

分类号： Q81

单位代码： 10363

密 级： 公开

学 号： 2220520107

基于生物传感器的月桂烯合酶定向进化及别罗勒烯合酶的挖掘

Biosensor-based directed evolution of myrcene synthase
and mining of *neo-allo*-ocimene synthase

论 文 作 者	刘 政
校 内 导 师	朱 龙 宝（教授）
校 外 导 师	蒋 辉（研究员）
专 业 学 位 类 别	生物与医药
研究方向（领域）	生物技术与工程

论文答辩日期： 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：刘政

日期：2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：刘政

日期：2025 年 5 月 15 日

指导教师签名：朱存玉

日期：2025 年 5 月 15 日

英文缩略词表

缩略符号	英文全称	中文全名
MVA	Mevalonate pathway	甲羟戊酸途径
MEP	Methylerythritol phosphate pathway	2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸途径
IPP	Isopentenyl pyrophosphate	异戊烯焦磷酸
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphate	二甲基烯丙基焦磷酸
MYR	Myrcene	月桂烯
MS	Myrcene synthase	月桂烯合酶
Cm	Chloramphenicol	氯霉素
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kana	Kanamycin Monosulfate	硫酸卡那霉素
Spe	Spectinomycin	壮观霉素
LB	Luria-Bertani	LB 培养基
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose	YPD 培养基
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyran -oside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
TAE	Tris-Acetic acid-EDTA buffer	Tris-乙酸-EDTA 缓冲液
mM	mMol/L	毫摩尔每升
rpm	Rounds per minute	每分钟转数
EP	Eppendorf	小型的离心管
OD	Optical Density	光密度
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
mm	millimole	毫摩尔
°C	Celsius degree	摄氏度
MIC	Minimum inhibitory concentration	最小抑菌浓度

基于生物传感器的月桂烯合酶定向进化及别罗勒烯合酶的挖掘

摘 要

单萜化合物作为类异戊二烯化合物，在植物、动物和微生物中广泛存在，具有重要的生理功能。目前，单萜化合物主要是从松节油中提取或通过化学合成获得，但这些方法存在成本高、产量低和环境污染等问题，难以满足持续增长的市场需求。近年来合成生物学技术被广泛应用于天然产物的生产，有效解决了传统生产方法的局限性。大肠杆菌中既可通过天然存在的 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸途径(MEP)或引入外源的甲羟戊酸途径(MVA)产生异戊烯基焦磷酸(IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)这两种萜类化合物前体物质，并在异戊烯基焦磷酸异构酶 IDI 的作用下实现互相转换。本研究以大肠杆菌作为宿主，构建了完整的月桂烯、别罗勒烯合成代谢通路，旨在高效合成单萜类化合物。主要研究内容如下：

月桂烯作为单萜化合物，对菌体存在一定的毒性，需要选取受影响最小的微生物作为底盘。因此对实验室保藏的 3 株大肠杆菌、4 株酵母菌和需钠弧菌进行了月桂烯耐受性测评。结果表明，在月桂烯存在的条件下培养 12 h 后，大肠杆菌 BL21(DE3)和 DH10B 的生物量能够达到对照组的 92.17%和 91.28%，远好于其他菌株。因此，确定大肠杆菌为月桂烯合成的底盘菌株。另外，月桂烯合酶活性低是导致月

桂烯产量较低的关键因素，为了解决这一问题，以前期研究获得的月桂烯合酶基因 *trCsMSM7* 为模板，通过易错 PCR 构建月桂烯合酶随机突变体文库，利用能够响应月桂烯浓度的生物传感器进行高通量筛选，完成了 2 轮月桂烯合酶定向进化。在第一代筛选的 168 个克隆中，编号为 108 的变体月桂烯产量较对照提升了 14.29%。在第二代筛选的 144 个克隆中，编号为 106 的变体月桂烯产量较对照组提升了 37.26%。在此基础上进一步优化诱导剂和葡萄糖的浓度等发酵条件后，工程菌的月桂烯产量达到 1.103 g/L，是迄今为止在摇瓶体系下的最高产量。

单萜合酶是提升产量的关键因素，为了进一步提升单萜的产量，本研究从芹菜中挖掘能高效催化单萜合成的酶。通过代谢组学分析，在芹菜叶和茎中检测到 78 个萜类化合物，其中包含 19 个单萜、25 个倍半萜、14 个二萜、15 个三萜和 5 个杂萜类化合物。随后对芹菜的叶和茎分别进行转录组分析，检测到 83 个编码 MVA 途径、MEP 途径及萜类生物合成途径相关酶的基因，这表明芹菜具有挖掘萜烯合酶的潜力。进一步通过生物信息学分析，挖掘到一个潜在的萜类合酶基因，并命名为 *AgTPS40*。系统发育分析表明 *AgTPS40* 属于植物萜烯合酶 TPS-b 亚家族，进一步证明其为萜烯合酶。与文献报道的单萜合酶序列比对发现，*AgTPS40* 中具有高度保守的 RRx₈W、DDxxD 和 NSE/DTE 氨基酸序列，提示其可能是一种未被发现的单萜合酶。将 *AgTPS40* 与编码 MVA 途径的 pCC24 载体连接，导入大肠杆菌 BS1101 进行表达。结果显示，其主产物为别罗勒烯，证实 *AgTPS40* 为别罗

勒烯合酶，为首次报道发现。通过优化发酵条件，别罗勒烯的产量达到了 933.35 mg/L，是目前报道的最高产量。本研究通过合成生物学技术，首次发现并鉴定了新型别罗勒烯合酶 AgTPS40，并成功实现了大肠杆菌中单萜化合物月桂烯和别罗勒烯的高效合成，显著提升了单萜化合物的产量，为绿色、可持续的单萜烯生产提供了新方法。

关键词：月桂烯，别罗勒烯，MVA 途径，定向进化，生物合成

BIOSENSOR-BASED DIRECTED EVOLUTION OF MYRCENE SYNTHASE AND MINING OF *NEO-ALLO-OCIMENE* SYNTHASE

ABSTRACT

Monoterpene compounds are a class of isoprenoids that are widely found in plants, animals and microorganisms and have important physiological functions. Current industrial production predominantly relies on extraction from turpentine or chemical synthesis, yet these conventional approaches are constrained by high costs, low yields, and environmental concerns, collectively rendering them incapable of addressing the exponential growth in market requirements. Recent advancements in synthetic biology have been strategically implemented to overcome these limitations in natural product biosynthesis. In *Escherichia coli*, the precursor metabolites isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) can be generated through 2-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway or an engineered heterologous mevalonate (MVA) pathway, with interconversion mediated by isopentenyl diphosphate isomerase (IDI).

This study established a comprehensive biosynthetic pathway for myrcene and *neo-allo*-ocimene production in *E. coli* BS1101, aiming to achieve high-efficiency monoterpenoid biosynthesis. The main research content is as follows:

The monoterpene compound myrcene exhibits inherent toxicity toward microbial cells, necessitating the selection of minimally affected microorganisms as chassis strains. Therefore, three strains of *E. coli*, four strains of yeast and *Vibrio natriegens* conserved in the laboratory were evaluated for myrcene tolerance. The results showed that *E. coli* BL21(DE3) and DH10B were able to reach 92.17% and 91.28% of the biomass of control after 12 h of incubation in the presence of myrcene, which was much better than other strains. Therefore, *E. coli* was identified as a chassis strain for myrcene synthesis. To address the critical limitation of low myrcene synthase activity affecting myrcene yield, a library of myrcene synthase random mutants was constructed by error-prone PCR using the myrcene synthase gene, *trCsMSM7*, obtained from the previous study as a template, and 2 rounds of directed evolution were accomplished through a high-throughput screening using biosensors capable of responding to myrcene concentration. Among the 168 clones in the first generation of screening, the number 108 showed a 14.29% improvement in myrcene production compared with the control. Among the 144 clones in the second generation screening, the myrcene

production of number 106 was enhanced by 37.26% compared with the control. After optimization of fermentation conditions such as the concentration of inducer and glucose, the engineered bacterium achieved a myrcene yield of 1.103 g/L, which is the highest yield in the shake flask system to date.

Monoterpene synthase is a key factor for yield enhancement, in order to further enhance the monoterpene yield, this study mined enzymes from celery that can efficiently catalyze monoterpene synthesis. Metabolomic profiling revealed 78 terpenoid compounds in celery leaves and stems, including 19 monoterpenes, 25 sesquiterpenes, 14 diterpenes, 15 triterpenes, and 5 heteroterpenes. Transcriptomic analysis identified 83 genes encoding enzymes associated with the MVA pathway, MEP pathway, and terpene biosynthesis pathway, suggesting that celery has the potential to mine terpene synthases. A potential terpene synthase gene was further mined by bioinformatics analysis and named *AgTPS40*. Phylogenetic analysis showed that *AgTPS40* belongs to the TPS-b subfamily of plant terpene synthases, further demonstrating it is a terpene synthase. Sequence comparison with monoterpene synthases reported in the literature revealed highly conserved amino acid sequences of RR_xW, DDxxD, and NSE/DTE in *AgTPS40*, suggesting that it may be an undiscovered monoterpene synthase. Then *AgTPS40* was ligated with pCC24 vector encoding MVA pathway and introduced into *E. coli*

BS1101 for expression. The results showed that the main product was *neo-allo-ocimene*, confirming that AgTPS40 is *neo-allo-ocimene* synthase, which is the first reported *neo-allo-ocimene* synthase from celery. By optimizing the fermentation conditions, the yield of *neo-allo-ocimene* reached 933.35 mg/L, which was the highest yield reported for *neo-allo-ocimene* synthesis. In this study, we discovered and characterized for the first time a novel *neo-allo-ocimene* synthase, AgTPS40, by synthetic biology techniques, and successfully realized the efficient synthesis of monoterpene compounds myrcene and *neo-allo-ocimene* in *E. coli*, which significantly enhanced the yield of monoterpene compounds, and provided a new method for green and sustainable monoterpene production.

Zheng Liu (Biology and Medicine)

Supervised by Longbao Zhu

KEY WORDS : Myrcene, *neo-allo-ocimene*, mva pathway, directed evolution, biosynthesis

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	IV
第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 单萜的概述	1
1.3 月桂烯和别罗勒烯的应用	2
1.4 萜类化合物的合成途径	3
1.4.1 前体物质的合成途径	3
1.4.2 月桂烯和别罗勒烯的合成途径	5
1.5 大肠杆菌单萜合成的研究进展	6
1.6 研究目的和意义	6
第 2 章 生产月桂烯的底盘菌株测评	8
2.1 引言	8
2.2 材料和方法	8
2.2.1 菌种	8
2.2.2 实验仪器	9
2.2.3 主要试剂与试剂盒	9
2.2.4 主要培养基的配制	10
2.2.5 引物	11
2.3 实验方法	11
2.3.1 种子培养	11
2.3.2 OD ₆₀₀ 检测	11
2.3.3 月桂烯产量测定	12
2.3.4 琼脂糖凝胶电泳	12
2.3.5 切胶回收 DNA 片段	13
2.3.6 遗传转化	13
2.4 结果与分析	13

2.4.1 月桂烯耐受性测评	15
2.4.2 变体基因 <i>trCsMSM7</i> 的构建与引入	15
2.5 本章小结	18
第 3 章 月桂烯合酶迭代进化	19
3.1 引言	19
3.2 材料和方法	20
3.2.1 菌种和质粒	20
3.2.2 实验仪器	20
3.2.3 实验试剂	20
3.2.4 引物	20
3.2.5 培养基	20
3.3 实验方法	21
3.3.1 菌种培养	21
3.3.2 月桂烯产量测定	21
3.3.3 质粒 DNA 的提取	21
3.3.4 琼脂糖凝胶电泳	21
3.3.5 切胶回收 DNA 片段	21
3.3.6 PCR 扩增基因片段和验证	21
3.3.7 遗传转化	25
3.3.8 扫描电子显微镜 (SEM) 观察	26
3.4 结果与分析	26
3.4.1 突变体文库的构建	26
3.4.2 变体基因的验证与连接	27
3.4.3 一代月桂烯合酶突变对月桂烯产量的影响	28
3.4.4 二代月桂烯合酶突变对月桂烯产量的影响	29
3.4.5 生产工艺的优化	31
3.5 本章小结	33
第 4 章 芹菜中单萜合酶的挖掘	35
4.1 引言	35
4.2 材料和方法	35

4.2.1 菌种和质粒	35
4.2.2 实验仪器	36
4.2.3 实验试剂	36
4.2.4 引物	36
4.2.5 培养基	36
4.2.6 代谢组分析	36
4.2.7 转录组分析	37
4.2.8 代谢途径分析	37
4.2.9 萜烯合成酶的系统发育分析和序列对比分析	38
4.2.10 萜类的定性和定量	38
4.2.11 发酵条件对生物转化的影响	39
4.3 结果分析	39
4.3.1 叶和茎当中的代谢产物分析	39
4.3.2 差异代谢物聚类分析	40
4.3.3 代谢通路分析	41
4.3.4 萜类生物合成相关的基因在植物不同位置的表达模式	42
4.3.5 TFs 在植物中的表达模式	43
4.3.6 叶和茎当中差异表达基因和通路的转录组学分析	44
4.3.7 系统发育分析和序列对比分析	45
4.3.8 萜烯合成酶体外功能分析	47
4.3.9 生产工艺的优化	49
4.4 本章小结	50
结论与展望	52
参考文献	54
攻读硕士学位期间研究成果	68
致谢	69

第 1 章 绪论

1.1 引言

萜类化合物是天然产物中结构多样、分布广泛的一类重要次生代谢产物，作为异戊二烯的聚合衍生物，主要来源于植物、微生物和海洋生物^[1]。根据分子结构中异戊二烯单元（C₅H₈）的数量（*n*），萜类化合物可分为单萜（*n*=2，C₁₀）、倍半萜（*n*=3，C₁₅）、二萜（*n*=4，C₂₀）、二倍半萜（*n*=5，C₂₅）、三萜（*n*=6，C₃₀）、四萜（*n*=8，C₄₀）和多萜（*n*>8）等结构类型。这类化合物不仅以萜烯烃类形式存在，还可形成多种含氧衍生物，包括醇、醛、酮、羧酸、酯类及甙类等。目前发现的萜类超过 5 万多种，常见的萜类化合物包括单萜类的月桂烯^[2]、倍半萜类的法尼烯^[3]、二萜类的紫杉醇^[4]、三萜类的人参皂苷^[5]以及四萜类的胡萝卜素^[6]等。

1.2 单萜的概述

月桂烯（myrcene）和别罗勒烯（*allo-ocimene*）均是来源于植物的共轭二烯烃，常温下为无色或淡黄色油状液体，具有令人愉快的、清淡的香脂气味^[7,8]。工业上主要通过 β -蒎烯的热裂解反应制备月桂烯^[9]。别罗勒烯主要存在于伞形科和菊科^[10]等植物当中，其主要制备方法有两种，一种是从植物当中分离提取^[11,12]，或者是化学合成^[13]。随着植物的多样化，单萜在不同的植物当中的含量也有所不同，含月桂烯最多的依次是黄柏果油（92%）、黄桫叶油（52%）和柔布枯油（43%），其次是日本黄檗果油、香脂云杉油、香脂冷杉油、加拿大铁杉油、香紫苏油、马鞭草油、蛇麻油、松节油等，也存在于枫茅、柏木、艾蒿类、橙子和柠檬等植物材料中^[14]。别罗勒烯分布在香叶油等植物精油中，同时存在于伞形科植物和菊科植物当中^[10]。

月桂烯和别罗勒烯均是无环单萜类化合物，含三个碳碳双键，其中两个为共轭双键，赋予其较高的化学反应活性，容易发生氧化、聚合、异构、重排等化学反应^[15]，在合成香料及其他功能物质方面有很大的潜力。月桂烯存在 α 和 β 两种同分异构体， α -月桂烯在自然界中几乎不存在，通常所指的月桂烯为 β -月桂烯。月桂烯因其三个独特的双键成为合成香料和药物中间体的重要原料^[16]。别罗勒烯存

在顺式和反式两种构型，在自然状态下两者以混合物的形式存在^[17]。含共轭双烯的萜类化合物的 Diels-Alder 反应是当前新香料试制中颇受重视的反应类型，不同的共轭双烯、亲二烯体及催化剂对产物的香气都有影响^[18]。月桂烯的共轭双键，可与亲二烯化合物进行 Diels-Alder 反应生成一系列环己烯基香料产品^[19]，进一步分子内环化可形成双环化合物这些环化产物大都有令人感兴趣的香气特征。月桂烯和别罗勒烯难溶于水，溶于乙醇、乙醚、氯仿，能与大多数其它香料混合，两者的稳定性和光、温度、金属离子、氧化剂以及抗氧化剂等因素有关^[21]。

1.3 月桂烯和别罗勒烯的应用

随着对其研究的深入，月桂烯和别罗勒烯的应用价值在不断的扩大。月桂烯含有多个双键，使得其有很强的消除自由基能力和抗氧化能力^[22,23]，还可应用于香料、合成维生素 E 等领域。别罗勒烯目前主要用于香精、高分子聚合材料、杀虫剂等领域。除此之外，月桂烯和别罗勒烯还是合成多萜类化合物的中间体，具有多种生理功能，它们不仅具有抗过敏的作用，而且对增强人体自身免疫抵抗力具有重要意义，在食品、日化、医疗等领域受到广泛关注，展现了巨大的应用潜力和广阔的市场前景。

(1) 食品添加剂。月桂烯和别罗勒烯两者都可以作为食品添加剂，通过将物质添加入食品当中，可以提高食物的香味^[16]。

(2) 香精香料。月桂烯所具有的独特香脂气味，可以用作香水和除臭剂的生产^[23]，同时还可用于合成其他香料，如柑葑醛、柑葑酸甲酯和龙涎酮等。

(3) 抗癌防癌。 β -月桂烯对转移性 MDA-MB-231 人类乳腺癌细胞具有抗侵袭活性^[30]。在 α -蒎烯、 β -月桂烯、葑烯和 D-柠檬烯四种单萜烯中， β -月桂烯对肿瘤坏死因子 TNF α 诱导的核因子 κ B (NF- κ B) 活性的抑制作用最强。月桂烯的衍生物香叶醇在多项研究表明其对不同类型肿瘤有治疗或预防作用。此外，香叶醇还可通过调控多种肿瘤细胞的信号分子和通路从而增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[24]。月桂烯作为一种二烯体，利用醌类物质作为亲二烯体与其进行 Diels-Alder 反应，合成了很多具有抗癌活性的醌类化合物，在医药领域的具有重要应用价值^[25-28]。

(4) 护肤、抗衰老。月桂烯通过多靶点 (AP-1、MAPK、ROS) 协同作用，

对紫外线诱导的人体皮肤光老化具有潜在的保护作用^[29]。因此，月桂烯具有应用于护肤行业的潜力。

(5) 农药杀虫剂。单萜烯氧化后会引引起昆虫引诱剂成分的变化，而成分的变化则影响引诱剂对害虫的引诱效果^[20]。二化螟是稻田主要的害虫之一，尤其在安徽地区，二化螟为害日益严重，已对水稻高产、稳产造成严重威胁^[31]。传统上，防治二化螟主要依赖化学农药，农药的大量施用带来了诸多环境和社会问题。但是月桂烯作为二化螟雌虫驱避剂组分的用途以及二化螟雌虫驱避剂，能够用于驱避二化螟雌虫，相应能够达到驱避二化螟雌虫产卵的作用，并且对环境污染很小，对我国防治二化螟危害水稻具有重要意义，有利于水稻无公害生产^[32]。别罗勒烯则能增强拟南芥对致病真菌灰霉病菌的抗性，同时它还对四种蚊子的幼虫具有高毒性^[33]。

(6) 高分子材料。月桂烯共聚物具有高抗湿滑、低滚阻的特性^[34]；月桂烯均聚物具有高阻尼的特性，同时侧链双键可加不同基团修饰，实现材料的功能化，具有应用到高性能轮胎领域的潜力^[35,36]。别罗勒烯含有三个双键，通过环丙烷化，可作为高能液体燃料应用于航空飞行器当中，提高有效载荷能力和增强任务能力^[37]。

(7) 其他功能。月桂烯可调节机体免疫功能，提高人体身体免疫能力，两者独特的味道可以愉悦身心，减缓损伤性神经疼痛，抗炎症，强化生殖系统能力^[27]。

1.4 萜类化合物的合成途径

1.4.1 前体物质的合成途径

尽管萜类化合物的种类丰富多样且结构复杂，但是他们的前体物质却是相同的，都是异戊烯焦磷酸（IPP）和二甲基烯丙基焦磷酸（DMAPP），且两者在特定条件下可以相互转化^[32,38,39]。IPP/DMAPP 可以在相应萜类合酶的作用下合成相应的萜类化合物。比如，在法尼基焦磷酸合酶（FPPS）的催化作用下，IPP 和 DMAPP 可以缩合生成 FPP。FPP 既可以作为前体直接合成 C₁₅ 倍半萜类化合物，也可以合成 C₃₀ 三萜类化合物^[40-42]。此外，IPP/DMAPP 可以在牻牛儿苗基焦磷酸合成酶（GGPPS）下连续缩合形成牻牛儿苗基焦磷酸（GPP）和牻牛儿苗基牻牛儿苗基焦磷酸（GGPP），GPP 可以进一步转化为 C₁₀ 单萜类化合物，GGPP 可

以转化为 C20 二萜类化合物^[43]。同时，在八氢番茄红素合成酶（PSY）催化两分子的 GGPP 生成类胡萝卜素的前体物质——八氢番茄红素^[44,45]。这些含有不同单位 C5 碳骨架的结构物还可以进一步在许多功能酶的作用下进行甲基化修饰、乙酰化修饰和羟基化修饰等，这些修饰更极大地增加了萜类结构和功能的多样性。IPP 和 DMAPP 主要来源于两种途径，一种是许多原核生物和植物质体中存在的 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸（MEP）途径，另外一种存在于真核生物以及古生菌的甲羟戊酸（MVA）途径^[46]。

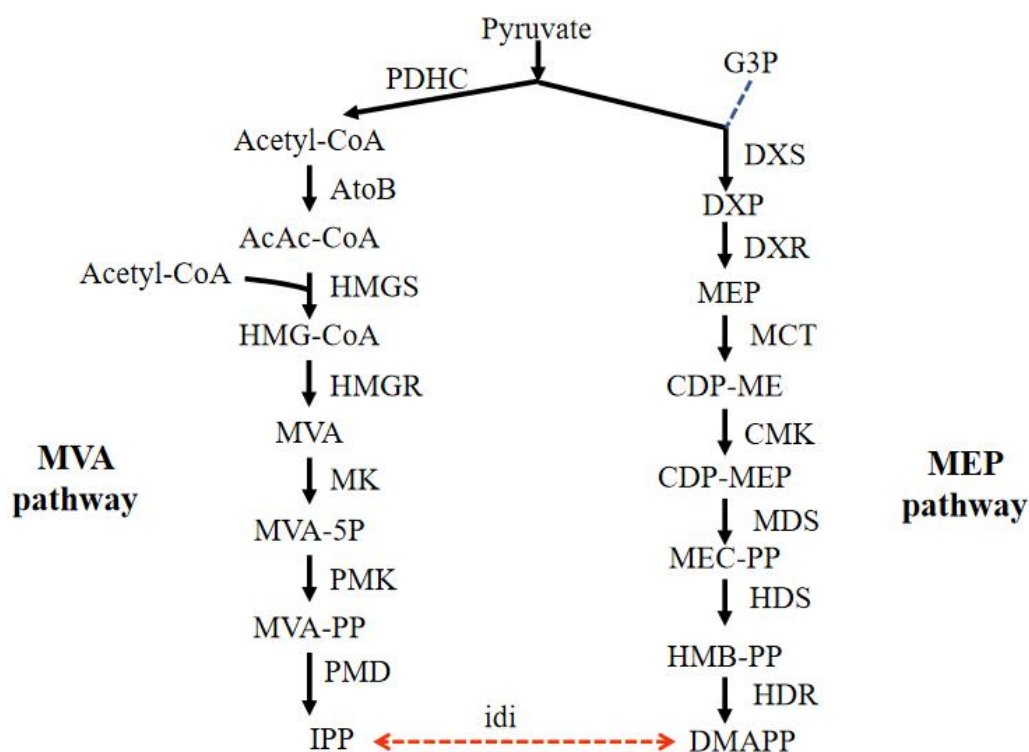


图 1-1 萜类化合物前体物质合成途径。

Figure 1-1 Pathway for the synthesis of terpenoid precursor substances.

