

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-098

在大肠杆菌中从头生物合成3-苯丙醇

高虎涛, 王佳, 孙新晓, 申晓林, 袁其朋

(北京化工大学, 化工资源有效利用国家重点实验室, 北京 100029)

摘要: 3-苯丙醇是一种具有芳香味的高价值香料, 在医药、化妆品、食品等领域有广泛用途, 是生产多种药品和化学品的重要前体。其目前的生产方法主要依赖于植物提取和化学合成, 存在产物得率低、生产周期长和环境不友好等缺点。为解决这些问题, 构建微生物细胞工厂利用可再生资源合成3-苯丙醇具有重要的意义。本研究通过将目标化合物与微生物自身代谢网络建立联系, 基于底物或中间体与产物的结构相似性以及化合物间的基团转移关系, 设计并构建了两条不同的3-苯丙醇的人工生物合成途径。其中, 依赖羧酸还原酶的苯丙醇生物合成途径具有较高的生产效率。在大肠杆菌中实现了以甘油为碳源, 从头生物合成3-苯丙醇, 产量达91 mg/L。通过消除限速步骤, 增加莽草酸途径碳通量以及敲除竞争途径等代谢工程策略的实施, 将苯丙醇的产量提高到了841 mg/L, 较初始菌株产量提高了9.2倍, 为苯丙醇的绿色、可持续、大规模生产提供了基础。

关键词: 3-苯丙醇; 代谢工程; 莽草酸途径; 人工途径设计

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A

De novo biosynthesis of 3-phenylpropanol in E. coli

GAO Hutaο, WANG Jia, SUN Xinxiao, SHEN Xiaolin, YUAN Qipeng

(State Key Laboratory of Effective Utilization of Chemical Resources, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: With the increasing consumption of fossil fuels and growing depravation of environment, development of substitutes for petroleum-derived compounds is becoming more and more important. In the past few years, bio-based production of chemicals, fuels, nutraceuticals and pharmaceuticals from renewable raw materials *via* metabolic engineering has gained significant attention. As a high-value fragrance with aromatic taste, 3-phenylpropanol has been widely used in the production of food additives, cosmetics and etc. It also acts as the precursor and reactant in pharmaceutical and chemical industries. Because of its high efficiency in promoting bile secretion and mild antispasmodic function, 3-phenylpropanol is widely used in the treatment of cholecystitis, gallstones and biliary surgery syndrome. The current production method mainly relies on plant extraction and chemical synthesis, which, however, are challenging due to the high cost of catalyst, strict reaction condition and low product yield. Recently, engineering microorganisms has become an attractive alternative to efficient production of high-value compounds, such

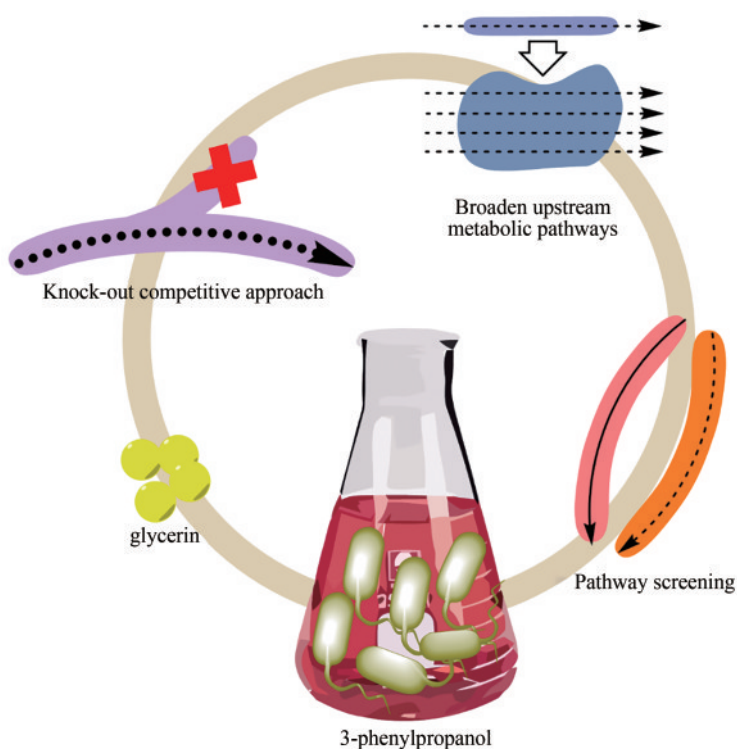
收稿日期: 2021-10-21 修回日期: 2021-11-29

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0901800)

引用本文: 高虎涛, 王佳, 孙新晓, 申晓林, 袁其朋. 在大肠杆菌中从头生物合成3-苯丙醇[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 1046-1060

Citation: GAO Hutaο, WANG Jia, SUN Xinxiao, SHEN Xiaolin, YUAN Qipeng. *De novo biosynthesis of 3-phenylpropanol in E. coli*[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 1046-1060

as flavors, fragrances, cosmetics, pharmaceuticals, solvents, biofuels and other chemicals. It is of great significance to construct a microbial cell factory to synthesize 3-phenylpropanol from renewable resources. In this study, we designed and constructed two different artificial 3-phenylpropanol biosynthetic pathways by establishing a connection between the target compound and the microorganism's own metabolic network. Especially, the pathway that relies on carboxylic acid reductase exhibited high efficiency in the production of 3-phenylpropanol. When using glycerol as the sole carbon source, the recombinant strain successfully generated 91 mg/L 3-phenylpropanol in shake flask experiments. By eliminating the rate-limiting steps, increasing the carbon flux towards the shikimate pathway and knocking out the competitive pathways, the titer of 3-phenylpropanol in the shake flask fermentation culture was finally increased to 841 mg/L, representing a 9.2-fold increase compared with the titer generated by the original strain. This work provides a green and sustainable approach for the production of 3-phenylpropanol.



Keywords: phenylpropanol; metabolic engineering; the shikimate pathway; artificial pathway design

3-苯丙醇又名氢化肉桂醇、利胆醇，天然存在于草莓、茶叶等植物中，它是一种无色、略带油性的液体，具有温和、芳香的花香气味和中等强度的甜味^[1]。由于消费者对天然食品添加剂的偏好，因此市场对天然芳香化合物的需求不断增加。长期以来，高等植物的精油是天然香料的唯一来源^[2]。3-苯丙醇作为精细化的芳香氨基酸衍生物广泛应用于化妆品、食品等领域。此外3-苯丙醇是一种高效促胆汁分泌剂和温和的解痉剂。临床上

用于治疗胆囊炎、胆石症、胆道术后综合征等，且对肝细胞的保护具有重要作用。胆石症是指胆道系统发生结石的疾病，在急腹症中发病率高居第二，仅次于急性阑尾炎。Lü等^[3]在2017年的一份报告指出，中国胆囊结石的发病率在5.7%，其中女性患者几乎是男性患者的两倍，因此利胆类药物市场需求量巨大。

目前苯丙醇的生产主要由肉桂酸乙酯催化加氢制得^[4]，贵金属催化剂本身性质的不同常导致

副产物的产生^[5], 反应一般在高温高压及重金属催化剂的条件下进行。随着国家碳达峰目标的深入贯彻落实, 较低的生产效率、高污染的化工生产方式将会逐步被取代^[6-7], 微生物生产因其温和的生产条件、绿色清洁的生产周期在未来的可持续发展中极具竞争力^[8]。在过去的几十年中, 利用微生物作为平台菌生产高附加值化合物的绿色生产方式已逐渐替代利用石油基合成化合物的高风险、高污染的方式。随着科学工作者对各种微生物系统、深入且明晰的研究以及基因编辑方法^[9-11]、高通量筛选方法的不断成熟^[12-13], 改造微生物使其利用廉价碳原料合成高附加值化学品的合成生物学已经广泛用于医疗^[14-15]、食品^[16]、化妆品^[17-18]、化学品^[19-20]、环境保护^[21]等重要领域, 中国“十三五”规划中明确把合成生物学作为重点创新发展领域。到2030年, 将基本形成比较完整的合成生物技术创新体系, 合成生物产业初具规模, 国际竞争力大幅提升。本课题以合成生物学和代谢工程学的理论为基础设计了两种3-苯丙醇的合成方式, 这两种合成方式共享同样的上游代谢途径, 即以甘油为基本碳源, 经糖异生途径和磷酸戊糖途径分别生成重要前体磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和D-赤藓糖-4-磷酸(E4P), 经DAHP合酶催化合成莽草酸途径的第一个化合物3-脱氧-D-阿拉伯糖庚酸七磷酸酯。通过调控基因表达、削弱竞争途径、调节碳流量分配等方式, 不断改善菌株的生产性能, 最终实现3-苯丙醇的高产。

