

工程大肠杆菌生产高附加值有机酸、醇研究进展

王纪明, 刘炜, 徐鑫, 张海波, 咸漠

中国科学院青岛生物能源与过程研究所 中国科学院生物基材料重点实验室, 山东 青岛 266101

王纪明, 刘炜, 徐鑫, 等. 工程大肠杆菌生产高附加值有机酸、醇研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1363-1373.
Wang JM, Liu W, Xu X, et al. Progress in engineering *Escherichia coli* for production of high-value added organic acids and alcohols. Chin J Biotech, 2013, 29(10): 1363-1373.

摘要: 人类正面临日益严峻的化石资源枯竭与环境恶化等问题, 利用可再生的生物质资源生产高附加值平台化合物受到越来越多的关注。文中主要讨论了代谢工程大肠杆菌 *Escherichia coli* 生产各种高附加值有机酸 (琥珀酸、3-羟基丙酸、葡萄糖二酸)、醇 (甘油、木糖醇) 的最新研究进展。此外, 还简述了 2,5-咪喃二甲酸、天冬氨酸、谷氨酸、衣康酸、乙酰丙酸、3-羟基- γ -丁内酯、山梨糖醇等几种平台化合物的应用及生产方式, 到目前为止未见使用 *E. coli* 生产这些化合物的报道。

关键词: 平台化合物, 生物基材料, 代谢途径

Progress in engineering *Escherichia coli* for production of high-value added organic acids and alcohols

Jiming Wang, Wei Liu, Xin Xu, Haibo Zhang, and Mo Xian

CAS Key Laboratory of Biobased Materials, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

Abstract: Confronted with the gradual exhaustion of the earth's fossil energy resources and the grimmer environmental deterioration, the bio-based process to produce high-value added platform chemicals from renewable biomass is attracting growing interest. *Escherichia coli* has been chosen as a workhouse for the production of many valuable chemicals due to various advantages, such as clear genetic background, convenient to be genetically modified and good growth properties with low nutrient requirements. Rational strain development of *E. coli* achieved by metabolic engineering strategies has provided new processes for efficiently biotechnological production of various high-value chemical building blocks. This

Received: June 9, 2013; **Accepted:** August 12, 2013

Supported by: Key Technologies Research and Development Program of China (No. SS2013AA050703).

Corresponding author: Mo Xian. Tel: +86-532-80662768; Fax: +86-532-80662765; E-mail: xianmo@qibebt.ac.cn

国家科技支撑计划重大项目 (No. SS2013AA050703) 资助。

网络出版时间: 2013-09-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130913.0911.001.html>

review focuses on recent progresses in metabolic engineering of *E. coli* that lead to efficient recombinant biocatalysts for production of high-value organic acids such as succinic acid, 3-hydroxypropionic acid and glucaric acid as well as alcohols like glycerol and xylitol. Besides, this review also discusses several other platform chemicals, including 2,5-furan dicarboxylic acid, aspartic acid, glutamic acid, itaconic acid, levulinic acid, 3-hydroxy- γ -butyrolactone and sorbitol, which have not been produced by *E. coli* until now.

Keywords: platform chemicals, bio-based material, metabolic pathway

现代文明建立在以石油为代表的化石资源的基础之上, 石油基材料给人类的衣食住行带来各种便利的同时, 其不可降解性也严重破坏着我们赖以生存的生态环境。在全球石油供给日趋紧张、环保问题日益突出大背景下, 以可再生资源为基础的生物基材料的开发受到越来越多的关注^[1-2]。

生物基材料开发的一项重要内容是利用可再生的生物质资源为原料来生产各种高附加值的平台化合物, 这些平台化合物可直接使用或经进一步加工生产各种高价值化工产品^[3-5]。2004年美国能源部认定了包括琥珀酸、2,5-呋喃二甲酸、3-羟基丙酸、葡萄糖二酸、天冬氨酸、谷氨酸、衣康酸、乙酰丙酸、3-羟基- γ -丁内酯、甘油、山梨醇、木糖醇等在内 12 种未来最有价值的生物炼制品^[6], 全部为有机酸或醇 (结构见图 1)。

