

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-049

人工代谢途径合成有机醇有机酸的研究进展

曹晨凯, 李佳隆, 张科春

(西湖大学工学院, 浙江省海岸带环境与资源研究重点实验室, 浙江 杭州 310024)

摘要: 有机酸有机醇不仅是食品、化工、医药领域的原料, 更是一类重要的生物基燃料, 相比于传统的石油基燃料, 具有原料可再生, 生产过程清洁的特点, 是应对能源危机、环境污染问题的有效对策。传统的代谢工程方法是通过在微生物中过表达产物相关的特异性酶实现的, 应用时常有发酵原料单一, 代谢效率不高, 产物种类受限等问题。筛选并重新组合不同来源的酶来构建人工代谢途径是一个有效的解决方案, 同时也是代谢工程方法发展的一个重要趋势。本文综述了近年来构建人工代谢途径生产有机酸有机醇取得的突破与进展, 具体阐述了5种创新生物合成途径(一碳化合物同化途径、非磷酸化途径、酮酸途径、 β -氧化逆循环途径和聚酮化合物途径)的相关机理, 为未来构建低成本、高效、产物多样化的有机酸有机醇生物合成平台提供了可能。

关键词: 有机酸; 有机醇; 生物基燃料; 代谢工程; 人工代谢途径

中图分类号: Q815 **文献标志码:** A

Progress in artificial metabolic pathways for biosynthesis of organic alcohols & acids

CAO Chenkai, LI Jialong, ZHANG Kechun

(Key Laboratory of Coastal Environment and Resources of Zhejiang Province, School of Engineering, Westlake University, Hangzhou 310024, Zhejiang, China)

Abstract: Organic acids and alcohols are usually known as commercial feedstock in chemical engineering and pharmaceutical field. It is also known as potential significant biofuel. Compared with traditional fossil fuels, the characteristics of industrial application of organic acids and alcohols can provide great advantages such as renewable feedstock and green production process. They are effective countermeasures to deal with energy crisis and environmental pollution. Traditional metabolic engineering is realized by overexpression specific genes to elevate the corresponding enzyme level. With certain artificial genetic transformation and modification, a microbial cell factory can be constructed for efficient production of certain organic acids and alcohols. However, problems such as limited fermentation raw materials, low metabolic efficiency, and limited product types arise during practical implementation. Constructing artificial metabolic pathways through screening and recombining nonhomologous enzymes can become

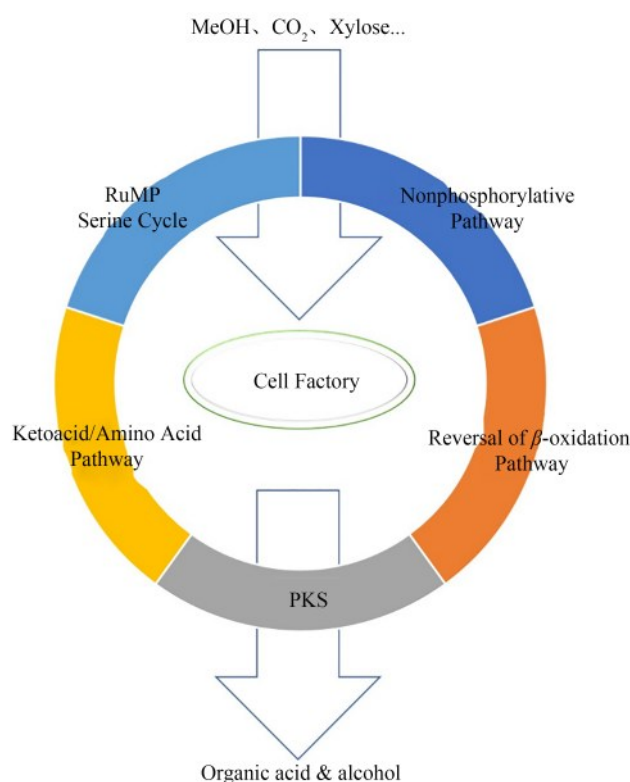
收稿日期: 2021-04-23 修回日期: 2021-11-19

基金项目: 国家自然科学基金 (22078267)

引用本文: 曹晨凯, 李佳隆, 张科春. 人工代谢途径合成有机醇有机酸的研究进展[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 902-919

Citation: CAO Chenkai, LI Jialong, ZHANG Kechun. Progress in artificial metabolic pathways for biosynthesis of organic alcohols & acids[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 902-919

an effective solution, which is also a cutting-edge general trend in this field. In this paper, recent breakthroughs and progress in constructing artificial metabolic pathway to produce organic acids and alcohols are reviewed. Five novel biosynthetic pathways are expounded with details including C_1 compounds assimilation pathway, nonphosphorylation pathway, ketoacid/ammino acid pathway, RBO pathway (reversal of β -oxidation pathway), and PKS pathway (polyketide pathway). Furthermore, the advantages and limitations compared with traditional chemical-produced technique are also discussed. Potential problems such as the tolerance of one carbon compounds, the inefficient conversion of xylose, the inefficient catalysis of key enzyme reactions in ketoacid amino acid pathway, and the lack of diversity of RBO pathway and PKS pathway products are reported in respected to practical application of the technology. In conclusion, the feasibility of establishing new metabolic pathways for production of specific products is analyzed, which has the potential of providing the possibility for the construction of high cost-efficient and diversified organic acid and organic alcohol biosynthesis platform in the future.



Keywords: organic acid; organic alcohol; biofuel; metabolic engineering; artificial metabolic pathway

合成生物学的一个重要目标是优化、重构微生物的遗传元件，使其能够满足人们对目标产物合成的需求。通过基因调控，可将微生物转变为高效的生物工厂^[1]。20世纪80年代初，随着重组DNA技术的出现，以及人们认识到微生物可以通过基因工程从本质上成为生产燃料和化学品的小化工厂，代谢工程科学因此诞生^[1]。代谢工程利

用多基因重组技术对细胞代谢途径进行改造，构建新的代谢途径生产特定产物。

1 一碳化合物同化途径

数百年来，通用的石化原料主要为石油与天然气。如今，全球每年因使用化石燃料产生的二

氧化碳的排放量约为70亿吨,过量的温室气体排放会引发许多环境问题,例如,海平面上升、热盐环流减弱与珊瑚礁系统灭绝等^[2-3]。因此,社会各界一直在寻找新绿色原料替代传统化石原料。其中,以甲醇和甲酸为代表的C₁化合物(C₁化合物)具有较大潜力,传统的甲醇生产工艺是以煤为原料制备合成气,而甲酸主要由二氧化碳通过高温高压、电解与水热反应转化而来^[4-5]。C₁化合物也可以通过绿色低成本的方法制备,例如,在农业、畜牧业与食品加工产业中,产生的有机物废料经过生物精炼后可转变为生物甲醇和甲酸^[6-8]。然而,目前面临的主要困难之一是缺少相应的以C₁化合物作为原料的生产技术。因此,相比于改造传统石油化学工艺限制碳排放,合成生物学可以提供一种使用C₁原料的思路:改造代谢途径使微生物能够同化C₁原料,从而以C₁化合物作为碳源进行相应目标产物的生产^[9-10]。

传统微生物发酵方法主要以葡萄糖、淀粉等为碳源。要以C₁化合物为碳源,主要难点在于绝大部分常见野生型微生物无法大量同化C₁化合物,以及甲醛等C₁化合物对微生物的毒性会影响其生长。根据近期的发现,异源表达RuMP循环与丝氨酸循环的基因可以使细菌有能力代谢并同化C₁化合物及其氧化物^[11]。

1.1 核酮糖单磷酸循环

尽管甲基营养菌中用于吸收甲醇的核酮糖单磷酸(ribulose monophosphate, RuMP)循环与典型的磷酸戊糖途径(HMP pathway)仅3个酶不同[甲醇脱氢酶(Mdh)、6-磷酸己糖合酶(Hps)和6-磷酸-3-己糖异构酶(Phi)]^[12],但构建一个能有效利用甲醇作为唯一碳源的菌株却是一个很大的挑战。1961年,Quayle等完成了对于扭脱甲基杆菌AM1(*Methylobacterium extorquens* AM1)的分离和表征^[13],发现了C₁化合物可以通过核酮糖单磷酸循环(RuMP cycle)的方式被吸收利用^[14]。图1(a)描述了RuMP、ED与EMP循环同化以甲醇为代表的C₁化合物的途径。在RuMP循环中,甲醛通过与5-磷酸核酮糖(Ru5P)缩合进入该循环,最终被转化为6-磷酸果糖(F6P)。随后F6P通过

Embden-Meyerhof-Parnas途径(EMP pathway)和Entner-Doudoroff途径(ED pathway)转化为乙酰辅酶A,进而用于脂肪酸、胆固醇和酮体的合成以支持微生物的生长。近年来,许多在大肠杆菌中重构核酮糖单磷酸循环途径的相关研究被报道。例如,2016年,Whitaker等^[15]将来自嗜热脂肪芽孢杆菌的NAD⁺依赖性的Mdh酶和来自甲醇双歧杆菌的RuMP途径的酶导入大肠杆菌中从而同化甲醇,实验使用¹³C标记(¹³C-labeling)证实了大肠杆菌菌株可以将甲醇转化为生物质。同时,Kalyuzhnaya等^[16]发现RuMP循环可有效支持微生物生长,这时需要消耗ATP并在丙酮酸脱羧时生成乙酰辅酶A,从而导致一份C₁以二氧化碳的形式损失。因此,当RuMP循环中一份磷酸二羟丙酮磷酸酯生成乙酰辅酶A时,一份碳单元会损失,导致过程中碳流回收率下降三分之一。对于克隆RuMP循环的微生物来说,仅依靠C₁化合物无法有效补充损失的碳流,因此,Kalyuzhnaya等提出需要进一步重构碳代谢流来保证其高效生长。2018年,Meyer等^[17]通过计算引导的多重敲除方法来设计可吸收甲醇的大肠杆菌菌株,并实验证明了在经改造和进化后,菌株在指数增长过程中,甲醇显著参与到核心代谢中(24%转化为6-磷酸己糖)。Woolston等^[18]实验发现在大肠杆菌中再生的5-磷酸核糖不足以维持甲醇的同化过程,他们通过表达突变的核糖单磷酸途径的景天酮糖双磷酸酶(sedoheptulose biphosphatase)解决了该问题。2020年,Chen等^[11]以代谢稳健性为标准对大肠杆菌基因进行了重排,经人工进化后得到了可有效利用甲醇作为唯一碳源的菌株,该甲基营养型大肠杆菌可以8h的倍增时间生长,得到较高OD。通过RuMP循环,改良后的工程菌可脱离传统的葡萄糖碳源生长模式,单一使用以甲醇为代表的C₁化合物,在合成醇类等高附加值的有机物方向上,展现出一定的潜力。