1 材料和方法

1.1 实验原料和仪器

甘油、甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯), Fisher Scientific; CaCl₂、MgSO₄, J.T.Baker; 琼脂糖, Omnipur Calbiochem; 溴化乙锭、氨苄青霉素、卡那霉素, Fisher BioReagents; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、基因组提取试剂盒, Zymo research; 核酸连接酶、核酸内切酶, New England Biolabs。

高速离心机, Eppendorf centrifuge 5424; 冷冻离心机, Eppendorf centrifuge 5430R; 凝胶成像仪, UVP Digidoc-It Darkroom; CTO-10AS 高效液相色谱,

岛津; 紫外可见分光光度计, Beckman DU650; 电转仪, Eppendorf Electroporator 2510。

1.2 基因及质粒构建

提取大肠杆菌(*Escherichia coli*)基因组, 设计引物PCR得到上游代谢途径中的4个基因:*aroL*, *ppsA*, *tktA*, *aroG^{br}*; 实验室保存有来源于黏胶红杆菌(*Rhodobacter glutinis*)的苯丙氨酸氨裂解酶基因*tal*、来源于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的香豆酸辅酶A连接酶基因*4CL1*、来源于银合欢(*Leucaena leucocephala*)的肉桂酰辅酶A还原酶基因*CCR*; 另外, 通过NCBI查找得到的来源于丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)的烯酸还原酶基因*er*在生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 文献中已报道催化效果较好的来源于海洋分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)的羧酸还原酶*car*编码基因在华大基因公司合成; 提取枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)基因组, 设计引物PCR得到编码4'-磷苯丙胺转移酶基因*sfp*。

通过多克隆位点KpnI、BamHI分别将*aroL*、*ppsA*、*tktA*、*aroG^{br}*构建到中拷贝质粒载体pCS27上; 通过多克隆位点KpnI、BamHI、XbaI分别将*4CL1*和*CCR*、*tal*和*er*、*car*和*sfp*构建到高拷贝质粒载体pZE12-luc上; 通过KpnI、XbaI分别将*tal*、*er*、*car-sfp*构建到高拷贝质粒载体pZE12-luc上; 通过SacI、BclI将*car-sfp*构建到pZE-TAL-ER的第2个阅读框中。

1.3 摇瓶培养发酵

挑取抗生素筛选培养皿上的单菌落到装有4 mL LB培养基的试管中, 于37 °C, 220 r/min培养过夜, 取1 mL大肠杆菌悬液接种于盛有50 mL发酵培养基的250 mL锥形瓶中进行摇瓶发酵培养, 待菌体密度在600 nm处的光密度(OD₆₀₀)为0.6时加入终浓度为0.5 mmol/L的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导, 于37 °C, 220 r/min继续培养48 h, 每隔12 h取样用于高效液相色谱分析。

LB培养基: 10 g/L蛋白胨、10 g/L氯化钠、5 g/L酵母粉, 溶于去离子水, 于115 °C下灭菌30 min, 制备固体培养基时加入2%的琼脂粉。

M9培养基: 20 g/L 甘油, 7 g/L 酵母粉, 2 g/L MOPS, 6 g/L Na_2HPO_4 , 0.5 g/L NaCl, 3 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L NH_4Cl , 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 溶于去离子水, 于 115 °C 下灭菌 30 min。

所有培养基在使用时加入所需的抗性, 卡那霉素、氯霉素、氨苄青霉素终浓度均为 0.5 mmol/L。M9 培养基在接种菌液时需额外添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 MgSO_4 和 0.05 mmol/L 的 CaCl_2 。

1.4 HPLC 检测

将购买的苯丙氨酸、肉桂酸、肉桂醇、苯丙酸、3-苯丙醇标准品配制成呈梯度的标准样品。标准样品和发酵液样品经 HPLC 检测并定量。使用 DIKMA C_{18} 反相柱以及自动进样岛津高效液相色谱仪, 色谱柱的规格为 250 mm×4.6 mm, ID 5 μm ,

流动相为混合物甲醇: 乙腈: 水: 乙酸=30: 16: 54: 0.1。柱温为 40 °C, 总流速为 0.8 mL/min, 检测时间为 25 min, 检测波长为 205 nm、254 nm。

1.5 实验菌种和质粒

本实验用到的菌株、质粒、引物等情况见表 1~表 3。

2 结果

2.1 转化肉桂酸生产 3-苯丙醇途径的设计

通过查阅文献发现, Chen 等^[22] 利用香豆酸辅酶 A 连接酶 (4CL1) 和肉桂酰辅酶 A 还原酶

表 1 本实验所用到的菌株

Tab. 1 Strains used in this study

Strains	Genotype	Source
Trans 5 α		Lab Stock
BW25113(F')		Lab Stock
BW25113(F') $\Delta\text{pykA } \Delta\text{pykF}$		This study
G01	BW25113(F') harboring pZE-CCR-4CL1	This study
G02	BW25113(F') harboring pCS-ER	This study
G03	BW25113(F') harboring pZE-CCR-4CL1 and pCS-ER	This study
G04	BW25113(F') harboring pZE-ER	This study
G05	BW25113(F') harboring pCS-Carsfp	This study
G06	BW25113(F') harboring pZE-ER and pCS-Carsfp	This study
G07	BW25113(F') harboring pZE-RgTAL-ER and pCS-Carsfp	This study
G08	BW25113(F') harboring pZE-tac-RgTAL-ER-Carsfp	This study
G09	BW25113(F') $\Delta\text{pykA } \Delta\text{pykF}$ harboring pZE-tac-RgTAL-ER-Carsfp	This study
G10	BW25113(F') harboring pCS-lac-APTA and pZE-tac-RgTAL-ER-Carsfp	This study
G11	BW25113(F') harboring pCS-tac-APTA and pZE-tac-RgTAL-ER-Carsfp	This study
G12	BW25113(F') $\Delta\text{pykA } \Delta\text{pykF}$ harboring pCS-tac-APTA and pZE-tac-RgTAL-ER-Carsfp	This study

表 2 本实验所用到的基础质粒

Tab. 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Description	Source
pZE12-luc	pLlacO-1; luc; ColE1 ori; Amp ^r	Lab Stock
pCS27	pLlacO-1, P15A ori, Kan ^r	Lab Stock
pZE-CCR-4CL1	pZE-luc carrying CCR from <i>Leucaena leucocephala</i> , and 4CL1 from <i>Arabidopsis thaliana</i>	This study
pZE-ER	pZE-luc carrying ER from <i>Clostridium acetobutylicum</i>	This study
pCS-ER	pCS27 carrying ER from <i>C. acetobutylicum</i>	This study
pCS-carsfp	pCS27 carrying Car from <i>Mycobacterium marinum</i> and Sfp from <i>Bacillus subtilis</i>	This study
pZE-RgTAL-ER	pZE-luc carrying TAL from <i>Rhodobacter glutinis</i> and ER from <i>C. acetobutylicum</i>	This study

表3 本实验所用到的引物
Tab.3 Primers used in this study

Primer	Sequence 5'-3'
CCR-4CL1-1-F-KpnI	gggaaaGGTACCatgcctgctcggctccagc
CCR-4CL1-1-R-BamHI	gggaaaGGATCCtatttgctggcagcggcaggtg
CCR-4CL1-2-F-BamHI	gggaaaGGATCCaggagatataccatggcggcacaagaacaagcagt
CCR-4CL1-2-R-XbaI	gggaaaTCTAGAttacaatccattgtctagtttgcctc
ER-KpnI-F	gggaaaGGTACCatgaacaatacaagaaattttgaaccaatcaaaattgg
ER-XbaI-F	gggaaaTCTAGAttatataatggttgcactcaaaagcatccc
ER 框-SpeI-F	gggaaaACTAGTaatgtgagcggataacaattgacattgtga
ER 框-SacI-R	gggaaaGAGCTCacaacagataaaacgaaaggccagtc
TAL 框-SpeI-F	gggaaaACTAGTctcgagaattgtgagcggataacaattga
TAL 框-SacI-R	gggaaaGAGCTCcgaacaacagataaaacgaaaggcc
Car-KpnI-F	gggaaaGGTACCatgtcacctatcaccgcgagg
Car-BamHI-R	gggaaaGGATCCcacagcaagcccagcagac
sfp-BamHI-F	gggaaaGGATCCaggagatataccatgaagatttacggaatttatatgg
sfp-XbaI-R	GGGAAAtctagattataaaagctcttcgtacgagactattgtgat
AP-NheI-R	gggaaaGCTAGCttatttctcagttcagccagccttaacc
TA-NheI-F	gggaaaGCTAGCaggagatataccatgtcctcacgtaaaagagcttg
APTA-XbaI-F	gggaaaTCTAGAatgacacaacctttttctgatcggg
APTA-BamHI-R	gggaaaGGATCCtaccgcgagcgccttta
pCS-tac-反-BamHI-F	gggaaaGGATCCgtcgcaatcacgcgtgaagagc
pCS-tac-反-XbaI-R	gggaaaCATATGttataaaagctcttcgtacgagacta
tac-Car 框-F-SpeI	gggaaaACTAGTctcgagttgacaattaatcagcgtctcg
tac-Car 框-R-SacI	gggaaaGAGCTCcgaacaacagataaaacgaaaggcc

