

# 化合物代谢新途径构建及微生物糖代谢网络改造的研究进展

程瑶 赵千婧 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:** 随着环境的恶化和化石能源的萎缩,以石油为原料通过化学方法合成化合物的生产受到了极大的抑制,代谢工程的出现为这些石油衍生物的生产提供了一种极具前景的选择。现阶段代谢工程主要通过代谢工程及合成生物学方法对工业微生物的天然代谢途径进行理性改造,然而在利用代谢工程生产这些化合物时仍然普遍存在一些问题,一些天然或非天然的化合物的生产受到限制。本文主要介绍本课题组针对目前微生物代谢工程生产中普遍存在的问题所采取的解决方案,以及关于生物合成芳香族化合物、改造微生物自身糖代谢网络和提高原子经济性的最新研究进展,以期对相关研究提供参考和方向。

**关键词:** 代谢工程; 芳香族化合物; 糖代谢网络; 原子经济性

**中图分类号:** Q812 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2018.05.010

## 引言

近年来,随着环保要求的提高和化石能源的减少,一些以石油为原料通过化学方法合成的化合物的生产受到了极大抑制,而低成本低功耗的代谢工程为这些石油衍生物或化合物的生产提供了一种极具前景的选择。现阶段的代谢工程主要通过分子生物学手段将工业微生物的天然代谢途径进行理性改造,从而实现由简单前体化合物如葡萄糖、甘油等可再生生物质资源到生物燃料或复杂天然大分子化合物的合成,同时满足了环境友好和低成本生产的要求。然而目前通过代谢工程生产这些化合物时普遍存在一些问题:一些天然化合物的代谢路径中的部分关键酶缺乏;一些天然化合物的天然代谢通路未知;一些非天然化合物没有微生物代谢路径;已有代谢路径中的原子经济性不高,目的产物产率低。针对这类共性问题,本课题组深入研究相关石油衍生品或化合物生物合成途径中关键酶的催化机理,分析目的化合物的结构相似性,并通过寻找和创造新的关键酶构建这些化合

物新的合成途径,来弥补代谢通路中关键酶的缺乏和非天然化合物代谢通路的缺失;通过改造微生物自身的糖代谢网络来保证在维持微生物基本生长的同时使碳流最大限度流向目标产物,提高代谢通路中的原子经济性。

## 1 酶已知但代谢途径未知的化合物生物合成

### 1.1 熊果苷的生物合成

熊果苷是一种存在于植物中的对羟基苯酚糖苷类化合物,具有美白、抗氧化、消炎、抗菌等生物活性,被广泛应用于化妆品及医学领域,是一种具有高附加值的天然化合物<sup>[1-3]</sup>。但是,目前熊果苷的生产方法主要集中于植物提取或酶催化法,这两种方法都面临工艺成本高且收率较低的问题。Shen等<sup>[4]</sup>通过合成生物学“由下而上”的设计理念,在大肠杆菌中设计了一条可以生产熊果苷的外源代谢途径;利用大肠杆菌中存在的可以生产对羟基苯甲酸的自然途径,通过在KEGG、BRENDA等酶学数据库中寻找1-羟化酶并结合文献检索,发现近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CBS604)中的4-羟基苯甲酸1-羟化酶(MNX1)可以催化对羟基苯甲酸生成对羟基苯酚;通过进一步检测发现蛇根木(*Rauvolfia serpentina*)中存在的糖苷转移酶(AS)可以将UDP-葡萄糖的糖苷配基特异性转移到对羟基苯酚上生成对羟基苯酚糖苷-熊果苷。对MNX1和AS进行饲

收稿日期: 2018-07-15

基金项目: 国家自然科学基金(21636001/21776008)

第一作者: 女, 1991年生, 硕士生

\* 通信联系人

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

喂实验和体外酶学性质检测发现,这两种酶的催化活性及底物专一性都非常高;然后利用 MNX1 和 AS 的特性,在大肠杆菌中成功地构建了一条由葡萄糖从头合成熊果苷的外源代谢途径(图 1)<sup>[4]</sup>。最终通过对羟基苯甲酸高产菌的构建和代谢途径优化等手段,得到可在摇瓶中高产熊果苷的大肠杆菌,产量达到 4.2 g/L。

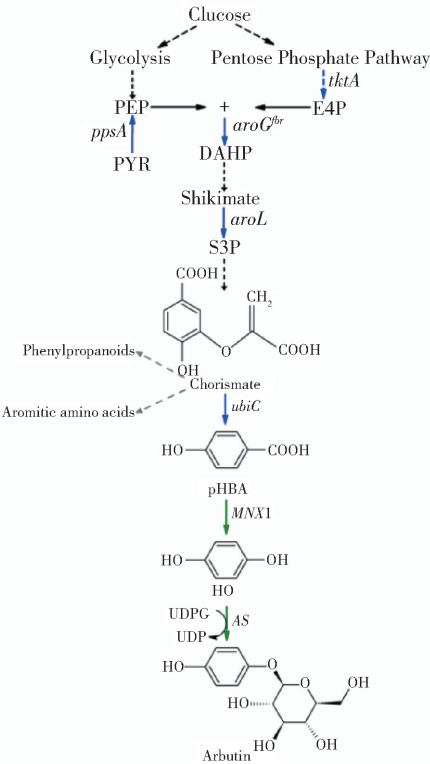


图 1 熊果苷人工合成代谢途径<sup>[4]</sup>

Fig. 1 Anabolic pathway of arbutin<sup>[4]</sup>

1.2 粘糠酸的生物合成

己二酸是一种主要依靠石化产品(例如苯)进行化学合成的重要平台化合物,可用于尼龙-6,6 和聚氨酯的生产。对苯二甲酸是合成聚对苯二甲酸乙二醇酯及其他聚酯的主要原料,而粘糠酸经过简单的转化(如加氢)就可以生成这些重要的化合物,目前已二酸和对苯二甲酸的全球年产量分别为 280 万吨和 7 100 万吨<sup>[5]</sup>。己二酸、对苯二甲酸主要依赖于石化产品(如苯)化学合成的方法生产,但这些石化产品通常被认为具有环境不友好且不可再生的缺点<sup>[6]</sup>,因此利用可再生原料开发这些化合物的绿色合成途径至关重要。Sun 等<sup>[7]</sup>发现邻氨基苯甲酸(AA)是色氨酸合成代谢途径中的一种重要的代谢产物,有些细菌可以使 AA 在邻氨基苯甲酸 1,2-加双氧酶(ADO)和儿茶酚 1,2-加双氧酶(CDO)的催

化作用下经儿茶酚降解为粘糠酸。他们首先搜索蛋白质数据库筛选得到高效的 ADO 和 CDO;然后通过过表达莽草酸途径中的关键酶并敲除掉生成色氨酸的关键酶来构建高产 AA 的菌株;最后将谷氨酰胺合成酶引入谷氨酰胺再生系统来进一步提高 AA 的产量。他们在大肠杆菌中构建的粘糠酸生物合成的途径如图 2 所示,其中通过引入 ADO 和 CDO 构建的一条完整的从头合成粘糠酸的途径如图中 A<sup>[7]</sup>,从而实现了从简单碳源产生了 389.96 mg/L 的粘糠酸。

粘糠酸和水杨酸都是天然代谢产物,其中粘糠酸是芳香化合物微生物降解的中间体,而水杨酸不仅是一种植物激素还是合成细菌铁载体的前体。迄今为止,仍几乎无法利用微生物代谢工程生成水杨酸,只有本课题组通过在大肠杆菌中表达异分支酸合成酶(ICS)和异分支酸丙酮酸裂解酶(IPL)合成了水杨酸,并以水杨酸为前体生物合成了 4-羟基香豆素<sup>[8]</sup>。Sun 等<sup>[9]</sup>发现只需两个酶(ICS 和 IPL)就可实现由分支酸合成水杨酸,同时一些细菌如假单胞菌属能够利用水杨酸作为唯一碳源和能源,在这一过程中水杨酸经儿茶酚和粘糠酸进行降解。他们首先通过引入 ICS 和 IPL 将原来高产苯丙氨酸的菌株改造成高产水杨酸菌株,可产 1.2 g/L 的水杨酸;接着通过引入水杨酸 1-加单氧酶(SMO)和 CDO 来降解水杨酸生成粘糠酸;然后通过对水杨酸合成途径及水杨酸降解为粘糠酸途径的整合和优化,构建了粘糠酸的从头合成途径(图 2B);最后经过模块优化,实现了由简单碳源合成粘糠酸,摇瓶实验中产量可达 1.5 g/L。

氧化脱羧酶(ODCs)和非氧化脱羧酶(NODCs)-脱羧酶是一类重要的酶,广泛参与芳香化合物的降解过程。Sun 等<sup>[10]</sup>发现,与 ODCs 不同,NODCs 具有独特的催化机制,可以不需要氧气及辅因子直接移除羧基并发挥活性,其中可以催化 2,3-二羟基苯甲酸(2,3-DHBA)脱羧形成儿茶酚的脱羧酶(BDC)属于 NODC 的一种;通过对比前两种粘糠酸的生物合成途径发现,找到一种高效的 BDC 酶就可能设计出一条新的粘糠酸生物合成途径。