MEP 途径包含 7 个生物合成步骤^[47-49]：是 MEP 途径的第一个催化酶，催化 3-磷酸甘油醛（G3P）和丙酮酸（AcAcH）生成 5-磷酸脱氧木酮糖（DXP）；第二步，DXP 经 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶（DXR）催化生成 2-甲基赤藻糖醇-4-磷酸（MEP）；第三步，MEP 经 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸胞苷酰转移酶（MCT）催化生成 4-胞苷二磷酸-2-甲基赤藻（CDP-ME）；第四步，CDP-ME 经 4-（5'-二磷酸胞苷）-2-C-甲基-D-赤藻糖醇激酶（CMK）化生成 4-胞苷二磷酸-2-甲基赤藻糖醇-2-磷酸（CDP-MEP）；第五步，CDP-MEP 经 2-C-甲基-D-赤藻糖醇 2,4-环二磷酸合成酶（MDS）催化生成 2-甲基赤藻糖醇-2,4-环焦磷酸（MEC）；

第六步，MEC 经羟甲基丁烯基-4-磷酸合成酶（HDS）催化生成羟甲基丁烯基-4-磷酸（HMB-PP）；第七步，MEP 途径中最后一个酶羟甲基丁烯基-4-磷酸还原酶（HDR）催化 HMB-PP 生成二甲基烯丙基焦磷酸（DMAPP）或异戊烯焦磷酸（IPP），且 IPP 和 DMAPP 的比例为 3:7。

由于 MEP 途径在大肠杆菌中生成的萜类化合物产量有限，随着分子生物学、合成生物学、微生物学和代谢工程学科的不断发展，大肠杆菌可以引入异源 MVA 途径从而产生大量单萜烯^[51,52]。MVA 途径一般有 6 步反应^[47-49]：第一步，两分子的乙酰辅酶 A 在乙酰乙酰 CoA 硫解酶（AACT）的作用下生成乙酰乙酰 CoA（AcAc-CoA）；第二步，AcAc-CoA 在 3-羟-3-甲戊二酸单酰 CoA 合酶（HMGS）的作用下生成 3-羟-3-甲戊二酸单酰 CoA（HMG-CoA）；第三步，HMG-CoA 3-羟-3-甲戊二酸单酰 CoA 还原酶（HMGR）的作用下生成甲羟戊酸（MVA）；第四步，甲羟戊酸在甲羟戊酸激酶（MK）的作用下生成 5-磷酸甲羟戊酸；第五步，5-磷酸甲羟戊酸在磷酸甲羟戊酸激酶（PMK）的作用下生成 5-焦磷酸甲羟戊酸；第六步经甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶（PMD）作用催化 5-焦磷酸甲羟戊酸生成 IPP，IPP 可以在异戊烯焦磷酸异构酶（IDI）的催化作用下可逆的异构化为 DMAPP，IPP 和 DMAPP 可以作为前体物质用作后续萜类化学品的合成。

1.4.2 月桂烯和别罗勒烯的合成途径

月桂烯合成途径有三种，一种是从月桂叶、马鞭草、香叶和其他植物的精油中直接提取。第二种是热分解法，由 β -蒎烯（我国每年可以生产大约三十多万吨的松节油，当中含有 0.5%~28%的 β -蒎烯）经过热裂解得到月桂烯^[50]。第三种则是使用微生物合成，目前常用于生产月桂烯的底盘为大肠杆菌^[40,57]。

罗勒烯目前主要来源于化学合成法，少部分来源于植物精油。由于缺乏催化别罗勒烯合成的酶，微生物法生产别罗勒烯目前尚未报道。

萜类的前体均为 DMAPP 和 IPP，从 DMAPP 和 IPP 得到单萜烯需要 2 步反应^[40]：首先 DMAPP 和 IPP 在牻牛儿基焦磷酸合成酶（GPPS）的催化作用下缩合生成牻牛儿基焦磷酸（GPP）。其次，单萜烯合酶催化 GPP 生成月桂烯或者别罗勒烯等。此外，月桂烯也可以以芳樟醇等作为反应物制得^[53]。

1.5 大肠杆菌单萜合成的研究进展

目前, 外源 MVA 途径生产别罗勒烯的方法尚未见报道, 而月桂烯的主要来源是植物提取法和化学提取法。这两种方法容易受到气候以及环境污染等问题制约^[8,12,54]。因此, 微生物合成单萜类化合物逐渐成为未来发展的主要趋势。大肠杆菌和酵母菌目前广泛用于微生物生产萜类化合物^[55]。单萜类化合物对酵母菌具有显著毒性(最小抑制浓度 MIC: 月桂烯, 2.12 mM^[56,57]; β -蒎烯, 1.45 mM^[58]; 柠檬烯, 0.44 mM^[59])。相比之下, 大肠杆菌的耐受性更强, 因此微生物生产单萜烯目前主要以大肠杆菌作为底盘菌株。大肠杆菌本身具有天然的 MEP 途径, 能够合成月桂烯的前体物质 IPP/DMAPP, 但由于 MEP 途径生成的 IPP/DMAPP 量较少, 难以满足工业化生产的需求^[46]。不过大肠杆菌作为外源基因表达的优选宿主, 具有遗传背景清晰、操作简便、发酵成本低且易于规模化等优势, 是目前应用最广泛、最成功的表达系统载体^[60]。通过引入外源 MVA 途径, 能够显著提高萜类化合物前体物质的供应量, 从而高效生产单萜烯^[40,51,61]。近年来, 对大肠杆菌提高月桂烯的产量改造主要集中在提高 MEP 途径关键基因表达、引入外源 MVA 系统、启动子优化、单萜烯合酶强度优化、调控或敲除基因策略以及优化中心代谢途径等研究。MEP 途径中的关键基因有: 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合成酶基因(*DXS*)、4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D 赤藓糖醇合成酶基因(*ispD*)、异戊烯焦磷酸异构酶基因(*IDI*)等。在大肠杆菌中过表达这些基因可以直接提高萜类化合物的产量^[57,62]。Kim 等人^[57]为了改变因为 GPP 不足和单萜烯合酶活性低所产生影响, 通过对大肠杆菌外源引入 GPPS 途径, 使得月桂烯的产量得到了提升。

1.6 研究目的和意义

本文以大肠杆菌 BS1101 为底盘菌株, 对月桂烯和别罗勒烯高效合成进行了研究。通过引入外源的 MVA 途径, 使得大肠杆菌同时拥有 MVA 途径和 MEP 途径两个途径提供合成月桂烯和别罗勒烯的前体物质 IPP 和 DMAPP, 从而使得前体物质能够更稳定的得到供应。其次, 大量文献研究证明, 单萜合酶的活性是影响单萜产量的一大重要因素, 为了得到高产月桂烯合酶, 利用能够响应月桂烯浓度的生物传感器策略进行月桂烯合酶定向进化。通过 2 轮的定向进化, 得到了更为高产的月桂烯合酶基因; 对于别罗勒烯合酶, 通过对芹菜进行转录组、代谢组

分析，并利用生物信息学技术从中挖掘到了别罗勒烯合酶基因 *AgTPS40* 并对其进行了功能鉴定；最后将两个合酶分别整合至编码异源 MVA 途径的载体，并转入大肠杆菌 BS1101 中进行表达，从而获得一定产量的月桂烯和别罗勒烯。

(1) 测评了多种菌株对月桂烯的耐受性。通过在培养基中添加一定浓度的月桂烯，检测菌株的生物量，从而得到对月桂烯耐受性较好的菌株，同时引入先前文献报道的 MVA 途径，进行发酵表达，得到一定产量的月桂烯。

(2) 以大肠杆菌 BL21(DE3)和 BS1101 为底盘菌，利用先前构建的月桂烯生物传感器对月桂烯合酶进行 2 轮的定向进化，得到高产月桂烯合酶，从而提升月桂烯的产量。

(3) 通过对芹菜进行转录组、代谢组分析，鉴定其具有挖掘萜烯合酶的潜力。其次利用生物信息学技术挖掘了单萜合酶基因，并进行整合表达，通过 GC-MS 分析和标准品鉴定产物为别罗勒烯，是首次报道的别罗勒烯合酶。通过对发酵条件进行优化，得到迄今为止报道的微生物合成别罗勒烯最高产量。

(4) 最后，对生产两种单萜的发酵工艺进行优化，包含 IPTG 的浓度的优化、pH 梯度和发酵规模，使得产量得到一定的提升。

通过本研究，一方面，在引入外源稳定 MVA 途径的基础之上，对月桂烯合酶做了 2 代迭代进化，提高了月桂烯的产量；另一方面，利用生物信息学技术挖掘并鉴定了一个能够生产别罗勒烯的合酶，为微生物生产单萜的研究提供了借鉴与参考。

第2章 生产月桂烯的底盘菌株测评

2.1 引言

单萜对细胞宿主有一定的毒性。比如，在酵母中，萜烯干扰膜结构，抑制呼吸链和离子通道，还能引起细胞内容物的释放，据文献报道，对于酿酒酵母 *S. cerevisiae* 而言，其对月桂烯的 MIC 的值为 2.12 mM^[56,57]。若想得到高产量的月桂烯，首先得确保宿主对其需具备一定的耐受性，筛选出一种对月桂烯耐受性较好的菌株尤为重要，本研究筛选了实验室保藏的 8 个菌株（3 个大肠杆菌系列菌株、4 个酵母系列菌株以及需钠弧菌），通过模拟发酵细胞产生月桂烯环境下，以 OD₆₀₀ 值作为参考，检测细胞的生物量。最后，在筛选出的两个月桂烯耐受菌株 BL21(DE3)和 DH10B 中，通过引入了外源 MVA 途径和先前文献报道的已经进行一代定向进化的月桂烯合酶基因 *trCsMSM7*^[40]，并通过设置了不同浓度梯度的 IPTG 和不同的发酵时间，初步判断底盘菌株的最适合发酵条件。

2.2 材料和方法

2.2.1 菌种

本研究所用菌株，见表 2-1。

表 2-1 本研究所用到的菌株

Table 2-1 Strains used in this study

菌株	菌属	来源
<i>P. putida</i> KT 2440	大肠杆菌系列	实验室保藏
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	大肠杆菌系列	实验室保藏
<i>E. coli</i> DH10B	大肠杆菌系列	实验室保藏
<i>E. coli</i> BS1101	大肠杆菌系列	实验室保藏 ^[63]
<i>P. pastoris</i> GS115	酵母系列	实验室保藏
<i>S. cerevisiae</i> 1135D	酵母系列	实验室保藏
<i>R. toruloides</i> NBRC 0880	酵母系列	实验室保藏
<i>Y. lipolytica</i> 2613	酵母系列	实验室保藏
<i>V. natriegens</i>	需钠弧菌	实验室保藏

2.2.2 实验仪器

本研究的主要实验仪器如表 2-2 所示。

表 2-2 本章所用的仪器设备

Table 2-2 The instruments used in this study

仪器名称	仪器公司	型号
超低温冷冻箱	青岛海尔特种电器有限公司	DW-86L490J
超纯水仪	默克 Meck 公司	Milli-Q
电子天平	Sartorius	GL62021-1SCN
PCR 仪	伯乐中国有限公司	T100
微量离心机	Eppendorf	Centrifuge 5425
高速离心机	Thermo Scientific	LYNX 6000
振荡培养箱	上海知楚仪器有限公司	ZQTY-50V
电热恒温培养箱	上海一恒科学仪器有限公司	MJ-150
超净工作台	青岛海尔生物医疗股份有限公司	HCB-1300V
恒温水浴锅	上海一恒科学仪器有限公司	HWS-26
凝胶成像系统	Uvitec 有限公司	Alliance Micro Q9
核酸电泳仪	伯乐中国有限公司	PowerPac
分光光度计	北京凯奥科技发展有限公司	K5800
压力蒸汽灭菌器	雅马拓科技有限公司	SM830
GC-MS	赛默飞科技有限公司	7890A Gas Chromatograph and 5975C Mass Spectrometer
扫描电子显微镜	日本日立公司	S-4800

2.2.3 主要试剂与试剂盒

本章所使用的试剂和试剂盒主要由表 2-3 所示，其中 Phanta Max Master Mix 主要用于 PCR 扩增目的条带，Rapid Taq Master Mix 用于菌落 PCR 验证，ClonExpressUltraOneStepCloningKitV2 主要用于同源重组，GeneMorph II random mutagenesis 用于构建突变体文库。

表 2-3 本研究使用的试剂

Table 2-3 The reagents used in this study

试剂	生产厂家
限制性核酸内切酶	Thermo Scientific/诺唯赞
ClonExpress 试剂盒	南京诺唯赞生物科技有限公司
2×Phanta Max Master Mix	南京诺唯赞生物科技有限公司
6×DNA Loading Buffer	北京全式金生物技术有限公司
1 kb Plus DNA Ladder	北京全式金生物技术有限公司
YeaGreen Nucleic Acid Gel Stain	翌圣生物科技股份有限公司
GeneMorph II random mutagenesis	北京冬歌博业生物科技有限公司
DNA 纯化回收试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
质粒提取试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
胰蛋白胨	OXOID
酵母粉	OXOID/安琪
十二烷	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
月桂烯标准品（90%）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
别罗勒烯标准品（95%）	北京信德元素科技有限公司
有机相滤膜	天津市津腾实验设备有限公司
TAE (50X)	上海碧云天生物技术有限公司

2.2.4 主要培养基的配制

LB 培养基（100 mL）：酵母提取物 0.5 g，氯化钠 1 g，胰蛋白胨 1 g（若是固体培养基，则额外加入 2 g 琼脂，YPD 培养基和 LB₃ 培养基同此）；YPD 培养基（100 mL）：酵母提取物 1 g，氯化钠 2 g，胰蛋白胨 2 g；LB₃ 培养基（100 mL）：酵母提取物 0.5 g，氯化钠 3 g，胰蛋白胨 2 g；突变体文库 LB 培养基（500 mL）：酵母提取物 0.5 g，氯化钠 1 g，胰蛋白胨 1 g，琼脂 2 g，Cm 500 μL，Kana 500 μL，1 M IPTG 5.05 μL，50 % Glu 10.2 mL；M9 MOPS 培养基（1 L）：M9 salts（1×）：MOPS 75 mM，MgSO₄ 2 mM，CaCl₂ 0.01 mM，thiamine·HCl (Vitamin B1) 1 mg/L，FeSO₄ 2.78 mg/L；MgSO₄（1 M）：将 12g MgSO₄ 固体粉末溶于适量水中，定容至 100 mL。高压蒸汽灭菌或过滤除菌，置于 4 °C 储存；M9 salts（1 L，

5×) : KH_2PO_4 15 g, NaCl 2.5 g, Na_2HPO_4 33.9 g, NH_4Cl 5 g; MOPS 1 M pH7.0 (500 mL): 104.6 g MOPS 粉末加 7.7 g 氢氧化钠调 pH 过滤除菌; 1000× CaCl_2 Mix (100 mL): 1000× FeSO_4 0.278 g, 1000× thiamine·HCl 0.1 g, 1000× CaCl_2 0.11098 g; $10^3 \times$ Micronutrients (100 mL): 钼酸铵 0.370757 g, 硼酸 2.472 g, 氯化钴 0.71379 g, 硫酸铜 0.5742755 g, 氯化锰 1.58328 g, 硫酸锌 0.28755 g。

2.2.5 引物

本章所用的引物见表 2-4。

表 2-4 本章所用的引物

Table 2-4 Primers used in this chapter

引物名称	序列 (5'-3')
CsMS-F	AGGCATTTTCGTCAGAATTAAGGATCTTTTAAGAAGGAGATATACAT GCGCCGTAGTGCAAATTACGAG
CsMS-R	TGAGATCCTTACTCGAGTTTGGATCCTTACTTCGGGATATTGATCGG GGTG

2.3 实验方法

2.3.1 菌种培养

(1) 种子培养

将-80 °C冰箱保存的大肠杆菌系列菌株、酵母系列菌株和需钠弧菌分别在 LB 固体平板、YPD 固体平板和 LB_3 固体平板上涂布均匀, 放于 30 °C 培养箱培养过夜, 然后用接种环挑取单菌落至 3 mL LB 液体培养基、3 mL YPD 液体培养基和 3 mL LB_3 液体培养基中, 置于 30 °C 培养 14~16 h。

(2) 月桂烯生物合成的体外模拟体系构建

将得到的种子液按照起始 $\text{OD}_{600}=0.2$ 的接种量稀释接种至含有 3 mL 液体培养基的摇菌管中。模拟发酵培养基加入 30 μL 50%浓度的月桂烯, 对照组加入 15 μL 无水乙醇, 放入 30 °C, 220 rpm 的摇床培养, 每间隔 2 h, 测一次 OD_{600} 。每个菌株分为实验组和对照组, 大肠杆菌测评至 h=12 小时即可, 酵母菌和需钠弧菌测到 h=14 小时即可, 每组数据重复三次。

2.3.2 OD_{600} 检测

OD_{600} 在 Muti skan FC (Thermo fisher, 美国) 仪器上测量, 将波长设置为 600 nm。在测试前, 用酒精喷壶喷少量 75%浓度酒精于擦镜纸上, 轻轻的擦拭测量镜头。用 dd H_2O 或者空白培养基进行校准, 每间隔 2 h 时, 在超净工作台

下吸取 1~2 μL 实验组和对照组的培养菌液，进行测量，每次测量后均用擦镜纸擦干净。在最后一个时间段所测得的实验组 OD_{600} 与对照组 OD_{600} 的比值结果作为生物量的评估参数。

2.3.3 月桂烯产量测定

发酵结束后，吸取摇瓶里的上层有机相十二烷 1~1.5 mL，放于 1.5 mL EP 管中，常温下 12000 rpm 离心 5 min，取出吸取上清液 10 μL 加入到 990 μL 的乙酸乙酯（内含一定量的氧化石竹烯内参）混合均匀。同时，以购买的月桂烯试剂（90%）作为母液进行稀释，分别得到 455.6 mg/L、1139 mg/L、2847 mg/L、7119 mg/L 四个已知浓度的月桂烯作为标品。按照同样的操作各吸取 10 μL 标品分别加入 990 μL 内含一定量氧化石竹烯内参的乙酸乙酯。用 1 mL 注射器吸取上述混合后的溶液，通过 0.22 μm 柱形滤柱进行过滤，且多次吹打注射器使得残留在滤柱内的液体完全流出，并将溶液收集至 GC-MS 样品瓶中，最后再通过气相色谱-质谱联用仪（7890 A 气相色谱和 5975 C 质谱检测器，Thermo fisher，美国）对样品进行分析。GC-MS 入口温度设置为 250 $^{\circ}\text{C}$ ，流速为 1 mL/min。柱箱温度最初设定在 50 $^{\circ}\text{C}$ 持续 0.5 min，并以 25 $^{\circ}\text{C}$ 的速度升至 150 $^{\circ}\text{C}$ ，然后以 40 $^{\circ}\text{C}$ 的速度升至 280 $^{\circ}\text{C}$ ；样品测定完毕后，根据事先配置不同浓度的月桂烯标准品和氧化石竹烯内标以及 GC-MS 色谱柱面积比值，算出标准曲线，并根据标准曲线 $y=ax \pm b$ 算出月桂烯的产量，其中 y 是产量（mg/L）， x 代表产物峰与内参峰面积的比值， a 和 b 是通过四个已知浓度的月桂烯标准品计算所得。

2.3.4 琼脂糖凝胶电泳

（1）为了尽可能降低误差，控制变量，本实验配置的琼脂糖凝胶为 0.8% 的普通胶和 0.8% 的回收胶。

（2）称取 0.64 g 琼脂糖粉转移至三角瓶中加入 80 mL 1 $\times$ TAE 缓冲溶液后，置于微波炉中高温加热 3 min，使琼脂糖粉完全溶解。溶解完毕，待溶液温度适当冷却后，加入 3 μL 核酸 YeaGreen Nucleic Acid Gel Stain 染料，充分摇匀。

（3）将样品梳放入提前准备好的制胶模具中，将上一步均匀染色的琼脂糖溶液倒入制胶槽内，控制凝胶厚度在 3 mm~5 mm 之间。

（4）室温静置固化 30 min 后，小心移除样品梳，将成型凝胶转移至电泳槽，加入 1 $\times$ TAE 缓冲液于电泳槽内使得液面高于琼脂糖凝胶表面约 2~5 mm，确保凝

胶两端的电压与外加电压的大小相等，以提高电泳效率。

(5) 按照一定体积比例 (6×DNA loading buffer: DNA 溶液=5: 1, 10×DNA loading buffer: DNA 溶液=9: 1) 加入 6×DNA loading buffer, 吹吸均匀后, 加入凝胶孔中, 大样品孔一般加入 20~30 μL , 微型孔一般加入 3 μL ~5 μL , 并点入 10 μL (微型孔加入 5 μL) 1 kb Plus DNA Ladder 做对比。

(6) 接通电源槽和电泳仪, 启动电源, 设置运行参数为电压 150 V~200 V, 电泳时间 30 min~10 min。

(7) 电泳时间完成后, 切断电源, 取出凝胶, 正面向上放置在全自动凝胶成像仪上, 通过分子量标准 marker 条带对比进行结果分析。

2.3.5 切胶回收 DNA 片段

从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段, 操作流程按照购于天根生化科技 (北京) 有限公司的通用型 DNA 纯化回收试剂盒说明书进行。最后一步洗脱缓冲液更换为 TE 缓冲溶液。

2.3.6 遗传转化

(1) 从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出大肠杆菌感受态细胞, 置于冰上, 待感受态细胞稍微溶解后, 加入 3 μL 提取质粒液或者 3 μL PCR 产物, 轻轻的吹洗均匀, 然后冰浴 30 min。

(2) 冰浴结束后, 立即取出, 放入事先调置好的 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅, 热击 90 s。

(3) 热击结束后, 立即取出, 再冰浴 3 min。

(4) 在超净工作台加入 1 mL 液体 LB 培养基或者液体 SOC 培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 的恒温摇床中复苏 1 h。

(5) 复苏完毕后, 12000 rpm 离心 1 min, 取出上清液 800 μL , 再将剩下的液体吹吸均匀并涂布在 LB 平板上 (按照实验需求, 加入特定的抗生素), 倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱, 恒温培养过夜。

2.4 结果与分析

2.4.1 月桂烯耐受性测评

如图 2-1 所示, 在经过 12~14 小时的培养后, 大肠杆菌系列的三个菌株: B L21(DE3)、DH10B、KT2440 实验组的 OD_{600} 分别能达到 3.472、2.762、2.437, 分别达到其各自对照组生物量的 92.17%、91.26%、80.22%。酵母系列的四个菌

株: *P. pastoris* GS115、*S. cerevisiae* 1135D、*R. toruloides* NBRC 0880、*Y. lipolytica* 2613 实验组的 OD₆₀₀ 分别能达到: 0.771、1.009、0.384、2.252, 分别能达到其各自对照组生物量的 7.6%、7.5%、3.8%、24.1%。需钠弧菌 *V. natriegens* 的实验组的 OD₆₀₀ 能达到 2.543, 达到了其对照组生物量的 65.85%。

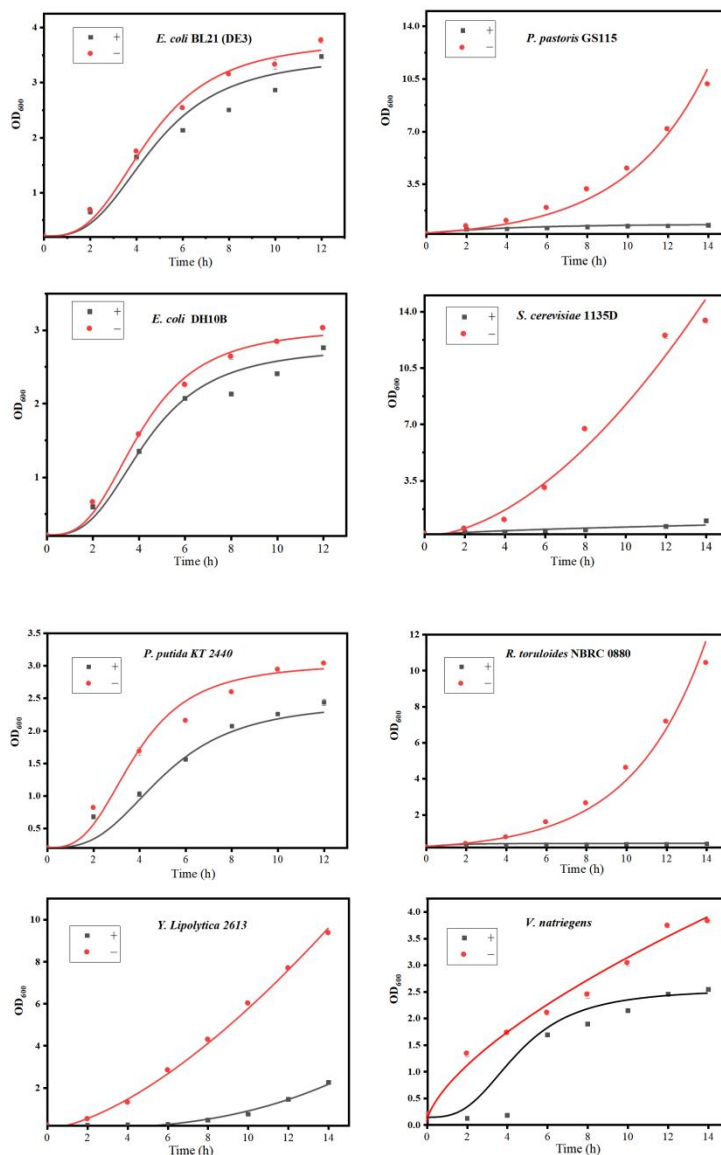


图 2-1 菌株生长 OD₆₀₀ 图。

Figure 2-1 OD₆₀₀ plot of strain growth.

