

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-100

大肠杆菌合成生物基1,4-丁二醇的研究进展与发展趋势

王博文, 屈梦圆, 李华南, 程万里, 刘家书, 江正兵
(湖北大学生命科学学院, 湖北 武汉 430062)

摘要: 1,4-丁二醇 (1,4-BDO) 作为一种重要的化工原料, 广泛应用于医药、材料、纺织、军工等多个领域。随着全球各国环保政策日趋严格, 传统1,4-BDO合成中催化剂昂贵、能耗大等弊端日益凸显。以可再生资源木质纤维素生物质制备可发酵糖, 基于合成生物学策略开发低碳、经济、可持续的1,4-BDO生物合成途径显得愈发重要。然而, 木质纤维素水解液中多种可发酵糖共存的情况降低了碳源利用效率, 木质纤维素预处理后所产生的发酵抑制物同样影响微生物代谢活性。本文综述了以大肠杆菌为底盘细胞, 利用不同可发酵糖作为碳源合成1,4-BDO途径的构建思路, 总结了提高大肠杆菌耐受多种发酵抑制物的遗传工程策略, 探讨了通过构建分工协作、互利共生的多功能模块微生物体系以实现混合糖共利用、原位脱毒以及1,4-BDO高产的可能性。在此基础上, 通过计算机辅助1,4-BDO合成途径的挖掘与理性设计、开展基因组尺度代谢网络模型的模拟与优化、对1,4-BDO合成关键酶进行智能设计, 在未来将进一步改善1,4-BDO合成效率, 为稳定、高产1,4-BDO的大肠杆菌多细胞联合体的构建提供可行性见解与思路。

关键词: 大肠杆菌; 合成生物学; 木质纤维素水解液; 1,4-丁二醇; 细菌联合体; 原位脱毒发酵

中图分类号: TQ923; Q819 文献标志码: A

Research progress and development of the biosynthesis of 1,4-butanediol by *Escherichia coli*

WANG Bowen, QU Mengyuan, LI Hua'nan, CHENG Wanli, LIU Jiashu, JIANG Zhengbing

(School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China)

Abstract: As a key chemical raw material, 1,4-butanediol (1,4-BDO) is widely utilized in industries, including pharmaceuticals, materials, textiles, and the defense industry sector. With increasingly stringent environmental protection policies worldwide, the shortcomings of conventional 1,4-BDO synthesis, such as the use of costly catalysts and high energy consumption, have become more apparent. Lignocellulosic biomass that is abundant and renewable has great potential in the production of clean fuels and chemicals, but the preparation of fermentable sugars from lignocellulosic biomass is the key step in biorefinery. Based on synthetic biology approaches, the development of a low-carbon, cost-effective, and sustainable route for 1,4-BDO synthesis gains great interest. However, the coexistence of

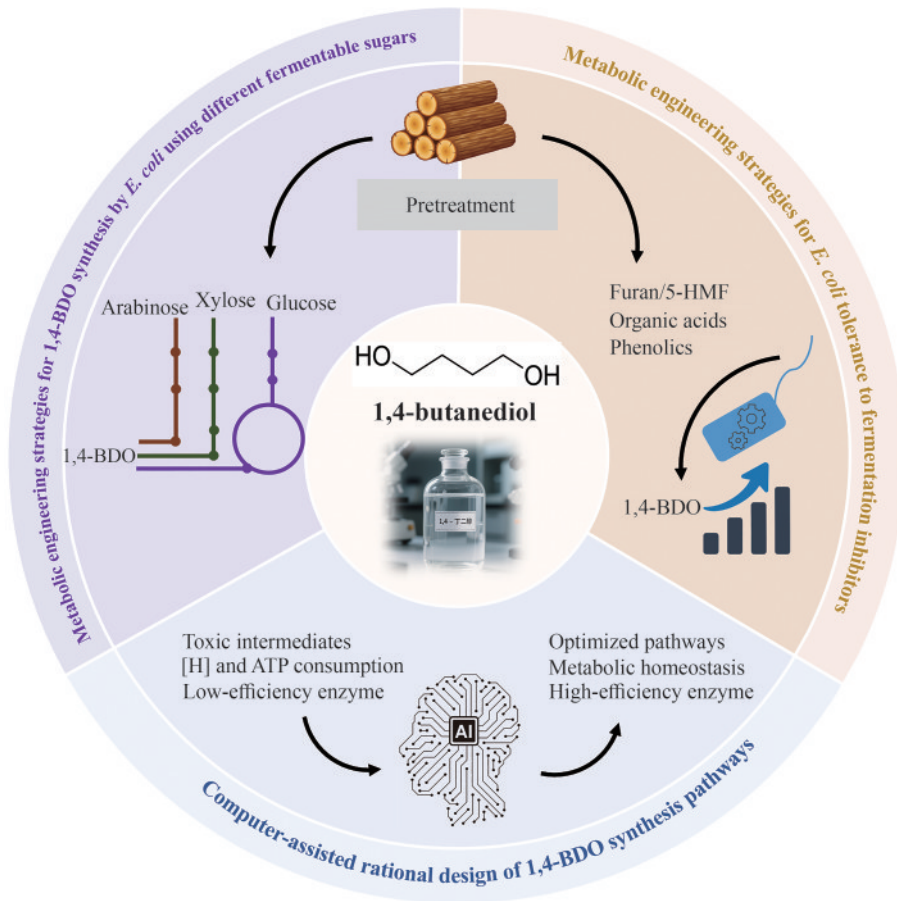
收稿日期: 2025-11-18 修回日期: 2026-01-16

基金项目: 国家重点研发计划 (2024YFA0919100)

引用本文: 王博文, 屈梦圆, 李华南, 程万里, 刘家书, 江正兵. 大肠杆菌合成生物基1,4-丁二醇的研究进展与发展趋势[J]. 合成生物学, 2026, 7(2): 357-374

Citation: WANG Bowen, QU Mengyuan, LI Hua'nan, CHENG Wanli, LIU Jiashu, JIANG Zhengbing. Research progress and development of the biosynthesis of 1,4-butanediol by *Escherichia coli*[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7(2): 357-374

multiple fermentable sugars in lignocellulosic hydrolysates compromises carbon source utilization efficiency. On the other hand, fermentation inhibitors that are generated during the pretreatment process can impair microbial metabolic activity as well, thereby lowering the fermentation efficiency. With *Escherichia coli* as the microbial chassis, this review outlines strategies for constructing 1,4-BDO biosynthesis pathways with different fermentable sugars as carbon sources. Moreover, this review also summarizes genetic engineering approaches to enhance the tolerance of *E. coli* to those fermentation inhibitors, including furfural, 5-hydroxymethylfurfural, organic acids, and phenolic substrates. We discuss the possibility of efficient co-utilization of mixed sugars, in situ detoxification, and enhancing the production yield of 1,4-BDO via the development of a multifunctional and modular microbial consortium through individual labor and mutualism. Furthermore, by employing computational tools to mine and rationally design 1,4-BDO synthesis pathways, conducting simulations and optimizations based on genome-scale metabolic network models, and applying intelligent design to key enzymes involved in 1,4-BDO biosynthesis, it is expected that 1,4-BDO synthesis efficiency can be further improved in the future. Overall, this review provides valuable insights and prospects for the construction of robust, high-yield *E. coli*-based microbial consortia for the production of 1,4-BDO.



Keywords: *Escherichia coli*; synthetic biology; lignocellulosic hydrolysate; 1,4-butanediol; bacterial consortia; *in-situ* detoxification and fermentation

1,4-丁二醇 (1,4-BDO) 是化工领域重要的精细化工原料之一^[1]。1,4-BDO 不仅可以作为聚丁

二酸丁二醇酯、聚对苯二甲酸丁二醇酯、四氢呋喃等多种化学品生产的前体^[2]，还可直接用作色

谱分析试剂、无毒抗冻剂、吸湿剂等，在医药、材料、纺织、军工等多个领域均有广泛的应用^[3]。1,4-BDO市场前景广阔，2025年全球总消费量市场规模已超过79亿美元，预计到2030年将突破147亿美元^[4]。目前，1,4-BDO的生产主要依赖于炔醛法、顺酐加氢法、丙烯醇法等传统工艺^[5-7]。尽管目前主流的1,4-BDO生产方法能够保证较高的产物得率，但随着全球各国环保政策的不断收紧，相关生产企业可能面临更加严格的碳排放限制^[8]，不利于社会经济可持续发展。在碳中和、碳达峰战略背景的影响下，生物基材料产业的快速发展已然成为趋势，生物基1,4-BDO的制备较石油基1,4-BDO更具绿色环保、节能减排等优势，高度契合社会经济低碳发展需求。近年来，随着合成生物学的迅猛发展，研究者们广泛利用大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 等多种底盘细胞进行平台化学品的生物合成并取得良好效果^[9-12]。其中，*E. coli* 遗传背景清晰、代谢途径较为明确、培养条件相对简单、易于基因编辑，是合成1,4-BDO的理想底盘细胞之一^[13-15]。

木质纤维素是地球上最丰富的有机资源之一，具有来源广泛、可再生性强的特点^[16]。基于木质纤维素来源的葡萄糖、木糖等可发酵糖制备生物基化学品是避免“与人争粮”的有效途径之一^[17]。为获得可发酵糖，往往需要对木质纤维素进行预处理^[18-20]。然而，水解液中混合糖分离较为困难，且*E. coli*细胞内存在碳代谢阻遏效应 (carbon catabolite repression, CCR)，导致*E. coli*对混合糖的利用效率较低^[21-23]；另外，预处理过程往往伴随糠醛、5-羟甲基糠醛、有机酸以及酚类化合物等发酵抑制物的产生，显著抑制*E. coli*的生长和代谢活性^[24-26]。因此，改善*E. coli*对可发酵混合糖的利用效率并增强其对发酵抑制物的耐受，是实现生物基1,4-BDO高效合成的关键前提。

本综述系统总结了近年来以*E. coli*为底盘细胞，采用代谢工程策略，利用可发酵糖合成1,4-BDO的研究进展。同时，围绕提高*E. coli*耐受发酵抑制物的目标阐述了代谢工程改造策略的研究进展。随后探讨了深入优化*E. coli*合成1,4-BDO

的现状以及需要面临的挑战。为进一步高效利用木质纤维素生物质合成生物基1,4-BDO提供了见解与思路。

1 大肠杆菌以不同可发酵糖合成1,4-BDO的代谢工程策略

1.1 葡萄糖为碳源合成1,4-BDO的代谢工程策略

由于 β -1,4-糖苷键线性连接葡萄糖形成的纤维素在木质纤维素中占比达40%~50%^[27]，这意味着葡萄糖是木质纤维素水解液中含量最大的可发酵糖^[28]。葡萄糖通过糖酵解等途径产生大量能量和中间代谢产物，为微生物细胞生长、繁殖以及各种生理活动提供必要的物质和能量支持^[29]。与其他碳源相比，*E. coli*利用葡萄糖的效率更高，当*E. coli*处于多种碳源共存的环境中时，优先选择葡萄糖作为主要碳源进行生长和代谢^[30]。因此，实现混合糖共发酵产1,4-BDO的前提是构建可行的以葡萄糖为底物的1,4-BDO合成途径。