(CCR) 催化底物 4-香豆酸得到了 501.8 mg/L 的 4-香豆醇，肉桂酸与 4-香豆酸的分子结构相似（苯环对位少一个羟基）；我们推测 4CL1 和 CCR 也能够催化肉桂酸生成肉桂醇。另外，Sun 等^[23] 利用烯酸还原酶（ER）催化底物肉桂酸得到了 366.77 mg/L 的苯丙酸，而肉桂醇和肉桂酸结构类似（侧链 2、3 位碳之间存在一个双键）；我们推测 ER 也能够催化肉桂醇得到 3-苯丙醇。基于这些推测，设计了一条依赖于辅酶 A 还原酶的催化肉桂酸生产 3-苯丙醇的生物途径 1。该途径上，肉桂酸经 4CL1 和 CCR 将羧基还原为肉桂醇，接着在 ER 的催化下将双键还原生成目标产物 3-苯丙醇。

另外，根据已发表文献报道，发现来源于 *M. marinum* 的羧酸还原酶 Car 能够将短链或芳香族羧酸还原为对应的醛类化合物^[24-25]，而大肠杆菌天然存在的醇脱氢酶可以将醛类化合物转化为相应的醇类化合物，鉴于 Car 的底物谱比较广泛，推测它能够将苯丙酸转化为苯丙醛；Sfp 是来源于枯草芽孢杆菌的磷酸泛肽基转移酶，相关文献报道其

与 Car 共同表达时明显增强后者活性^[26]。由此，设计了另一条依赖于羧酸还原酶 Car 的生产 3-苯丙醇的生物途径 2。该途径上，肉桂酸经 ER 催化将双键还原生成苯丙酸，接着在 Carsfp 的催化下将羧基还原为醇。我们通过分步添加实验验证这两条途径（图 1）是否能顺利生成目标产物。

2.2 筛选转化肉桂酸生产 3-苯丙醇的最佳途径

2.2.1 辅酶 A 依赖的还原途径 1

为验证途径 1 是否可行，首先通过添加实验来分别测试 4CL1 和 CCR 对肉桂酸的催化活性以及 ER 对肉桂醇的催化活性。由于 4CL1 催化肉桂酸所得到的中间产物肉桂酰辅酶 A 标准品难以纯化得到且价格昂贵，所以本实验将 4CL1 和 CCR 联用催化肉桂酸，得到产物肉桂醇，肉桂醇标品易得到，也便于液相检测。

将携带有 pZE-CCR-4CL1 的 BW25113 (F') 菌株 G01 进行摇瓶培养，为减弱较高浓度肉桂酸对

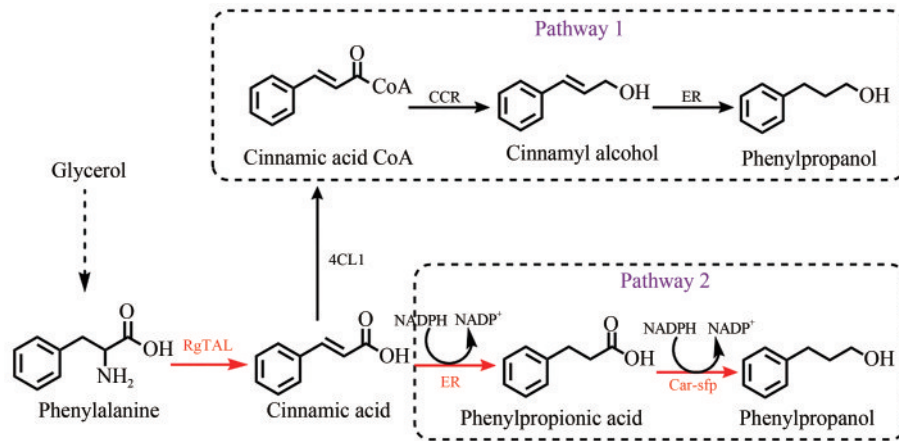


图1 3-苯丙醇合成途径的设计 RgTAL

RgTAL—来自 *Rhodobacter glutinis* 的苯丙氨酸氨裂合酶；4CL1—来自 *Arabidopsis thaliana* 香豆酸辅酶A连接酶；CCR—来自 *Leucaena leucocephala* 的肉桂酰辅酶A还原酶；ER—来自 *Clostridium acetobutylicum* 的烯酸还原酶；Car—来自 *Mycobacterium marinum* 的羧酸还原酶；sfp—来自 *Bacillus subtilis* 的磷酸泛肽基转移酶

Fig. 1 Design of synthetic routes of 3-phenylpropanol

RgTAL—phenylalanine ammonia lyase from *Rhodobacter glutinis*; 4CL1—from *Arabidopsis thaliana* coumarate-CoA ligase; CCR—cinnamoyl-CoA reductase from *Leucaena leucocephala*; ER—enoic acid reduction from *Clostridium acetobutylicum* Enzyme; Car—carboxylic acid reductase from *Marine Mycobacterium*; sfp—phosphoubiquitin transferase from *Bacillus subtilis*

工程菌的生长抑制（下述苯丙酸、肉桂醇同理），分3次（分别为添加诱导剂时、添加诱导剂后3 h、添加诱导剂后6 h）添加终浓度为1.5 g/L的肉桂酸，24 h后得到91 mg/L的肉桂醇 [图2(a)]，这表明4CL1和CCR能够接受肉桂酸为催化底物，但催化活性较低。分析原因可能是肉桂酸与4-香豆酸相比4位上少了羟基，活性基团缺失导致酶的催化活性大幅减弱；同样，为验证烯酸还原酶ER对底物肉桂醇的催化活性，向携带有pCS-ER的G02菌株的发酵摇瓶里分3次添加终浓度为1.5 g/L的肉桂醇，24 h后得到129 mg/L的3-苯丙醇 [图2(b)]，这表明ER能够接受肉桂醇为底物，同样的对肉桂醇的催化活性也较低。有文献报道，当与双键相连的碳原子上有羰基或者硝基等活性基团存在时，ER的催化活性会更高^[27]，我们推测烯酸还原酶ER对苯丙酸的催化活性相对会更高。从上述这两个添加实验来看设计的途径1可行，但是由于酶对底物的催化活性较低所以产量不高。整体的转化效率还待进一步添加实验验证。

通过双转化得到同时携带pZE-CCR-4CL1和pCS-ER的G03菌株进行添加实验，同样分3次添加终浓度为1.5 g/L的肉桂酸，48 h后检测到16.6 mg/L肉桂醇以及287.5 mg/L苯丙酸，但没有

检测到最终产物3-苯丙醇 [图2(c)]。分析造成这种情况的原因是ER对肉桂酸的催化活性相对于肉桂醇较高，当体系中同时存在肉桂酸和肉桂醇时，ER会优先将肉桂酸还原为苯丙酸，而实验结果表明4CL1和CCR不能将苯丙酸转化生成3-苯丙醇，导致产物主要积累在了苯丙酸。

为探究烯酸还原酶ER对肉桂酸、肉桂醇转化效率的差别，向携带有pCS-ER的G02菌株的发酵摇瓶里分3次添加终浓度为1.5 g/L的肉桂酸，24 h后得到578 mg/L的苯丙酸 [图2(d)]，这表明ER对肉桂酸的催化活性更高，羰基等活性基团的存在确实提高了ER对底物的催化活性。

2.2.2 羧酸还原酶途径2

接着验证途径2的可行性。由上述实验可知，相对于催化肉桂醇生成3-苯丙醇，ER催化肉桂酸生成苯丙酸的效率更高。途径2中由肉桂酸生成苯丙酸的通路打通后，接着要通过添加实验来测试Carsfp对苯丙酸的催化活性。将携带有pCS-Carsfp的G05菌株进行摇瓶培养，分3次添加终浓度为1.5 g/L的苯丙酸，24 h后得到1.51 g/L的3-苯丙醇 [图3(a)]，实验结果表明羧酸还原酶Carsfp实现了对苯丙酸的完全转化。为了验证当ER和Carsfp联用时肉桂酸能否顺利转化为3-苯丙醇，将ER构建到了高拷贝质粒上进行添加实验，携带有