1.2 丝氨酸循环

丝氨酸循环(serine cycle)是一条经自然进化形成、对氧气供应不敏感的代谢途径,如图1(b)所示。丝氨酸循环通过丝氨酸羟甲基转移酶固定

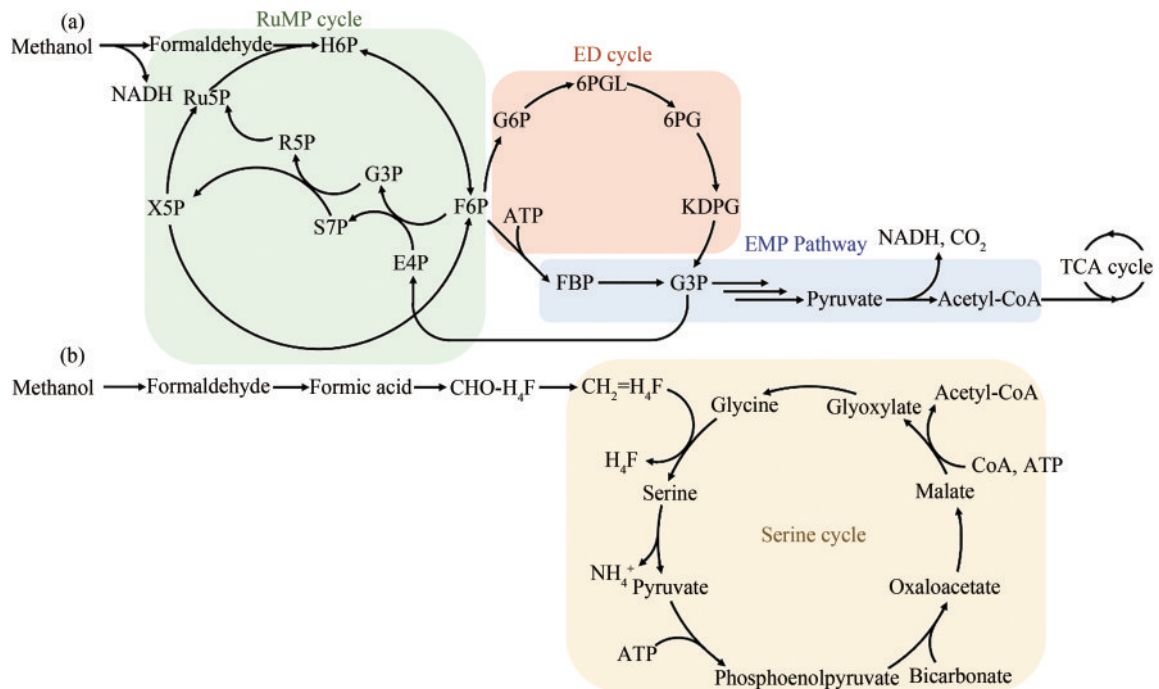


图1 RuMP途径、ED途径、EMP途径 (a) 和丝氨酸循环 (b)^[19]

Fig. 1 C₁ compound assimilation through ribulose-5-phosphate (RuMP), ED (Entner-Doudoroff), EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) pathway (a) and serine cycle (b)^[19]

H6P—Hexulose-6-phosphate; Ru5P—ribulose-5-phosphate; X5P—xylulose 5-phosphate; F6P—fructose-6-phosphate;
R5P—ribose-5-phosphate; G3P—glyceraldehyde-3-phosphate; S7P—sedoheptulose-7-phosphate; E4P—erythrose 4-phosphate;
G6P—glucose-6-phosphate; 6PGL—6-phospho-D-glucono-1,5-lactone; 6PG—6-phospho-D-gulonate;
KDPG—2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate-6-phosphate; FBP—fructose-1,6-bisphosphate; TCA—tricarboxylic acid

由5,10-亚甲基四氢叶酸携带的C₁化合物；其碳同化过程经历二碳、三碳、四碳代谢过程最终生成乙酰辅酶A。其中，二碳代谢过程为乙醛酸通过转氨过程转化为甘氨酸；三碳代谢过程为甘氨酸转化为丝氨酸并进一步脱水转化为磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)；四碳代谢过程为PEP进一步羟化生成草酰乙酸 (OAA)，随后分裂为两个二碳单元完成循环并输出最终产物乙酰辅酶A。因此，丝氨酸循环可以从多组C₁化合物合成乙酰辅酶A而不会造成碳损失。2018年，Yu等^[19]发现仅构建RuMP循环很难支持微生物在只有C₁化合物的环境下生长，为了补充碳流，他们在大肠杆菌中表达了改进的扭脱甲基杆菌AM1中的丝氨酸循环，使得改良后的工程菌能够同化C₁化合物，从而提高了乙酰辅酶A的产量。然而，对于丝氨酸循环系统，每生产一份乙酰辅酶A需要消耗3个ATP分子。这降低了生物质和产量，因为大部分C₁底物需要被氧化以产生所需的ATP而不是被同化为生物质。因此，对于使用丝氨酸循环同化C₁化合物的微生

物来说，仍需要关注优化ATP补充从而达到高效生长与生产。

1.3 其他同化一碳化合物的天然途径

除了RuMP循环及丝氨酸循环外，一些甲酸、甲烷营养菌中还存在着同化一碳化合物的其他天然途径^[20]。例如*Methanococcus maripaludis*在利用二氧化碳或甲酸生产甲烷的过程中存在一个中间体甲基THMPT，甲基THMPT会在一氧化碳脱羧酶/乙酰辅酶A合酶复合物的帮助下结合一个CO和一个CoA直接合成乙酰辅酶A^[21]。又比如*Cupriavidus necator*可以利用1,5-二磷酸核酮糖 (ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP)结合二氧化碳，在1,5-二磷酸核酮糖羧/加氧酶的作用下转化成磷酸甘油醛^[22]。由于提供的能量和还原力的不足，想要利用这些途径同化一碳化合物进行生产难度很大。

1.4 以C₁化合物作为底物进行生产

通过 RuMP 或丝氨酸循环, 可以形成一个 C₁ 化合物为底物的同化平台, 从而改进传统的化学合成工艺。例如, 甲基营养型大肠杆菌在生物燃料方面可成为一个有潜力的工程菌株。通常化学合成方法需要复杂的反应条件, 使用 C₁ 化合物建立碳碳键的化学方法需要高温和高压^[23], 建立这样的反应条件往往伴随着巨大的投资, 反应时使用的物料也通常为具有高碳排放量的化石燃料。相反, 生物合成的反应条件则更温和, 改良后的工程菌利用丝氨酸循环、RuMP 循环及甲醇缩合循环将 C₁ 化合物导向其他代谢途径并最终转化为相应产物, 例如, 碳链更长的化合物、氨基酸、代谢中间产物等。采用重新设计代谢系统的方法来改造微生物, 可以提高产量和生产率, 从而大幅度降低对原材料需求、工厂规模与运营成本^[24]; 相较于传统方法, 这种新的碳循环在使用成本与环境保护方面更具潜在优势。目前通过甲基营养型大肠杆菌合成特定化合物仍然是一个挑战, 表 1 总结了目前由甲基营养性菌发酵生产的特定有机醇与有机酸的产量与方法, 例如丁醇、甲羟戊酸 (MEV)、 γ -氨基丁酸 (GABA)、2-羟基异丁酸、3-羟基异丁酸、D-乳酸等。其中, 甲羟戊酸是萜类化合物的重要平台化合物^[29]; 其中, GABA 在哺乳动物中充当主要的抑制性神经递质, 并参与控制神经元的生长和成熟。是作为调节 GABA-谷氨酸平衡紊乱的重要治疗药物^[31]。然而, 目前可同化甲醇的天然微生物的代谢途径同样涉及二氧化碳的损失或 ATP 的消耗^[32]。因此, 当克隆 RuMP 和丝氨酸循环时仍然需持续优化碳流以提高效率。实验发现虽然大肠杆菌通过基因克隆的方法能以 C₁ 化合物作为唯一碳源生长, 但一些氧化型的 C₁

化合物如甲醇、甲醛等对于微生物存在一定毒性。当微生物生长进入平台期时, 过量存在的 C₁ 化合物会引起 DNA-蛋白质交联 (DNA protein crosslinking)^[11]。若使用这类甲基营养性大肠杆菌进行工业化生产, 仍需提高其对 C₁ 化合物的耐受性。2018 年, Cui 等^[29] 通过对 α -变形杆菌甲基杆菌 AM1 (α -proteobacterium *Methylobacterium extorquens* AM1) 使用自适应实验室进化 (ALE, adaptive laboratory evolution) 的方法提高了甲基营养性菌对甲醇的耐受性, 同时得到了 2.27 g/L 甲羟戊酸 (MEV) 的产量。同样, 微生物对发酵产物的耐受性也可以尝试通过类似 ALE 的方法提高^[26]。虽然利用 C₁ 化合物平台生产有机醇与有机酸仍然具有挑战性, 但这项工作为微生物固碳提供了思路与可能性。

2 木糖代谢途径为代表的非磷酸化途径

2.1 木糖的代谢途径

木质组织中的半纤维素是地球上最丰富的生物资源之一, 与生产第一代生物燃料的原料玉米、甘蔗相比, 半纤维素可以很好地缓和“粮食与燃料冲突”的问题^[33-34], 因此, 由可再生半纤维素生物质生产的第二代生物燃料有望作为常规化石燃料的可持续替代品^[35-38]。半纤维素水解的主要产物是葡萄糖和木糖, 虽然木糖是植物细胞壁中含量第二高的糖, 占木质生物质总碳水化合物的 35%, 但是由于存在葡萄糖的代谢阻遏, 在利用葡萄糖和木糖同时发酵时, 即使使用高浓度的木糖, 其利用率仍然很低。而木质纤维素水解液中往往是混合糖体系, 这种低效发酵的问题限制