作为一种非天然二元醇，目前尚未发现已知微生物具有天然合成1,4-BDO的能力。近年来，以*E. coli*为底盘细胞，通过不同的代谢工程策略成功构建了1,4-BDO生物合成途径。2011年，Yim等^[31]首次在*E. coli* K-12 MG1655中引入两条异源合成路径 [图1(a)]。第一条路径以琥珀酸酯为起点，通过内源琥珀酰辅酶A合成酶 (SucCD)、外源琥珀酸半醛脱氢酶 (SucD) 和4-羟基丁酸脱氢酶 (4Hbd) 催化生成4-羟基丁酸；第二条路径以 α -酮戊二酸为底物，利用外源2-氧葡萄糖酸脱羧酶 (SucA) 和4-羟基丁酸脱氢酶生成4-羟基丁酸，继而在外源4-羟基丁基辅酶A转移酶 (Cat2)、4-羟基丁基辅酶A还原酶及内源醇脱氢酶催化下合成1,4-BDO。代谢工程改造的*E. coli*以葡萄糖为底物，在2 L生物反应器中进行微氧补料分批发酵，5 d后1,4-BDO的滴度达到18 g/L。2014年，Hwang等^[32]对该1,4-BDO合成途径的最后两步进行了优化 [图1(b)]，通过丁醛脱氢酶 (Bld) 突变体 L273I 与 L273T 替代双功能醇脱氢酶 (AdhE)，并后续通过共表达CS4C模块 (组成型表达 *cat1*、*sucD*、*4hbd* 和 *cat2*)、Bld273T 和丁醇

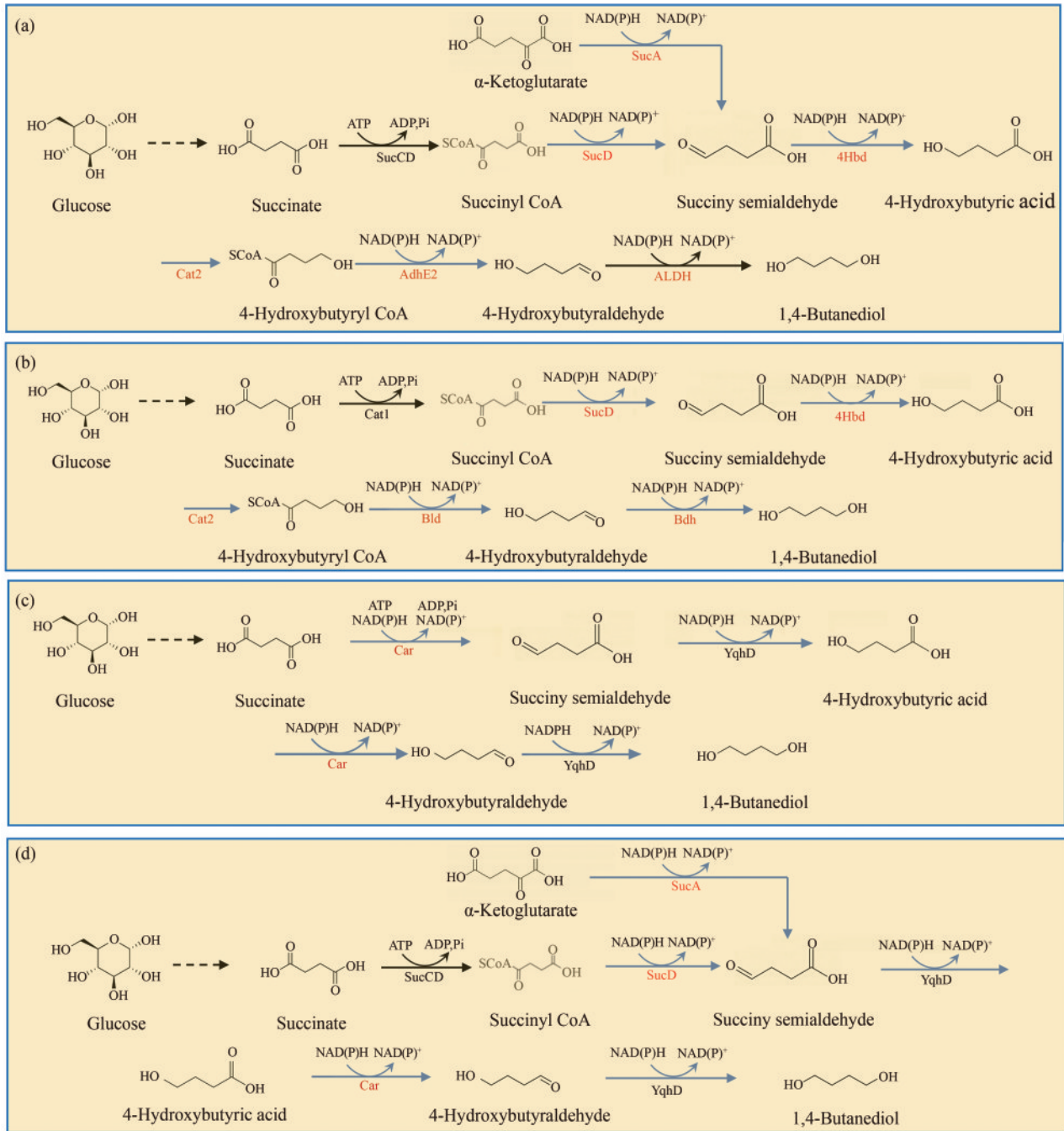


图1 大肠杆菌利用葡萄糖合成1,4-BDO的代谢途径

(黑色为内源酶，红色为外源酶。SucCD—*E. coli* 琥珀酰辅酶A合成酶；SucD—*Clostridium kluveri* 琥珀酸半醛脱氢酶；SucA—*Mycobacterium bovis* α-酮戊二酸脱羧酶；4Hbd—*Porphyromonas gingivalis* 4-羟基丁酸脱氢酶；Cat2—*P. gingivalis* 4-羟基丁基辅酶A转移酶；Cat1—*E. coli* 琥珀酸辅酶A转移酶；Bld—*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 丁醛脱氢酶；Bdh—*C. saccharoperbutylacetonicum* 丁醇脱氢酶；Car—*Mycobacterium marinum* 羧酸盐还原酶；YqhD—*E. coli* 乙醇脱氢酶)

Fig. 1 The metabolic pathway through which *E. coli* uses glucose to synthesize 1, 4-BDO

(Black represents endogenous enzymes and red represents exogenous enzymes. SucCD—*E. coli* succinyl-CoA synthetase; SucD—*Clostridium kluveri* CoA-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase; SucA—*Mycobacterium bovis* α-ketoglutarate decarboxylase; 4Hbd—*Porphyromonas gingivalis* 4-hydroxybutyrate dehydrogenase; Cat2—*P. gingivalis* 4-hydroxybutyryl-CoA transferase; Cat1—*E. coli* succinate CoA transferase; Bld—*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* butyraldehyde dehydrogenase; Bdh—*C. saccharoperbutylacetonicum* butanol dehydrogenase; Car—*Mycobacterium marinum* carboxylate reductase; YqhD—*E. coli* alcohol dehydrogenase)

脱氢酶 (Bdh), *E. coli* W023 工程菌生产 1,4-BDO 的滴度达到 (660±40) mg/L。2024 年, Ni 等^[33] 通过筛选出外源基因 *MmCar* (来自海洋分枝杆菌的羧酸还原酶) 和 *EcYqhD* (来自 *E. coli* 的乙醇脱氢酶) 构建双酶级联反应, 实现琥珀酸向 1,4-BDO 的转化 [图 1(c)], 并通过四酶级联反应、NADPH 和 ATP 循环系统的建立, 使 *E. coli* BL21 (DE3) 工程菌在摇瓶和 5 L 生物反应器中发酵 48 h 所得 1,4-BDO 滴度分别达到 201 mg/L 与 1555 mg/L。同年, 姜君逸等^[34] 通过过表达 *E. coli* K-12 MG1655 的乙醇脱氢酶 (YqhD), 同时引入外源的羧酸还原酶 (Car)、磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (Sfp)、 α -酮酸脱羧酶 (SucA), 构建出一条完整的以葡萄糖为底物合成 1,4-BDO 的途径 [图 1(d)], 并通过敲除乳酸脱氢酶 (LdhA)、丙酮酸甲酸裂解酶 (PflB) 基因阻断旁路代谢途径, 随后通过强化底盘细胞辅酶因子 NADPH 合成、优化 α -酮酸脱羧酶、羧酸还原酶和醇脱氢酶的比例为 1:3:2、增加关键限速酶 α -酮酸脱羧酶和羧酸还原酶的表达量, 可以显著提高转化率。最终实现在 48 h 的摇瓶发酵培养中 1,4-BDO 滴度达到 770 mg/L, 5 L 生物反应器发酵 60 h 后 1,4-BDO 滴度达到 4.22 g/L, 相较于最初导入 1,4-BDO 完整合成途径的工程化菌株, 终产量提高了 148.4%。尽管天然 *E. coli* 不具备合成 1,4-BDO 的代谢途径, 但已有研究表明, 通过内源基因修饰、表达元件优化以及外源功能基因过表达等策略, 可以在底盘细胞 *E. coli* 中成功实现 1,4-BDO 合成, 这为有效利用水解液中可发酵糖主要成分葡萄糖进行 1,4-BDO 合成奠定了基础。

1.2 木糖为碳源合成 1,4-BDO 的代谢工程策略

木糖是木质纤维素中仅次于葡萄糖的第二大可发酵糖^[35]。不同于酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 等不具有木糖代谢能力的微生物底盘细胞, *E. coli* 天然具备转运及代谢木糖的能力, 是利用木糖进行平台化学品合成的理想底盘细胞^[36]。为实现木质纤维素水解液可发酵糖的充分利用, 依据 *E. coli* 木糖分解代谢途径的特点重塑细胞代谢网络, 是实现混合糖发酵产 1,4-BDO 策略的重要组成。