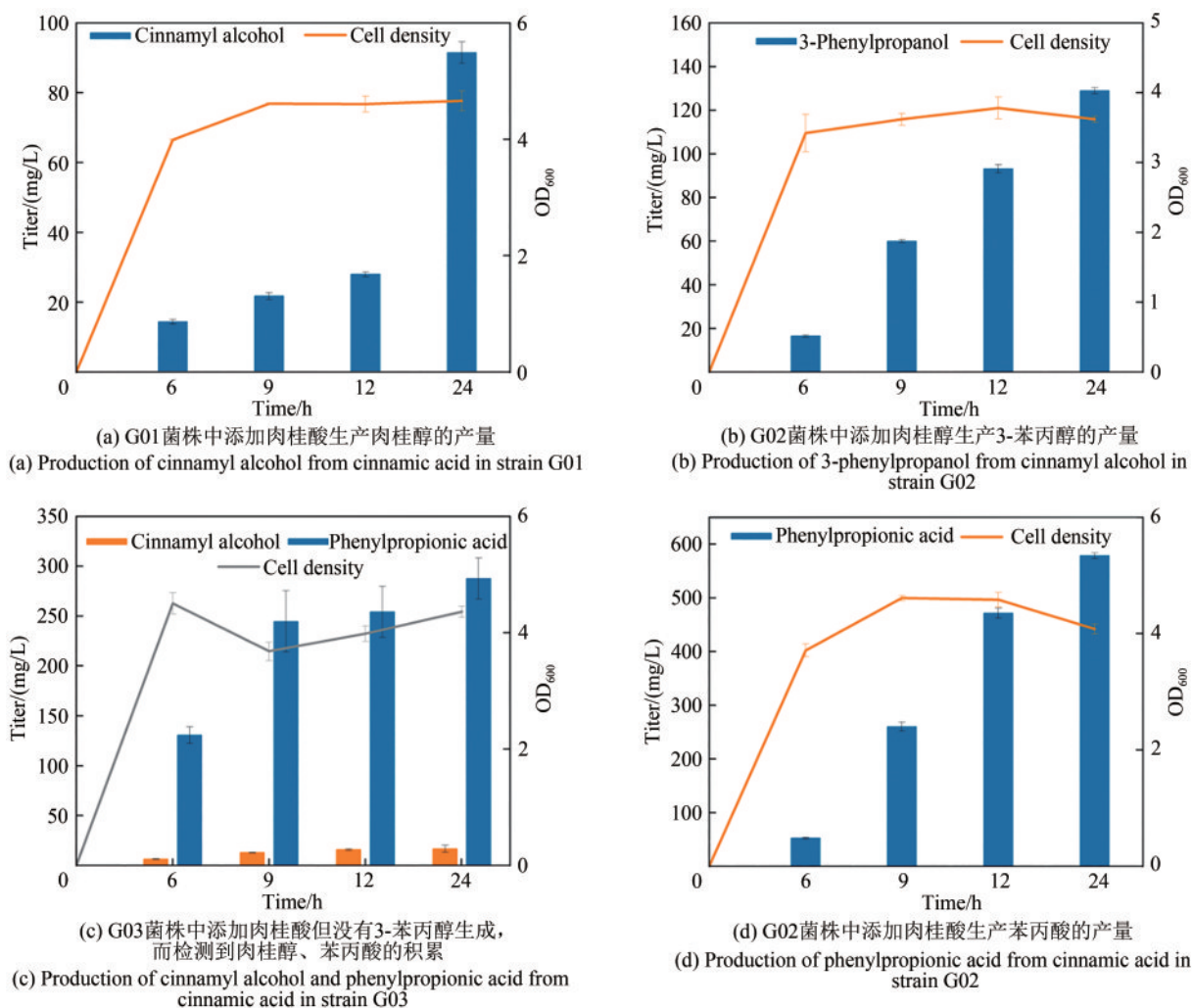


图2 验证辅酶A依赖的还原途径1

Fig. 2 Validation of coenzyme A-dependent reduction pathway 1

pZE-ER的G04菌株在24 h内将1.5 g/L的肉桂酸转化得到1.26 g/L的苯丙酸 [图3(b)], 转化率相比其在中拷贝质粒上时提高了123%。接着, 通过双转化得到同时携带有pZE-ER和pCS-Carsfp的G06菌株进行摇瓶培养, 分3次添加终浓度为1.5 g/L的肉桂酸, 在48 h内合成了429 mg/L的3-苯丙醇, 这表明依赖羧酸还原酶Carsfp的途径2可行。同时也检测到副产物肉桂醇和苯丙酸分别积累了319 mg/L和113 mg/L [图3(c)]。

分析造成副产物肉桂醇积累的原因是羧酸还原酶Car的杂泛性, 导致Car催化肉桂酸生成了大量肉桂醇。为验证猜想, 将携带有pCS-Carsfp的G05菌株进行摇瓶培养, 24 h后将1.5 g/L的肉桂酸转化得到375 mg/L的肉桂醇 [图3(d)]。这表明

Car能够接受肉桂酸为底物, 但相较于催化苯丙酸而言, 催化肉桂酸的活性较低。上述实验结果表明依赖羧酸还原酶Car的还原途径能够将肉桂酸转化为目标产物3-苯丙醇, 为了达到利用廉价碳源生产高附加值化合物的目标, 将使用基本培养基培养宿主菌实现对3-苯丙醇的从头合成。

2.3 从头合成3-苯丙醇

大肠杆菌自身代谢通过莽草酸途径能够产生L-苯丙氨酸, 而来源于*Rhodobacter glutinis*的苯丙氨酸氨裂解酶基因tal能够催化L-苯丙氨酸脱氨生成肉桂酸。根据现有的报道可以发现该酶的应用已经非常成熟, 如Wang等^[28]利用来自红车轴草(*Trifolium pretense*)的tal基因, 在饲喂3 mmol/L

