CSTR: 32114.14.j.cjb.241004
DOI: 10.13345/j.cjb.241004

May 25, 2025, 41(5): 1942-1958
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
©2025 Chin J Biotech, All rights reserved

·工业生物技术·

代谢工程改造大肠杆菌生产没食子酸

罗依凡[1]，胡贵鹏[2]，吴静[2]，宋伟[2]，魏婉清[3]，刘立明[1,3*]

1 安徽科技学院 食品工程学院，安徽 滁州 233100
2 江南大学 生命科学与健康工程学院，江苏 无锡 214122
3 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122

罗依凡，胡贵鹏，吴静，宋伟，魏婉清，刘立明. 代谢工程改造大肠杆菌生产没食子酸[J]. 生物工程学报，2025，41(5): 1942-1958.
LUO Yifan, HU Guipeng, WU Jing, SONG Wei, WEI Wanqing, LIU Liming. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of gallic acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 1942-1958.

摘　要：没食子酸是一种具有抗氧化等多种药用价值的天然植物酚类化合物，目前主要的生产方法是通过提取植物中单宁进行化学或酶水解方式制备，存在成本高和污染大的问题。基于微生物细胞工厂的绿色合成为没食子酸生产提供了有效替代途径，然而目前的产量仍难以达到工业化要求。为了利用廉价底物实现没食子酸的从头高效合成，本研究以一株高效合成 3-脱氢莽草酸的大肠杆菌为底盘，首先确定没食子酸最优合成路径的关键酶为3-脱氢莽草酸脱水酶(AroZ)及对羟基苯甲酸羟化酶(PobA)，且二者最优表达比例为 1:20。基于质粒拷贝数和启动子工程实现最优路径在底盘菌株体内的构建，并结合蛋白质工程改造获得限速酶突变体 $PobA^{M2/A45S/V47P}$，使得没食子酸摇瓶生产水平达到 3.6 g/L。最后，在 5 L 发酵罐进行菌株稳定性和发酵条件优化，没食子酸产量达到 26.7 g/L，糖酸转化率 0.15 g/g。本研究实现了以葡萄糖为底物从头合成没食子酸产量的突破，为强化没食子酸及相关植物酚酸的生物合成提供了重要参考。

关键词：没食子酸；大肠杆菌；启动子工程；蛋白质工程；合成生物学

资助项目：国家自然科学基金(22478158)；榆林中科洁净能源创新研究院能源革命科技专项(E411040705)
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22478158) and the Energy Revolution Science and Technology Program of Yulin Innovation Institute of Clean Energy (E411040705).
*Corresponding author. E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn
Received: 2024-12-27; Accepted: 2025-02-17; Published online: 2025-02-17

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of gallic acid

LUO Yifan[1], HU Guipeng[2], WU Jing[2], SONG Wei[2], WEI Wanqing[3], LIU Liming[1,3*]

1 School of Food Engineering, Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, Anhui, China
2 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China
3 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Gallic acid is a plant-derived phenolic compound with various medicinal values, including antioxidant properties. The primary method for producing gallic acid at present involves the chemical or enzymatic hydrolysis of tannins extracted from plants, which is associated with high costs and serious environmental pollution. Green synthesis based on microbial cell factories offers an effective alternative route for the production of gallic acid. However, the current yields of green synthesis are insufficient for industrial-scale requirements. Therefore, the development of a *de novo* synthesis strategy for gallic acid using low-cost substrates holds significant potential for industrial applications. In this study, an *Escherichia coli* strain capable of efficiently synthesizing 3-dehydroshikimic acid was used as the chassis organism. Initially, the key enzymes for the optimal synthesis pathway of gallic acid were identified as 3-dehydroshikimate dehydratase (AroZ) and 4-hydroxybenzoate hydroxylase (PobA), with an optimal expression ratio of 1:20. The optimal pathway was constructed within the chassis strain through plasmid copy number and promoter engineering. Protein engineering was further employed to obtain a mutant of the rate-limiting enzyme, $PobA^{M2/A45S/V47P}$, which enhanced the shake flask production level of gallic acid to 3.6 g/L. Finally, strain stability and fermentation condition optimization were conducted in a 5 L fermentor, resulting in a gallic acid yield of 26.7 g/L and a sugar-to-acid conversion rate of 0.15 g/g. This study achieves a breakthrough in the *de novo* synthesis of gallic acid from glucose, providing an important reference for enhancing the biological synthesis of gallic acid and related phenolic acids from plants.

Keywords: gallic acid; *Escherichia coli*; promoter engineering; protein engineering; synthetic biology

没食子酸是一种天然存在的植物酚类化合物，通常在蓝莓、苹果、茶叶等植物中发现，具有显著的抗氧化特性和多种药用价值[1-5]。例如，研究表明没食子酸能够恢复 9 个月大雄性小鼠肝脏、大脑和肾脏等重要器官的抗氧化酶活性[6-8]。此外，它还在阻止人类前列腺癌细胞在 G2/M 期的生长以及减少冠状动脉疾病和动脉血栓形成的风险方面展现出潜力[9-11]。由于传统方法(如单宁的化学或酶解水解)在原材料获取和加工成本上的限制，研究人员正在寻求更具成本效益的没食子酸生产替代方法，以满足全球每年约 8 000 t 的市场需求[12]。

基于微生物细胞工厂的生物合成技术为没食子酸的可持续生产提供了一条绿色发展途径。目前，没食子酸生物合成主要以葡萄糖或木质素等低廉物质为底物从头合成。以葡萄糖为底物首先通过磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)转化为葡萄糖-6-磷酸，在糖酵解途

径中，葡萄糖-6-磷酸经过果糖-6-磷酸、甘油醛-3-磷酸多步转化为磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)，同时，葡萄糖-6-磷酸经磷酸戊糖途径转化为赤藓糖-4-磷酸(erythrose 4-phosphate, E4P)。其次，PEP 和 E4P 在 *aroF*、*aroG*、*aroH* 等基因编码的酶作用下转化为 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸(3-deoxy-D-arabinoheptulosonate, DAHP)，然后 DAHP 通过 *aroB*、*aroD* 等基因编码的酶介导转化为重要前体物质 3-脱氢莽草酸(dehydroshikimic acid, DHS)，最后 DHS 转化为没食子酸的过程中涉及的催化或合成步骤又分为莽草酸脱氢酶催化 3-脱氢莽草酸直接转化[13]，以及 3-脱氢莽草酸先通过脱氢莽草酸脱水酶转化为原儿茶酸，再通过对羟基苯甲酸羟化酶转化这 2 种路径[14]。以木质素为底物首先需要碱性或碱催化下生成多种木质素降解产物，然后经过多种酶的羟基化、O-去甲基化以及芳基侧链氧化等共同作用转化为没食子酸[15]。

针对生物法合成没食子酸，目前开发的技术主要集中在挖掘新的途径酶、阻断没食子酸降解途径以及拓宽底物谱[16-17]。例如，研究人员在葡萄中发现了 2 种新的莽草酸脱氢酶被认为参与了没食子酸的合成[18]；此外，突变型对羟基苯甲酸羟化酶 $PobA^{Y385F/T294A}$ 被设计用于将对羟基苯甲酸直接转化为没食子酸，可以实现以 1 000 mg/L 对羟基苯甲酸为底物合成 1 150 mg/L 没食子酸，摩尔转化率达到 93%[19]，突变体 $PobA^{Y385F/T294A/V349A}$ 被设计用于将原儿茶酸转化为没食子酸[20]；近期，来源于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的途径酶被用于建立基于大肠杆菌的全细胞生物催化系统，成功将木质素衍生的阿魏酸和对香豆酸几乎 100%转化为没食子酸[14]。上述策略的开发使得全细胞催化合成没食子酸的研究取得了重要进展。然而，全细胞催化体系的原料价格仍然相对较高，目前的生物制造产业大多数还是以葡萄糖等廉价原料为底物。2000 年，Forst 团队以葡萄糖为底物从头合成没食子酸的产量达到 20 g/L[21]，之后除袁其朋团队报道发酵法生产没食子酸产量达 51 g/L 外，至今尚未见其他相关研究[20]。因此，迫切需要突破以葡萄糖为底物从头合成没食子酸的技术瓶颈，构建高效生产没食子酸的微生物细胞工厂。

本研究以实验室前期构建的一株高产 3-脱氢莽草酸的大肠杆菌为底盘细胞，首先基于无细胞体系鉴定了 3-脱氢莽草酸转化为没食子酸的最优路径以及路径酶的最优比例；其次，结合质粒拷贝优化启动子工程实现了体内路径的重构及表达比例优化；在此基础上，通过蛋白质工程进一步提高了限速酶的催化活性；最后在 5 L 发酵罐上进行菌株稳定性优化和发酵条件优化，实现了以葡萄糖为底物从头合成没食子酸产量的突破，以期为没食子酸的工业化生产提供有效参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物

本研究所使用的重组质粒、工程菌株及引物见表 1 和表 2。

1.1.2 主要仪器和试剂

PCR 扩增仪，赛默飞世尔科技有限公司；凝胶成像仪，Bio-Rad 公司；恒温培养箱，上海跃进医疗器械有限公司；紫外分光光度计、高效液相色谱仪，岛津企业管理(中国)有限公司；M-100 生物传感器，深圳市希尔曼科技有限公司；5 L 发酵罐，迪必尔生物工程(上海)有限公司。