据报道, 以 *E. coli* 为底盘细胞已成功构建得到利用木糖为碳源转化生产 1,4-BDO 的代谢工程菌株。2015 年, Liu 等^[37] 以 *E. coli* W3110 为底盘细胞进行代谢工程改造, 使木糖在内源酶木糖酸脱氢酶 (YihG、YagF)、醇脱氢酶 (Sadh、Adh), 以及外源的木糖脱氢酶 (Xdh)、2-脱氢-3-脱氧-D-木酸脱氢酶 (XylIX) 和酮酸脱氢酶 (MdiC) 的作用下成功转化为 1,4-BDO [图 2(a)], 重组菌株以 10 g/L 木糖为底物进行发酵, 48 h 时 1,4-BDO 的滴度达到 0.44 g/L。2016 年, Tai 等^[38] 在 *E. coli* BW25113 中建立上述类似反应途径 [图 2(b)]。通过对酶的筛选和改造, 提高了 α -酮酸脱羧酶 (KDC) 和醇脱氢酶 (ADH) 对底物的选择性, 使得前体物质向 1,4-BDO 的转化效率得到提升, 同时为了减少副产物 1,2,4-丁三醇的产生, 还对外源导入的 2-酮酸脱水酶 (KivD) 进行了定点突变, KivD V461I 对 2,5-二氧代戊酸的脱羧反应选择性进一步提高, 大大减少了副产物 1,2,4-丁三醇的积累, 使其在以 20 g/L 木糖为碳源的摇瓶培养条件下将 1,4-BDO 的滴度提高至 3.83 g/L。2017 年, Wang 等^[39] 在 *E. coli* BW25113 中构建了木糖转化合成 1,4-BDO 的途径 [图 2(c)], 即木糖依次在外源的木糖脱氢酶 (XylBC)、木酸盐脱水酶 (XylD)、 α -酮异戊酸脱羧酶 (KivD)、醇脱氢酶 (YqhD) 的催化下转化为 1,2,4-丁三醇, 并最终在改造的二醇脱水酶以及醇脱氢酶的催化下转化合成 1,4-BDO。为了促进 1,2,4-丁三醇向 1,4-BDO 的转化, 通过对二醇脱水酶进行了组合定点突变, 得到突变体 S301AQ336AV300M, 在减少该酶对底物抑制作用的同时, 增大了酶的催化口袋空间, 使其与天然二醇脱水酶相比酶活性提高近 5 倍, 最终实现了由木糖到 1,4-BDO 的从头合成, 滴度达到 209 mg/L。

针对 *E. coli* 中因 CCR 对木糖利用产生的抑制作用, 目前普遍采用解除 CCR 的改造策略主要围绕其核心调控机制展开, 具体可分为三类: 一是改造木糖转运与代谢相关元件, 过表达木糖转运蛋白以增强微生物对木糖的摄取能力, 同时强化木糖代谢关键酶的表达, 提升木糖在细胞内的代谢通量, 从而缓解葡萄糖的竞争抑制; 二是调控碳代谢阻遏关键因子, 通过基因敲除或定点突变

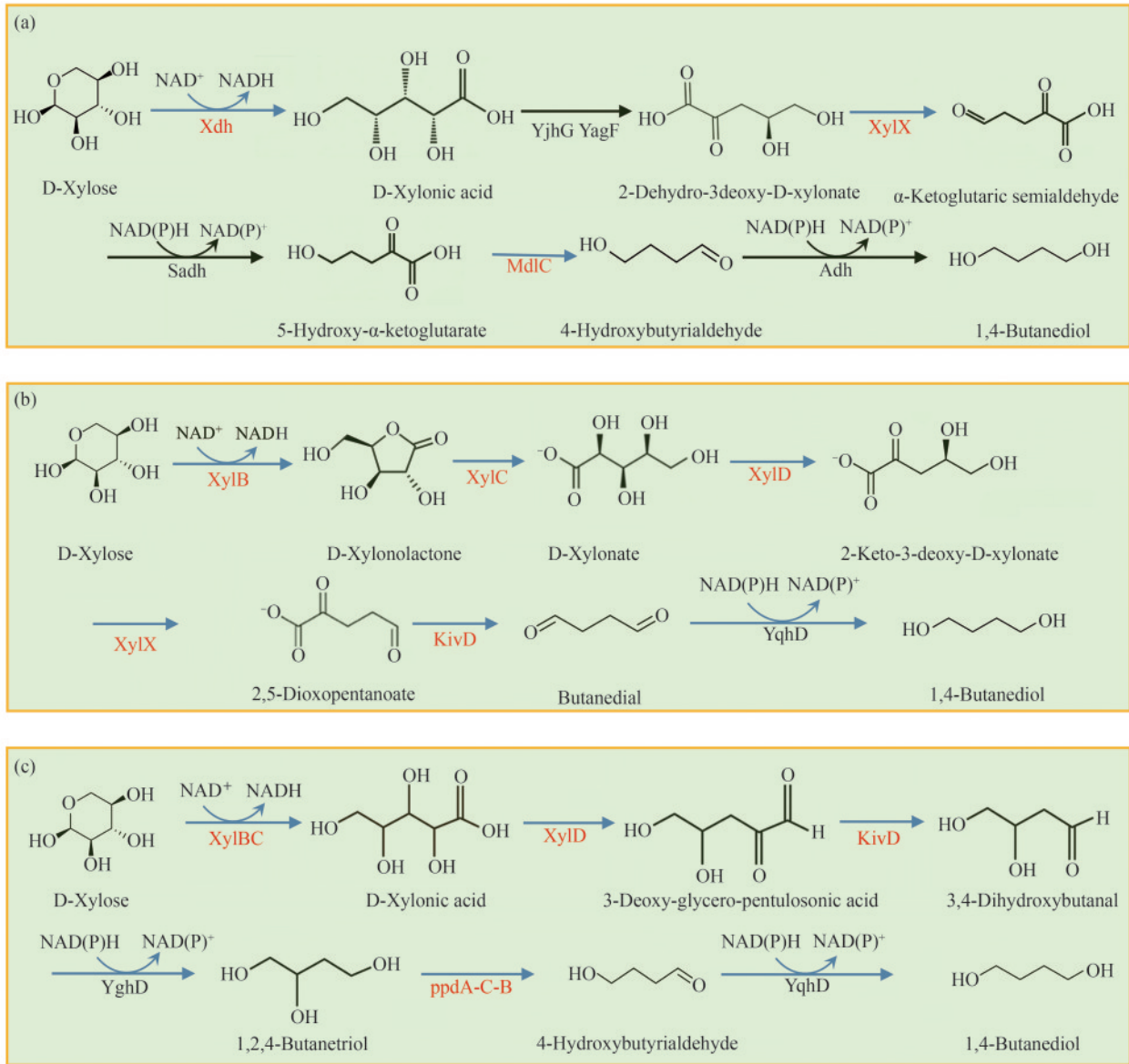


图2 大肠杆菌利用木糖合成1,4-BDO的代谢途径

(黑色为内源酶, 红色为外源酶。Xdh—*Caulobacter crescentus* 木糖脱氢酶; YjhG、YagF—*E. coli* 木糖酸脱氢酶; XylX—*C. crescentus* 2-脱氢-3-脱氧-D-木酸脱氢酶; Sadh—*E. coli* 醇脱氢酶; MdlC—*Pseudomonas putida* 酮酸脱氢酶; Adh—*E. coli* 醇脱氢酶; XylB、XylC—*C. crescentus* 木糖脱氢酶; XylD—*C. crescentus* 木酸盐脱水酶; KivD—*Lactococcus lactis* α -酮异戊酸脱羧酶; YqhD—*E. coli* 醇脱氢酶; ppdA-C-B—改造的二醇脱水酶)

Fig. 2 The metabolic pathway through which *E. coli* uses xylose to synthesize 1,4-BDO

(Black represents endogenous enzymes and red represents exogenous enzymes. Xdh—*Caulobacter crescentus* D-xylose dehydrogenase; YjhG and YagF—*E. coli* D-xylonic acid dehydratases; XylX—*C. crescentus* 2-dehydro-3-deoxy-D-xylonate dehydrogenase; Sadh—*E. coli* alcohol dehydrogenase; MdlC—*Pseudomonas putida* ketoacid dehydrogenase; Adh—*E. coli* alcohol dehydrogenase; XylB and XylC—*C. crescentus* D-xylose dehydrogenases; XylD—*C. crescentus* xylonate dehydratase; KivD—*Lactococcus lactis* α -ketoisovalerate decarboxylase; YqhD—*E. coli* alcohol dehydrogenase; ppdA-C-B—fusion diol dehydratase)

弱化碳分解代谢物阻遏蛋白 (Crp) 与 cAMP 的结合能力^[40], 或敲除磷酸转移酶系统 (PTS) 中参与葡萄糖转运与信号转导的关键基因 (如 *crr* 等)^[41], 阻断葡萄糖对木糖代谢途径的抑制信

号^[42]; 三是构建非 PTS 葡萄糖转运系统, 通过异源表达葡萄糖转运蛋白 (Glf) 与葡萄糖激酶 (Glc) 组成的非磷酸化葡萄糖转运途径, 替代天然 PTS 系统, 减少葡萄糖代谢引起的 cAMP 浓度下

降, 进而解除对木糖代谢相关基因的阻遏作用^[43]。上述策略均为突破CCR限制、实现葡萄糖与木糖混合糖共发酵并合成1,4-BDO提供了重要的技术支持。

1.3 其他碳源合成1,4-BDO的代谢工程策略

由于半纤维素是由五碳糖和六碳糖共同组成的多聚物^[44], 木质纤维素经预处理后, 水解液中除了占绝大多数可发酵糖的葡萄糖(40%~70%)和木糖(10%~40%)之外, 往往还存在少量的阿拉伯糖、甘露糖以及半乳糖等其他糖类^[45-46]。除了葡萄糖、木糖等典型的水解产物之外, 甜菜渣、柑橘皮等废弃物水解之后还存在一定比例的半乳糖醛酸(20.7%~26%), 半乳糖醛酸的存在对微生物发酵产生负面影响, 也可能导致水解液中可发酵糖的不充分利用^[47]。进一步构建以上碳源转化合成1,4-BDO的途径, 有利于消除水解液组分对发酵过程的抑制作用, 从而促进可发酵糖的利用最大化。

2016年, Tai等^[38]设计出一个基于细胞生长的选择平台, 并通过该平台成功鉴定出几个能在*E. coli* BW25113体内发挥作用的基因簇如*araCDABE*、*udh-garD-ycbC*等, 可以在不到6步内将L-阿拉伯糖和D-半乳糖醛酸非磷酸化代谢为

2-酮戊二酸, 从而进入TCA循环。例如, 将多噬伯克霍尔德里氏菌(*Burkholderia multivorans*)中的基因簇*araCDABE*导入至*E. coli*中可实现L-阿拉伯糖的非磷酸化代谢; 将来自*P. putida*的基因*udh*、*E. coli*的基因*garD*以及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的基因*ycbC*一起导入至*E. coli*中可实现D-半乳糖醛酸的非磷酸化代谢。为了证明该平台的普适性, 成功构建出利用L-阿拉伯糖、D-半乳糖生成1,4-BDO的工程化*E. coli* [图3(a)和(b)], 通过假设2,5-二氧代戊酸(DOP)可经2-酮酸脱羧酶(KDC)和醇脱氢酶(Adh)转化为1,4-BDO, 筛选出初始最佳酶组合*L. lactis*的Kiv和*E. coli*的YqhD, 并基于其晶体结构改造出Kiv V461I突变体, 将下游途径与非磷酸化同化途径相偶联, 最终得到的*E. coli*能够分别以L-阿拉伯糖和D-半乳糖醛酸为底物产生15.6 g/L和16.5 g/L的1,4-BDO。因此, 深入探究上述碳源转化合成1,4-BDO的生物合成途径, 有利于实现木质纤维素水解液全糖组分的高效利用。

表1汇总了不同工程化*E. coli*以木质纤维素水解液中不同糖组分为唯一碳源时, 1,4-BDO生物合成的相关参数和结果。结合上述相关代谢网络途径比较不难发现, 从木糖、阿拉伯糖等出发的合成路径与三羧酸循环偶联较少, 合成路径相对较短; 而从葡萄糖出发的合成路径与三羧酸循环