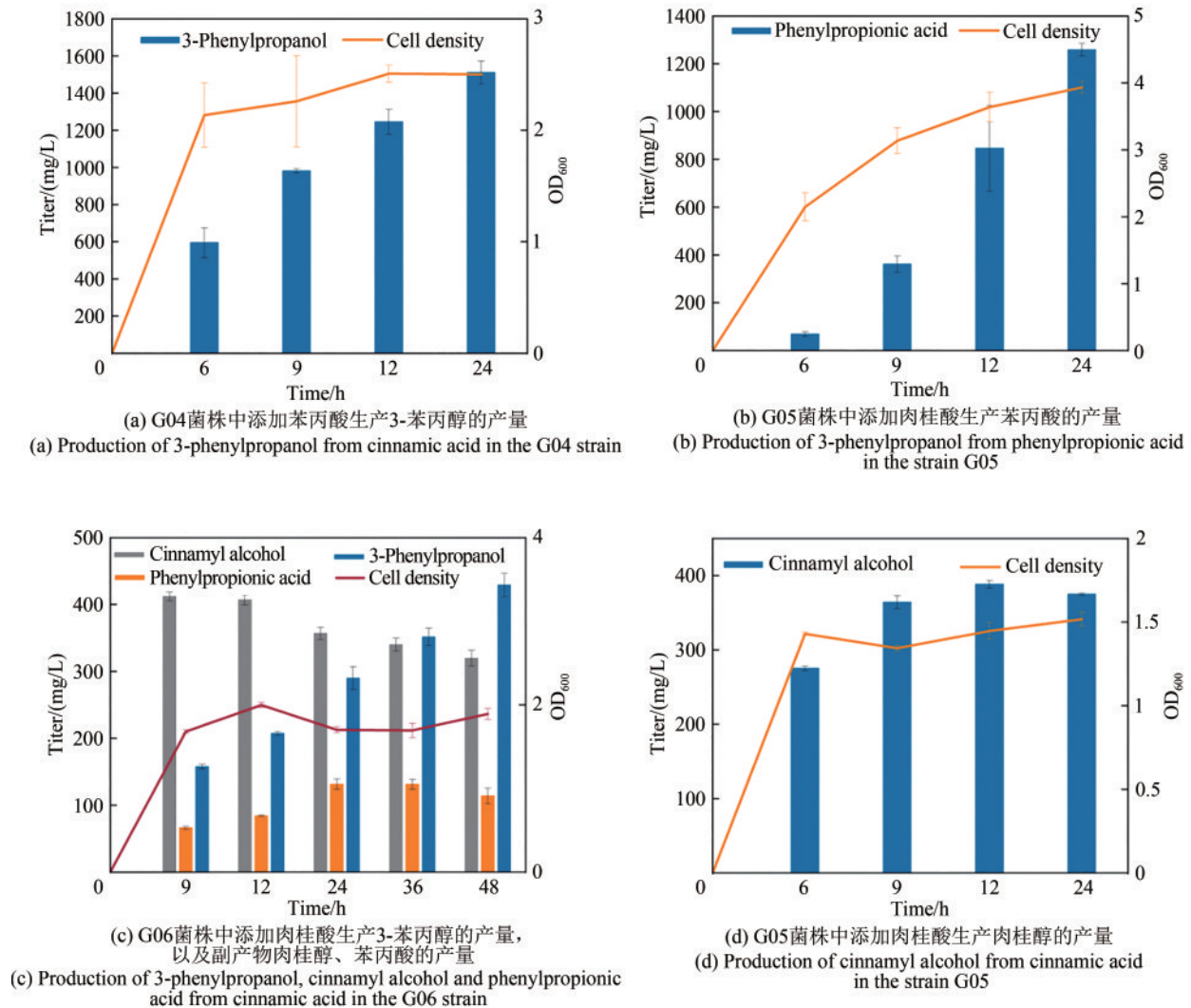


图3 验证羧酸还原酶依赖的途径2

Fig. 3 Validation of carboxylic acid reductase-dependent pathway 2

苯丙氨酸的条件下，得到 241.3 mg/L 的肉桂酸。将 *tal* 和烯酸还原酶基因 *er* 构建到 pZE12-luc 载体上得到 pZE-RgTAL-ER，与 pCS-carsfp 一起双转入大肠杆菌 BW25113 (F') 中得到生产菌株 G07，以甘油为基本碳源从头合成 3-苯丙醇 (图4)。

实验结果表明，当将 3-苯丙醇的外源合成途径转入大肠杆菌后，摇瓶培养 48 h 从头合成了 91 mg/L 的 3-苯丙醇，表明设计的 3-苯丙醇的微生物合成途径可行。然而该产量远低于向培养基中直接添加肉桂酸时得到的产量，这表明整个途径中肉桂酸的供应不足。为了实现 3-苯丙醇的高产，需要通过基因调控使更多碳流量流向肉桂酸。为了方便接下来对上游基因的修饰，通过模块优化

等行距将下游途径中 3 个关键基因均整合到同一个高拷贝质粒上，具体而言，即将羧酸还原酶 Carsfp 整合到 pZE-RgTAL-ER 的第 2 个阅读框上；同时为了强化苯丙氨酸氨裂合酶 TAL 及烯酸还原酶 ER 的表达，将上述这两个基因置于更强的 *tac* 启动子控制下，得到 pZE-tac-RgTAL-ER-Carsfp。将该质粒转化到野生型大肠杆菌 BW25113 (F') 中得到菌株 G08 并进行从头合成实验，发现 48 h 得到 189 mg/L 3-苯丙醇的最高产量，相比基因整合前提高了 1 倍，但这一产量仍远低于向培养基中直接添加肉桂酸时得到的产量，进一步说明充分扩大上游代谢通路碳通量对提高 3-苯丙醇的产量至关重要。

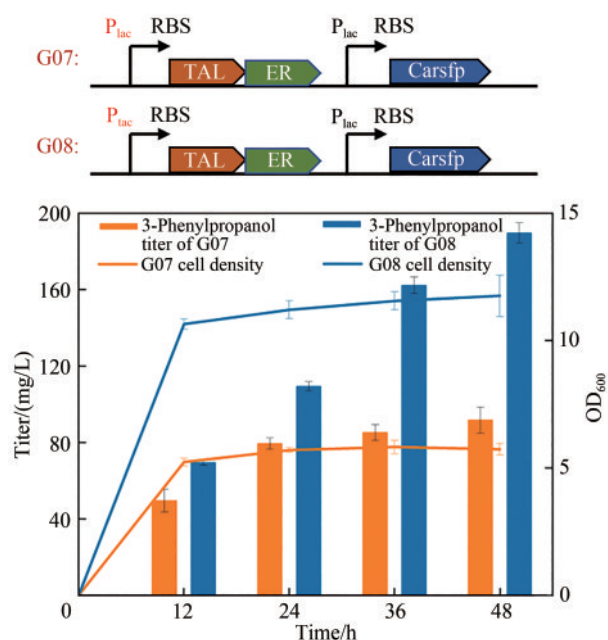


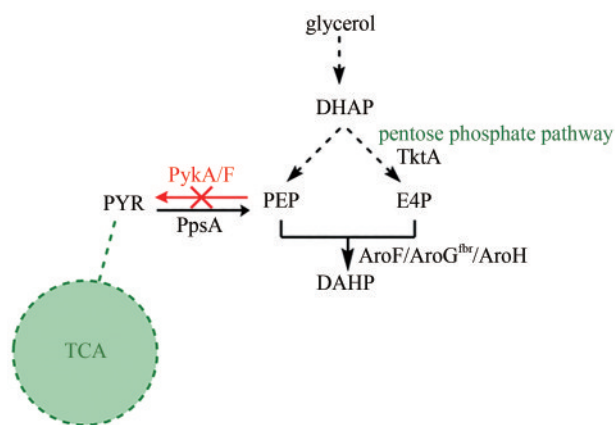
图4 在菌株 G07 和菌株 G08 中从头合成 3-苯丙醇

Fig. 4 De novo production of 3-phenylpropanol in strains G07 and G08

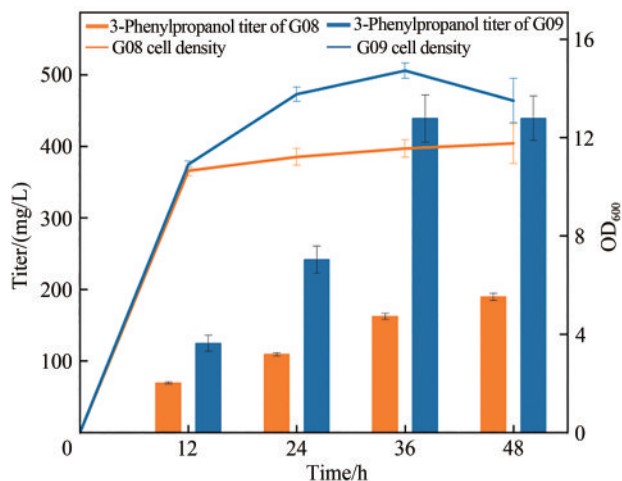
2.4 敲除竞争途径对 3-苯丙醇产量的影响

据报道, 多种植物、藻类、真菌和细菌皆可以通过莽草酸途径产生芳香化合物^[29-30]。莽草酸酯途径

由来源于糖酵解途径 (EMP) 中的磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和来源于磷酸戊糖途径 (PPP) 中的 D-赤藓糖-4-磷酸 (E4P) 缩合形成 3-脱氧-D-阿拉伯糖庚酸七磷酸酯 (DAHP) 开始, 如何增加这两种关键前体的供应成为亟待解决的问题。大肠杆菌的 PTS 转运途径需要消耗大量 PEP 作为磷酸基供体参与葡萄糖的跨膜运输^[31], 因此当使用葡萄糖为碳源生产芳香化合物时, 一般会构建 PTS 缺陷型宿主菌以节省 PEP 供莽草酸途径使用^[32-34], 而甘油是葡萄糖的替代底物, 更有利于通过莽草酸途径实现高附加值的芳香化合物的生物合成^[35-36]。本课题在从头合成 3-苯丙醇时均采用甘油为单一基本碳源, 故不考虑 PTS 缺陷型的构建。重要的是磷酸烯醇式丙酮酸作为莽草酸途径的关键前体, 它还参与由丙酮酸激酶 PykA、PykF 催化的反应, 这些酶催化 PEP 产生丙酮酸, 同时生成 ATP 为细胞内代谢活动供能。有文献报道缺失丙酮酸激酶使 PEP 的可用性提高^[37-38], 我们用了同样的策略在宿主菌 BW25113 (F') 的基因组上敲除了 *pykA*、*pykF*, 得到了丙酮酸激酶缺失菌株 BW25113 (F') Δ *pykA* Δ *pykF* 作为新的宿主菌 [图 5(a)]。接着, 将 pZE-