目前,仍未有在原核生物中发现 BDC 的报道,只从几种真核微生物(如 *Aspergillus niger* 和 *Trichosporon cutaneum*)中鉴定了几个 BDC。由于原核生物具有更广泛的底物利用性能,从原核生物中鉴定 BDC 是非常迫切的。Sun 等<sup>[10]</sup>经过大量的工作从

*K. pneumoniae* 中鉴定出一个新的 BDC (kpBDC); 基于该酶, 再经由连接 2,3-DHBA 的合成和降解途径构建了一条新的粘糠酸生物合成途径(图 2C), 最终通过途径整合实现了粘糠酸的生物合成, 摇瓶产量为 480 mg/L。

芳香族化合物降解中的很多阶段都由脱羧酶作催化剂, Sun 等<sup>[10]</sup>通过鉴定一系列与芳香族降解相关的酶, 如氧化脱羧酶(ADO 和 SMO) 和非氧化脱羧酶(BDO) 等, 为粘糠酸的生物合成提供了 3 条新的代谢途径(图 2), 同时也为其他代谢及降解菌株的构建提供了选择途径。

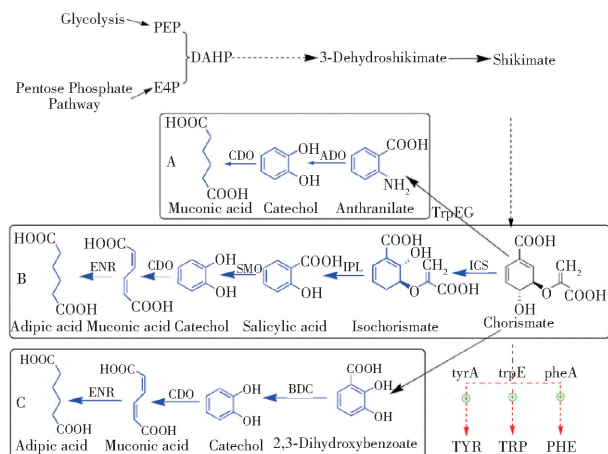


图 2 粘糠酸生物合成的途径<sup>[10]</sup>

Fig. 2 Biosynthetic pathways for muconic acid production<sup>[10]</sup>

## 2 由产物或底物的相似性来创造化合物的新途径

### 2.1 焦性没食子酸的生物合成

焦性没食子酸是一种简单的酚类化合物, 常被用于食品、农业、染料、印刷、化妆品等行业<sup>[11-13]</sup>。目前焦性没食子酸的生产主要由没食子酸脱羧制备, 反应条件复杂, 环境污染严重, 因此焦性没食子酸的生物合成途径一直以来备受关注。生物法合成焦性没食子酸的方法至今只有一篇文献报道, Kambourakis 等<sup>[14]</sup>于 2000 年开始尝试利用大肠杆菌表达脱羧酶来催化没食子酸脱羧, 再生产焦性没食子酸; 但是该脱羧酶对没食子酸的上游中间物 3,4-二羟基苯甲酸的催化效果更强, 并生产了大量的儿茶酚, 因此从头合成并没有得到相应的焦性没食子酸。Wang 等<sup>[15]</sup>通过结构比对发现, 焦性没食子酸与 2,3-二羟基苯甲酸(2,3-DHBA) 都有底物相似性, 如果将 2,3-二羟基苯甲酸的 C1 位上的羧基还原为羟基, 就可以得到焦性没食子酸; 但是通过检索 KEGG、BRENDA 等酶学

及代谢通路数据库, 他们并没有发现能催化这种反应的酶, 因此找到 2,3-二羟基苯甲酸 1-羟化酶成为其研究的重点; 最后通过底物及产物类似的生物勘探法找到了 5 种羟化酶来进行测试(图 3)<sup>[15]</sup>, 结果表明在 5 种羟化酶中, 水杨酸 1-羟化酶(NahG) 可以作用于 2,3-二羟基苯甲酸将 C1 位上的羧基还原为羟基, 并生成焦性没食子酸。

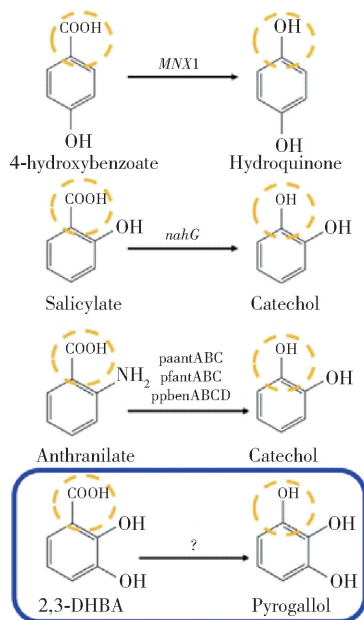


图 3 生物勘探法筛选 2,3-DHBA 1-羟化酶<sup>[15]</sup>

Fig. 3 Bioprospecting method for screening

### 2,3-DHBA 1- hydroxylase<sup>[15]</sup>

在得到可以高效催化 2,3-二羟基苯甲酸生产焦性没食子酸的酶后, Wang 等<sup>[15]</sup>又在大肠杆菌中成功构建了相应的代谢通路, 从葡萄糖先生产 2,3-二羟基苯甲酸再进一步生产焦性没食子酸(图 4)。通过降低竞争性途径碳通量、增加目标代谢通路的

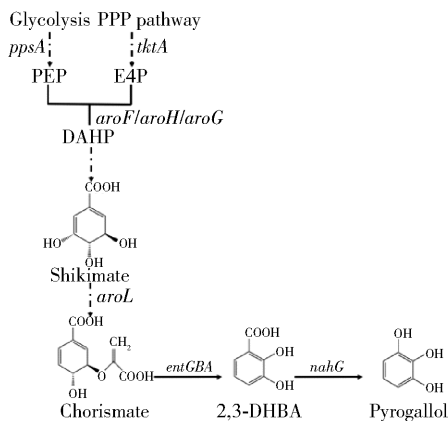


图 4 焦性没食子酸生物合成途径<sup>[15]</sup>

Fig. 4 Biosynthesis pathway of coke gallic acid<sup>[15]</sup>



通量、将模块优化组合、缓解焦性没食子酸的自氧化等策略,最终在摇瓶中得到了产量为 1.04 g/L 的焦性没食子酸。

2.2 香草醇的首次生物合成

香草醇(4-羟基-3-甲氧基苄基醇)是一种天然酚类化合物,也是一种应用广泛的调味剂,存在于天麻、香草等多种植物中,具有多种生物活性<sup>[16]</sup>。迄今为止,香草醇的主要生产途径是从各种植物中提取。本课题组在构建高产熊果苷、没食子酸及焦性没食子酸的基础上,成功得到了 3 种产物共同的前体——4-羟基苯甲酸(4-HBA)的高产菌。Chen

等<sup>[17]</sup>通过分析 4-羟基苯甲酸和香草醇结构并对比咖啡酸甲基转移酶(COMT)的天然底物咖啡酸、咖啡醇和 3,4-二羟基苯甲醇的结构,发现其相似性极高。他们首先对 COMT 以 3,4-二羟基苯甲醇为底物的催化活性进行了表征,结果证明该酶可以催化 3,4-二羟基苯甲醇的甲基化;然后通过对比底物和产物的相似性,引入羧酸还原酶(CAR)构建了 3,4-二羟基苯甲酸到 3,4-二羟基苯甲醇的生产途径;最后通过引入对羟基苯甲酸羟化酶(PobA)加强上游途径,在大肠杆菌中实现了香草醇的首次从头合成(图 5)<sup>[17]</sup>,摇瓶产量达到 240.69 mg/L。

