辅酶NADPH或FADH₂也可能对HpaB和HpaC的活性产生重要作用[25,26]。在接下来的研究中我们综合考虑和测试了这些因素。

3.2. 用于生产咖啡酸的源自同一其他物种的 $hpaB$ 和 $hpaC$ 的功能检测

虽然我们已初步证实了HpaB酶和HpaC酶的功能, 但其合成咖啡酸的效率远未达到令人满意的水平。我们推测, 其他同一物种来源的替代酶可能具有更好的效果。因此, 我们尝试去寻找表现更好的酶, 关键的问题之一是如何设置一个选择标准。我们使用“位置特异性迭代基本局部比对搜索工具”(PSI-BLAST)分别搜索了大肠杆菌源 $hpaB$ 和 $hpaC$ 对应酶的同源酶, 发现只有不到10种来源的酶与大肠杆菌源的酶具有较高的相似性(>90%), 10多个来源的酶的相似性在80%~90%之间, 近20个来源的酶的相似性在70%~80%之间。从总体上看, $hpaB$ 对应酶的相似性略高于 $hpaC$ 。在充分考虑物种距离和酶序列相似性的情况下, 我们选择了4种物种来源的基因: 肺炎克雷伯菌(K $phpaB$, 相似性: 96%; K $phpaC$, 相似性: 85%)、发光杆菌(Pl $hpaB$, 相似性: 82%; Pl $hpaC$, 相似性: 77%)、铜绿假单胞菌(Pa $hpaB$, 相似性为73%; Pa $hpaC$, 相似性为58%), 以及恶臭假单胞菌(Pp $hpaB$, 相似性为42%, Pp $hpaC$, 相似性为25%)。所有这些物种来源菌属于革兰氏阴性菌, 所有基因均为根据蛋白序列、经酵母密码子优化后, 重新合成得到。

通过利用同样的方法构建相关质粒并共转化酵母, 我们获得了目标菌株(表1和表2)并在相同条件对其进行发酵培养。图2显示了咖啡酸和对香豆酸的测定产量。菌株SyBE_Sc03020003(K $phpaB$ 、K $phpaC$)和SyBE_Sc03020004(Pl $hpaB$ 、Pl $hpaC$)产生的咖啡酸比SyBE_Sc03020002(Ech paB 、Ech paC)更少, 其中对香豆酸仅少量转化为咖啡酸(检测到的值分别为1.2 mg·L⁻¹和2.1 mg·L⁻¹)。SyBE_Sc03020005菌株(Pa $hpaB$ 、Pa $hpaC$)的情况明显改善, 咖啡酸产量提高到68.2 mg·L⁻¹, 比SyBE_Sc03020002菌株产量提高近11倍。令人惊讶的是, 前体对香豆酸被成功转化了一半以上, 仅剩余35.96 mg·L⁻¹。在SyBE_Sc03020006菌株(Pp $hpaB$ 、

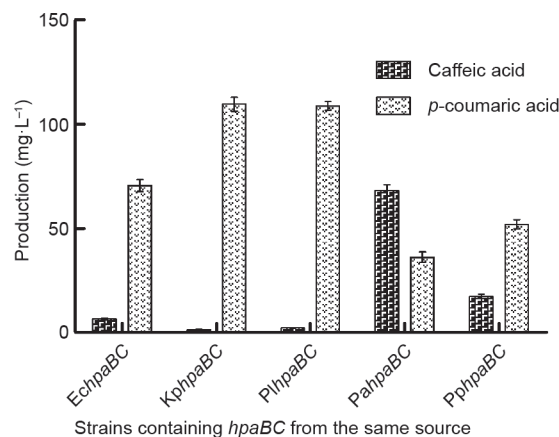


图2. 含有不同 $hpaB$ 和 $hpaC$ 组合的不同菌株中咖啡酸及其前体对香豆酸的产量。误差线表示从摇瓶发酵的3个平行实验计算出的标准偏差值。

Pp $hpaC$)中, 虽然表达酶与大肠杆菌酶的相似性较低, 但咖啡酸产量仍然显著提高了1.7倍, 达到16.8 mg·L⁻¹。综上所述, 不同的同一物种来源两种酶与酵母底盘具有明显差别的相容性。我们认为, SyBE_Sc03020005菌株中Pa $hpaB$ 和Pa $hpaC$ 值得进一步研究。