(a) *pykA/F* 敲除示意图



(b) *pykA/F* 敲除前后从头合成 3-苯丙醇产量的变化

图5 *pykA/F* 敲除对 3-苯丙醇产量的影响

DHAP—磷酸二羟丙酮; PYR—丙酮酸; PEP—磷酸烯醇式丙酮酸; E4P—D-赤藓糖-4-磷酸; DAHP—3-脱氧-D-阿拉伯糖庚酸七磷酸酯; TktA—转酮酶; PykA/F—丙酮酸激酶; PpsA—磷酸烯醇式丙酮酸合酶; AroF/AroG^{tr}/AroH—3-脱氧-D-阿拉伯糖庚酸七磷酸酯合酶

Fig. 5 Production of 3-phenylpropanol in *pykA/F* knockout strain

DHAP—dihydroxyacetone phosphate; PYR—pyruvate; PEP—phosphoenolpyruvate; E4P—D-erythrose-4-phosphate; DAHP—3-deoxy-D-arabinoheptanoate heptaphosphate; TktA—Transketolase; PykA/F—pyruvate kinase; PpsA—phosphoenolpyruvate synthase; AroF/AroG^{tr}/AroH—3-deoxy-D-arabinoheptanoate heptaphosphate synthase

tac-RgTAL-ER-Carsfp 转入 BW25113 (F') Δ pykA Δ pykF 中得到生产菌株 G09, 以基本培养基从头合成 3-苯丙醇。

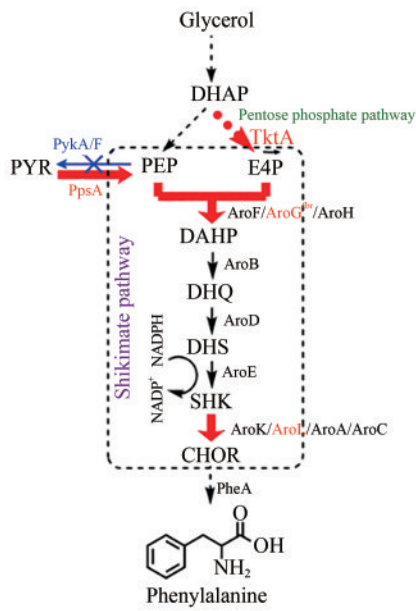
实验结果如图 5(b) 所示, 48 h 内产生了 439 mg/L 的 3-苯丙醇, 相比敲除 *pykA*、*pykF* 前提高了 130% [图 5(b)], 这充分说明 PEP 竞争途径的敲除显著提高了 PEP 的供应。但敲除 *pykA*、*pykF* 大幅阻断了大肠杆菌的糖酵解途径, 导致宿主菌的生长速度明显降低, 使发酵周期被延长。有文献报道了一种既不影响宿主菌正常的糖酵解途径又能有效增加 PEP 供应的策略——碳储存调节系统 (Csr) 的调节。具体而言, CsrA 是一种调节碳代谢和能量代谢相关基因转录的蛋白质^[39], 丙酮酸激酶 (PykF) 受到 CsrA 的正调控, 而由丙酮酸产生 PEP 的 PpsA 受到 CsrA 的负调控, 研究发现, CsrA 的缺失可增强糖异生代谢流量, 促进 PEP 的积累。Yakandawala 等^[42] 敲除了 *csrA* 基因, 并观察到 PEP 浓度增加^[40-41], 因此 *csrA* 的删除导致细胞内 PEP 浓度在整个指数生长期和稳定期升高。另外, *csrB* (编码一种来自碳储存调节器的小的未翻译 RNA) 的过表达也能提高大肠杆菌内 PEP 的供应^[42]。

除了 PEP, 另一个关键前体 E4P 的供应也同样需要提高, 否则两种前体的供应不平衡将导致无法充分利用碳源生产目标产物。D-赤藓糖-4-磷酸 (E4P) 是磷酸戊糖途径 (PPP) 的中间产物, 增加 E4P 通量的最常见方法是过表达转醛醇酶和转酮酶基因, 以促进景天糖-7-磷酸 (S7P) 和甘油醛-3-磷酸 (G3P) 转化为 E4P 和果糖-6-磷酸 (F6P)^[43-44]。

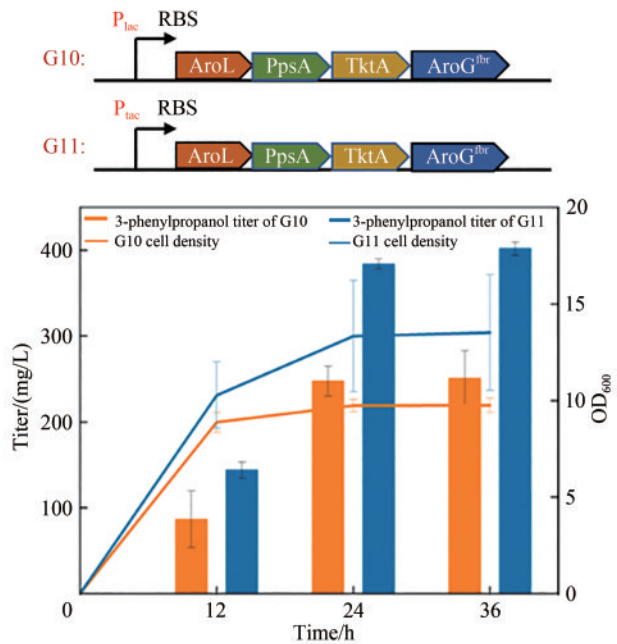
2.5 关键基因的过表达对 3-苯丙醇产量的影响

Knop 等^[45] 在大肠杆菌中过表达转酮酶 (TktA) 后, 观察到莽草酸产量从 38 g/L 增加到 52 g/L; 另外, Lu 和 Liao^[46] 在已经过表达转酮酶基因的菌株中, 继续过表达转醛醇酶基因并没有显示芳香化合物产量的进一步增加, 这一结果可

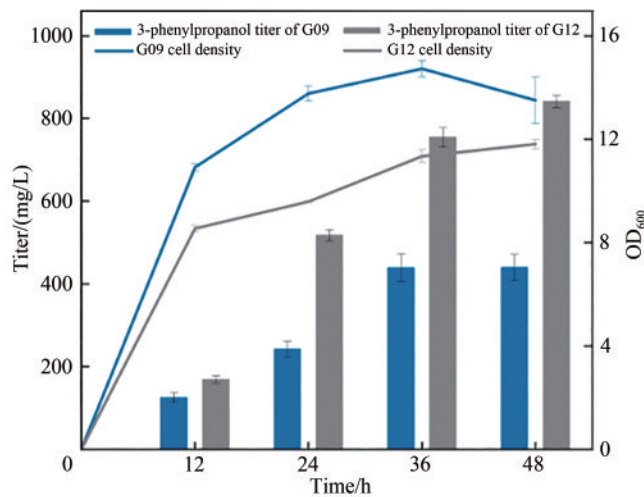
能与 *tktA* 过表达时 E4P 供应饱和有关, 得出结论转酮酶比转醛醇酶更有效地将碳通量引导到芳香途径。因此我们设计引物扩增得到转酮酶基因 *tktA*。Chandran 等^[47] 在早前的报道中提到编码 PEP 合成酶 (催化丙酮酸转化为 PEP) 的基因 *ppsA* 的过表达提高了胞内 PEP 的供应, 在阻断 PEP 降解途径的同时, 增强它的合成途径将进一步提高 PEP 水平。莽草酸途径是将中心碳代谢与芳香族氨基酸 (包括 L-Trp、L-Tyr 和 L-Phe) 的生物合成联系起来的代谢中枢。随着莽草酸途径中两个关键前体可用性的提高, 莽草酸途径内部的代谢步骤成为新的瓶颈, 为使重要中间体芳香氨基酸 L-苯丙氨酸大量积累, 接下来工作的焦点将转移到增加莽草酸途径碳通量。莽草酸途径的第 1 步是由 DAHP 合成酶催化 PEP 和 E4P 合成 DAHP, 而 DAHP 合酶活性受莽草酸途径下游产物芳香族氨基酸浓度的反馈调节, 这是细胞为避免积累过量芳香化合物长期自然进化形成的反馈调节机制。大肠杆菌有 3 种不同的 DAHP 合酶同工酶 (分别由 *aroF*、*aroG*、*aroH* 编码, 其中 *aroG* 对 DAHP 合酶的活性贡献达 80%^[48]), 分别受到产物酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸不同程度的反馈抑制, 0.1 mmol/L 的 L-苯丙氨酸或酪氨酸就可以完全抑制 *aroG* 或 *aroF*^[49]。为使更多的碳通量被引导至 L-苯丙氨酸, 编码 AroG 的抗反馈抗性 (*fbr*) 酶基因 *aroG^{fbr}* 被克隆。另外, *aroK* 编码的莽草酸激酶 I 的 K_m 值 (20 mmol/L) 比 AroL 高 100 倍, AroL 是莽草酸途径中的限速酶^[50]。尤其是当工程菌内芳香氨基酸浓度较高的情况下 AroL 的催化活性很可能受到限制, 而其同工酶 AroK 功能良好^[51]。此外, *aroG*、*aroF*、*aroH*、*aroL* 的转录被 TyrR 抑制^[52-53]。为了增加 L-苯丙氨酸的积累, *tyrR* 通常被灭活。以大肠杆菌基因组为模板克隆得到莽草酸激酶基因 *aroL*, 与上述提到的 PEP 合酶 *ppsA*、转酮酶 *tktA* 以及 DAHP 抗反馈合酶 *aroG^{fbr}* 共同构建到中拷贝质粒 pCS27 上, 得到质粒 pCS-AroG^{fbr}-PpsA-TktA-AroL [图 6(a)], 下面简称为 pCS-APTA; 同时, 为强化上述关键基因的