2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus)高保真酶、质粒提取试剂盒、产物纯化试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；DNA marker 购自宝日医生物技术(北京)有限公司；细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成；其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Plasmids and strains	Relevant characteristics	Sources
Plasmids		
pET28a	f1 ori, P_{T7}, Kan^R	Laboratory storage
pACYCDuet-1	p15A ori, P_{T7}, Cm^R	Laboratory storage
pCDFDuet-1	CloDF13 ori, P_{T7}, Sm^R	Laboratory storage
pRSFDuet-1	RSF ori, P_{T7}, Kan^R	Laboratory storage
pET28a-*PobA*	pET28a harboring *Pae*PobA	This study
pET28a-*PobA*^{M2}	pET28a harboring *Pae*PobA^{M2}	This study
pET28a-*AroZ*	pET28a harboring *Ap*AroZ	This study
pPCA1	pCDFDuet-1 harboring *Ap*AroZ	This study
pPCA2	pACYCDuet-1 harboring *Ap*AroZ	This study
pGA1	pRSFDuet-1 harboring *Pae*PobA^{M2}	This study
pGA2	pRSFDuet-1 harboring *Pae*PobA$^{M2/A45S/V47P}$	This study
pPCA2-1	pACYCDuet-1, p15A ori, P_{J23108}, Cm^R, *Ap*AroZ	This study
pPCA2-2	pACYCDuet-1, p15A ori, P_{J23110}, Cm^R, *Ap*AroZ	This study
pPCA2-3	pACYCDuet-1, p15A ori, P_{J23115}, Cm^R, *Ap*AroZ	This study
pPCA2-4	pACYCDuet-1, p15A ori, P_{J23113}, Cm^R, *Ap*AroZ	This study
pPCA2-5	pACYCDuet-1, p15A ori, P_{J23103}, Cm^R, *Ap*AroZ	This study
pPCA2-6	pACYCDuet-1, p15A ori, P_{J23117}, Cm^R, *Ap*AroZ	This study
Strains		
DHS02	*Escherichia coli* TRP, Δ*aroK*, Δ*aroL*, Δ*ptsH*::*tktA*, Δ*poxB*::*aroF*^{fbr}, Δ*aroE*	Laboratory storage
GA1	DHS02 harboring pPCA1, pGA1	This study
GA1-1	DHS02 harboring pPCA2, pGA1	This study
GA2-1	DHS02 harboring pPCA2-1, pGA1	This study
GA2-2	DHS02 harboring pPCA2-2, pGA1	This study
GA2-3	DHS02 harboring pPCA2-3, pGA1	This study
GA2-4	DHS02 harboring pPCA2-4, pGA1	This study
GA2-5	DHS02 harboring pPCA2-5, pGA1	This study
GA2-6	DHS02 harboring pPCA2-6, pGA1	This study
GA3-1	DHS02 harboring pPCA2-5, pGA2	This study
GA3-2	DHS02 Δ*yeel*::*Ap*AroZ, harboring pGA2	This study

1.1.3 培养基

LB 培养基:酵母粉 5.00 g/L,蛋白胨 10.00 g/L,NaCl 10.00 g/L。

TB 培养基：酵母粉 24.00 g/L，胰蛋白胨 12.00 g/L，甘油 4.00 g/L，三水磷酸氢二钾 16.42 g/L，磷酸二氢钾 2.31 g/L。

发酵培养基：葡萄糖 10 g/L，硫酸镁 0.24 g/L，酵母粉 15 g/L，磷酸氢二钾 7.5 g/L，柠檬酸铁铵 0.3 g/L，一水柠檬酸 2.1 g/L，L-苯丙氨酸 0.7 g/L，L-酪氨酸 0.7 g/L，L-色氨酸 0.35 g/L，L-丝氨酸 0.04 g/L，莽草酸 0.04 g/L，对羟基苯甲酸 0.01 g/L，对氨基苯甲酸钾 0.01 g/L，2,3-二羟基苯甲酸 0.01 g/L，浓硫酸 1.2 mL/L，金属离子液 1 mL/L，氨水调整 pH 至 7.0。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5′→3′)	Application
F-*PobA*	ATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAAGACTCAAGTCGCCATCAT	Amplification
R-*PobA*	GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGCTCGATTTCCTCGTAGGGCA	Amplification
F-T294A	ATCGTGCCGCCCGCCGGCGCC	Mutation
R-T294A	TCCCTTGGCGCCGGCGGGCGG	Mutation
F-Y385F	ATCGCCGAGAACTTTGTCGGC	Mutation
R-Y385F	GGGCAGGCCGACAAAGTTCTC	Mutation
F-A45	GCATCCGCNNKGGCGTGCTGGAA	Mutation
R-A45	CAGCACGCCMNNGCGGATGCGGC	Mutation
F-V47	GCCGGCNNKCTGGAACAGGGTATG	Mutation
R-V47	TGTTCCAGMNNGCCGGCGCGG	Mutation
F-Y201	GAACTGATCNNKGCCAACCATCCG	Mutation
R-Y201	ATGGTTGGCMNNGATCAGTTCGTGGC	Mutation
F-L210	GGCTTCGCCNNKTGCAGCCAGCGT	Mutation
R-L210	GCTGCAMNNGGCGAAGCCGCGCGGAT	Mutation
F-A216	AGCGTTCGNNKACCCGCAGCCG	Mutation
R-A216	GCTGCGGGTMNNCGAACGCTGGC	Mutation
F-R220	ACCCGCAGCNNKTACTACGTGCAG	Mutation
R-R220	CACGTAGTAMNNGCTGCGGGTGGC	Mutation
AroZ-F	ACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCGATGAACATTCTGCGCCTGACC	Amplification
AroZ-R	CTTAAGCATTATGCGGCCGCAAGCTTGTTTCTTTACCAGACCGCTCGAG	Amplification
PJ23115-F	TAGCTCAGCCCTTGGTACAATGCTAGCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAG	Promoter
PJ23115-R	GTACCAAGGGCTGAGCTAGCTATAAAATTTCCTAATGCAGGAGTCG	Promoter
PJ23113-F	TAGCTCAGTCCTAGGGATTATGCTAGCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAG	Promoter
PJ23113-R	ATCCCTAGGACTGAGCTAGCCATCAGATTTCCTAATGCAGGAGTCG	Promoter
PJ23108-F	TAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAG	Promoter
PJ23108-R	ATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAGATTTCCTAATGCAGGAGTCG	Promoter
PJ23117-F	TAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAG	Promoter
PJ23117-R	ATCCCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAATTTCCTAATGCAGGAGTCG	Promoter
PJ23110-F	TAGCTCAGTCCTAGGTACAATGCTAGCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAG	Promoter
PJ23110-R	GTACCTAGGACTGAGCTAGCCGTAAAATTTCCTAATGCAGGAGTCG	Promoter
PJ23103-F	TAGCTCAGTCCTAGGGATTATGCTAGCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAG	Promoter
PJ23103-R	ATCCCTAGGACTGAGCTAGCTATCAGATTTCCTAATGCAGGAGTCG	Promoter

金属离子液：四水钼酸铵 0.37 g，七水硫酸锌 0.29 g，硼酸 2.47 g，五水硫酸铜 0.25 g，四水氯化锰 1.58 g，溶于硫酸定容至 100 mL。

LB、TB 培养基在 121 ℃条件下灭菌 20 min，发酵培养基中葡萄糖在 115 ℃条件下单独灭菌 15 min，其余成分在 121 ℃条件下灭菌 15 min。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

使用细菌基因组提取试剂盒，提取铜绿假单胞菌基因组，以基因组为模板，用引物对F-*PobA*/R-*PobA* 扩增得到 *PobA* 片段。以载体pET28a 为模板，使用 *Eco*R I、*Xho* I 酶切，得到线性载体。扩增产物及线性载体经琼脂糖凝胶回收后经同源重组法连接，转化至 *E. coli* BL21(DE3)中，获得重组质粒 pET28a-*PobA*。其余重组质粒的构建方法均与此相同。

1.2.2 工程菌株的构建

于 50 mL LB 液体培养基中接种 50 μL DHS02 甘油菌，37 ℃过夜培养得到种子培养液。在新鲜 50 mL LB 液体培养基中转接 1% (体积比)种子培养液，37 ℃培养至 OD_{600}=0.8，冰浴 30 min，5 000 r/min 离心 5 min，弃上清液。加入 20 mL 10% (体积比)无菌甘油振荡混匀后，5 000 r/min 离心 5 min，该步骤重复 1 次，得到电转感受态。将重组质粒加入感受态中混匀，进行电击转化导入 DHS02 内，于 37 ℃下培养 24 h，并对长出的单菌落进行验证，验证成功即得到新工程菌株。

1.2.3 体外酶活检测

将 *E. coli* BL21(DE3) pET28a-$PobA^{M2}$ 和 *E. coli* BL21(DE3) pET28a-*AroZ* 分别接种至 30 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中，37 ℃培养 8 h 得到种子培养液，再分别转接至含 50 mg/L 卡那霉素的新鲜 TB 培养基中，转接量 2% (体积比)，37 ℃培养至 OD_{600}=0.6，添加终浓度 0.4 mmol/L IPTG 诱导菌体蛋白表达，随后 16 ℃培养 16 h。收集菌体破碎后，利用重组蛋白的组氨酸标签与 Ni^{2+}结合，经重力 Ni 柱分离，得纯化蛋白。100 μL 反应体系内含有终浓度 1 mmol/L 原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)、1 mmol/L NADPH、10 μmol/L $PobA^{M2}$、100 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，30 ℃反应 10 min，使用酶标仪检测 340 nm 处 NADPH 的消耗量表示 $PobA^{M2}$ 活性。500 μL 反应体系中含有终浓度 5 mmol/L 3-脱氢莽草酸(3-DHS)、10 ng/μL AroZ、100 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，30 ℃反应 10 min，添加等体积 0.1 mol/L H_2SO_4终止反应，高效液相色谱法检测 PCA 的产量，使用 PCA 的生成量表示 AroZ 活性，每 min 生成 1 μmol 产物所需酶量定义为 1 U。