3.3. Pa $hpaC$ 与其他来源 $hpaB$ 的配合使用对咖啡酸生产的影响

由于从铜绿假单胞菌中筛选出的HpaB和HpaC对于产咖啡酸的效果较好, 我们考虑了两种酶中的一种能否与其他物种中配对酶产生更好的协同作用。以往研究也表明, 构建多种来源酶的组合筛选是确定最优底物选择性、催化活性和宿主细胞相容性等特征进而达到目标产物最佳生产率的一个有效方法[34~36]。首先, 我们选择Pa $hpaC$ 去研究其与其他物种来源 $hpaB$ 的组合, 这是由于在步骤上先由HpaC酶将NADPH合成为FADH₂, 然后再将FADH₂转移给HpaB酶进行羟化反应[26]。我们构建了相关质粒, 并有选择地将它们共转化为酵母细胞, 进一步发酵(图3、表1和表2)。在SyBE_Sc03020007(Ech paB 、Pa $hpaC$)菌株中, 我们检测到了最高的咖啡酸产量, 为12.8 mg·L⁻¹, 远低于SyBE_Sc03020005(Pa $hpaB$ 、Pa $hpaC$)中的68.7 mg·L⁻¹。其他组合的咖啡酸产量均较低, 在1.3~6.8 mg·L⁻¹之间。这些结果表明, HpaC酶可能不是限速瓶颈。

为了进一步验证这一推测, 我们使用了另外两个来自Sa $hpaB$ 和En $hpaB$ 的 $hpaB$ 基因与Pa $hpaC$ 配合。前者可产生5.7 mg·L⁻¹咖啡酸, 后者可产生22.7 mg·L⁻¹咖啡酸, 与SyBE_Sc03020005(Pa $hpaB$ 、Pa $hpaC$)菌株中咖

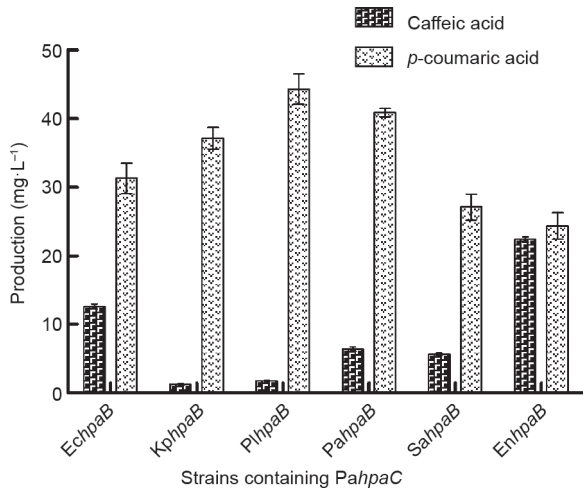


图3. *PahpaC*与其他*hpaB*的组合对咖啡酸合成的影响。含有相同*PahpaC*和不同*hpaB*的菌株中咖啡酸和对香豆酸的产量有所不同。误差线表示从摇瓶发酵的3个平行实验计算出的标准偏差值。

啡酸的产量相比，仍有较大差异。另外还发现，对香豆酸总量的半数以上均已在大多数菌株中被转化（图3）。对香豆酸残留量最大的是SyBE_Sc03020009（*PlhpaB*、*PahpaC*）菌株，为44.2 mg·L⁻¹，残留量最低的是SyBE_Sc03020012（*EnhpaB*、*PahpaC*）菌株，为24.9 mg·L⁻¹。然而，转化的前体并没有完全产生咖啡酸。因此我们推测，在*HpaC*和*HpaB*的作用之间可能存在一个潜在的中间状态。总体上，*HpaC*酶应该不是限速步骤。

3.4. *PahpaB*与其他*hpaC*的配合使用对咖啡酸生产的影响

接下来，我们选择*PahpaB*与其他物种来源的*hpaC*进行配合。以往的研究表明，*hpaB*可能在将对香豆酸转化为咖啡酸的催化反应中起到关键作用[25,37,38]。为了检验这一推测，我们决定使用其他物种来源的*hpaC*

