

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-014

## 工程微生物合成苯丙酸类化合物及其衍生物的研究进展

牛福星<sup>1</sup>, 杜云平<sup>2</sup>, 黄远斌<sup>1</sup>, 周荷田<sup>2</sup>, 刘建忠<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中山大学生命科学院合成生物学研究所, 生物无机与合成化学教育部重点实验室, 广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275; <sup>2</sup> 温氏食品集团股份有限公司, 广东 云浮 527400)

**摘要:** 苯丙酸类化合物是一类重要的苯丙素类化合物, 是指含 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> 单元的天然有机酸, 包括苯丙烯酸类和苯乳酸类化合物。许多苯丙酸类化合物具有抗氧化、抑菌、增强免疫力、抗癌、抗病毒、抗炎、降血脂、治疗心血管疾病等生物学活性, 广泛应用于食品、医药、香料、化妆品、农业等领域。苯丙酸类化合物是经由莽草酸合成途径合成的苯丙氨酸或酪氨酸衍生物。随着代谢工程和合成生物学的发展, 成功构建了一些微生物以合成苯丙酸类化合物及其衍生物。为此, 本文系统综述了工程微生物合成苯丙酸类化合物及其衍生物的进展, 包括肉桂酸、苯乙烯、对香豆酸、对羟基苯乙烯、对香豆酸-莽草酸、咖啡酸、绿原酸、3,4-二羟基苯乙烯、阿魏酸、姜黄素、左旋多巴、苯乳酸、对羟基苯乳酸、丹参素和迷迭香酸。其后, 归纳了应用于微生物合成芳香化合物的主要合成生物学策略。最后, 对合成苯丙酸类化合物及其衍生物的工程微生物的发展趋势进行了展望。本文旨在为合成苯丙酸类化合物及其衍生物的人工微生物的创制提供指导。

**关键词:** 工程微生物; 苯丙酸类化合物及其衍生物; 代谢工程; 合成生物学; 生物合成; 菌种构建

**中图分类号:** Q 78 **文献标志码:** A

## Recent advances in the production of phenylpropanoic acids and their derivatives by genetically engineered microorganisms

NIU Fuxing<sup>1</sup>, DU Yunping<sup>2</sup>, HUANG Yuanbin<sup>1</sup>, ZHOU Hetian<sup>2</sup>, LIU Jianzhong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Synthetic Biology, MOE Key Laboratory of Bioinorganic and Synthetic Chemistry, Guangdong Province Key Laboratory of Improved Variety Reproduction in Aquatic Economic Animals, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China; <sup>2</sup>Wens Foodstuff Group CO., Ltd., Yunfu 527400, Guangdong, China)

**Abstract:** Phenylpropanoic acids are important phenylpropanoid compounds, which are natural organic acids containing the C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> unit, including phenylacrylic acid and phenyllactic acid compounds. Many phenylpropanoic acids have activities in antioxidation, antibacteria, antitumors, antiviral, anti-inflammation, immunity enhancement, reducing blood lipids, and treating

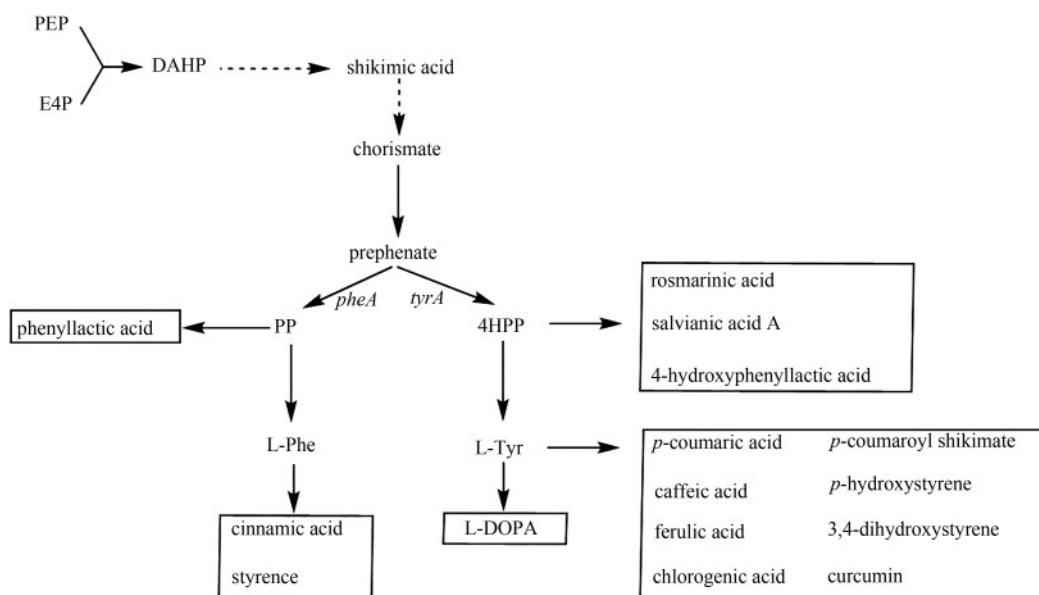
收稿日期: 2020-03-02 修回日期: 2020-04-14

基金项目: 国家自然科学基金 (21808248 和 31901024); 广东省基础与应用基础研究基金 (2019B1515210006); 深圳合成生物学创新研究院对外开放基金 (DWKF20190003)。

引用本文: 牛福星, 杜云平, 黄远斌, 周荷田, 刘建忠. 工程微生物合成苯丙酸类化合物及其衍生物的研究进展[J]. 合成生物学, 2020, 1(3): 337-357

Citation: NIU Fuxing, DU Yunping, HUANG Yuanbin, ZHOU Hetian, LIU Jianzhong. Recent advances in the production of phenylpropanoic acids and their derivatives by genetically engineered microorganisms[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(3): 337-357

cardiovascular diseases. Phenylpropanoic acids are widely used in food, medicine, flavor, cosmetics, agriculture, and so forth. In plants, phenylpropanoids are synthesized from L-phenylalanine or L-tyrosine derived from the shikimate pathway. To overcome the drawbacks of their extract from plants, biotechnological production is a good alternative. With advances in metabolic engineering and synthetic biology, many microorganisms have been engineered to produce phenylpropanoic acids and their derivatives. Herein, we systematically and comprehensively review recent advancements in the production of phenylpropanoic acids and their derivatives by metabolic engineered microorganisms. These compounds include cinnamic acid, styrene, *p*-coumaric acid, *p*-hydroxystyrene, *p*-coumaroyl shikimate, caffeic acid, chlorogenic acid, 3,4-hydroxystyrene, ferulic acid, curcumin, L-DOPA, phenyllactic acid, *p*-hydroxyphenyllactic acid, salvianic acid A, and rosmarinic acid. Then, some main synthetic biology strategies for the microbial production of the aromatics are summarized. Finally, future perspectives about engineering microorganisms for producing phenylpropanoids are discussed. Some strategies are proposed: 1) tolerance engineering using biosensor-based adaptive laboratory evolution; 2) oxidative engineering; 3) modular coculture engineering; 4) systems metabolic engineering.



**Keywords:** engineered microorganisms; phenylpropanoic acids and their derivatives; metabolic engineering; synthetic biology; biosynthesis; strain construction

苯丙酸类化合物是苯丙素类化合物中的一类，是指含  $C_6-C_3$  单元的天然有机酸，包括苯丙烯酸类和苯乳酸类化合物。许多苯丙酸类化合物具有显著的生物学活性，而广泛应用于食品、医药、香料、化妆品、农业等领域。

在植物中，苯丙酸类化合物是经莽草酸途径生成的芳香族氨基酸的衍生物，其人工生物合成途径如图1所示。苯丙氨酸、酪氨酸在苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、酪氨酸解氨酶 (TAL) 的作用下分别生成肉桂酸 (cinnamic acid) 和对香豆酸 (*p*-coumaric acid)。它们又会被进一步羟化或甲基化从而生成其他苯丙烯酸类化合物。对香豆酸在羟化酶

(C3H) 的作用下生成咖啡酸 (caffeic acid)，而咖啡酸又在 *O*-甲基转移酶 (COM) 的催化下生成阿魏酸 (ferulic acid)。苯丙氨酸前体苯丙酮酸 (PP) 在乳酸脱氢酶作用下生成苯乳酸；而酪氨酸前体对羟基苯丙酮酸在乳酸脱氢酶作用下则生成对羟基苯乳酸。

微生物与植物具有类似的初级代谢途径，如芳香族生物代谢途径。随着代谢工程、合成生物学的发展，工程微生物已成为苯丙酸类化合物生物合成的一种有效的方法。因此，本文对近年来工程微生物生物合成苯丙酸类化合物的进展做一综述，最后对其未来发展方向进行了展望。

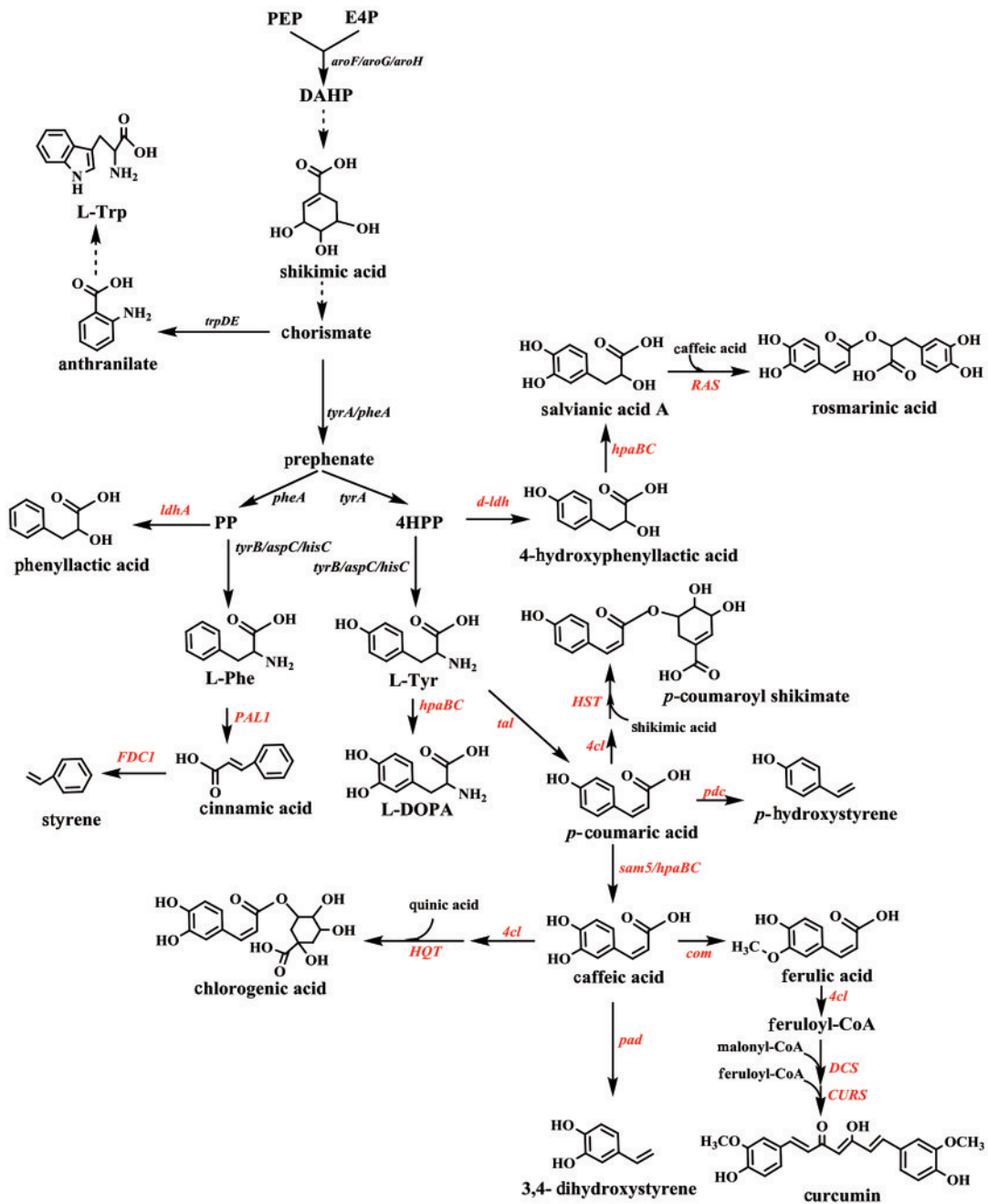


图1 苯丙酸类化合物及其衍生物的人工生物合成途径

Fig. 1 The artificial biosynthetic pathway of phenylpropanoids and their derivatives

Black: endogenous genes; Red: exogenous genes.