1.2.4 突变体的构建

以 pET28a-*PobA* 质粒为 DNA 模板，在 50 μL PCR 体系中添加 DNA 模板 30 ng，上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL，2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus)高保真酶 25 μL，体系内剩余体积用超纯水补齐。使用 PCR 仪进行 DNA 扩增，程序为：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 15 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 30 s/kb，34 个循环。扩增产物使用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 回收，得到的纯化产物进行消化处理，减少模板 DNA 造成的假阳性。消化产物转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中，冰浴 15 min，在 42 ℃条件下热激 90 s，随后立即冰浴 2 min，在超净台中向装有感受态细胞的 EP 管中加入 1 mL 无菌 LB 液体培养基，37 ℃培养 30 min 后取出 5 000 r/min 离心 4 min，保留约 100 μL 培养基将菌体重悬涂布于含有 50 mg/L 卡那霉素抗性的平板上，37 ℃培养 12 h，得到的单菌落经测序确定后即为构建的突变体。其余突变体方法构建均与此相同。

1.2.5 菌体培养

种子培养：取一环甘油菌，于平板三区划线，37 ℃培养箱中培养至单菌落生成。

一级种子液：使用接种环挑取单菌落接至装有 50 mL LB 液体培养基的 500 mL 摇瓶中，37 ℃、220 r/min，过夜培养。

二级种子液：一级种子液以 1% (体积比)转接量转接至装有新鲜 50 mL LB 液体培养基的 500 mL 摇瓶中，37 ℃、220 r/min，培养至 OD_{600}=4。

摇瓶发酵：5% (体积比)转接量转接二级种子液至装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 摇瓶

中，33 ℃、220 r/min 发酵 36 h。每 4 h 测定葡萄糖浓度进行补料，控制葡萄糖浓度 15 g/L 内。

5 L 罐分批补料发酵：发酵罐装液量为 2 L。以 5%总体积的接种量将种子液接种至发酵罐。将发酵初始条件控制为 pH 6.8，转速 300 r/min，通气 2 L/min，温度 33 ℃。当菌种开始产酸时流加氨水控制 pH 6.8。当初始葡萄糖即将耗尽时开始流加葡萄糖至发酵结束，控制葡萄糖浓度在 10 g/L 内。

1.2.6 分析方法

细胞密度测定方法：使用比浊法，取 0.1–1 mL 发酵液，纯水稀释 0–200 倍后振荡混匀，使用紫外分光光度计测定 600 nm 处吸光度，发酵液 *OD* 值=吸光度×稀释倍数。

葡萄糖测定方法：取 2 mL 发酵液，12 000 r/min，离心 5 min，取 200 μL 上清液，纯水定容至 5 mL，使用 M-100 生物传感器分析仪对稀释液进行测定。

产物测定：检测器为岛津 SPD-20A 紫外可见光检测器和 RID-20A 示差折光检测器，色谱柱为 Aminex HPX-87H 柱(Bio-Rad 公司)，流动相为 5 mmol/L H_2SO_4，流速 0.6 mL/min，柱温 60 ℃，波长 210 nm，进样量 10 μL，取 2 mL 发酵液，12 000 r/min 离心 5min，取 200 μL 上清液，纯水定容至 5 mL，使用稀释液进行测定。

2 结果与分析

2.1 没食子酸合成路径的设计与构建

基于实验室前期构建的一株高产 3-脱氢莽草酸的底盘菌株[22]，设计了 3 条转化 3-脱氢莽草酸合成没食子酸的途径(图 1A)：(1) 3-脱氢莽草酸在莽草酸脱氢酶(shikimate dehydrogenase, SDH)作用下 5-OH 脱氢生成中间体 3,5-脱氢莽草酸(3,5-dehydroshikimic acid, 3,5-DHS)，随后自发氧化为没食子酸；(2) 奎宁酸/莽草酸脱氢酶(YdiB)一步催化 3-脱氢莽草酸生成没食子酸；(3) 3-脱氢莽草酸在 3-脱氢莽草酸脱水酶(AroZ)作用下脱水形成原儿茶酸，随后经对羟基苯甲酸羟化酶(PobA)催化 C5 羟基化从而生成没食子酸。

为了测试途径 1 的可行性，以文献[13]报道的大肠杆菌 MG1655 编码 SDH 的 *aroE* 基因序列为模板，通过 BLAST 和基因垂钓等方式从 NCBI 数据库中筛选得到 11 种不同序列相似度(30%−100%)原核来源的莽草酸脱氢酶，分别来源于大肠杆菌(*Escherichia coli* AB2834，GenBank 登录号：ACO48489.1)、柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalo*，GenBank 登录号：BCU46938.1)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae* subsp.，GenBank 登录号：WP-230137249.1-4077)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*，GenBank 登录号：FO203501.1)、布拉特希氏菌(*Shimwellia blattae*，GenBank 登录号：WP_002445340.1)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*，GenBank 登录号：WP-031300344.1-4849)、成团泛菌属(*Pantoea agglomerans*，GenBank 登录号：WP_086906531.1)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*，GenBank 登录号：WP-053253624.1-2013)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*，GenBank 登录号：NP-248715.1.25)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*，GenBank 登录号：WP-016500332.1-3288)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*，GenBank 登录号：WP-000812072.1.4145)。将上述 11 种酶分别于 *E. coli* BL21(DE3)中过量表达，11 种酶在 BL21(DE3)中均表达良好(图 1B)，但以 3-脱氢莽草酸为底物进行体内及体外催化反应，通过液相色谱-质谱联用仪(liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS)并未检测到产物没食子酸的生成。为了测试路径 2 的可行性，将大肠杆菌本源编码奎宁酸/莽草酸脱氢酶的 *YdiB* 基因克隆在 pET28a 载体上，并在 *E. coli* BL21(DE3)菌株中进行重组表达、全细胞催化及体外验证。然而，以 3-脱氢莽草酸为底物进行 24 h 的全细胞催化反应，也并未检测到产物没食子酸的生成(表 3)。