基因与*PahpaB*进行配合。我们构建了相关质粒并将其转化到酵母中进行发酵[图4 (a)、表1和表2]。实验结果很令人惊讶，*PaHpaB*酶与其他物种来源的*HpaC*酶均能很好地配合，甚至优于它们的天然伴侣。SyBE_Sc03020013（*PahpaB*、*EchpaC*）中咖啡酸产量为37.6 mg·L⁻¹。SyBE_Sc03020016（*PahpaB*、*PphpaC*）中的咖啡酸产量为68.49 mg·L⁻¹，与之前获得最佳菌株SyBE_Sc03020005（*PahpaB*、*PahpaC*）中咖啡酸的产量基本一致。而在SyBE_Sc03020014（*PahpaB*、*KphpaC*）和SyBE_Sc03020015（*PahpaB*、*PlhpaC*）菌株中，咖啡酸的产量甚至达到了175.86 mg·L⁻¹和241.3 mg·L⁻¹，对香豆酸的转化率达为80%，仅剩余17.8 mg·L⁻¹和16.8 mg·L⁻¹。Appendix A (Fig. S1)中给出了各代表性菌株中咖啡酸与对香豆酸的色谱出峰图。*KphpaC*和*PlhpaC*在酵母细胞中与*PahpaB*的合作融洽性高出了其天然伴侣*PahpaC*。

为了寻求两种酶更有效的配合，我们从沙门氏菌（*SehpaC*）和无色杆菌属（*AshpaC*）中选择了另外两个新的*hpaC*基因分别与*PahpaB*协作。在含有*PahpaB*和*SehpaC*的菌株SyBE_Sc03020017中，我们得到了咖啡酸的最高产量（289.4 ± 4.6）mg·L⁻¹[图4 (a)、Fig. S1]。由于这个产量较高，我们对SyBE_Sc03020017生产的咖啡酸样品使用飞行时间质谱（TOF-MS）和飞行时间质谱/质谱联用（TOF-MS/MS）[使用ACQUITYUHPLC系统（Waters Corporation，美国）和配备有电喷雾电离（ESI）离子源的XEVOG2-SQ-TOF质谱仪（Waters Corporation，美国）]进行了表征（Fig. S2）。产物提取样品表征得到负离子（107、117、135、146、161、174和179）与咖啡酸标品的质谱离子相同，定性证明了本研究所构建菌株确实成功生产了咖啡酸。该咖啡酸产量几乎比菌

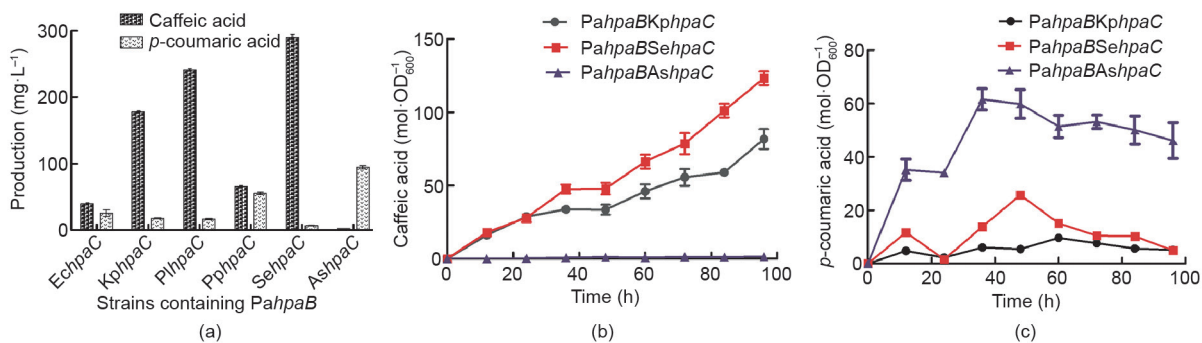


图4. *PahpaB*与其他*hpaC*配合使用对咖啡酸生产的影响。(a) 含有相同*PahpaB*和不同*hpaC*的菌株中咖啡酸和对香豆酸的产量有所不同。误差线表示从摇瓶发酵的3个平行实验计算出的标准偏差值。(b) 咖啡酸和 (c) 对香豆酸的产量随发酵时间变化图。误差线表示从3个平行实验计算出来的标准偏差值。