实验结果分析表明, 酵母菌株在常规培养条件下虽相较于大肠杆菌系列菌和需钠弧菌呈现显著增殖优势, 但是在存在月桂烯的环境中, 其细胞的存活率大大降低, 这与先前已有文献报道的结论一致。值得注意的是, 相较于酵母菌及需钠弧菌的敏感表现, 大肠杆菌 BL21(DE3)与 DH10B 菌株展现出突出的月桂烯适应

性，在同等月桂烯暴露条件下二者均能达到其对照组生物量的 90%以上。

2.4.2 变体基因 *trCsMSM7* 的构建与引入

trCsMSM7 是陈等人通过生物传感器筛选结合月桂烯合酶定向进化策略所得到的一个高产月桂烯突变合酶^[40]。为了能够明确 BL21(DE3)和 DH10B 在引入外源的月桂烯合酶，生产月桂烯所需要的最佳条件，本研究将 *trCsMSM7* 分别导入 BL21(DE3)和 DH10B，并通过设置不同的诱导剂浓度梯度和不同的发酵时间，初步确定两种菌株在月桂烯发酵生产中所需要的最佳培养条件。

2.4.2.1 变体基因 *trCsMSM7* 的扩增

2×Phanta Max Master Mix 酶用作 DNA 聚合酶有着高保真、高扩增效率、高灵敏度和广泛适用性的效果，能够稳定的保证目标片段在 PCR 的过程中不会出错。本章节使用其作为 DNA 聚合酶扩增 *trCsMSM7* 基因，以 *trCsMSM7* 为模板，CsMS-F/CsMS-R 为引物扩增质粒骨架，*trCsMSM7* 基因全长为 1731 bp，按照表 2-5 的扩增体系加入聚合酶 2×Phanta Max Master Mix、dd H₂O，按照表 2-6 的扩增方案进行 PCR。扩增速度为 1 kb/30 s。扩增完成后，产物做琼脂糖凝胶电泳验证、通过胶回收纯化系统进行目标片段纯化并测定核算浓度，纯化片段与线性化的 pCC24 载体连接，最终构建完整的 MVA 萜类生物合成通路。连接体系以及连接方案如表 2-7 所示。

表 2-5 Phanta 酶 PCR 扩增体系

Table 2-5 Phanta Polymerase PCR amplification system

反应体系	体积 (μL)
2×Phanta Max mix	25 μL
CsMS-F	2 μL
CsMS-R	2 μL
模板 (<i>trCsMSM7</i>)	0.5 μL
dd H ₂ O	To 50 μL

扩增方案如表 2-6 所示。

表 2-6 Phanta 酶扩增方案

Table 2-6 Phanta Polymerase PCR protocol

步骤	温度 °C	时间
Step 1 预变性	95 °C	3 min

续表 2-6 Phanta 酶扩增方案

Continued table 2-6 Phanta Polymerase PCR protocol

步骤	温度 °C	时间
Step 1 预变性	95 °C	3 min
Step 2 变性	95 °C	15 s
Step 3 退火	60 °C	30 s
Step 4 延伸	72 °C	55 s
From Step 2 to Step 4 30 ×		
Step 5 终延伸	72 °C	5 min
Step 6 保温	4 °C	∞

ClonExpress Ultra One Step Cloning 连接体系以及连接方案如表 2-7 所示。

表 2-7 ClonExpress Ultra One Step Cloning 连接体系和连接方案

Table 2-7 ClonExpress Ultra One Step Cloning connectivity system and protocol

反应体系	体积
trCsMS-M7 片段	2.5 μL
pCC24 载体	2 μL
2×CE 酶	10 μL
dd H ₂ O	To 20 μL
50 °C 连接 1 h	

2.4.2.2 MVA 途径的引入

将实验室保存在-80 °C冰箱的 BL21(DE3)感受态细胞和 DH10B 感受态细胞取出并在冰上慢慢融化，将上一步实验研究构建的含有 MVA 途径的质粒分别导入至 BL21(DE3)和 DH10B 感受态细胞内，按照 2.2.6 遗传转化的方法进行转化。由于 trCsMSM7 带有氯霉素抗性，因此，转化后的两个菌株均涂布在带有氯霉素抗性的 LB 固体平板上，37 °C培养过夜。从过夜培养的固体平板上各挑出 2 个单

克隆设置生物学平行组，分别接种至 3 mL 带有氯霉素 Cm 抗性的 LB 液体培养基中，培养 15 h 得到发酵种子液，此时，菌株中带有完整的 MVA 生物合成通路。本次发酵以 M9-MOPS 培养基（带有 Cm 抗性）作为发酵培养基，以 LB 培养基（Cm 抗性）培养种子液，发酵种子液接种比例为 2%，IPTG 的终浓度梯度为：BL21(DE3)菌株：600 μ M、500 μ M、400 μ M、300 μ M、200 μ M，对应的实验组别命名为 B5-600、B5-500、B5-400、B5-300、B5-200。DH10B 菌株：50 μ M、40 μ M、30 μ M、20 μ M、10 μ M，得到实验组命名为 D5-50、D5-40、D5-30、D5-20、D5-10。发酵时间以先前实验研究成果为参考^[40,57]，取两次间隔，分别为 48 h 和 72 h，其中，37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 的时间为 4 h。

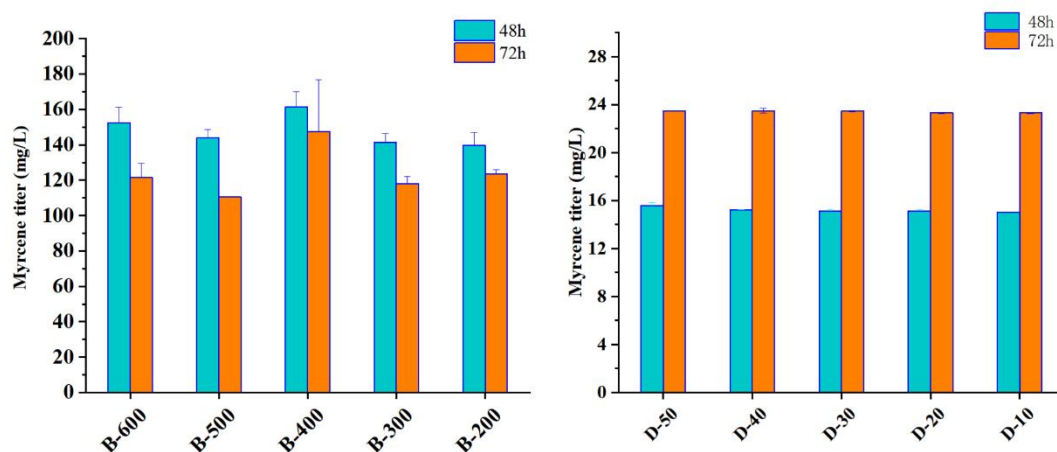


图 2-2 不同诱导剂浓度和发酵时间下的月桂烯产量。

Figure 2-2 Myrcene production at different inducer concentrations and fermentation times.

由图 2-2 可知，通过设置不同的 IPTG 浓度梯度，大肠杆菌 BL21(DE3)菌株在诱导剂 IPTG 终浓度为 400 μ M 时，48 h 的发酵产量达到 161.53 mg/L，72 h 的发酵产量仍维持 147.4 mg/L 水平。相比之下，大肠杆菌 DH10B 菌株的月桂烯生产能力显著受限，其在发酵 48 h 时，产量稳定维持在 15 ± 0.6 mg/L 区间，发酵 72 h 时产量维持在 23 ± 0.5 mg/L 区间。综上所述，本研究通过设置了不同诱导剂浓度梯度和发酵时间，并通过 GC-MS 对产物进行测定。根据实验结果可以发现，大肠杆菌 BL21(DE3)不仅具有更优的月桂烯耐受性，其生物合成效率也显著高于 DH10B 菌株。基于上述结论，本研究确立 BL21(DE3)作为后续月桂烯合酶迭代进化研究的底盘细胞，以 IPTG 终浓度为 400 μ M、发酵时间为 48 h 为发酵条件，同时，以本研究构建所得到的 B5-400 菌株(后续研究命名为 BL21 DE3-M7)

设定为后续实验的对照菌，为酶进化筛选得到更高活性的月桂烯合酶提供参考和基础。

2.5 本章小结

萜类化合物是以异戊二烯为基本结构单元形成的化合物或衍生物。根据异戊二烯单元(C5)的数量差异，萜类化合物可分为单萜类(C10)、倍半萜类(C15)、二萜类(C20)等。天然存在的低浓度萜类产物和低活性萜类合酶是目前阻碍萜类生物合成研究进展的关键点。近年的研究表明，萜烯合酶在不同宿主中的异源表达是提高鉴定效率的可行方法。基于微生物底盘的代谢工程策略确保了用于鉴定的萜类化合物的高产量，比如酿酒酵母和大肠杆菌通常被用作萜烯生产的异源宿主，这是由于其两者被充分研究的背景和 STPs 生物合成的巨大潜力^[61,64]。本章节首阶段旨在筛选出一种能够对月桂烯耐受性较好的菌株，从而可以对其进行异源 MVA 途径表达，得到高浓度的月桂烯。利用实验室保藏的 8 种菌株（三种大肠杆菌、四种酵母菌、需钠弧菌），通过模拟发酵的条件，在含有一定浓度月桂烯的合成培养基中进行模拟发酵实验。实验结果表明，酵母菌和需钠弧菌对月桂烯的耐受性较差，而大肠杆菌 BL21(DE3)菌株和 DH10B 菌株表现出显著月桂烯环境适应性，分别能达到其各自对照组生物量的 92.17%和 91.26%。

在确定了对月桂烯耐受性较好的菌株之后，将先前文献报道的生产月桂烯合酶基因连接至异源编码 MVA 生物合成途径的载体上，并将其转化至 BL21(DE3)菌株和 DH10B 菌株。通过设置了不同浓度梯度的 IPTG 诱导剂和发酵时间，采用 GC-MS 定量分析产物动态，初步探索最适发酵 IPTG 浓度和发酵时长。最终，大肠杆菌 BL21(DE3)菌株在诱导剂终浓度为 400 μ M 时，48 h 的月桂烯发酵产量达到 161.526 mg/L。大肠杆菌 DH10B 菌株在发酵 72 h 时，产量在 23 ± 0.5 mg/L 区间。基于上述结论，在后续月桂烯合酶定向进化的研究中，以 BL21(DE3)菌株作为底盘菌株，以 BL21DE3-M7 作为对照菌株。

第3章 月桂烯合酶迭代进化

3.1 引言

萜类生物合成研究进展表明,通过代谢工程策略在微生物体系中构建单萜合成通路已经能够生产单萜烯,如 α/β -蒎烯^[65,66]、柠檬烯^[67,68]和香桉烯^[69]等典型单萜的异源合成,其主要的方法是通过引入外源 MVA 途径(将碳通量从乙酰辅酶 A 导向 IPP/DMAPP)或者是工程改造天然 MVA 途径在大肠杆菌中进行生物合成。然而,单萜合酶的催化能力依旧显著低于来自相同微生物宿主的倍半萜^[70,71]或二萜^[72]的水平,这表明香叶基焦磷酸合酶(GPPS)和单萜合酶的活性仍然是限制产物高水平生产的瓶颈。天然存在的酶通常表现出较低的异源表达活性或效率,不适合稳定高产的生物合成途径。早在 2015 年,韩国的 Kim 等人^[57]就通过向大肠杆菌外源引入 MVA 途径,并通过过量表达月桂烯合酶,使得月桂烯的产量达到了 58.19 mg/L,这在当时是大肠杆菌中生产月桂烯的最高产量。但是,月桂烯的合酶活性相对来说依旧很低,对月桂烯合酶改造的空间依旧很大。生物传感器是一种很有前途的用于酶定向进化的工具,其具有灵敏度高^[73]、响应快^[74]、信号转导机制多样^[75]等特点,适合于高通量筛选。基因编码的全细胞生物传感器是为酶进化而开发的杰出代表。2023 年,陈等人^[40]通过构建了一个月桂烯特异性生物传感器高通量筛选平台,并以此为基础对月桂烯合酶进行了一代进化和高通量筛选,最终使得月桂烯的产量突破至 510.38 mg/L,远远超过了此前文献报道的月桂烯产量。该传感器是基于假单胞菌 MyrR 调控因子,建立了一种能够响应月桂烯浓度的新型基因编码生物传感器^[76],通过传感启动子的表征和工程化,开发了具有优异特异性和动态范围的生物传感器,并应用于月桂烯合酶的定向进化。

本章节在陈等人研究的基础上,进一步利用月桂烯生物传感器高通量筛选平台,对月桂烯合酶进行了两代定向进化实验。通过筛选,获得了第一代 168 个突变体基因和第二代 144 个突变体基因。随后,将这些突变体基因整合至异源编码 MVA 途径的 pCC24 线性化载体中,构建完整月桂烯生物合成通路,随后将其分别转化至 BL21(DE3)菌株和 BS1101 菌株中,实现月桂烯的高效合成,其产物积累量较原始菌株提升显著,验证了该定向进化策略的有效性。

3.2 材料和方法

3.2.1 菌种和质粒

所用的菌株及质粒见表 3-1。

表 3-1 本章研究所用的菌株和质粒

Table 3-1 Strains and plasmids used in this chapter

质粒	来源
trCsMSM7	实验室保藏 ^[40]
菌株	
DH10B PCC201	本研究
BL21(DE3)	本研究
BS1101	实验室保藏 ^[63]
DH5 α	实验室保藏

3.2.2 实验仪器

所用的主要仪器，同第二章 2.2.2。

3.2.3 实验试剂

所用的主要试剂，同第二章 2.2.3。

3.2.4 引物

所用的引物见表 3-2。

表 3-2 本章所用的引物

Table 3-2 Primers used in this chapter

引物名称	序列 (5'-3')
CsMSep-F	ACGTGGCATTTCGTCAGAATTAAGGATCTTTTAAGAAGGA GATATACATG
CsMSep-R	TGATGCCTGGAGATCCTTACTCTGTTA
CsMS-F	AGGCATTTCGTCAGAATTAAGGATCTTTTAAGAAGGAGAAT ACATGCGCCGTAGTGCAAATTACGAG
CsMS-R	TGAGATCCTTACTCGAGTTTGGATCCTTACTTCGGGATATT GATCGGGGTG

3.2.5 培养基

所用的主要培养基，同第二章 2.2.4。

3.3 实验方法

3.3.1 菌种培养

(1) 种子培养

对于在-80 °C甘油保藏菌，将其在冰上稍微融化后，使用无菌移液枪吸取适当量加入对应的培养基中（需要抗生素则加相应抗生素），置于 37 °C恒温振荡培养箱 220 rpm 培养 16~18 小时；对于生长在固体培养基上的菌，使用无菌接种环挑取新鲜单克隆菌落接种至带有对应抗生素的培养基中，置于 37 °C恒温振荡培养箱 220 rpm 培养 16~18 小时即可。

(2) 发酵培养

取过夜培养 16 小时的新鲜菌液，按照 2%的接种量转接至 M9-MOPS 培养基中（加入对应抗生素），37 °C条件下 220 rpm 振荡培养细胞至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ ，随后加入覆盖剂正十二烷和相应浓度的诱导剂 IPTG，将培养参数调整为 30 °C，220 rpm，发酵时间根据前一章得到的实验结论进行操作。

3.3.2 月桂烯产量测定

月桂烯产量测定方法同 2.3.4。

3.3.3 质粒 DNA 的提取

质粒 DNA 的提取按照购于天根生化科技（北京）有限公司的质粒小提试剂盒说明书进行，最后一步洗脱缓冲液更换为 TE 缓冲溶液。

3.3.4 琼脂糖凝胶电泳

主要试剂和操作同 2.3.5。

3.3.5 切胶回收 DNA 片段

主要试剂和操作同 2.3.6。

3.3.6 PCR 扩增基因片段和验证

根据基因片段的大小以及实验阶段的目的不同，所需要的催化酶、扩增体系以及 PCR 程序也不相同。扩增构建质粒的 DNA 片段和变体基因验证均使用购于南京诺唯赞的高保真 2×Phanta Max DNA 聚合酶，菌落 PCR 的验证使用的是购于南京诺唯赞的 2×Rapid Taq Master Mix 聚合酶，基于拓扑异构酶的超快速克隆试剂盒用的是所购于南京诺唯赞的 5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit 试剂盒，用于连接转化的酶是购于南京诺唯赞的 2×ClonExpress Ultra One Step Cloning KitV2，用于随机突变使用的是安捷伦 GeneMorph II 诱变试剂盒，用于去除模板化的是

10×Fastdigest *DpnI* 快切酶，用于酶切验证的是 *KpnI* 和 *HindIII* 快切酶。用于扩增完整的 *trCsMSM7* 基因片段所使用的引物是 CsMS-F/R，用于易错 PCR 扩增的引物是 CsMSep-F/R。经过筛选后的基因最终与带有异源 MVA 生物合成途径的 pCC24 载体连接，形成完整的月桂烯生物合成通路，并转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中进行表达。

(1) 2×Phanta Max Master Mix 酶扩增体系和扩增方案见表 3-3 和表 3-4。

表 3-3 扩增体系

Table 3-3 PCR amplification system

反应体系	体积 (μL)
2×Phanta Max Master Mix	25 μL
Primer-F	2 μL
Primer-R	2 μL
Template	0.5 μL
dd H ₂ O	To 50 μL

表 3-4 扩增方案

Table 3-4 PCR protocol

步骤	温度 (°C)	时间
Step 1 预变性	95 °C	3 min
Step 2 变性	95 °C	15 s
Step 3 退火	60 °C	30 s
Step 4 延伸	72 °C	1 kb/30 s
From Step 2 to Step 4 30 ×		
Step 5 终延伸	72 °C	5 min
Step 6 保温	4 °C	∞

(2) *DpnI* 内切酶 PCR 体系和方案见表 3-5 和表 3-6。

表 3-5 扩增体系

Table 3-5 PCR amplification system

反应体系和方案	体积
PCR 溶液	50 μL
<i>DpnI</i> 内切酶	1 μL
50 $^{\circ}\text{C}$ 连接 1 h	

表 3-6 扩增方案

Table 3-6 PCR protocol

温度	时间
37 $^{\circ}\text{C}$	15 min
98 $^{\circ}\text{C}$	3 min
12 $^{\circ}\text{C}$	∞

(3) 5 min TA/Blunt-Zero Cloning PCR 扩增体系和扩增方案见表 3-7。

表 3-7 扩增体系和扩增方案

Table 3-7 PCR amplification system and protocol

反应体系	体积 (μL)
5 $\times$ TA/Blunt-Zero Cloning	1 μL
片段回收样品溶液	1 μL
dd H ₂ O	3 μL
25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	

(4) GeneMorph II 易错 PCR 扩增体系和扩增方案见表 3-8 和表 2-6。

表 3-8 扩增体系

Table 3-8 PCR amplification system

反应体系	体积 (μL)
10 $\times$ Mutazyme II Buffer	5 μL
dNTP	1 μL
Primer-F	2 μL

续表 3-8 扩增体系

Continued table 3-8 PCR amplification system

反应体系	体积 (μL)
Primer-R	2 μL
Polymera	1 μL
Template	X μL
dd H ₂ O	To 50 μL

(5) 2×ClonExpress Ultra One Step Cloning 扩增体系和扩增方案见表 3-9。

表 3-9 扩增体系和扩增方案

Table 3-9 PCR amplification system and protocol

反应体系	体积
DNA 片段	2.5 μL
载体	2 μL
2×CE 酶	10 μL
dd H ₂ O	To 20 μL
50 °C 连接 1 h	

(6) 10×Fastdigest 酶切验证体系与方案见表 3-10。

表 3-10 验证体系和方案

Table 3-10 Validation system and protocol

反应体系	体积
10×FastDigest buffer	1 μL
<i>Kpn</i> I	0.5 μL
<i>Hind</i> III	0.5 μL
质粒溶液	5 μL
dd H ₂ O	To 10 μL
37 °C 酶切 30 min	

(7) 2×Rapid Taq Master Mix 酶菌落 PCR 验证体系与方案见表 3-11 和表 2-6。

表 3-11 扩增体系

Table 3-11 PCR amplification system

反应体系	体积 (μL)
2×Rapid Taq Master Mix	12.5 μL
Primer-F	1 μL
Primer-R	1 μL
Template	0.5 μL
dd H ₂ O	To 20 μL

3.3.7 遗传转化

3.3.7.1 常规转化

(1) 从-80 °C冰箱取出感受态细胞，置于冰上，待感受态细胞稍微溶解后，加入 1~3 μL 提取的质粒溶液或者 3 μL PCR 产物，轻轻的吹洗均匀，然后冰浴 30 min。

(2) 放入事先调置好的 42 °C水浴锅，热击 90 s。

(3) 热击结束后，立即取出，再冰浴 3 min。

(4) 在超净工作台下加入 1 mL SOC 培养基，然后置于 37 °C，220 rpm 的恒温摇床中复苏 1 h。

(5) 复苏完毕后，取出，12000 rpm 离心 1 min，取出上清液 900 mL，再将剩下的液体吹吸均匀并涂布在 LB 平板上（有抗性的加入特定的抗生素），倒置于 37 °C培养箱，恒温培养过夜。（此步骤对于 DH10B PCC 201 大肠杆菌超级感受态细胞转化实验，不需要离心去部分上清液）

3.3.7.2 快速转化

(1) 从-80 °C冰箱取出 DH5 α 感受态细胞，置于冰上，待感受态细胞稍微溶解后，加入 1~3 μL 提取质粒或者 3 μL PCR 产物，轻轻的吹洗均匀，然后冰浴 3 min。

(2) 冰浴结束后，立即取出，放入事先调置好的 42 °C水浴锅，热击 90 s。

(3) 热击结束后，立即取出，再冰浴 3 min，全部均匀涂布于带有 Amp 抗性的 LB 固体培养基上，倒置于 37 °C培养箱，恒温培养过夜。

3.3.7.3 制备 PCC 201 大肠杆菌超级感受态细胞

大肠杆菌超级感受态细胞按照购于上海碧云天生物技术有限公司的超级感受态细菌制备试剂盒说明书进行制备。

3.3.8 扫描电子显微镜 (SEM) 观察

使用扫描电子显微镜 (S-4800, 日本日立公司) 对菌株形态进行成像。

(1) 从发酵液中收获细菌细胞, 离心 5000 rpm, 5 min, 并在 4% 多聚甲醛中固定过夜。

(2) 离心除去上清液后, 依次用乙醇梯度 (30%、50%、80% 和 100%, 每个浓度 10 min) 处理细胞。

(3) 随后, 用水冲洗样品三次 (每次 2 min), 离心, -20 °C 速冻, 并冷冻干燥 24 h。

(4) 干燥后, 准备观察菌株形态。显微镜观察时, 首先使用低倍镜定位目标区域, 然后使用高倍镜成像。加速电压设定为 5 kV。

3.4 结果与分析

3.4.1 突变体文库的构建

以原始质粒 trCsMSM7 为模版, 首先使用引物 CsMS-F/ CsMS-R 通过 PCR 扩增获得完整片段 (1731 bp), 如图 3-1 所示, 在扩增出完整片段后, 使用购自安捷伦的突变试剂盒进行易错 PCR 扩增, 随后使用 *DpnI* 酶消化去除原始模板质粒。经琼脂糖凝胶电泳验证后, 切胶回收目的片段并送测序分析 (测序公司为北京擎科生物科技股份有限公司); 在确定了有突变碱基之后, 再将上一步胶回收产物与带有荧光感应生物传感器的载体连接, 连接后的产物先转化至 DH5 α 感受态细胞并送测序验证; 在测序结果显示有碱基突变之后, 其余溶液全部转化至 DH10B PCC201 超级感受态细胞内 (按照 1.5 μ L/管的标准进行转化), 涂布于 LB 平板上 (Cm, Kan, 10 μ M IPTG, 1% Glu), 并放置于 30 °C 培养箱培养 12 h 左右, 培养出的细胞内若含有月桂烯则会呈现出绿色荧光, 至此完成突变体文库的构建。

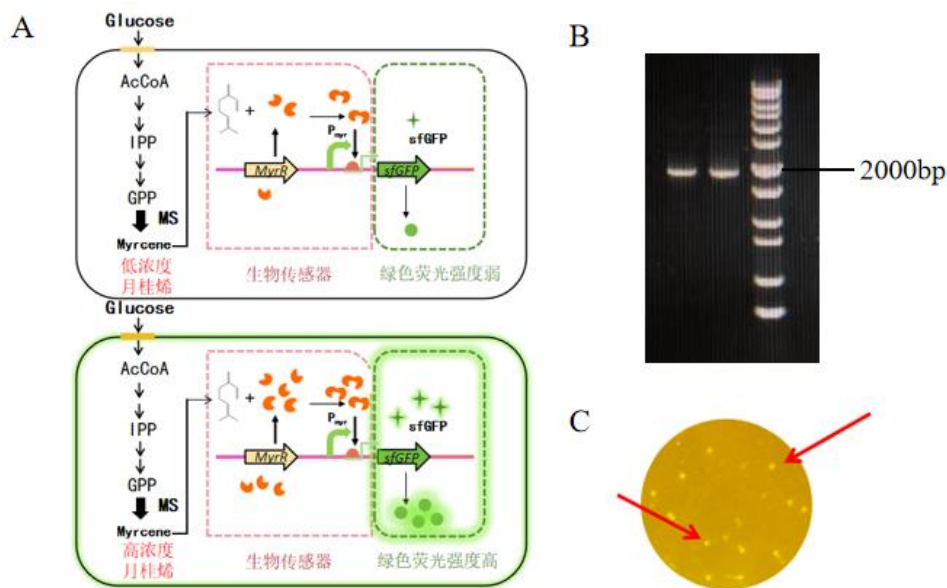


图 3-1 突变体文库构建流程

荧光感应生物传感器原理示意图 (A)；易错 PCR 产物电泳图 (B)；菌株荧光图 (C)。

Figure 3-1 Mutant library construction process

Schematic diagram of the fluorescence sensing biosensor (A); Electrophoretic diagram of error-prone PCR products (B); Fluorescence diagram of the strains (C).