表 1 由甲基营养性菌发酵生产特定有机醇与有机酸实例

Tab. 1 Summary of methylotrophic production data

| 菌株 | 方法 | 培养基 | 产物 | 产量/(g/L) | 时间 | 文献 |
|------------------------|--------|---------------------------|----------------|-----------------------|------|------|
| 甲醇芽孢杆菌 | 补料分批发酵 | 含 200 mmol/L 甲醇的 MVcM 培养基 | γ -氨基丁酸 | 9.0 | 2016 | [25] |
| α -变形杆菌甲基杆菌 AM1 | 摇瓶发酵 | 含 20 mmol/L 乙胺的基础培养基 | L-丁醇 | 25.5×10^{-3} | 2016 | [26] |
| 扭脱甲基杆菌 AM1 | 补料分批发酵 | 含有 3 g/L 甲醇的矿物盐培养基 | 2-羟基异丁酸 | 2.1 | 2016 | [27] |
| 扭脱甲基杆菌 AM1 | 摇瓶发酵 | 含 125 mmol/L 甲醇的基础培养基 | 3-羟基丙酸 | 69.8×10^{-3} | 2017 | [28] |
| α -变形杆菌甲基杆菌 AM1 | 补料分批发酵 | 含 5% (体积分数) 甲醇的基础培养基 | 甲羟戊酸 | 2.3 | 2018 | [29] |
| 毕赤酵母 | 试管发酵 | 酵母/蛋白胨/葡萄糖培养基 | D-乳酸 | 3.5 | 2019 | [30] |

了木质生物燃料的商业生产，是利用木糖作为发酵原料需要面临的重大挑战。木质纤维素水解体系中还常带有弱酸、呋喃、苯酚和醛等副产物，对菌株生长有明显的抑制作用^[39]，因此开发对抑制剂有高耐受性的菌株也是一个很有潜力的方向。最近，Li等^[40]利用适应性进化的方法提高了菌株对抑制剂的耐受性，并且进一步提高了木糖的利用率；Liu等^[41]则通过杂交的方法使木糖发酵菌株获得了对抑制剂的耐受性。

自然界中至少存在以下5种木糖的代谢途径(图2)。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中^[42-43]，木糖首先被木糖异构酶(XylA)异构化成为木酮糖，通过木酮糖激酶(XylB)磷酸化成为5-磷酸木酮糖(X5P)后进入磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway)，其下游的6-磷酸果糖(F6P)和3-磷酸甘油醛(G3P)均可通过糖酵解途径(glycolysis)进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)。在丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中还存在磷酸转酮酶途径(phosphoketolase pathway)^[44-45]，能将5-磷酸木酮糖裂解为乙酰磷酸(acetyl-P)和3-磷酸甘油醛。在酿酒酵母及某些真菌中^[46]，木糖的异构化分为两步，首先由木糖还原酶还原成为木糖醇(xylitol)，再经过木糖醇脱氢酶氧化生成木酮糖，

最后由磷酸化途径进入磷酸戊糖途径。以三羧酸循环的关键中间产物 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, 2-KG)作为衡量标准，以上的木糖磷酸化途径均需要10个以上的酶促反应，且最终2-KG的理论摩尔产率也仅有83%。第4种途径是Weimberg途径，这是一种非磷酸化的途径，最早由Weimberg^[47]于1961年在脆弱假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)中发现。木糖首先由木糖脱氢酶(XylB)脱氢生成木糖醇内酯，再由木糖醇内酯酶(XylC)开环生成木糖酸，木糖酸被木糖酸脱水酶(XylD)脱水生成2-氧代3-脱氧木糖酸，后者经过2-氧代-3-脱氧木糖酸脱水酶(XylX)进一步脱水生成2-酮戊二酸半醛，最后经过2-酮戊二酸半醛脱氢酶(XylA)脱氢生成2-KG。该途径仅通过5个酶促步骤就能将木糖以100%的理论产率生成2-KG。第5种途径是Dahms途径，1974年，Dahms^[48]在一种未分类的假单胞菌中发现其包含了D-木糖脱氢酶、D-木糖醛酸脱水酶和一种新的醛缩酶(YghH/YagE)，该酶可以将2-氧代-3-脱氧木糖酸裂解为丙酮酸和乙醇醛。该途径在2-氧代-3-脱氧木糖酸处与Weimberg途径分开，经脱羧酶裂解后生成丙酮酸，丙酮酸脱羧后生成乙酰辅酶A进入TCA循环。对比这5种途径，非磷酸化途径显然较磷酸化途径步骤更少，理论内源代谢中间体2-KG的产率更高，

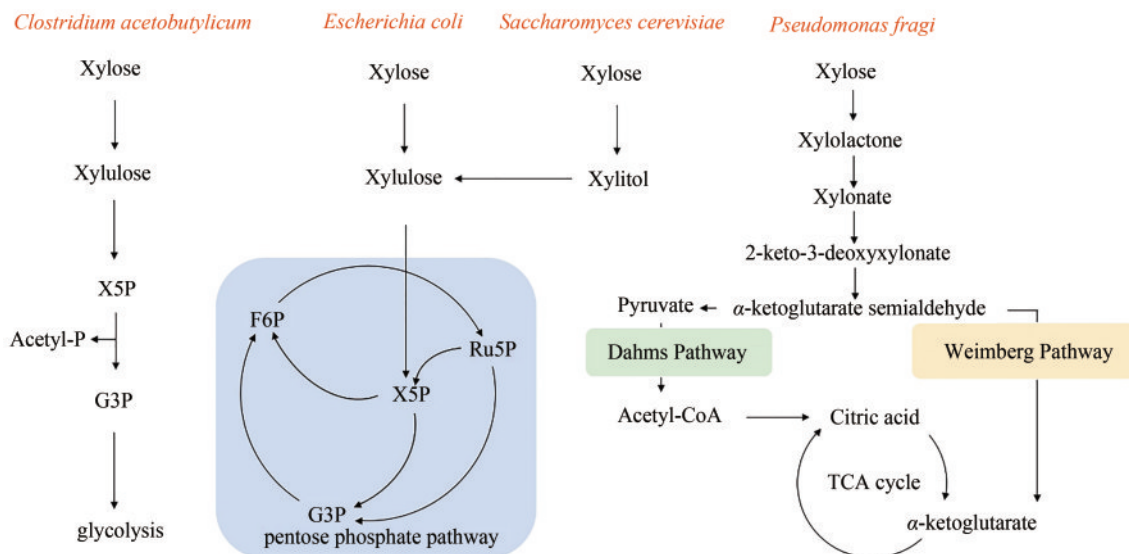


图2 不同微生物的木糖代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathways of xylose in different microorganisms

X5P—Xylulose 5-phosphate; G3P—glyceraldehyde-3-phosphate; F6P—fructose-6-phosphate;

Ru5P—ribulose-5-phosphate; Acetyl-P—acetylphosphate

因此, 开发非磷酸化途径在生物生产中具有可观的潜力^[49]。

2.2 酿酒酵母及运动发酵单胞菌在木糖发酵方面的研究进展

酿酒酵母具有耐酸、稳健性好的优点, 适合工业化发酵, 是一种重要的真核模式生物^[50]。酵母利用木糖发酵的研究主要集中在酵母自身的还原-脱氢酶途径, 以及外源表达的异构酶途径这两个方面^[51]。前者由于木糖还原酶需要辅因子NADPH而木糖醇脱氢酶需要辅因子NAD⁺, 该途径的过表达会导致辅因子失衡。为了解决这个问题, 改变木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的辅因子偏好, 调整它们的表达水平, 操作内源性氧化还原酶的途径和引入异源NADH依赖的反应等方式都是可行的策略^[52-53]。Zha等^[54]通过进化工程, 提高了利用还原-脱氢酶途径从木糖发酵生产乙醇的产量。后者的木糖异构酶在催化反应时具有一步转化、不依赖辅因子的优点, 而且不会积累木糖醇, 在生产乙醇时更有优势。然而只有少数异源木糖异构酶可以在酿酒酵母中功能性表达, 而且酶的活性普遍偏低, 筛选出高活性的木糖异构酶是该途径面临的一个瓶颈问题。最近, Hou等^[55]及Katahira等^[56]在牛瘤胃和昆虫肠道内容物的基因组文库中鉴定出了具有高体内活性的木糖异构酶。在近几十年中, 一些工程菌株在纤维素水解物中的发酵性能通过各种工程方法得到显著增强^[57-59]。然而, 低效的木糖转运、葡萄糖的代谢阻遏、下游途径效率低等都是限制木糖发酵的因素, 因此设计没有葡萄糖抑制的木糖转运蛋白或者克服葡萄糖的代谢阻遏进一步提高葡萄糖和木糖共同发酵时的利用率是开发酿酒酵母转化木糖的一个重要方向^[60-62]。Zha等^[63]在酿酒酵母中外源表达了来自的*Neurospora crassa*的编码纤维糊精转运蛋白的*CDT-1*基因, 细胞内 β -葡萄糖苷酶的*GHI-1*基因和来自*Scheffersomyces stipitidis*的编码木糖还原酶的*XYL1*基因, 减轻了葡萄糖的抑制。

运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)比酿酒酵母有更高的乙醇耐受性, 而且发酵时的碳源转化率很高, 也是发酵乙醇的常用菌种。虽然运动发酵单胞菌本身没有木糖代谢通路, 但是可以

通过异源表达木糖代谢途径的方式来克服。运动发酵单胞菌以木糖和葡萄糖的混合物作为原料发酵时, 木糖代谢途径同样会受到葡萄糖的抑制。为解决葡萄糖的抑制问题, Dunn等^[64]构建了减轻葡萄糖代谢阻遏的工程菌株, 减少了木糖醇的产量从而改善木糖的发酵效率。除了抑制问题, 木糖的运输也是阻碍运动发酵单胞菌有效利用木糖的瓶颈问题。据报道, 野生运动发酵单胞菌运输木糖用的是GLF(葡萄糖促进扩散蛋白), 该蛋白对葡萄糖具有更高的亲和力而导致葡萄糖对木糖的竞争性抑制^[65]。Dunn等^[65]高表达异源的木糖转运蛋白, Young等^[66]改造己糖转运蛋白以增加该蛋白对木糖的亲和力, 从木糖转运的角度入手, 分别提高了木糖在运动发酵单胞菌和酵母中的利用率。最近, Sarkar等^[67]利用ALE方法得到了比亲本利用率高1.65倍的进化菌株, 并且在此基础上引入木糖转运蛋白, 得到了在用双糖发酵的条件下, 木糖比利用率 $[2.04 \text{ g}/(\text{g}\cdot\text{h})]$ 与葡萄糖 $[2.49 \text{ g}/(\text{g}\cdot\text{h})]$ 相当的菌株, 产物乙醇滴度也达到了 47.4 g/L ^[68]。