株SyBE_Sc03020003中的最低产率高出240倍,并且比初始测试菌株(SyBE_Sc03020002, *EchpaB*和*EchpaC*)中咖啡酸产率提高将近43倍。在菌株SYBE_Sc03020017中,超过90%的对香豆酸被转化,只剩余6.9 mg·L⁻¹。这个极低的对香豆酸剩余量和较高的咖啡酸产量表明,在SeHpaC酶和PaHpaB酶联合控制下的反应有可能经L-酪氨酸的合成从内源代谢中获得更多的通量。另一个由*AshpaC*表达的HpaC酶没有和*PahpaB*发挥很好的协同作用,咖啡酸产量仅为2.7 mg·L⁻¹。

我们对如下菌株发酵全过程细胞密度、咖啡酸和对香豆酸实时累积与减少进行了监测: SyBE_Sc03020015、SyBE_Sc03020017、SyBE_Sc03020018[图4(b)和(c)]。其中,菌株SyBE_Sv03020017(*PahpaB*、*SehpaC*)获得了最高水平的咖啡酸[(124.4 ± 2.4) mol·OD₆₀₀⁻¹]。在细胞发酵周期的大部分时间内,对香豆酸的产量低于20 mol·OD₆₀₀⁻¹,而咖啡酸的产生在96 h内始终保持着上升趋势。这一发现进一步证实了我们的推测,即HpaB和HpaC的高效合作能够从内源代谢中持续不断地获取更多的碳资源。总体而言,HpaB控制了潜在的瓶颈步骤,但仍需要配之以合适的HpaC合作伙伴,以实现整个反应的高效率。

3.5. *SehpaC*与其他 *hpaB* 的配合使用对咖啡酸生产的影响

鉴于SeHpaC和PaHpaB的组合得到了最佳表现的菌株,我们推测SeHpaC与其他源HpaB的组合也可能取得良好效果。为了检验这一点,我们将含有*SehpaC*的TU的质粒分别与其他已构建的*hpaB*的TU的质粒共转化到酵母中(已含有TAL所在的质粒)(图5、表1和表2)。结果表明,除*PahpaB*外,*SehpaC*并没有与其他源*hpaB*发挥很好的协同作用。菌株SyBE_Sc03020013(*PahpaB*、*EchpaC*)的咖啡酸产量较高,为23.2 mg·L⁻¹,其他菌株的咖啡酸产量均小于10 mg·L⁻¹。在SyBE_Sc03020019(*EchpaB*、*SehpaC*)、SyBE_Sc03020020(*KphpaB*、*SehpaC*)和SyBE_Sc03020021(*PlhpaB*、*SehpaC*)菌株中,SeHpaC几乎不起作用,绝大部分对香豆酸前体都未被转化。在SyBE_Sc03020022(*PphpaB*、*SehpaC*)、SyBE_Sc03020023(*SahpaB*、*SehpaC*)和SyBE_Sc03020024(*EnhpaB*、*SehpaC*)菌株中,SeHpaC虽具有很强的对香豆酸的活性,但最终产物咖啡酸的产量仍然很低。根据所得结果推测,HpaC和HpaB存在相互影响,这种影响可能来自过两个酶之间转移的辅因子

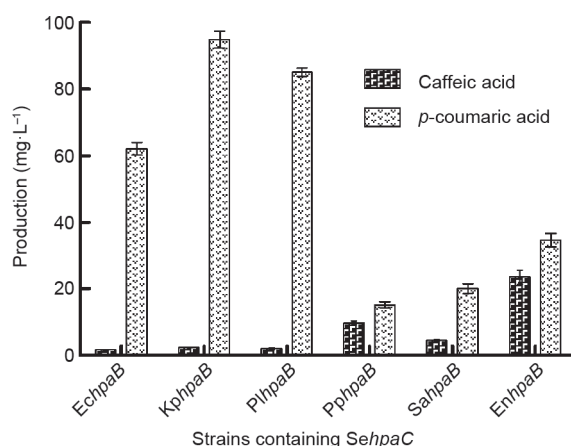


图5. *SehpaC*与其他*hpaB*组合对咖啡酸生产的影响。含有相同*SehpaC*和不同*hpaB*的菌株中咖啡酸和对香豆酸的产量有所不同。误差线表示从摇瓶发酵的3个平行实验计算出的标准偏差值。