表1 工程化*E. coli*利用不同碳源生产1,4-BDO的情况汇总

Table 1 Summary of 1,4-BDO production by engineered *E. coli* using different carbon sources

Strain	Carbon source	Titer /(g/L)	Yield /(g/g)	Fermentation time/h	Fermentation method	Reactor scale/L	References
<i>E. coli</i> ECKh-422	Glucose	18.000	0.310	120	Bioreactor	1.000	[31]
<i>E. coli</i> W023	Glucose	0.660	0.033	48	Shake flask	—	[32]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) N20	Glucose	0.201	0.020	48	Shake flask	—	[33]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) N20	Glucose	1.555	0.150	48	Bioreactor	—	[33]
<i>E. coli</i> W3110(BDO-7)	Glucose	0.770	0.008	48	Shake flask	0.030	[34]
<i>E. coli</i> W3110(BDO-7)	Glucose	4.220	0.012	60	Bioreactor	2.000	[34]
<i>E. coli</i> EWCB3	Xylose	0.440	0.044	48	Shake flask	0.100	[37]
<i>E. coli</i> BDO03	Xylose	3.830	0.190	48	Shake flask	0.005	[38]
<i>E. coli</i> BDO03	Xylose	12.000	0.260	30	Bioreactor	0.500	[38]
<i>E. coli</i> JW177	Xylose	0.209	0.010	48	Shake flask	0.020	[39]
<i>E. coli</i> BDO05	Arabinose	5.650	0.280	48	Shake flask	0.005	[38]
<i>E. coli</i> BDO05	Arabinose	15.600	0.220	72	Bioreactor	0.500	[38]
<i>E. coli</i> BDO07	Galacturonic acid	2.340	0.120	48	Shake flask	0.005	[38]
<i>E. coli</i> BDO07	Galacturonic acid	16.500	0.330	90	Bioreactor	0.500	[38]

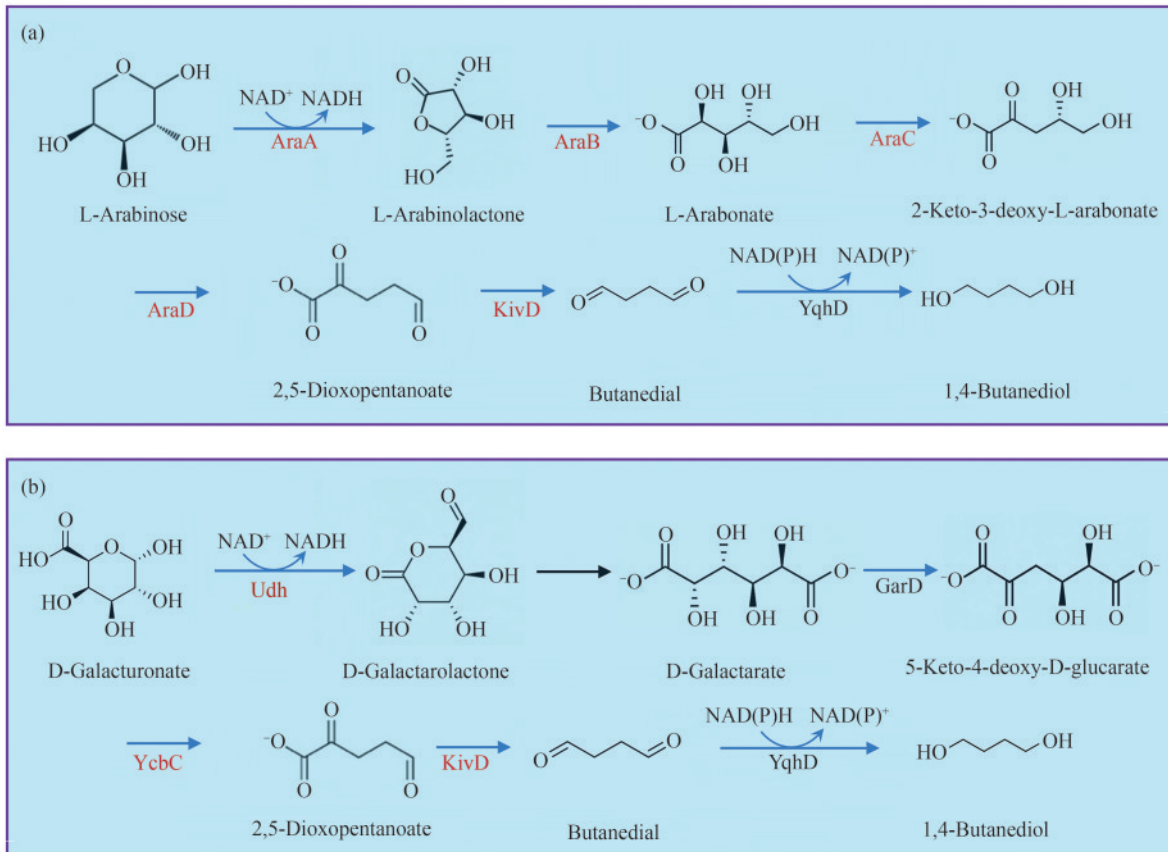


图3 大肠杆菌利用阿拉伯糖、半乳糖醛酸合成1,4-BDO的代谢途径

(黑色为内源酶, 红色为外源酶。AraA—*B. multivorans* L-阿拉伯糖脱氢酶; AraB—*B. multivorans* L-阿拉伯糖内酯酶; AraC—*B. multivorans* L-阿拉伯糖酸脱水酶; AraD—*B. multivorans* 2-酮-3-脱氧-L-阿拉伯糖酸脱水酶; KivD—*L. lactis* α -酮异戊酸脱羧酶; YqhD—*E. coli* 醇脱氢酶; Udh—*P. putida* 糖醛酸脱氢酶; GarD—*E. coli* 半乳糖酸脱水酶; YcbC—*B. subtilis* 5-酮-4-脱氧-D-葡糖二酸脱水酶)

Fig. 3 The metabolic pathway through which *E. coli* synthesizes 1,4-BDO from arabinose and galactose

(Black represents endogenous enzymes and red represents exogenous enzymes. AraA—*B. multivorans* L-arabinose dehydrogenase; AraB—*B. multivorans* L-arabinolactonase; AraC—*B. multivorans* L-arabinonate dehydratase; AraD—*B. multivorans* 2-keto-3-deoxy-L-arabinonate dehydratase; KivD—*L. lactis* α -ketoisovalerate decarboxylase; YqhD—*E. coli* alcohol dehydrogenase; Udh—*P. putida* uronate dehydrogenase; GarD—*E. coli* galactarate dehydratase; YcbC—*B. subtilis* 5-keto-4-deoxy-D-glucarate dehydratase)

高度关联, 合成1,4-BDO则需要更多反应步骤的参与, 这意味在设计不同可发酵糖合成1,4-BDO路径时, 还需要考虑1,4-BDO合成途径的增加对底盘细胞内碳代谢、能量供给以及还原力平衡的影响。尽管在碳源单一的培养体系中可以实现生物基1,4-BDO的有效合成, 但实际木质纤维素水解液中往往伴随预处理过程产生的一系列发酵抑制物^[26, 48], 在发酵前进行水解液脱毒会导致潜在成本的增加, 降低经济性; 正如上文所述, CCR作用也是*E. coli*在实际水解液中混合糖利用效率不充分的主要因素^[21], 导致1,4-BDO的实际得率较理论值仍有较大差距。

2 大肠杆菌耐受发酵抑制物的代谢工程策略

在预处理过程中, 半纤维素中戊聚糖经酸或高温水解生成的戊糖进一步脱水形成糠醛^[49]; 纤维素水解产生的己糖在酸热条件下脱水生成5-羟甲基糠醛^[50]; 半纤维素乙酰基脱乙酰化生成乙酸等有机酸^[51]; 糖类氧化分解可能产生甲酸^[52]; 木质素解聚释放各类酚类单体^[53]。预处理工艺释放的多种发酵抑制物对*E. coli*的生长和代谢表现出抑制作用^[54]。目前, 利用*E. coli*进行1,4-BDO生物合成的同时提升其发酵抑制物耐受性的研究鲜有

报道, 而提高该耐受性是维持菌株发酵过程中良好生理活性、缩短发酵周期、提升发酵效率的关键, 有助于实现木质纤维素水解液原位脱毒发酵合成1,4-BDO。

2.1 提高对于糠醛 (FF) 和 5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 耐受的策略

糠醛与5-羟甲基糠醛均具有细胞毒性, 可破坏 *E. coli* 细胞膜完整性导致胞内物质泄漏, 低浓度下干扰代谢途径、影响酶活性及基因表达, 高浓度则直接导致细胞死亡; 其中5-羟甲基糠醛由于羟甲基结构的存在, 其毒性较糠醛通常更强, 二者联合作用会加剧抑制效果^[55]。

2012年, Wang等^[56]以耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的外源全局调控因子 *irrE* 为研究对象, 通过易错PCR构建突变体文库并导入 *E. coli* DH5 α , 在高浓度糠醛0.075%~0.2% (体积分数) 压力下筛选获得F1-37、F2-1等突变体。这些突变体的生长在糠醛胁迫下较对照提升了4~16倍, 同时交叉耐受HMF、香草醛等常见抑制物, 显著缩短延滞期, 深入分析表明 *irrE* 突变体的引入可显著降低 *E. coli* 胞内活性氧水平。2019年, Jung等^[57]通过将来源于罗尔斯通氏菌 (*Ralstonia eutropha*) H16中合成聚羟基丁酸酯 (PHB) 的基因 *bktB* (编码 β -酮硫解酶)、*phaB* (编码乙酰乙酰辅酶A还原酶) 和 *phaC* (编码PHB聚合酶) 外源导入至 *E. coli* KSYH (DE3), 来改善其对发酵抑制物糠醛的耐受性。结果发现, 该策略不仅提高了工程菌对糠醛的耐受能力, 还促进了PHB的产生。2020年, Wang等^[58]通过构建含有突变型HMF氧化酶 (HMFO) 基因的重组 *E. coli* HMFOMUT, 重组菌株可耐受150 mmol/L的5-羟甲基糠醛和50 mmol/L的糠醛, 在30 °C、pH 7.0的条件下可将高底物浓度的糠醛和5-羟甲基糠醛高效转化为呋喃基羧酸。本团队前期基于短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) ZB1漆酶和盘长孢状刺盘孢 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 醇氧化酶^[59]、盘长孢状刺盘孢 (*C. gloeosporioides*) 醇氧化酶和伯克霍尔德菌 (*Burkholderia* sp.) 脂肪酶等构建了多条体外多酶级联催化体系^[60], 成功实现5-羟甲基糠醛酶催化转化合成呋喃二甲酸, 为发酵

抑制物高值化利用提供了思路。因此, 在提升 *E. coli* 5-羟甲基糠醛耐受性的同时, 将抑制物转化途径整合至菌株中实现平台化学品同步合成, 是提高木质纤维素水解液资源化利用的有效途径^[61]。此外, 2022年, Zheng等^[62]通过整合适应性实验室进化 (adaptive laboratory evolution, ALE) 与基于CRISPR的可追踪基因组工程技术 (CRISPR-enabled trackable genome engineering, CREATE), 构建了全局调节因子文库, 大幅提升菌株遗传多样性, 仅27 d (53代) 即获得了相较于亲本菌株 *E. coli* MG1655 耐受发酵抑制物糠醛性能提升近2倍的突变菌株KQ52。