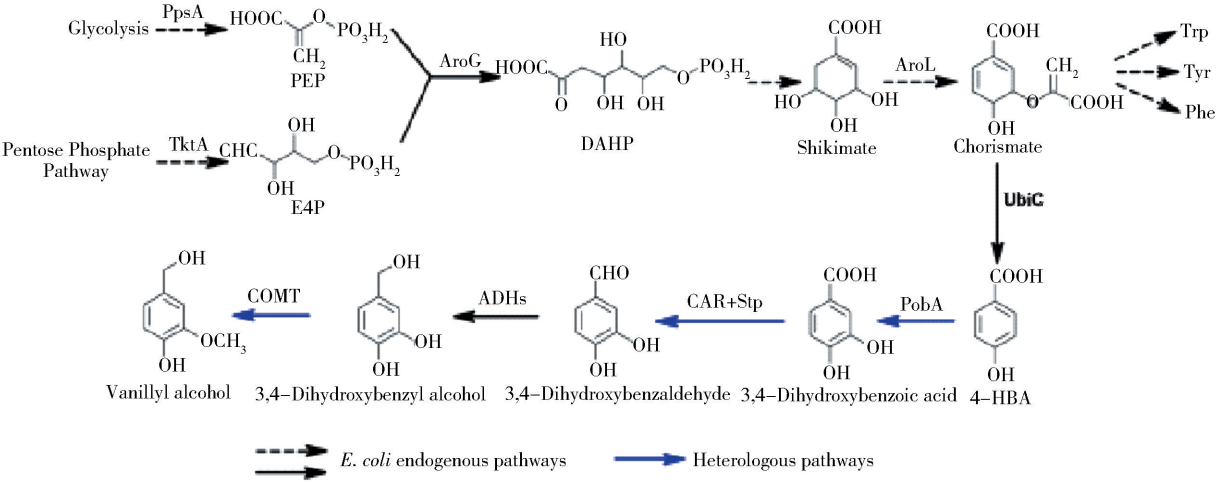


图 5 香草醇人工合成代谢途径<sup>[17]</sup>

Fig. 5 Synthetic metabolic pathway for vanillinol<sup>[17]</sup>

2.3 咖啡醇和松柏醇的首次生物合成

木质素单体是重要的芳香族化合物,也是植物重要的代谢产物,可以在植物中用于木质素的生物合成。木质素单体的衍生物具有多种多样的物理特性和医药应用价值<sup>[18]</sup>。目前化学法生产这些单体时需要还原对应的氢化肉桂酸,但是该方法存在底物价格昂贵、反应条件苛刻以及总体得率很低的缺点。

Chen 等<sup>[19]</sup>对比了对-香豆醇、咖啡醇及松柏醇等的结构,发现它们的相似性极高,然后通过对酶的筛选和对-香豆素的生物合成途径的优化,仅利用几种酶的相互组合和延伸就构建了这 3 种木质素单体化合物的代谢网络,并成功组建了木质素单体化合物的生产平台(图 6)。他们利用此木质素单体化合物的生产平台提高了对-香豆醇的生物合成产量,达到 501 mg/L,相比之前报道的 52 mg/L 提高了近 10 倍;在此基础上进一步对该平台进行延

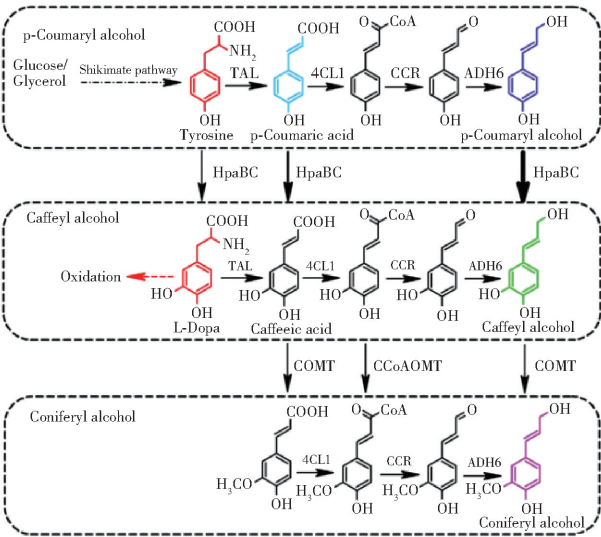


图 6 对-香豆醇、咖啡醇和松柏醇的生物合成途径<sup>[19]</sup>

Fig. 6 The biosynthetic pathways for coumarin, caffeol and coniferyl alcohol<sup>[19]</sup>

伸,克服了 4-羟基丙酸 3-羟化酶(HpaB)对前体的氧化,首次构建了咖啡醇的生物合成途径,通过共培养的方式使摇瓶产量达到 401 mg/L。另外,分析了咖啡醇和松柏醇的结构相似性,通过引入咖啡酸甲基转移酶(COMT)引入了一个甲基,使得咖啡醇被进一步催化为松柏醇,从而首次实现了松柏醇在大肠杆菌中的生物合成,摇瓶产量达到 125 mg/L。

### 2.4 4-羟基香豆素产量的提高方法

4-羟基香豆素是一种高附加值的抗血栓天然产物,是制备口服抗凝剂(如乙酰香豆酚和扑热息痛)和杀鼠剂的关键成分<sup>[20-21]</sup>,目前 4-羟基香豆素生物合成过程中的代谢物降解仍然是待解的难题。Shen 等<sup>[8]</sup>发现酰基-CoA 是生物合成高附加值产品过程中的一种重要的中间代谢物,而当这些外源代谢途径被重组进宿主细胞后,酰基-CoA 会被宿主细胞自身存在的硫酯酶降解,从而导致细胞能量的浪费和中间代谢物可利用程度降低(图 7(a))。为此他们构建了一个可以筛选特定酰基-CoA 的平台,用以特异性地定位到降解酰基-CoA 的相应酶;同时在其之前构建的 4-羟基香豆素代谢途径中<sup>[22]</sup>,一种重要的中间代谢物水杨酰-CoA 也遭受到了严重的降解(图 7(b)),所以他们利用这条生物合成途径来验证水杨酰-CoA 降解带来的负面影响,并验证他们新构建的筛选特定酰基-CoA 平台的有效性<sup>[8]</sup>。

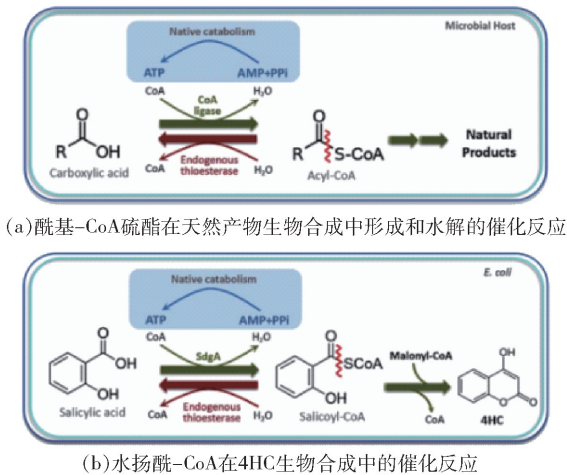


图 7 酰基-CoA 生物降解示意图<sup>[8]</sup>

Fig. 7 Acyl-CoA biodegradation diagram<sup>[8]</sup>

Shen 等<sup>[8]</sup>共筛选了 16 种硫酯酶,并且通过体内和体外活性鉴定确定了 1,4-二羟基-2-萘甲酰辅酶 A 水解酶(YdiI)是直接介导水杨酰-CoA 降解的

关键酶;通过敲除 YdiI 的表达基因,使 4-羟基香豆素的产量提高了 300%。经过模块优化,最终得到了 935 mg/L 的 4-羟基香豆素,这是目前为止的最高产量。

### 2.5 龙胆醇和水杨醇的生物合成

水杨醇又名 2-羟基苯甲醇,是一种广泛应用于制药工业的药物或前药,具有杀菌、抗菌和解热作用,并且作为一种局部麻醉剂已使用了很长时间<sup>[23]</sup>;与抗炎药阿司匹林相比,水杨醇具有相似的药理作用,但对人体的副作用较小<sup>[24]</sup>。龙胆醇也被命名为 2,5-二羟基苯甲酸(2,5-DHBA),是另一种重要的生物活性化合物,它被认为是一种具有清除自由基活性的强效抗氧化剂,还可以诱导新的血管形成,并抑制依托泊苷诱导的细胞凋亡。

为了构建水杨醇和龙胆醇的生物合成途径,首先需要确定其合适的前体。Shen 等<sup>[25]</sup>考虑到底物结构的相似性,选择水杨酸和 2,5-DHBA 作为直接前体,将这两种芳香羧酸进行还原生成相应的醇,为水杨醇和龙胆醇的生物合成提供了极具前景的思路。然而迄今为止催化这种生物反应的酶尚未有报道,为了解决这一问题,他们通过研究类似的催化反应发现,从海鱼分枝杆菌中得到的羧酸还原酶(CAR)能够将一系列芳香和短链羧酸转化成相应的醛类,然后利用大肠杆菌内源性醇脱氢酶自动还原成相应的醇类。考虑到 CAR 具有广泛的底物特异性,他们选择以 CAR 为催化剂还原水杨酸和 2,5-DHBA 合成水杨醇和龙胆醇,并在此基础上鉴定了一种新的水杨酸 5-羟化酶可以催化水杨酸生成 2,5-DHBA;之后通过改写碳代谢流将碳通量引入到莽草酸通路,首次实现了水杨醇和龙胆醇的生物合成(图 8)<sup>[25]</sup>,最终在摇瓶中得到了产量分别为 594.4 mg/L 和 30.1 mg/L 的水杨醇和龙胆醇。

### 2.6 羟基酯醇的生物合成

羟基酯醇(HT)又称 3,4-二羟基苯乙醇,有“液体白金”、“地中海甘露”等美誉,是一种天然多酚类化合物,具有很强的抗氧化活性,在疾病预防、食品补充剂、功能性食品及药品等的生产中都有应用。HT 是由橄榄苦苷降解的天然产物,主要从橄榄树中提取,也有通过全细胞生物转化从酪氨酸溶胶中产生的报道<sup>[26]</sup>。