FADH₂。FADH₂是由HpaC控制下从NADPH合成的,如果HpaB酶不能对接收到的FADH₂及时利用,则该辅因子具有很高的不稳定性和易分解性。总之,研究为什么特殊的酶组合效果更好甚至远超过其他组合是很有必要的,HpaB与HpaC之间的辅酶转移可能是关键因素之一。

3.6. 关键酶 HpaB 的蛋白质结构分析

我们所得到的数据和分析与之前的报道形成一致观点,即HpaB可能在从对香豆酸转化到咖啡酸的过程中起到关键作用[25,38]。研究该酶与辅因子底物的催化活性结合位点对于逐步提高咖啡酸的产量具有重要意义。除了铜绿假单胞菌的HpaB外,我们也利用ClustalW2软件对其他源HpaB氨基酸序列进行了比对与分析(即由*EchpaB*、*KphpaB*、*PlhpaB*、*PahpaB*、*PphpaB*、*SahpaB*和*EnhpaB*各个基因所表达的酶)[39]。根据图6(a)所示的比对结果,在关键结合位点中发现了一些重要的氨基酸位点,我们将它们标记为黄色框。黄色框的确定过程为:首先,我们明确了嗜热菌(*Thermus thermophilus*) HB8中的*hpaB*是具备晶体结构数据的,其可与FAD配体结合[9];其次,我们用SWISS-MODEL建模分析得到了嗜热菌HB8中*hpaB*与FAD结合的构型,进而依此作为本研究中使用的*hpaB*蛋白与FADH₂结合的晶体结构[如图6(b)所示]。铜绿假单胞菌*hpaB*与模板的序列同源性在45%~53%之间。这一模拟过程使我们能够预测*hpaB*与其底物之间的近似结合域,这些区域最终在图6(a)中被标记为黄色框。综合所有信息,我们确定了这些氨基酸位点。