PEP—phosphoenolpyruvate; E4P—D-erythrose 4-phosphate; DAHP—3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate;  
 L-Trp—L-tryptophan; PP—phenylpyruvate; 4HPP—4-hydroxyphenylpyruvate; L-Phe—L-phenylalanine; L-Tyr—L-tyrosine;  
*aroF/aroG/aroH*—3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase genes; *trpDE*—anthranilate synthase genes;  
*pheA/tyrA*—chorismate mutase/prephenate dehydrogenase genes; *ldhA*—lactate dehydrogenase gene; *d-ldh*—D-lactate dehydrogenase gene;  
*hpaBC*—*p*-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase genes; *RAS*—rosmarinic acid synthase gene; *PAL1*—phenylalanine ammonia lyase gene;  
*tal*—tyrosine ammonia lyase gene; *4cl*—4-coumaroyl-coenzyme A ligase gene; *HST*—hydroxycinnamate-CoA shikimate transferase;  
*FDC1*—ferulic acid decarboxylase 1 gene; *pdc*—*p*-coumaric acid decarboxylase gene; *sam5*—4-coumarate hydroxylase gene; *com*—caffeic acid  
 methyltransferase gene; *HQT*—hydroxycinnamoyl-CoA quinate transferase gene; *pad*—phenolic acid decarboxylase; *DCS*—phenyldiketide-CoA  
 synthase gene; *CURS*—curcumin synthase gene

## 1 苯丙烯酸类化合物

### 1.1 肉桂酸及其衍生物

肉桂酸又名 $\beta$ -苯丙烯酸、3-苯基-2-丙烯酸。它在医药、农药、香料等方面的应用中起着重要作用。医药方面，它是合成治疗脑动脉硬化药物肉桂苯哌嗪、治疗冠心病药物心可安等的重要前体；同时也可以抑制多种肿瘤细胞的增殖。农药方面，它可以用于杀菌剂、除草剂以及食品保鲜防腐剂等。香料方面，它是食品安全国家标准食品添加剂使用标准（GB 2760—2014）规定范围内所允许使用的香料之一。Bang等<sup>[1]</sup>在过量生产L-苯丙氨酸的大肠杆菌中质粒表达马里蒂姆链霉菌（*Streptomyces maritimus*）苯丙氨酸解氨酶基因*pal*，实现了从头合成肉桂酸，在2 L反应器中pH-Stat补料发酵可产6.9 g/L肉桂酸。Gottardi等<sup>[2]</sup>研究发现在酿酒酵母中发光杆菌（*Photorhabdus luminescens*）的苯丙氨酸解氨酶比拟南芥酶具有更高的催化活性。在此基础上，他们优化了生物合成途径后构建了一株工程酵母，实现了从头合成肉桂酸，摇瓶发酵可产37.9 mg/L肉桂酸。

苯乙烯是肉桂酸的脱羧产物，是合成聚合物、共聚物、塑料及合成橡胶等的重要单体，2020年全球需求将超过4100万吨。美国亚利桑那州立大学Nielsen团队<sup>[3]</sup>在高产苯丙氨酸的大肠杆菌NST74中，质粒共表达拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的苯丙氨酸解氨酶*PAL2*和酿酒酵母的肉桂酸脱羧酶*FDC1*，摇瓶发酵产260 mg/L苯乙烯。为了避免苯乙烯对宿主菌的毒性，随后该团队<sup>[4]</sup>应用二(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯萃取发酵技术，使工程菌苯乙烯产量提高至836 mg/L。中国科学院青岛生物能源与过程研究所咸漠团队<sup>[5]</sup>采用相似策略构建了一株含双质粒的工程大肠杆菌以从头合成苯乙烯，通过豆蔻酸异丙酯萃取发酵使工程大肠杆菌苯乙烯产量提高至350 mg/L。Jeong团队<sup>[6]</sup>采用双质粒系统分别表达马里蒂姆链霉菌*pal*基因和酿酒酵母*FDC1*基因，并将其引入高产苯丙氨酸的工程大肠杆菌中，采用萃取与气提相结合的高密度发酵技术，5 L罐发酵60 h产5.3 g/L苯乙烯。今年，美国可再生与可持续能源研究所Gill团队<sup>[7]</sup>首先将拟南芥*PAL2*和酿酒酵母*FDC1*基因整

合到苯丙氨酸产生菌大肠杆菌NST74染色体上，构建了一株苯乙烯产生菌；随后利用iCREATE技术对*PAL2*和*FDC1*基因的核糖体结合位点（RBS）序列进行了优化，接着采用同样的iCREATE策略对54个转录因子进行了突变进化以提高工程菌对苯乙烯的耐受性和产量，获得了一株工程大肠杆菌，在1 L罐中后期补料气提发酵可产3.15 g/L苯乙烯。测序发现，工程菌染色体上的转录抑制因子*lexA*发生了E45I氨基酸突变。由于酿酒酵母本身含有肉桂酸脱羧酶基因*FDC1*，只需引入苯丙氨酸解氨酶基因，便可合成苯乙烯。美国亚利桑那州立大学Nielsen团队<sup>[8]</sup>在酿酒酵母中质粒表达拟南芥苯丙氨酸解氨酶基因*PAL2*，从而构建了能产苯乙烯的酿酒酵母。为了提高酿酒酵母合成苯丙氨酸的能力，他们首先通过传统诱变育种筛选到一株间-氟-DL-苯丙氨酸抗性菌，使其苯丙氨酸产量提高到357 mg/L；随后，通过强化表达耐受反馈抑制的DAHP合酶*ARO4*<sup>K229L</sup>基因和阻断竞争性途径苯丙酮酸的消耗，使苯乙烯产量提高60%，达到29 mg/L。链霉菌具有降解生物质、同化木糖（如戊糖）及纤维二糖、低聚木糖等低聚糖的良好能力，因此日本神户大学Fujiwara等<sup>[9]</sup>构建了一个能利用单糖或低聚糖的产苯乙烯的浅青紫链霉菌（*Streptomyces lividans*）-浅青紫链霉菌共培养系统，以葡萄糖为碳源时，摇床发酵可产30 mg/L苯乙烯。

### 1.2 对香豆酸及其衍生物

对香豆酸又名对羟基肉桂酸，具有抗氧化、抗菌和抗突变活性，也是许多重要化合物及药物的前体或中间体。对香豆酸既可以在苯丙氨酸解氨酶和肉桂酸羟化酶催化作用下由苯丙氨酸生成，也可以在酪氨酸解氨酶催化作用下直接由酪氨酸生成。由于肉桂酸羟化酶是一种细胞色素P450酶，在原核宿主细胞中难以表达，因此，通常采用酪氨酸解氨途径来合成对香豆酸。丹麦技术大学和瑞典查尔姆斯理工大学Nielsen团队<sup>[10]</sup>在敲除竞争性途径酶基因*ARO10*和*PDC5*的基础上，强化表达合成途径酶基因从而构建了一株产对香豆酸的酿酒酵母。工程酵母强化表达约翰逊黄杆菌

(*Flavobacterium johnsoniae*) 酪氨酸解氨酶基因 *tal*、去反馈抑制的 DAHP 合酶基因 *ARO4<sup>K229L</sup>*、去反馈抑制的分支酸变位酶基因 *ARO7<sup>G141S</sup>* 及大肠杆菌的莽草酸激酶基因 *aroL*。所构建的酿酒酵母在 1 L 发酵罐中分批补料发酵产 1.9 g/L 对香豆酸。随后, 该课题组<sup>[11]</sup> 比较分析了两个常用的酿酒酵母宿主菌对对香豆酸合成的影响, 发现酿酒酵母 CEN.PK 更有利于对香豆酸的合成, 同时发现敲除一些转运蛋白基因能明显促进对香豆酸的合成。最近, 该课题组<sup>[12]</sup> 通过引入磷酸酮醇酶途径以增加赤藓糖-4-磷酸 (E4P) 的供给以及通过启动子置换优化糖酵解途径和芳香族氨基酸合成途径间碳通量的分配, 使工程酵母对香豆酸产量提高到 12.5 g/L, 对葡萄糖的产率达到 154.9 mg/g。虽然大肠杆菌<sup>[13]</sup>、蓝细菌 (*Synechocystis* PCC 6803)<sup>[14]</sup> 和假单胞菌 (*Pseudomonas putida* KT2440)<sup>[15]</sup> 都已成功用作合成对香豆酸的宿主菌, 但其产量都远低于酿酒酵母。

对香豆酸在脱羧酶作用下脱羧生成对羟基苯乙烯。对羟基苯乙烯又称为 4-乙烯基苯酚, 是一种重要的化工原料, 用于生产许多重要的工业聚合物; 同时也在光阻、光刻和半导体制造中发挥重要作用。Qi 等<sup>[16]</sup> 在苯丙氨酸高产菌大肠杆菌 NST74 中利用质粒共表达黏红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 酪氨酸/苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 对香豆酸脱羧酶基因 *pdC*, 在 14 L 发酵罐中补料发酵可产 0.4 g/L 对羟基苯乙烯。Kang 等<sup>[17]</sup> 构建了一个由西班牙糖丝菌 (*Saccharothrix espanaensis*) 酪氨酸解氨酶基因 *tal* 和解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 酚酸脱羧酶基因 *pad* 组成的对羟基苯乙烯合成途径, 并将其转化到苯丙氨酸高产大肠杆菌中, 摇床发酵 36 h 能产 355 mg/L 对羟基苯乙烯。由于链霉菌基因组含有丰富的酚酸脱羧酶基因, 因此链霉菌也已成功用作合成对羟基苯乙烯的宿主菌。日本神户大学 Kondo 团队<sup>[18]</sup> 比较了 3 种不同链霉菌的酚酸脱羧酶基因, 发现斯氏链霉菌 (*Streptomyces sviveus*) 的酚酸脱羧酶催化对香豆酸脱羧生成对羟基苯乙烯的效果最佳。该团队<sup>[19]</sup> 随后比较分析了 9 个不同链霉菌分解代谢对香豆酸的能力, 发现白斑链霉菌 (*Streptomyces mobaraense*) 的降解能力最

强, 为此他们将球形红杆菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 酪氨酸解氨酶基因引入白斑链霉菌中, 从而构建了产对羟基苯乙烯的白斑链霉菌。恶臭假单胞菌因具有很强的溶剂耐受能力, 也已成功用作对羟基苯乙烯的宿主菌。Verhoef 等<sup>[20]</sup> 在溶剂耐受菌恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida* S12) 中质粒表达黏红酵母酪氨酸/苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* 和植物乳杆菌对香豆酸脱羧酶基因 *pdC*, 从而构建了一株产对羟基苯乙烯的恶臭假单胞菌。在此基础上敲除阿魏酸辅酶 A 合成酶基因 *fcs* 以阻断对香豆酸的分解, 进一步提高了对羟基苯乙烯的产量。为了降低产物的细胞毒性, 采用有机相萃取发酵技术, 工程菌对羟基苯乙烯的产量达到 17.6 g/L。

### 1.3 咖啡酸及其衍生物

咖啡酸及其衍生物是一类普遍存在于一些植物中的次生代谢产物。咖啡酸及其衍生物具有抗氧化、清除自由基、抗炎、抑菌、抗病毒、抗感染、增强免疫力、抗癌、止血等活性。目前大肠杆菌、酿酒酵母已成功用于合成咖啡酸, 并实现了从头合成<sup>[21]</sup>。美国佐治亚大学 Yan 团队<sup>[22]</sup> 比较了不同红细菌 *Rhodobacter* 的酪氨酸解氨酶 (TAL) 后, 将来源于荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*) 的 *tal* 和大肠杆菌的 4-羟基苯乙酸 3-羟化酶基因 *hpaBC* 引入产酪氨酸的大肠杆菌中, 首次从头合成了咖啡酸, 摇床发酵 48 h 可产 50.2 mg/L 咖啡酸。随后, 美国麻省理工学院的 Zhang 和 Stephanopoulos<sup>[23]</sup> 构建了由黏红酵母 *tal* 和西班牙糖丝菌 (*Saccharothrix espanaensis*) 对香豆酸 3-羟化酶基因 *sam5* 编码酶组成的另一个咖啡酸合成途径, 并将该外源途径引入产酪氨酸的大肠杆菌中, 在 2 L 发酵罐中发酵 4 d 可产 106 mg/L 咖啡酸。佐治亚大学 Yan 团队<sup>[24]</sup> 在将高产苯丙氨酸的大肠杆菌 ATCC31884 改造为酪氨酸产生菌的基础上, 引入由黏红酵母 *tal* 和大肠杆菌 HpaBC 组成的咖啡酸合成途径, 使大肠杆菌摇床发酵可产 766.68 mg/L 咖啡酸, 是目前文献报道的从头合成咖啡酸的最高值。日本神户大学 Kawaguchi 等<sup>[25]</sup> 构建了一个由铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)