2.3 木糖非磷酸化代谢途径的研究进展

Tai等^[69]利用木糖非磷酸化途径在大肠杆菌内构建了阿拉伯糖和半乳糖醛酸的非磷酸化途径。通过敲除编码异柠檬酸脱氢酶的基因(*ICD*)以切断2-KG的供应, 从而构建 α -酮戊二酸营养缺陷型的菌种作为筛选平台, 在该菌中转入Weimberg途径相关的酶可以筛选对D-木糖、L-阿拉伯糖和D-半乳糖醛酸利用率更高的菌株。同时利用该平台从*Burkholderia xenovorans*菌中鉴定出了一个活性更强的非磷酸化木糖操纵子。这是首次在大肠杆菌内通过完全非磷酸化途径将D-木糖、L-阿拉伯糖和D-半乳糖醛酸同化为生物燃料的报道。Liu等^[70]也通过6个酶促反应实现了从木糖到1,4-丁二醇的生产途径。Wang等^[71]在此基础上引入二醇脱水酶来优化2-KG下游生成1,4-丁二醇的途径, 从木糖出发从头合成了 209 mg/L 的1,4-丁二醇。Wang等^[72]在大肠杆菌中利用该途径最终实现了3,4-二羟基丁酸的生产。尽管这些非磷酸化代谢途径仅仅经过不到6个酶促步骤, 且理论摩尔产率都高达100%, 但非

磷酸化代谢途径的生物合成效率仍然不是很理想。

为解决木糖低效发酵的问题, Wang等^[73]研究了其中3种木糖代谢途径, 发现异构酶途径和Weimberg途径之间存在协同作用。前者虽然生产2-KG效率低下但是能够提供足量的乙酰辅酶A, 而后者恰恰相反。他们证明两种途径在前体供应中是相互补充的。以戊二酸作为终产物, 发现单独使用异构酶途径和Weimberg途径时戊二酸的产量仅104 mg/L和209 mg/L, 而结合使用两种途径时戊二酸的产量达到了602 mg/L, 甚至超过了从葡萄糖代谢途径获得的戊二酸产量(420 mg/L), 该项工作提供了一种提高木糖代谢效率的新颖策略。Bai等^[74]针对D-木糖和L-阿拉伯糖筛选了最有效的转运蛋白, 合成了高效的木糖操纵子, 利用非磷酸化途径实现了中康酸的高产合成, 该工作表明运输系统可能是非磷酸化代谢途径利用过程中的限速步骤之一。

自20世纪中叶以来, 非磷酸化代谢一直未见广泛应用。得益于新平台的开发, 更多的非磷酸化基因簇得以确定, 这也扩大了可利用代谢途径的数量。并且, 这些酶中的许多酶尚未经过蛋白质工程研究或选择性进化, 因此在未来有很大的发展空间。使用半纤维素等生物质作为发酵原料, 实际上为微生物提供了一种混杂多种糖的发酵体系。在该体系中, 理想状态下葡萄糖主要用于细胞生长, 而木糖、阿拉伯糖和半乳糖醛酸则直接用于产品生产。引入非磷酸化代谢是提高糖利用效率的一种方法, 但是需要将这些属性与菌株工程结合起来, 以提高菌株对半纤维素生物质水解产物中存在的抑制物(例如乙酸)的适应性^[75]。

3 酮酸/氨基酸途径

3.1 Ehrlich途径

酵母和乳酸菌在食品发酵中除了生成乙醇, 还常常伴随着脂肪醇和芳香醇的形成, 这些物质被称为杂醇, 发酵食品独特的风味和香气正是由此而来^[76]。这些杂醇的代谢途径由Ehrlich首次提出^[77]: 最开始氨基酸在转氨酶的作用下生成 α -酮酸, 由于这些 α -酮酸不能重新定向到中心代谢中

去, 在被排除体外之前经由Ehrlich途径的脱羧酶脱去 CO_2 成为对应的醛, 而后经还原成为杂醇或进一步氧化得到相应的杂酸。

上述步骤中的脱羧不可逆, 是该途径的决速步骤。酿酒酵母中的5个脱羧酶基因(*PDC1*、*PDC5*、*PDC6*、*ARO10*和*THI3*)中, 前3个编码丙酮酸脱羧酶^[78-80]。Vuralhan等^[81]发现在酿酒酵母中*ARO10*是唯一的适用于Ehrlich途径的脱羧酶基因, 其转录谱与培养物中的 β -酮酸脱羧酶活性密切相关; 他们运用遗传、生理和生化方法对Arop10p进行全面表征, 证实其是一种具有广泛底物特异性的脱羧酶^[82]。Iraqi等^[83]发现*ARO80*的36bp上游激活序列对于促进芳香族氨基酸转录诱导是必要且充分的, 证明Aro80p是介导芳香族氨基酸转氨酶和脱羧酶的转录激活因子。Mojzita等^[84]证明Thi3p参与酿酒酵母中硫胺素稳态的调节, 而且与Pdc1p、Pdc5p、Pdc6p和Aro10p定位在细胞质内不同, Nosaka等^[85]观察到Thi3p定位在细胞质和细胞核中, 证明Thi3p可能起调节作用而非催化作用。在乳酸菌中*KCDA*编码一种 β -酮酸脱羧酶, 被证明也具有广泛的底物特异性, 且对支链 α -酮酸表现出的活性最高^[86]。

3.2 酮酸途径

然而, 天然的Ehrlich途径合成的杂醇浓度较低, 不适用于生产。为了探究该途径用于生产的潜力, Atsumi等^[87]在2008年开发了一种通过酶的组合和优化来生产 $\text{C}_3\sim\text{C}_5$ 醇类的策略。该策略合成醇的路径首先是将2-酮酸通过2-酮酸脱羧酶(KDC)脱羧转化为少一个碳原子的醛, 然后通过醇脱氢酶(ADH)还原为醇(图3)。由于脱羧酶在植物、酵母和真菌中常见, 而细菌中很少见^[88], 他们筛选了来自酿酒酵母、乳酸菌和丙酮酸梭菌内的5种KDC, 结果证明来自酿酒酵母的*ARO10*和来自乳酸菌的*KIVD*具有较好的脱羧活性和较宽的底物范围, 且*KIVD*的催化活性更高。通过*KIVD*, 合成了1-丙醇、1-丁醇、异丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-丁醇和2-苯基乙醇。3-甲基-1-丁醇^[89]、异丁醇^[90]和2-甲基-1-丁醇^[91]的生产也在此基础上进行了优化。

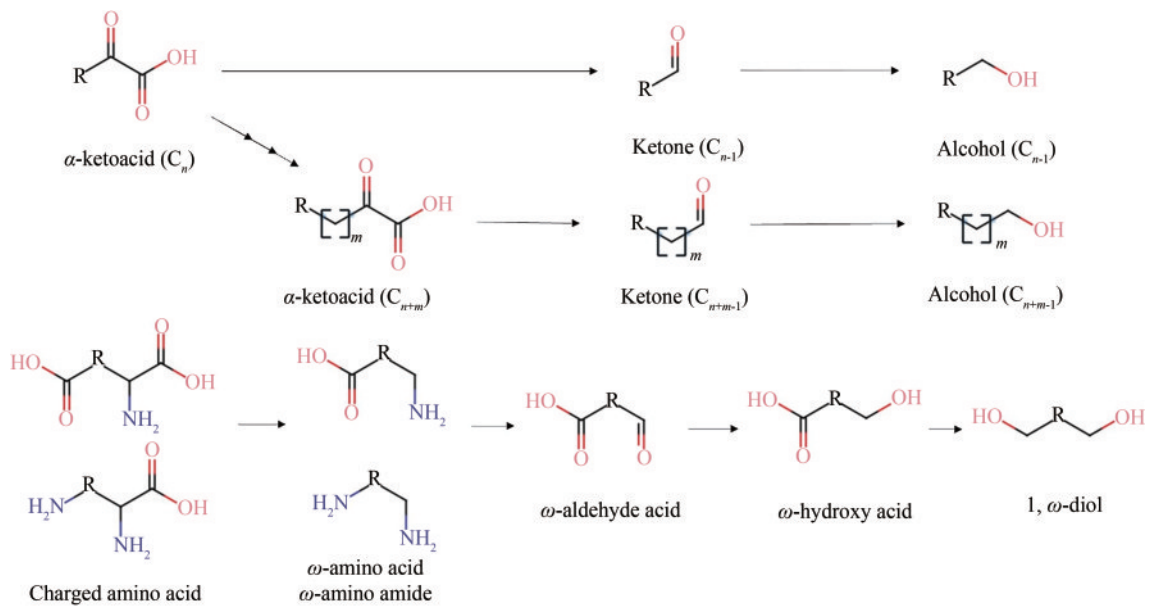


图3 酮酸/氨基酸途径合成醇、二醇

Fig. 3 Ketoacid/amino acid pathway for production of alcohol and diol

Zhang 等^[92]通过设计2-异丙基苹果酸合酶的链延伸活性,从而合成碳链更长的酮酸,这个链延长的反应来自于亮氨酸的生物合成,其作用是将酮异戊酸转化为酮异己酸。这项研究发现仅仅突变反应的第1个酶2-异丙基苹果酸合酶是必需的,随后的酶由于其非特异性催化的特点可以接受更大的底物,然后再基于上述的酮酸途径,构建了生产 $C_5 \sim C_8$ 的长链醇的代谢通路。

除了醇之外,酮酸途径还能用来生产羧酸。Xiong 等^[93]通过对2-酮酸脱羧酶的工程选择性和对杂合醛脱氢酶的筛选,构建了同时产生 C_5 和 C_6 酸的合成途径。特别地,异戊酸的产量达到32 g/L (0.22 g/g的葡萄糖产率),达到了理论产率的58%。

3.3 氨基酸途径

氨基酸生产方法主要有蛋白质水解、化学合成及微生物发酵。随着技术不断革新,氨基酸的市场份额也逐年增长。Wendisch 等^[94]预计全球氨基酸需求在2017—2022年期间将以5.6%的年增长率增长,到2022年将达到256亿美元,其中动物饲料氨基酸为增长最快的市场。各种氨基酸中年产量最高的谷氨酸在2020年的年产量高达321万吨。

由于酮酸途径本身建立在氨基酸合成途径上,

而氨基酸作为蛋白质的基本组成单位,也是几乎所有微生物的主要内源性代谢产物之一,故氨基酸途径具有很好的生物体相容性,利用氨基酸途径在诸如酵母/枯草芽孢杆菌和热纤梭状芽孢杆菌内的工作也都有报道^[95-97]。