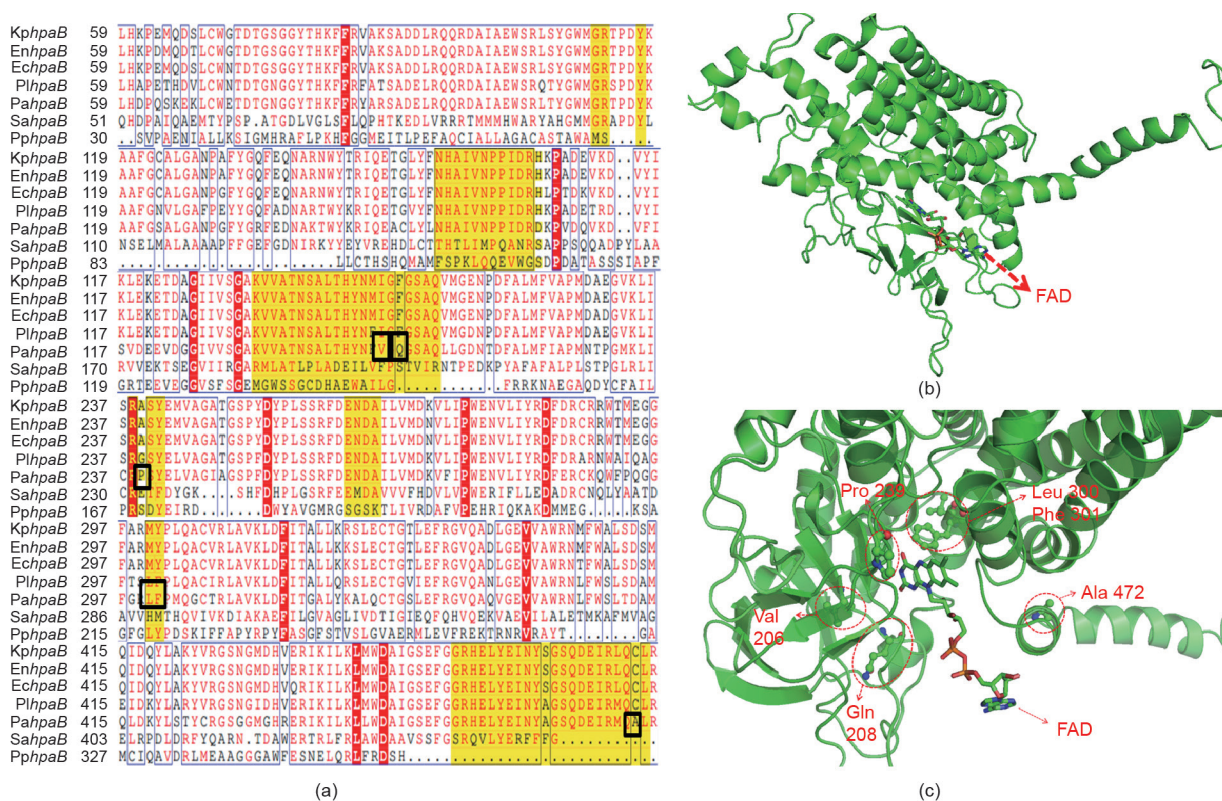


图6. 铜绿假单胞菌与不同来源*hpaB*的序列差异及结构模拟。(a) 7个来源的*hpaB*的氨基酸序列比对。(b) 根据嗜热菌HB8与配体FAD的晶体结构, 对最佳配对中的*hpaB*进行了结构模拟。(c) 推测的氨基酸活性结合位点以红色标注。Val: 缬氨酸; Gln: 谷氨酰胺; Pro: 脯氨酸; Ala: 丙氨酸。

根据我们建立的结构模拟可以合理预测, 黄色框区域的氨基酸位点与酶催化反应活性具有很强的关联。由于黄色框中SaHpaB和PpHpaB序列与其他源HpaB序列的同源性很低, 因此在探索关键结合位点时无需考虑这两个酶, 只需考察表现最佳的PaHpaB与其他4个高度同源的HpaB酶之间的差异。最终, 我们确定了6个重要的氨基酸残基: 缬氨酸206、谷氨酰胺208、脯氨酸239、亮氨酸300、苯丙氨酸301和丙氨酸472是潜在的关键位点, 因为它们仅存在于最佳的PaHpaB中[图6 (c)]。如图所示, 这些残基均位于FAD结合域周围。我们推测这6个残基对于HpaB的催化活性具有重要影响。当然, 这些假设位点仍然需要通过进一步研究中的点突变来验证。综上所述, 我们对铜绿假单胞菌*hpaB*具有最高活性的潜在原因进行了研究, 为提高咖啡酸的产量提供了新的研究方向。

4. 结论

合成生物学通过构建异源途径实现了植物源天然化合物在工程化微生物底盘中的生物合成[40]。在微生物中直接植入植物源基因偶尔但并非总是可行。一种替代

策略是使用植物源酶的精确替代物。例如在前人的工作中, 在构建微生物中咖啡酸的合成途径时, 分别从西班牙糖丝菌和沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) 中得到了植物源细胞色素P450酶的两个替代物Coum3H和CYP199A2, 并成功地在大肠杆菌中得到了咖啡酸产物[10,21,41,42]。在我们的研究中, 一个更具鲁棒性的模式微生物底盘——酿酒酵母被选用以设计合成咖啡酸。首先, 我们在酿酒酵母中检测了Coum3H和CYP199A2, 发现其完全没有合成咖啡酸的催化活性。与这形成鲜明对比, 由HpaB和HpaC协同作用形成4HPA3H酶的形式能够在酵母中成功合成咖啡酸, 初始产量为 $(6.3 \pm 0.3) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Lin[9]和Yao[24]各自的研究也证明, 这些酶在大肠杆菌中具有生产类似产物的功能。

虽然最初设计的含有TAL、EcHpaB和EcHpaC酶的途径已经发挥作用, 但其将底物转化为最终产物的效率仍然不足。不同物种源基因编码的酶催化活性往往差异很大, 因此, 将不同物种中筛选出的单个基因进行优化组合是提高异源反应效率的有效途径[34,43]。在此, 我们有选择地合成了多个细菌源的*hpaB*和*hpaC*基因, 得到了多种形成4HPA3H酶的新组合。结果表明, 各个菌