Li 等<sup>[27]</sup>发现酯醇转化为 HT 只需要一个羟基化步骤,利用铜绿假单胞菌的 4-羟基苯乙酸 3-羟

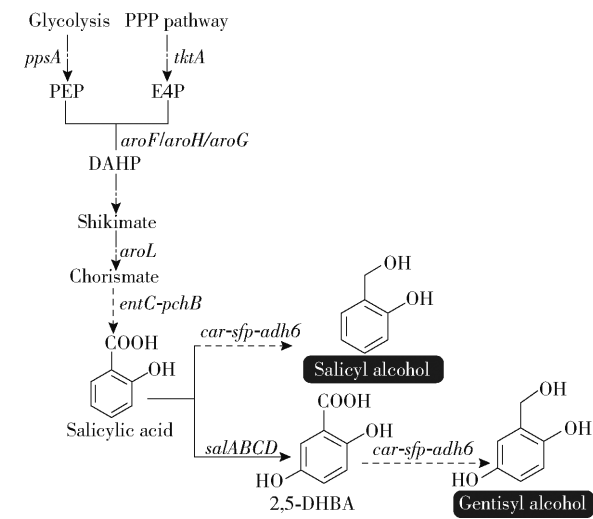


图 8 水杨醇和龙胆醇的人工生物合成途径<sup>[25]</sup>  
Fig. 8 Artificial biosynthesis pathway for salicylic alcohol and gentian alcohol<sup>[25]</sup>

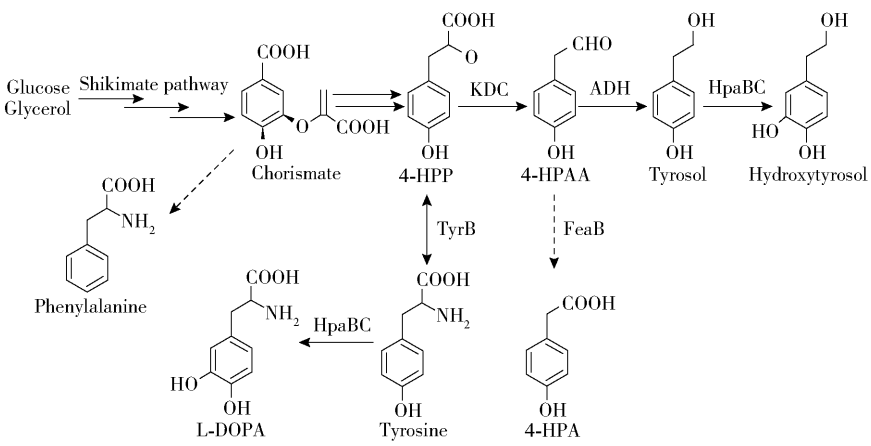


图 9 羟基酪醇的生物合成新途径<sup>[27]</sup>  
Fig. 9 A new biosynthesis pathway for hydroxy tyamol<sup>[27]</sup>

### 3 新酶的挖掘及酶分子结构的研究和改造

#### 3.1 3-苯基丙酸和 3-4-羟基苯基丙酸的生物合成

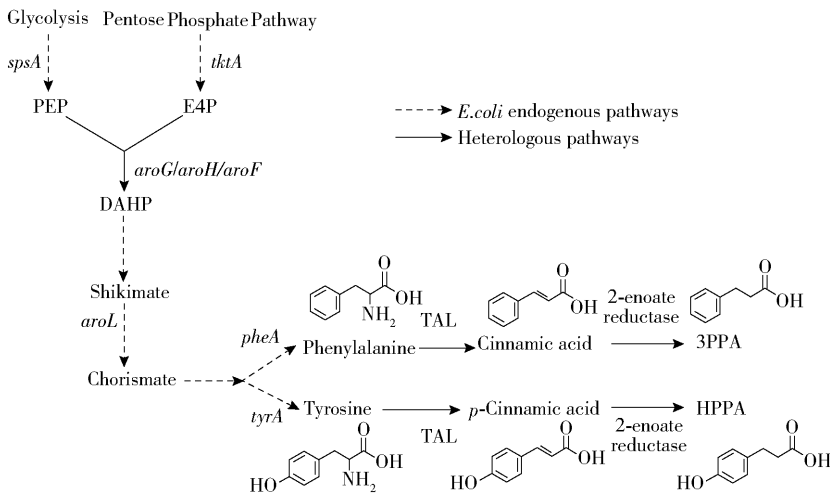
3-苯基丙酸 (3-phenylpropionic acid, 3PPA) 和 3-4-羟基苯基丙酸 (3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, HPPA) 是两种广泛应用于食品、制药和化工产品的芳香酸类, 3PPA 常被用来生产调味料、香水和香料, 而 HPPA 则具有抗菌活性, 是一种重要的药物中间体<sup>[28]</sup>。目前这两种化合物都通过化学法合成, 需要经过复杂的合成步骤, 所用试剂和催化剂具有毒性, 并且污染环境。

Sun 等<sup>[29]</sup>从 9 种微生物中筛选了 11 种不同的

化酶 (HpaBC) 可进行这一步反应。基于此, 他们选择具有广泛的底物活性并已用于各种芳香化合物的羟基化的大肠杆菌 HpaBC 使酪醇羟基化为 HT (酪醇是 HT 生物合成的关键中间体); 然后对酪氨酸酶的生产进行了优化: 通过在培养基中添加抗坏血酸来防止 HT 的氧化, 用双向培养法原位萃取来解除 HT 对细胞生长的抑制作用; 最终通过引入芳香氨基酸转氨酶 (TyrB)、酮酸脱羧酶 (KDC)、乙醇脱氢酶 (ADH)、4-羟基苯乙酸 3-羟化酶 (HpaBC) 4 种酶设计了一条用简单的碳源生物合成 HT 的新途径 (图 9)<sup>[27]</sup>, 摇瓶产量达到 1 243 mg/L。由此实现了 HT 在生物体内的高产, 为以后 HT 的工业化打下了坚实的基础, 同时该途径所采用的相关方法也为其他天然药物的生物合成提供了科学依据。

2-烯酸还原酶 (ER), 首次证明了在严格厌氧条件下来自梭状芽胞杆菌中的 ER 可以催化肉桂酸和 p-香豆酸生成 3PPA 和 HPPA, 并基于这一新酶的发现在大肠杆菌中构建了一条从头合成两种高附加产物的代谢途径 (图 10)。同时他们尝试将该酶在厌氧及好氧条件下进行表达, 发现在有氧气条件下该酶已可以保持活性, 这是首次实现该酶在好氧条件下的表达及应用; 但是最初的表达策略使这两种底物的前体——肉桂酸和 p-香豆酸在大肠杆菌中大量积累, 并导致了细胞毒性; 因此他们尝试了不同的表达策略来克服这一难题, 最终实现了这两种产物在大肠杆菌中的高效生产, 使 3PPA 和 HPP 的摇瓶产量分别达到 366.77 mg/L 和 225.10 mg/L。



图 10 3PPA 和 HPPA 的新生物合成途径<sup>[29]</sup>Fig. 10 De novo biosynthetic pathways for 3PPA and HPPA<sup>[29]</sup>

### 3.2 1,4-丁二醇的生物合成

1,4-丁二醇(1,4-BDO)是一种有价值的商品化化学品,常用于塑料、溶剂、纤维以及其他化学品的制造,其全球年市场总价值超过 40 亿美元,全球年市场超过 250 万吨<sup>[30]</sup>,因此利用生物方法生产 1,4-BDO 具有极高的商业价值。Wang 等<sup>[31]</sup>发现文献[32]构建的 1,4-丁二醇合成途径中积累了大量的 1,2,4-丁三醇,考虑到 1,2,4-丁三醇是 1,4-丁二醇的结构类似物,因此他们拟将 1,2,4-丁三醇转化为 1,4-丁二醇。

尽管自然界中存在很多可以转化三醇到二醇的酶,但是并没有催化多元丁醇间互相转化的酶。在分析了来自克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)中的丙二醇脱水酶后,考虑到该酶可以天然催化 1,2-丙二醇和甘油(丙三醇)脱水生产 1-丙醇和 1,2-丙二醇,Wang 等<sup>[31]</sup>尝试通过理性设计的方法改造二醇脱水酶(PpdACB),使其可以催化 1,2,4-丁三醇转化为 1,4-丁二醇。首先,他们通过体内和体外酶活测试鉴定了该酶对 1,2,4-丁三醇的催化活性,发现虽然二醇脱水酶可以在体外以纯化酶的方式微弱催化 1,2,4-丁三醇转化为 1,4-丁二醇,但是在大肠杆菌体内并不能完成这一步转化。然后基于该酶的晶体结构分析了酶与底物之间的相互作用,发现当甘油作为底物时,甘油中一个羟基可以和活性位点中 301 位丝氨酸的羟基形成氢键,导致空间位阻增大;将 301 位的丝氨酸突变为结构类似但不含羟基的丙氨酸(PpdACB S301A)可以减少酶对底物 1,2,4-丁三醇的空间位阻,但是当添加 1,2,4-丁三醇作为底物时依然没有在大肠杆菌的培养基中检测到 1,4-