基于氨基酸的代谢,类似3.2节中的酮酸途径,Wang 等^[98]于2020年提出了一种合成 $C_3 \sim C_5$ ω -二醇的策略:首先将带电氨基酸 α 位的羧基由脱羧酶脱去得到 ω -氨基酸或者 ω -二胺,然后通过氧化还原反应将氨基和羧基转化为 ω -羟酸,最后经过一步酶促反应还原 ω -羟酸生成 ω -二醇(图3)。这项工作中不仅提供了直接从7种氨基酸合成 $C_3 \sim C_5$ ω -二醇的平台,也验证了从糖到二醇途径的可行性。由于CAR对 ω -羟酸的高效催化,使得上游氨基酸到 ω -羟酸的步骤是这一途径的瓶颈,为进一步改善该平台的实用性,需对上游通路进行优化。可行的手段主要有:通过进行其他遗传操作提高微生物宿主中的氨基酸通量;或者直接将宿主替换为成熟的氨基酸高产菌株(如谷氨酸棒状杆菌)实现;筛选更加高效的代谢酶来消除瓶颈。

除此之外,带电氨基酸作为原料也被报道用于生产 ω -羟酸、二羧酸、二胺和内酰胺等^[99-100]。例如,Yu 等^[101]过量表达来源于共生梭菌(*Clostridium symbiosum*)的2-羟基戊二酸脱氢酶基因(*HGDH*)、

2-羟基戊二酰辅酶A脱水酶基因 (*HGDAB*)、谷氨酸辅酶A转移酶基因 (*GCTAB*) 和酸性氨基球菌 (*Acidaminococcus fermentans*) 的2-羟基戊二酰辅酶A脱水酶基因 (*HGDC*) 构建了谷氨酸生物合成途径, 通过表达来自密螺旋体 (*Treponema denticola*) 的混杂反式双键-CoA还原酶基因 (*TER*) 和大肠杆菌的硫酯酶基因 (*TESA*) 成功生产了戊二酸。值得注意的是, 与之前的酮酸途径、氨基酸途径不同, 该途径中没有 CO_2 损失, 具有100%的碳效率。然而, 该途径的一个缺点是由于2-羟基戊二酰辅酶A脱水酶的氧敏感性, 其仅在厌氧条件下有生物活性。为了解决这个问题, 厌氧诱导的 *NAR* 的启动子被选用于表达编码2-羟基戊二酰辅酶A脱水酶及其激活因子的 *HGDABC* 基因, 通过好氧-厌氧两阶段法生长得到的菌株可产生0.0116 g/L的戊二酸^[102]。

4 β -氧化逆循环途径

4.1 β -氧化途径

β -氧化 (β -oxidation, BOX) 是生物体内代谢脂肪酸的常见代谢途径^[103-104]。首先脂肪酸由酰基

辅酶A合成酶活化生成酰基辅酶A硫酯; 然后, 酰基辅酶A脱氢酶使用FAD将酰基辅酶A硫酯氧化为 β -反式烯酰基辅酶A; 接着通过烯酰基辅酶A水合酶将其加成为3-羟基酰基辅酶A; 3-羟基酰基辅酶A经其脱氢酶氧化为3-氧代酰基辅酶A; 最后经由相应的硫解酶分解成乙酰辅酶A和碳原子减少2的酰基辅酶A。

4.2 β -氧化逆循环

利用 β -氧化循环的逆途径可以构建许多生产特定产物的平台^[105-109]。Dellomonaco等^[110]证明BOX的逆循环途径 (reversal of β -oxidation pathway, RBO) 可用作合成直链醇、脂肪酸、1,3-二醇、3-羟基羧酸、3-氧代醇、3-氧代酸、反式-2-烯醇、反式-2-烯酸的代谢平台 (图4)。他们首先敲除编码分解代谢物阻遏因子Crp、全局调节蛋白ArcA的基因, 解除了其对 β -氧化作用的调控, 再通过引入乙酰乙酸代谢调节蛋白AtoC和脂肪酸代谢调节蛋白FadR的突变体, 实现了编码大肠杆菌 β -氧化循环的Fad和Ato调节子的组成型表达。另外, 敲除了消耗乙酰辅酶A并产生乙酸、乙醇和琥珀酸的竞争途径。由于天然的3-氧代酰基-CoA

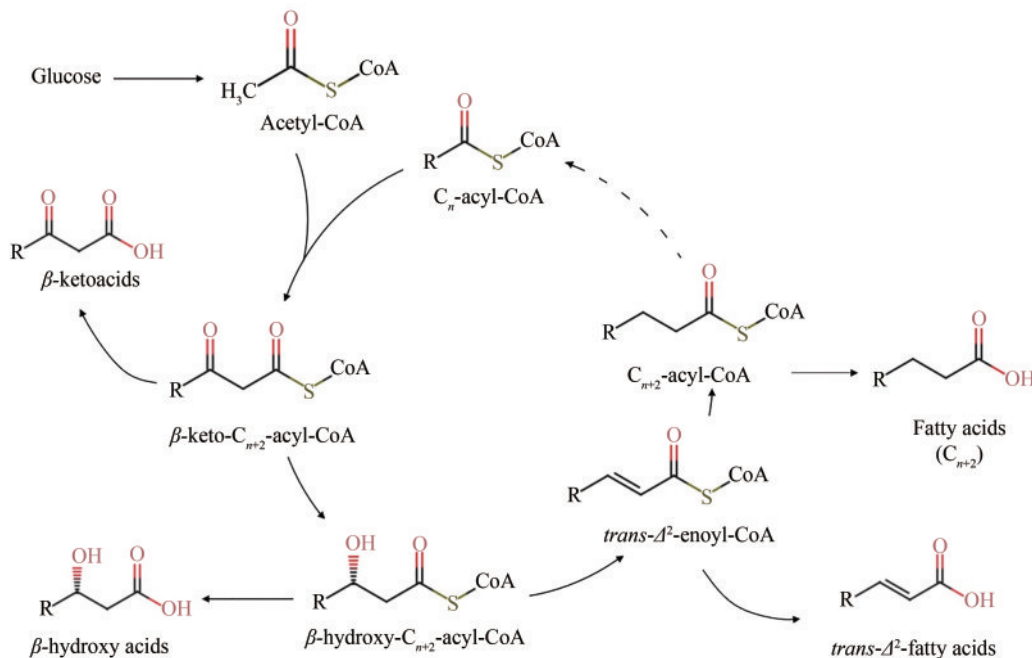


图4 β -氧化逆循环^[110]

Fig. 4 Reversal of β -oxidation^[110]

硫解酶是限速步骤，过表达编码乙酰乙酰辅酶A硫解酶（途径起始）和L-1,2,2-丙二醇氧化还原酶（用于将丁醛转化为正丁醇）的天然 *YQEF* 和 *FUCO* 基因。由此生产了14 g/L的正丁醇，每克葡萄糖的产量为0.33 g的正丁醇。基因敲除和基因互补实验表明，*YqeF*（乙酰乙酰辅酶A硫解酶）、*FadB*（3-羟酰基辅酶A脱氢酶/烯酰辅酶A水合酶）和 *YdiO*（潜在的辅酶酰基辅酶A脱氢酶）主要催化反向 β -氧化循环的反应。因为起始碳链和增长单元都由乙酰辅酶A提供，故 *Dellomonaco* 等检测到的直链醇和长链脂肪酸都含有偶数个数的碳原子。在补充丙酸作为碳链的起始分子时，则可以检测到碳链数为奇数的脂肪酸。

Clomburg 等^[111]利用硫解酶（*BktB*）和硫酯酶（*YdiI*）结合其他 β -氧化逆循环相关的酶构建了RBS，并构建了基于 *cumate* 诱导的表达双键还原酶的体系，从而建立了能够生成 $C_6 \sim C_{10}$ 羧酸的平台。在此基础上额外表达不动杆菌SE19的 *ChnD*、*ChnE* 以及 *AlkBGT* 对产物进一步氧化，也为合成 ω 官能化羧酸如羟基酸、二元酸等提供了途径，使产品进一步多元化。例如，*Clomburg* 等^[111]通过过量表达 *Cupriavidus necator* 的硫解酶（*BktB*）大肠杆菌的双功能3-羟酰基-CoA脱氢酶/脱水酶（*FadB*）和反式双键-CoA还原酶（*Ter*）在大肠杆菌内构建了 β -氧化逆循环。在此基础上，通过异源表达烷烃单加氧酶、醇脱氢酶和醛脱氢酶实现了 ω -氧化，在大肠杆菌中从甘油生产了0.17 g/L的1,6-己二酸。

Cheong 等^[112]发现，除了乙酰辅酶A以外，丙酰基辅酶A和乙醇酰辅酶A均能够用作链增长单元参与 β -氧化逆循环，他们将这些单元与不同的底物结合使用，从该途径中生产了高达18种不同的化合物。这也为该途径用于合成特定非天然产物提供了生产策略。

相较于脂肪酸合成途径^[113-114]， β -氧化逆循环途径在合成正构醇时更有效率。前者低效率的原因在于合成丙二酰-ACP，2个碳原子供体用于链延长以及酰基-ACP中间体使用时，均需要转化为游离酸并且再酰化，然后才能还原为醇，这些步骤都是ATP消耗的步骤，所以前者能量的利用效率不高。

5 聚酮化合物合酶途径

5.1 PKS的种类及I型PKS的反应机理

PKS是聚酮化合物合酶（polyketide synthase pathway），一共分为3种类型，I型PKS是具有催化能力的结构域构成模块组合成的大合酶^[115]。典型的I型PKS最少包含一个负责建立单体选择和负载的酰基转移酶（AT）域，一个带有40个磷酸鸟嘌呤臂来携带新生聚酮链的酰基载体蛋白（ACP）域和一个酮合酶（KS）催化脱羧克萊森缩合反应以延长碳链的结构域。PKS巨合酶也可能包含几个可选的催化结构域，例如酮还原酶（KR）、脱水酶（DH）、烯酰还原酶（ER）和甲基转移酶（CMT）。这些模块顺序组合在一起，可以单向或者迭代地连接各种酰基辅酶A的链增长单元。II型PKS最少包含两个酮合酶异二聚体（KS的 α -亚基和 β -亚基）和一个ACP结构域，主要催化芳香聚酮化合物的生物合成^[116]。III型PKS结构简单，是一种能够重复使用的酮合酶（KS），该单一的KS域可以执行I型和II型PKS基本域的所有功能^[117]。