株中咖啡酸的产量差异较大。含铜绿假单胞菌 *hpaB* 基因 (*PahpaB*) 的组合所获得的咖啡酸产量均达到可接受的较高值。通过 HpaB 和 HpaC 酶的配合作用, 最优菌株 SyBE_Sc03020017 经摇瓶发酵后咖啡酸产量 (相对于含有大肠杆菌源 *hpaB* 和 *hpaC* 的起始菌株 SyBE_Sc03020002 的咖啡酸产量) 提高了 45.9 倍 (从 $6.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到 $289.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。研究初步表明, HpaB 和 HpaC 的合理配合对于从内源代谢中向目标产物合成方向拉动更多的通量具有至关重要的作用。

此外, 为了探讨某些基因组合下咖啡酸高产的内因, 我们对关键基因 *hpaB* 表达的酶行了建模分析。我们发现了可能在催化中起重要作用的 6 个氨基酸活性位点: Val 206、Gln 208、Pro 239、Leu 300、Phe 301 和 Ala 472, 它们都位于 FAD 结合域周围。我们认为 FAD 结合活性决定了 *hpaB* 的催化活性以及 *hpaB* 与 *hpaC* 配合使用的效果。这一推测揭示了一个未来改造酶活性的工作方向。综上, 我们首次在酿酒酵母中实现了咖啡酸的合成, 最高产量达到 (289.4 ± 4.6) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 是工程菌生产咖啡酸的最高产量之一。本研究为如何操作多个关键酶的协同反应用于在微生物中合成感兴趣的芳环化合物提供了一个有应用前景的视角。

致谢

本研究由中国科技部项目 (2014CB745100) 和中国自然科学基金 (21390203、21706186) 资助。

Compliance with ethics guidelines

Lanqing Liu, Hong Liu, Wei Zhang, Mingdong Yao, Bingzhi Li, Duo Liu, and Yingjin Yuan declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.029>.

References

- [1] Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, Filsinger Interrante M, Smolke CD. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science* 2015;349(6252):1095–100.
- [2] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol* 2003;21(7):796–802.
- [3] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 2006;440(7086):940–3.
- [4] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 2013;496(7446):528–32.
- [5] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science* 2010;330(6000):70–4.
- [6] Zhou K, Qiao K, Edgar S, Stephanopoulos G. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nat Biotechnol* 2015;33(4):377–83.
- [7] Nakagawa A, Matsumura E, Koyanagi T, Katayama T, Kawano N, Yoshimatsu K, et al. Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. *Nat Commun* 2016;7(1):10390.
- [8] Liu D, Li B, Liu H, Li BZ, Yuan YJ. Profiling influences of gene overexpression on heterologous resveratrol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Chem Sci Eng* 2017;11(1):1–9.
- [9] Lin Y, Yan Y. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microb Cell Fact* 2012;11(1):42.
- [10] Rodrigues JL, Araújo RG, Prather KL, Kluskens LD, Rodrigues LR. Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 2015;71:36–44.
- [11] Yoshimoto M, Kurata-Azuma R, Fujii M, Hou DX, Ikeda K, Yoshidome T, et al. Enzymatic production of caffeic acid by koji from plant resources containing caffeoylquinic acid derivatives. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005;69(9):1777–81.
- [12] Sachan A, Ghosh S, Sen SK, Mitra A. Co-production of caffeic acid and *p*-hydroxybenzoic acid from *p*-coumaric acid by *Streptomyces caeruleus* MTCC 6638. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;71(5):720–7.
- [13] De Campos Buzzi F, Franzoi CL, Antonini G, Fracasso M, Cechinel Filho V, Yunes RA, et al. Antinociceptive properties of caffeic acid derivatives in mice. *Eur J Med Chem* 2009;44(11):4596–602.
- [14] Wu J, Omene C, Karkoszka J, Bosland M, Eckard J, Klein CB, et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Lett* 2011;308(1):43–53.
- [15] Xing Y, Peng HY, Zhang MX, Li X, Zeng WW, Yang XE. Caffeic acid product from the highly copper-tolerant plant *Elsholtzia splendens* post-phytoremediation: its extraction, purification, and identification. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012;13(6):487–93.
- [16] Celik S, Erdogan S, Tuzcu M. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) exhibits significant potential as an antidiabetic and liver-protective agent in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 2009;60(4):270–6.
- [17] Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem Rev* 2006;5(2–3):293–308.
- [18] Nakamura S, Minami A, Fujimoto K, Kojima T. Combination effect of recombinant human interleukin-1 alpha with antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33(10):1804–10.
- [19] Cheniany M, Ganjeali A. Developmental role of phenylalanine-ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) genes during adventitious rooting of *Juglans regia* L. microshoots. *Acta Biol Hung* 2016;67(4):379–92.
- [20] Kim YH, Kwon T, Yang HJ, Kim W, Youn H, Lee JY, et al. Gene engineering, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of cytochrome P450 *p*-coumarate-3-hydroxylase (C3H), the Arabidopsis membrane protein. *Protein Expr Purif* 2011;79(1):149–55.
- [21] Ro DK, Mah N, Ellis BE, Douglas CJ. Functional characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol* 2001;126(1):317–29.
- [22] Li M, Schneider K, Kristensen M, Borodina I, Nielsen J. Engineering yeast for high-level production of stilbenoid antioxidants. *Sci Rep* 2016;6(1):36827.
- [23] Zhang H, Stephanopoulos G. Engineering *E. coli* for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97(8):3333–41.
- [24] Yao YF, Wang CS, Qiao J, Zhao GR. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvianic acid A via an artificial biosynthetic pathway. *Metab Eng* 2013;19:79–87.
- [25] Huang Q, Lin Y, Yan Y. Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Bioeng* 2013;110(12):3188–96.
- [26] Prieto MA, Garcia JL. Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. A two-protein component enzyme. *J Biol Chem* 1994;269(36):22823–9.
- [27] Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* 2007;2(4):924–32.
- [28] Gietz RD, Woods RA. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol* 2006;313:107–20.
- [29] Nell RE, Phillips RH. Contributions of brewers' yeast to a diet deficient in reproductive factors. *J Nutr* 1950;42(1):117–27.
- [30] Liu Z, Fu J, Shan L, Sun Q, Zhang W. Synthesis, preliminary bioevaluation and computational analysis of caffeic acid analogues. *Int J Mol Sci* 2014;15(5):8808–20.
- [31] Xiao P, Zhang S, Ma H, Zhang A, Lv X, Zheng L. Stereoselective synthesis of caffeic acid amides via enzyme-catalyzed asymmetric aminolysis reaction. *J Biotechnol* 2013;168(4):552–9.