HpaBC和链霉菌 (*Streptomyces* sp. WK-534) 酪氨酸裂解酶 (FevV) 组成的咖啡酸合成途径, 将其引入酪氨酸产生菌后, 在外加纤维素酶条件下, 从硫酸盐纸浆中边糖化边发酵, 可生产 233 mg/L 咖啡酸。天津大学元英进团队<sup>[26]</sup> 在比较了不同来源的 HpaB 和 HpaC 之后, 合成了一个咖啡酸途径, 将其引入酿酒酵母中, 创制了第一个合成咖啡酸的酿酒酵母, 以葡萄糖为原料摇床发酵可产 289.4 mg/L 咖啡酸。全细胞生物催化是将细胞生长与产物合成完全隔开的一种生物制造技术。它尤其适合高毒性产物的生物制造。对香豆酸和咖啡酸等苯丙烯酸类化合物固有的抑菌活性, 导致对大肠杆菌同样具有很高的毒性。为了避免对香豆酸和咖啡酸高毒性的抑制作用, 佐治亚大学 Yan 团队<sup>[24]</sup> 利用表达 *EchpaBC* 的酪氨酸产生菌, 进行全细胞生物催化对香豆酸合成咖啡酸, 产量达到 3.82 g/L。目前文献报道的咖啡酸产量最高值是利用全细胞生物催化对香豆酸而获得的, 达到 10.2 g/L<sup>[27]</sup>。从已报道的咖啡酸产量数据来看, 全细胞生物催化的咖啡酸产量远远高于以葡萄糖为原料从头合成的产量。究其原因, 可能是咖啡酸对宿主细胞的高毒性引起的。

在植物中, 咖啡酸常与奎宁酸、莽草酸、马来酸、邻氨基苯甲酸或甘油共轭生成酯化物。而且这些酯化物比咖啡酸具有更好的溶解性、稳定性和抗氧化能力。绿原酸就是其中一个重要代表, 它是咖啡酸与奎宁酸的共轭酯化产物, 广泛存在于咖啡、杜仲、金银花和野菊花等植物中。韩国建国大学 Ahn 团队<sup>[28]</sup> 首先构建了一株产绿原酸的工程大肠杆菌, 该工程菌质粒表达了烟草 (*Nicotiana tabacum*) 羟基肉桂酸辅酶 A 奎宁酸转移酶基因 *HQT*、水稻 (*Oryza sativa*) 对香豆酸辅酶 A 连接酶基因 *4CL* 和内源莽草酸/奎宁酸脱氢酶基因 *ydiB*。发酵 24 h 后, 工程菌以咖啡酸为原料可合成 450 mg/L 绿原酸。他们的研究表明, *NtHQT* 能催化奎宁酸与咖啡酸-CoA、对香豆酸-CoA 或阿魏酸-CoA 间的酯化反应, 但咖啡酸-CoA 是其最佳的酰基供体, 其次是对香豆酸-CoA 和阿魏酸-CoA。随后, 该团队<sup>[29]</sup> 将所构建的以咖啡酸为原料的绿原酸产生菌与产咖啡酸的工程大肠杆菌进行共培养, 实现了以葡萄糖为原料的绿原酸

从头合成, 摇床发酵可产 78 mg/L 绿原酸。烟草中也含有羟基肉桂酸辅酶 A 莽草酸转移酶基因 *HST*。*NtHST* 能催化莽草酸与对香豆酸-CoA、咖啡酸-CoA 或阿魏酸-CoA 间的酯化, 分别生成对香豆酸-莽草酸酯、咖啡酸-莽草酸酯或阿魏酸-莽草酸酯。该团队<sup>[28]</sup> 研究发现在以莽草酸为酰基受体时, 对香豆酸-CoA 是 *NtHST* 的最佳酰基供体。在敲除了 *aroL* 基因的大肠杆菌中质粒表达 *NtHST* 和 *Os4CL*, 可催化对香豆酸生成 235 mg/L 对香豆酸-莽草酸酯<sup>[28]</sup>。随后, 该团队<sup>[29]</sup> 利用 *NtHST* 构建了一株大肠杆菌, 实现了从头合成对香豆酸-莽草酸, 摇床发酵 48 h 可产 236 mg/L 对香豆酸-莽草酸酯。

3,4-二羟基苯乙烯是苯乙烯衍生物。Kang 等<sup>[17]</sup> 构建了一个由西班牙糖丝菌酪氨酸裂解酶基因 *tal* 和对香豆酸-3-羟化酶基因 *sam5*、解淀粉芽孢杆菌酚酸脱羧酶基因 *pad* 组成的 3,4-二羟基苯乙烯合成途径, 并将其转化到苯丙氨酸高产大肠杆菌中进行表达, 摇床发酵 36 h 能产 63 mg/L 3,4-二羟基苯乙烯。

#### 1.4 阿魏酸

阿魏酸又称为 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸。它具有抗辐射、抗氧化、抗血栓、降血脂、降低心肌缺血和耗氧量、抗菌、抗病毒、抗癌等功能。临床上已用于治疗冠心病、肾病、肺动脉高压、脑梗死、阿尔茨海默病等。阿魏酸广泛存在于伞形科、毛茛科及禾本科等植物中, 如当归、川芎、升麻、三棱等。阿魏酸是咖啡酸甲基化产物, 咖啡酸在 *O*-甲基转移酶 (COMT) 的催化下生成阿魏酸。韩国生物科学与生物技术研究所以 Kang 等<sup>[30]</sup> 构建了一个由西班牙糖丝菌酪氨酸裂解酶基因 *tal*、对香豆酸-3-羟化酶基因 *sam5* 和拟南芥 *O*-甲基转移酶基因 *com* 编码酶组成的阿魏酸合成途径, 并将该途径引入合成酪氨酸的大肠杆菌中, 实现了阿魏酸的从头合成, 摇床发酵 36 h 可产 196 mg/L 阿魏酸。阿魏酸也可由丁香酚通过丁香酚羟化酶 (或者香草醇氧化酶)、松柏醇脱氢酶和松柏醛脱氢酶催化生成。Overhage 等<sup>[31]</sup> 在真氧产碱菌 H16 中用质粒表达假单胞菌丁香酚羟化酶基因 *ehyAB*、松柏醇脱氢酶基因 *calA* 及松柏醛脱氢酶基因 *calB*, 所构建工程菌能生物转化丁香酚生成阿魏酸, 生产

力达到2.9 mmol/(L·h)。随后,该课题组<sup>[32]</sup>又构建了一株质粒表达筒青霉(*Penicillium simplicissimum*)的香草醇氧化酶基因*vaoA*、假单胞菌松柏醇脱氢酶基因*calA*及松柏醛脱氢酶基因*calB*的大肠杆菌,所构建大肠杆菌在30 L发酵罐中可在30 h内将丁香酚生物催化生成14.7 g/L阿魏酸,摩尔转化率达到93.3%。

姜黄素是姜黄中的一种黄色的二酮化合物,具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗肿瘤、护肝、降脂、抗动脉粥样硬化、抑制肥胖、抗老年痴呆等生物活性,广泛应用于食品、医药、化妆品和禽畜养殖等行业。阿魏酸经过对香豆酰辅酶A连接酶(4CL)、二酮辅酶A合酶(DCS)和姜黄素合酶(CURS)三个酶的连续催化反应生成姜黄素。葡萄牙米尼奥大学Rodrigues课题组<sup>[33]</sup>将由拟南芥4CL、姜黄DCS和姜黄CURS2组成的姜黄素合成途径引入大肠杆菌中,实现了从阿魏酸到姜黄素的合成。随后,该课题组<sup>[34]</sup>对工程菌的培养条件进行了优化,使以阿魏酸为原料合成姜黄素的产量提高到959.3 μmol/L(353 mg/L)。韩国生物科学与生物技术研究所以Kang等<sup>[35]</sup>将西班牙糖丝菌酪氨酸解氨酶基因*tal*、对香豆酸-3-羟化酶基因*sam5*、拟南芥*O*-甲基转移酶*com*由烟草4cl、姜黄苯二肽CoA合成酶基因DCS和姜黄素合成酶基因CURS2编码酶组成的姜黄素合成途径引入合成酪氨酸的大肠杆菌中,实现了姜黄素的从头合成,然后采用多重基因组工程(MAGE)技术对合成途径的6个基因的表达水平进行了优化,使姜黄素产量提高了38.2倍,达到3.8 mg/L。

## 1.5 左旋多巴

左旋多巴(L-DOPA)是治疗帕金森病的药物。由于帕金森病患者人数的逐年增加,对药物的需求也逐年增加,左旋多巴全球市场规模达每年250 t、1.01亿美元市值。目前左旋多巴的生物制造方法主要有:①酪氨酸酶法;②酪氨酸苯酚裂解酶法;③对羟基苯乙酸3-羟化酶法<sup>[36]</sup>。酪氨酸酶能催化两个反应:一是催化酪氨酸生成左旋多巴,即甲酚酶活性;二是催化左旋多巴氧化生成多巴醌,即邻苯二酚酶活性。酪氨酸酶的这种特性不利于左旋多巴的合成。酪氨酸苯酚裂解酶

能催化裂解酪氨酸生成丙酮酸、氨和酚的可逆反应。当丙酮酸、氨和邻苯二酚为底物时,酪氨酸苯酚裂解酶便能催化左旋多巴的合成。由于酪氨酸苯酚裂解酶是酪氨酸诱导酶,需要添加酪氨酸进行诱导,从而增加了左旋多巴从含酪氨酸的培养液中提取的难度。而且酪氨酸苯酚裂解酶法需要丙酮酸和邻苯二酚参与,无法以葡萄糖为原料从头合成,从而限制了其应用。对羟基苯乙酸3-羟化酶法能直接羟化酪氨酸生成左旋多巴,以便从头合成,受到了学者的广泛关注。墨西哥国立自治大学Munoz等<sup>[37]</sup>最早构建了一株产左旋多巴的大肠杆菌,他们将非P450酶的大肠杆菌W的对羟基苯乙酸3-羟化酶基因*hpaBC*引入酪氨酸高产大肠杆菌中,在1 L反应器中分批发酵40 h,可产1.51 g/L左旋多巴。本课题组<sup>[38]</sup>首先利用单基因组工程手段,对转录调控因子*tyrR*和*csrA*、葡萄糖磷酸转移酶系统、竞争性途径酶基因*zwf*和*pheLA*、合成途径关键酶基因进行了敲除/置换和整合,构建了一株无质粒的产左旋多巴大肠杆菌,然后采用MAGE技术对23个靶基因进行修饰,进一步提高左旋多巴产量,所构建工程大肠杆菌在5 L发酵罐中后期补料发酵60 h可产8.67 g/L左旋多巴。Das等<sup>[39]</sup>构建了一株产左旋多巴的工程大肠杆菌,该菌敲除了丙酮酸激酶I基因*pfkF*、转录因子*tyrR*和磷酸甘油酸脱氢酶基因*serA*,双质粒表达酪氨酸氨基转移酶基因*tyrB*、分支酸变位酶基因*tyrA*、分支酸合成酶基因*aroC*、3-磷酸莽草酸1-羧乙基转移酶基因*aroA*、莽草酸激酶II基因*aroL*、*hpaBC*。工程菌以甘油为碳源、在5 L发酵罐中后期补料发酵产12.5 g/L左旋多巴。江南大学周景文团队<sup>[40]</sup>通过对HpaB的定向进化,获得了3个突变体,将其中*hpaB*<sup>G295R</sup>的突变体置换产左旋多巴大肠杆菌的野生型*hpaB*基因,进一步提高了左旋多巴的产量,在5 L发酵罐中后期补料发酵48 h可产25.53 g/L左旋多巴。