生物转化主要是指采用生物细胞作为催化剂, 对底物进行一系列结构修饰进而生成新化合物的生物化学过程, 其本质为酶催化反应, 具有反应类型多、选择性强、催化效率高、反应条件温和、环境友好等优点, 是传统化学合成路线的有力补充。微生物是常用的生物转化平台。在众多微生物中, *E. coli* 因其具有多种优点, 如遗传背景清楚, 营养要求简单, 生长迅速, 易于遗传操作, 可耐受高浓度有机酸、醇等, 被广泛地用于各种高附加值有机酸、醇代谢工程的研究。文中重点论述了 *E. coli* 代谢工程在生产琥珀酸、3-羟基丙酸、葡萄糖二酸、甘油和木糖醇等高附加值有机酸、醇的最新研究进展; 此外, 还简述了

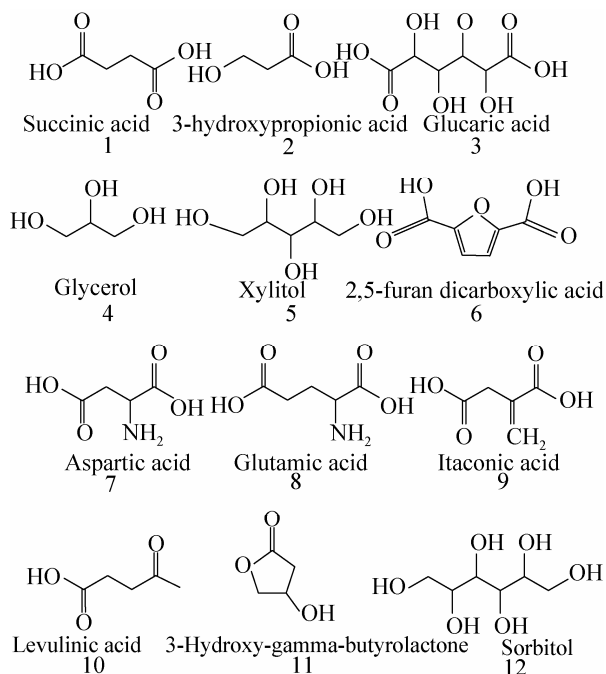


图 1 12 种最具价值生物基化学品结构图^[6]

Fig. 1 Structures of 12 top value added bio-based chemicals^[6]. Chemicals 1-5 have been produced by *E. coli* successfully; chemicals 6-12 have the possibility to be produced by *E. coli* in the future.

2,5-呋喃二甲酸、天门冬氨酸、谷氨酸、衣康酸、乙酰丙酸、3-羟基- γ -丁内酯、山梨糖醇等其他几种平台化合物的应用及生产方式, 到目前为止未见使用 *E. coli* 生产这些化合物的报道。

1 琥珀酸

琥珀酸 (Succinic acid, 见图 1 中化合物 1) 作为一种优秀的 C4 平台化合物, 可用于合成 1,4-丁二醇、1,4-丁二胺、四氢呋喃、 γ -丁内酯、2-吡咯

烷酮、N-甲基吡咯烷酮等有机化学品及聚丁二酸丁二醇酯类生物可降解材料,广泛用于高分子、食品与医药等行业,市场需求量巨大^[7]。

在有氧条件下,琥珀酸仅作为野生型 *E. coli* 三羧酸 (TCA) 循环的中间代谢产物,不作积累;在无氧并缺乏其他电子受体的条件下, *E. coli* 可以通过混合酸发酵产生少量琥珀酸 (7.8%)^[8-11]。在厌氧条件下,葡萄糖经糖酵解生成磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)。其中一半 PEP 通过 PEP 依赖型磷酸转移酶系统直接转化为丙酮酸并生成 ATP,用于从环境中摄取葡萄糖;另一半 PEP 中大部分通过丙酮酸激酶 *Pyk* 生成丙酮酸,同时生成 ATP 为细胞提供能量;剩余少量 PEP 转化为草酰乙酸 (OAA),进而合成苹果酸、富马酸,最终以琥珀酸的形式积累,这也是 *E. coli* 合成琥珀酸的主要途径^[12]。为了维持细胞内的氧化还原平衡,生成的丙酮酸转化为甲酸、乙酸、乳酸、乙醇等 (代谢途径见图 2)。为了提高 *E. coli* 产琥珀酸的能力,可采用多种策略对其进行改造,如增强琥珀酸合成途径中的关键酶、抑制或阻断竞争途径或两种策略综合利用。