3种PKS中对I型PKS研究最为深入^[118]。类似于脂肪酸的生物合成，PKS在负载了酰基-ACP中间体和酰基辅酶A单元之间进行克萊森缩合反应，然后通过辅助结构改变 β -羰基的还原度，聚酮化合物通过KS的巯基接受上游的ACP的硫酯，进行的硫酯交换反应从上一个模块转移到下一个模块，最后通过硫酯酶（TE）结构域将聚酮化合物从装配线中释放出来，随后通过下游的酶进行后修饰，从而可以生产具有复杂结构的多种产品（图5、图6）^[119-122]。

5.2 PKS产物多样性的探索

天然PKS产物的多样性主要来自于不同的氧化过程、环化方式以及后续的PKS修饰。天然的AT结构域的底物通常为丙二酰辅酶A和甲基丙二酰辅酶A，极少数情况下为乙基丙二酰辅酶A。*Kalkreuter* 等^[123]对吡咯霉素PKS最后两个模块的AT结构域进行活性位点突变，改变了其对底物的选择性，使其能够特异性结合非天然的链增长单元（丙二酰类似物），首次合成了带有两个非天然链增

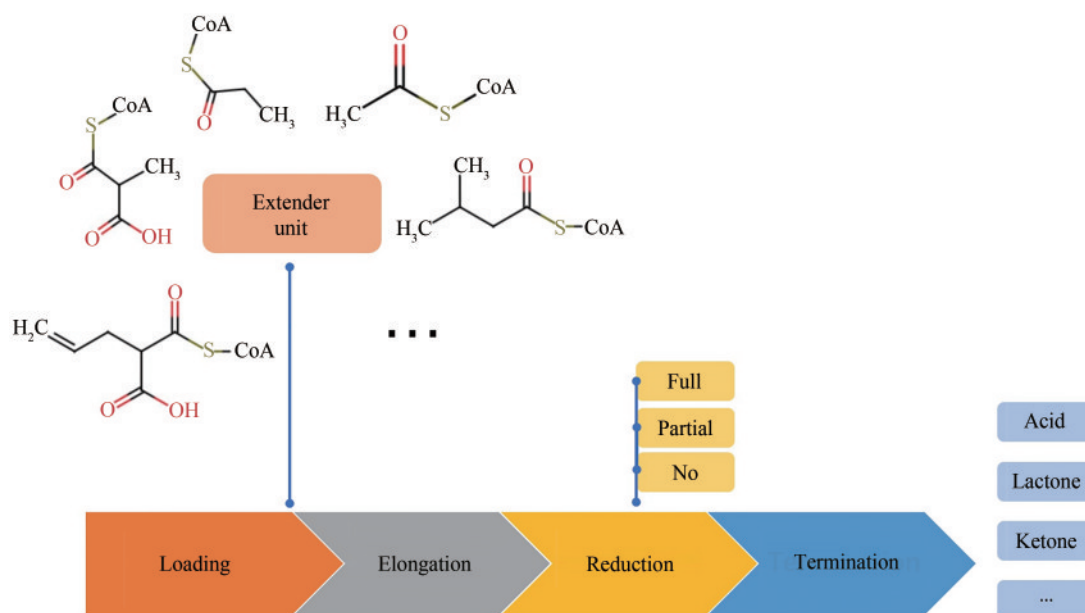


图5 I型PKS装配线

Fig. 5 Assembly line of type I polyketide synthase

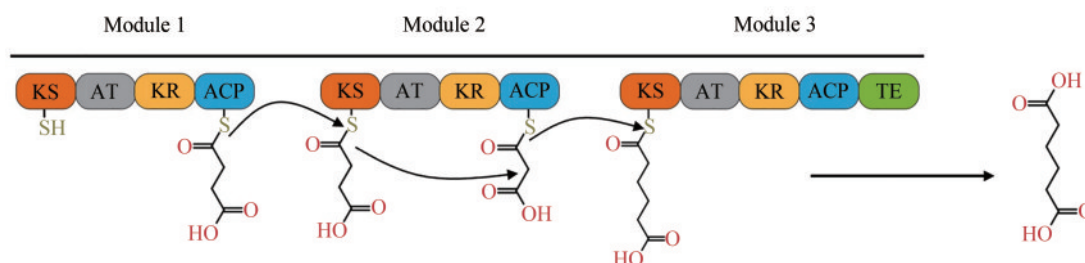


图6 以合成己二酸为例的PKS途径

[其中一共有3个模块，底物通过硫酯交换反应从前一个模块转移到下一个模块，最后通过硫酯酶（TEp）结构域释放]

Fig. 6 PKS pathway for production of adipic acid

[There are 3 respective modules. Substrate is transferred from previous module to next one via thioester exchange reaction, and finally released by thioesterase (TEp) domain]

长单元的全长聚酮化合物。Eng等^[124]使用含有混杂负载AT的脂霉素合酶作为模型，在合成短链 β -羟基酸的时候通过KR交换将 α -甲基的立体化学变化由反式变为反式。Zargar等^[125]重新设计了部分还原的PKS模块，通过还原回路的交换产生饱和的 β -碳，在这项工作中他们使用链霉菌J1074产生了165 mg/L的短链脂肪酸（2,4-二甲基戊酸）。Lünne等^[126]在*Claviceps purpurea*中过表达聚酮化合物合酶的基因PKS7，生产了柠檬酸、柠檬酸乙酯等产品。Hagen等^[127]提出了一种通过质谱监测的方式来对每个模块执行的化学反应进行表征，从而能有效指导组装PKS的功能系统。他们在一个PKS中的

扩展模块部分引入了多种PKS簇的异源还原结构域，通过筛选的方式得到了一个能够将琥珀酰辅酶A和丙二酰辅酶A合成己二酸的PKS。这些工作很大程度上扩展了PKS平台的综合潜力。

6 总结与展望

本文描述了构建人工代谢途径以实现生物合成有机醇和有机酸的一些进展。

虽然甲醇这类一碳有机物可从二氧化碳或者农业食品加工业的废料之中制备，成本较低，在

大肠杆菌内构建 RuMP 循环为异养微生物固碳、有机废料再利用提供了一种新的策略。但由于除扭脱甲基杆菌以外的多数菌对甲醇不耐受，利用甲醇作碳源进行生物发酵仍然是一个巨大挑战。

木糖广泛存在于农林业废弃物中，利用木糖作为发酵原料也是一直以来研究的热点。木质纤维素水解产物用于发酵时混合糖对木糖利用率的抑制以及水解产物中对微生物的抑制物问题是该途径面临的一个挑战。木糖的非磷酸化途径酶促步骤少，碳原子的理论利用率高，将非磷酸化代谢引入宿主的代谢网络有望提高木糖的代谢效率。

有机醇和有机酸是常见的生物燃料和重要的化工原料，其中乙醇是目前常见的生物燃料^[128]，然而，随着技术进步，生产具有更好的燃烧性能的长链醇及脂肪酸替代乙醇将是未来生物质能源的一个重要方向。近期报道中利用酮酸或氨基酸途径生产醇、二醇和脂肪酸的平台生产产率仍然较低，其商业化仍然面临着酶催化活性低、代谢通量不足等挑战。但这些平台的出现扩大了产物的多样性，并为有机酸和有机醇的工业化生产提供了新的思路。

近年来人们通过表达编码酰基-ACP 硫酯酶的异源基因，借由脂肪酸合成途径来生产游离态脂肪酸。但是由于脂肪酸合成途径遵循 FAS 络合物的重复循环催化，因此直接合成某个特定产物极具挑战性。对比脂肪酸合成途径， β -氧化逆循环途径中由 3-氧代酰基辅酶硫醇酶催化的用于链延长的非脱羧性克莱森缩合反应直接消耗了乙酰辅酶 A 作为延伸单元。因此， β -氧化逆循环途径的应用规避了乙酰辅酶 A 的耗能的羧化步骤，具有能量和还原当量利用率高的优点。目前为止，该途径应用面临的巨大挑战是反应产物产量不高。乙酰辅酶 A 在 β -氧化逆循环途径中作为链增长单元，而同时又是细胞碳代谢中的关键代谢产物。因此，未来宿主菌株的工程操作可能集中在作为该酶底物的酰基辅酶 A 和乙酰辅酶 A 的过量生产上，结合用下游的反应步骤快速除去产物 3-氧代酰基辅酶 A 的措施以及释放的辅酶 A 的有效循环措施，将大大增加合成代谢方向的通量。

通过 PKS 系统来实现生产特定产物在结构生物学和合成生物学方面都是巨大的机遇与挑战。

总的来说，由于其多模块的特性，PKS 提供了一个通用的合成平台。尽管全基因组测序的进展导致 PKS 不断地被发现，但是很多 PKS 的产物仍然不为人所知。而且由于 PKS 复合体具有异常大的空间尺寸和柔韧性，很难对完整的 PKS 酶及其相关催化状态进行结构分析。酶-底物的识别，模块结构域之间的相互作用等都是制约 PKS 下一步研究的难题。尽管如此，PKS 平台仍然不失为合成特定有机酸的一个有效方法。

以上的多条代谢途径多来源于微生物的内源代谢，因此可以探索广泛的生物体作为生产宿主。这些合成途径中的各项反应种类繁多，诸如链增长、氧化、还原、环化等，所以理论上以特定分子为目标建立新的代谢途径是可行的。建立目标产品的人工代谢途径，可以类比有机合成，根据化学合成的路线进行逆向分析，同时结合生物体内的天然分子，利用酶的催化将前体与产物连接，从而搭建合成途径。其中前体与底物之间的催化过程通常不是天然的，需要引入新的酶来催化该过程。这些酶可以是多种异源的蛋白质中筛选出来，也可以由催化类似反应的同工酶对底物的非特异性来实现，还可以通过蛋白质工程对酶进行设计得到。由此构建得到的人工代谢途径再经过代谢工程技术的优化，从而得以提高产量和产率，实现目标产物的生物合成。

可以预期，随着基因组学、蛋白质组学、代谢组学的进一步发展，元件库的不断扩充，各项技术的日渐成熟，人工代谢途径的设计、构建和优化将更加便捷、合理、高效。这将为生物合成有机醇和有机酸领域带来重大突破，推动产业可持续发展。