## 2 苯乳酸类化合物

### 2.1 苯乳酸

苯乳酸是一种广谱的新型天然防腐剂,对多

数革兰氏阳性、阴性菌和真菌都有明显的抑菌作用。经聚合后生成比聚乳酸具有更强的热稳定性、机械强度、柔韧性和紫外吸收能力的新型的生物基聚合物聚苯乳酸。在医学上,可作为丹参素替代品用于治疗冠心病,具有止血止痛疗效,抗血小板聚集和扩张冠状动脉等功能。在化妆品行业,具有除皱、亮肤的美容功效。作为新型的抑菌剂,特别对肠道致病菌具有良好的抑制作用,苯乳酸类化合物成功应用于畜禽养殖业,代替抗生素成分并提高鸡肉品质,提高蛋鸡的免疫能力以及鸡蛋的质量,减少猪的肠道致病菌并提高生产性能。因此,苯乳酸在食品、医药、化妆品、生物材料和养殖行业有广阔的应用前景。工程微生物生产苯乳酸的方法主要有两种:一是全细胞生物催化苯丙氨酸/苯丙酮酸法;二是微生物发酵从头合成法。乳酸脱氢酶能催化苯丙酮酸生成苯乳酸,但反应需要消耗NADH。因此辅因子NADH的再生是该反应的一个关键因素。葡萄糖脱氢酶和甲酸脱氢酶的催化反应能生成NADH,已成功作为全细胞生物催化生成苯乳酸的辅因子再生系统。Zhu等<sup>[41]</sup>利用质粒表达植物乳杆菌乳酸脱氢酶和巨大芽孢杆菌葡萄糖脱氢酶的大肠杆菌,全细胞生物催化苯丙酮酸生成L-苯乳酸,产量达到103.8 mmol/L。但该工艺需要消耗葡萄糖作为葡萄糖脱氢酶的底物以实现NADH再生。Zhang和Li<sup>[42]</sup>应用表达灰盖鬼伞菌(*Coprinopsis cinereus*)苯丙氨酸氧化酶和植物乳杆菌乳酸脱氢酶的大肠杆菌,全细胞生物催化苯丙氨酸生成1.62 g/L L-苯乳酸、转化率为28%。天津科技大学贾士儒团队<sup>[43]</sup>构建了一株质粒表达奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)L-氨基酸解氨酶基因*L-aad*、植物乳杆菌乳酸脱氢酶基因*L-ldh*和博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)甲酸脱氢酶基因*FDH*的大肠杆菌,经RBS序列优化和采用共底物辅因子再生手段,使重组大肠杆菌在葡萄糖的辅助下,全细胞生物催化苯丙氨酸生成L-苯乳酸的产量进一步提高至54.0 g/L。但苯丙氨酸和苯丙酮酸价格高,限制了全细胞生物催化法的产业化。科学家们希望能构建工程微生物以葡萄糖为原料从头合成苯乳酸。日本大阪市技术研究所Koma等<sup>[44]</sup>将合成苯丙氨酸的大肠杆菌的*acs*和*mtlA*基因置换成钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)乳酸脱

氢酶基因*ldhA*,从而构建了从头合成苯乳酸的大肠杆菌,摇床发酵产6.0 mmol/L苯乳酸。日本神户大学Fujita等<sup>[45]</sup>在合成苯丙氨酸的大肠杆菌NST37中质粒表达荧光威克汉酵母(*Wickerhamia fluorescens*)苯丙酮酸还原酶基因*pprA*及去反馈抑制*pheA<sup>br</sup>*和*aroG<sup>br</sup>*,构建了一株产D-苯乳酸的重组大肠杆菌,工程菌在0.4 L发酵罐中后期补料发酵144 h可产29.2 g/L D-苯乳酸。他们研究也发现,用乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)乳酸脱氢酶基因*L-ldhA*置换*pprA*基因,所构建的工程菌生成的是L-苯乳酸、摇瓶发酵的产量为1.9 g/L。

## 2.2 4-羟基苯乳酸及其衍生物

4-羟基苯乳酸具有与苯乳酸同样的性质,它是酪氨酸/4-羟基苯丙酮酸的衍生物。日本大阪市技术研究所Koma等<sup>[44]</sup>将合成酪氨酸的大肠杆菌的乙酰辅酶A合成酶基因*acs*置换成钩虫贪铜菌乳酸脱氢酶基因*ldhA*,从而构建了从头合成羟基苯乳酸的大肠杆菌,摇床发酵产8.1 mmol/L羟基苯乳酸。

丹参素(salvianic acid A)是丹参水溶性成分中的主要药效成分之一。它具有保护心肌、抑制血小板凝集及抗凝、抗动脉粥样硬化及降血脂、抗血栓形成、扩张冠状动脉、抗脑缺血、抗氧化、增强免疫和抗癌等功效。天津大学赵广荣团队<sup>[46]</sup>在大肠杆菌中构建了1个由戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)D-乳酸脱氢酶和大肠杆菌HpaBC组成的丹参素合成途径,在优化了整个合成途径及敲除了竞争性途径后,所构建工程菌在摇瓶中后期补料发酵70 h可产7.10 g/L丹参素。为了避免质粒易丢失和质粒上抗性素抗性基因所带来的抗生素污染问题,该课题组<sup>[47]</sup>随后利用基因置换技术,将丹参素外源合成途径及需要强化表达的内源基因整合到大肠杆菌染色体的相应位置,从而构建了一株无质粒、无抗生素标记的合成丹参素大肠杆菌,工程菌摇瓶后期补料发酵60 h可产5.6 g/L丹参素。Li等<sup>[48]</sup>建立了一个由嗜压热球菌(*Thermococcus barophilus*)D-扁桃酸脱氢酶*TbManDH*、弯曲高温单孢菌(*Thermomonospora curvata*)苯丙氨酸4-羟化酶*TcPAH*和嗜酸硫杆菌(*Sulfobacillus acidophilus* TPY)羟基苯乙酸3-羟化

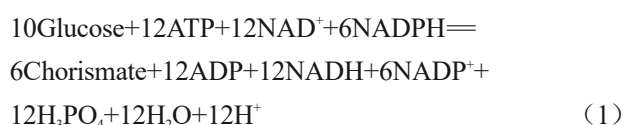
酶 SaHpaBC 组成的嗜热酶无细胞合成系统，在 50 °C 反应 12 h 能催化苯丙酮酸生成 39.2 mmol/L 丹参素，摩尔转化率达到 85%。

迷迭香酸是一种天然存在的水溶性羟基肉桂酸酯化合物，常见于迷迭香、紫苏和鼠尾草等植物中。具有抗氧化、抗抑郁、抗炎、抗菌、抗病毒和抗肿瘤等活性，已广泛用于食品、药物和化妆品等领域。在迷迭香酸合成酶作用下，丹参素与咖啡酸进行酯化生成迷迭香酸。Bloch 和 Schmidt-Dannert<sup>[49]</sup> 在比较了不同来源的酶基因后，构建了一个迷迭香酸外源合成途径，该途径由德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*) 2-羟基酸脱氢酶 (HdhA)、大肠杆菌 HpaBC、球形红杆菌 Tal、拟南芥 4CL2 和香蜂草 (*Melissa officinalis*) 迷迭香酸合成酶 (RAS) 构成；采用三质粒表达系统在大肠杆菌中表达该外源合成途径，首次实现了迷迭香酸的从头合成，工程菌可合成 1.8 μmol/L 迷迭香酸。他们研究同样发现酪氨酸等前体的供给是迷迭香酸合成的主要瓶颈。Jiang 等<sup>[50]</sup> 构建了另一个由不同酶组成的迷迭香酸的人工合成途径，该途径由戊糖乳杆菌 D-乳酸脱氢酶突变体 Ldh<sup>Y52A</sup>、大肠杆菌 HpaBC、拟南芥 4CL 和彩叶草 (*Coleus blumei*) RAS 组成；将该人工合成途径引入酪氨酸产生菌中实现了迷迭香酸的合成。在添加咖啡酸条件下全细胞生物催化产约 130 mg/L 迷迭香酸。迷迭香酸合成途径是典型的分流-汇合途径，碳流经 4-羟基苯丙酮酸分流成咖啡酸和丹参素两个合成途径，然后咖啡酸和丹参素进行酯化反应生成

迷迭香酸，即碳流又汇集在一起。为了平衡这些分支途径的碳代谢流，美国新泽西州立大学 Li 等<sup>[51]</sup> 构建了 3 个大肠杆菌组成的共培养系统，使迷迭香酸从头合成的产量提高到 172 mg/L。江南大学蔡宇杰团队<sup>[52]</sup> 构建了一个无细胞系统，在 ATP 和 CoA 循环再生条件下，以咖啡酸为原料无细胞系统反应 1 h 产 320.04 mg/L 迷迭香酸。

### 3 合成生物学策略的应用

苯丙酸类及其衍生物是分枝酸 (chorismate) 的衍生物 (图 1)。分枝酸的总合成方程式为：



由此可看出分枝酸的理论产率为 60% (摩尔分数)。表 1 为工程微生物合成苯丙酸类化合物及其衍生物的代表性进展，从其微生物合成的产量来看，与理论最大值还有相当大差距，即使是目前文献报道的苯丙氨酸 (72.9 g/L、28.3%)<sup>[53]</sup> 和酪氨酸 (43.14 g/L、10.6%)<sup>[54]</sup> 的最大值，与理论产率相比也有一定差距。近年来合成生物学的应用大幅度提高了工程微生物的合成效率。虽然应用于苯丙酸类及其衍生物微生物合成的合成生物学策略文献还鲜有报道，但是，为了给苯丙酸类及其衍生物的人工微生物创建提供借鉴，在此对应用于其他芳香化合物的合成生物学策略进行总结和评述。

表 1 代表性的工程微生物合成苯丙酸类化合物及其衍生物

Tab. 1 Representative microorganisms engineered for the production of phenylpropanoids and their derivatives

产品	应用	宿主	表达基因	敲除/置换基因	基质	培养条件	产量	生产力	文献
<b>苯丙酸类化合物</b>									
肉桂酸	杀菌剂、除草剂、香料、医药中间体	大肠杆菌 W3110	马里蒂姆链霉菌苯丙氨酸解氨酶基因 <i>pal</i> ；内源磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚醛缩酶反馈抑制抗性基因 <i>aroG<sup>br</sup></i> 、莽草酸脱氢酶基因 <i>ydiB</i> 、莽草酸激酶 I、分枝酸变位酶反馈抑制抗性基因 <i>pheA<sup>br</sup></i> 、葡萄糖激酶基因 <i>glk</i> 和 UDP-吡喃半乳糖变位酶基因 <i>galP</i>	PTS 系统 EIIA 组分蛋白基因 <i>crr</i> 、转录调控蛋白 TyrR 基因、分枝酸变位酶基因 <i>tyrA</i> 和丙酮酸激酶 II 基因 <i>pykA</i>	葡萄糖	2 L 罐补料发酵	6.9 g/L	0.08 g/(L·h)	[1]

续表

产品	应用	宿主	表达基因	敲除/置换基因	基质	培养条件	产量	生产力	文献
		酿酒酵母	密码子优化的发光杆菌苯丙氨酸解氨酶基因 <i>pal</i>	苯丙酮酸脱羧酶基因 <i>ARO10</i> 、去反馈抑制分枝酸变位酶基因 <i>ARO7<sup>G141S</sup></i> 和磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>ARO4<sup>K229L</sup></i> 置换天然基因	葡萄糖	摇床发酵	37.9mg/L	1.58 mg/(L·h)	[2]
苯乙烯	聚合物合成	大肠杆菌 NST74 (ATCC 31884)	拟南芥苯丙氨酸解氨酶基因 <i>PAL2</i> 、酿酒酵母肉桂酸脱羧酶基因 <i>FDC1</i>		葡萄糖	摇床发酵	260mg/L	8.97 mg/(L·h)	[3]
		大肠杆菌 NST74	拟南芥苯丙氨酸解氨酶基因 <i>PAL2</i> 、酿酒酵母肉桂酸脱羧酶基因 <i>FDC1</i>		葡萄糖	二(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯原位萃取摇床发酵	836mg/L		[4]
		大肠杆菌 BL21 (DE3)	拟南芥苯丙氨酸解氨酶基因 <i>PAL2</i> 、肉桂酸脱羧酶基因 <i>FDC1</i> 、内源 <i>ppsA</i> 和 <i>tklA</i> ；内源磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>aroF</i> 、分枝酸变位酶基因 <i>pheA</i> 、转酮酶 I 基因和磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因 <i>ppsA</i>		葡萄糖	异丙酯原位萃取摇床发酵	350mg/L	7.29 mg/(L·h)	[5]
		大肠杆菌 W3110	马里蒂姆链霉菌苯丙氨酸解氨酶基因 <i>pal</i> ；内源磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶反馈抑制抗性基因 <i>aroG<sup>br</sup></i> 、莽草酸脱氢酶基因 <i>ydiB</i> 、莽草酸激酶 I、分枝酸变位酶反馈抑制抗性基因 <i>pheA<sup>br</sup></i> 、葡萄糖激酶基因 <i>glk</i> 、UDP-吡喃半乳糖变位酶基因 <i>galP</i> 和酿酒酵母阿魏酸脱羧酶 I 基因 <i>FDC1</i>	PTS 系统 EIIA 组分蛋白基因 <i>crr</i> 、转录调控蛋白 TyrR 基因、邻氨基苯甲酸合酶基因 <i>trpE</i> 、分枝酸变位酶基因 <i>tyrA</i> 和丙酮酸激酶 II 基因	葡萄糖	5 L 罐原位萃取、气提补料发酵	5.3g/L	88.3 mg/(L·h)	[6]
		间氟-DL-苯丙氨酸抗性酿酒酵母	拟南芥苯丙氨酸解氨酶基因 <i>PAL2</i>	去反馈抑制磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>ARO4<sup>K229L</sup></i> 置换天然苯丙酮酸脱羧酶基因 <i>ARO10</i>	葡萄糖	摇床发酵	29mg/L	0.6 mg/L	[8]
		浅青紫链霉菌-浅青紫链霉菌	第一个菌：酿酒酵母阿魏酸脱羧酶 I 基因 <i>FDC1</i> 。 另一个菌：马里蒂姆链霉菌苯丙氨酸解氨酶基因 <i>encP</i>		葡萄糖	摇床共培养	30mg/L	0.18 mg/(L·h)	[9]
对香豆酸	抗氧化剂、抗菌剂及合成黄酮、多酚和聚酮化合物的前体	酿酒酵母 CEN. PK102-5B	约翰逊黄杆菌酪氨酸解氨酶基因 <i>tal</i> 、内源分枝酸变位酶反馈抑制抗性基因 <i>ARO7<sup>br</sup></i> 、磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶反馈抑制抗性基因 <i>ARO4<sup>br</sup></i> 和大肠杆菌莽草酸激酶 II 基因 <i>aroL</i>	苯丙酮酸脱羧酶基因 <i>ARO10</i> 和丙酮酸脱羧酶基因 <i>PDC5</i>	葡萄糖	1L 罐补料发酵	1.9g/L		[10]