3.4.2 变体基因的验证与连接

从上一步长出的突变体文库中，挑取 168 个荧光较为明亮的菌落进行 PCR 验证，随后用 *DpnI* 甲基化敏感型限制性内切酶消化母本质粒残留，处理后的溶液吸出 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳分析验证。如图 3-2 所示，验证正确的突变体基因片段，通过 Gibson 连接与经 *XhoI/BamHI* 双酶切的 pCC24 进行连接，构建含完整 MVA 途径的质粒，将其转化至 DH5 α 感受态细胞内。随机挑取转化子进行菌落 PCR 验证和质粒双酶切验证。将验证正确的质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)超级感受态细胞内进行表达。

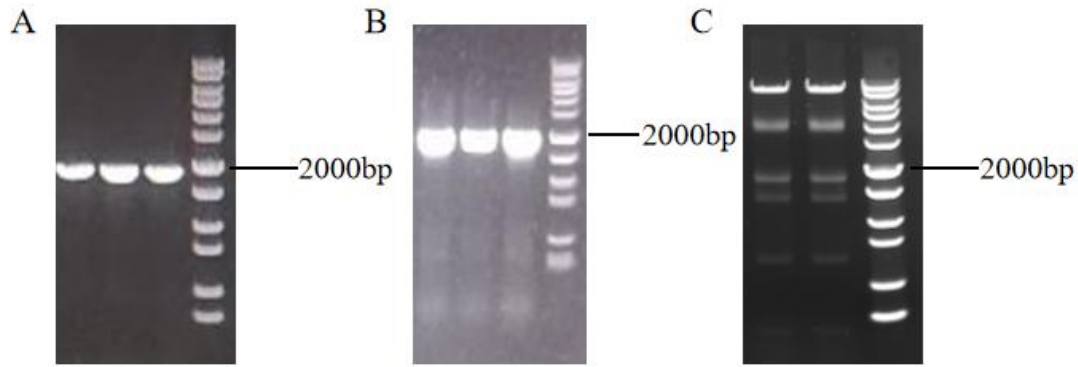


图 3-2 突变基因电泳图

(A) 变体基因 PCR 产物电泳图; (B) 质粒 PCR 验证图; (C) 酶切验证电泳图。

Figure 3-2 Electropherogram of mutant genes

Variant gene PCR product electropherogram (A); Plasmid PCR validation graph (B); Enzyme digestion validation electropherogram (C).

3.4.3 一代月桂烯合酶突变对月桂烯产量的影响

基于前期构建的 168 株 BL21(DE3)菌株文库,在标准化发酵条件下(终浓度 400 μ M IPTG, 48 h 培养周期)进行分批发酵实验。结果如图 3-3 所示,将 168 株突变菌株与对照组 BL21(DE3)-M7 进行对比,取 28 个高产的菌送测序。在挑取的 28 个突变菌株当中,编号为 4 的菌株和编号为 108 的菌株产量明显提升,分别为 203.22 mg/L 和 200.08 mg/L,相较于对照菌株 BL21(DE3)-M7 的月桂烯产量分别提升了 25.81%和 23.87%。在这 168 个菌株当中,部分菌株发生了氨基酸突变,另一部分仅存在碱基突变。基于月桂烯产量及氨基酸突变位点的综合评估,最终选定编号 108 菌株的对应质粒用于月桂烯合酶的第二代定向进化改造。

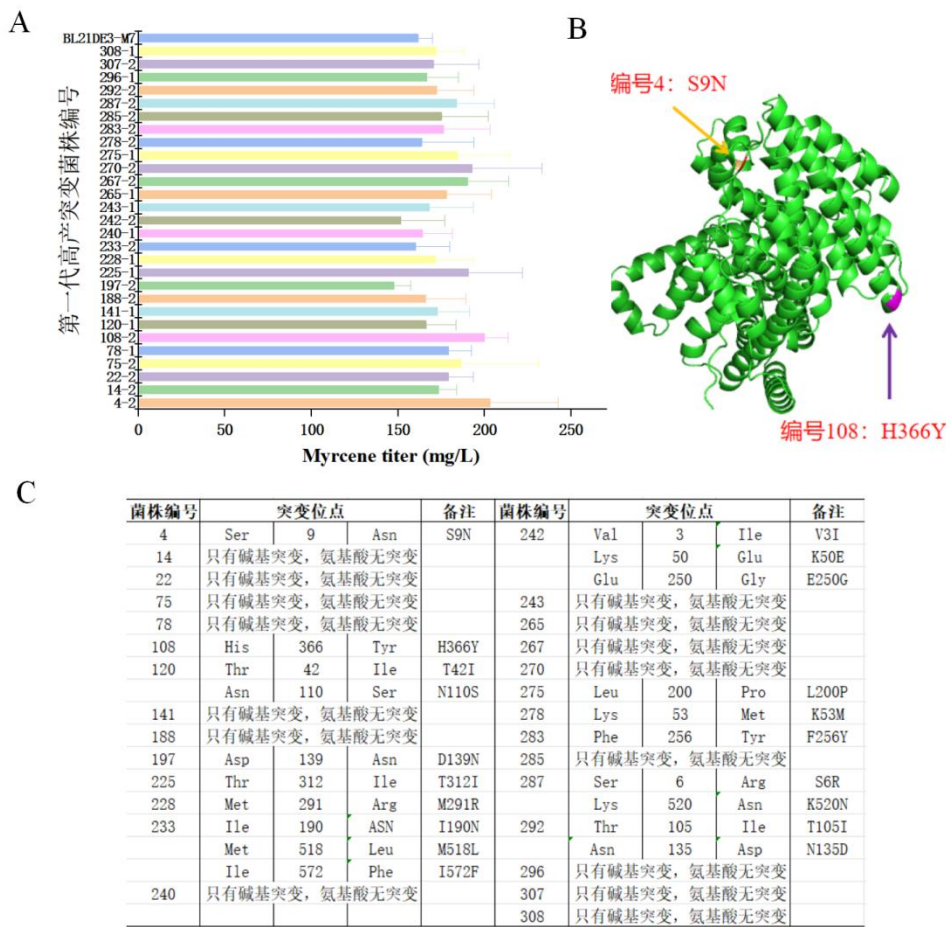


图 3-3 第一代月桂烯合酶突变对月桂烯产量的影响

第一代高产突变菌株产量（A）；突变氨基酸位置（B）；碱基突变位点（C）。

Figure 3-3 Effect of mutations in first-generation myrcene synthase on myrcene production

Yield of the first-generation high-yield mutant strain (A); Mutated amino acid position (B); Base mutation site (C).

3.4.4 二代月桂烯合酶突变对月桂烯产量的影响

将第一代的编号 108 菌株所对应的质粒作为起始模板进行第二代定向进化，实验流程与第一代保持一致。首先通过 PCR 扩增出完整片段，随后进行易错 PCR，再与月桂烯荧光传感器载体连接等。第二代仍以 BL21(DE3)为初始底盘菌株，共构建了 144 个突变克隆并分三批进行转化。如图 3-4 所示，在第一批的 47 个菌株当中最高产量菌株（编号 6）月桂烯的产量为 157.86 mg/L，显著低于第一代进化合酶的月桂烯产量。推测出现该情况的原因可能是 BL21(DE3)菌株对于突变质粒存在一个表达阈值，多轮突变所带来的负面效应超过了正向优化。为此，将发酵菌株更换为先前文章使用的大肠杆菌 BS1101，将 144 个二代突变体进行表

达, 以该文章发表的 M7 菌株作为对照。结果如图 3-4 所示, 从第二代筛选出的 9 个高产突变体中, 产量最高的是编号 106 所对应的变体, 其月桂烯产量能达到 601.66 mg/L。对筛选出的 9 个高产菌株进行测序, 测序结果如图 3-5 所示, 编号为 106 的菌株一共发生了两个位点突变, 其余菌株均存在氨基酸或碱基突变。为消除游离质粒不稳定性对产量的影响, 将两代突变体质粒分别重新转化至 BS1101 和 BL21(DE3) 菌株。BS1101 组对照为 M7 菌株, BL21(DE3) 组对照为 BL21(DE3)-M7 菌株。结果如图 3-5 所示, 对于 BS1101 菌株, 经过了两代的突

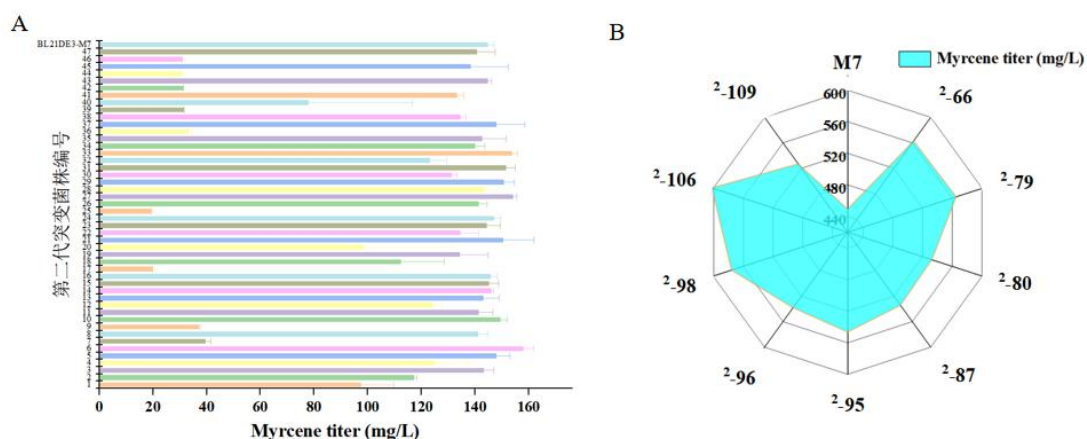


图 3.4 第二代月桂烯合酶突变对月桂烯产量的影响

第二代突变菌株产量图(A) (BL21(DE3)) 和第二代高产突变菌株产量图(B) (BS1101)。

Figure 3.4 Effect of mutations in second-generation myrcene synthase on myrcene production

Second generation mutant strain yield plot (A) (BL21(DE3)) and second generation high yield mutant strain plot (B) (BS1101).

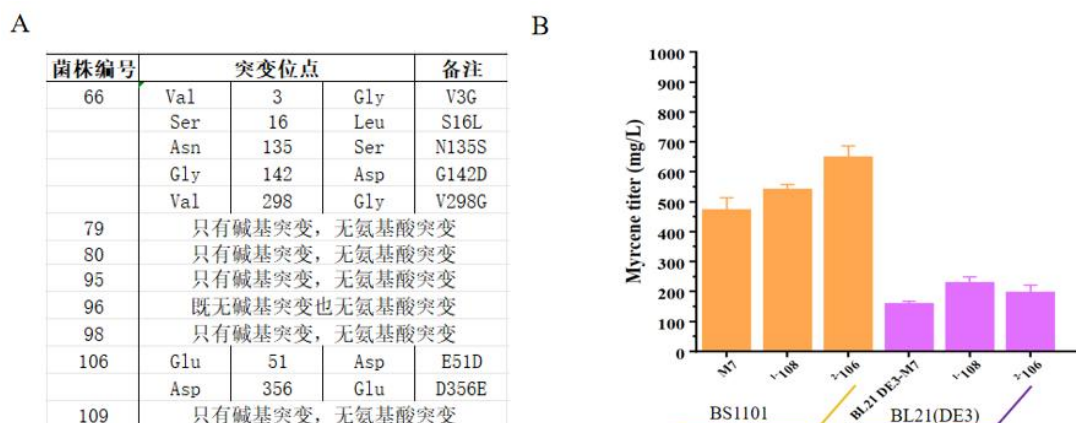


图 3-5 碱基突变位点图 (A) 和一代和二代进化菌株产量汇总图 (B)。

Figure 3-5 Map of base mutation sites (A) and summary of yields of first and second generation evolved strains (B).

变之后，其第一代的产量为 542.87 mg/L，第二代的产量为 651.95 mg/L，相较于对照组，分别提升了 14.29%和 37.26%。对于 BL21(DE3)菌株，经过了两代的突变之后，其第一代的产量为 232.11 mg/L，第二代的产量为 199.57 mg/L，相较于对照组，分别提升了 43.15%和 23.08%。两代月桂烯合酶迭代进化相对于对照组，均提升了产量，且在 BS1101 中最高能达到 651.59 mg/L，是迄今为止在 10 mL 摇瓶体系下的月桂烯最高产量。BL21(DE3)菌株在第二代进化中的表现表明，不同菌株对迭代进化的响应效果可能存在差异，且其产物产量提升存在生物学上限。

3.4.5 生产工艺的优化

本研究中，作为诱导剂的 IPTG 起到了诱导菌株表达生产月桂烯的作用。在不同诱导剂浓度下，菌株对月桂烯的生产能力也不相同。此外，每种微生物都有其最适生长的 pH 范围，偏离这一范围可能会抑制微生物的生长，从而影响单萜烯的合成。本研究额外设置 pH 为 5.5、6.0、7.0 的梯度，同时设置了 IPTG 终浓度为 25 μ M、100 μ M、150 μ M 的 IPTG 浓度梯度，以 BS1101 作为底盘菌株进行发酵表达，结果如图 3-6 所示，去除初始 pH=6.5 的情况下，在 pH=5.5 时菌株

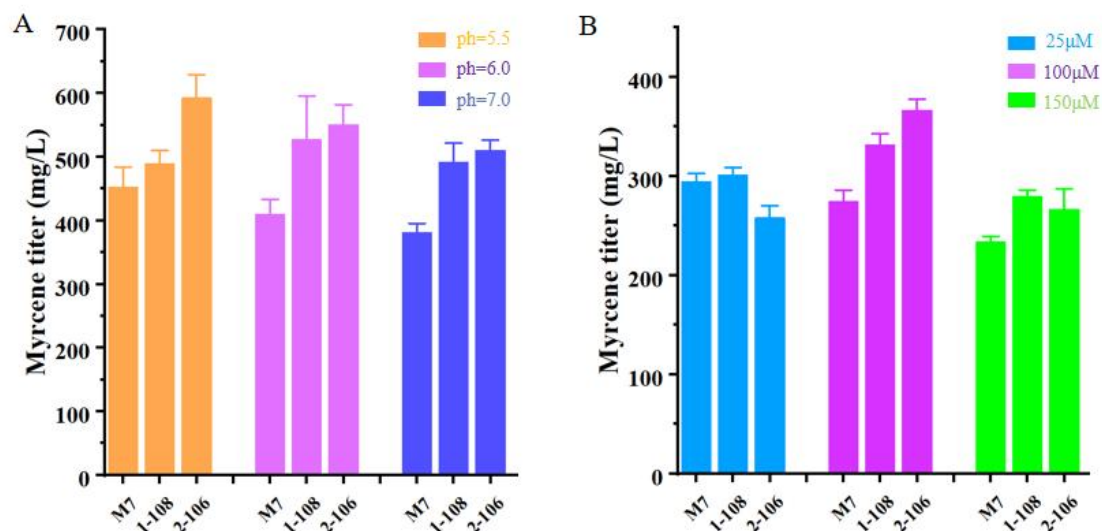


图 3-6 不同 pH 和诱导剂浓度下的月桂烯产量。

Figure 3-6 Myrcene production at different pH and inducer concentrations.

的月桂烯产量最高，其对照组 M7、一代和二代进化的最优菌株产量分别为 452.39 mg/L、489.78 mg/L、592.67 mg/L。相对于之前实验设置的 50 μ M 终浓度的 IPTG，

额外设置几组产量均显著低于先前研究,因此得出结论:终浓度为 50 μM 的 IPTG 就是最适诱导菌株生产月桂烯的诱导剂浓度。

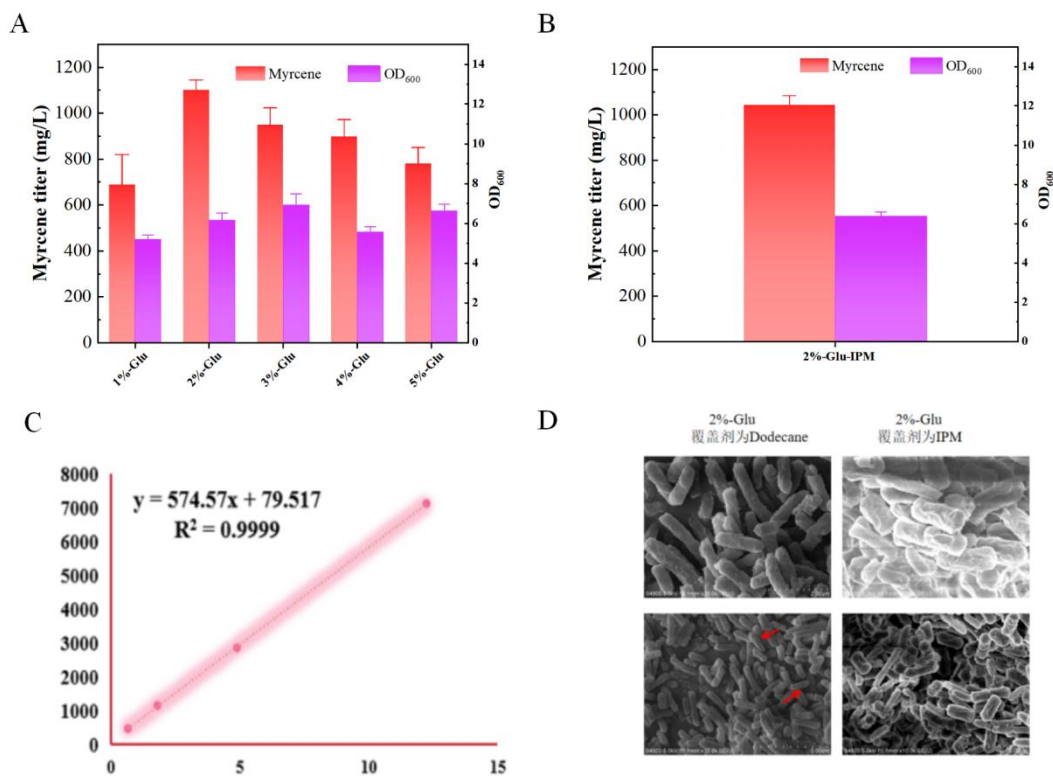


图 3-7 月桂烯生产工艺的优化

不同葡萄糖浓度下的月桂烯产量 (A); 以 IPM 作为覆盖剂的月桂烯产量 (B); GC-MS 拟合曲线 (C); 扫描电镜下菌株的成像 (D)。

Figure 3-7 Optimization of myrcene production

Myrcene yield at different glucose concentrations (A); Myrcene yield with IPM as a covering agent (B); GC-MS fitting plot (C); Scanning electron microscopy imaging of the strain (D).

为了进一步提高月桂烯生物合成效率,本研究扩大了发酵体系至 1 L 规模,并设置 1%、2%、3%、4%、5%、6% 的葡萄糖浓度梯度。结果如图 3-7 所示,在 2% 葡萄糖浓度下,月桂烯的产量达到 1.103 g/L,相较于原产量 651.95 mg/L,产量提升了 69.18%。为完善萃取体系,本研究在常规十二烷体系基础上,新增评估了肉豆蔻酸异丙酯 (isopropyl myristate, IPM) 构建的两相萃取系统。结果表明,采用 IPM 作为有机相时,2% 葡萄糖体系中的月桂烯产量可达 1.045 g/L。此外,在扫描电子显微镜下的成像可以看到,当葡萄糖终浓度为 2% 时,覆盖剂为十二烷相较于覆盖剂为 IPM 所对应的细胞形态呈现更为规整的超微结构特征。

3.5 本章小结

天然来源的单萜合酶普遍表现出较低的异源表达活性或效率,不适合稳定高产的生物合成需求^[77]。定向进化是一种强有力的工具,能够用于识别具有改进或新特性的酶变体,例如促进酶的特异性和催化活性^[78]。本章节采用定向进化技术,基于课题组前期开发的生物传感器高通量筛选平台,对月桂烯合酶进行两代迭代改造。第一代进化获得 168 个突变体基因,第二代进化获得 144 个突变体基因,通过这些变体基因连接至携带异源 MVA 途径的线性化载体 pCC24 中,构建完整月桂烯生物合成途径质粒,并分别转化至 BL21(DE3)和 BS1101 菌株进行体外表达。实验结果显示,第一代 168 个突变体菌株中编号 4 的菌株和编号为 108 的菌株产量明显提升,分别为 203.22 mg/L 和 200.08 mg/L,相较于对照菌株 BL21(DE3)-M7 (161.53 mg/L) 月桂烯产量分别提升了 25.81%和 23.87%。基于氨基酸突变位点分析,选择突变菌株 106 所对应的质粒进行月桂烯合酶第二代定向进化。在第二代首批 47 个突变体当中,最高的产量为编号为 6 菌株,其月桂烯产量为 157.86 mg/L,显著低于第一代进化合酶的月桂烯总体产量。推测二代突变的质粒可能在菌体内表达不稳定或是多轮突变使得菌株对变体合酶有表达阈值。基于上述考虑,将发酵菌株切换至先前研究报道的具备更强表达稳定性的大肠杆菌 BS1101,将 144 个二代突变基因全部进行表达,对照组为先前文章所发表的 M7 菌株。结果显示,从第二代筛选出的 9 个高产突变体中,产量最高的菌株是编号 106 株,其月桂烯产量能达到 601.66 mg/L。最后,为排除质粒丢失对数据的干扰,将两代最高产量突变体质粒重新转化至 BS1101 菌株和 BL21(DE3)菌株进行验证。对于 BL21(DE3)组,对照是前一章节构建的 BL21(DE3)-M7。结果表明:经过了两代的定向进化之后,在 BS1101 宿主中,第一代的产量为 542.87 mg/L,第二代的产量为 651.95 mg/L,相较于对照组,分别提升了 14.29%和 37.26%,对于 BL21(DE3)菌株,第一代的产量为 232.11 mg/L,第二代的产量为 199.57 mg/L,相较于对照组,分别提升了 43.15%和 23.08%。通过对生产工艺进行优化,最终在 1 L 摇瓶体系下,BS1101 对月桂烯的生产效价达到 1.103 g/L,这是迄今为止报道的在摇瓶发酵体系下最高的月桂烯产量。然而,部分变体并没有表现出提高的活性,相反,其产量甚至是低于对照,表明在月桂烯的两代定向进化中,出现了假阳性克隆的现象。推测可能的原因是细胞不同的生长状态和形态影响了遗传