- [32] Zhang W, Liu H, Li X, Liu D, Dong XT, Li FF, et al. Production of naringenin from *D*-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Eng. Life Sci* 2017;17(9):1021–9.
- [33] Rodriguez A, Kildegaard KR, Li M, Borodina I, Nielsen J. Establishment of a yeast platform strain for production of *p*-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis. *Metab Eng* 2015;31:181–8.
- [34] Kim E, Moore BS, Yoon YJ. Reinvigorating natural product combinatorial biosynthesis with synthetic biology. *Nat Chem Biol* 2015;11(9):649–59.
- [35] Sarria S, Wong B, García Martín H, Keasling JD, Peralta-Yahya P. Microbial synthesis of pinene. *ACS Synth Biol* 2014;3(7):466–75.
- [36] Zhao S, Jones JA, Lachance DM, Bhan N, Khalidi O, Venkataraman S, et al. Improvement of catechin production in *Escherichia coli* through combinatorial metabolic engineering. *Metab Eng* 2015;28:43–53.
- [37] Xun L, Sandvik ER. Characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (HpaB) of *Escherichia coli* as a reduced flavin adenine dinucleotide-utilizing monooxygenase. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(2):481–6.
- [38] Galán B, Díaz E, Prieto MA, García JL. Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. *J Bacteriol* 2000;182(3):627–36.
- [39] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23(21):2947–8.
- [40] Luo Y, Li BZ, Liu D, Zhang L, Chen Y, Jia B, et al. Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts. *Chem Soc Rev* 2015;44(15):5265–90.
- [41] Choi O, Wu CZ, Kang SY, Ahn JS, Uhm TB, Hong YS. Biosynthesis of plantspecific phenylpropanoids by construction of an artificial biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011;38(10):1657–65.
- [42] Kang SY, Choi O, Lee JK, Hwang BY, Uhm TB, Hong YS. Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain. *Microb Cell Fact* 2012;11(1):153.
- [43] Chai F, Wang Y, Mei X, Yao M, Chen Y, Liu H, et al. Heterologous biosynthesis and manipulation of crocetin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 2017;16(1):54.