续表

产品	应用	宿主	表达基因	敲除/置换基因	基质	培养条件	产量	生产力	文献
			拟南芥 P450 还原酶基因 <i>ATR2</i> 和肉桂酸羟化酶基因 <i>C4H</i> 、内源细胞色素 b5 基因 <i>CYB5</i> 、大肠杆菌莽草酸激酶 II 基因 <i>aroL</i> 、内源去反馈抑制分枝酸变位酶基因 <i>ARO7<sup>G14S</sup></i> 、去反馈抑制磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>ARO4<sup>K229L</sup></i> 、五功能 AROM 蛋白基因 <i>ARO1</i> 、分枝酸合成酶基因 <i>ARO2</i> 、磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>ARO3</i> 、苯甲酸酯脱水酶基因 <i>PHA2</i> 和苜蓿预苯酸脱氢酶基因 <i>PDH1</i>	丙酮酸脱羧酶基因 <i>PDC5</i> 、苯丙酮酸脱羧酶基因 <i>ARO10</i> 、半乳糖/乳糖代谢调节蛋白 <i>GAL80</i> 基因、磷酸果糖激酶 I、II 基因 <i>PFK1</i> 、 <i>PFK2</i> 和丙酮酸基因 I 基因 <i>PYK1</i> 的天然启动子分别置换成组蛋白脱乙酰酶 <i>SET3</i> 、细胞分裂蛋白 <i>CDC24</i> 和乙醛脱氢酶 <i>ALD5</i> 基因天然启动子	葡萄糖	1L 罐 补料发酵	12.5g/L	130.1 mg/(L·h)	[12]
对羟基 苯乙烯	聚合物 合成	大肠杆菌 NST74	黏红酵母酪氨酸/苯丙氨酸解氨酶基因 <i>PAL</i> 和植物乳杆菌对香豆酸脱羧酶基因 <i>pdc</i>		葡萄糖	14L 罐 补料发酵	0.4g/L	0.007 g/(L·h)	[16]
		大肠杆菌	西班牙糖丝菌酪氨酸解氨酶基因 <i>tal</i> 和解淀粉芽孢杆菌酚酸脱羧酶基因 <i>pad</i>	转录调控蛋白 TyrR 基因置换成去反馈抑制分枝酸变位酶-磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因簇 ( <i>tyrA<sup>br</sup>-aroG<sup>br</sup></i> )	葡萄糖	摇床发酵	355mg/L	9.86 mg/(L·h)	[17]
		白斑链霉菌	斯氏链霉菌的酚酸脱羧酶基因 <i>pad</i>		葡萄糖	摇床发酵	273mg/L		[18]
		恶臭假单胞菌	黏红酵母酪氨酸/苯丙氨酸解氨酶基因 <i>PAL</i> 和植物乳杆菌对香豆酸脱羧酶基因 <i>pdc</i>	阿魏酸辅酶 A 合成酶基因 <i>fcs</i>	葡萄糖	3L 罐 补料发酵	17.6g/L	约 0.29 g/(L·h)	[20]
咖啡酸	抗氧化剂、 抗菌剂、抗 病毒剂、抗 肿瘤剂、抗 炎剂及药物	大肠杆菌 BW25113	荚膜红细菌酪氨酸解氨酶基因 <i>tal</i> 、大肠杆菌的 4-羟苯乙酸 3-羟化酶基因 <i>hpABC</i> 、天然去反馈抑制分枝酸变位酶-磷酸烯醇式丙酮酸合成酶-转酮酶-去反馈抑制磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因簇 ( <i>tyrA<sup>br</sup>-ppsA-iktA-aroG<sup>br</sup></i> )	转录调控蛋白 TyrR 基因	葡萄糖	摇床发酵	50.2mg/L	1.05 mg/(L·h)	[22]
		大肠杆菌 MG1655	黏红酵母酪氨酸解氨酶基因 <i>TAL</i> 、西班牙糖丝菌对香豆酸 3-羟化酶基因 <i>sam5</i> 、天然 RNA 聚合酶 alpha 亚基 <i>rpoA14</i> 突变体	分枝酸变位酶基因 <i>pheA</i> ； $\beta$ -半乳糖苷酶基因置换成去反馈抑制分枝酸变位酶-磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因簇；转录调控蛋白 TyrR 基因置换成去反馈抑制分枝酸变位酶-磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因簇 ( <i>tyrA<sup>br</sup>-aroG<sup>br</sup></i> )	葡萄糖	2 L 罐补 料发酵	106mg/L	1.10 mg/(L·h)	[23]

续表

产品	应用	宿主	表达基因	敲除/置换基因	基质	培养条件	产量	生产力	文献
		大肠杆菌 ATCC 31884	黏红酵母酪氨酸解氨酶基因 <i>TAL</i> 和 大肠杆菌 4-羟基苯乙酸 3-羟化酶基因 <i>hpaBC</i> , 去反馈抑制分枝酸变位酶-磷酸烯醇式丙酮酸合成酶-转酮酶-去反馈抑制磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因簇 ( <i>tyrA<sup>br</sup>-ppsA-ktA-aroG<sup>br</sup></i> )	分枝酸变位酶基因 <i>pheLA-tyrA</i>	葡萄糖	摇床发酵	766.68 mg/L	10.65 mg/(L·h)	[24]
		酿酒酵母	圆红冬孢酵母酪氨酸解氨酶基因 <i>TAL</i> , 铜绿假单胞菌 4-羟基苯乙酸 3-单加氧酶基因 <i>hpaB</i> , 肠道沙门菌 NADPH-黄素氧化酶基因 <i>hpaC</i>		葡萄糖	摇床发酵	289.4 mg/L	3.01 mg/(L·h)	[26]
绿原酸	抗氧化剂、 抗菌剂、 抗病毒剂、 抗肿瘤剂、 抗炎剂 及药物	大肠杆菌 BL21 (DE3)	烟草羟基肉桂酸辅酶 A 奎宁酸转移酶基因 <i>HQT</i> 、水稻对香豆酸辅酶 A 连接酶基因 <i>4CL</i> 和内源莽草酸/奎宁酸脱氢酶基因 <i>ydiB</i>	3-脱氢奎宁脱水酶基因 <i>aroD</i>	咖啡酸	摇床发酵	450mg/L	18.75 mg/(L·h)	[28]
		大肠杆菌- 大肠杆菌	咖啡酸产生菌: 西班牙糖丝菌酪氨酸解氨酶基因 <i>tal</i> , 天然磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>aroG</i> 和分枝酸变位酶基因 <i>tyrA</i> , 4-羟基苯乙酸 3-羟化酶基因 <i>hpaBC</i> 绿原酸产生菌: 烟草羟基肉桂酸辅酶 A 奎宁酸转移酶基因 <i>HQT</i> 、水稻对香豆酸辅酶 A 连接酶基因 <i>4CL</i> 和内源莽草酸/奎宁酸脱氢酶基因 <i>ydiB</i>	咖啡酸产生菌: 转录调控蛋白 TyrR 基因和分枝酸变位酶基因 <i>pheA</i>  绿原酸产生菌: 3-脱氢奎宁脱水酶基因 <i>aroD</i>	葡萄糖	摇床共 培养	78mg/L	1.44 mg/(L·h)	[29]
对香豆 酸-莽 草酸酯	抗氧化剂、 抗菌剂、 抗病毒剂、 抗肿瘤剂、 抗炎剂 及药物	大肠杆菌	西班牙糖丝菌酪氨酸解氨酶基因 <i>tal</i> , 天然磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>aroG</i> 和分枝酸变位酶基因 <i>tyrA</i> 、烟草羟基肉桂酸辅酶 A 奎宁酸转移酶基因 <i>HQT</i> 、水稻对香豆酸辅酶 A 连接酶基因 <i>4CL</i>	转录调控蛋白 TyrR 基因、分枝酸变位酶基因 <i>pheA</i> 和莽草酸激酶 II 基因 <i>aroL</i>	葡萄糖	摇床发酵	236mg/L	4.9 mg/(L·h)	[29]
3, 4-二 羟基苯 乙烯	聚合物合成	大肠杆菌	西班牙糖丝菌酪氨酸解氨酶基因 <i>tal</i> 和对香豆酸 3-羟化酶基因 <i>sam5</i> 、解淀粉芽孢杆菌酚酸脱羧酶基因 <i>pad</i>	转录调控蛋白 TyrR 基因置换成去反馈抑制分枝酸变位酶-磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因簇 ( <i>tyrA<sup>br</sup>-aroG<sup>br</sup></i> )	葡萄糖	摇床发酵	63mg/L	1.75 mg/(L·h)	[17]
阿魏酸	抗氧化剂、 抗菌剂、 抗病毒剂、 抗肿瘤剂、 抗血栓剂 和心血管 药物	大肠杆菌	西班牙糖丝菌酪氨酸解氨酶基因 <i>tal</i> 和对香豆酸 3-羟化酶基因 <i>sam5</i> 、拟南芥 <i>O</i> -甲基转移酶基因、天然去反馈抑制分枝酸变位酶-磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因簇 ( <i>tyrA<sup>br</sup>-aroG<sup>br</sup></i> )	转录调控蛋白 TyrR 基因	葡萄糖	摇床发酵	196mg/L	5.44 mg/(L·h)	[30]