编码的生物传感器的效果或者是不同菌株对经过不同次数定向进化的酶所表现出的表达能力不同。

在月桂烯生物合成途径中，代谢通量的改变会直接影响月桂烯的积累浓度，而月桂烯传感生物传感器可以监测到这种变化^[40]。基于这一特性，该生物传感器不仅可用于代谢工程研究中月桂烯高产菌株的高通量筛选，还可助力菌株定向进化实验。此外，单萜烯类化合物的生物合成均依赖于 MEP 或 MVA 这两条核心代谢途径^[79]。因此，通过该生物传感器优化单萜烯合成途径中关键酶的催化效率，不仅能特异性提升月桂烯的产量，还可通过代谢途径的协同作用促进其他单萜类化合物的生物合成。

第 4 章 芹菜中单萜合酶的挖掘

4.1 引言

植物是萜烯合成酶的重要来源。诸多植物如拟南芥^[80]、番茄^[81]和薄荷^[82]等，已鉴定出许多萜烯合成酶。芹菜（*Apium graveolens* L.）是一种一年生或二年生蔬菜，其富含维生素、芹菜素、纤维素等营养物质^[83]。据报道，芹菜精油具有催吐、健胃、利尿和通便的功效^[84]。之前的一项研究利用 HS-SPME-GC/MS 方法发现，芹菜中 70% 以上的挥发性化合物为萜烯类化合物，其中最主要的化合物是 β -月桂烯、*D*-柠檬烯、 β -罗勒烯和 γ -萜品烯^[85]，在其同科物种水芹中也检测到了大量单萜和倍半萜挥发物^[86]。本研究的代谢组测序数据进一步显示，芹菜中共检测到 746 种代谢物，涵盖 19 种单萜类化合物、25 种倍半萜类化合物、14 种二萜类化合物、15 种三萜类化合物以及 5 种杂萜类化合物。因此综上所述，芹菜具有挖掘新型萜烯合酶的巨大潜力。

本研究从芹菜转录组中挖掘出一个萜烯合成酶 AgTPS40，通过系统发育分析和序列对比分析确定其为单萜合酶。将 AgTPS40 与编码异源 MVA 途径的 pCC24 载体连接，构建含有完整生物合成途径的质粒，并将其转化至大肠杆菌 BS1101 进行异源表达。气相色谱-质谱（GC-MS）分析表明，产物的主要成分为别罗勒烯，证明 AgTPS40 可催化别罗勒烯的生成，因此，AgTPS40 被命名为别罗勒烯合酶，这是别罗勒烯合酶的首次报道。通过对生产工艺进行优化，在 1 L 摇瓶培养体系中实现了 933.35 mg/L 的别罗勒烯，这是迄今为止报道的别罗勒烯的最高产量。

4.2 材料和方法

4.2.1 菌种和质粒

本章研究所用的菌株及质粒见表 4-1。

表 4-1 本章研究所用的菌株

Table 4-1 Strains used in this study

菌株	来源
BS1101	本研究 ^[63]
DH5 α	实验室保藏

4.2.2 实验仪器

主要仪器同 2.2.2。

4.2.3 实验试剂

主要试剂同 2.2.3。

4.2.4 引物

本章所用的引物见表 4-2。

表 4-2 本章所用的引物

Table 4-2 Primers used in this chapter

引物名称	序列 (5'-3')
pCC24-AgTPS40-F	GGCATTTCGTCAGAATTAAGGATCTTTTAAGAAGGAGATATA CATGGTTACCAATCCGACCACC
pCC24-AgTPS40-R	GAGATCCTTACTCGAGTTTGGATCCTTACAGATTAATCGGTT CCAGCAG

4.2.5 培养基

主要培养基同 2.2.4。

4.2.6 代谢组分析

芹菜样本分为茎和叶两组，各组对应的生物学重复为 6 例，共提取 12 个样品，基于自建数据库，完成峰的提取、标注和分析。所有目标化合物的质谱数据采集和定量分析均由上海百趣生物技术有限公司完成（中国，上海）。

具体的操作如下：首先，将样品冷冻干燥处理再进行研磨（60 Hz，30 s），然后按照体积 3: 1 的体系加入甲醇和水进行萃取。将萃取液涡旋 30 s，40 Hz 匀浆 4 min，冰水浴超声 5 min，重复匀浆和超声 3 次，在混匀仪上 4 °C 过夜培养后，12000 rpm，4 °C 离心 15min。取上清液过 0.22 μ M 滤膜后取 2 mL 进样品，每个样品各取等体积混合成 QC 样品，采用 EXIONLC 系统（Sciex）进行 U HPLC 分离。流动相 A 为 0.01% 醋酸水溶液，流动相 B 为 50% ACN/IPA。柱温

设置为 25 °C。自进样器温度为 4 °C，进样量为 2 µL。流速 0.3 mL/min。使用装备 IonDrive Turbo V ESI 离子源的 SCIEX 6500 QTRAP+三重四极杆质谱仪，以多反应监测（MRM）模式进行质谱分析。典型离子源参数为：离子喷雾电压：5500 V-4500 V；幕气：35 psi；温度：400 °C；离子源气体 50 psi^[54,87,88]。

为了评估组间和组内代谢物多样性，对所有代谢数据进行多变量统计分析，包括无监督主成分分析（PCA）^[89]和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）^[90]等，并通过火山图对组间差异代谢物的整体分布情况进行可视化，通过箱型图展示组间上下调最明显的差异代谢物，同时，使用 KEGG（<http://www.genome.jp/kegg/>）和 MetaboAnalyst（<http://www.metaboanalyst.ca/>）等数据库进行途径富集分析。植物样本共 2 组，分别为芹菜-叶，芹菜-茎，各组对应的生物学重复为 6 例，进行基于 LC-MS 的代谢组学分析。对这些结果进行评价后，鉴定出 $|\text{Log}_2(\text{FC})| \geq 1$ 、 p 值 < 0.05 、变量投影重要度（VIP） ≥ 1 的代谢物为差异积累代谢物（DAMs）。

4.2.7 转录组分析

转录组测序结果和序列组装。为了从整体水平研究基因功能以及基因结构，了解潜在的生物合成机制，由于本研究涉及的植物没有合适的参考基因组，所以使用的是无参考转录组的分析策略^[91]，无参转录组测序数据分析中，主要分析内容是测序数据拼接（组装）、组装序列功能注释、Unigene 表达和差异分析，其次是转录本信息的挖掘，包括 SNP 分析、SSR 分析、CDS 预测等，鉴定出 $|\text{Log}_2(\text{FC})| \geq 1$ 、 p 值 < 0.05 、变量投影重要度（VIP） ≥ 1 的基因为差异表达基因（DEGs）。

4.2.8 代谢途径分析

在确定生物标志物后，在 KEGG 代谢通路找到对应的萜类合成通路，使用 NCBI_NR（<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz>）、SwissProt（https://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html）、GO（<http://geneontology.org>）、KEGG（<http://www.kegg.jp/kegg>）数据库检索与萜类合成相关途径当中每条代谢路径所含有的表达基因，并按照表达量以热图形式展示，在联川云在线平台（<https://www.omicstudio.cn/tool/24>）上生成代谢路径的热图（数据做 $\log_{10}$ 处理）以呈现出在芹菜的叶和茎当中，各基因表达量的区别，从而确定叶和茎当中有关萜类合成途径基因表达的强度。

4.2.9 萜烯合成酶的系统发育分析和序列对比分析

使用 PacBio Sequel 平台 (Novogene, 中国北京) 对芹菜 (*Apium graveolens* L.) 的叶组织进行全长转录组测序, 以获得高质量的完整转录本。随后, 通过 HMMER research 软件以转录组中的保守 TPS 结构域 (PF01397 和 PF03936) 为目标, 确定了 TPS 基因。

系统发生树是基于 JTT 矩阵模型的最大似然法 (Maximum Likelihood method) 计算的^[92]。图中显示了具有最高对数似然值 (-14360.28) 的树。分支节点上标注的数字表示相关类群在系统树中聚类的百分比。启发式搜索的初始树通过应用邻接法 (Neighbor-Join) 和 BioNJ 算法对基于 JTT 模型估计的成对距离矩阵自动生成, 并选择具有更高对数似然值的拓扑结构。发育树是按比例绘制的, 分支长度以每个位点的取代数来衡量。分析一共涉及 34 个氨基酸序列, 所有含有空白和缺失数据的位置都被剔除。最终数据集中有 277 个位点。系统发育分析和序列对比分析均在 MEGA 7^[93]中进行。使用 ESPript 3.0 (<https://espript.ibcp.fr/ESPrript/cgi-bin/ESPrript.cgi>) 进行序列比较分析。

4.2.10 萜类的定性和定量

将含有 MVA 途径的大肠杆菌菌株 BS1101 接种于含氯霉素 (35 $\mu\text{g/mL}$) 的 LB 培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 16 h 获得种子液。随后以 2% 的比例接种过夜培养的种子液至含有 10 mL M9-MOPS 液体培养基 (Cm, 35 mg/mL) 的 50 mL 摇瓶中。37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 培养 5 h, 使得 OD_{600} 达到 0.6~0.8, 加入适当浓度的 IPTG 诱导, 同时加入 20% (v/v) IPM 进行原位提取。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 220 rpm 下培养细胞以产生单萜烯, 发酵 72h 后采集样品。在扩大体系培养中, 将各组分按培养体积等比例放大。所有的发酵实验和 OD_{600} 值均为三次独立重复实验所得到的平均值作为最终数据。

GC-MS 定量: 发酵 72 小时后, 取 1.5 mL 上层有机相转移至 EP 管中, 在 12000 rpm 转速下离心 1 分钟, 收集上层清液。随后, 用含有一定浓度氧化石竹烯内标的乙酸乙酯稀释收集的上清液。最终将所得样品通过 0.22 μm 孔径尼龙膜完成过滤处理。样品采用气相色谱-质谱法进行分析: 入口温度设置为 250 $^{\circ}\text{C}$, 流速为 1 mL/min。烤箱温度最初设定在 50 $^{\circ}\text{C}$, 0.5 分钟, 在 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时升至 150 $^{\circ}\text{C}$, 然后在 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时升至 260 $^{\circ}\text{C}$, 色谱柱为 DB-5MS^[58]。气相色谱-质谱分析在 SCAN 模式下进行。通过将产物的保留时间和质谱图谱与经认证的参考

标准品进行比较分析，并对主产物进行定性鉴定和定量分析。副产物则通过与美国国家标准与技术研究院（NIST）质谱数据库进行质谱比对来初步鉴定。采用经认证的别罗勒烯作为标品，对别罗勒烯进行定量分析，产物浓度是根据标准品与内标的峰面积比值计算得到的校准曲线方法确定的，具体方法如下：通过对储备标准品别罗勒烯溶液进行梯度稀释，制备出不同浓度的别罗勒烯标准品（7771 mg/L、3108 mg/L、1243 mg/L、497.2 mg/L 和 198.9 mg/L）。在乙酸乙酯溶液中加入氧化石竹烯（母液浓度为 100 mg/mL）作为内标，浓度为 0.005%（v/v）。通过将峰面积比（标准品别罗勒烯与内标氧化石竹烯）与相应的标准品浓度进行线性回归，建立校准曲线，从而对样品进行定量分析。

4.2.11 发酵条件对生物转化的影响

为了研究不同的生长和诱导条件对大肠杆菌单萜生产能力的影​​响。选择诱导剂浓度（25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M、200 μ M）、葡萄糖浓度（1%、2%、3%、4%、5%、6%）等发酵因素优化菌株生产单萜的效率。发酵 72 h 结束后进行样品采集与分析。菌体 OD₆₀₀ 在 Mutiskan FC（Thermofisher, USA）酶标仪上测定，方法同 2.3.2。菌株形态使用扫描电子显微镜（S-4800，日本日立公司）进行成像，方法同 3.3.8。

4.3 结果分析

4.3.1 叶和茎当中的代谢产物分析

芹菜在室温下叶和茎形态如图 4-1 所示。为解析其茎与叶的关键代谢差异，研究采用主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA），结果显示不同部位样本呈现显著分离趋势，且全部数据点均位于 95%置信区间内。

通过火山图可直观表征茎叶组织间差异代谢物的表达模式。基于二级质谱鉴定，筛选标准设定为：不同离子模式下代谢物表达比值 ≥ 2 或 $\leq 1/2$ （ $P \leq 0.05$ ，VIP ≥ 1 ）。数据分析表明，芹菜茎组织相较于叶组织存在显著代谢差异，总代谢物有 746 个，一定程度上说明在叶和茎中某些差异代谢物可能参与了相似的代谢通路。在这些代谢物中，检测到了 19 个单萜类化合物、25 个倍半萜类化合物、14 个二萜类化合物、15 和三萜类化合物以及 5 个杂萜类化合物，这一发现充分证明芹菜作为萜类合酶来源植物具有重要的开发潜力。

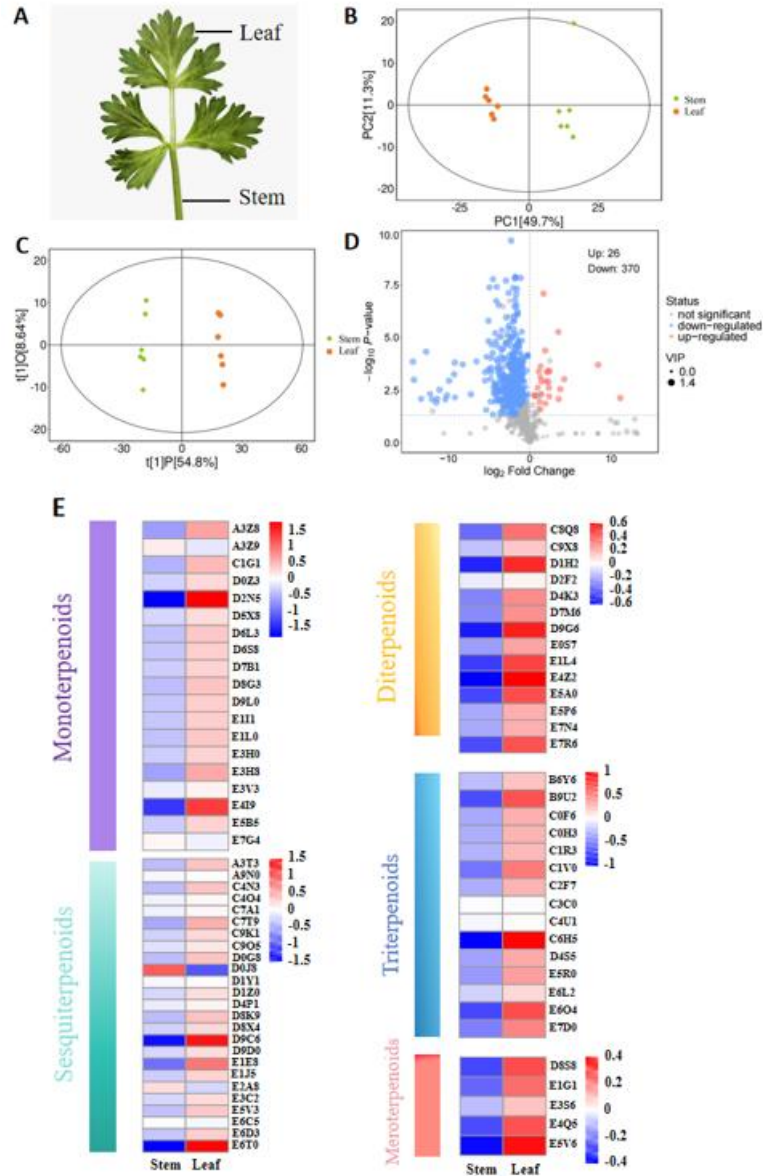


图 4-1 芹菜的代谢组学分析

室温下芹菜的叶和茎的形态(A); 芹菜中叶和茎的 PCA 分析(B); 芹菜中叶和茎的 OPLS-DA 分析 (C); 火山图分析 (D); 芹菜中萜类代谢物含量的热图 (E)。

Figure 4-1 Metabolomic analysis of celery

Morphology of leaves and stems of celery at room temperature (A); PCA analysis of leaves and stems in celery (B); OPLS-DA analysis of leaves and stems in celery (C); Volcano plot analysis (D); Terpene metabolite content in celery (E).

4.3.2 差异代谢物聚类分析

经候选生物筛选获得的差异代谢物通常表现出生物学功能的协同效应或代谢通路的关联调控特征, 这类代谢物可能受同一代谢途径的协同或拮抗作用调控,

在不同实验组间呈现趋同或拮抗的表达趋势。为揭示其调控规律,采用层次聚类法对具有相似表达模式的代谢物进行归类分析。具体操作中,针对每组实验比较样本,首先基于代谢物定量数据构建欧氏距离矩阵^[94](Euclidean distance matrix),随后运用完全连锁聚类法对差异代谢物进行系统聚类,并通过热图可视化呈现聚类结果。最终从显著上调与下调的差异代谢物中各筛选出表达量变化最显著的10个特征性代谢物进行重点分析。如图4-2所示,在本研究中,茎对叶子上调最显著的两种分别是 β -大马酮和芹菜镇静素,下调最显著的两种分别是莽草酸和苯丙烷糖苷。

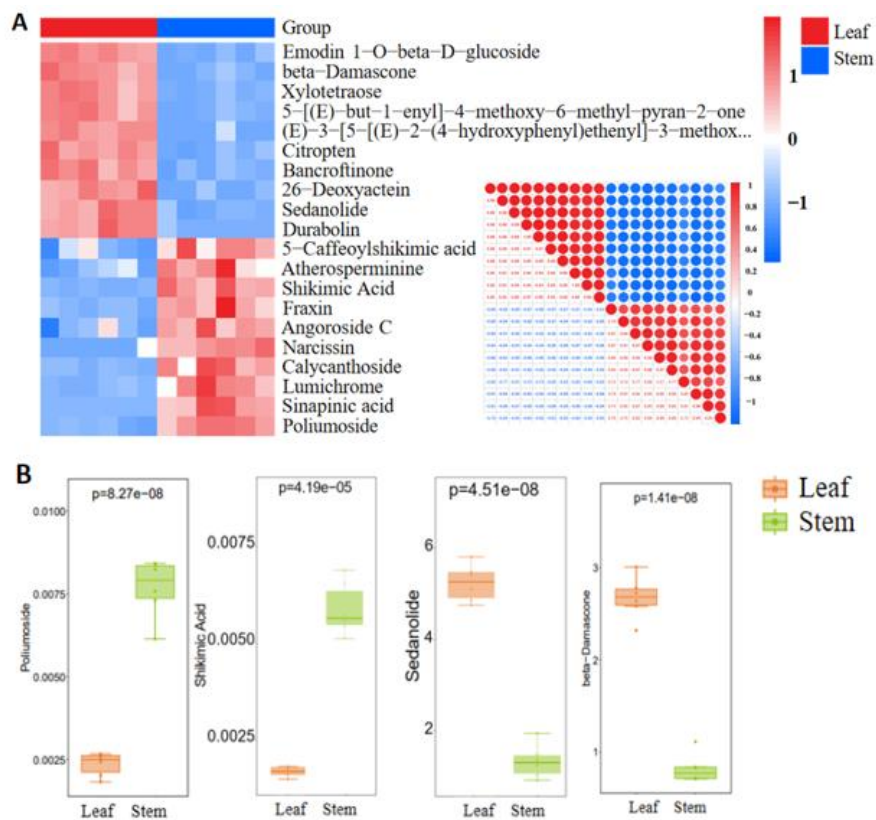


图 4-2 差异代谢物聚类分析

差异代谢物的层次聚类图与相关系分析 (A) 和差异代谢物 Box-plot 分析 (B)。

Figure 4-2 Cluster analysis of differential metabolites

Hierarchical clustering diagram with phase relationship analysis of differential metabolites (A)

and Box-plot analysis of differential metabolites (B).

4.3.3 代谢通路分析

代谢通路分析的结果以气泡图进行展示,以说明芹菜诱导的代谢物之间的关系。改变的代谢物对芹菜参与 22 条代谢途径,每个代谢通路对应一个特征气泡:

其横轴坐标及气泡面积共同表征拓扑分析中的作用强度，面积越大说明通路影响程度越高，而纵轴坐标与渐变色阶则反映富集分析的显著性水平，色度越深表明统计学意义越显著）。如图 4-3 所示，硫代谢和半乳糖代谢和甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢是受芹菜影响最大的三个途径。

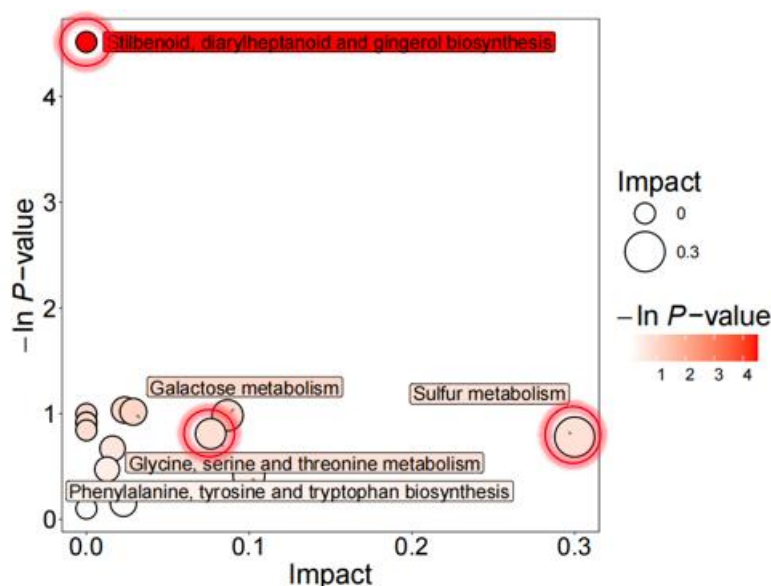


图 4-3 代谢通路分析图。

Figure 4-3 Metabolic pathway analysis diagram.

4.3.4 萜类生物合成相关的基因在芹菜不同位置的表达模式

为进一步探讨萜类化合物在芹菜叶和茎中积累的机制，研究分析了可能与萜类生物合成相关的基因表达模式。在本研究中，转录组共计检测到 83 个基因编码 MVA 途径、MEP 途径中涉及的酶，其中 51 个基因推测参与了萜类骨架生物合成，10 个参与单萜类产物的合成，5 个基因参与倍半萜类的生物合成，1 个参与二萜类的生物合成，3 个参与三萜类的生物合成。此外，7 个 CYP450s 被认为是修饰作用，6 个 SDRs 是认定为起到萜类合成关键转录因子作用。51 个参与萜类骨架合成的基因中大部分，如乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶（AAT），3-羟-3-甲戊二酸单酰辅酶 A 合酶（HMGs），3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶（HMGs）、磷酸戊糖激酶（PK）、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶（DXR），2-C-甲基-D-赤藓糖醇 2,4-环二磷酸合成酶（MDS），羟甲基丁烯基-4-磷酸合成酶（HDS），羟甲基丁烯基-4-磷酸还原酶（HDR），牻牛儿基焦磷酸合酶（GPPS）在叶子中高表达，说明萜类主要在芹菜的叶中合成，在催化单萜类合成的基因中注释到了罗勒烯合酶（TRINITY_DN16947_c0_g1）、萜品烯合酶（TRINITY_DN19028_c

0_g2、TRINITY_DN116275_c0_g1) 和柠檬烯合酶 (TRINITY_DN41165_c0_g1)。

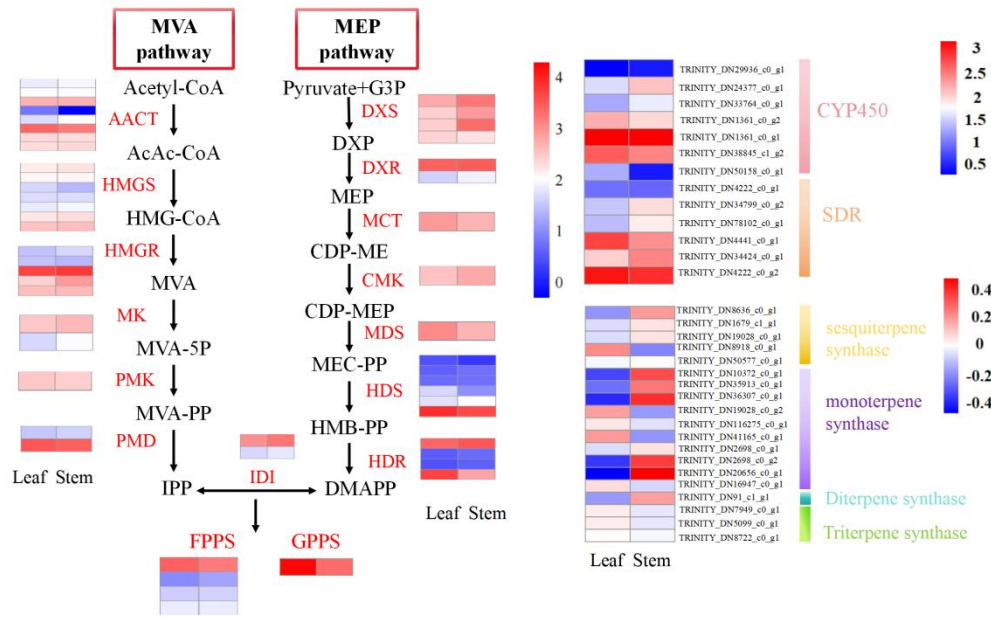


图 4-4 芹菜中的萜类的生物合成途径。

Figure 4-4 Biosynthetic pathways of terpenes in celery.