丁二醇生成。考虑到 1,2,4-丁三醇是四碳醇,与甘油相比空间结构更大,由此通过测量催化中心的通道距离将 336 位的谷氨酸突变为丙氨酸,进而将通道由 7.93 Å 增大至 8.47 Å 生成二突变体 PpdACB S301AQ336A;饲喂试验显示,含有 PpdACB S301AQ336A 突变体的大肠杆菌将 1,2,4-丁三醇成功转化成了 1,4-丁二醇。最后,根据催化中心金属离子与底物的最佳距离优化了 PpdACB S301AQ336A 对于 1,2,4-丁三醇的距离,并通过模拟测算得出,将 300 位的缬氨酸突变为甲硫氨酸可以得到最佳的催化距离,进而得到突变体 PpdACBS301AQ336AV300M;饲喂试验显示,带有突变体 PpdACB S301AQ336AV300M 的大肠杆菌可以生产 1,4-丁二醇,产量达到 224 mg/L。

在成功改造了原本不能催化 1,2,4-丁三醇生成 1,4-丁二醇的脱水酶后,Wang 等<sup>[31]</sup>将已经构建好的木糖非磷酸化途径(图 11)引入到 1,4-丁二醇的合成途径中,结合二醇脱水酶突变体 PpdACB S301AQ336AV300M 最终成功构建了一条全新的 1,4-丁二醇合成途径(图 11);通过敲除竞争性途径,在大肠杆菌中生产了 209 mg/L 的 1,4-丁二醇。

### 3.3 没食子酸的生物合成

没食子酸(GA)是一种天然存在的植物化学成分,广泛存在于蓝莓、核桃、苹果、栎树皮、石榴和茶叶中,具有很强的抗氧化、抗癌、抗炎及抗菌能力;没食子酸同时也是一种生产高附加值产物的平台化合物,具有极高的工业化价值<sup>[33]</sup>。在研究对羟基苯酚及对羟基苯甲酸等芳香族化合物的生产中,Chen 等<sup>[34]</sup>发现来自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的对

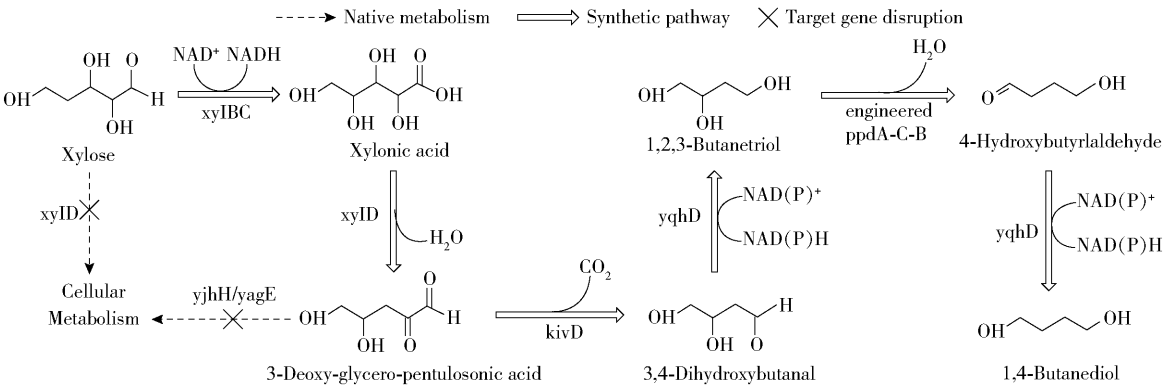


图 11 一种新的在大肠杆菌中从木糖和天然竞争途径合成 1,4-丁二醇的途径<sup>[31]</sup>

Fig. 11 Schematic representation of a novel 1,4-butanediol pathway from xylose and native competing pathways in *Escherichia coli*<sup>[31]</sup>

羟基苯甲酸羟化酶(PobA)可以催化对羟基苯甲酸(4-HBA)生成3,4-二羟基苯甲酸(3,4-DHBA)。据已知文献报道,该酶的突变体PobA\*可以进一步催化3,4-二羟基苯甲酸临位加羟基生成没食子酸<sup>[35]</sup>;但是另有研究表明PobA\*对于3,4-二羟基苯甲酸的体外转化率很低,在体内从头合成中由于PobA\*的活性不高,3,4-二羟基苯甲酸被大量积累而不能生产没食子酸<sup>[36]</sup>。Chen等<sup>[34]</sup>通过对PobA及PobA\*两个蛋白的晶体结构解析及酶活位点分析,发现PobA及PobA\*的氨基酸残基Y201、P293、T294、Y385和对羟基苯甲酸4位上的羟基形成一个氢键环(hydrogen-bond loop),该氢键环可以将底物稳定地绑定在活性中心(图12)。基于此他们针对PobA\*进行理性设计,通过将PobA\*294位的苏氨酸突变为丙氨酸得到突变体PobA\*\*,使该酶的催化中心与3,4-二羟基苯甲酸形成一个新的氢键环,再由氢键环来帮助催化3,4-二羟基苯甲酸生产没食子酸;实验结果表明,PobA\*\*可以成功催化3,4-二羟基苯甲酸生产没食子酸。在此基础上,他们最终构建了一条以葡萄糖为底物,高效生产没食子酸的外源代谢通路(图13)<sup>[34]</sup>,摇瓶产量达到1.2 g/L。

4 突破已知代谢网络,提高原子经济性

大肠杆菌中糖代谢所涉及的中央代谢途径可以经过人工改造而摆脱冗余的代谢步骤和复杂的调控措施。在糖苷类化合物及多糖类化合物的生产中,葡萄糖的利用一直以来存在一个极大的问题,即大量的葡萄糖都用于菌体生长而挤压竞争了产物的生产,若彻底阻断生长代谢则会导致菌体死亡,而额外

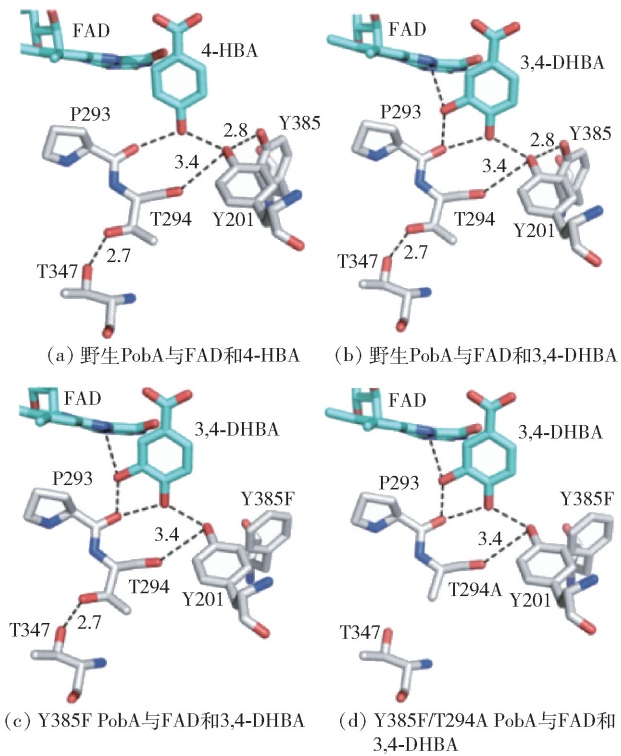


图 12 分子对接模型的催化小孔<sup>[34]</sup>

Fig. 12 Catalytic pockets of molecular docking models<sup>[34]</sup>  
添加第二碳源又会因碳分解代谢物阻遏(carbon catabolite repression, CCR)效应而导致第二碳源难以被吸收利用。因此如何平衡二者的关系是糖苷类及多糖类生产的研究重点,而提高原子经济性是解决这一问题的关键。