2.2 提高对于有机酸耐受的策略

甲酸、乙酸等有机酸对 *E. coli* 的影响主要体现在抑制生长与干扰代谢两方面^[63]。未解离的有机酸可透过细胞膜进入细胞, 在胞内释放氢离子, 降低细胞质pH, 破坏酸碱平衡, 抑制酶活性与蛋白质合成^[64-66]。同时还会迫使 *E. coli* 启动应激响应, 消耗能量用于维持胞内环境稳定, 进而影响菌株正常生理功能及发酵性能^[67]。

2024年, Yilmaz等^[68]通过对已构建和进化的产甲酸 *E. coli* K4、K4e 和 K4e2 进行代谢建模、基因组和蛋白质组分析, 从优化能量辅因子再生途径、调整中心碳代谢相关酶表达、调控特定基因表达以及改变蛋白质分配等方面, 提出敲除或下调 *zwf* (编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、*gltA* (编码柠檬酸合酶)、*sucAB* (编码 α -酮戊二酸脱氢酶)、*ppsA* (编码磷酸烯醇式丙酮酸合酶)、*ppc* (编码磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶) 和 *aceB* (编码苹果酸合酶) 等内源基因, 上调 *pntAB* (编码烟酰胺核苷酸转氢酶)、*maeB* (编码苹果酸酶) 和 *lpd* (编码二氢硫辛酰胺脱氢酶) 等内源基因, 引入更高效的金属辅助因子依赖的甲酸脱氢酶 (Fdh) 等策略, 以优化其利用甲酸生长的代谢途径, 提高其对甲酸的耐受性和生长效率。同年, Wenk等^[69]通过构建“选择菌株”、模块化表达丝氨酸苏氨酸循环途径模块、ALE以及引入关键突变, 如 *thrABC* (编码苏氨酸生物合成途径中的关键酶) 操纵子上游39 bp缺失、*lon* 基因 (编码一种ATP依赖的蛋白

酶)上游转座子插入、*pntAB*启动子区域点突变、*thrA* (编码天冬氨酸激酶)编码区域点突变等策略,使*E. coli* SIJ488能够以甲酸为唯一碳源进行生长。

2008年, Mordukhova等^[70]通过随机诱变获得热稳定的*E. coli*高丝氨酸O-琥珀酰转移酶(MetA)突变体MetA_{*E. coli*}-333,其中I229T突变可提高MetA稳定性,工程化*E. coli* MetA_{*E. coli*}-333在乙酸环境中表现出更强的生长能力,且该突变体在高乙酸环境下细胞内蛋白质聚集程度显著降低,进而增强了对发酵抑制物乙酸的耐受性。2013年, Chong等^[71]通过易错PCR技术对*E. coli* DH5 α 全局调控因子cAMP受体蛋白(CRP)进行随机突变,构建突变文库并在含乙酸钠的M9培养基中筛选,获得突变体A2(D138Y),A2在15 g/L乙酸钠中的生长速率显著高于对照菌株,实现对发酵抑制物乙酸耐受性的提高。同年, Lu等^[72]利用酸性环境下由酸激活的谷氨酰胺酶(YbaS)将L-谷氨酰胺转化为L-谷氨酸并释放出气态氨,通过氨中和质子的过程以提高细胞内的pH。同时,氨基酸反向转运体GadC协助L-谷氨酰胺进入细胞,二者共同作用增强*E. coli* MG1655对酸性环境的耐受。2015年, Zheng等^[73]通过构建重组质粒pMV24-*uvrA*,将来自巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*) AC2005基因组中负责识别DNA损伤并启动修复过程的关键UvrA蛋白的编码基因*uvrA*基因外源导入*E. coli* JM109使其表达修复核酸内切酶,从而提高其对发酵抑制物乙酸的耐受性。

为提高*E. coli*对甲酸、乙酸等有机酸的耐受,前提是解析有机酸对*E. coli*细胞生理活性的影响机制,弱酸在低pH环境中解离,破坏细胞内pH平衡,抑制*E. coli*生长代谢^[54]。采用代谢途径优化、基因突变和外源基因导入等手段,可以达到显著增强菌株对有机酸等发酵抑制物耐受的目的。

2.3 提高对于酚类物质耐受的策略

酚类物质不仅破坏细胞膜的完整性,还能特异性抑制酶活性并引起氧化应激^[74]。通过基因工程强化外排系统、抗氧化系统及DNA修复系统,利用代谢工程重构酚类降解途径或敲除敏感基因,

结合添加保护物质及适应性进化等多种手段,能够提升*E. coli*对酚类物质的耐受。

2022年, Ikehata等^[75]发现向培养基中添加1~2 mmol/L香兰素,可以激活由*marR*、*marA*和*marB*三个基因组成、参与调控AcrAB-TolC外排泵表达的MarRAB系统,进而提升AcrAB-TolC外排泵(抗性-结节-细胞分裂RND家族的转运蛋白)的表达水平,并且通过调节相关转录因子发现MarRAB系统中的关键转录激活因子MarA在香兰素作用下显著升高,通过调控相关基因的表达,促进AcrAB-TolC外排泵的合成或增强其功能,提高了*E. coli* BW25113对香兰素的耐受能力,随后将编码外排转运蛋白的内源基因*acrB*导入*acrB*缺失的突变体,即可恢复其对香兰素的耐受性。同年, Yang等^[76]比较了两条3,4-二羟基苯甲醇合成途径(3-脱氢莽草酸衍生途径和4-羟基苯甲酸衍生途径),选择3-脱氢莽草酸衍生途径以优化代谢流、降低细胞代谢负担来提升*E. coli* BW25113及其衍生菌株对香草酸等物质的耐受能力,同时采用强化S-腺苷甲硫氨酸循环提高甲基化效率减少中间产物积累,设计*E. coli* BW25113及Lab02、Lab03共培养体系并敲除内源基因*aroE*(编码莽草酸脱氢酶)改变代谢流向,最终增强了对香草酸等相关物质的耐受性。2024年, Wu等^[77]通过敲除内源基因*ptsG*(编码磷酸烯醇式丙酮酸磷酸转移酶)、*ptsI*(编码磷酸烯醇式丙酮酸依赖性磷酸转移酶系统酶I)和*aroE*(编码莽草酸脱氢酶),筛选出羧酸还原酶(Car)和儿茶酚-O-甲基转移酶(Omt)最优组合,并通过敲除3个内源性醛酮还原酶(AKR)基因(*dkgB*、*yeaE*等)和3个醇脱氢酶(ADH)基因(*yqhD*、*yahK*、*yjgB*)来阻断香草醛及其中间体的非特异性还原,减少香草醇等副产物的生成。同时采用单载体系统表达通路基因以及优化发酵条件,减少了副产物生成和细胞代谢负担,增强了菌株对香草醛的耐受性。

在发酵抑制物存在条件下,*E. coli*如何维持利用可发酵糖的生物活性是实现高效生物炼制的关键。现阶段针对*E. coli*耐受糠醛、5-羟甲基糠醛、甲酸、乙酸等单一发酵抑制物耐受机制的解析和耐受菌株的构建策略取得了一定进展(表2)。然而,在实际木质纤维素水解液体系中,多种抑制物共存

表2 *E. coli* 耐受不同发酵抑制物的代谢工程策略Table 2 Metabolic engineering strategies for *E. coli* to tolerate different fermentation inhibitors

Fermentation inhibitors	Metabolic engineering strategies	References
Furfural and 5-hydroxymethylfurfural	Construct modules for screening tolerant mutants and modularizing stress-resistance pathways	[56]
	Exogenous introduction of functional genes	[57]
	Construct recombinant strains containing mutant enzyme genes	[58]
	Constructed <i>in vitro</i> multi-enzyme cascades with multi-source enzymes for 5-HMF conversion to FDCA	[59]
	Integrate adaptive laboratory evolution and genomic engineering technologies	[62]
Formic acid	Optimize metabolic pathways (knockout/down-regulation, up-regulation of specific endogenous genes) and introduce exogenous enzymes	[68]
	Construct modules for selecting strains and modularizing expression pathways, combining adaptive evolution with key mutations	[69]
Acetic acid	Mutants are obtained through random mutagenesis	[70]
	Random mutation screening was conducted for global regulatory factors	[71]
	Regulating intracellular pH through material metabolism (the effect of binding transport proteins)	[72]
	Exogenous introduction of genes related to repair	[73]
Phenolic substances	Activate the exhalation system and introduce exhalation-related genes	[75]
	Optimize metabolic pathways, strengthen the circulatory system, design co-culture systems and knockout related genes	[76]
	Knock out specific endogenous genes, screen enzyme combinations, and optimize the expression system and fermentation conditions	[77]

并形成复合胁迫环境，导致单一抑制物耐受策略的适用性显著受限。其主要局限性体现在以下方面：第一，针对某一抑制物的“专一性”改造往往难以应对其他抑制物的协同或叠加毒性，甚至可能因代谢资源分配失衡而加剧胞内生理紊乱^[78]；第二，不同抑制物可能作用于菌株的相同脆弱节点（如膜完整性、辅酶平衡、呼吸链功能等），单一耐受性提升策略往往提升部分损伤修复能力，难以实现细胞的系统性防护^[64]；第三，过多引入外源基因或强化特定通路易增加代谢负担，影响菌株生长与产物合成效率，在复合胁迫下更易导致菌株适应性下降^[79]。因此，尽管单一抑制物耐受机制解析不断深入，其在真实水解液体系中的效果往往大打折扣。近年来，基于CRISPR介导的CREATE等技术，能够实现高效、多位点的基因组编辑，针对全局调控网络或多重应激相关基因进行改造，快速构建耐受性提升的突变体文库，并可通过高通量筛选获得在复合抑制剂环境下适应性增强的菌株^[80]。该策略不仅关注单一毒性分子的解毒，更注重强化细胞整体的稳态维持能力、膜修复效率、活性氧清除能力及能量再生水平。因此，为实现*E. coli*在实际木质纤维素水解液中高效合成1,4-BDO，有必要在现有基础上进一步解析复

合抑制物影响代谢网络的关键节点与分子机制，识别其协同毒性作用的共同靶标，并开发集成化的耐受解决方案。通过整合系统生物学分析、动态应激响应监测与多维度工程策略，增强菌株在复合环境中的防御、修复与代谢再平衡能力，从而突破多重抑制物共存下可发酵糖高效利用的瓶颈^[81]。

3 计算机辅助1,4-BDO合成途径的设计与优化

正如前文所述，1,4-BDO是已知微生物无法合成的非天然二元醇。尽管目前已有多项研究以*E. coli*为底盘细胞，通过将不同物种来源的酶分子进行组装并构建出多条1,4-BDO合成途径，但仍然存在1,4-BDO合成效率较低、副产物多等问题。究其根本，可能引起合成效率下降的原因有：①目前已报道人工构建途径中的代谢中间体（如4-羟基丁醛）以及目标产物1,4-BDO均会损伤细胞膜，继而对细胞产生毒性作用^[82]；②1,4-BDO是一种还原性物质，这意味着合成1,4-BDO通常需要消耗大量的还原力以及ATP^[83]，这与细胞生长的需求形成了竞争关系，导致细胞难以维持正常的能量供给与氧化