4.3.5 TFs 在植物中的表达模式

如图 4-5 所示, 在两种植物中共检测到 2662 个不同表达丰度的 TFs, 根据 PlantTFDB 数据库将其分为 20 个科。TFs 的 WRKY、bHLH、ERF、MYB 和 C2H2 家族表达的 TFs 数量最多, 分别有 382 个、185 个、169 个、168 个和 168 个成员。WRKY 家族, 广泛参与植物的生长发育和非生物胁迫应答过程^[95]。bHLH 家族在细胞生长、增殖和代谢、神经发生、肌生成以及昼夜节律等方面也起着重要作用。ERF 家族和 MYB 家族在植物的代谢、发育和抗逆性等方面起着关键作用^[96]。C2H2 锌指转录因子家族的作用相当于开关, 可以调控其下游靶基因表达^[97,98], 这一发现与本研究鉴定的萜类合酶在 MVA 通路中的定位结果相一致。此外, 这些高表达的家族转录因子可能在调控萜类生物合成过程中发挥重要作用。

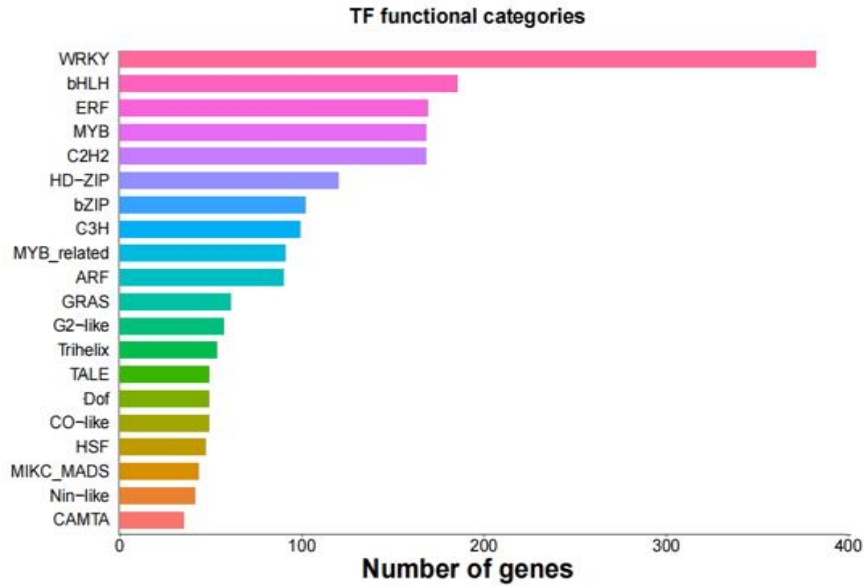


图 4-5 TF 家族的表达动态。

Figure 4-5 Expression dynamics of the TF family.

4.3.6 叶和茎当中差异表达基因和通路的转录组学分析

RNA-Seq 结果表明在叶和茎中表达的基因总数是不同的，筛选出来的差异表达 Unigene 如图 4-6 所示，不同颜色表示不同的 Unigene 表达水平， $p < 0.05$ 和 $\log_2\text{FoldChange} > 0.0$ 认为是 deg 基因。具体而言，与茎相比，在叶子中发现 5391 个基因显著上调，4058 个基因显著下调。火山图用红点显示了这些温度变化的程度。同时，针对 KEGG 富集分析结果的呈现方式，采用气泡图进行可视化表征：图中横轴以富集因子 Rich Factor 作为量化指标，该参数反映特定代谢通路中差异 Unigene 数目与该通路总 Unigene 数的比值，其数值与通路富集程度呈正相关；纵轴则对应具体的 KEGG 代谢通路分类。在气泡图中，各气泡的尺寸参数 S 由几何直径表征，其色度梯度与富集分析的显著性 P 值相关联，P 值越小代表统计学意义越显著。可视化结果选取 P 值最小的前 20 个代谢通路进行展示，通过整合参数 S 和 P 值的双维度信息，该图表可直观呈现不同 Unigene 在代谢通路中的表达差异特征。KEGG 分析结果显示，在 KEGG 通路中富集到了单萜生物合成途径，同时，光合作用途径和类胡萝卜素生物合成富集程度也很明显，因为类胡萝卜素可以在含有以 DMAPP 和 IPP 为前体的生物合成细胞中积累^[99]，而光合作用可以加快植物的新陈代谢和物质合成能力^[100]，这些途径可能在萜类的生物合成中发挥正向协同作用。

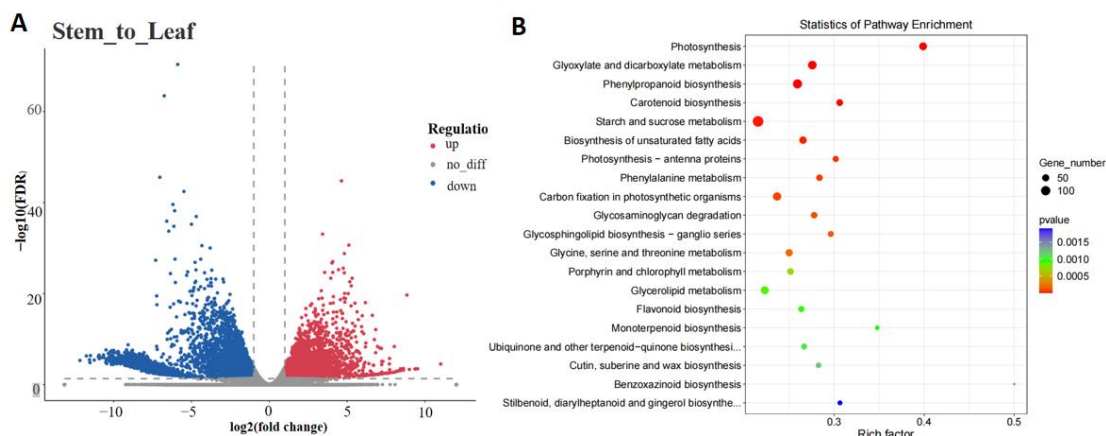


图 4-6 芹菜的转录组学分析

叶和茎差异表达基因（A）以及基因的 KEGG 富集分析（B）。

Figure 4-6 Transcriptomic analysis of celery

Leaf and stem differentially expressed genes (A) and KEGG enrichment analysis of genes (B).

4.3.7 系统发育分析和序列对比分析

通过生物信息学方法，在芹菜的三代转录组序列中，挖掘出了一个假定的萜烯合成酶（TPS）基因。通过将该基因与之前报道的 39 个芹菜中的 TPS 对比^[85]，确定它是一个之前未被发现的新型萜烯合酶，因此将其命名为 AgTPS40。为阐明其特征，对 AgTPS40 进行了系统进化分析。如图 4-7，系统发育树分析显示，AgTPS40 属于 TPS-b 亚家族。TPS-b 亚家族被认为是一个被子植物特有的家族，主要包含单萜合成酶^[101]。

序列比对分析表明（图 4-8），AgTPS40 具有保守的 RRx₈W 基序，这是 TPS-b 亚家族中单萜烯合成酶的标志，也是其催化功能的关键要素。此外，AgTPS40 还具有保守的 DDxxD 基序和 NSE/DTE 基序，它们对于二价金属离子的配位至关重要^[102,103]。鉴于这些结果，表明芹菜中的 AgTPS40 很可能是一种未被发现的单萜合成酶。图中数字代表单萜合酶：XBP65112.1，*E*- β -ocimene 合酶（*Zanthoxylum ailanthoides*）；QHU78619.1， β -ocimene 合酶（*Albizia julibrissin*）；ABY65110.1，*E*- β -ocimene synthase（*Phaseolus lunatus*）；KAJ7964209.1， β -ocimene synthase（*Quillaja saponaria*）；UTM72487.1， γ -terpinene synthase（*Nigella sativa*）。

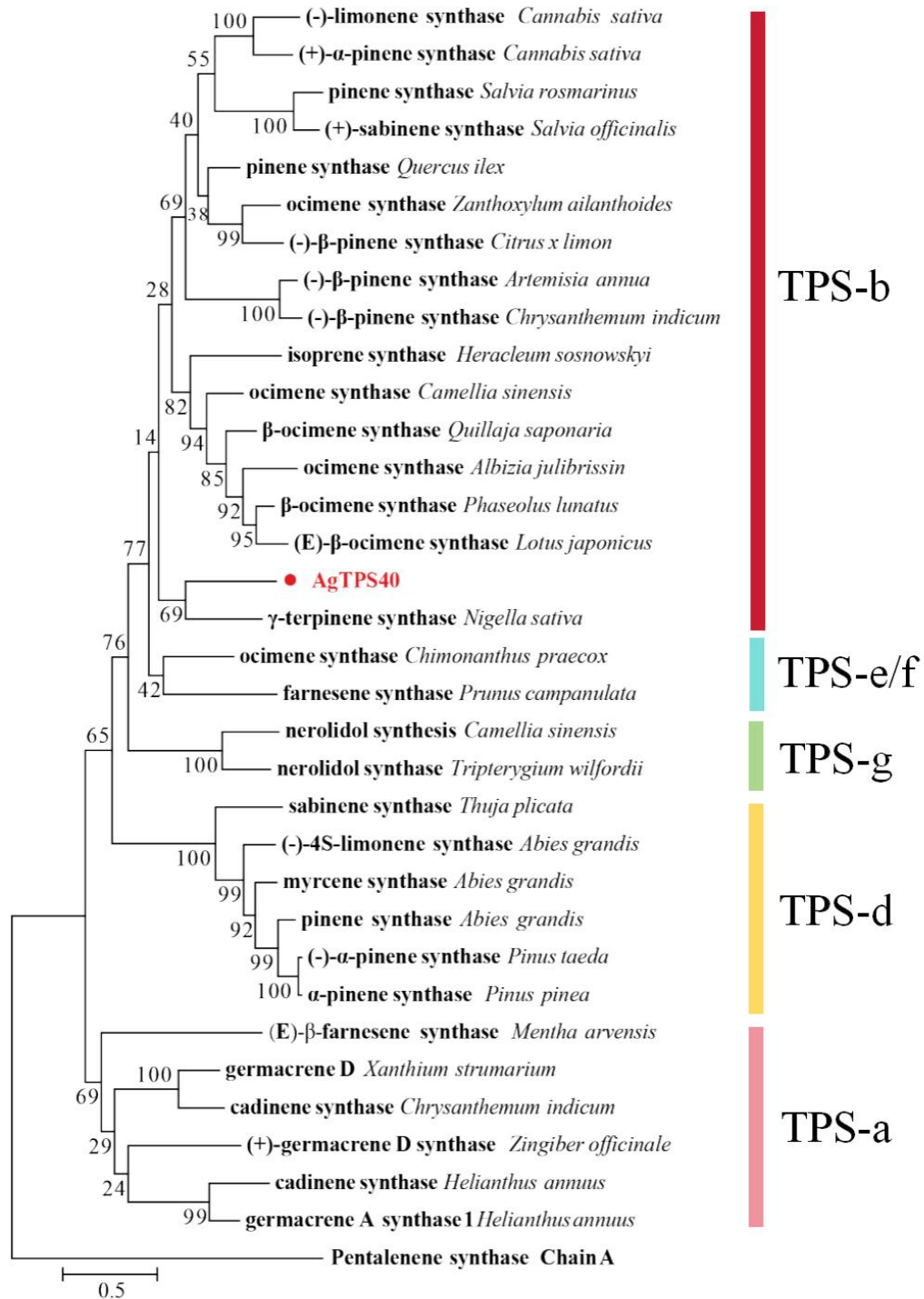


图 4-7 AgTPS40 与其他已知萜烯合成酶的系统进化分析。

Figure 4-7 Phylogenetic analysis of AgTPS40 with other known terpene synthases.

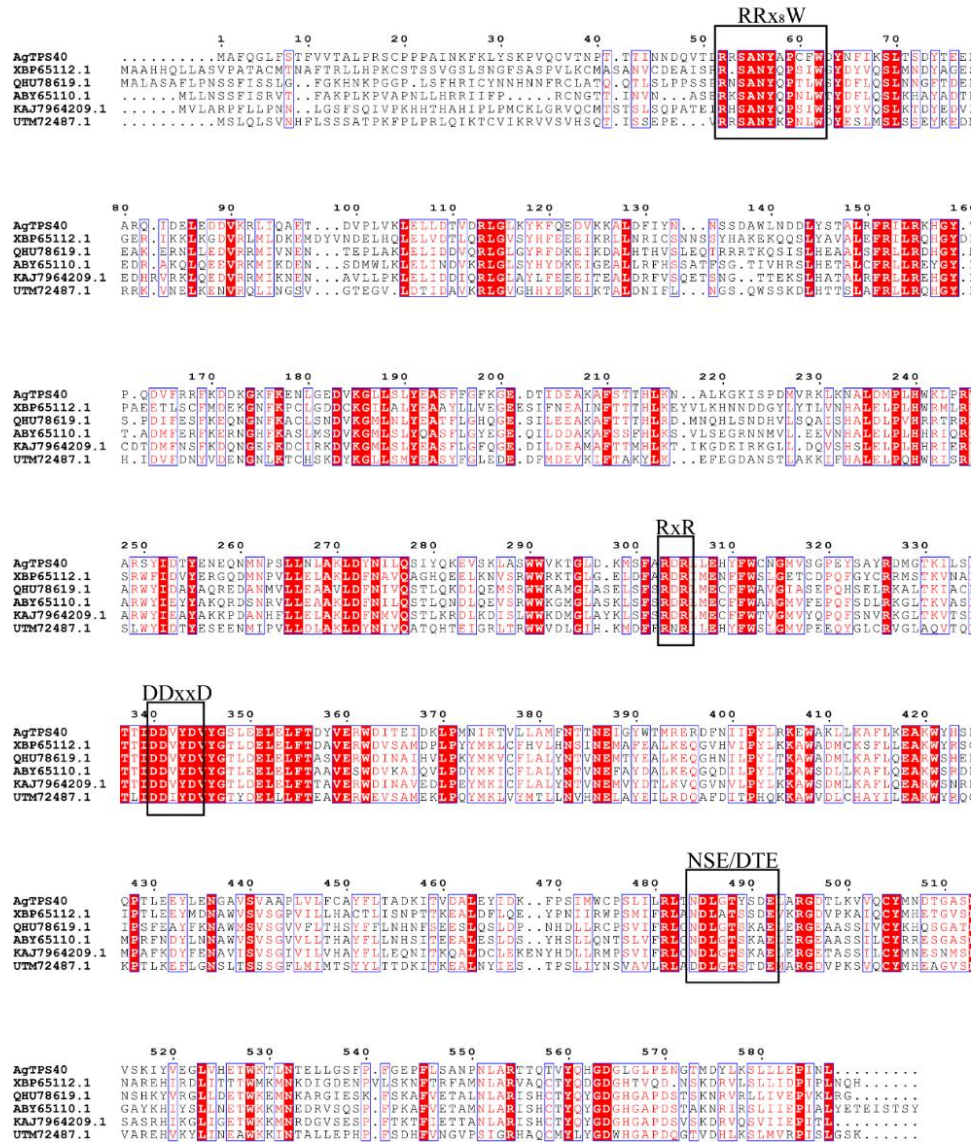


图 4-8 AgTPS40 的序列比对分析。

Figure 4-8 Sequence alignment analysis of AgTPS40.

4.3.8 萜烯合成酶体外功能分析

为了确定 AgTPS40 的功能, 通过将该基因连接到异源编码 MVA 途径的 pCC24 载体中, 并将其转化到大肠杆菌 BS1101 进行体外表达分析。如图 4-9 所示, 发酵 72 小时后产生的化合物经 GC-MS 分析, 通过比较其保留时间 (RT: 4.62 分钟) 和质谱数据 (母离子在 136 m/z; 主要子离子在 121 和 105 m/z), 这与别罗勒烯标准品的保留时间和质谱数据一致, 占产物总成分的 76.58%, 这证实了主要产物是别罗勒烯。除了别罗勒烯之外, 还通过将其他生产出的化合物的质谱与美国国家标准与技术研究院 (NIST) 数据库进行比较, 初步确定了这些化合物: RT=4.01 时产生 *Z*- β -ocimene (19.2%), RT=4.09 时产生 (*E*)- β -ocimene

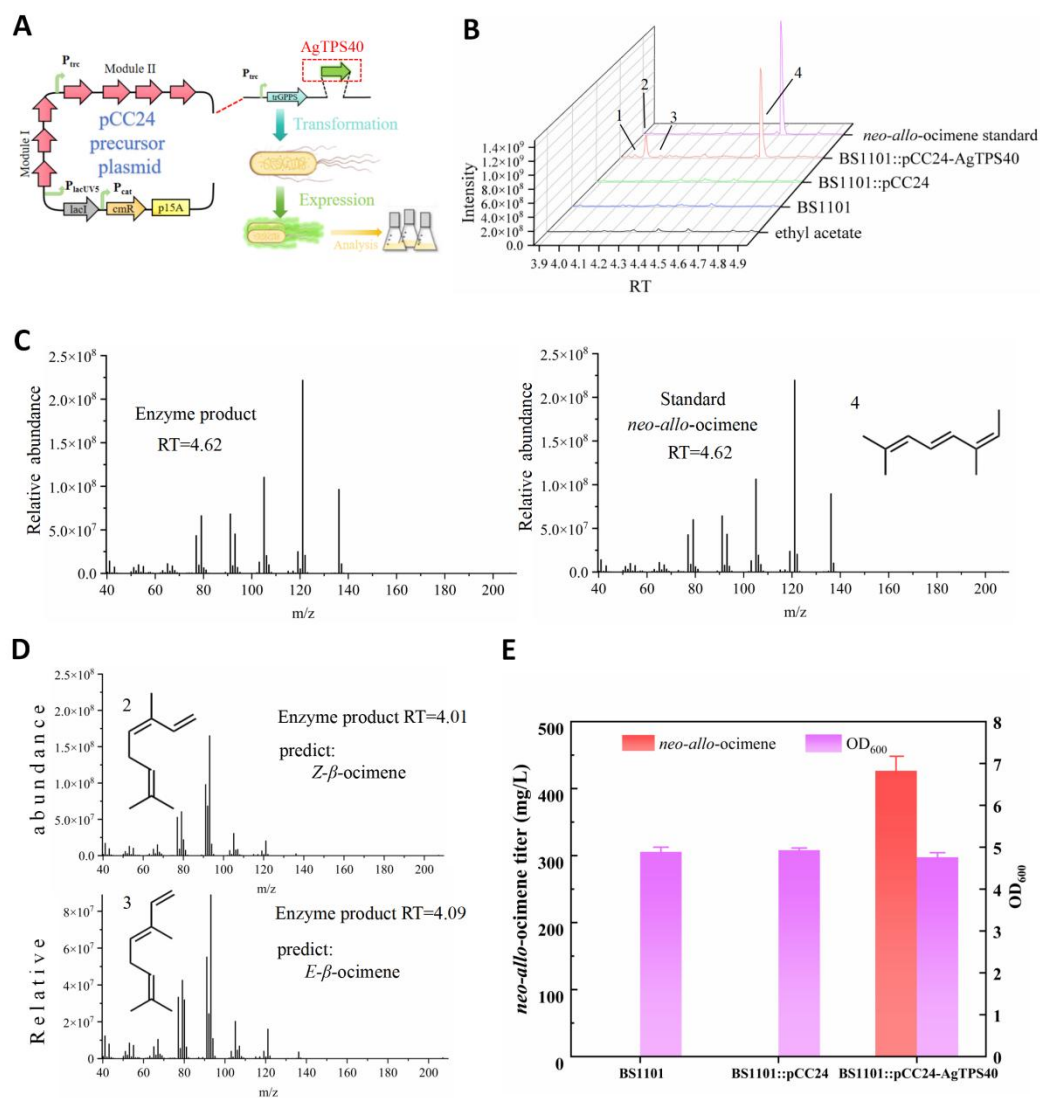


图 4-9 萜类产物的定性和定量

将筛选出的合酶整合至异源编码 MVA 途径的载体示意图 (A)；GC-MS 结果示意图 (B)；产物和标品的 GC-MS 色谱图 (C)；GC-MS 预测的产物质谱图 (D)；10mL 体系下别罗勒烯的产量图 (E)。

Figure 4-9 Characterization and quantification of terpene products

Integration of the screened synthase into a vector heterologously encoding the MVA pathway (A); GC-MS results (B); GC-MS chromatograms of the product and the standard product (C); Mass spectra of the product predicted by GC-MS (D); Titer of the *neo-allo-ocimene* in the 10 mL system (E).

(1.8%)，RT=3.95 时在数据库中没有匹配到合适的产物，因此其在本研究中被定义为未知产物 (2.42%)。对照实验结果显示，在相同培养条件下，不含任何

质粒和仅含 pCC24 质粒的大肠杆菌 BS1101 没有产生任何萜类化合物。这些结果表明, AgTPS40 具有催化别罗勒烯生产的功能。在 10 mL 摇瓶体系下, 经过 72 h 的发酵后, 别罗勒烯的产量达到了 426.70 mg/L, 此时细胞的 OD₆₀₀ 值为 4.76。

4.3.9 生产工艺的优化

在甲羟戊酸途径中, 葡萄糖是新陈代谢前体和能量的重要来源, 其主要通过糖酵解途径和磷酸戊糖途径产生^[104,105], 因此对葡萄糖的供给量进行了优化, 分别设置了 1%、2%、3%、4%、5%、6% 的葡萄糖浓度, 同时将发酵体系扩大到 1 L, 菌种接种比例和发酵时间不变, IPTG 初始终浓度为 50 μ M。结果如图 4-10 所示, 在葡萄糖浓度为 2% 的条件下, 发酵 72 小时后, 别罗勒烯的产量可达 933.35 mg/L, 这是目前报道的最高产量, 此时细胞 OD₆₀₀ 达到 7.95。在扫描电子显微镜下, 以葡萄糖添加浓度为 1% 和 2% 作为参考, 还可以看到在葡萄糖添加浓度为 2% 时, 细胞的形态更加圆大。

其次, 进一步优化 IPTG 诱导剂的浓度, 将 IPTG 的终浓度分别设置为 25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 和 200 μ M, 葡萄糖浓度设置为 2%。结果如图 4-10 所示, 在 200 μ M 条件下, 产量可达 249.93 mg/L, 远低于 IPTG 终浓度为 50 μ M 时的别罗勒烯产量, 表明本研究中 IPTG 的最佳终浓度为 50 μ M。

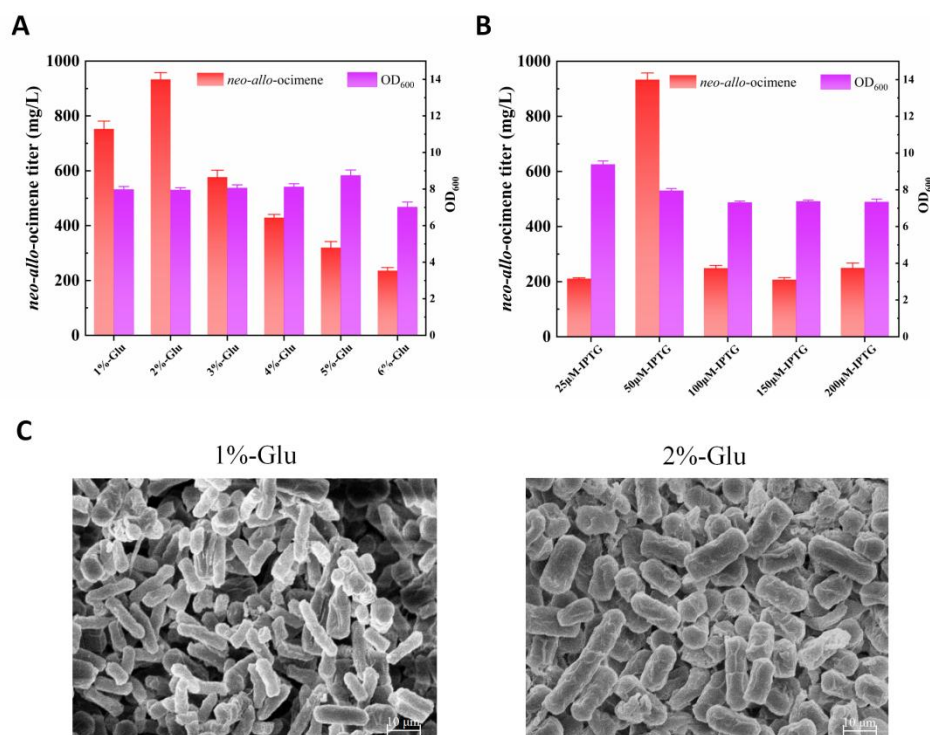


图 4-10 别罗勒烯生产工艺的优化

不同葡萄糖和诱导剂浓度对大肠杆菌 BS1101 发酵生产别罗勒烯的影响 (A) 和 (B) 以及扫描电镜下菌株的成像 (C)。

Figure 4-10 Optimization of *neo-allo-ocimene* production

Effect of different glucose and inducer concentrations on the production of *neo-allo-ocimene* by fermentation of *E.coli* BS1101 (A) and (B) and imaging of the strain under scanning electron microscopy (C).