4.1 木糖代谢网络优化及木糖非磷酸化代谢的平台建立

微生物自身存在的葡萄糖或木糖代谢途径受到严格的多级调控,其目的是最大限度地供应菌体生长,而构建外源途径的原则是最大限度地利用碳源



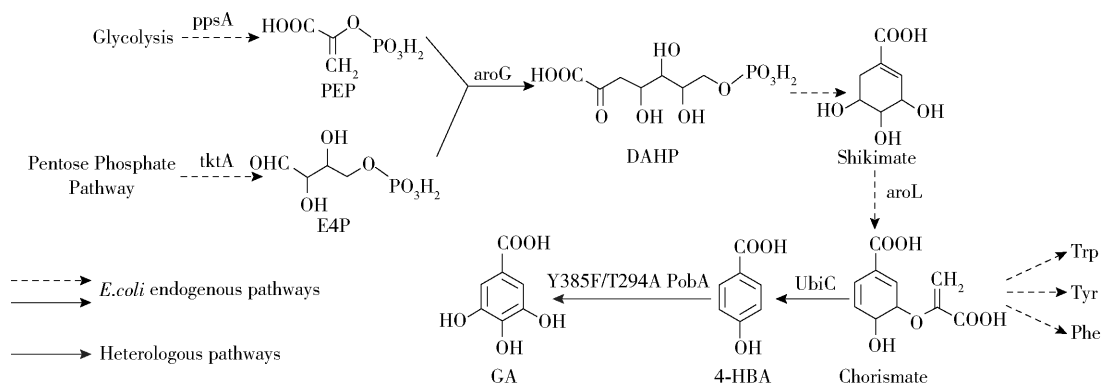


图 13 GA 生物合成新途径<sup>[34]</sup>

Fig. 13 The novel biosynthetic pathway for GA<sup>[34]</sup>

生产目的产物,这与菌体自身存在的糖类代谢调控相违背,因此如何使菌体高效生产目标产物成为亟待解决的问题。目前常见的调控都集中于敲除竞争性副产物途径,或者动态调控整个代谢通路甚至代谢网络。敲除竞争性副产物途径虽然可以将更多的碳流引入目标代谢途径,但并不能减少菌体在生长上消耗的能量,因此仍然造成大量的能源浪费;而动态调控的最大缺点是调控范围较窄、调控效果不明显。这两种调控都没有从根本上对菌体自身糖的核心代谢进行改造和调整,因此都不能从根本上节约碳源。Wang 等<sup>[37]</sup>通过改造微生物自身的糖代谢网络,使细菌在维持基本生长的同时将碳流最大限度流向目标产物。

大肠杆菌原有的木糖代谢途径是磷酸戊糖途径,从木糖到  $\alpha$ -酮戊二酸再进入三羧酸循环需要十余步反应,同时受到非常严格和复杂的调控,使理论最大摩尔得率仅为 83%。基于此,Wang 等<sup>[37]</sup>通过改造大肠杆菌的木糖代谢途径构建了一条非磷酸化的木糖代谢途径,该途径仅通过 5 步反应就可以将

木糖转化为  $\alpha$ -酮戊二酸。在这条通路上没有碳损失,理论摩尔得率可以达到 100%;同时这条途径还不存在调控,是一条非常具有潜力的代谢通路(图 14),可从根本上提高原子经济性。

3-羟基- $\gamma$ -丁内酯 (3-hydroxy- $\gamma$ -butyrolactone, 3HBL) 是一种很有应用前景的基础材料,被广泛应用于制药领域,目前市场价格在 450 美元/kg, (约合人民币 3 000 元/kg),被美国能源部列为最具价值的化合物之一<sup>[38]</sup>。目前 3-羟基- $\gamma$ -丁内酯主要以石油为原料,利用有毒的底物和苛刻的反应条件进行生产;3,4-二羟基丁酸是 3-羟基- $\gamma$ -丁内酯的直接前体,仅经过一步简单酸化就可以生产 3-羟基- $\gamma$ -丁内酯<sup>[39]</sup>。Wang 等<sup>[37]</sup>首先通过筛选一系列的酶构建上述非磷酸化的代谢通路,以保证代谢通路可以高效转化木糖进入目标代谢途径;然后以木糖为底物,仅经过 5 步反应就构建了高效的木糖非磷酸化生产 3,4-二羟基丁酸的代谢通路(图 15);接着通过敲除竞争性途径进一步将碳代谢流引入目标代谢途径,使 3,4-二羟基丁酸产量达到 1 270 mg/L,这是目前

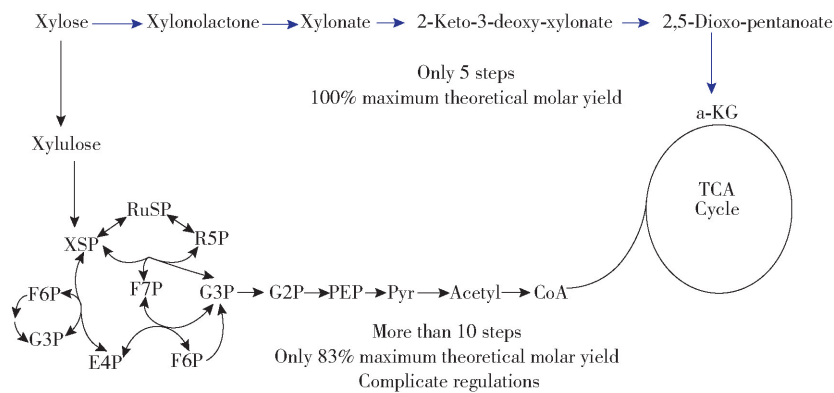


图 14 大肠杆菌原有木糖代谢与非磷酸化木糖代谢的区别<sup>[37]</sup>

Fig. 14 The difference between xylose metabolism and non-phosphorylated xylose metabolism in *E. coli*<sup>[37]</sup>

报道的最高产量。这条高效的生产途径为大规模生产 3,4-二羟基丁酸奠定了基础,同时该非磷酸化代谢通路也可以应用于 1,4-丁二醇的生物合成。

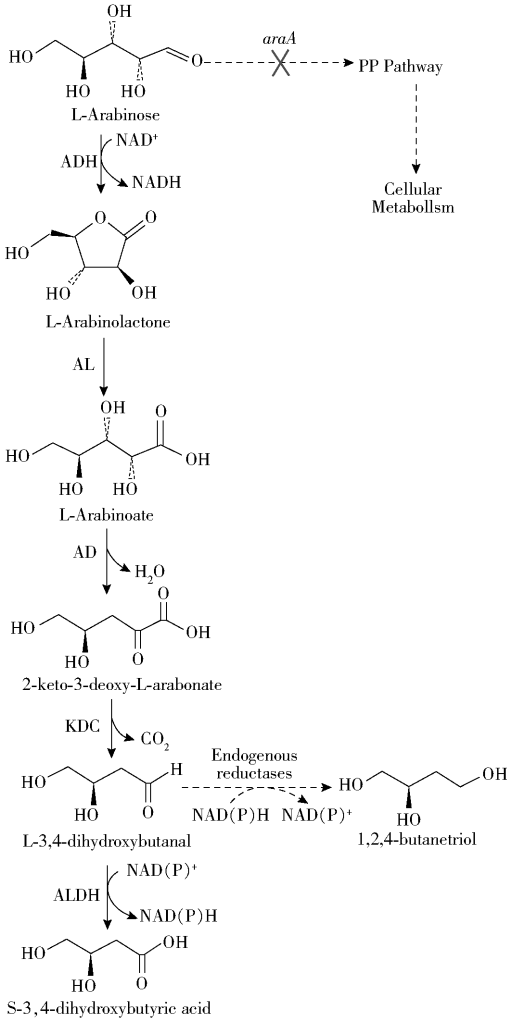


图 15 木糖非磷酸化代谢途径生产 3,4-二羟基丁酸<sup>[37]</sup>

Fig. 15 Production of 3,4-dihydroxybutyric acid by the non-phosphorylated metabolic pathway of xylose<sup>[37]</sup>

在成功构建了一条高效的木糖非磷酸化利用途径的基础上,Wang 等<sup>[37]</sup>生产了 3,4-二羟基丁酸和 1,4-丁二醇这两种不同的高附加值产物。为了比较新构建的木糖非磷酸化代谢途径与大肠杆菌自带的磷酸戊糖途径的效率,他们探究了 3 种木糖的代谢途径——isomerase 途径,Weimberg 途径和 Dahms 途径之间的关系。Isomerase 途径是大肠杆菌的主要戊糖代谢途径即磷酸戊糖途径和糖酵解途径,Weimberg 途径是 Wang 等<sup>[40]</sup>构建的非磷酸化木糖代谢途径,Dahms 途径是连接前两个途径的分支途径,这 3 种途径都可以生产  $\alpha$ -酮戊二酸和乙酰-CoA 使之

进入三羧酸循环。为了更好地研究 3 种途径之间的关系,他们将以  $\alpha$ -酮戊二酸和乙酰-CoA 为前体生产的高附加值产物戊二酸作为目标产物进行进一步研究(图 16)<sup>[40]</sup>。首先,他们用大肠杆菌自带的 isomerase 途径生产戊二酸,这是首次在大肠杆菌中以木糖为底物生产戊二酸,戊二酸产量仅为 104 mg/L,说明利用大肠杆菌自身的 isomerase 途径生产 TCA 循环的衍生物是非常低效的。相较于 isomerase 途径,他们构建的 Weimberg 途径仅用 5 步就可以生成  $\alpha$ -酮戊二酸,但是该途径并不能生产戊二酸的必需前体乙酰-CoA,而 Dahms 途径作为分支途径则可以通过产生丙酮酸进入糖酵解途径生产乙酰-CoA。基于此他们将两者组合生产了 209 mg/L 的戊二酸,这一结果说明相较于 isomerase 途径,Weimberg 途径对生产 TCA 循环的衍生物具有更高的效率,但与葡萄糖生产戊二酸相比,效率还不够高。