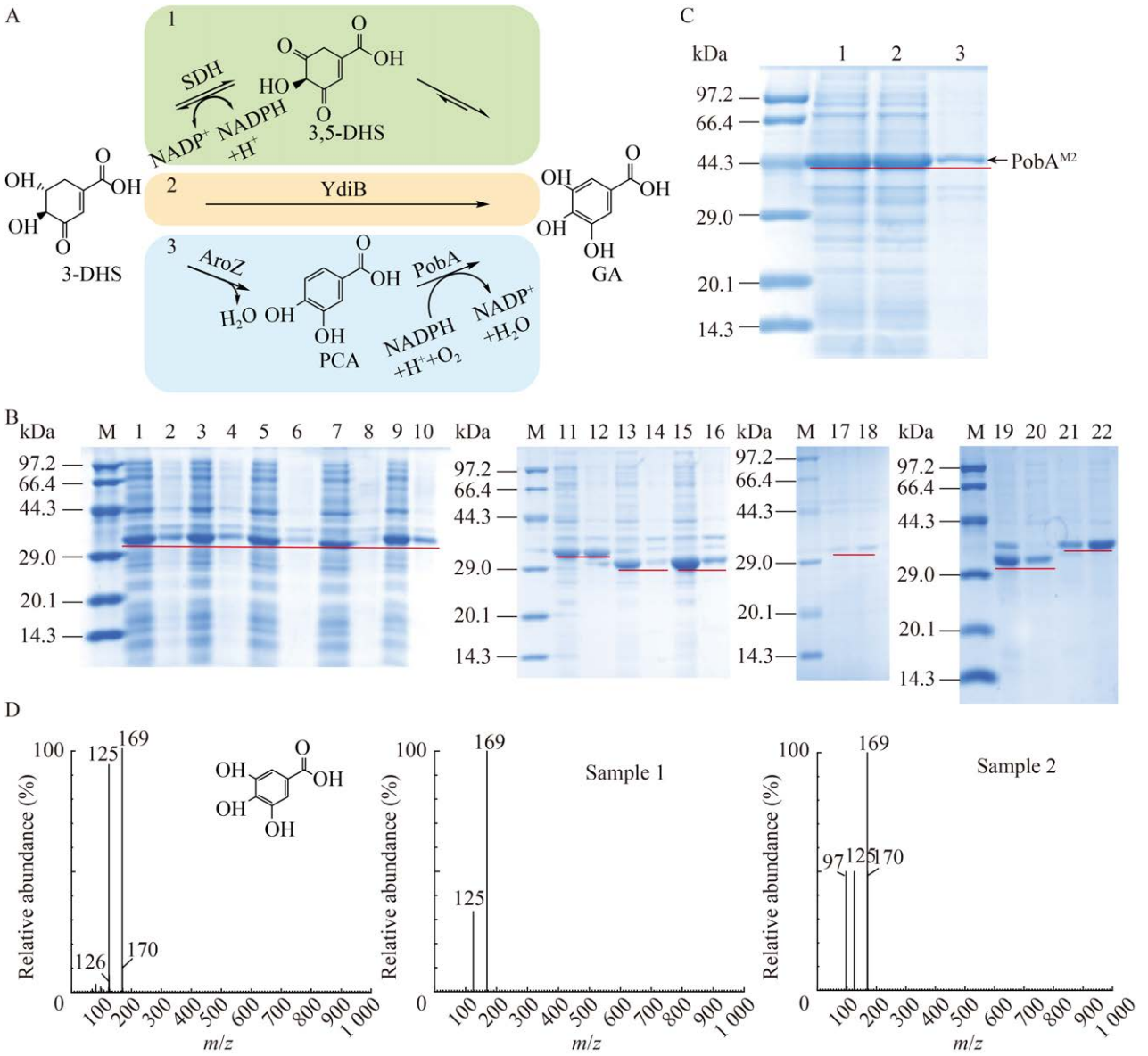

图 1　没食子酸合成路径的设计及验证　A：没食子酸合成步骤。3-DHS：3-脱氢莽草酸；SDH：莽草酸脱氢酶；3,5-DHS：3,5-脱氢莽草酸；*YdiB*：编码奎宁酸/莽草酸脱氢酶的基因；AroZ：脱氢莽草酸脱水酶；PCA：原儿茶酸；PobA：对羟基苯甲酸羟化酶；$NADP^+$：烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸；NADPH：还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸；GA：没食子酸。B：SDH 凝胶电泳结果。M：蛋白 Marker；泳道 1−2：*Pf*SDH 上清液、沉淀；泳道 3−4：*Bt*SDH 上清液、沉淀；泳道 5−6：*Ec*SDH 上清液、沉淀；泳道 7−8：*Sm*SDH 上清液、沉淀；泳道 9−10：*Kp*SDH 上清液、沉淀；泳道 11−12：*Ca*SDH 上清液、沉淀；泳道 13−14：*Pag*SDH 上清液、沉淀；泳道 15−16：*Sb*SDH 上清液、沉淀；泳道 17−18：*Pp*SDH 上清液、沉淀；泳道 19−20：*Bt*SDH 上清液、沉淀；泳道 21−22：*Ecl*SDH 上清液、沉淀。C：$PobA^{M2}$ 凝胶电泳结果。泳道 1：全细胞；泳道 2：上清液；泳道 3：沉淀。D：合成路径 3 的 LC-MS 验证结果。左图为没食子酸标准品；样品 1：1 mL 反应体系包含 5 g/L PCA、10 g/L $PobA^{M2}$、5 g/L 葡萄糖、1 mmol/L NADPH、0.2 mg/mL 葡萄糖脱氢酶(GDH)，30 ℃反应 24 h 样品；样品 2：1 mL 反应体系包含终浓度

1 g/L 3-DHS、1 mg/mL AroZ、1 mg/mL PobA^{M2}、5 g/L 葡萄糖、1 mmol/L NADPH、0.2 mg/mL 葡萄糖脱氢酶(GDH)，30 ℃反应 24 h 样品。

Figure 1 Design and validation of the gallic acid biosynthetic pathway. A: Schematic representation of the gallic acid biosynthetic pathway. 3-DHS: 3-dehydroshikimic acid; SDH: Shikimate dehydrogenase; 3,5-DHS: 3,5-dehydroshikimic acid; *YdiB*: Gene encoding quinate/shikimate dehydrogenase; AroZ: 3-dehydroshikimate dehydratase; PCA: Protocatechuic acid; PobA: 4-hydroxybenzoate hydroxylase; NADP$^+$: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; GA: Gallic acid. B: Gel electrophoresis analysis of SDH expression. M: Protein molecular weight marker; Lane 1−2: *Pf*SDH supernatant and pellet; Lane 3−4: *Bt*SDH supernatant and pellet; Lane 5−6: *Ec*SDH supernatant and pellet; Lane 7−8: *Sm*SDH supernatant and pellet; Lane 9−10: *Kp*SDH supernatant and pellet; Lane 11−12: *Ca*SDH supernatant and pellet; Lane 13−14: *Pag*SDH supernatant and pellet; Lane 15−16: *Sb*SDH supernatant and pellet; Lane 17−18: *Pp*SDH supernatant and pellet; Lane 19−20: *Bt*SDH supernatant and pellet; Lane 21−22: *Ecl*SDH supernatant and pellet. C: Gel electrophoresis analysis of PobA^{M2} expression. Lane 1: Whole cells; Lane 2: Supernatant; Lane 3: Pellet. D: LC-MS validation results of synthetic pathway 3. Left panel: Gallic acid standard; Sample 1: 1 mL reaction system containing 5 g/L PCA, 10 g/L PobA^{M2}, 5 g/L glucose, 1 mmol/L NADPH, and 0.2 mg/mL glucose dehydrogenase (GDH), incubated at 30 ℃ for 24 h; Sample 2: 1 mL reaction system containing 1 g/L DHS, 1 mg/mL AroZ, 1 mg/mL PobA^{M2}, 5 g/L glucose, 1 mmol/L NADPH, and 0.2 mg/mL GDH, incubated at 30 ℃ for 24 h.

表 3 没食子酸合成路径验证结果

Table 3 Validation results of the gallic acid synthesis pathway

Pathway	Enzyme	Substrate	Titer of GA (g/L)	Conversion (%)
1	*Ec*SDH	3-DHS	N/A	N/A
	*Ca*SDH	3-DHS	N/A	N/A
	*Ecl*SDH	3-DHS	N/A	N/A
	*Kp*SDH	3-DHS	N/A	N/A
	*Sb*SDH	3-DHS	N/A	N/A
	*Sm*SDH	3-DHS	N/A	N/A
	*Pag*SDH	3-DHS	N/A	N/A
	*Pf*SDH	3-DHS	N/A	N/A
	*Pae*SDH	3-DHS	N/A	N/A
	*Pp*SDH	3-DHS	N/A	N/A
	*Bt*SDH	3-DHS	N/A	N/A
2	*Ec*YdiB	3-DHS	N/A	N/A
3	*Pae*PobA^{M2}	PCA	0.47±0.01	8.47±0.15
	*Ap*AroZ、*Pae*PobA^{M2}	3-DHS	0.08±0.00	3.22±0.09

3-DHS: 3-dehydroshikimic acid; PCA: Protocatechuic acid; N/A: Not available.

最后，尝试对路径 3 进行验证。关于原儿茶酸转化为没食子酸的反应，目前只有来源于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的对羟基苯甲酸羟化酶突变体 PobA$^{T294A/Y385F}$ (PobA^{M2})具有较好的催化活性。因此，首先对 PobA^{M2} 进行表达分析和酶活测定，结果显示该酶在 *E. coli* BL21(DE3)中可溶性表达良好，比酶活为 1.91 U/mg (图 1C、2D)。随后，将表达 PobA^{M2} 的大肠杆菌细胞以 10 g/L 的浓度加入含有 5 g/L 原儿茶酸的反应体系中，反应 24 h 后经质谱和高效液相色谱证实了没食子酸的生成，没食子酸的积累量为(0.47±0.01) g/L，转化率为(8.47±0.15)% (图 1D 和表 3)。关于 3-脱氢莽草酸转化为原儿茶酸的反应步骤，实验室前期研究发现来源于皮氏不动杆菌(*Acinetobacter pittii*) PHEA-2 的 3-脱氢莽草酸脱水酶(*Ap*AroZ)具有很高的活性[23]；因此，选择 *Ap*AroZ 与 PobA$^{T294A/Y385F}$ 构建级联路径，以验证 3-脱氢莽草酸转化为没食子酸的可行性。在 *E. coli* BL21(DE3)中过量表达这 2 个酶并进行纯化，然后按 *Ap*AroZ:PobA^{M2}=1:1 (质量比)加入含有 1 g/L 3-脱氢莽草酸的反应体系中，反应 24 h 得到 0.08 g/L 的没食子酸(表 3)，表明了路径 3 可以实现没食子酸的生物合成，因此选择该路径进行后续实验。

2.2 没食子酸的从头生物合成

为了实现没食子酸的从头合成，以实验室保藏的一株高产 3-脱氢莽草酸的大肠杆菌

DHS02 为底盘[24]，引入上述验证成功的路径 3。首先设计双酶双质粒表达策略，分别使用质粒 pCDFDuet-1 和 pRSFDuet-1 对 AroZ 和 PobA^{M2} 进行过量表达，获得工程菌 GA1。对工程菌 DHS02 和 GA1 进行摇瓶发酵，结果显示，菌株 GA1 的没食子酸产量仅比菌株 DHS02 提高 10% (图 2A−2C)，表明引入的外源没食子酸合成路径效率不高，发酵液中所检测到的没食子酸主要还是来源于 3-脱氢莽草酸的自发氧化[25]。

基于课题组前期对 AroZ 的研究，推测 AroZ 与 PobA^{M2} 的比酶活差距较大是影响路径传输效率的重要原因之一。为了验证该推测，首先对 AroZ 的比酶活进行测定，结果显示其比酶活为 37.74 U/mg (图 2D)，大约是 PobA^{M2} (1.91 U/mg)的 20 倍。随后，在无细胞转化体系中对这 2 个酶的投放比例进行调节，在投加等体积酶液情况下，AroZ 在体系中的终浓度固定为 0.1 mg/mL，PobA^{M2} 终浓度分别为 1.0、1.5、