4.4 本章小结

别罗勒烯是一种无环单萜化合物, 很早的研究就已经表明其存在于在芹菜中^[84], 因其具有独特的芳香特性而被广泛用作化妆品行业的香料, 同时它还具有多种生物活性。例如, 别罗勒烯能增强邻近植物对甘薯象鼻虫的防御能力^[106], 挥发性别罗勒烯能增强拟南芥对致病真菌 *Botrytis cinerea* 抗性^[33]的同时, 它还对四种蚊子的幼虫具有高毒性^[107]。这些特点表明, 别罗勒烯具有发展成为环境友好型杀虫剂的潜力。此外, 别罗勒烯还可用于合成生物基可持续聚合物^[108], 这进一步提高了其应用价值。传统上, 别罗勒烯主要通过化学合成法生产^[108]。这种方法虽然可以暂时满足市场需求, 但存在生产成本低、效率低、自然资源消耗过多以及潜在环境风险等问题。随着代谢工程和合成生物学的发展, 微生物异源生

物合成已成为单萜烯生产的一种有前途的替代方法。先前的研究提出了一种通过来源于 *Hedychium coronarium* 中的香叶醇脱水缩合生成别罗勒烯的假定途径^[17]，但由于这一假设缺乏直接证据，别罗勒烯的生物合成途径仍未完全确定。本研究通过对芹菜的转录组进行了挖掘，并成功鉴定了一种新型单萜烯合成酶基因 *AgTPS40*，它能催化别罗勒烯的直接合成。这表明植物中的别罗勒烯是由单萜烯合成酶直接催化合成的，而不是通过所提出的香叶醇途径合成，这一发现填补了目前研究对别罗勒烯生物合成的认识空白。

单萜合酶除了催化生成主要产物外，通常还会产生多种副产物。例如，来源于拟南芥的反式罗勒烯合成酶不仅合成反式罗勒烯，同时会合成少量的顺式罗勒烯和月桂烯^[109]。同样，在本研究中 *AgTPS40* 主要生产别罗勒烯，但也会产生三种副产品。其中两种副产品被鉴定为顺式罗勒烯和反式罗勒烯。根据质谱预测，第三种产物可能是顺式别罗勒烯[(4*E*, 6*E*)-*allo-ocimene*]，但由于其保留时间无法与已知标准品相匹配^[110]，无法对该产品做出明确推断。由于其产量低，无法采用其他鉴定方法，因此该产品仍无法鉴定。根据其质谱，只能将其初步归类为单萜烯类化合物。

天然宿主体内产物浓度或酶活性的低水平表达可能阻碍后续研究进展。此外，天然宿主中萜烯代谢物的背景也会影响功能预测的准确性^[111]。萜烯合成酶在不同宿主中的异源表达和转录组分析是提高鉴定效率的有效方法^[51,52]。通过在微生物底盘中应用代谢工程策略，可以确保有足够产量的萜类化合物用于鉴定分析^[112,113]。鉴于大肠杆菌在 STP 类化合物生物合成领域展现的显著应用潜力及其完善的研究基础，该菌株已成为萜烯异源合成的首选表达宿主^[40,51,61]。本研究选择大肠杆菌 BS1101 作为异源表达宿主，实现了别罗勒烯的高效生物合成，其产量达到 933.35 mg/L，这是首次报道利用微生物作为底盘生产别罗勒烯，并实现了迄今为止该化合物的最高产量。虽然该产品的纯度尚未达到单一成分的标准，产品功效也有待进一步优化，但这项作为这种独特化合物的可持续生产奠定了基础。通过构建以微生物为底盘的生物合成途径，大大降低了外部环境可能造成干扰的可能性，并在不对环境造成危害的情况下获得高产量的别罗勒烯。

结论与展望

β -月桂烯 (β -myrcene) 和别罗勒烯 (*allo-ocimene*) 在香料、燃料、材料和医学等领域具有广泛的应用前景。本研究以单萜烯的高效生物合成为研究目标, 通过对月桂烯合酶的定向进化以及别罗勒烯合酶的挖掘, 在大肠杆菌 BS1101 中使用异源 MVA 途径实现了单萜烯的高效生物合成。再通过优化培养温度, pH, 培养体系等一系列方法增加了单萜烯的合成产量。主要结论如下:

(1) 通过对不同菌株的耐受性进行测试, 发现大肠杆菌对月桂烯的耐受性最好, 在月桂烯抑制的情况下, 生物量仍能达到 90% 以上。将前期月桂烯合成途径导入 BL21(DE3) 后, 在 10 mL 的摇瓶体系下的产量为 161.526 mg/L。

(2) 通过月桂烯合酶定向进化策略, 在第二代筛选的 168 个克隆中, 编号为 108 的变体月桂烯产量较对照提升了 14.29%。在第二代筛选的 144 个克隆中, 编号为 106 的变体月桂烯产量较第一代进一步提升了 20.09%。最后对生产工艺进行优化, 月桂烯的最高产量达到了 1.103 g/L, 是迄今为止在摇瓶体系下的最高产量。

(3) 利用生物信息学及体外酶学技术, 从芹菜中首次挖掘并鉴定出别罗勒烯合酶基因 *AgTPS40*。其主产物为别罗勒烯 (76.58%), 副产物分别为顺式罗勒烯 (19.2%), 反式罗勒烯 (1.8%), 除此之外还有 2.42% 的不确定产物。

(4) 通过对生产工艺进行优化, 别罗勒烯的产量达到了 933.35 mg/L, 是迄今为止文献报道的别罗勒烯最高产量。

虽然本研究实现了大肠杆菌中月桂烯和别罗勒烯的生物合成, 并且达到了摇瓶体系下, 大肠杆菌中合成月桂烯和别罗勒烯的最高产量。但是进一步提高两者的产量, 实现单萜烯的工业化大规模生产, 仍有许多地方可以改进。1. 单体烯生物合成代谢途径的改造: 本文仅对月桂烯合酶和别罗勒烯合酶进行了定向进化与挖掘以提高两者的产量, 今后可以尝试对 MVA 途径其他基因进行过表达, 或者进一步增加前体 GPP 的供应从而提高单萜烯的产量; 2. 别罗勒烯合酶的进一步改造: 月桂烯和别罗勒烯均是开环单萜, 后续可以通过对月桂烯生物传感器进行改造, 用于别罗勒烯合酶的定向进化, 来进一步提高别罗勒烯的产量。甚至通过定向进化, 可以筛选出降低副产物的酶, 再对这个酶再进行定向进化, 从而可以提

高别罗勒烯的产量和纯度；3.整合型单萜烯合成菌株的构建：通过质粒表达目标产物通常存在稳定性较弱，容易产生质粒丢失的问题，不利于产量提升。通过整合合成途径，提高菌株的稳定性和产量。

参考文献

- [1] Couillaud J, Leydet L, Duquesne K, etc. The terpene mini-path, a new promising alternative for terpenoids bio-production[J]. Genes, 2021, 12(12): 1974-1974.
- [2] Zhang S, Han L, Ma H, etc. Investigation on synthesis and application performance of elastomers with biogenic myrcene[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2019, 58(28): 12845-12853.
- [3] Meadows A L, Hawkins K M, Tsegaye Y, etc. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production[J]. Nature, 2016, 537(7622): 694-697.
- [4] Schneider F, Samarin K, Zanella S, etc. Total synthesis of the complex taxane diterpene canataxpropellane[J]. Science, 2020, 367(6478): 676-681.
- [5] Xu Y, Chen Z, Jia L, etc. Advances in understanding of the biosynthetic pathway and regulatory mechanism of triterpenoid saponins in plants[J]. Scientia Sinica Vitae, 2021, 51(5): 525-555.
- [6] Tang W, Wang Y, Zhang J, etc. Biosynthetic pathway of carotenoids in rhodotorula and strategies for enhanced their production[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(4): 507-517.
- [7] Surendran S, Qassadi F, Surendran G, etc. Myrcene—what are the potential health benefits of this flavouring and aroma agent?[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 699666-699666.
- [8] Chen H, Yue Y, Yu R, etc. A *Hedychium coronarium* short chain alcohol dehydrogenase is a player in *allo*-ocimene biosynthesis[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 101(3): 297-313.
- [9] 陆占国,小林直,张亚丽.以 β -月桂烯为原料的新单萜衍生物合成及构造解析[J].化学与黏合,2005,(03):131-134.
- [10] Mamadalieva N Z, Abdullaeva N S, Rosenau T, etc. Composition of essential oils from four apiaceae and asteraceae species growing in uzbekistan[J]. Natural Product Research, 2018, 32(9): 1118-1122.
- [11] Chen H, Yue Y, Yu R, etc. A *Hedychium coronarium* short chain alcohol dehydrogenase is a player in *allo*-ocimene biosynthesis[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 101(3): 297-313.
- [12] Lin C H, Chao L K, Lin L Y, etc. Analysis of volatile compounds from different parts of *Houttuynia cordata* thunb.[J]. Molecules, 2022, 27(24): 8893-8893.
- [13] De Vos R C, Moco S, Lommen A, etc. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 778-791.
- [14] 王印国.常见单萜类化合物及其在植物中的分布[J].现代农业科技,2012,(16):185-186.
- [15] Lstrok B E ,Ukasik .Study on selectivity of β -myrcene hydrogenation in high-pressure carbon dioxide catalysed by noble metal catalysts[J].Green Chemistry,2009,11(11):1847-1856.
- [16] Zeng W, Jiang Y, Shan X, etc. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for synthesis of β -myrcene and (*E*)- β -ocimene[J]. 3 Biotech, 2023, 13(12): 384-384.
- [17] Chen H, Yue Y, Yu R, etc. A *Hedychium coronarium* short chain alcohol dehydrogenase is a player in *allo*-ocimene biosynthesis[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 101(3): 297-313.

- [18] Wenzel J O, Santos Correa L, Schmidt S, etc. Benign synthesis of terpene-based 1,4-p-menthane diamine[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 8055-8055.
- [19] 邹志平,刘六军,陈素文.Diels-Alder 反应在松节油半合成香料中的应用[J].林产化工通讯,2002,(03):35-38.
- [20] 吴华,戴建青,陈大嵩,等.几种抗氧化剂对单萜烯稳定性及其对松墨天牛诱捕效果的影响[J].应用昆虫学报,2021,58(04):894-899.
- [21] Chamorro E, Ruiz P, Quijano J, etc. Understanding the thermal [1s,5s] hydrogen shift isomerization of ocimene[J]. Journal of Molecular Modeling, 2014, 20(8): 2390-2390.
- [22] 俞承锴.月桂烯共聚物的阴离子合成、加氢与应用研究[D].北京化工大学,2021.
- [23] Behr A, Johnen L. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: A critical review[J]. ChemSusChem, 2009, 2(12): 1072-1095.
- [24] 蔡圻锐,于晓兰,刘家仁.香叶醇抗肿瘤活性及其他生物学作用的研究进展[J].实用肿瘤学杂志,2023,37(01):58-62.
- [25] 海维.月桂烯合成蒽二酚类化合物的研究[D].南京林业大学,2009.
- [26] Miguel Del Corral J M, Castro M A, Gordaliza M, etc. Synthesis and cytotoxicity of new aminoterpenylquinones[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13(3): 631-644.
- [27] Surendran S, Qassadi F, Surendran G, etc. Myrcene—what are the potential health benefits of this flavouring and aroma agent?[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 699666-699666.
- [28] Pincigher L, Valenti F, Bergamini C, etc. Myrcene: A natural compound showing anticancer activity in HeLa cells[J]. Molecules, 2023, 28(18): 6728-6728.
- [29] Hwang E, Ngo HTT, Park B, etc. Myrcene, an Aromatic Volatile Compound, Ameliorates Human Skin Extrinsic Aging via Regulation of MMPs Production[J].The American journal of Chinese medicine, 45(5), 1113–1124.
- [30] Lee J, Lee K, Lee H D, etc.Anti-invasive effect of β -myrcene, a component of the essential oil from *Pinus koraiensis* cones, in metastatic MDA-MB-231 human breast cancer cells[J].Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry,2015,58(4):563-569.
- [31] 刘成社,周群芳,张立良,等.安徽沿江稻区二化螟抗药性动态及治理对策[J].中国植保导刊,2011,31(04):43-45.
- [32] 中国农业科学院植物保护研究所. β -月桂烯作为二化螟雌虫驱避剂组分的用途及驱避剂:201810758967.4[P].2020-05-01.
- [33] Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, etc. Analysis of defensive responses activated by volatile *allo*-ocimene treatment in arabidopsis thaliana[J]. Phytochemistry, 2006, 67(14): 1520-1529.
- [34] Sarkar P, Bhowmick A K. Terpene based sustainable elastomer for low rolling resistance and improved wet grip application: Synthesis, characterization and properties of poly(styrene- co -myrcene)[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2016, 4(10): 5462-5474.
- [35] Zhang S, Han L, Ma H, etc. Investigation on synthesis and application performance of elastomers with biogenic myrcene[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2019, 58(28): 12845-12853.
- [36] Weems A C, Delle Chiaie K R, Yee R, etc. Selective reactivity of myrcene for vat photopolymerization 3D printing and postfabrication surface modification[J].

- Biomacromolecules, 2020, 21(1): 163-170.
- [37] Woodroffe J D, Lupton D V, Garrison M D, etc. Synthesis and fuel properties of high-energy density cyclopropanated monoterpenes[J]. Fuel Processing Technology, 2021, 222: 106952.
- [38] Sauret-Güeto S, Botella-Pavía P, Flores-Pérez Ú, etc. Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2006, 141(1): 75-84.
- [39] 祝光涛,国艳梅,王孝宣,等.番茄红素生物合成相关基因及其基因工程研究进展[J].中国蔬菜,2012,(14):1-8.
- [40] Chen C, Liu J, Yao G, etc. A novel, genetically encoded whole-cell biosensor for directed evolution of myrcene synthase in *Escherichia coli*[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 228: 115176-115176.
- [41] Huang A C, Hong Y J, Bond A D, etc. Diverged plant terpene synthases reroute the carbocation cyclization path towards the formation of unprecedented 6/11/5 and 6/6/7/5 sesterterpene scaffolds[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2018, 57(5): 1291-1295.
- [42] Mai J, Li W, Ledesma-Amaro R, etc. Engineering plant sesquiterpene synthesis into yeasts: A review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(33): 9498-9510.
- [43] Wang L, Rosenfeldt M, Koutsaviti A, etc. Systematic biotechnological production of isoprenoid analogs with bespoke carbon skeletons[J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 2098-2098.
- [44] Cao H, Luo H, Yuan H, etc. A neighboring aromatic-aromatic amino acid combination governs activity divergence between tomato phytoene synthases[J]. Plant Physiology, 2019, 180(4): 1988-2003.
- [45] Nisar N, Li L, Lu S, etc. Carotenoid metabolism in plants[J]. Molecular Plant, 2015, 8(1): 68-82.
- [46] Perez-Gil J, Behrendorff J, Douw A, etc. The methylerythritol phosphate pathway as an oxidative stress sense and response system[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 5303-5303.
- [47] Vranová E, Coman D, Gruissem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64(1): 665-700.
- [48] Yang J, Guo L. Biosynthesis of β -carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 160-160.
- [49] Partow S, Siewers V, Daviet L, etc. Reconstruction and evaluation of the synthetic bacterial MEP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52498.
- [50] Zheng H, Chen J, Li C, etc. Mechanism and kinetics of the pyrolysis of β -pinene to myrcene[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2016, 123: 99-106.
- [51] Huang Y, Ye Z, Wan X, etc. Systematic mining and evaluation of the sesquiterpene skeletons as high energy aviation fuel molecules[J]. Advanced Science, 2023, 10(23): 2300889-2300889.
- [52] Wei G, Xu Y, Xu M, etc. Identification of volatile compounds and terpene synthase (TPS) genes reveals ZcTPS02 involved in β -ocimene biosynthesis in *Zephyranthes candida*[J]. Genes, 2024, 15(2): 185-185.

- [53] Wang X, Wang J, Zhang X, etc. Efficient myrcene production using linalool dehydratase isomerase and rational biochemical process in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biotechnology, 2023, 371-372: 33-40.
- [54] De Vos R C, Moco S, Lommen A, etc. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 778-791.
- [55] Liu J, Lin M, Han P, etc. Biosynthesis progress of high-energy-density liquid fuels derived from terpenes[J]. Microorganisms, 2024, 12(4): 706-706.
- [56] Brennan T C R, Turner C D, Krömer J O, etc. Alleviating monoterpene toxicity using a two-phase extractive fermentation for the bioproduction of jet fuel mixtures in *saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(10): 2513-2522.
- [57] Kim E M, Eom J H, Um Y, etc. Microbial synthesis of myrcene by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(18): 4606-4612.
- [58] Sarria S, Wong B, Martín H G, etc. Microbial synthesis of pinene[J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(7): 466-475.
- [59] Alonso-Gutierrez J, Chan R, Batth T S, etc. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production[J]. Metabolic Engineering, 2013, 19: 33-41.
- [60] Francis D M, Page R. Strategies to optimize protein expression in *Escherichia coli*[J]. Current Protocols in Protein Science, 2010, Chapter 5(1): Unit 5.24.1-29.
- [61] Zhou L, Wang Q, Shen J, etc. Metabolic engineering of glycolysis in *Escherichia coli* for efficient production of patchoulol and τ -cadinol[J]. Bioresource Technology, 2024, 391: 130004-130004.
- [62] Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E J, etc. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. Science, 2010, 330(6000): 70-74.
- [63] Bao S H, Zhang D Y, Meng E. Improving biosynthetic production of pinene through plasmid recombination elimination and pathway optimization[J]. Plasmid, 2019, 105: 102431-102431.
- [64] Walls L E, Rios-Solis L. Sustainable production of microbial isoprenoid derived advanced biojet fuels using different generation feedstocks: A review[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 599560-599560.
- [65] Yang J, Nie Q, Ren M, etc. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of alpha-pinene[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6: 60-60.
- [66] Kang M K, Eom J H, Kim Y, etc. Biosynthesis of pinene from glucose using metabolically-engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(10): 2069-2077.
- [67] Alonso-Gutierrez J, Chan R, Batth T S, etc. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production[J]. Metabolic Engineering, 2013, 19: 33-41.
- [68] Willrodt C, David C, Cornelissen S, etc. Engineering the productivity of recombinant *Escherichia coli* for limonene formation from glycerol in minimal media[J]. Biotechnology Journal, 2014, 9(8): 1000-1012.
- [69] Zhang H, Liu Q, Cao Y, etc. Microbial production of sabinene—a new terpene-based precursor of advanced biofuel[J]. Microbial cell factories, 2014, 13(1): 20.

- [70] Woo H M, Murray G W, Batth T S, etc. Application of targeted proteomics and biological parts assembly in *E. coli* to optimize the biosynthesis of an anti-malarial drug precursor, amorpha-4,11-diene[J]. Chemical Engineering Science, 2013, 103: 21-28.
- [71] Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, etc. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. Nature, 2013, 496(7446): 528-532.
- [72] Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E J, etc. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. Science, 2010, 330(6000): 70-74.
- [73] Zeng R, Wang W, Chen M, etc. CRISPR-Cas12a-driven MXene-PEDOT:PSS piezoresistive wireless biosensor[J]. Nano Energy, 2021, 82: 105711-105711.
- [74] Zeng R, Gong H, Li Y, etc. CRISPR-Cas12a-derived photoelectrochemical biosensor for point-of-care diagnosis of nucleic acid[J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(20): 7442-7448.
- [75] Yu Z, Cai G, Liu X, etc. Pressure-based biosensor integrated with a flexible pressure sensor and an electrochromic device for visual detection[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(5): 2916-2925.
- [76] Soares-Castro P, Montenegro-Silva P, Heipieper H J, etc. Functional characterization of a 28-kilobase catabolic island from *Pseudomonas* sp. Strain M1 involved in biotransformation of β -myrcene and related plant-derived volatiles[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(9): e03112-16.
- [77] Zeng R, Wang W, Cai G, etc. Single-atom platinum nanocatalyst-improved catalytic efficiency with enzyme-DNA supermolecular architectures[J]. Nano Energy, 2020, 74: 10493-10493.
- [78] Nirantar S R. Directed evolution methods for enzyme engineering[J]. Molecules, 2021, 26(18): 5599-5599.
- [79] Zhang L, Xiao W H, Wang Y, etc. Chassis and key enzymes engineering for monoterpenes production[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(8): 1022-1031.
- [80] Boachon B, Burdloff Y, Ruan J X, etc. A promiscuous CYP706A3 reduces terpene volatile emission from arabidopsis flowers, affecting florivores and the floral microbiome[J]. The Plant Cell, 2019, 31(12): 2947-2972.
- [81] Falara V, Akhtar T A, Nguyen T T H, etc. The tomato terpene synthase gene Family1[J]. Plant Physiology, 2011, 157(2): 770-789.
- [82] Chen Z, Vining K J, Qi X, etc. Genome-wide analysis of terpene synthase gene family in *mentha longifolia* and catalytic activity analysis of a single terpene synthase[J]. Genes, 2021, 12(4): 518-518.
- [83] Cheng Q, Wang P, Li T, etc. Complete mitochondrial genome sequence and identification of a candidate gene responsible for cytoplasmic male sterility in celery (*Apium graveolens* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8584-8584.
- [84] Saleh M M, Zwaving J H, Malingré Th M, etc. The essential oil of *Apium graveolens* var. secalinum and its cercaricidal activity[J]. Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, 1985, 7(6): 277-279.
- [85] Li M, Li X, Zhou J, etc. Genome-wide identification and analysis of terpene synthase (TPS) genes in celery reveals their regulatory roles in terpenoid biosynthesis[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1010780.
- [86] Guijarro-Real C, Rodríguez-Burruezo A, Prohens J, etc. HS-SPME analysis of the

- volatiles profile of water celery (*Apium nodiflorum*), a wild vegetable with increasing culinary interest[J]. Food Research International, 2019, 121: 765-775.
- [87] Sawada Y, Akiyama K, Sakata A, etc. Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants[J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(1): 37-47.
- [88] Shi X, Wang S, Jasbi P, etc. Database-assisted globally optimized targeted mass spectrometry (dGOT-MS): Broad and reliable metabolomics analysis with enhanced identification[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(21): 13737-13745.
- [89] Abdelhafez O H, Othman E M, Fahim J R, etc. Metabolomics analysis and biological investigation of three malvaceae plants[J]. Phytochemical Analysis, 2020, 31(2): 204-214.
- [90] Worley B, Powers R. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability[J]. Current Metabolomics, 2016, 4(2): 97-103.
- [91] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, etc. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(7): 644-652.
- [92] Jones D T, Taylor W R, Thornton J M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences[J]. Bioinformatics, 1992, 8(3): 275-282.
- [93] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [94] Raivo Kolde. pheatmap: Pretty heatmaps[DS]. 2010: 1.0.12.
- [95] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, etc. WRKY transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 247-258.
- [96] Xing G, Li J, Li W, etc. AP2/ERF and R2R3-MYB family transcription factors: Potential associations between temperature stress and lipid metabolism in auxenochlorella protothecoides[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 22-22.
- [97] Cui H, Chen J, Liu M, etc. Genome-wide analysis of C2H2 zinc finger gene family and its response to cold and drought stress in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) moench][J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(10): 557-577.
- [98] Yang Z, Wei X, Min W, etc. A C2H2-type zinc finger protein ZAT12 of *Poncirus trifoliata* acts downstream of CBF1 to regulate cold tolerance.[J].The Plant journal : for cell and molecular biology,2023,117(5):1317-1329.
- [99] Misawa N. Pathway engineering for functional isoprenoids[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22(5): 627-633.
- [100] Nowicka B, Ciura J, Szymańska R, etc. Improving photosynthesis, plant productivity and abiotic stress tolerance – current trends and future perspectives[J]. Journal of Plant Physiology, 2018, 231: 415-433.
- [101] Chen F, Tholl D, Bohlmann J, etc. The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom[J]. The Plant Journal, 2011, 66(1): 212-229.
- [102] Christianson D W. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases[J]. Chemical Reviews, 2006, 106(8): 3412-3442.
- [103] Rudolf J D, Chang C Y. Terpene synthases in disguise: Enzymology, structure, and opportunities of non-canonical terpene synthases[J]. Natural Product Reports, 2020, 37(3):

- 425-463.
- [104] Li Y, Xian H, Xu Y, etc. Fine tuning the glycolytic flux ratio of EP-bifido pathway for mevalonate production by enhancing glucose-6-phosphate dehydrogenase (zwf) and CRISPRi suppressing 6-phosphofructose kinase (PfkA) in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 32-32.
 - [105] Zhang J, Yuan Y, Wang Z, etc. Metabolic engineering of *Halomonas bluephagenesis* for high-level mevalonate production from glucose and acetate mixture[J]. Metabolic Engineering, 2023, 79: 203-213.
 - [106] Xiao Y Y, Qian J J, Hou X L, etc. Diurnal emission of herbivore-induced (Z)-3-hexenyl acetate and *allo*-ocimene activates sweet potato defense responses to sweet potato weevils[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2023, 22(6): 1782-1796.
 - [107] Benelli G, Govindarajan M, Rajeswary M, etc. Larvicidal activity of *Blumea eriantha* essential oil and its components against six mosquito species, including zika virus vectors: The promising potential of (4*E*,6*Z*)-*allo*-ocimene, carvotanacetone and dodecyl acetate[J]. Parasitology Research, 2017, 116(4): 1175-1188.
 - [108] Sahu P, Sarkar P, Bhowmick A K. Synthesis and characterization of a terpene-based sustainable polymer: Poly-*allo*ocimene[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017, 5(9): 7659-7669.
 - [109] Fäldt J, Arimura G Ichiro, Gershenzon J, etc. Functional identification of AtTPS03 as (*E*)- β -ocimene synthase: A monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Planta, 2003, 216(5): 745-751.
 - [110] Sparkman O D. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy robert P. Adams[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005, 16(11): 1902-1903.
 - [111] Crutcher F K, Parich A, Schuhmacher R, etc. A putative terpene cyclase, *vir4*, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2013, 56: 67-77.
 - [112] Liu J, Chen C, Wan X, etc. Identification of the sesquiterpene synthase AcTPS1 and high production of (-)-germacrene D in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 89-89.
 - [113] Zhang G, Wang H, Zhang Z, etc. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for terpenoids production: Advances and perspectives[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2021, 42(4): 11-16.