通过分析发现,Weimberg 途径与 Dahms 途径组合的通路是以消耗  $\alpha$ -酮戊二酸为代价来生产乙酰-CoA 的。尽管 Weimberg 途径可以更有效地生产  $\alpha$ -酮戊二酸,但是 Dahms 途径并不是一个生产乙酰-CoA 的较优途径。在本研究中,Weimberg 途径因可以高效提供  $\alpha$ -酮戊二酸而成为大肠杆菌的固有途径,isomerase 途径可以更好地合成乙酰-CoA,因此 Wang 等<sup>[40]</sup>选择以 isomerase 途径代替 Dahms 途径与 Weimberg 途径组合,最终生产了产量为 602 mg/L 的戊二酸,高于葡萄糖生产戊二酸的产量(420 mg/L);结果说明 isomerase 途径与 Weimberg 途径的组合产生了良好的协同效应,从而提高了原子的经济性。

4.2 葡萄糖和甘油协同利用的新平台建立

在探究了木糖非磷酸化途径与大肠杆菌固有的木糖代谢途径的关系后,本课题组发现,大肠杆菌中糖代谢所涉及的中央代谢途径可以经过人工改造而摆脱冗余的代谢步骤和复杂的调控过程。在糖苷类化合物及多糖类化合物的生产中,如何提高碳源的利用效率始终是一个待解的难题。Wu 等<sup>[41]</sup>以海藻糖为目标产物对葡萄糖的代谢网络进行了改造,以解决产物生产与菌体生长的竞争问题并提高原子的经济性。他们敲除了葡萄糖进入中央代谢途径的所有相关基因,包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*zwf*)和磷酸葡萄糖异构酶(*pgi*),还敲除了磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)生成丙酮酸(PYR)及进入三羧酸循环的所有基因,如丙酮酸激酶 II(*py-*

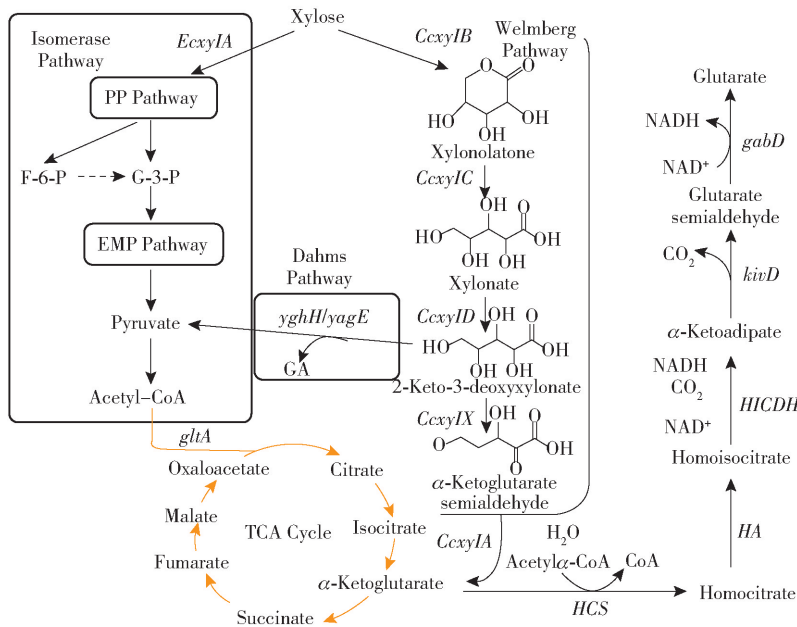


图 16 糖代谢的 3 个主要途径及戊二酸生物合成途径<sup>[40]</sup>

Fig. 16 Schematic representation of three different xylose metabolic pathways and the glutaric acid biosynthetic pathway<sup>[40]</sup>

kA)、丙酮酸激酶 I (*pykF*) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*ppc*);进行基因敲除后,细胞即使利用甘油也会因中间代谢产物进入三羧酸循环的途径被阻断而无法生长。培养实验证明,在仅含葡萄糖或仅含甘油的培养基中,大肠杆菌不能正常生长。由于葡萄糖转运进细胞的方式是消耗 PEP 生成 PYR,因此该平台菌株利用甘油为第二碳源支持 PEP 生成,再由 PEP 转运葡萄糖生成 PYR 来支持菌株的生长,而转运进细胞的葡萄糖则作为底物来生产目标产物,同时由此生成的 PYR 进入中央代谢途径提供生长的必需能量。甘油与葡萄糖协同利用平台如图 17 所示,该协同利用机制可以使甘油解除 CCR 效应先于葡萄糖被利用来支持菌体自身生长,通过这种方式将碳流及能量引入到中央代谢途径来提供生长能量。该协同利用机制的优势在于菌体吸收甘油以支持自身生长,而大量的葡萄糖则直接进入目标产物合成途径来生成多糖类或糖苷类化合物。

海藻糖是一种非还原型二糖,具有非常稳定的特性,可以作为甜味剂、保湿剂和器官防腐剂等,还可以治疗脂肪肝、糖尿病和阿兹海默症,具有重要的商业化价值<sup>[42]</sup>,因此选用海藻糖来验证其改造甘油与葡萄糖协同利用平台的功效。在文献[41]中,不仅首次构建了甘油与葡萄糖的协同利用平台,还首

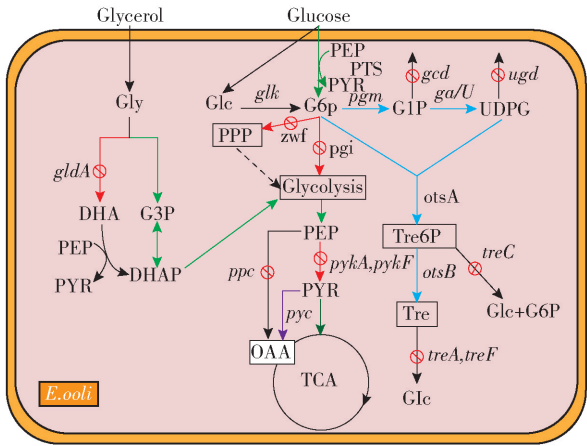


图 17 甘油与葡萄糖协同利用平台及海藻糖生物合成途径<sup>[41]</sup>

Fig. 17 Glycerol and glucose utilization mechanism and the trehalose biosynthesis pathway<sup>[41]</sup>

次实现了海藻糖的生物合成(图 17),其产率达到最大理论得率的 91%,摇瓶产量达到 8.2 g/L,具有极高的工业化价值。

4.3 葡萄糖和木糖协同利用的新平台建立

木糖的代谢途径可以与葡萄糖的中央代谢途径通过 3-磷酸甘油醛高效偶联来实现五碳糖向三碳、七碳或六碳的转化。因此, Wu 等<sup>[43]</sup>假设将木糖或半纤维素水解液作为底物,通过改造大肠杆菌的中央代谢途径来生产糖苷类或多糖类的高附加值产



品,并仍然选择海藻糖为目的产物验证该假设;他们通过阻断葡萄糖的主要代谢途径和改造 PEP 到丙酮酸的反应途径,成功地构建了葡萄糖和木糖的协同利用平台(图 18),并在摇瓶中实现了海藻糖的生产,产量达 5.5 g/L。这一结果不但证明了葡萄糖和木糖协同利用平台可以提高两种单糖的利用效率,还为木质纤维素水解液的高效利用和海藻糖的生物合成提供了新的方法。

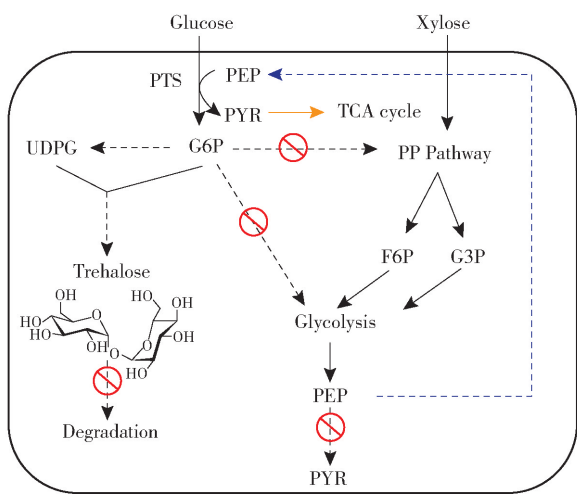


图 18 葡萄糖和木糖协同利用平台  
生物合成海藻糖<sup>[43]</sup>

Fig. 18 Synergetic utilization platform of glucose and xylose for trehalose biosynthesis<sup>[43]</sup>

## 5 结论与展望

本文介绍了本课题组解决目前代谢工程存在问题的具体方法,如通过分析已知酶的作用机理设计目前未知的从头合成的代谢通路来进行熊果苷、粘糠酸的生物合成;通过分析底物或产物的结构相似性筛选酶设计从头合成的代谢途径来进行焦性没食子酸、香草醇等的生物合成;通过酶分子结构的分析改造创造出从头合成的代谢途径来进行 1,4-丁二醇、没食子酸的首次生物合成;通过改造微生物体内自身的糖代谢网络实现海藻糖、3,4-二羟基丁酸等的高产等。