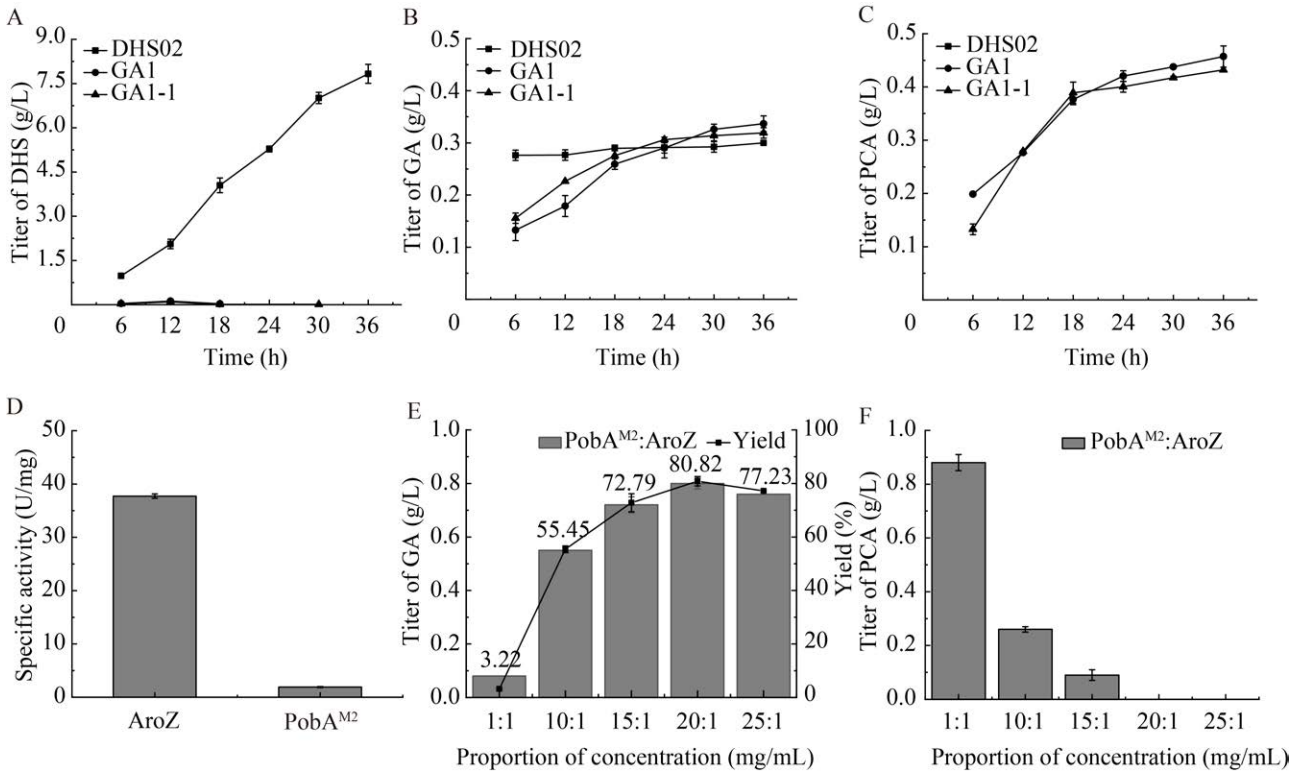

图 2　没食子酸的从头合成及酶量优化　A：工程菌 DHS02、GA1 与 GA1-1 33 ℃摇瓶发酵 36 h 3-脱氢莽草酸积累量。B：工程菌 DHS02、GA1 与 GA1-1 33 ℃摇瓶发酵 36 h 没食子酸产量。C：工程菌 DHS02、GA1 与 GA1-1 33 ℃摇瓶发酵 36 h 原儿茶酸积累量。D：AroZ 与 PobA^{M2} 酶活。E：双酶比例优化没食子酸产量。F：双酶比例优化原儿茶酸积累量。

Figure 2　*De novo* synthesis of gallic acid and optimization of enzyme dosage. A: DHS accumulation in engineered strains DHS02, GA1, and GA1-1 after 36 h of shake flask fermentation at 33 ℃. B: Gallic acid (GA) production by engineered strains DHS02, GA1, and GA1-1 after 36 h of shake flask fermentation at 33 ℃. C: PCA accumulation in engineered strains DHS02, GA1, and GA1-1 after 36 h of shake flask fermentation at 33 ℃. D: Enzymatic activity analysis of AroZ and PobA^{M2}. E: Optimization of dual-enzyme ratio for gallic acid production. F: Optimization of dual-enzyme ratio for PCA accumulation.

2.0、2.5 mg/mL，即 $PobA^{M2}$ 与 AroZ 的投放比例分别为 10:1、15:1、20:1、25:1。结果显示，当 $PobA^{M2}$ 与 AroZ 的投放比例为 10:1 时，没食子酸的产量显著高于双酶比例为 1:1 时，级联反应的转化率达到 55.45%；此外，当 $PobA^{M2}$ 与 AroZ 的投放比例进一步提高时，没食子酸的产量也随之逐步上升；当投放比例达到 20:1 时，转化率达到最高的 80.82% (图 2E)。分析中间产物原儿茶酸的产量可以发现相应的支撑数据，即当 $PobA^{M2}$ 与 AroZ 的投放比例小于 20:1 时，中间产物原儿茶酸存在积累，而双酶投放比大于 20:1 时无中间产物积累(图 2F)，表明此时两步反应的速率相当，3-脱氢莽草酸可以高效地转化为没食子酸。

根据上述实验结果，计划对 AroZ 与 $PobA^{M2}$ 的表达策略进行精细调控，以提高外源路径 3 在大肠杆菌体内的合成效率。首先，使用高拷贝质粒 pRSFDuet-1 表达 $PobA^{M2}$，分别使用中拷贝质粒 pCDFDuet-1 和低拷贝质粒 pACYCDuet-1 表达 AroZ，分别构建了菌株 GA1 和 GA1-1。摇瓶发酵结果显示，经质粒拷贝数优化后工程菌株的没食子酸产量并没有提高，且中间产物原儿茶酸与对照组 GA1 也无显著性差异(图 2A–2C)。这些结果表明 AroZ 在体内的活性还需要进一步进行弱化，从而使其活性能够更好地匹配 $PobA^{M2}$。随后，在表达 AroZ 的低拷贝质粒上进行启动子的替换，筛选了 6 个不同强度的启动子，分别是 P_{J23108}、P_{J23110}、P_{J23115}、P_{J23113}、P_{J23103}、P_{J23117}。与 pACYCDuet-1 质粒上的原始启动子相比，这 6 个启动子的强度分别约是其强度的 20%、10%、5%、1%、0.5%、0.1% (图 3A)。将 6 个不同启动子强度的 pACYCDuet-1 质粒(表达 AroZ)与 pGA1 分别构建工程菌株 GA2-1、GA2-2、GA2-3、GA2-4、GA2-5、GA2-6 (表 1)。对 6 株工程菌株进行摇瓶发酵，可以观察到当 AroZ 的启动子强度下调至 1%以下时，没食子酸的产量开始提升，其中下调至 0.5%时没食子酸的产量在实验组中最高，达到 2.5 g/L，是 GA1 的 5.9 倍(图 3B、3C)。然而，启动子强度进一步降低至 0.1%的工程菌株 GA2-6 并没有积累更高产量的没食子酸，表明仅通过优化 AroZ 与 $PobA^{M2}$ 的表达比例已无法进一步提高目标产品的合成效率，需要对 $PobA^{M2}$ 本身的活性加以强化。

2.3 蛋白质工程增强对羟基苯甲酸羟化酶催化活性

在进行 $PobA^{M2}$ 与 AroZ 体外比例优化时，发现中间产物原儿茶酸的积累会显著影响没食子酸的生成，因此进一步测定了原儿茶酸对 $PobA^{M2}$ 的底物抑制动力学(图 4A)。结果表明，当原儿茶酸浓度超过 204 μmol/L 时，$PobA^{M2}$ 的催化活性便会受到抑制，即 $PobA^{M2}$ 存在明显的底物抑制现象。为了改善 $PobA^{M2}$ 的催化活性，计划对 $PobA^{M2}$ 底物结合口袋 4 Å 范围内的 13 个氨基酸残基使用 NNK 简并密码子进行单点饱和突变(图 4B)，理论上可以产生 247 个突变体。

在进行定点饱和突变实验前，首先对高通量筛选方法进行优化。由于没食子酸在硫酸根自由基的氧化作用下生成了苯氧自由基，后者可以发生重排反应生成联苯或醌类化合物[26]，推测没食子酸在氧化过程中可能产生了鞣花酸，其与 Fe^{3+} 等金属离子形成络合物，在 640 nm 处存在吸收峰[27]。前期研究中发现原儿茶酸对 PobA 存在抑制，所以对原儿茶酸浓度进行了优化。发现当底物原儿茶酸浓度为 0.5 g/L 时，生成的产物没食子酸颜色反应可以明显被肉眼观察到(图 4C)。确定高通量筛选方法后，首先使用 96 孔板对突变体进行初筛。通过检测 640 nm 处的吸光值，共筛选到 11 个有益突变体，分别为 Y201F、A45S/E/Y、L210Q/T、R220D/W/I、V47M/P (图 4D)。随后，使用 24 孔板对上述有

益突变体进行复筛，最终得到 3 个有益突变体，突变位点分别为 A45S、R220D 及 V47P (图 4E)。随后，对 A45S、R220D 和 V47P 这 3 个突变位点进行组合突变，结果显示，只有 A45S 与 V47P 的叠加突变可以获得更好的效果(图 4F)。

最后，将 PobA 四突变体 $PobA^{M2/A45S/V47P}$ 替换上述最优菌株 GA2-5 中的 $PobA^{M2}$，得到工程菌株 GA3-1。摇瓶发酵结果显示，菌株 GA3-1 的没食子酸积累量可以达到 3.6 g/L，相比于菌株 GA2-5 提高了 44% (图 4G)。