还原平衡, 继而生长与生产都受到抑制; ③外源引入的1,4-BDO合成途径中酶分子可能存在催化效率以及特异性不足等问题, 继而导致催化反应速率不足、副产物出现等问题。近年来, 随着人工智能的快速发展, 计算机辅助设计和优化技术在细胞工厂构建中的应用日益广泛, 为生物催化合成高值化合物提供了强大的工具。在计算机辅助设计和优化技术的帮助下, 通过高效合成1,4-BDO途径的挖掘与设计、代谢通量平衡与优化、酶分子的精准设计与改造等策略, 可以实现*E. coli*为底盘细胞1,4-BDO生物合成的智能制造。

3.1 1,4-BDO合成途径的挖掘与理性设计

2014年, Hwang等^[32]通过代谢路径导向的数据库构建、多维度序列筛选、功能验证和结构驱动的理性改造, 从梭菌属中精准筛选丁醛脱氢酶(Bld), 经BLASTP比对和Pfam结构域分析确定同源性后, 采用易错PCR结合Schiff试剂筛选进行定向进化, 获得的突变体L273I酶活提升4倍。通过密码子优化和T7启动子工程增强异源表达, 实现了酶对*E. coli* 1,4-BDO合成路径的适配。2015年, Liu等^[37]在*E. coli*中设计从头合成1,4-BDO的模块化路径, 分为木糖专用的“碳源分流模块”和群体感应调控的“生产控制模块”。通过理性设计改造醇脱氢酶(YqhD)的NADH结合位点, 使其对NADPH亲和力提升5倍, 并引入SpyTag/SpyCatcher蛋白支架增强多酶复合物稳定性, 半衰期延长至72 h。同时整合毒素-抗毒素系统(hok/sok)维持质粒稳定性达98%以上, 最终在5 L发酵罐中实现1.8 g/L 1,4-BDO的生物合成, 较传统诱导系统合成效率提升50%。2024年, Ni等^[33]开发从琥珀酸出发的双酶催化途径, 利用羧酸还原酶(Car)与乙醇脱氢酶(Adh)构建两步转化路径, 并结合COBRA工具包进行通量平衡分析(FBA)优化理论产率至0.95 g/g。通过引入葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Zwf)强化NADPH循环系统, 提升辅因子利用率48.9%, 降低能量消耗。

3.2 基因组尺度代谢网络模型的模拟与优化

2011年, Yim等^[31]基于*E. coli* iAF1260基因

组尺度代谢模型, 通过通量平衡分析(FBA)预测最优路径, 敲除乳酸脱氢酶基因(LdhA)、丙酮酸甲酸裂解酶基因(PflB)以阻断竞争代谢流, 过表达二醇脱水酶(Ddh)等关键酶; 且利用模型分析氧化还原平衡与能量代谢, 指导厌氧条件下TCA循环通量重定向, 强化还原力供应, 在工程菌中实现18 g/L的1,4-BDO产量。2016年, Andreozzi等^[84]采用ORACLE框架整合转录组数据与代谢通量数据, 构建*E. coli*大规模动力学模型以辅助1,4-BDO合成途径优化。通过灵敏度分析定位中央糖酵解、TCA循环下游分支及1,4-BDO合成路径的关键调控节点(如Glt、Mdh), 结合通量平衡分析(FBA)预测酶过表达策略(如增强Zwf、PntAB表达)以提升NADPH供应。模型指导下的代谢工程改造使NADPH再生效率提高40%, 重组*E. coli*中1,4-BDO产量提升至1.2 g/L。2019年, Pooth等^[85]以基因组尺度代谢网络模型为核心工具, 结合通量平衡分析构建含氧环境约束的模拟体系, 系统探究底物与氧可用性对重组*E. coli* 1,4-BDO合成的代谢敏感性。模型纳入微好氧等关键约束, 模拟不同葡萄糖供应(过剩/限制)和氧浓度下的代谢网络状态, 揭示氧水平对碳通量分配的决定性作用——微氧(0.1 VVM)条件可减少乙酸副产物生成, 使碳通量向1,4-BDO分配提升至30%, 而氧供应增加会导致产物产量下降77%。基于模型预测的动态氧调控策略, 在5 L发酵罐中实现1.8 g/L 1,4-BDO的合成, 验证了GEM(基因组尺度代谢模型)指导环境参数优化与代谢网络重编程的有效性。

3.3 计算机辅助关键酶设计

2015年, Barton等^[86]借助Genomatica集成平台设计从葡萄糖到1,4-BDO的代谢途径, 通过¹³C代谢通量和多组学数据分析, 精准解析了醛脱氢酶(Ald)和醇脱氢酶(Adh)催化瓶颈、4-羟基丁酸辅酶A(4HB-CoA)自发降解导致碳流失、高NADH水平下TCA循环通量不足等一系列问题。并进一步通过建模指导染色体整合路径基因、定向进化Ald酶、优化OUR(oxygen uptake rate)等发酵参数, 同时将实验数据反馈至模型迭代调整,

成功构建一种高产且稳定的生产1,4-BDO的*E. coli*。2017年, Wang等^[39]首先通过整合KEGG代谢数据与BRENDA酶数据库, 确定了产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)的二醇脱水酶(Ddh)为核心催化酶, 并基于Swiss-model的酶结构预测理性设计突变体D276N, 其活性较野生Ddh提升5倍。同时, 底物特异性扩展至C₄三醇, 构建出较传统化学法缩短30%长度的7步酶促反应路径, 并降低了15%的ATP消耗。2024年, Ni等^[33]针对BRENDA数据库和文献中筛选出的*MmCar*和*EcYqhD*, 利用AlphaFold2预测酶结构并分析催化机制, 并通过酶位点突变和高通量筛选获得高效突变体*MmCARI922V/C983I/Y952R*, 最终使得1,4-BDO的产量增加了48.9%。

随着AI的快速发展, 计算机辅助技术深度融入合成路径设计、代谢网络优化及酶分子改造多个环节, 为突破微生物合成1,4-BDO过程中非天然途径适配性差、代谢网络调控复杂以及关键酶催化效率不足等核心难题提供了重要理论支撑和解决方案, 也为其他非天然高值化合物(如长链二元醇、特种聚酯单体等)的微生物合成提供了可复制、可推广的研究范式。然而, 不同来源非粮生物质原料经不同预处理工艺处理, 所得到的混合糖比例以及抑制物种类和水平均有较大差异。利用AI模型预测混合碳源下底盘微生物的代谢流分配、预测对复合抑制物耐受及脱毒途径, 有望在实现代谢途径、网络调控与酶分子精准设计的同时, 进一步增强1,4-BDO规模化生物炼制的能力^[87]。

4 总结与展望

综上, 以*E. coli*为底盘细胞利用不同碳源合成生物基1,4-BDO展现出显著潜力, 但基于木质纤维素水解液实现规模化生产仍面临若干核心挑战, 主要体现在以下方面:

其一, 不同碳源代谢路径存在固有差异与协同障碍。葡萄糖代谢合成1,4-BDO的路径已相对成熟且产物滴度相对较高^[82], 但由于该路径与中心代谢高度偶联、步骤较长, 容易导致代谢失衡及中间产物(如丙酮酸、琥珀酸等)积累, 从而

降低了碳源利用及发酵效率^[88]。木糖、阿拉伯糖等戊糖代谢路径相对简短, 但受到*E. coli*天然PTS系统的限制, 葡萄糖转运时引起的信号转导会降低细胞内cAMP浓度, 进而抑制木糖、阿拉伯糖等次级碳源代谢相关基因的表达, 导致水解液混合糖难以充分利用^[89]。

其二, 发酵抑制物共存引发多重胁迫。木质纤维素预处理产生的糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸及酚酸类物质共存, 不仅直接干扰*E. coli*的生长与代谢活性, 还通过干扰糖代谢关键酶活性、破坏辅因子平衡等作用间接抑制1,4-BDO的合成效率^[90], 针对单一抑制物耐受性改造策略往往难以应对复合抑制物引起的胁迫毒性。

针对上述瓶颈, 基于功能模块化策略构建多细胞混菌体系, 可以有效缓解单一*E. coli*细胞在同步利用混合糖或协同耐受复合抑制物时面临的代谢负担过重、辅因子失衡及中间产物积累等问题, 为高效利用木质纤维素水解液合成1,4-BDO提供了新思路。相关研究表明, 通过敲除木糖代谢关键转录激活因子XylR使得*E. coli*专一利用葡萄糖, 通过敲除葡萄糖转运与磷酸化相关基因、引入XylR突变体以增强木糖代谢, 使得*E. coli*专一利用木糖, 最终通过代谢分工实现*E. coli*共培养体系对葡萄糖与木糖混合糖的高效利用, 总糖利用率约91%^[91]。在实现多细胞体系对可发酵糖的共利用后, 进一步提高体系稳定性是持续改善产物合成效率的重要研究方向。也有研究表明, 在*E. coli*中进行代谢互补性设计可以实现从葡萄糖和木糖混合底物出发合成高值化合物, 例如通过分别敲除苯丙氨酸合成与酪氨酸合成相关基因, 使两个菌株通过相互交换苯丙氨酸和酪氨酸进行代谢互补, 确保整个混菌体系更加稳定^[92]。尽管目前针对复合抑制物的耐受改造报道相对较少, 但通过深入解析发酵抑制物对于微生物细胞的作用机制发现, 糠醛和乙酸均能在糖酵解、ABC转运蛋白等方面表现出协同抑制作用^[93]。这意味着在明确不同抑制物作用靶点的基础上, 结合特定途径强化、靶点改造以及实验室适应性进化等技术, 有望提升底盘细胞对多重抑制物的整体耐受性^[13, 94-95]。

为使功能模块化的多细胞混菌体系更好地适

配木质纤维素水解液高效合成1,4-BDO的工业应用,在未来的研究中应重点解决以下挑战:

首先,由于木质纤维素生物质来源广泛,生物质预处理水解液中的组分因原料以及预处理工艺的不同而具有较大差异,针对不同来源、不同预处理方式获得的木质纤维素水解液,基于随机森林、梯度提升决策树、卷积神经网络及人工神经网络等机器学习模型预测不同预处理工艺的糖产量与抑制物水平,从根本上改变预处理条件的优化策略并降低生产成本^[96-99]。