续表

产品	应用	宿主	表达基因	敲除/置换基因	基质	培养条件	产量	生产力	文献
		大肠杆菌 XL1-Blue	筒青霉的香草醇氧化酶基因 <i>vaoA</i> 、假单胞菌松柏醇脱氢酶基因 <i>calA</i> 及松柏醛脱氢酶基因 <i>calB</i>		丁香酚	30 L 罐 补料发酵	14.7g/L	0.49 g/(L·h)	[32]
姜黄素	抗氧化剂、 抗菌剂、 抗病毒剂、 抗肿瘤剂、 抗炎剂,治 疗帕金森 病和阿尔 茨海默病	大肠杆菌	西班牙糖丝菌酪氨酸解氨酶基因 <i>tal</i> 、对香豆酸-3-羟化酶基因 <i>sam5</i> 、拟南芥 <i>O</i> -甲基转移酶基因 <i>com</i> 、由烟草对香豆酸辅酶 A 连接酶基因 <i>4CL</i> 、姜黄苯二肽 CoA 合成酶基因 <i>DCS</i> 和姜黄素合成酶基因 <i>CURS2</i>	转录调控蛋白 TyrR 基因 置换成去反馈抑制分枝酸变位酶-磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因簇 ( <i>tyrA<sup>br</sup>-aroG<sup>br</sup></i> )	葡萄糖	摇床发酵	3.8mg/L		[35]
左旋多巴	治疗帕 金森病	大肠杆菌 W3110	去反馈抑制磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>aroG<sup>br</sup></i> 、转酮酶 I 基因 <i>tktA</i> 、对羟基苯乙酸 3-羟化酶基因 <i>hpaBC</i> 、分枝酸变位酶结构域 <i>pheA<sub>CM</sub></i> 和运动发酵单胞菌的环己二烯基脱氢酶基因 <i>tyrC</i>	PTS 系统基因 <i>ptsIH</i> 、PTS 系统 EIIA 组分蛋白基因 <i>crr</i> 、乳糖抑制蛋白基因 <i>lacI</i> 和 $\beta$ -半乳糖苷酶基因; UDP-吡喃半乳糖变位酶基因 <i>galP</i> 的天然启动子置换成 <i>P<sub>trc</sub></i> 启动子	葡萄糖	摇床发酵	1.51g/L	0.03 g/(L·h)	[37]
		大肠杆菌 BW25113	去反馈抑制分枝酸变位酶基因 <i>tyrA<sup>br</sup></i> 、芳香氨基酸转氨酶基因 <i>tyrB</i> 和 4-羟基苯乙酸 3-羟化酶基因 <i>hpaBC</i>	转录调控蛋白 TyrR 基因、PTS 系统基因 <i>ptsIH</i> 、PTS 系统 EIIA 组分蛋白基因 <i>crr</i> 、6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因 <i>zwf</i> 和分枝酸变位酶基因 <i>pheLA</i> ; UDP-吡喃半乳糖变位酶基因 <i>galP</i> 和葡萄糖激酶基因 <i>glk</i> 启动子置换成 P37 启动子; 去反馈抑制磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>aroG<sup>br</sup></i> 置换天然基因	葡萄糖	5 L 罐 补料发酵	8.67g/L	0.14 g/(L·h)	[38]
		大肠杆菌 W3110	4-羟基苯乙酸 3-羟化酶基因 <i>hpaBC</i> 、芳香氨基酸转氨酶基因 <i>tyrB</i> 、分枝酸变位酶基因 <i>tyrA</i> 、分枝酸合成酶基因 <i>aroC</i> 、3-磷酸莽草酸 1-羧酸乙烯基转移酶基因 <i>aroA</i> 和莽草酸激酶 II 基因 <i>aroL</i>	转录调控蛋白 TyrR 基因、丙酮酸激酶 I 基因 <i>pykF</i> 、3-磷酸甘油酸脱氢酶基因 <i>serA</i> ; 去反馈抑制去磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>aroG<sup>br</sup></i> 置换天然基因	葡萄糖	5 L 罐 补料发酵	12.5g/L		[39]
		大肠杆菌 BL21 (DE3)	4-羟基苯乙酸 3-单加氧酶突变体基因 <i>hpaB<sup>G295R</sup></i> 、NADPH-黄素氧化酶基因 <i>hpaC</i> 、UDP-吡喃半乳糖变位酶基因 <i>galP</i> 、葡萄糖激酶基因、磷酸烯醇式丙酮酸合酶基因 <i>ppsA</i> 、转酮酶 I 基因 <i>tktA</i> 、去反馈抑制去磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>aroG<sup>br</sup></i> 和去反馈抑制分枝酸变位酶 <i>tyrA<sup>br</sup></i>	转录调控蛋白 TyrR 基因、PTS 系统基因 <i>ptsG</i> 、PTS 系统 EIIA 组分蛋白基因 <i>crr</i> 、分枝酸变位酶基因 <i>pheA</i> 和丙酮酸激酶 I 基因 <i>pykF</i>	葡萄糖	5 L 罐 补料发酵	25.53g/L	0.53 g/(L·h)	[40]

续表

产品	应用	宿主	表达基因	敲除/置换基因	基质	培养条件	产量	生产力	文献
<b>苯乳酸类化合物</b>									
L-苯 乳酸	antioxidant, antifungal compound, synthesizing polymer	大肠杆菌	植物乳杆菌乳酸脱氢酶基 因 <i>L-ldh</i> 、巨大芽孢杆菌葡萄 糖脱氢酶基因 <i>gdh</i>		苯丙酮 酸(葡萄 糖供 NADPH 再生 之用)	补料全细胞 生物催化	103.8 mmol/L (17.25g/L)	17.25 g/(L·h)	[41]
			植物乳杆菌乳酸脱氢酶基 因 <i>L-ldh</i> 、奇异变形杆菌 L-氨 基酸解氨酶基因 <i>L-aad</i> 和博 伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶基 因 <i>FDH</i>		苯丙氨 酸(葡萄 糖供辅 因子再 生用)	摇床全细胞 生物催化	54.0g/L		[43]
		大肠杆菌 NST37	乳酸片球菌乳酸脱氢酶基 因 <i>L-ldhA</i> 、天然去反馈抑制 分枝酸变位酶基因 <i>pheA<sup>br</sup></i> 和 去反馈抑制磷酸-2-脱氢-3- 脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>aroG<sup>br</sup></i>		葡萄糖	摇床发酵	1.9g/L	0.08 g/(L·h)	[45]
D-苯 乳酸		大肠杆菌 NST37	荧光威克汉酵母苯丙酮酸 还原酶基因 <i>pprA</i> 、天然去反馈 抑制分枝酸变位酶基因 <i>pheA<sup>br</sup></i> 和去反馈抑制磷酸-2-脱氢-3- 脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>aroG<sup>br</sup></i>		葡萄糖	0.4 L 罐 补料发酵	29.2g/L	0.20 g/(L·h)	[45]
4-羟基 苯乳酸	抗氧化剂、 抗菌剂和 聚合物合成	大肠杆菌 BW25113 (DE3)		转录调控蛋白 TyrR 基因 置换成去反馈抑制磷酸-2- 脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶和 分枝酸变位酶基因簇 ( <i>aroF<sup>br</sup>-tyrA<sup>br</sup></i> )；乙酰辅酶 A 合成酶基因置换成钩虫贪铜 菌乳酸脱氢酶基因 <i>ldhA</i>	葡萄糖	摇床发酵	8.1 mmol/L		[44]
丹参素	抗氧化剂、 抗肿瘤剂、 抗炎剂及 其他药物	大肠杆菌 BW25113	大肠杆菌 4-羟基苯乙酸 3- 羟化酶基因 <i>hpaBC</i> 、戊糖乳杆 菌 D-乳酸脱氢酶突变基因 <i>d-ldh<sup>Y524</sup></i> 、天然去反馈抑制磷 酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶 基因 <i>aroG<sup>br</sup></i> 、分枝酸变位酶基 因 <i>tyrA<sup>br</sup></i> 、莽草酸脱氢酶基因 <i>aroE</i> 、磷酸烯醇式丙酮酸合酶 基因 <i>ppsA</i> 、转酮酶 I 基因 <i>tktA</i> 和葡萄糖激酶基因 <i>glk</i>	PTS 系统基因 <i>ptsG</i> 、转录 调控蛋白 TyrR 基因、丙酮酸 激酶基因 <i>pykFA</i> 和分枝酸变 位酶基因 <i>pheA</i>	葡萄糖	摇床补 料发酵	7.10g/L	0.10 g/(L·h)	[46]
			大肠杆菌 4-羟基苯乙酸 3- 羟化酶基因 <i>hpaBC</i> 、戊糖乳杆 菌 D-乳酸脱氢酶突变基因 <i>d- ldh<sup>Y524</sup></i> 、天然去反馈抑制磷酸- 2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基 因 <i>aroG<sup>br</sup></i> 、分枝酸变位酶基因 <i>tyrA<sup>br</sup></i> 、莽草酸脱氢酶基因 <i>aroE</i> 、磷酸烯醇式丙酮酸合酶 基因 <i>ppsA</i> 、转酮酶 I 基因 <i>tktA</i> 和葡萄糖激酶基因 <i>glk</i>	PTS 系统基因 <i>ptsG</i> 、转录 调控蛋白 TyrR 基因、丙酮酸 激酶基因 <i>pykFA</i> 和分枝酸变 位酶基因 <i>pheA</i>	葡萄糖	摇床补 料发酵	5.6g/L	0.09 g/(L·h)	[47]

续表

产品	应用	宿主	表达基因	敲除/置换基因	基质	培养条件	产量	生产力	文献
迷迭香酸	抗氧化剂、抗菌剂、抗肿瘤剂、抗炎剂和免疫调节剂	大肠杆菌-大肠杆菌-大肠杆菌	咖啡酸产生菌:黏红酵母酪氨酸解氨酶基因 <i>tal</i> 、4-羟基苯乙酸3-羟化酶基因 <i>hpaBC</i> 、莽草酸脱氢酶基因 <i>aroE</i> 、RNA聚合酶 $\alpha$ 亚基突变体基因 <i>rpoA<sup>mut</sup></i> 丹参素产生菌:莽草酸脱氢酶基因 <i>aroE</i> 、莽草酸激酶II基因 <i>aroL</i> 、3-磷酸莽草酸1-羧乙烯基转移酶基因 <i>aroA</i> 、分支酸合成酶基因 <i>aroC</i> 、去反馈抑制变位酶基因 <i>tyrA<sup>br</sup></i> 和去反馈抑制磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因 <i>aroG<sup>br</sup></i> 、大肠杆菌4-羟基苯乙酸3-羟化酶基因 <i>hpaBC</i> 和戊糖乳杆菌D-乳酸脱氢酶突变基因 <i>d-ldh<sup>Y52A</sup></i> 迷迭香酸产生菌:薯蓣对香豆酸辅酶A连接酶基因 <i>4CL</i> 和香蜂草迷迭香酸合成酶基因 <i>RAS</i>	咖啡酸产生菌:分枝酸变位酶基因 <i>pheA</i> 、转录调控蛋白 TyrR 基因、PTS 系统基因 <i>ptsIH</i> 、PTS 系统 EIIA 组分蛋白基因 <i>crr</i> 、莽草酸脱氢酶基因 <i>aroE</i> 和莽草酸/奎宁酸脱氢酶基因 <i>ydiB</i> ; $\beta$ -半乳糖苷酶基因和转录调控蛋白 TyrR 基因同时置换成去反馈抑制分枝酸变位酶-磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因簇( <i>tyrA<sup>br</sup>-aroG<sup>br</sup></i> ) 丹参素产生菌:木糖异构酶基因 <i>xylA</i> 迷迭香酸产生菌:分枝酸变位酶基因 <i>pheA</i> 、转录调控蛋白 TyrR 基因、PTS 系统基因 <i>ptsIH</i> 、PTS 系统 EIIA 组分蛋白基因 <i>crr</i> 、莽草酸脱氢酶基因 <i>aroE</i> 和莽草酸/奎宁酸脱氢酶基因 <i>ydiB</i> ; $\beta$ -半乳糖苷酶基因和转录调控蛋白 TyrR 基因同时置换成去反馈抑制分枝酸变位酶-磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶基因簇( <i>tyrA<sup>br</sup>-aroG<sup>br</sup></i> )	葡萄糖和木糖 (3:2)	摇床共培养	172mg/L		[51]
		大肠杆菌	苜蓿中华根瘤菌聚磷酸激酶基因、约翰逊不动杆菌聚磷酸激酶基因、拟南芥对香豆酸辅酶A连接酶基因 <i>4CL</i> 和彩叶草迷迭香酸合酶基因		咖啡酸	无细胞生物催化	320mg/L	320.04 mg/(L·h)	[52]

基于传统代谢工程的基因敲除和过表达的静态调控往往会导致代谢通量在各个途径分配的不平衡、有毒中间代谢产物的积累,影响细胞生长,抑制产物的合成。而动态调控能根据胞内外环境的变化自动调控基因表达,协调各个途径的代谢通量分布,优化细胞生长,促进产物的合成。为了避免竞争途径敲除对细胞生长的影响,日本九州大学 Hanai 团队<sup>[55]</sup>研发一种代谢拨动开关(metabolic toggle switch)以调控 TCA 循环与产物的合成。利用这种代谢波动开关对进入 TCA 循环的柠檬酸合成酶基因 *gltA* 与外源合成途径进行了动态调控。在未添加 IPTG 时,表达 *gltA* 而关闭异丙醇合成途径的表达,驱使碳代谢流进入 TCA 循环供细胞生长;而添加 IPTG 诱导后,关闭 *gltA* 的表达而开始表达异丙醇合成途径,驱使碳代谢流进

入异丙醇合成途径。采用这种代谢波动开关使大肠杆菌合成异丙醇的产量和产率,与静态调控相比分别提高了 3.7 倍和 3.1 倍。TCA 循环同样是苯丙酸类及其衍生物合成的竞争途径和细胞生长的必需途径。利用这种代谢波动开关动态调控 TCA 循环的策略同样适合于苯丙酸类及其衍生物的合成。山东大学梁泉峰团队<sup>[56]</sup>采用相同的策略构建了一个代谢波动开关调控莽草酸的降解途径,以促进大肠杆菌莽草酸的合成。要积累莽草酸就必须阻断莽草酸代谢,即敲除莽草酸激酶编码基因,但这样又会导致宿主菌变成营养缺陷菌从而影响细胞生长。为此,他们构建了一个阿拉伯糖诱导的代谢波动开关来动态调控莽草酸激酶编码基因 *aroK* 的表达。在没有添加阿拉伯糖时调控装置上的 *aroK* 基因得以表达,合成芳香族氨基酸供细胞