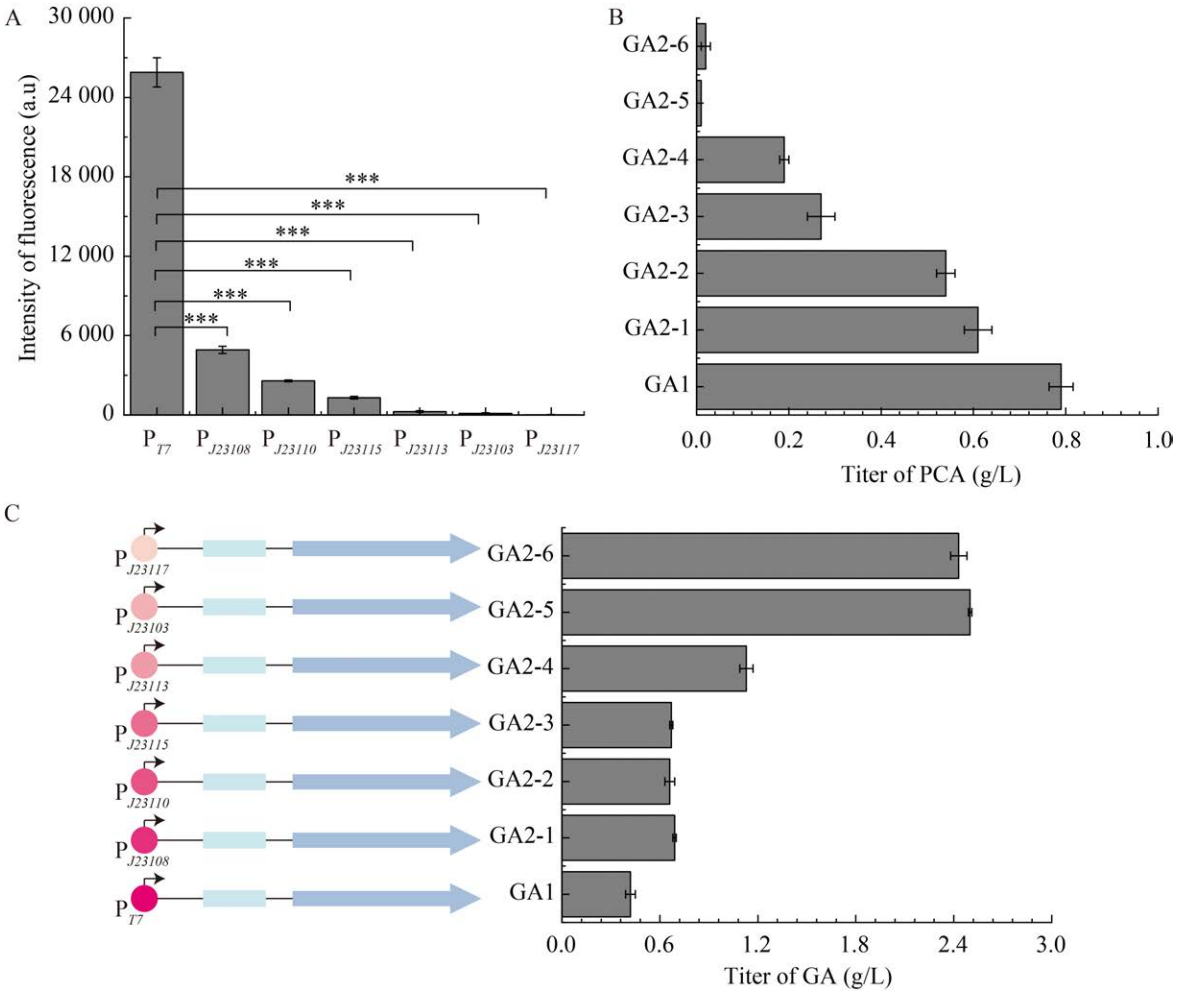

图 3　启动子优化结果　A：不同强度启动子表征结果。设置 6 组平行实验，***代表 $P<0.001$。B：33 ℃摇瓶发酵不同强度启动子工程菌 PCA 积累量。设置 3 组平行实验。C：33 ℃摇瓶发酵不同强度启动子工程菌 GA 积累量。设置 3 组平行实验。

Figure 3　Results of promoter optimization. A: Characterization of promoters with varying strengths. Six independent replicates were performed, and statistical significance (***) indicates $P<0.001$. B: PCA accumulation in engineered strains with different promoter strengths after shake flask fermentation at 33 ℃. Three independent replicates were conducted. C: Gallic acid (GA) accumulation in engineered strains with different promoter strengths after shake flask fermentation at 33 ℃. Three independent replicates were conducted.

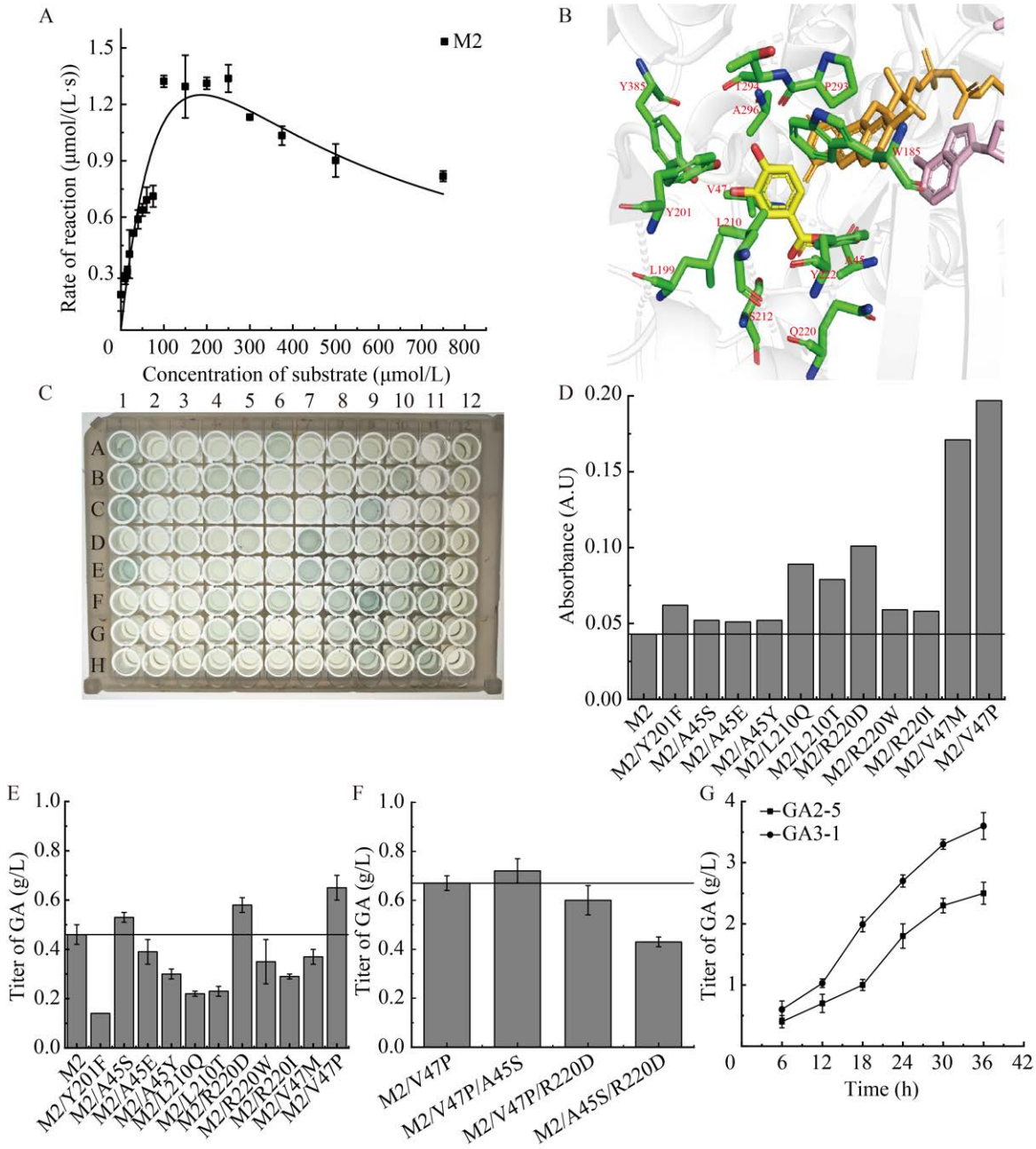

图 4　PobA^{M2} 蛋白质工程改造结果　A：PobA^{M2} 底物抑制曲线。设置 3 组平行实验。B：底物 PCA 4 Å 范围氨基酸残基。黄色为底物原儿茶酸，橙色为黄素腺嘌呤二核苷酸 FAD，浅紫色为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 NADPH。C：突变体初筛颜色反应。H11 为模板 PobA^{M2}，H12 为空白对照，颜色越深代表没食子酸含量越多。D：突变体初筛结果。E：突变体复筛结果。设置 3 组平行实验。F：组合突变体筛选结果。设置 3 组平行实验。G：33 ℃ GA2-5 与 GA3-1 摇瓶发酵结果。设置 3 组平行实验。

Figure 4　Protein engineering results of PobA^{M2} A: Substrate inhibition curve of PobA^{M2}. Three independent replicates were conducted. B: Amino acid residues within 4 Å of substrate PCA. Yellow: Protocatechuic acid (PCA); Orange: Flavin adenine dinucleotide (FAD); Light purple: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). C: Color-based preliminary screening of mutant strains. H11: Template PobA^{M2}; H12: Blank control. A darker color indicates a higher concentration of gallic acid. D: Initial screening results of PobA^{M2} mutants. E: Secondary screening results of mutants. Three independent replicates were conducted. F: Screening results of combined mutants. Three independent replicates were conducted. G: Shake flask fermentation results of strains GA2-5 and GA3-1 at 33 ℃. Three independent replicates were conducted.