其次,针对抑制物共存引起的多重胁迫,通过高通量筛选获取具有强耐受性与高效脱毒能力的发酵抑制物降解菌株,深入探究其对于抑制物耐受的分子机制,识别脱毒的关键途径,基于脱毒代谢途径构建专一性发酵抑制物脱毒模块菌株,在实现发酵抑制物原位脱毒的同时,避免不同微生物细胞因生长温度、pH以及溶氧需求差异引起的混菌体系失调^[100-102],从而提升1,4-BDO合成效率。此外,针对混合糖利用效率不一致、优势菌株积累的代谢废弃物干扰其他菌株代谢活性所导致代谢途径整体效率不足、代谢途径与底盘细胞适配性等问题,在计算机辅助指导与AI技术的驱动下,整合多组学数据,挖掘催化效能更高、与底盘细胞更适配的1,4-BDO合成途径,并指导新酶挖掘与精准理性设计。通过全局代谢调控网络分析混合糖代谢流速率,可构建分工合理、鲁棒性强的多细胞混菌体系。结合智能算法预测混合碳源下的代谢流分配,可进一步指导多细胞体系构建及路径优化,从而增强1,4-BDO合成路径中的碳通量、提高还原力供给并提升1,4-BDO生物合成效率,为高效生物炼制提供可行性方案。

参 考 文 献

- [1] SATAM C C, REALFF M J. Comparison of two routes for the bio-based production of economically important C₄ streams[J]. *Journal of Advanced Manufacturing and Processing*, 2020, 2(3): e10054.
- [2] PLATNIEKS O, GAIDUKOV S, KUMAR THAKUR V, et al. Bio-based poly (butylene succinate): recent progress, challenges and future opportunities[J]. *European Polymer Journal*, 2021, 161: 110855.
- [3] PERVEZ M N, HOSSAIN M Y, TALUKDER M E, et al. Nanomaterial-based smart and sustainable protective textiles [M]//Protective textiles from natural resources. Amsterdam: Elsevier, 2022: 75-111.
- [4] YANG Y, SEO K, KIM J, et al. Biodegradable plastic production: economic and environmental perspective[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2025, 13(2): 923-935.
- [5] 曹红忠. 1,4-丁二醇工艺技术路线选择和分析[J]. *煤炭与化工*, 2019, 42(10): 123-128, 160.
CAO H Z. Selection of and analysis process technology route of 1,4-butanediol[J]. *Coal and Chemical Industry*, 2019, 42(10): 123-128, 160.
- [6] HAAS T, JAEGER B, WEBER R, et al. New diol processes: 1,3-propanediol and 1,4-butanediol[J]. *Applied Catalysis A: General*, 2005, 280(1): 83-88.
- [7] KUMAR P, PARK H, YUK Y, et al. Developed and emerging 1,4-butanediol commercial production strategies: forecasting the current status and future possibility[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2024, 44(4): 530-546.
- [8] SCOTT L N, FIUME M, BERGFELD W F, et al. Safety assessment of alkane diols as used in cosmetics[J]. *International Journal of Toxicology*, 2024, 43(2S): 70S-131S.
- [9] XU X H, LIU Y F, DU G C, et al. Microbial chassis development for natural product biosynthesis[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(7): 779-796.
- [10] GAO J C, JIANG L H, LIAN J Z. Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2021, 6(2): 110-119.
- [11] ZHA J, ZHAO Z, XIAO Z Y, et al. Biosystem design of *Corynebacterium glutamicum* for bioproduction[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2023, 79: 102870.
- [12] WANG M, WANG H M, GAO C, et al. Efficient production of protocatechuic acid using systems engineering of *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 82: 134-146.
- [13] CALERO P, NIKEL P I. Chasing bacterial chassis for metabolic engineering: a perspective review from classical to non-traditional microorganisms[J]. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12(1): 98-124.
- [14] 周千茜, 李星科. 代谢工程改造大肠杆菌产L-苏氨酸研究进展[J]. *生物化工*, 2025, 11(3): 245-248.
ZHOU Q X, LI X K. Advances in metabolic engineering to modify *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. *Biological Chemical Engineering*, 2025, 11(3): 245-248.
- [15] 张焯宁. 代谢工程策略在大肠杆菌中提高丁醇产量的系统生物学研究[J]. *工业微生物*, 2025, 55(3): 23-25.
ZHANG Y N. Systems biology study on the metabolic engineering strategy to enhance butanol production in *Escherichia coli*[J]. *Industrial Microbiology*, 2025, 55(3): 23-25.

- [16] TAN H T, CORBIN K R, FINCHER G B. Emerging technologies for the production of renewable liquid transport fuels from biomass sources enriched in plant cell walls[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1854.
- [17] SULIS D B, LAVOINE N, SEDEROFF H, et al. Advances in lignocellulosic feedstocks for bioenergy and bioproducts[J]. *Nature Communications*, 2025, 16: 1244.
- [18] KIM J S, LEE Y Y, KIM T H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 199: 42-48.
- [19] DADI M, SIWALE W, MUNALULA F, et al. A comprehensive review of advances in bioenergy including emerging trends and future directions[J]. *Discover Energy*, 2025, 5(1): 26.
- [20] KAPOOR A, TIWARI A K, TRIPATHI S C, et al. Sustainable production of biofuels from lignocellulosic biomass using microbial applications: status, challenges and prospects[J]. *Molecular Biotechnology*, 2025, 68(4): 1649-1666.
- [21] FOX K J, PRATHER K L. Carbon catabolite repression relaxation in *Escherichia coli*: global and sugar-specific methods for glucose and secondary sugar co-utilization[J]. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2020, 30: 9-16.
- [22] JOJIMA T, OMUMASABA C A, INUI M, et al. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 471-480.
- [23] KAPLAN N A, ISLAM K N, KANIS F C, et al. Simultaneous glucose and xylose utilization by an *Escherichia coli* catabolite repression mutant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(2): e02169-23.
- [24] PARAWIRA W, TEKERE M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, 31(1): 20-31.
- [25] PIENKOS P T, ZHANG M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates[J]. *Cellulose*, 2009, 16(4): 743-762.
- [26] KUMAR A K, SHARMA S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2017, 4(1): 7.
- [27] STEFANIDIS S D, KALOGIANNIS K G, ILIOPOULOU E F, et al. A study of lignocellulosic biomass pyrolysis via the pyrolysis of cellulose, hemicellulose and lignin[J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2014, 105: 143-150.
- [28] JØRGENSEN H, KRISTENSEN J B, FELBY C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2007, 1(2): 119-134.
- [29] MILLARD P, SMALLBONE K, MENDES P. Metabolic regulation is sufficient for global and robust coordination of glucose uptake, catabolism, energy production and growth in *Escherichia coli*[J]. *PLoS Computational Biology*, 2017, 13(2): e1005396.
- [30] SUN J F, TIAN K M, WANG J, et al. Improved ethanol productivity from lignocellulosic hydrolysates by *Escherichia coli* with regulated glucose utilization[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 66.
- [31] YIM H, HASELBECK R, NIU W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1, 4-butanediol[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(7): 445-452.
- [32] HWANG H J, PARK J H, KIM J H, et al. Engineering of a butyraldehyde dehydrogenase of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* to fit an engineered 1, 4-butanediol pathway in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(7): 1374-1384.
- [33] NI P, GAO C, WU J, et al. Production of 1, 4-butanediol from succinic acid using *Escherichia coli* whole-cell catalysis[J]. *ChemBioChem*, 2024, 25(11): e202400142.
- [34] 姜君逸, 郭艺鸣, 杨套伟, 等. 代谢工程改造大肠杆菌从头合成 1, 4-丁二醇[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(9): 3142-3157.
- JIANG J Y, GUO Y M, YANG T W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* synthesis of 1, 4-butanediol[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(9): 3142-3157.
- [35] ZHOU X, ZHANG H Y, XU Y. Biodegradation and utilization of hemicellulose[M]//CHEN J, ZHU Y, LIU S. Functional carbohydrates. Boca Raton: CRC Press, 2017: 183-218.
- [36] ZHAO Z, XIAN M, LIU M, et al. Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 21.
- [37] LIU H W, LU T. Autonomous production of 1, 4-butanediol via a *de novo* biosynthesis pathway in engineered *Escherichia coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 135-141.
- [38] TAI Y S, XIONG M Y, JAMBUNATHAN P, et al. Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(4): 247-253.
- [39] WANG J, JAIN R, SHEN X L, et al. Rational engineering of diol dehydratase enables 1, 4-butanediol biosynthesis from xylose[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 148-156.
- [40] 袁新松. 采用 CRP 突变及 NADPH 再生强化改造大肠杆菌 IS5-d 生产木糖醇[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- YUAN X S. Further improvement of *E. coli* IS5-d for xylitol production via CRP mutation and enhancement of NADPH regeneration[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [41] 邱炜玥, 李敏, 陈思宇, 等. 构建大肠杆菌合成生物群落利用混合糖同步发酵生产 L-乳酸[J]. *中国食品学报*, 2024, 24(7): 208-218.
- QIU W Y, LI M, CHEN S Y, et al. Constructing *Escherichia*

- coli* synthetic microbial communities for simultaneously utilizing mixed sugars to product L-lactic acid[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(7): 208-218.
- [42] 许琼丹, 王永泽, 王金华, 等. 大肠杆菌乙醇工程菌 *mglB* 基因的敲除对混合糖发酵木糖利用效率的影响[J]. 生物技术通报, 2019, 35(6): 83-90.
- XU Q D, WANG Y Z, WANG J H, et al. Influence of *mglB* gene knockout in engineered *Escherichia coli* producing ethanol on the xylose utilization of mix sugar fermentation[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(6): 83-90.
- [43] TANG J L, ZHU X N, LU J, et al. Recruiting alternative glucose utilization pathways for improving succinate production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(6): 2513-2520.
- [44] PAPA V I. Hemicelluloses[M]/Polysaccharides in medicinal applications. London: Routledge, 2017: 107-124.
- [45] ALAWAD I, IBRAHIM H. Pretreatment of agricultural lignocellulosic biomass for fermentable sugar: opportunities, challenges, and future trends[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2024, 14(5): 6155-6183.
- [46] HU F, RAGAUSKAS A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry[J]. BioEnergy Research, 2012, 5(4): 1043-1066.
- [47] HUISJES E H, DE HULSTER E, VAN DAM J C, et al. Galacturonic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on galactose, xylose, and Arabinose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(15): 5052-5059.
- [48] KIM D. Physico-chemical conversion of lignocellulose: inhibitor effects and detoxification strategies: a mini review[J]. Molecules, 2018, 23(2): 309.
- [49] PENG F, REN J L, XU F, et al. Chemicals from hemicelluloses: a review[M]//ZHU J Y, ZHANG X, PAN X J. Sustainable production of fuels, chemicals, and fibers from forest biomass. Washington: American Chemical Society, 2011: 219-259.
- [50] LIN Q X, ZHANG C H, WANG X H, et al. Impact of activation on properties of carbon-based solid acid catalysts for the hydrothermal conversion of xylose and hemicelluloses[J]. Catalysis Today, 2019, 319: 31-40.
- [51] MARTINS J R, LLANOS J H R, BOTARO V, et al. Hemicellulose biomass degree of acetylation (natural versus chemical acetylation) as a strategy for based packaging materials[J]. BioEnergy Research, 2024, 17(2): 877-896.
- [52] BULUSHEV D A, ROSS J R H. Towards sustainable production of formic acid[J]. ChemSusChem, 2018, 11(5): 821-836.
- [53] FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ J, ERDOCIA X, SÁNCHEZ C, et al. Lignin depolymerization for phenolic monomers production by sustainable processes[J]. Journal of Energy Chemistry, 2017, 26(4): 622-631.
- [54] MILLS T Y, SANDOVAL N R, GILL R T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2009, 2(1): 26.
- [55] 王丹, 王洪辉, 王兢, 等. 糠醛和 5-羟甲基糠醛对大肠杆菌产丁二酸的影响[J]. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1463-1472.
- WANG D, WANG H H, WANG J, et al. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on succinic acid production by *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(10): 1463-1472.
- [56] WANG J Q, ZHANG Y, CHEN Y L, et al. Global regulator engineering significantly improved *Escherichia coli* tolerances toward inhibitors of lignocellulosic hydrolysates[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(12): 3133-3142.
- [57] JUNG H R, LEE J H, MOON Y M, et al. Increased tolerance to furfural by introduction of polyhydroxybutyrate synthetic genes to *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(5): 776-784.
- [58] WANG Z W, GONG C J, HE Y C. Improved biosynthesis of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid and furoic acid from biomass-derived furans with high substrate tolerance of recombinant *Escherichia coli* HMFOMUT whole-cells[J]. Bioresource Technology, 2020, 303: 122930.
- [59] YANG F, LIU J S, LI B X, et al. Effective biosynthesis of 2,5-furandicarboxylic acid from 5-hydroxymethylfurfural via a bi-enzymatic cascade system using bacterial laccase and fungal alcohol oxidase[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 164.
- [60] LI Y, YANG F, TAN X M, et al. Lipase and alcohol oxidase cascade catalytic system for the efficient conversion of 5-hydroxymethylfurfural to 2, 5-furandicarboxylic acid[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 334: 149081.
- [61] UJOR V C, OKONKWO C C. Microbial detoxification of lignocellulosic biomass hydrolysates: biochemical and molecular aspects, challenges, exploits and future perspectives [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 1061667.
- [62] ZHENG Y Y, KONG S T, LUO S Q, et al. Improving furfural tolerance of *Escherichia coli* by integrating adaptive laboratory evolution with CRISPR-enabled trackable genome engineering (CREATE) [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2022, 10(7): 2318-2330.
- [63] ZALDIVAR J, INGRAM L O. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 66(4): 203-210.
- [64] 计晴阳, 王文琼, 钱易, 等. 不同有机酸联用对大肠杆菌的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(8): 42-47.