附 录

月桂烯合酶 trCsMSM7 序列:

TTACTTCGGGATATTGATCGGGGTGATAATCAGGGTGCTGATCCGCTCTTTG
CTTAAACTATTTTGGCTGCCGTGGCCATCGCCGTTTTTCGTAAATGAATAATG
CGGTACGGGCCATGTTCTTGACACCTCAACAAAATTTTCGCTCAGGCAGC
TCTCGTCCTCGTCTTTCTTGTTTCATGTCCTTCCATGTCTCGCTGATCAGAAAT
TTAATATGTTACGGGCCTCGTCCTCGGTGGCGTTGTTGTCGTACATATAGC
ATTGTATGCTTTTAGGCACGTCGCCGCGGTTACGCTCATCACTACTTGTACC
TAAATCATTGGCCAGGCGGGTGATCAGGCAGGCCTGCTTGATGATGTTTCGG
ATAATGATGTTGCAGTTGCAGGCTCTTCAGGTCCTGCTTGGTAATCGGGTTG
GTAAAGCAGAAGTAGGCGTGCATCAGAATAACACTTGCGCCAATGCTCAGC
CAACCCAGTTCGGTATATTCTTCCAGGGTCGGCTGATAGCCGCTGTAGTACC
ATTTGGCTTCTTGACAGGTAGCACTTACACAGGTCCACCCAGCTCTTCTTCA
GGTACTCGATGTTAACGAAATTCTGTTCAACCAGCACGTCGAAGCCCATCT
CGTTGATGGTGTTATGCAGAACAAAGAACGGCATCTTCATGTAGTCCGGCA
GCTCATTAATCAGCTTAACATCCCAGCGTTCAACGGCACTGGTAAAAAGTT
CCAGCTCTTCCAGGGTGCCGTAAACGTCGTAGATGTCGTCGATGATGGTAA
TCAGAACAAATAAACGTGCATTGGTGCGGCGGAAGTAGCTGAACTCGCCC
TCAAACCTTAAGGCCACATCCCATAAAAATGCCTCCATTAAACGATCGCGG
GCGAAGTTCAGTTTACCGCCCAGTTTACAATCACGCCACCAACGGCTTAAA
TGTTGCAGGTCCTCCTGGTGGGTGCTCTGCACAATATTAAAGTCCAGTTTG
GCGAACTCGAACAGGGTGCTGTTTCATGTCCTGCTTTTTCTCGTATATTTTCGT
CAATAAACCAACGGGCTTCGCTGCGCGTAATACGCCAATGTAAAGGCAGTT
CGAAGGCGTGGTTGATCAGCAGCAGGTTGCTGTTGATGTTGTTGTCATTCA
GCAGCAGGATTTTCTTCTCCTCCTCGTTCTCGATCTTCTCCATGTACTTTTTC
AGACACTTGGTGCTAAAAATGCGGGCTTCCTCCAGGATGTTCTCGTGCTTC
ATGGCATAAAAACTGGCCTCGTACAGACACAGAACGCCCATGATATCATCA
CTCAGGCTGGTCTTGAATTTGCCGCGCTTGTCCTTGAATGCGTTGAAAATTT

CCTGCGGCACGGTGTAGCCGTGTTGACGTAATAAGCGGAACTCTAATGCGG
TGGCGTACAGGTGTTGTAGTTCGGGCTGGTGATGATGTTGTTGTTGATGTA
GTTGTCGTTGTACTTCTTCTTCAGGATGGTGTGATCTCGTTCTTGAAGTGA
TAGCTAATGCCAAGGCGTTGTAAGGTGTCAATCAGTTCAGCAGTGCCAGG
CTGTTAATCTCCATACGCAGCAGCATGCGCTTAACCTCCTTCTTCAGTTTATT
TAATTGGCCTGTATATGACTCGCCCTTGTAAGGTGCTCAGGCTCTGAATG
TAATCAAAGCTCCAAATCGGCGGCTCGTAATTTGCACTACGGCGCACAAATG
GTGCTGCTCGGGCTGCTATTGTAAACAACCAT

第一代进化编号为 108 的月桂烯合酶序列:

TTACTTCGGGATATTGATCGGGGTGATAATCAGGGTGCTGATCCGCTCTTTG
CTTAAACTATTTTGGCTGCCGTGGCCATCGCCGTTTTTCGTAAATGAATAATG
CGGTACGGGCCATGTTCTTGACACCTCAACAAAATTTTCGCTCAGGCAGC
TCTCGTCCTCGTCTTTCTTGTTTCATGTCCTTCCATGTCTCGCTGATCAGAAAT
TTAATATGTTACGGGCCTCGTCCTCGGTGGCGTTGTTGTCGTACATATAGC
ATTGTATGCTTTTAGGCACGTCGCCGCGGTTTCAGCTCATCACTACTTGTACC
TAAATCATTGGCCAGGCGGGTGATCAGGCAGGCCTGCTTGATGATGTTTCGG
ATAATGATGTTGCAGTTGCAGGCTCTTCAGGTCCTGCTTGGTAATTGGGTTG
GTAAAGCAGAAGTAGGCGTGCATCAGAATAACACTTGCGCCAATGCTCAGC
CAACCCAGTTCGGTATATTCTTCCAGGGTCGGCTGATAGCCGCTGTAGTACC
ATTTGGCTTCTTGCAGGTAGCACTTACACAGGTCCACCCAGCTCTTCTTCA
GGTACTCGATGTTAACGAAATTCTGTTCAACCAGCACGTCGAAGCCCATCT
CGTTGATGGTGTATACAGAACAAGAACGGCATCTTCATGTAGTCCGGCA
GCTCATTAAATCAGCTTAACATCCCAGCGTTCAACGGCACTGGTAAAAAGTT
CCAGCTCTTCCAGGGTGCCGTAAACGTCGTAGATGTCGTCGATGATGGTAA
TCAGAACAAATAAACGTGCATTGGTGCGGCGGAAGTAGCTGAACTCGCCC
TCAAACCTTAAGGCCACATCCCATAAAAATGCCTCCATTAAACGATCGCGG
GCGAAGTTCAGTTTACCGCCCAGTTTACAATCACGCCACCAACGGCTTAAA
TGTTGCAGGTCCTCCTGGTGGGTGCTCTGCACAATATTAAAGTCCAGTTTG
GCGAACTCGAACAGGGTGCTGTTTCATGTCCTGCTTTTTCTCGTATATTTCTG
CAATAAACCAACGGGCTTCGCTGCGCGTAATACGCCAATGTAAAGGCAGTT

CGAAGGCGTGGTTGATCAGCAGCAGGTTGCTGTTGATGTTGTTGTCATTCA
GCAGCAGGATTTTCTTCTCCTCCTCGTTCTCGATCTTCTCCATGTACTTTTTC
AGACACTTGGTGCTAAAAATGCGGGCTTCCTCCAGGATGTTCTCGTGCTTC
ATGGCATAAAAACTGGCCTCGTACAGACACAGAACGCCCATGATATCATCA
CTCAGGCTGGTCTTGAATTTGCCGCGCTTGTCCTTGAATGCGTTGAAAATTT
CCTGCGGCACGGTGTAGCCGTGTTGACGTAATAAGCGGAACTCTAATGCGG
TGCGGTACAGGTTGTTGTAGTTCGGGCTGGTGATGATGTTGTTGTTGATGTA
GTTGTCGTTGTACTTCTTCTTCAGGATGGTGTGATCTCGTTCTTGAAGTGA
TAGCTAATGCCAAGGCGTTGTAAGGTGTCAATCAGTTCCAGCAGTGCCAGG
CTGTTAATCTCCATACGCAGCAGCATGCGCTTAACCTCCTTCTTCAGTTTATT
TAATTGGCCTGTATATGACTCGCCCTTGTAAGGTGGTGCTCAGGCTCTGAATG
TAATCAAAGCTCCAAATCGGCGGCTCGTAATTTGCACTACGGCGCACAAATG
GTGCTGCTCGGGCTGCTATTGTTAACAACCAT

第二代进化编号为 106 的月桂烯合酶序列:

TTACTTCGGGATATTGATCGGGGTGATAATCAGGGTGCTGATCCGCTCTTTG
CTTAAACTATTTTGGCTGCCGTGGCCATCGCCGTTTTTCGTAAATGAATAATG
CGGTACGGGCCATGTTCTTGACACCTCAACAAAATTTTCGCTCAGGCAGC
TCTCGTCCTCGTCTTTCTTGTTTCATGTCCTTCATGTCTCGCTGATCAGAAAT
TTAATATGTTACGGGCCTCGTCCTCGGTGGCGTTGTTGTCGTACATATAGC
ATTGTATGCTTTTAGGCACGTCGCCGCGGTTGAGCTCATCACTACTTGTACC
TAAATCATTGGCCAGGCGGGTGATCAGGCAGGCCTGCTTGATGATGTTCCG
ATAATGATGTTGCAGTTGCAGGCTCTTCAGGTCCTGCTTGGTAATTGGGTTG
GTAAAGCAGAAGTAGGCGTGCATCAGAATAACACTTGCGCCAATGCTCAGC
CAACCCAGTTCGGTATATTCTTCCAGGGTCGGCTGATAGCCGCTGTAGTACC
ATTTGGCTTCTTGACAGGTAGCACTTACACAGGTCCACCCAGCTCTTCTTCA
GGTACTCGATGTTAACGAAATTCTGTTCAACCAGCACGTCGAAGCCCATCT
CGTTGATGGTGTATACAGAACAAAGAACGGCATCTTCATGTATTCCGGCA
GCTCATTAATCAGCTTAACATCCCAGCGTTCAACGGCACTGGTAAAAAGTT
CCAGCTCTTCCAGGGTGCCGTAAACGTCGTAGATGTCGTCGATGATGGTAA
TCAGAACAAATAAACGTGCATTGGTGCGGCGGAAGTAGCTGAACTCGCCC

TCAAACCTTAAGGCCACATCCCATAAAAATGCCTCCATTAAACGATCGCGG
GCGAAGTTCAGTTTACCGCCCAGTTTACAATCACGCCACCAACGGCTTAAA
TGTTGCAGGTCCTCCTGGTGGGTGCTCTGCACAATATTAAAGTCCAGTTTG
GCGAACTCGAACAGGGTGCTGTTTCATGTCCTGCTTTTTCTCGTATATTTCTG
CAATAAACCAACGGGGCTTCGCTGCGCGTAATACGCCAATGTAAAGGCAGTT
CGAAGGCGTGGTTGATCAGCAGCAGGTTGCTGTTGATGTTGTTGTCATTCA
GCAGCAGGATTTTCTTCTCCTCCTCGTTCTCGATCTTCTCCATGTACTTTTTC
AGACACTTGGTGCTAAAAATGCGGGCTTCCTCCAGGATGTTCTCGTGCTTC
ATGGCATAAAAACTGGCCTCGTACAGACACAGAACGCCCATGATATCATCA
CTCAGGCTGGTCTTGAATTTGCCGCGCTTGTCCTTGAATGCGTTGAAAATTT
CCTGCGGCACGGTGTAGCCGTGTTGACGTAATAAGCGGAACTCTAATGCGG
TGGCGTACAGGTTGTTGTAGTTCGGGCTGGTGATGATGTTGTTGTTGATGTA
GTTGTCGTTGTACTTCTTCTTCAGGATGGTGTGATCTCGTTCTTGAAGTGA
TAGCTAATGCCAAGGCGTTGTAAGGTGTCAATCAGTTCCAGCAGTGCCAGG
CTGTTAATCTCCATACGCAGCAGCATGCGCTTAACATCCTTCTTCAGTTTATT
TAATTGGCCTGTATATGACTCGCCCTTGTAAGGTGCTCAGGCTCTGAATG
TAATCAAAGCTCCAAATCGGCGGCTCGTAATTTGCACTACGGCGCACAAATG
GTGCTGCTCGGGCTGCTATTGTTAACAACCAT

The protein sequence of AgTPS40:

*MAFQGLFSTFVV*TALPRSCPPPAINKFKLYSKPVQCVTNPTTTINNDQVTLRRSA
NYAPCFWDYNFIKSLTSDYTEEKYARQIDELEDDVKRLIQAETDVPLVKLELL
DTVDRGLGLKYKFQEDVKKALDFIYNNSSDAWLNDLYSTALRFRILRKHGYT
VPQDVFRRFKDDKGGFKENLGEDVKGLLSLYEASFFGFKGEDTIDEAKAFSTT
HLKNALKGKISPDMVRKLKNALDMPLHWKLPRVEARSYIDTYENEQNMNPS
LLNLAKLDYNILQSIYQKEVSKLASWWVKTGLDKMSFARDRLLEHYFWCNG
MVSGPEYSAYRDMGTKILSLMTTIDDVYDVYGSLEELELFTDYVERWDITEID
KLPMNIRTVLLAMFNTTNEIGYWTMRERDFNIIPYLRKEWAKLLKAFLKEAK
WYHSRYQPTLEEYLENGAVSVAAPLVLFCAFLTADKITVDALEYIDKFPSIM
WCPSLILRLTNDLGTYSDELARGDTLKVVQCYMNDTGASEEVSKIYVEGLVH
ETWKTLNTELLGSFPFGEPFLSANPNLARTTQTVYQHGDGLGLPENGTM DYL

KSLLLEPINL

Italicized text indicates signal peptide sequences.

The DNA sequence of AgTPS40:

ATGGCATTTCAGGGTCTGTTTAGCACCTTTGTTGTTACCGCATTACCGCGTA
GTTGTCCTCCTCCGGCAATTAATAAATTCAAGCTGTACAGCAAACCGGTTC
AGTGTGTTACCAATCCGACCACCACCATTAAATAATGATCAGGTTACCCTGCG
TCGTAGCGCAAATTATGCACCGTGTTTCTGGGACTATAACTTCATTAAGAGC
CTGACCAGCGATTATACCGAAGAAAAATACGCCCCTCAGATTGATGAACTG
GAGGACGATGTTAAACGTCTGATTCAGGCAGAAACCGATGTTCCGCTGGTT
AAACTGGAAGTCTGGATACCGTTGATCGTCTGGGTCTGAAGTATAAATTC
CAGGAGGACGTAAAAAGGCACTGGACTTCATCTATAACAACAGCAGCGA
TGCATGGCTGAATGATGATCTGTATAGCACCGCATTACGTTTTTCGTATTCTGC
GCAAACATGGTTATACCGTTCCGCAGGATGTTTTTCGTCGCTTCAAAGACG
ATAAGGGCAAGTTTAAGGAGAATCTGGGCGAGGATGTTAAAGGTCTGCTG
AGCCTGTATGAAGCAAGCTTTTTTCGGCTTTAAAGGTGAAGACACCATCGAT
GAAGCAAAAGCATTTAGCACCAACCATCTGAAAAATGCACTGAAGGGCAA
AATTAGCCCGGATATGGTTCGTAAACTGAAAAACGCACTGGATATGCCGCT
GCATTGGAACTGCCGCGTGTTGAAGCACGTAGCTATATTGACACCTACGA
GAATGAACAGAACATGAATCCGAGCCTGCTGAATCTGGCAAAGCTGGACTA
TAATATCCTGCAGAGCATCTATCAGAAAGAAGTGAGCAAAGCTGGCAAGCTG
GTGGGTAAAACCGGTCTGGACAAAATGAGCTTTGCACGTGATCGTCTGCT
GGAACATTATTTTTGGTGCAACGGTATGGTTAGCGGTCCGGAATATAGCGCA
TATCGTGATATGGGTACCAAAATTCTGAGCCTGATGACCACCATGATGACG
TGTACGATGTTTATGGCAGCCTGGAAGAACTGGAAGTTCACCGATTATGT
TGAGCGTTGGGACATTACCGAAATTGACAAGCTGCCGATGAATATTCGTAC
CGTTCTGCTGGCAATGTTTAATACCACCAACGAGATTGGTTATTGGACCATG
CGTGAACGTGACTTTAACATTATCCCGTACCTGCGTAAAGAATGGGCAAAA
CTGCTGAAAGCATTTCTGAAAGAGGCAAAGTGGTACCATAGCCGTTATCAG
CCGACCCTGGAAGAATATCTGGAAAATGGTGCAGTTAGCGTTGCAGCACCG
CTGGTTCTGTTTTGTGCATATTTTCTGACCGCAGACAAGATTACCGTTGATG

CACTGGAATACATCGATAAGTTCCCGAGCATTATGTGGTGTCCGAGCCTGAT
TCTGCGTCTGACCAATGATCTGGGTACCTATAGCGATGAACTGGCACGTGG
TGATACCCTGAAAGTTGTCCAGTGCTACATGAATGATACCGGTGCAAGCGA
AGAAGTTAGCAAGATCTATGTTGAGGGCCTGGTTCATGAAACCTGGAAAAC
CCTGAATACCGAACTGCTGGGTAGCTTTCCGTTTGGTGAACCGTTTCTGAG
CGCAAATCCGAATCTGGCACGTACCACCCAGACCGTTTATCAGCATGGTGA
TGGTCTGGGTCTGCCGGAATGGTACCATGGACTATCTGAAAAGCCTGCT
GCTGGAACCGATTAATCTG

Codon optimized for *E.coli*.

Reference genes used in phylogenetic analysis.

Name	Accession NO.
myrcene synthase [<i>Abies grandis</i>]	AAB71084.1
(-)-4S-limonene synthase [<i>Abies grandis</i>]	AAB70907.1
(-)-limonene synthase [<i>Cannabis sativa</i>]	ABI21837.1
pinene synthase [<i>Abies grandis</i>]	AAB71085.1
pinene synthase [<i>Salvia rosmarinus</i>]	ABP01684.1
pinene synthase [<i>Quercus ilex</i>]	CAK55186.1
ocimene synthase [<i>Zanthoxylum ailanthoides</i>]	XBP65112.1
ocimene synthase [<i>Albizia julibrissin</i>]	QHU78619.1
ocimene synthase [<i>Chimonanthus praecox</i>]	WOE99139.1
ocimene synthase [<i>Camellia sinensis</i>]	QID05625.1
(-)- β -pinene synthase [<i>Artemisia annua</i>]	AAK58723.1
(-)- β -pinene synthase [<i>Chrysanthemum indicum</i>]	QQY00626.1
(-)- β -pinene synthase [<i>Citrus x limon</i>]	AAM53945.1
(-)- α -pinene synthase [<i>Pinus taeda</i>]	AAO61225.1
(+)- α -pinene synthase [<i>Cannabis sativa</i>]	ABI21838.1
α -pinene synthase [<i>Pinus pinea</i>]	ALD18902.1
β -ocimene synthase [<i>Phaseolus lunatus</i>]	ABY65110.1
β -ocimene synthase [<i>Quillaja saponaria</i>]	KAJ7964209.1

(E)- β -ocimene synthase [<i>Lotus japonicus</i>]	AAT86042.1
γ -terpinene synthase [<i>Nigella sativa</i>]	UTM72487.1
(+)-sabinene synthase [<i>Salvia officinalis</i>]	AAC26018.1
sabinene synthase [<i>Thuja plicata</i>]	AGO02736.1
nerolidol synthesis [<i>Camellia sinensis</i>]	ARQ20729.1
(E)- β -farnesene synthase [<i>Mentha arvensis</i>]	ADC92564.1
farnesene synthase [<i>Prunus campanulata</i>]	AIC76499.1
Chain A, pentalenene synthase	pdb 1PS1 A
nerolidol synthase [<i>Tripterygium wilfordii</i>]	AQA26342.1
germacrene D [<i>Xanthium strumarium</i>]	AMP42987.1
cadinene synthase [<i>Chrysanthemum indicum</i>]	WIM34771.1
cadinene synthase [<i>Helianthus annuus</i>]	ACA33926.1
(+)-germacrene D synthase [<i>Zingiber officinale</i>]	NP_001413672.1
germacrene A synthase 1 [<i>Helianthus annuus</i>]	NP_001385288.1

攻读硕士学位期间研究成果

Zheng Liu, Ting Gao, Shaoheng Bao, Penggang Han, Ge Yao, Tianyu Song, Longbao Zhu, Chang Chen and Hui Jiang. Microbial Synthesis of *Neo-Allo-Ocimene* by Celery-Derived *Neo-Allo-Ocimene* Synthase. *Fermentation*, 2025, 11(3):153-153.

致 谢

致谢是论文的终篇，但不是青春的终点。

行文至此，落笔为终。这一年，我二十四岁，一个距离十八岁和三十岁一样远的年纪，在我人生的黄金时代，我来到了求学生涯的最后一站，意味着我的硕士生涯落下帷幕。回望整个学生生涯，如烟火，满眼繁华，目之所及，皆是回忆。这段故事始于金秋，终于盛夏。一路披荆斩棘，风雨兼程，再回头，轻重已过万重山。纵有万般不舍，但仍心怀感激。

桃李不言，下自成蹊。感谢我的导师朱龙宝老师以及我的联培导师蒋辉老师和陈昶老师给予我很多科研上的指导。非常感谢朱老师对我的信任与支持，无论是科研还是社会生活方面都给予我许多指导、理解、鼓励与帮助；特别感谢蒋辉老师对我的无私支持与帮助；由衷地感谢陈昶老师对我的悉心指导，从使用移液枪到熟练操作几乎所有的大型仪器、从最开始对合成生物学的懵懂无知到具备发表 SCI 科研成果的能力，这一路走来，最离不开的就是陈老师的指导和鼓励；其次，特别感谢我的教练金庆红老师，您既是我的教练，也是我的师父，也是我们同学心中的好老师！最后，感谢这一路遇到的所有老师对我的指导与帮助，你们的指导让我收获颇多，承蒙教诲，心存感激！

春晖寸草，难以回报。感谢我的父母，是他们一直支持着我的求学之路，见证我的成长和努力，他们很平凡但却让我站在了他们的肩膀，见识了更广阔的世界。感谢我的家人们，是他们一直陪伴我、支持我、鼓励我，给了我勇往直前的力量。人海茫茫，感恩相遇。

山水一程，三生有幸。感谢我的师兄师姐以及同门师弟妹们，你们在生活和科研中都给予我很多帮助与支持，你们都很优秀，和你们在一起我很快乐，愿我们都能在自己坚持的道路上熠熠生辉，在更高更远处重逢！

道阻且长，行则将至。学无止境，砥砺前行。在未来，我将更加坚定目标，走更远的路，看更远的风景，见更亮的光，成为更好的人。

谨以此篇，献给我的二十四岁，我最热烈而真挚的青春。