2.4 分批发酵及条件优化

在摇瓶水平得到最优工程菌株 GA3-1 后，在 5 L 发酵罐对其进行放大验证。GA3-1 在 32 h 的发酵时间内积累没食子酸 12.4 g/L，对葡萄糖的转化率为 0.08 g/g (图 5A)。考虑到菌株 GA3-1 的细胞生长相较于出发菌株 DHS02 有较大程度的降低，推测是由于多质粒表达系统造成的负荷(图 5A、5B)。因此，将 *AroZ* 基因的表达框整合到菌株 GA3-1 的染色体上，从而得到菌株 GA3-2。利用 5 L 发酵罐对菌株 GA3-2 进行分批发酵，菌株 GA3-2 的最大 OD_{600} 比菌株 GA3-1 提升了 41%，没食子酸的最高产量可以达到 21.3 g/L，糖酸转化率为 0.13 g/g (图 5C)。最后，对补糖策略进行精细调控优化，维持葡萄糖的浓度在 2 g/L 以下。结果显示，副产物乙酸的最大积累浓度从 12 g/L 降低至 5 g/L，同时没食子酸的积累量可以进一步提高至 26.7 g/L，糖酸转化率提高至 0.15 g/g (图 5D)。

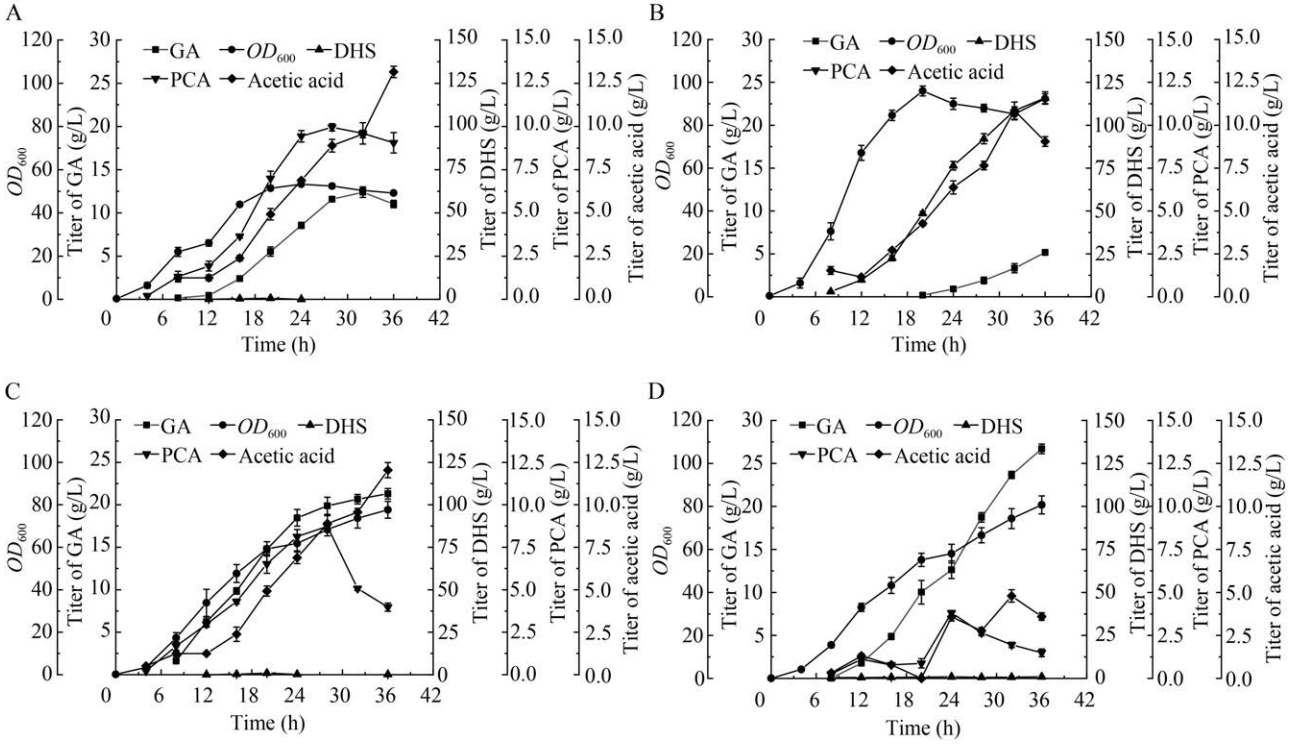

图 5 分批发酵及条件优化结果 A：GA3-1 的 5 L 发酵罐 33 ℃发酵 36 h 结果。每次平行取样 3 组。B：DHS02 的 5 L 发酵罐 33 ℃发酵 36 h 结果。每次平行取样 3 组。C：GA3-2 的 5 L 发酵罐 33 ℃分批补料发酵 36 h 结果。每次平行取样 3 组。D：GA3-2 优化补糖 5 L 发酵罐 33 ℃分批补料发酵 36 h 结果。每次平行取样 3 组。

Figure 5 Results of batch fermentation and condition optimization A: Fermentation profile of strain GA3-1 in a 5 L bioreactor at 33 ℃ for 36 h. Three independent replicates were sampled at each time point. B: Fermentation profile of strain DHS02 in a 5 L bioreactor at 33 ℃ for 36 h. Three independent replicates were sampled at each time point. C: Fed-batch fermentation profile of strain GA3-2 in a 5 L bioreactor at 33 ºC for 36 h. Three independent replicates were sampled at each time point. D: Fed-batch fermentation profile of strain GA3-2 with optimized glucose feeding in a 5 L bioreactor at 33 ℃ for 36 h. Three independent replicates were sampled at each time point.

3 讨论与结论

以葡萄糖为底物合成没食子酸为工业化生产没食子酸提供了更经济的技术路线。本研究以一株高效合成 3-脱氢莽草酸的菌株为底盘，通过引入关键酶 3-脱氢莽草酸脱水酶(AroZ)和对羟基苯甲酸羟化酶(PobA)实现了没食子酸的从头合成。基于无细胞体系鉴定了合成途径中 AroZ 和 PobA 的最优表达比例，并以此为指导完成了没食子酸体内合成途径的重构。进一步通过蛋白质工程改造限速酶 PobA 以及发酵条件优化，使得以葡萄糖为底物发酵生产没食子酸的产量达到文献报道的领先水平。

3-脱氢莽草酸是微生物合成芳香族化学品的重要节点化合物，本研究证实了在高产 3-脱氢莽草酸的底盘中移植延伸路径是高效合成相关衍生物的有效方法。有文献报道莽草酸脱氢酶可以催化 3-脱氢莽草酸转化为没食子酸[13,28]。然而，本研究发现，不论是 *aroE* 还是 *YdiB* 基因编码的莽草酸脱氢酶，使用纯化后的蛋白催化反应均未检测到没食子酸的生成。这些结果表明，在高产 3-脱氢莽草酸的发酵液中检测到的少量没食子酸，其可能主要来源于磷酸盐促进的 3-脱氢莽草酸自发氧化过程[29]，或者是莽草酸脱氢酶与其他未表征蛋白协同工作产生的催化作用。本研究经过纯酶和全细胞催化实验验证了由 AroZ 和 PobA 组成的级联路径可以高效转化 3-脱氢莽草酸合成没食子酸。与 2000 年 Frost 课题组的研究相比[21]，本研究中的方法具备催化性能更为优越的 AroZ 和 PobA 蛋白，并且基于纯酶实验表征了 AroZ 与 PobA 的最优比例；基于启动子和质粒拷贝数优化，实现了体内路径酶表达比例的优化重构，并最终在发酵罐水平使没食子酸的产量达到 26.7 g/L。本研究所采用的系列合成生物学技术可以用于其他高价值化合物的合成，尤其是以 3-脱氢莽草酸为代谢节点的化合物，如儿茶酚[21,30]、粘康酸[31]、香兰素[32]等。

由于芳香族化合物在结构上的相似性，很多酶可以分别催化不同底物生成相应的产品，如 HpaBC 可以催化酪醇生成羟基酪醇[33]，也可以催化酪氨酸生成左旋多巴[34]，还可以催化对香豆酸生成咖啡酸[35]。由于目前暂未发现以原儿茶酸为天然底物并能够催化转化为没食子酸的天然酶，所以研究者们以能够催化原儿茶酸类似物对羟基苯甲酸的对羟基苯甲酸羟化酶作为研究对象，通过蛋白质工程改造获取 PobA 突变体，实现将原儿茶酸催化转化为没食子酸。2000 年，Frost 团队首次利用 PobA 的单突变体($PobA^{Y385F}$)催化没食子酸的合成，成功拓展了该酶的底物谱。然而，随后十几年里，未见文献报道关于 PobA 进一步改造的研究。2017 年，Chen 等[19]基于 $PobA^{Y385F}$ 结构的理性改造，获得了 $PobA^{Y385F/T294A}$，相较于之前的 $PobA^{Y385F}$ 催化常数 k_{cat} 提升近 4 倍。Moriwaki 等[36]将多个单点突变和双点突变引入野生型 PobA 并观察其活性，得到了一个 $PobA^{Y385F/L199V}$ 双突变体，活性比 $PobA^{Y385F}$ 提高 4.3 倍。Maxel 等[37]使用 NNK 简并密码子与菌体生长偶联进行突变筛选，得到最佳突变体 DA015 ($PobA^{L199R/T294C/Y385M}$)，k_{cat}/K_m 比野生型提高了 7.9 倍。近期，Chen 等改造该酶得到了一个三突变体($PobA^{Y385F/T294A/V349A}$)，具有一定的提升效果[38]，但该酶在合成没食子酸的方面仍有较大潜力。本研究首次系统鉴定了原儿茶酸对 PobA 造成的显著底物抑制，基于对这一现象的分析，对底物结合口袋进行了靶向改造，并成功获得了催化性能更为优异的突变体。该酶的成功改造也为其他具有相似问题的蛋白提供参考，如：细胞色素 P450 酶在催化三唑仑 1′-羟基化反应中，高三唑仑浓度会降低 1′-羟基三唑仑的形成速率，严重影响催化效率，存在显著底物抑制现象[39]。

尽管本研究提升了没食子酸从头合成的产量，但仍需进一步优化才能满足工业化的要求，未来的研究方向可以侧重于以下几个方面：(1)探索更高效的没食子酸生物合成酶，有文献报

道称在烟草中表达胡桃来源的莽草酸脱氢酶，可以使没食子酸的积累量增加 500%[13]；(2) 通过适应性进化和没食子酸生物传感器筛选出没食子酸耐受性更强的菌株[40]；(3) 利用组学数据挖掘关键基因，例如通过代谢组学分析负责转运非特异性溶质的外膜蛋白 OmpF 和 OmpC 可能与没食子酸吸收相关，下调这 2 个蛋白的表达水平有望减少没食子酸的胞内吸收[41]。

作者贡献声明

罗依凡：方案设计、实验操作、初稿写作；胡贵鹏、吴静：数据管理、方案设计、经费支持、稿件润色修改；宋伟、魏婉清：数据管理、实验操作、提供材料；刘立明：监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

[1] ZHAI CZ, WU KG, CHAI XH, DUAN XJ, ZHANG W, LIN RH. Study on antioxidant effect of natural antioxidants on sunflower seed oil[J]. Science & Technology of Food Industry, 2010(3): 148-150.