(a) 增强莽草酸途径的基因工程策略示意图
(a) Schematic diagram of genetic engineering strategies for enhancing shikimate pathway



(b) 野生菌中不同强度启动子过表达莽草酸途径关键基因对3-苯丙醇产量的影响 (黄色代表在lac启动子控制下, 蓝色代表在tac启动子控制下)
(b) Expression shikimate pathway genes under control of different strength promoters on production of 3-phenylpropanol in strains G10 and G11 (Yellow columns represents under control of the lac promoter, blue columns represents under control of the tac promoter)



(c) 在*pykA/F*敲除菌中过表达莽草酸途径关键基因对3-苯丙醇产量的影响
(c) Expression shikimate pathway genes on the production of 3-phenylpropanol in strains G09 and G12

图6 增强莽草酸途径对3-苯丙醇产量的影响

DHQ—3-脱氢奎尼酸; DHS—3-脱氢莽草酸; SHK—莽草酸; CHOR—分支酸;
AroB—脱氢奎尼酸合成酶; AroD—脱氢奎尼酸脱水酶; AroE—莽草酸脱氢酶;
AroK/AroL/AroA/AroC—脱氢莽草酸脱水酶; PheA—预苯酸脱水酶

Fig. 6 Strengthening of shikimate pathway on production of 3-phenylpropanol

DHQ—3-dehydroquinic acid; DHS—3-dehydroshikimate; SHK—shikimic acid; CHOR—chorismate;
AroB—dehydroquinic acid synthase; AroD—dehydroquinic acid dehydratase, AroE—Shikimate dehydrogenase;
AroK/AroL/AroA/AroC—dehydroshikimate dehydratase; PheA—prephenate dehydrogenase

表达, 将上述4个基因置于强启动子 *tac* 控制下得到 pCS-*tac*-APTA。

为观察不同强度启动子控制莽草酸途径关键基因对苯丙醇产量的影响, 将 pCS-*lac*-APTA、pZE-*tac*-RgTAL-ER-Carsfp 及 pCS-*tac*-APTA、pZE-*tac*-RgTAL-ER-Carsfp 分别双转化到 BW25113 (F') 菌株中得到 G10 和 G11 菌株并进行从头合成实验, 48 h 后, G11 菌株产生了 474 mg/L 的 3-苯丙醇, 而 G10 菌株的产量仅为 247 mg/L [图 6(b)]。结果表明在强启动子 *tac* 的控制下过表达的莽草酸途径关键基因能够有效加强莽草酸途径的碳通量。于是将 pCS-*tac*-APTA、pZE-*tac*-RgTAL-ER-Carsfp 的组合转化到双敲除菌 BW25113 (F') Δ pykA Δ pykF 中得到 G12, 以从头合成 3-苯丙醇, 48 h 后得到 841 mg/L 的产量, 与未过表达莽草酸途径关键基因时相比产量提高了 90% [图 6(c)]。

3 结果与讨论

利用酿酒酵母作为底盘细胞, 用来源于 *Photorhabdus luminescens* 的苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL)、来源于诺卡氏菌 *Nocardia* sp. 的芳基羧酸还原酶 (Car) 和大肠杆菌内源的磷酸泛烯基转移酶 (PPTase) 生产了 212.9 mg/L 的 3-苯丙醇已见报道^[54], 虽然该报道中并没有探究肉桂醇的双键被何酶催化加成生成还原产物 3-苯丙醇, 但使得 3-苯丙醇的微生物合成得以实现。随着 3-苯丙醇潜在价值的不断挖掘和应用的不断发展, 工业化生产成为被关注的焦点。大肠杆菌因其充分的研究背景和易于基因工程操作、繁殖迅速等优势, 成为最常用的基因工程底盘菌株。2021 年 6 月, 天津大学的 Liu 等^[55] 利用反转录生物合成的分析策略, 通过逆合成的思路搭建出目标产物 3-苯丙醇可能的代谢途径, 通过优化培养条件最终在工程大肠杆菌里得到 847.97 mg/L 的 3-苯丙醇。同期我们也致力于将大肠杆菌作为工程菌生产 3-苯丙醇, 根据已发表文献的报道, 理性设计了两条 3-苯丙醇的合

成途径并对其分别进行验证。依赖于辅酶 A 的途径一未能将 1.5 g/L 的肉桂酸转化为 3-苯丙醇, 而依赖于芳基羧酸还原酶的途径二在添加相同量的肉桂酸后成功检测到 3-苯丙醇, 表明了途径二的可行性。利用途径二, 以甘油为基本碳源从头合成 91 mg/L 的 3-苯丙醇, 经过分析确定出瓶颈所在, 通过模块优化整合、对竞争途径的敲除以及对上游关键基因的过表达, 最终在 48 h 的摇瓶发酵培养中得到 841 mg/L 的目标产物。3-苯丙醇的产量得到了大幅提升, 但距离工业化仍有一定距离。我们尝试从酶本身的性质以及辅因子供给出发, 探索进一步提高 3-苯丙醇产量的策略。因为肉桂酸经过两步连续的还原反应被代谢生成 3-苯丙醇, 这需要额外的还原力。理论上为反应体系提供更多的还原力对提高反应产量有正向作用。据报道来源于 *Candida boidinii* 的甲酸脱氢酶 (基因 *fdh*) 能够催化甲酸根阴离子氧化为 CO₂, 同时 NAD⁺ 还原为 NADH^[56-57], 因此, 将 *fdh* 引入质粒表达体系来增加 NADH 的供应, 为烯酸还原酶 ER 的催化提供更多辅因子, 甲酸根阴离子以甲酸钠的形式外源添加, 然而最终产量仅有引入前的一半, 细胞密度也较引入前低, 推测甲酸根阴离子对底盘细胞的生长呈抑制作用, 应分批次逐步添加以降低对细胞的影响。另外, 莽草酸通路末端的分支酸除能转化为 L-苯丙氨酸外, 还将生成 L-酪氨酸等芳族化合物, 将合成 L-酪氨酸的基因 *tyrA* 敲除将使碳通量最大化流向 L-苯丙氨酸, 也就意味着更多目标产物的生成。另外, 本课题所进行的研究均建立在质粒载体表达的基础上, 众多基因给宿主菌带来了沉重的负担, 一方面细菌传代影响质粒的稳定遗传, 另一方面也导致菌本身生长活性的降低, 随着 CRISPR 基因编辑技术的迅猛发展, 将异源基因引入到宿主菌基因组上的整合方法变得高效, 可以将途径下游的 3 个基因均整合到宿主菌基因组上, 并由强启动子控制, 也可以通过增加拷贝数的方法来增强基因的表达以实现 3-苯丙醇的高产, 进而实现工业化生产的目标。