生长之用；生长到一定时候，添加阿拉伯糖诱导调控装置上的 *tetR*，阻断 *aroK* 基因的表达，积累莽草酸。由于苯丙酸类及其衍生物的合成往往采用芳香族氨基酸的营养缺陷株作为宿主菌，因此，这种代谢波动开关策略同样可以用于合成苯丙酸类及其衍生物的人工微生物的创建。但是上述代谢波动开关需要添加诱导剂，对扩大生产不利。群体感应是一种天然的细胞与细胞间通信形式，可根据细胞密度而自动调控下游基因的表达。本课题组<sup>[57]</sup>研发出了一种同时具有激活和抑制作用的 *Esa* 群体感应系统，应用该系统对对羟基苯乙酸合成途径进行了动态调控，使大肠杆菌合成对羟基苯乙酸的产量，与静态调控途径相比提高了46%。美国 MIT 的 Dinh 和 Prather<sup>[58]</sup> 构建一个含 *lux* 和 *esa* 双组分的分层群体感应系统，对合成途径和竞争性途径同时进行依赖群体感应的自动上调和下调控制，大幅度提高了大肠杆菌合成柚皮苷和水杨酸的产量。

体内生物传感器能灵敏地识别和实时检测胞内或环境中目标小分子代谢物。体内生物传感器由响应和报告两个系统组成。目前学者报道了许多体内生物传感器，Shi 等<sup>[59]</sup> 对体内生物传感器的进展和应用进行了很好的综述。生物传感器在人工微生物创建领域主要用于：①选育高产突变株；②动态调控途径；③选育突变酶；④体内检测。目前报道的芳香化合物生物传感器主要有基于 *TyrR*、*OR5P3*、*TnaC*、*DmpR*、*PcaU*、*TtgR*、*HucR*、*ShiR*、*NahR*、*XylS*、*HbpR*、*QsuR* 和 *MarR* 等转录因子传感器、核糖开关传感器和启动子传感器<sup>[59-60]</sup>。中国科学院微生物研究所唐双焱团队对 *HucR* 进行饱和突变构建了莽草酸<sup>[61]</sup>、白藜芦醇<sup>[62]</sup>、阿魏酸和香兰素<sup>[63]</sup> 传感器。最近，该团队<sup>[63]</sup> 通过 *HucR* 的饱和突变，构建了一个能同时响应阿魏酸和香兰素、但对后者活性更强的传感器。应用该双功能传感器对由阿魏酸到香兰素的合成途径进行顺序串级动态调控，使大肠杆菌合成香兰素的产量远高于群体感应和静态调控的合成途径。在此顺序串级动态调控系统中，生长初期合成途径在高浓度基质阿魏酸的诱导下开始低水平地表达、合成香兰素；随着香兰素的合成，合成途径的表达受香兰素的高活性反馈诱导而逐

渐加强。本课题组何馨<sup>[64]</sup> 应用基于 *HucR* 的莽草酸传感器依次从 ARTP 诱变库和基因组改组 (*genome shuffling*) 库中选育出一株改组菌，莽草酸产量提高了91%、生物量提高了36%。Siedler 等<sup>[65]</sup> 报道了一个基于枯草芽孢杆菌 *PadR* 的对香豆酸传感器，该传感器能灵敏地响应对香豆酸，但对肉桂酸和咖啡酸活性低，而且可应用于大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌。

启动子是合成生物学最基本的元件。Mahr 等<sup>[66]</sup> 从含2000个大肠杆菌启动子的 Alon 文库中筛选得到 *mtr* 启动子，能响应苯丙氨酸；并应用基于  $P_{mtr}$  的传感器从 MNNG 诱变的大肠杆菌文库中选育出一株高产苯丙氨酸的突变菌株。中国科学院天津工业生物技术研究所张大伟团队<sup>[67]</sup> 依据酪氨酸运输蛋白基因 *tyrP* 的启动子序列设计构建了12个具有不同强度的苯丙氨酸启动子，并利用其中的 P8 启动子置换产苯丙氨酸大肠杆菌的 *aroK* 天然启动子，对 *aroK* 进行动态调控，使大肠杆菌合成苯丙氨酸的产量和产率分别提高了36%和22%。

近年来，学者发展了多种反式作用基因表达敲低工具，如合成小分子调控 RNA (sRNA) 和 CRISPR 干扰 (CRISPRi)，以便从全基因组快速筛选出需修饰的靶基因。韩国先进科技学院 Lee 团队发展了一种称为合成 sRNA 的技术。该团队<sup>[68]</sup> 合成并分析了抑制88个基因的 sRNA 对大肠杆菌合成酪氨酸的影响，发现联合对 *tyrR* 和 *csrA* 进行 sRNA 调低能大幅度提高酪氨酸产量。随后该团队<sup>[69]</sup> 又应用该技术结合丙酰辅酶 A 传感器，从大肠杆菌1858个基因的合成 sRNA 库中筛选得到对14个能促进丙酰辅酶 A 合成的 sRNA，其中对 *pabA* 进行 sRNA 调控使大肠杆菌合成白藜芦醇的产量提高4.2倍。江南大学周景文团队<sup>[70]</sup> 对产柚皮素大肠杆菌的30个竞争途径基因进行了 CRISPRi 干扰，发现同时对 *fabF*、*fumC*、*fabB*、*sucC* 和 *adhE* 进行 CRISPRi 干扰可使柚皮素产量提高7.4倍。本课题组沈玉平<sup>[71]</sup> 利用 CRISPRi 技术对产对羟基苯乙酸大肠杆菌内源的所有76个与 NADPH 消耗有关基因进行了 CRISPRi 干扰，发现对 *yahk* 和 *yqjH* 的抑制增加了 NADPH 的供给，使对羟基苯乙酸的产量分别提高了67.1%和45.6%。

## 4 展 望

随着代谢工程与合成生物学的发展, 虽然已成功构建了一些合成苯丙酸类化合物的工程微生物, 并取得了很大进展, 但其生产水平与产业化还有很大差距, 仍有许多工作需要进行。为了实现苯丙酸类化合物生物制造的工业化生产, 除了采用前述用于其他芳香化合物人工微生物创建的合成生物学策略之外, 还可从以下几个方面进一步提高人工微生物的生产效率。

(1) 提高宿主菌对苯丙酸类化合物的耐受性。大多数苯丙酸类化合物都具有抗菌活性, 对宿主细胞具有很强的生长毒性, 从而限制了目标产物的合成。实验室适应性进化是提高细胞耐受性最常用的策略。但耐受性提高并不能保证目标产物产量的提高, 为此我们提出了一种生物传感器介导的实验室适应性进化技术。利用可以检测目标化合物的生物传感器在经适应性进化获得的耐受菌的突变库中, 高通量地选育出耐受性和产量都得到提高的进化菌。本课题组<sup>[72]</sup>采用这种策略选育出了一株耐2.0% 蒎烯、蒎烯产量也提高了77%的大肠杆菌。除此之外, 也可过表达全局调控因子或外排泵等运输蛋白<sup>[73]</sup>。尤其采用全局调控机制工程(gTME)技术, 对全局调控因子, 如 $\delta$ 因子、cAMP受体蛋白、调控基因*irrE*和*bssS*等, 进行定向进化以提高宿主菌的鲁棒性。

(2) 氧化应激工程可能是苯丙酸类化合物代谢工程的一种新策略。氧化应激是指体内活性氧自由基(ROS)产生与抗氧化间的不平衡, 将导致细胞损伤。宿主细胞为了避免受到氧化应激引起的细胞损伤, 将诱导包括抗氧化酶在内的氧化应激蛋白的表达, 以清除ROS。若人为地对宿主细胞中有关氧化应激蛋白进行抑制, 宿主为了避免受到损伤, 必然要诱导合成更多的抗氧化剂来清除ROS。本课题组<sup>[74]</sup>采用这种氧化应激工程策略使大肠杆菌合成虾青素的产量提高了78%。大部分苯丙酸类化合物都具有抗氧化活性, 采用这种氧化应激工程的策略可望进一步促进苯丙酸类化合物的合成。

(3) 模块共培养工程是代谢工程的一种新策略。该策略将复杂的生物合成途径理性地分隔

成多个途径, 将其置于各自合适的宿主细胞中高效表达, 然后将不同模块菌进行共培养以实现目标产物的合成。模块共培养工程策略已成功用于一些芳香化合物的合成生物学制造, 如红景天苷<sup>[75]</sup>和白藜芦醇<sup>[76]</sup>。我们同样成功将模块共培养工程策略用于人工合成大肠杆菌的蒎烯生物制造中。采用模块共培养大肠杆菌合成蒎烯的产量是单菌培养的2.9倍<sup>[72]</sup>。

(4) 系统代谢工程能从系统水平上对细胞进行全局调控, 进一步促进目标产物的合成。本课题组<sup>[77]</sup>前期研究证实了比较组学分析与CRSIPRa/CRISPRi相结合技术能快速地找到目标产物合成的瓶颈, 从而进行反向代谢工程, 是一种快速发现代谢工程新靶点的高效技术手段。通过对具有不同苯丙酸类化合物合成能力的工程微生物的比较组学分析, 挖掘具有显著差异的基因和蛋白, 然后采用CRSIPRa/CRISPRi技术确认差异基因/蛋白与表型之间的关系, 找到工程微生物合成苯丙酸类化合物的瓶颈, 进行反向代谢工程进一步提高人工微生物合成苯丙酸类化合物的产量。本课题组<sup>[78-79]</sup>采用以组学为核心的系统代谢工程策略对多个人工微生物细胞工程进行了全局调控, 大幅度促进了目标产物的合成。

## 参 考 文 献

- [1] BANG Hyun Bae, LEE Kyungsoo, LEE Yong Jae, et al. High-level production of trans-cinnamic acid by fed-batch cultivation of *Escherichia coli* [J]. *Process Biochemistry*, 2018, 68: 30-36.
- [2] GOTTARDI M, GRUEN P, BODE H B, et al. Optimisation of trans-cinnamic acid and hydrocinnamyl alcohol production with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* and identification of cinnamyl methyl ketone as a by-product [J]. *FEMS Yeast Research*, 2017, 17: 8.
- [3] MCKENNA R, NIELSEN D R. Styrene biosynthesis from glucose by engineered *E. coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13 (5): 544-554.
- [4] MCKENNA R, MOYA L, MCDANIEL M, et al. Comparing in situ removal strategies for improving styrene bioproduction [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(1): 165-174.
- [5] LIU Changqing, MEN Xiao, CHEN Hailin, et al. A systematic optimization of styrene biosynthesis in *Escherichia coli* BL21