[2] ZHANG GG, ZHENG CM, HUANG BQ, FEI P. Preparation of acylated pectin with Gallic acid through enzymatic method and their emulsifying properties, antioxidation activities and antibacterial activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 198-204.

[3] 马存强，周斌星，马冰淞，黎星辉，陈暄. 茶叶微生物发酵过程中没食子酸代谢研究进展[J]. 中国食品学报, 2024, 24(7): 450-459.
MA CQ, ZHOU BX, MA BS, LI XH, CHEN X. Research advances on gallic acid metabolism during tea-leaves microbial fermentation[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(7): 450-459 (in Chinese).

[4] SHABANI S, RABIEI Z, AMINI-KHOEI H. Exploring the multifaceted neuroprotective actions of gallic acid: a review[J]. International Journal of Food Properties, 2020, 23(1): 736-752.

[5] BADEA M, Di MODUGNO F, FLOROIAN L, TIT DM, RESTANI P, BUNGAU S, IOVAN C, BADEA GE, ALEYA L. Electrochemical strategies for gallic acid detection: potential for application in clinical, food or environmental analyses[J]. Science of the Total Environment, 2019, 672: 129-140.

[6] SRISET Y, NAKORN SN, CHITSAITARN S, DECHSRI K, CHATUPHONPRASERT W, JARUKAMJORN K. Bergenin exhibits a nephroprotective effect by improvement of the antioxidant system in xenobiotic-induced oxidative stress in ICR mice[J]. International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research, 2020, 10(3): 13-21.

[7] OLATOYE T, ADEBAYO JO. Effects of Gallic acid on antioxidant defense system in mice with benzene-induced myelotoxicity[J]. bioRxiv, 2024.

[8] LI L, NG TB, GAO W, LI W, FU M, NIU SM, ZHAO L, CHEN RR, LIU F. Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice[J]. Life Sciences, 2005, 77(2): 230-240.

[9] CHEN HM, WU YC, CHIA YC, CHANG FR, HSU HK, HSIEH YC, CHEN CC, YUAN SS. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells[J]. Cancer Letters, 2009, 286(2): 161-171.

[10] HE YH, WANG J, YAN W, HUANG N. Gallic acid and gallic acid-loaded coating involved in selective regulation of platelet, endothelial and smooth muscle cell fate[J]. RSC Advances, 2014, 4(1): 212-221.

[11] DAS A, AHMAD SHIEKH P, KUMAR A. A coaxially structured trilayered gallic acid-based antioxidant vascular graft for treating coronary artery disease[J]. European Polymer Journal, 2021, 143: 110203.

[12] DHIMAN S, MUKHERJEE G, SINGH AK. Recent trends and advancements in microbial tannase-catalyzed biotransformation of tannins: a review[J]. International Microbiology, 2018, 21(4): 175-195.

[13] MUIR RM, IBÁÑEZ AM, URATSU SL, INGHAM ES, LESLIE CA, McGRANAHAN GH, BATRA N, GOYAL S, JOSEPH J, JEMMIS ED, DANDEKAR AM. Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*)[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(6): 555-565.

[14] FU BX, XIAO GZ, ZHANG Y, YUAN JF. One-pot bioconversion of lignin-derived substrates into gallic acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(38): 11336-11341.

[15] CAI CG, XU ZX, ZHOU HR, CHEN ST, JIN MJ. Valorization of lignin components into gallate by integrated biological hydroxylation, O-demethylation, and aryl side-chain oxidation[J]. Science Advances, 2021, 7(36): eabg4585.

[16] DIAS FMS, PANTOJA RK, GOMEZ JGC, SILVA LF. From degrader to producer: reversing the gallic acid metabolism of *Pseudomonas putida* KT2440[J]. International Microbiology, 2023, 26(2): 243-255.

[17] ANDRADE PML, BAPTISTA L, BRITTO JS, UETENABARO APT, COSTA AMD. Co-production of tannase and gallic acid by a novel *Penicillium rolfsii* (CCMB 714)[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2018, 48(8): 700-706.

[18] BONTPART T, MARLIN T, VIALET S, GUIRAUD JL, PINASSEAU L, MEUDEC E, SOMMERER N, CHEYNIER V, TERRIER N. Two shikimate dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine[J]. Journal of

Experimental Botany, 2016, 67(11): 3537-3550.
[19] CHEN ZY, SHEN XL, WANG J, WANG J, YUAN QP, YAN YJ. 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.
[20] GUO J, REN X, LU LY, AN N, LI SW, GENG MJ, LI G, SHEN XL, SUN XX, WANG J, YUAN QP. Microbial synthesis of gallic acid and its glucoside β-glucogallin[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2024, 121(11): 3527-3536.
[21] KAMBOURAKIS S, DRATHS KM, FROST JW. 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.
[22] 刘立明, 王明, 高聪, 刘佳, 陈修来, 宋伟, 魏婉清, 吴静. 一种重组大肠杆菌及其构建方法与其在生产 3-脱氢莽草酸中的应用: CN116426455A[P]. 2023-07-14.
LIU LM, WANG M, GAO C, LIU J, CHEN XL, SONG W, WEI WQ, WU J. A Recombinant *Escherichia coli* strain and its construction method for the production of 3-dehydroshikimic acid: application and advances: CN116426455A[P]. 2023-07-14 (in Chinese).
[23] WANG M, WANG HM, GAO C, WEI WQ, LIU J, CHEN XL, HU GP, SONG W, WU J, ZHANG F, LIU LM. Efficient production of protocatechuic acid using systems engineering of *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2024, 82: 134-146.
[24] 吴静, 王翔鹤, 胡贵鹏, 刘立明, 盛琦, 李振栋, 王明. 一种重组大肠杆菌及其构建方法与其在生产 3-脱氢莽草酸中的应用: CN118581023A[P]. 2024-09-03.
WU J, WANG XH, HU GP, LIU LM, SHENG Q, LI ZD, WANG M. A Recombinant *Escherichia coli* strain and its construction method for the production of 3-dehydroshikimic acid: application and advances: CN118581023A[P]. 2024-09-03 (in Chinese).
[25] KAMBOURAKIS S, FROST JW. Synthesis of gallic acid: Cu^{2+}-mediated oxidation of 3-dehydroshikimic acid[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2000, 65(21): 6904-6909.
[26] CAREGNATO P, GARA PM, BOSIO GN, GONZALEZ MC, RUSSO N, MICHELINI MD, MARTIRE DO. Theoretical and experimental investigation on the oxidation of gallic acid by sulfate radical anions[J]. The Journal of Physical Chemistry A, 2008, 112(6): 1188-1194.
[27] KAMEL MY, SALEH NA, GHAZY AM. Gallic acid oxidation by turnip peroxidase[J]. Phytochemistry, 1977, 16(5): 521-524.
[28] GARCÍA S, FLORES N, de ANDA R, HERNÁNDEZ G, GOSSET G, BOLÍVAR F, ESCALANTE A. The role of the *ydiB* gene, which encodes quinate/shikimate dehydrogenase, in the production of quinic, dehydroshikimic and shikimic acids in a PTS- strain of *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(1): 11-21.
[29] LI K, MIKOLA MR, DRATHS KM, WORDEN RM, FROST JW. Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 64(1): 61-73.
[30] WEBER C, BRÜCKNER C, WEINREB S, LEHR C, ESSL C, BOLES E. Biosynthesis of *cis*,*cis*-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(23): 8421-8430.
[31] NIU W, DRATHS KM, FROST JW. Benzene-free synthesis of adipic acid[J]. Biotechnology Progress, 2002, 18(2): 201-211.
[32] LI K, FROST JW. Synthesis of vanillin from glucose[J]. Journal of the American Chemical Society, 1998, 120(40): 10545-10546.
[33] MUÑIZ-CALVO S, BISQUERT R, PUIG S, GUILLAMÓN JM. Overproduction of hydroxytyrosol in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous overexpression of the *Escherichia coli* 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase[J]. Food Chemistry, 2020, 308: 125646.
[34] [34] MUÑOZ AJ, HERNÁNDEZ-CHÁVEZ G, de ANDA R, MARTÍNEZ A, BOLÍVAR F, GOSSET G. 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.
[35] 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.
[36] MORIWAKI Y, YATO M, TERADA T, SAITO S, NUKUI N, IWASAKI T, NISHI T, KAWAGUCHI Y, OKAMOTO K, ARAKAWA T, YAMADA C, FUSHINOBU S, SHIMIZU K. Understanding the molecular mechanism underlying the high catalytic activity of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase mutants for producing gallic acid[J]. Biochemistry, 2019, 58(45): 4543-4558.
[37] MAXEL S, ASPACIO D, KING E, ZHANG LY, ACOSTA AP, LI H. A growth-based, high-throughput selection platform enables remodeling of 4-hydroxybenzoate hydroxylase active site[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(12): 6969-6974.
[38] CHEN ZY, CHEN TT, YU SZ, HUO YX. A high-throughput visual screening method for *p*-hydroxybenzoate hydroxylase to increase phenolic compounds biosynthesis[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2022, 15(1): 43.
[39] ZHANG YS, ZHANG GB, WANG TC, CHEN Y, WANG JQ, LI PW, WANG RM, SU J. Understanding cytochrome P450 enzyme substrate inhibition and prospects for elimination strategies[J]. Chembiochem, 2024, 25(22): e202400297.
[40] KUTRAITE I, MALYS N. Development and application of whole-cell biosensors for the detection of gallic acid[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(2): 533-543.
[41] LIU LN, MA XL, BILAL M, WEI LL, TANG SJ, LUO HZ, ZHAO YP, WANG ZY, DUAN XG. Toxicity and inhibition mechanism of gallic acid on physiology and fermentation performance of *Escherichia coli*[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9(1): 76.