为了降低工业化的生产成本、提高生产效率,通过创造新的微生物代谢途径来实现化合物的高产和碳源高效利用的策略对于工业化生产非常关键。随着代谢工程和基因工程的发展,在微生物代谢水平上进行改造的策略也会逐渐增多,诸如动态调控、基因编辑、基因线路设计组装以及人工细胞的构建等都提供了很有前景的方向。

## 参考文献:

- [1] FUNAYAMA M, ARAKAWA H, YAMAMOTO R, et al. Effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1995, 59(1):143–144.
- [2] HORI I, NIHEI K, KUBO I. Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin[J]. Phytotherapy Research, 2004, 18(6): 475–479.
- [3] MAEDA K, FUKUDA M. Arbutin; mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture[J]. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 1996, 276(2):765–769.
- [4] SHEN X L, WANG J, WANG J, et al. High-level *De novo* biosynthesis of arbutin in engineered *Escherichia coli* [J]. Metabolic Engineering, 2017, 42:52–58.
- [5] WEBER C, BRUCKNER C, WEINREB S, et al. Biosynthesis of *cis*, *cis*-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78 (23): 8421–8430.
- [6] THIEMENS M H, TROGLER W C. Nylon production; an unknown source of atmospheric nitrous oxide[J]. Science, 1991, 251(4996):932–934.
- [7] SUN X X, LIN Y H, HUANG Q, et al. A novel muconic acid biosynthesis approach by shunting tryptophan biosynthesis via Anthranilate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(13):4024–4030.
- [8] SHEN X L, MAHAJANI M, WANG J, et al. Elevating 4-hydroxycoumarin production through alleviating thioesterase-mediated salicyl-CoA degradation[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42:59–65.
- [9] LIN Y H, SUN X X, YUAN Q P, et al. Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 23:62–69.
- [10] SUN X X, LIN Y H, YUAN Q P, et al. Biological production of muconic acid via a prokaryotic 2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase[J]. Chemsuschem, 2014, 7(9):2478–2481.
- [11] LI W J, WANG C Z. Biodegradation of gallic acid to prepare pyrogallol by *Enterobacter aerogenes* through substrate induction[J]. Bioresources, 2015, 10(2):3027–3044.
- [12] SONI M, SHARMA K P, JOHN P J. Characterization of pyrogallol production from gallic acid by *Enterobacter* spp [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology Research, 2017, 2(2):327–336.

- [13] KIM T J, SILVA J L, JUNG Y S. Enhanced functional properties of tannic acid after thermal hydrolysis [J]. Food Chemistry, 2011, 126(1):116–120.
- [14] KAMBOURAKIS S, DRATHS K M, FROST J W. Synthesis of gallic acid and pyrogallol from glucose: replacing natural product isolation with microbial catalysis [J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(37):9042–9043.
- [15] WANG J, SHEN X L, YUAN Q P, et al. Microbial synthesis of pyrogallol using genetically engineered *Escherichia coli* [J]. Metabolic Engineering, 2018, 45:134–141.
- [16] SHYAMALA B N, NAIDU M M, SULOCHANAMMA G, et al. Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(19):7738–7743.
- [17] CHEN Z Y, SHEN X L, WANG J, et al. Establishing an artificial pathway for *De novo* biosynthesis of vanillyl alcohol in *Escherichia coli* [J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(9):1784–1792.
- [18] QUIDEAU S, RALPH J. Facile large-scale synthesis of coniferyl, sinapyl, and *p*-coumaryl alcohol [J]. J Agric Food Chem, 1992, 40(7):1108–1110.
- [19] CHEN Z Y, SUN X L, LI Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial synthesis of monolignols [J]. Metabolic Engineering, 2017, 39:102–109.
- [20] FERREYRA M L F, RIUS S P, CASATI P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications [J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3:222.
- [21] HALLS C, YU O. Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis [J]. Trends in Biotechnology, 2008, 26(2):77–81.
- [22] LIN Y H, SHEN X L, YUAN Q P, et al. Microbial biosynthesis of the anticoagulant precursor 4-hydroxycoumarin [J]. Nature Communications, 2013, 4(1):2603.
- [23] HIRSCHFELDER A D, WYNNE H M N. Saligenin as a local anesthetic for the female urethra [J]. Journal of the American Medical Association, 1920, 75(26):1770.
- [24] KUMAR S, SINGH S K, CALABRESE C, et al. Structure of saligenin: microwave, UV and IR spectroscopy studies in a supersonic jet combined with quantum chemistry calculations [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014, 16(32):17163–17171.
- [25] SHEN X L, WANG J, GALL B K, et al. Establishment of novel biosynthetic pathways for the production of salicyl alcohol and gentisyl alcohol in engineered *Escherichia coli* [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(4):1012–1017.
- [26] RIGANE G, BOUAZIZ M, BACCAR N, et al. Recovery of hydroxytyrosol rich extract from two-phase chemlali olive pomace by chemical treatment [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(10):C1077–C1083.
- [27] LI X L, CHEN Z Y, WU Y F, et al. Establishing an artificial pathway for efficient biosynthesis of hydroxytyrosol [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(2):647–654.
- [28] KORNEEV S M. Hydrocinnamic acids: application and strategy of synthesis [J]. Synthesis, 2013, 45(8):1000–1015.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] WANG Q Q, ZHOU K, NING Y, et al. Effect of the structure of gallic acid and its derivatives on their interaction with plant ferritin [J]. Food Chemistry, 2016, 213:260–267.
- [34] CHEN Z Y, SHEN X L, WANG J, et al. Rational engineering of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase to enable efficient gallic acid synthesis via a novel artificial biosynthetic pathway [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(11):2571–2580.
- [35] PALFEY B A, BALLOU D P, MASSEY V. Catalytic function of tyrosine residues in *para*-hydroxybenzoate hydroxylase as determined by the study of site-directed mutants [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(26):17341–17349.
- [36] KAMBOURAKIS S, DRATHS K M, FROST J W. Synthesis of gallic acid and pyrogallol from glucose: replacing natural product isolation with microbial catalysis [J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(37):9042–9043.
- [37] WANG J, SHEN X L, JAIN R, et al. Establishing a no-

- vel biosynthetic pathway for the production of 3,4-dihydroxybutyric acid from xylose in *Escherichia coli* [J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 39–45.
- [38] MARTIN C H, DHAMANKAR H, TSENG H C, et al. A platform pathway for production of 3-hydroxyacids provides a biosynthetic route to 3-hydroxy- $\gamma$ -butyrolactone [J]. Nature Communications, 2013, 4: 1414.
- [39] KUMAR P, DESHMUKH A N, UPADYAY R K, et al. A simple and practical approach to enantiomerically pure (S)-3-hydroxy- $\gamma$ -butyrolactone: synthesis of (R)-4-cyano-3-hydroxybutyric acid ethyl ester [J]. Tetrahedron: Asym, 2005, 16: 2717–2721.
- [40] WANG J, SHEN X L, LIN Y H, et al. Investigation of the synergetic effect of xylose metabolic pathways on the production of glutaric acid [J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 7(1): 24–29.
- [41] WU Y F, SUN X L, LIN Y H, et al. Establishing a synergetic carbon utilization mechanism for non-catabolic use of glucose in microbial synthesis of trehalose [J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 1–8.
- [42] OHTAKE S, WANG Y J. Trehalose: current use and future applications [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100(6): 2020–2053.
- [43] WU Y F, WANG J, SHEN X L, et al. Investigating the strategies for microbial production of trehalose from lignocellulosic sugars [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(3): 785–790.

## Advances in the construction of new pathways of chemical compound metabolism and modification of microbial sugar metabolism network

CHENG Yao ZHAO QianJing WANG Jia SUN XinXiao SHEN XiaoLin\* YUAN QiPeng

(State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** In order to reduce harmful effects on the environment, sustainable development of the modern chemical industry requires an alternative to fossil fuels as the source of organic compounds. Metabolic engineering has become a promising alternative approach for synthesis of compounds originally derived from petroleum. Currently, a variety of compounds can be synthesized on an industrial scale by using both metabolic engineering and synthetic biology methods in microorganisms. However, some limitations still exist in metabolic engineering and synthetic biology approaches. In order to further the development of metabolic engineering and synthetic biology methods, our research group in Beijing University of Chemical Technology has developed many new methods for the production of a wide range of target compounds. Using these novel methods, our group has reported the biosynthesis of aromatic compounds, rearrangement of microbial glycometabolic networks and improvements in atom economy. Our work offers ways to address the drawbacks in current methods for the biosynthesis of products originally derived from petroleum using engineered microorganisms.

**Key words:** metabolic engineering; aromatic compounds; glycometabolic network; atomic economy

(责任编辑:汪 琴)