参 考 文 献

- [1] BHATIA S P, WELLINGTON G A, COCCHIARA J, et al. Fragrance material review on 3-phenyl-1-propanol[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49: S246-S51.
- [2] SÁ A G A, MENESES A C D, ARAÚJO P H H D, et al. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 69: 95-105.
- [3] LÜ J, YU C Q, GUO Y, et al. Gallstone disease and the risk of type 2 diabetes[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 15853.
- [4] PANTEN J, SURBURG H. Flavors and fragrances (III): Aromatic and heterocyclic compounds[J]. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2016: 1-45.
- [5] ZHOU Y Y, LI Z H, LIU Y B, et al. Regulating hydrogenation chemoselectivity of α , β -unsaturated aldehydes by combination of transfer and catalytic hydrogenation[J]. ChemSusChem, 2020, 13(7): 1746-1750.
- [6] MAO X Y, WANG Y. Cooperative carbon emission reduction through the Belt and Road Initiative[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021: 1-22.
- [7] YUAN X L, SHENG X R, CHEN L P, et al. Carbon footprint and embodied carbon transfer at the provincial level of the Yellow River Basin[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 803: 149993.
- [8] KHALIL A S, COLLINS J J. Synthetic biology: applications come of age[J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(5): 367-379.
- [9] RAN F A, HSU P D, WRIGHT J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nature Protocols, 2013, 8(11): 2281-308.
- [10] FRANGOUL H, ALTSHULER D, CAPPELLINI M D, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia[J]. The New England Journal of Medicine, 2021, 384(3): 252-260.
- [11] BIAN X Y, HUANG F, STEWART F A, et al. Direct cloning, genetic engineering, and heterologous expression of the syringolin biosynthetic gene cluster in *E. coli* through Red/ET recombineering[J]. ChemBioChem, 2012, 13(13): 1946-1952.
- [12] CORREA A, OPPEZZO P. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in *E. coli*: advantages of high-throughput screening[J]. Biotechnology Journal, 2011, 6(6): 715-730.
- [13] WANG Y, LI Q G, ZHENG P, et al. Evolving the L-lysine high-producing strain of *Escherichia coli* using a newly developed high-throughput screening method[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(9): 1227-1235.
- [14] LEE S Y, KIM H U, PARK J H, et al. Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production[J]. Drug Discovery Today, 2009, 14(1/2): 78-88.
- [15] SHEN X L, CHEN X, WANG J, et al. Design and construction of an artificial pathway for biosynthesis of acetaminophen in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2021, 68: 26-33.
- [16] FENG J C, YANG C, ZHAO Z H, et al. Application of cell-free protein synthesis system for the biosynthesis of L-theanine[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(3): 620-631.
- [17] BOO Y C. *p*-Coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: a review focusing on its antimelanogenic effects[J]. Antioxidants, 2019, 8(8): 275.
- [18] SHANG Y Z, WEI W P, ZHANG P, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for enhanced production of arbutin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(5): 1364-1372.
- [19] 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.
- [20] ATSUMI S, LIAO J C. Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(5): 414-419.
- [21] DZIGA D, LISZNIANSKA M, WLADYKA B. Bioreactor study employing bacteria with enhanced activity toward cyanobacterial toxins microcystins[J]. Toxins, 2014, 6(8): 2379-2392.
- [22] CHEN Z Y, SUN X X, LI Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial synthesis of monolignols[J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 102-109.
- [23] SUN J, LIN Y H, SHEN X L, et al. Aerobic biosynthesis of hydrocinnamic acids in *Escherichia coli* with a strictly oxygen-sensitive enoate reductase[J]. Metabolic Engineering, 2016, 35: 75-82.
- [24] AKHTAR M K, TURNER N J, JONES P R. Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(1): 87-92.
- [25] 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.
- [26] VENKITASUBRAMANIAN P, DANIELS L, ROSAZZA J P. Reduction of carboxylic acids by *Nocardia* aldehyde oxidore-

- ductase requires a phosphopantetheinylated enzyme[J]. *JBC*, 2007, 282(1): 478-485.
- [27] HALL M, STUECKLER C, HAUER B, et al. Asymmetric bio-reduction of activated C=C bonds using *Zymomonas mobilis* NCR enoate reductase and old yellow enzymes OYE 1-3 from yeasts[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2008, 2008(9): 1511-1516.
- [28] WANG S Y, ZHANG S W, XIAO A F, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of various phenylpropanoid derivatives[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 153-159.
- [29] MAEDA H, DUDAREVA N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63: 73-105.
- [30] ROBERTS C W, ROBERTS F, LYONS R E, et al. The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 185 (S1): S25-S36.
- [31] XU J Z, YU H B, HAN M, et al. Metabolic engineering of glucose uptake systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(7): 937-949.
- [32] LINDNER S N, KNEBEL S, PALLERLA S R, et al. Cg2091 encodes a polyphosphate/ATP-dependent glucokinase of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 703-713.
- [33] LINDNER S N, SEIBOLD G M, HENRICH A, et al. Phosphotransferase system-independent glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by inositol permeases and glucokinases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3571-3581.
- [34] VOGT M, HAAS S, KLAFFL S, et al. Pushing product formation to its limit: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine overproduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 22: 40-52.
- [35] KHAMDUANG M, PACKDIBAMRUNG K, CHUTMANOP J, et al. Production of l-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(10): 1267-1274.
- [36] AHN J O, LEE H W, SAHA R, et al. Exploring the effects of carbon sources on the metabolic capacity for shikimic acid production in *Escherichia coli* using in silico metabolic predictions[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18(11): 1773-1784.
- [37] LEE S J, LEE D Y, KIM T Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and in silico gene knockout simulation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7880-7887.
- [38] CHAVADI S, WOOFF E, COLDHAM N G, et al. Global effects of inactivation of the pyruvate kinase gene in the *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(24): 7545-7553.
- [39] POTTS A H, VAKULSKAS C A, PANNURI A, et al. Global role of the bacterial post-transcriptional regulator CsrA revealed by integrated transcriptomics[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1596.
- [40] TATARCO M, ROMEO T. Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Current Microbiology*, 2001, 43(1): 26-32.
- [41] SUZUKI K, BABITZKE P, KUSHNER S R, et al. Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(18): 2605-2617.
- [42] YAKANDAWALA N, ROMEO T, FRIESEN A D, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance phenylalanine production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(2): 283-291.
- [43] JIANG M, ZHANG H R. Engineering the shikimate pathway for biosynthesis of molecules with pharmaceutical activities in *E. coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 1-6.
- [44] LI Z, DING D Q, WANG H Y, et al. Engineering *Escherichia coli* to improve tryptophan production via genetic manipulation of precursor and cofactor pathways[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2020, 5(3): 200-205.
- [45] KNOP D R, DRATHS K M, CHANDRAN S S, et al. Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(42): 10173-10182.
- [46] LU J-L, LIAO J C. Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: role of transaldolase[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, 53(2): 132-138.
- [47] CHANDRAN S S, YI J, DRATHS K M, et al. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid[J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(3): 808-814.
- [48] ZHOU H Y, LIAO X Y, WANG T W, et al. Enhanced L-phenylalanine biosynthesis by co-expression of *pheA^{br}* and *aroF^{wi}*[J].

- Bioresour. Technol., 2010, 101(11): 4151-4156.
- [49] MCCANDLISS R J, POLING M D, HERRMANN K M. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. Purification and molecular characterization of the phenylalanine-sensitive isoenzyme from *Escherichia coli*[J]. JBC, 1978, 253(12): 4259-4265.
- [50] ELY B, PITTARD J. Aromatic amino acid biosynthesis: regulation of shikimate kinase in *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Bacteriology, 1979, 138(3): 933-43.
- [51] DEFEYTER R C, PITTARD J. Purification and properties of shikimate kinase II from *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 165(1): 331-333.
- [52] KIM B, BINKLEY R, KIM H U, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the enhanced production of L-tyrosine[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(10): 2554-2564.
- [53] PARSONS C V, HARRIS D M M, PATTEN C L. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthesis by branched-chain amino acids in *Enterobacter cloacae* UW₅[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(18): fnv153.
- [54] GOTTARDI M, KNUDSEN J D, PRADO L, et al. *De novo* biosynthesis of *trans*-cinnamic acid derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(12): 4883-4893.
- [55] LIU Z N, ZHANG X, LEI D W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* production of 3-phenylpropanol via retrobiosynthesis approach[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 121.
- [56] KAUP B, BRINGER-MEYER S, SAHM H. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(3): 333-339.
- [57] WANG J, YANG Y P, ZHANG R H, et al. Microbial production of branched-chain dicarboxylate 2-methylsuccinic acid via enoate reductase-mediated bioreduction[J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 1-10.



通讯作者: 申晓林(1984—),女,博士,副教授。研究方向为代谢工程及微生物合成生物学。

E-mail: shenxl@mail.buct.edu.cn



通讯作者: 袁其朋(1969—),男,博士,教授。研究方向为代谢工程及微生物合成生物学。

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn



第一作者: 高虎涛(1997—),男,硕士研究生。研究方向为芳香氨基酸衍生物的合成生物学和代谢工程。

E-mail: 2019201106@buct.edu.cn

广告索引:九天基因科技(天津)有限公司(后彩一)/国家合成生物技术创新中心(后彩二)/
诚志生命科技有限公司(封三)