参 考 文 献

- [1] 丁明珠, 李炳志, 王颖, 等. 合成生物学重要研究方向进展[J]. 合成生物学, 2020, 1(1): 7-28.
DING M Z, LI B Z, WANG Y, et al. Significant research progress in synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(1): 7-28.
- [2] PACALA S, SOCOLOW R. Stabilization wedges: Solving the climate problem for the next 50 years with current technologies[J]. Science, 2004, 305(5686): 968-972.
- [3] O'NEILL B C, OPPENHEIMER M. Climate change. Danger-

- ous climate impacts and the Kyoto protocol[J]. *Science*, 2002, 296(5575): 1971-1972.
- [4] 任光. 我国煤制甲醇的工业现状及发展趋势分析[J]. *化肥设计*, 2016, 54(5): 5-7.
- REN G. Analysis on present situation and development trend of coal methanol industry in China[J]. *Chemical Fertilizer Design*, 2016, 54(5): 5-7.
- [5] 高姣丽, 潘子鹤, 成怀刚, 等. CO₂催化制甲酸反应设备的现状与研究进展[J]. *化工机械*, 2020, 47(6): 737-741.
- GAO J L, PAN Z H, CHENG H G, et al. Status and research progress of reaction equipment for preparation of formic acid catalyzed by CO₂[J]. *Chemical Engineering & Machinery*, 2020, 47(6): 737-741.
- [6] CHEN X, LIU Y, WU J W. Sustainable production of formic acid from biomass and carbon dioxide[J]. *Molecular Catalysis*, 2020, 483: 110716.
- [7] LI H, OPGENORTH P H, WERNICK D G, et al. Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols[J]. *Science*, 2012, 335(6076): 1596.
- [8] SAWATDEENARUNAT C, NGUYEN D, SURENDRA K C, et al. Anaerobic biorefinery: current status, challenges, and opportunities[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 215: 304-313.
- [9] CLOMBURG J M, CRUMBLY A M, GONZALEZ R. Industrial biomanufacturing: the future of chemical production [J]. *Science*, 2017, 355(6320): aag0804.
- [10] ZENG A P. New bioproduction systems for chemicals and fuels: Needs and new development[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(4): 508-518.
- [11] CHEN F Y H, JUNG H W, TSUEI C Y, et al. Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 933-946.
- [12] BODEN R, CUNLIFFE M, SCANLAN J, et al. Complete genome sequence of the aerobic marine methanotroph *Methylobacterium methanica* MC09[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(24): 7001-7002.
- [13] PEEL D, QUAYLE J R. Microbial growth on C₁ compounds (I): Isolation and characterization of *Pseudomonas* AM 1[J]. *Biochemical Journal*, 1961, 81(3): 465-469.
- [14] STROM T, FERENCI T, QUAYLE J R. The carbon assimilation pathways of *Methylobacterium capsulatus*, *Pseudomonas methanica* and *Methylosinus trichosporium* (OB3B) during growth on methane[J]. *The Biochemical Journal*, 1974, 144(3): 465-476.
- [15] WHITAKER W B, JONES J A, BENNETT R K, et al. Engineering the biological conversion of methanol to specialty chemicals in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 49-59.
- [16] KALYUZHAYAYA M G, YANG S, ROZOVA O N, et al. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium[J]. *Nature Communications*, 2013, 4(1): 2785.
- [17] MEYER F, KELLER P, HARTL J, et al. Methanol-essential growth of *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1508.
- [18] WOOLSTON B M, KING J R, REITER M, et al. Improving formaldehyde consumption drives methanol assimilation in engineered *E. coli* [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2387-2398.
- [19] YU H, LIAO J C. A modified serine cycle in *Escherichia coli* converts methanol and CO₂ to two-carbon compounds[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3992.
- [20] 郭姝媛, 吴良焕, 刘香健, 等. 微生物中一碳代谢网络构建的进展与挑战[J/OL]. *合成生物学*: 1-24, doi: 10.12211/2096-8280.2021-079. <http://synbioj.cip.com.cn/CN/10.12211/2096-8280.2021-079>.
- GUO Shuyuan, WU Lianghuan, LIU Xiangjian, et al. The biotransformation outlook of C₁-based metabolic networks in methylotrophy[J/OL]. *Synthetic Biology Journal*: 1-24, doi: 10.12211/2096-8280.2021-079. <http://synbioj.cip.com.cn/CN/10.12211/2096-8280.2021-079>.
- [21] GOYAL N, ZHOU Z, KARIMI I A. Metabolic processes of *Methanococcus maripaludis* and potential applications[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 107.
- [22] SOHN Y J, SON J, JO S Y, et al. Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125693.
- [23] KOZLOWSKI J T, DAVIS R J. Heterogeneous catalysts for the guerbet coupling of alcohols[J]. *ACS Catalysis*, 2013, 3(7): 1588-1600.
- [24] LIAO J C, MI L, PONTRELLI S, et al. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(5): 288-304.
- [25] IRLA M, NÆRDAL I, BRAUTASET T, et al. Methanol-based γ -aminobutyric acid (GABA) production by genetically engineered *Bacillus methanolicus* strains[J]. *Industrial Crops and Products*, 2017, 106: 12-20.
- [26] HU B, YANG Y M, BECK D A C, et al. Comprehensive molecular characterization of *Methylobacterium extorquens* AM1 adapted for 1-butanol tolerance[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 84-97.
- [27] ROHDE M T, TISCHER S, HARMS H, et al. Production of 2-hydroxyisobutyric acid from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 expressing (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA isomerizing enzymes [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2017, 83(3): AEM.02622-16.
- [28] YANG Y M, CHEN W J, YANG J, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid in engineered *Methylobacterium extorquens* AM1 and its reassimilation through a reductive route[J]. *Micro-*

- bial Cell Factories, 2017, 16(1): 179.
- [29] CUI L Y, WANG S S, GUAN C G, et al. Breeding of methanol-tolerant *Methylobacterium extorquens* AM1 by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis combined with adaptive laboratory evolution[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(6): e1700679.
- [30] YAMADA R, OGURA K, KIMOTO Y, et al. Toward the construction of a technology platform for chemicals production from methanol: D-lactic acid production from methanol by an engineered yeast *Pichia pastoris* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(2): 37-45.
- [31] GODDARD A W. Cortical and subcortical gamma amino acid butyric acid deficits in anxiety and stress disorders: clinical implications[J]. *World Journal of Psychiatry*, 2016, 6(1): 43-53.
- [32] BOGORAD I W, CHEN C T, THEISEN M K, et al. Building carbon-carbon bonds using a biocatalytic methanol condensation cycle[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(45): 15928-15933.
- [33] TILMAN D, SOLOW R, FOLEY J A, et al. Beneficial biofuels—the food, energy, and environment trilemma[J]. *Science*, 2009, 325(5938): 270-271.
- [34] GRAHAM-ROWE D. Agriculture: beyond food versus fuel[J]. *Nature*, 2011, 474(7352): S6-S8.
- [35] PERLACK R D, WRIGHT L L, TURHOLLOW A F, et al. Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply[R]. Office of Scientific and Technical Information (OSTI), 2005.
- [36] SOMERVILLE C. The billion-ton biofuels vision[J]. *Science*, 2006, 312(5778): 1277.
- [37] RAGAUSKAS A J, WILLIAMS C K, DAVISON B H, et al. The path forward for biofuels and biomaterials[J]. *Science*, 2006, 311(5760): 484-489.
- [38] GALL D L, RALPH J, DONOHUE T J, et al. Biochemical transformation of lignin for deriving valued commodities from lignocellulose[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 45: 120-126.
- [39] QIN L, LI W C, LIU L, et al. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 70.
- [40] LI W C, ZHU J Q, ZHAO X, et al. Improving co-fermentation of glucose and xylose by adaptive evolution of engineering xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* and different fermentation strategies[J]. *Renewable Energy*, 2019, 139: 1176-1183.
- [41] LIU H, ZHU J Q, LI X, et al. Hybridization improves inhibitor tolerance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *BioResources*, 2017, 12(3): 4737-4753.
- [42] JEFFRIES T W. Engineering yeasts for xylose metabolism[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(3): 320-326.
- [43] MATSUSHIKA A, INOUE H, KODAKI T, et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(1): 37-53.
- [44] LIU L X, ZHANG L, TANG W, et al. Phosphoketolase pathway for xylose catabolism in *Clostridium acetobutylicum* revealed by ¹³C metabolic flux analysis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(19): 5413-5422.
- [45] TANAKA K, KOMIYAMA A, SONOMOTO K, et al. Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(1/2): 160-167.
- [46] SCALCINATI G, OTERO J M, VAN VLEET J R H, et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient aerobic xylose consumption[J]. *FEMS Yeast Research*, 2012, 12(5): 582-597.
- [47] WEIMBERG R. Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236(3): 629-635.
- [48] DAHMS A S. 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1974, 60(4): 1433-9.
- [49] KUHAD R C, GUPTA R, KHASA Y P, et al. Bioethanol production from pentose sugars: current status and future prospects[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011, 15(9): 4950-4962.
- [50] KIM S R, PARK Y C, JIN Y S, et al. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 851-861.
- [51] QI X, ZHA J, LIU G-G, et al. Heterologous xylose isomerase pathway and evolutionary engineering improve xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1165.
- [52] GOPINARAYANAN V E, NAIR N U. Pentose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the need to engineer global regulatory systems[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(1): e1800364.
- [53] KWAK S, JIN Y S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective [J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 82-96.
- [54] ZHA J, SHEN M H, HU M L, et al. Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(1): 27-39.
- [55] HOU J, SHEN Y, JIAO C L, et al. Characterization and evolu-