- JI Q Y, WANG W Q, QIAN Y, et al. Inhibitory of different organic acid combinations against *Escherichia coli*[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(8): 42-47.
- [65] 张晓荣, 傅志丰. 食品中5-羟甲基糠醛的控制方法研究进展[J]. 食品安全导刊, 2019(32): 18-19.
- ZHANG X R, FU Z F. Research progress on control methods of 5-hydroxymethylfurfural in food[J]. China Food Safety Magazine, 2019(32): 18-19.
- [66] 马嘉瑜, 朴香淑. 酸化剂改善畜禽生长和肠道健康的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(8): 1-10.
- MA J Y, PIAO X S. Recent advances in acidifiers on growth performance and intestinal health of livestock and poultry[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(8): 1-10.
- [67] 郝雪雁, 刘梦晓, 韩紫依, 等. 大肠杆菌的耐酸机制及其改造研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4667-4680.
- HAO X Y, LIU M X, HAN Z Y, et al. Advances in acid-resistant mechanisms and modifications of *Escherichia coli* [J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4667-4680.
- [68] YILMAZ S, KANIS B, HOGERS R A H, et al. System-level characterization of engineered and evolved formatotrophic *E. coli* strains[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2025, 10(2): 650-666.
- [69] WENK S, RAINALDI V, SCHANN K, et al. Evolution-assisted engineering of *E. coli* enables growth on formic acid at ambient CO₂ via the serine threonine cycle[J]. Metabolic Engineering, 2025, 88: 14-24.
- [70] MORDUKHOVA E A, LEE H S, PAN J G. Improved thermostability and acetic acid tolerance of *Escherichia coli* via directed evolution of homoserine *O*-succinyltransferase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(24): 7660-7668.
- [71] CHONG H Q, YEOW J, WANG I, et al. Improving acetate tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP) [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77422.
- [72] LU P L, MA D, CHEN Y L, et al. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia[J]. Cell Research, 2013, 23(5): 635-644.
- [73] ZHENG Y, CHEN X J, WANG J, et al. Expression of gene *uvrA* from *Acetobacter pasteurianus* and its tolerance to acetic acid in *Escherichia coli*[M]//PETRE M. Advances in applied biotechnology. Berlin: Springer, 2015: 163-169.
- [74] HEIPIEPER H J, KEWELOH H, REHM H J. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(4): 1213-1217.
- [75] IKEHATA Y, DOUKYU N. Improving the organic solvent tolerance of *Escherichia coli* with vanillin, and the involvement of an AcrAB-TolC efflux pump in vanillin tolerance[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 133(4): 347-352.
- [76] YANG M C, MENG H, LI X L, et al. Coculture engineering for efficient production of vanillyl alcohol in *Escherichia coli* [J]. aBIOTECH, 2022, 3(4): 292-300.
- [77] WU R G, LI D, CHEN Q H, et al. Optimization of vanillin biosynthesis in *Escherichia coli* K12 MG1655 through metabolic engineering[J]. Bioresource Technology, 2024, 411: 131189.
- [78] 贾承霖, 郭晓鹏, 陆栋, 等. 增强酿酒酵母对木质纤维素水解液抑制剂耐受性的研究进展[J]. 生物技术通报, 2025, 41(4): 61-75.
- JIA C L, GUO X P, LU D, et al. Advances in improving the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to lignocellulose hydrolysate inhibitors[J]. Biotechnology Bulletin, 2025, 41(4): 61-75.
- [79] 于海浪, 刘佳, 李晓敏, 等. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产L-缬氨酸[J]. 生物工程学报, 2025, 41(9): 3504-3520.
- YU H L, LIU J, LI X M, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-valine production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(9): 3504-3520.
- [80] SONG X, ZHENG Y Y, LI S T, et al. Engineering global regulators for enhanced tolerance to multiple inhibitors by CRISPR-enabled trackable genome engineering[J]. AIChE Journal, 2023, 69(4): e18031.
- [81] 张丽, 高健, 刘长青, 等. 耐受性工程调控微生物细胞工厂胁迫抗性[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1373-1389.
- ZHANG L, GAO J, LIU C Q, et al. Tolerance engineering regulates stress resistance of microbial cell factory[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1373-1389.
- [82] WU T, LIU Y M, LIU J S, et al. Metabolic engineering and regulation of diol biosynthesis from renewable biomass in *Escherichia coli*[J]. Biomolecules, 2022, 12(5): 715.
- [83] BURGARD A, BURK M J, OSTERHOUT R, et al. Development of a commercial scale process for production of 1,4-butanediol from sugar[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 42: 118-125.
- [84] ANDREOZZI S, CHAKRABARTI A, SOH K C, et al. Identification of metabolic engineering targets for the enhancement of 1, 4-butanediol production in recombinant *E. coli* using large-scale kinetic models[J]. Metabolic Engineering, 2016, 35: 148-159.
- [85] POOTH V, VAN GAALEN K, TRENKAMP S, et al. Comprehensive analysis of metabolic sensitivity of 1,4-butanediol producing *Escherichia coli* toward substrate and oxygen availability[J]. Biotechnology Progress, 2020, 36(1): e2917.
- [86] BARTON N R, BURGARD A P, BURK M J, et al. An integrated biotechnology platform for developing sustainable

- chemical processes[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(3): 349-360.
- [87] TRIVEDI P, KUMAR A, GUPTA N, et al. Artificial intelligence and machine learning in microbial degradation of pollutants and toxins[M]//KAUR S, DHIMAN S, TRIPATHI M. *Microbial metabolomics: recent developments, challenges and future opportunities*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2025: 377-400.
- [88] MOORE C D, WANG Q K, WANG G, et al. Recent advances and challenges in engineering metabolic pathways and cofactor regeneration for enhanced *n*-butanol biosynthesis[J]. *Synthetic Biology and Engineering*, 2025, 3(1): 10005.
- [89] LIU J L, YANG J J, YUAN L H, et al. Modulated Arabinose uptake and cAMP signaling synergistically improve glucose and Arabinose consumption in recombinant yeast[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(34): 12797-12806.
- [90] PINHAL S, ROPERS D, GEISELMANN J, et al. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate[J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(13): e00147-19.
- [91] FLORES A D, CHOI H G, MARTINEZ R, et al. Catabolic division of labor enhances production of D-lactate and succinate from glucose-xylose mixtures in engineered *Escherichia coli* co-culture systems[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 329.
- [92] LIU X, LI X B, JIANG J L, et al. Convergent engineering of syntrophic *Escherichia coli* coculture for efficient production of glycosides[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 243-253.
- [93] JILANI S B, OLSON D G. Mechanism of furfural toxicity and metabolic strategies to engineer tolerance in microbial strains [J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 221.
- [94] MENEGON Y A, GROSS J, JACOBUS A P. How adaptive laboratory evolution can boost yeast tolerance to lignocellulosic hydrolyses[J]. *Current Genetics*, 2022, 68(3): 319-342.
- [95] FLETCHER E, BAETZ K. Multi-faceted systems biology approaches present a cellular landscape of phenolic compound inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 539902.
- [96] ZHANG Y, ZHAO T, XIAO L, et al. Machine learning prediction of glucose production from lignocellulosic biomass through various pretreatment methods[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2026, 207: 108811.
- [97] XU H F, DONG C Y, WANG W X, et al. Machine learning prediction of deep eutectic solvents pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, 196: 116431.
- [98] MADADI M, KARGARAN E, AL AZAD S, et al. Machine learning-driven optimization of biphasic pretreatment conditions for enhanced lignocellulosic biomass fractionation [J]. *Energy*, 2025, 326: 136241.
- [99] HUANG X Y, ZHANG X, HE Y, et al. Leveraging machine learning for acid catalyzed steam explosion pretreatment: towards supporting fermentation by the trade-off between glucose and inhibitors[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2024, 448: 141530.
- [100] TEMUDO M F, MUYZER G, KLEEREBEZEM R, et al. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(6): 1121-1130.
- [101] KHANJANI M H, MOHAMMADI A, EMERENCIANO M G C. Water quality in biofloc technology (BFT): an applied review for an evolving aquaculture[J]. *Aquaculture International*, 2024, 32(7): 9321-9374.
- [102] ARENIELLO M, MATASSA S, ESPOSITO G, et al. Biowaste upcycling into second-generation microbial protein through mixed-culture fermentation[J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(2): 197-213.



通讯作者: 刘家书(1988—),男,博士,副教授,博士生导师。研究方向为环境微生物学、生物质资源化、生物催化与转化。

E-mail: jsliu@hubu.edu.cn



共同通讯作者: 江正兵(1972—),男,博士,教授,博士生导师。研究方向为生物化工、分子酶工程、生物质资源化。

E-mail: zhbjiang@hubu.edu.cn



第一作者: 王博文(2001—),男,硕士研究生。研究方向为合成生物学、生物质资源化。

E-mail: 690313285@qq.com