- (DE3) [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 14.
- [6] LEE Kyungsoo, BANG Hyun Bae, LEE Yoon Hyeok, et al. Enhanced production of styrene by engineered *Escherichia coli* and in situ product recovery (ISPR) with an organic solvent [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18: 79.
- [7] LIANG Liya, LIU Rongming, FOSTER K E O, et al. Genome engineering of *E. coli* for improved styrene production [J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 57: 74-84.
- [8] MCKENNA R, THOMPSON B, PUGH S, et al. Rational and combinatorial approaches to engineering styrene production by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 123.
- [9] FUJIWARA R, NODA S, TANAKA T, et al. Styrene production from a biomass-derived carbon source using a coculture system of phenylalanine ammonia lyase and phenylacrylic acid decarboxylase-expressing *Streptomyces lividans* transformants [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 122(6): 730-735.
- [10] RODRIGUEZ A, KILDEGAARD K R, LI Mingji, et al. Establishment of a yeast platform strain for production of *p*-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis [J]. *Metabolic engineering*, 2015, 31: 181-188.
- [11] RODRIGUEZ A, CHEN Yun, KHOOMRUNG S, et al. Comparison of the metabolic response to over-production of *p*-coumaric acid in two yeast strains [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 44: 265-272.
- [12] LIU Quanli, YU Tao, LI Xiaowei, et al. Rewiring carbon metabolism in yeast for high level production of aromatic chemicals [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4976.
- [13] RODRIGUES J L, ARAUJO R G, PRATHER K L J, et al. Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 71: 36-44.
- [14] XUE Yong, ZHANG Yan, CHENG Dan, et al. Genetically engineering *Synechocystis* sp. Pasteur Culture Collection 6803 for the sustainable production of the plant secondary metabolite *p*-coumaric acid [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(26): 9449-9454.
- [15] CALERO P, JENSEN S I, NIELSEN A T. Broad-host-range ProUSER vectors enable fast characterization of inducible promoters and optimization of *p*-coumaric acid production in *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(7): 741-753.
- [16] QI Weiwei, VANNELLI T, BREINIG S, et al. Functional expression of prokaryotic and eukaryotic genes in *Escherichia coli* for conversion of glucose to *p*-hydroxystyrene [J]. *Metabolic Engineering*, 2007, 9(3): 268-276.
- [17] KANG Sun-Young, CHOI Oksik, LEE Jae Kyoung, et al. Artificial *de novo* biosynthesis of hydroxystyrene derivatives in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain [J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 78.
- [18] NODA S, KAWAI Y, TANAKA T, et al. 4-Vinylphenol biosynthesis from cellulose as the sole carbon source using phenolic acid decarboxylase- and tyrosine ammonia lyase-expressing *Streptomyces lividans* [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 180: 59-65.
- [19] FUJIWARA R, NODA S, KAWAI Y, et al. 4-Vinylphenol production from glucose using recombinant *Streptomyces mobaraense* expressing a tyrosine ammonia lyase from *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(9): 1543-1549.
- [20] VERHOEF S, WIERCKX N, WESTERHOF R G M, et al. Bio-production of *p*-hydroxystyrene from glucose by the solvent-tolerant bacterium *Pseudomonas putida* S12 in a two-phase water-decanol fermentation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(4): 931-936.
- [21] HERNANDEZ-CHAVEZ G, MARTINEZ A, GOSSET G. Metabolic engineering strategies for caffeic acid production in *Escherichia coli* [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2019, 38(1): 19-26.
- [22] LIN Yuheng, YAN Yajun. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex [J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 42.
- [23] ZHANG Haoran, STEPHANOPOULOS G. Engineering *E. coli* for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(8): 3333-3341.
- [24] HUANG Qin, LIN Yuheng, YAN Yajun. Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing *Escherichia coli* strain [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(12): 3188-3196.
- [25] KAWAGUCHI H, KATSUYAMA Y, DU Danyao, et al. Caffeic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of kraft pulp using recombinant *Escherichia coli* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(13): 5279-5290.
- [26] LIU Lanqing, LIU Hong, ZHANG Wei, et al. Engineering the biosynthesis of caffeic acid in *Saccharomyces cerevisiae* with heterologous enzyme combinations [J]. *Engineering*, 2019, 5(2): 287-295.
- [27] FURUYA T, KINO K. Catalytic activity of the two-component flavin-dependent monooxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* toward cinnamic acid derivatives [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(3): 1145-1154.
- [28] KIM Bong-Gyu, JUNG Woo Dam, MOK Hyejung, et al. Pro-

- duction of hydroxycinnamoyl-shikimates and chlorogenic acid in *Escherichia coli*: production of hydroxycinnamic acid conjugates [J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 15.
- [29] CHA Mi Na, KIM Hyeon Jeong, KIM Bong-Gyu, et al. Synthesis of chlorogenic acid and *p*-coumaroyl shikimates from glucose using engineered *Escherichia coli* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 24(8): 1109-1117.
- [30] KANG Sun-Young, CHOI Oksik, LEE Jae Kyoung, et al. Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain [J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 53.
- [31] OVERHAGE J, STEINBUCHER A, PRIEFERT H. Biotransformation of eugenol to ferulic acid by a recombinant strain of *Ralstonia eutropha* H16 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4315-4321.
- [32] OVERHAGE J, STEINBUCHER A, PRIEFERT H. Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6569-6576.
- [33] RODRIGUES J L, ARAÚJO R G, PRATHER K L J, et al. Production of curcuminoids from tyrosine by a metabolically engineered *Escherichia coli* using caffeic acid as an intermediate [J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(4): 599-609.
- [34] COUTO M R, RODRIGUES J L, RODRIGUES L R. Optimization of fermentation conditions for the production of curcumin by engineered *Escherichia coli* [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2017, 14(133): 20170470.
- [35] KANG Sun Young, HEO Kyung Taek, HONG Young-Soo. Optimization of artificial curcumin biosynthesis in *E. coli* by randomized 5'-UTR sequences to control the multienzyme pathway [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(9): 2054-2062.
- [36] MIN Kyoungseon, PARK Kyungmoon, PARK Don-Hee, et al. Overview on the biotechnological production of L-DOPA [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 575-584.
- [37] MUNOZ A J, HERNANDEZ-CHAVEZ G, DE ANDA R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) synthesis from glucose [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(11): 1845-1852.
- [38] WEI Tao, CHENG Biyan, LIU Jianzhong. Genome engineering *Escherichia coli* for L-DOPA overproduction from glucose [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30080.
- [39] DAS A, TYAGI N, VERMA A, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 strain by incorporating genome-level modifications and synthetic plasmid modules to enhance L-DOPA production from glycerol [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2018, 48(8): 671-682.
- [40] FORDJOUR E, ADIPAH F K, ZHOU S H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* BL21 (DE3) for *de novo* production of L-DOPA from D-glucose [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18: 74.
- [41] ZHU Yibo, WANG Ying, XU Jiayuzi, et al. Enantioselective biosynthesis of L-phenyllactic acid by whole cells of recombinant *Escherichia coli* [J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1966.
- [42] ZHANG Jianzhi, LI Xi. Novel strategy for phenyllactic acid biosynthesis from phenylalanine by whole cell recombinant *Escherichia coli* coexpressing L-phenylalanine oxidase and L-lactate dehydrogenase [J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(1): 165-171.
- [43] HOU Ying, GAO Bo, CUI Jiandong, et al. Combination of multi-enzyme expression fine-tuning and co-substrates addition improves phenyllactic acid production with an *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 287: 121423.
- [44] KOMA D, YAMANAKA H, MORIYOSHI K, et al. Production of aromatic compounds by metabolically engineered *Escherichia coli* with an expanded shikimate pathway [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(17): 6203-6216.
- [45] FUJITA T, NGUYEN H D, ITO T, et al. Microbial monomers custom-synthesized to build true bio-derived aromatic polymers [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(20): 8887-8894.
- [46] YAO Yuanfeng, WANG Changsong, QIAO Jianjun, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvianic acid A via an artificial biosynthetic pathway [J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 79-87.
- [47] ZHOU Liang, DING Qi, JIANG Guozhen, et al. Chromosome engineering of *Escherichia coli* for constitutive production of salvianic acid A [J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16: 84.
- [48] LI Chao, ZHANG Chao, WANG Jian. A thermophilic biofunctional multienzyme cascade reaction for cell-free synthesis of salvianic acid a and 3,4-dihydroxymandelic acid [J]. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2019, 7: 18247-18253.
- [49] BLOCH S E, SCHMIDT-DANNERT C. Construction of a chimeric biosynthetic pathway for the *de novo* biosynthesis of rosmarinic acid in *Escherichia coli* [J]. *Chembiochem*, 2014, 15(16): 2393-2401.
- [50] JIANG Jingjie, BI Huiping, ZHUANG Yibin, et al. Engineered synthesis of rosmarinic acid in *Escherichia coli* resulting production of a new intermediate, caffeoyl-phenyllactate [J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(1): 81-88.
- [51] LI Zhenghong, WANG Xiaonan, ZHANG Haoran. Balancing

- the non-linear rosmarinic acid biosynthetic pathway by modular co-culture engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 1-11.
- [52] YAN Yi, JIA Pu, BAI Yajun, et al. Production of rosmarinic acid with ATP and CoA double regenerating system [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 131: 109392.
- [53] LIU Yongfei, XU Yiran, DING Dongqin, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production [J]. *BMC Biotechnology*, 2018, 18: 5.
- [54] KIM BYOUNGJIN, BINKLEY R, KIM Hyun Uk, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the enhanced production of L-tyrosine [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(10): 2554-2564.
- [55] SOMA Y, TSURUNO K, WADA M, et al. Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 23: 175-184.
- [56] GU Pengfei, SU Tianyuan, WANG Qian, et al. Tunable switch mediated shikimate biosynthesis in an engineered non-auxotrophic *Escherichia coli* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29745.
- [57] SHEN Yuping, FONG Lai San, YAN Zhibo, et al. Combining directed evolution of pathway enzymes and dynamic pathway regulation using a quorum-sensing circuit to improve the production of 4-hydroxyphenylacetic acid in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 94.
- [58] DINH C V, PRATHER K L J. Development of an autonomous and bifunctional quorum-sensing circuit for metabolic flux control in engineered *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(51): 25562-25568.
- [59] SHI Shuobo, ANG Ee Lui, ZHAO Huimin. *In vivo* biosensors: mechanisms, development, and applications [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(7): 491-516.
- [60] XUE Haoran, SHI Hailing, YU Zhou, et al. Design, construction, and characterization of a set of biosensors for aromatic compounds [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(12): 1011-1014.
- [61] LI Heng, LIANG Chaoning, CHEN Wei, et al. Monitoring in vivo metabolic flux with a designed whole-cell metabolite biosensor of shikimic acid [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 98: 457-465.
- [62] XIONG Dandan, LU Shikun, WU Jieyuan, et al. Improving key enzyme activity in phenylpropanoid pathway with a designed biosensor [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 115-123.
- [63] LIANG Chaoning, ZHANG Xuanxuan, WU Jieyuan, et al. Dynamic control of toxic natural product biosynthesis by an artificial regulatory circuit [J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 57: 239-246.
- [64] 何馨. 运用 ARTP 诱变育种技术和 CRISPRi 提高工程大肠杆菌的莽草酸产量[D]. 广州: 中山大学, 2019.
- HE Xin. Improving the production of shikimic acid of engineered *E. coli* via ARTP and CRISPRi [D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2019.
- [65] SIEDLER S, KHATRI N K, ZSOHAR A, et al. Development of a bacterial biosensor for rapid screening of yeast *p*-coumaric acid production [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(10): 1860-1869.
- [66] MAHR R, VON BOESELAGER R F, WIECHERT J, et al. Screening of an *Escherichia coli* promoter library for a phenylalanine biosensor [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(15): 6739-6753.
- [67] WU Jie, LIU Yongfei, ZHAO Sheng, et al. Application of dynamic regulation to increase L-phenylalanine production in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(6): 923-932.
- [68] NA Dokyun, YOO Seung Min, CHUNG Hannah, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(2): 170-174.
- [69] YAN Dongsoo, KIM Won Jun, YOO Seung Min, et al. Repurposing type III polyketide synthase as a malonyl-CoA biosensor for metabolic engineering in bacteria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(40): 9835-9844.
- [70] WU Junjun, DU Guocheng, CHEN Jian, et al. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13477.
- [71] 沈玉平. 代谢工程大肠杆菌生产对羟基苯乙酸[D]. 广州: 中山大学, 2019.
- SHEN Y P. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 4-hydroxyphenylacetic acid production [D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2019.
- [72] NIU Fuxing, HE Xin, WU Yaqin, et al. Enhancing production of pinene in *Escherichia coli* by using a combination of tolerance, evolution, and modular co-culture engineering [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1623.
- [73] GONG Zhiwei, NIELSEN J, ZHOU Yongjin J. Engineering robustness of microbial cell factories [J]. *Biotechnology Journal*, 2017, 12(10): 1700014.
- [74] LU Qian, LIU Jianzhong. Enhanced astaxanthin production in *Escherichia coli* via morphology and oxidative stress engineering [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(42): 11703-11709.
- [75] LIU Xue, LI Xiaobo, JIANG Jianlan, et al. Convergent engineering of syntrophic *Escherichia coli* coculture for efficient production of glycosides [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47:

243-253.

- [76] CAMACHO-ZARAGOZA J M, HERNANDEZ-CHAVEZ G, MORENO-AVITIA F, et al. Engineering of a microbial coculture of *Escherichia coli* strains for the biosynthesis of resveratrol [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 163.
- [77] NIU Fuxing, HUANG Yuanbin, JI Liangnian, et al. Genomic and transcriptional changes in response to pinene tolerance and overproduction in evolved *Escherichia coli* [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2019, 4(3): 113-119.
- [78] LI Zhen, LIU Jianzhong. Transcriptomic Changes in response to putrescine production in metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1987.
- [79] SHEN Hongjie, CHENG Biyan, ZHANG Yanmei, et al. Dynamic control of the mevalonate pathway expression for improved zeaxanthin production in *Escherichia coli* and comparative proteome analysis [J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 180-190.



**通讯作者:** 刘建忠(1966—),男,博士,教授。研究方向为微生物代谢工程与合成生物学。  
E-mail: lssljz@mail.sysu.edu.cn



**第一作者:** 牛福星(1988—),男,博士,博士后。研究方向为微生物代谢工程与合成生物学。  
E-mail: niufx3@mail.sysu.edu.cn