- tion of xylose isomerase screened from the bovine rumen metagenome in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 121(2): 160-165.
- [56] KATAHIRA S, MURAMOTO N, MORIYA S, et al. Screening and evolution of a novel protist xylose isomerase from the termite *Reticulitermes speratus* for efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 203-220.
- [57] SONDEREGGER M, SAUER U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 1990-1998.
- [58] MADHAVAN A, TAMALAMPUDI S, USHIDA K, et al. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(6): 1067-1078.
- [59] KUYPER M, TOIRKENS M J, DIDERICH J A, et al. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. *FEMS Yeast Research*, 2005, 5(10): 925-934.
- [60] HOU J, QIU C X, SHEN Y, et al. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficient co-utilization of glucose and xylose[J]. *FEMS Yeast Research*, 2017, 17(4): fox034.
- [61] WANG X, JIN M J, BALAN V, et al. Comparative metabolic profiling revealed limitations in xylose-fermenting yeast during co-fermentation of glucose and xylose in the presence of inhibitors[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(1): 152-164.
- [62] LÜ Y J, WANG X, MA Q, et al. Proteomic analysis reveals complex metabolic regulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells against multiple inhibitors stress[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(5): 2207-2221.
- [63] ZHA J, LI B Z, SHEN M H, et al. Optimization of CDT-1 and XYL1 expression for balanced co-production of ethanol and xylitol from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68317.
- [64] DUNN K L, RAO C V. High-throughput sequencing reveals adaptation-induced mutations in pentose-fermenting strains of *Zymomonas mobilis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(11): 2228-2240.
- [65] DUNN K L, RAO C V. Expression of a xylose-specific transporter improves ethanol production by metabolically engineered *Zymomonas mobilis* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(15): 6897-6905.
- [66] YOUNG E M, TONG A, BUI H, et al. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(1): 131-136.
- [67] SARKAR P, MUKHERJEE M, GOSWAMI G, et al. Adaptive laboratory evolution induced novel mutations in *Zymomonas mobilis* ATCC ZW658: a potential platform for co-utilization of glucose and xylose[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(3): 329-341.
- [68] SARKAR P, GOSWAMI G, MUKHERJEE M, et al. Heterologous expression of xylose specific transporter improves xylose utilization by recombinant *Zymomonas mobilis* strain in presence of glucose[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 102: 190-198.
- [69] TAI Y S, XIONG M, JAMBUNATHAN P, et al. Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(4): 247-253.
- [70] 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.
- [71] 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.
- [72] WANG J, SHEN X L, JAIN R, et al. Establishing a novel biosynthetic pathway for the production of 3,4-dihydroxybutyric acid from xylose in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 39-45.
- [73] WANG J, SHEN X L, LIN Y H, et al. Investigation of the synergistic effect of xylose metabolic pathways on the production of glutaric acid[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 24-29.
- [74] BAI W Q, TAI Y S, WANG J Y, et al. Engineering nonphosphorylative metabolism to synthesize mesaconate from lignocellulosic sugars in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 285-292.
- [75] WEI N, QUARTERMAN J, KIM S R, et al. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2580.
- [76] MEILGAARD M C. Flavor chemistry of beer (II): Flavor and threshold of 239 aroma volatiles [J]. *Techquartmasterbrewassocam*, 1975, 12: 22-8.
- [77] EHRLICH F. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe [J]. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1907, 40(1): 1027-1047.
- [78] HOHMANN S. Characterisation of *PDC2*, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1993, 241(5/6): 657-666.
- [79] HOHMANN S. Characterization of *PDC6*, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(24): 7963-7969.
- [80] HOHMANN S, CEDERBERG H. Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes

- PDC1* and *PDC5*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1990, 188(3): 615-621.
- [81] VURALHAN Z, MORAIS M A, TAI S L, et al. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4534-4541.
- [82] VURALHAN Z, LUTTIK M A, TAI S L, et al. Physiological characterization of the ARO10-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(6): 3276-3284.
- [83] IRAQUI I, VISSERS S, ANDRÉ B, et al. Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(5): 3360-3371.
- [84] MOJZITA D, HOHMANN S. Pdc2 coordinates expression of the THI regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, 276(2): 147-161.
- [85] NOSAKA K, ONOZUKA M, KONNO H, et al. Genetic regulation mediated by thiamin pyrophosphate-binding motif in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(2): 467-479.
- [86] SMIT G, SMIT B A, ENGELS W J M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(3): 591-610.
- [87] ATSUMI S, HANAI T, LIAO J C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels[J]. *Nature*, 2008, 451(7174): 86-89.
- [88] KÖNIG S. Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylases from various organisms[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1385(2): 271-286.
- [89] CONNOR M R, CANN A F, LIAO J C. 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(4): 1155-1164.
- [90] ATSUMI S, WU T Y, ECKL E M, et al. Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 651-657.
- [91] CANN A F, LIAO J C. Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(1): 89-98.
- [92] ZHANG K C, SAWAYA M R, EISENBERG D S, et al. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(52): 20653-20658.
- [93] XIONG M, DENG J, WOODRUFF A P, et al. A bio-catalytic approach to aliphatic ketones[J]. *Scientific Reports*, 2012, 2: 311.
- [94] WENDISCH V F. Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 58: 17-34.
- [95] LIN P P, MI L, MORIOKA A H, et al. Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 31: 44-52.
- [96] LI S S, WEN J P, JIA X Q. Engineering *Bacillus subtilis* for isobutanol production by heterologous Ehrlich pathway construction and the biosynthetic 2-ketoisovalerate precursor pathway overexpression[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(3): 577-589.
- [97] MATSUDA F, ISHII J, KONDO T, et al. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance [J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 119-129.
- [98] WANG J, LI C Y, ZOU Y S, et al. Bacterial synthesis of C₃-C₅ diols *via* extending amino acid catabolism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(32): 19159-19167.
- [99] CHAE T U, AHN J H, KO Y S, et al. Metabolic engineering for the production of dicarboxylic acids and diamines[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 58: 2-16.
- [100] CHAE T U, KO Y S, HWANG K S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of four-, five- and six-carbon lactams[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 82-91.
- [101] YU J L, XIA X X, ZHONG J J, et al. A novel synthetic pathway for glutarate production in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 59: 167-171.
- [102] YU J L, XIA X X, ZHONG J J, et al. Enhanced production of C₅ dicarboxylic acids by aerobic-anaerobic shift in fermentation of engineered *Escherichia coli*[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 62: 53-58.
- [103] SCHULZ H. Beta oxidation of fatty acids[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1081(2): 109-120.
- [104] KATIYAR S S, PORTER J W. Mechanism of fatty acid synthesis[J]. *Life Sciences*, 1977, 20(5): 737-759.
- [105] CLOMBURG J M, VICK J E, BLANKSCHIEEN M D, et al. A synthetic biology approach to engineer a functional reversal of the β -oxidation cycle[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(11): 541-554.
- [106] GULEVICH A Y, SKOROKHODOVA A Y, SUKHOZHENKO A V, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol biosynthesis through the inverted aerobic fatty acid β -oxidation pathway[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(3): 463-469.
- [107] LIAN J Z, ZHAO H M. Reversal of the β -oxidation cycle in *Saccharomyces cerevisiae* for production of fuels and chemicals[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(3): 332-341.
- [108] ZHUANG Q Q, WANG Q, LIANG Q F, et al. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from glucose that contain medium-chain-

- length monomers *via* the reversed fatty acid β -oxidation cycle in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 78-86.
- [109] CINTOLESI A, CLOMBURG J M, GONZALEZ R. In silico assessment of the metabolic capabilities of an engineered functional reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of longer-chain ($C \geq 4$) products[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 23: 100-115.
- [110] DELLOMONACO C, CLOMBURG J M, MILLER E N, et al. Engineered reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals[J]. *Nature*, 2011, 476(7360): 355-359.
- [111] CLOMBURG J M, BLANKSCHEN M D, VICK J E, et al. Integrated engineering of β -oxidation reversal and ω -oxidation pathways for the synthesis of medium chain ω -functionalized carboxylic acids[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 202-212.
- [112] CHEONG S, CLOMBURG J M, GONZALEZ R. Energy- and carbon-efficient synthesis of functionalized small molecules in bacteria using non-decarboxylative Claisen condensation reactions[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(5): 556-561.
- [113] STEEN E J, KANG Y, BOKINSKY G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass[J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 559-562.
- [114] LENNEN R M, BRADEN D J, WEST R A, et al. A process for microbial hydrocarbon synthesis: overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* and catalytic conversion to alkanes[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 106(2): 193-202.
- [115] CAI W L, ZHANG W J. Engineering modular polyketide synthases for production of biofuels and industrial chemicals[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 50: 32-38.
- [116] ZHANG Z, PAN H X, TANG G L. New insights into bacterial type II polyketide biosynthesis[J]. *F1000Research*, 2017, 6: 172.
- [117] SHIMIZU Y, OGATA H, GOTO S. Type III polyketide synthases: functional classification and phylogenomics[J]. *ChemBioChem*, 2017, 18(1): 50-65.
- [118] KHOSLA C, HERSCHLAG D, CANE D E, et al. Assembly line polyketide synthases: Mechanistic insights and unsolved problems[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(18): 2875-2883.
- [119] ZHANG W J, LIU J. Recent advances in understanding and engineering polyketide synthesis[J]. *F1000Research*, 2016, 5: 208.
- [120] WEISSMAN K J. Genetic engineering of modular PKSs: from combinatorial biosynthesis to synthetic biology [J]. *Natural Product Reports*, 2016, 33(2): 203-230.
- [121] WONG F T, KHOSLA C. Combinatorial biosynthesis of polyketides—a perspective[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2012, 16(1/2): 117-123.
- [122] HERTWECK C. Decoding and reprogramming complex polyketide assembly lines: prospects for synthetic biology[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2015, 40(4): 189-199.
- [123] KALKREUTER E, CROWETIPTON J M, LOWELL A N, et al. Engineering the substrate specificity of a modular polyketide synthase for installation of consecutive non-natural extender units[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(5): 1961-1969.
- [124] ENG C H, YUZAWA S, WANG G, et al. Alteration of polyketide stereochemistry from anti to syn by a ketoreductase domain exchange in a type I modular polyketide synthase subunit[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(12): 1677-1680.
- [125] ZARGAR A, LAL R, VALENCIA L, et al. Chemoinformatic-guided engineering of polyketide synthases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(22): 9896-9901.
- [126] LÜNNE F, NIEHAUS E M, LIPINSKI S, et al. Identification of the polyketide synthase PKS₇ responsible for the production of lecanoric acid and ethyl lecanorate in *Claviceps purpurea*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2020, 145: 103481.
- [127] HAGEN A, POUST S, ROND T D, et al. Engineering a polyketide synthase for *in vitro* production of adipic acid[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(1): 21-27.
- [128] FARRELL A E, PLEVIN R J, TURNER B T, et al. Ethanol can contribute to energy and environmental goals [J]. *Science*, 2006, 311(5760): 506-508.



通讯作者: 张科春(1978—), 特聘研究员, 博士生导师。研究方向为应用合成生物、绿色化学、材料科学和工程优化的方法, 设计绿色新化工生产路线和开发环保新材料, 为循环经济向前发展提供新的解决方案。
E-mail: zhangkechun@westlake.edu.cn



第一作者: 曹晨凯(1996—), 男, 博士研究生。研究方向为代谢工程。
E-mail: caochenkai@westlake.edu.cn



第一作者: 李佳隆(1996—), 男, 博士研究生。研究方向为代谢工程。
E-mail: lijialong@westlake.edu.cn