PEP 羧化酶 *Ppc* 和 PEP 羧激酶 *Pck* 催化 PEP 与 OAA 之间的反应,可能是 *E. coli* 厌氧发酵中催化 PEP 生成 OAA 最主要的酶。Millard 等在 *E. coli* 中过量表达内源性 *ppc* 和 *pck* 基因,结果显示过表达 *ppc* 可大幅提高 *E. coli* 利用葡萄糖合成琥珀酸的能力,而过量表达 *pck* 对发酵结果没有明显影响^[13]。富马酸还原酶 *FrdABCD* 是琥珀酸合成代谢途径中的另一个关键酶。Goldberg 和 Wang 分别构建了两种过表达 *frdABCD* 基因的重组 *E. coli* 菌株,直接转化富马酸生成琥珀酸,结果表明富马酸转化率可达 93%^[14-15]。增强琥珀酸合成途径中关键酶活性的另一种方法是引入外源的关键酶基因。Kim 等引入产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* 的 *pck* 使琥珀酸产量较出发菌株提高了 6.5 倍^[16],比过表达内源基因更加有效。Wang 等在 *E. coli* 中过

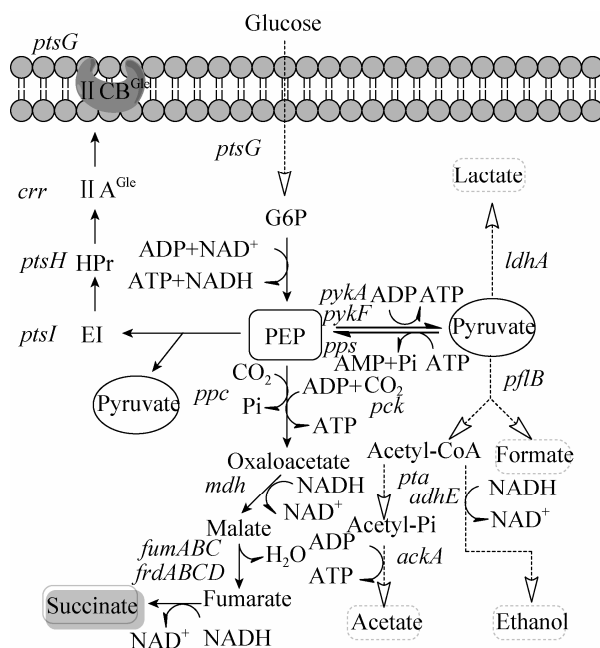


图 2 野生型 *E. coli* 混合酸发酵示意图^[25]

Fig. 2 Mixed acid pathway for glucose fermentation in wild type *E. coli*.^[25] The dashed arrows indicate metabolic steps that have been blocked by deletion mutations. Pyruvate is shown twice but represents a single metabolic pool. Some intermediate steps in glycolysis have been omitted for clarity. G6P: glucose 6-phosphate.

表达来自于一种蓝藻 *Anabaena* sp. 7120 的碳酸酐酶基因 *ecaA*, 增强 HCO_3^- 供应,也可以提高琥珀酸的产量^[17]。

提高琥珀酸产量的另外一种代谢工程策略是抑制或阻断琥珀酸合成的竞争途径。野生型 *E. coli* 厌氧发酵的主要产物为乙酸、甲酸、乙醇及少量乳酸和琥珀酸^[11]。要提高琥珀酸的产量,则必须减少副产物的生成,使更多的中间代谢产物流向琥珀酸。*E. coli* NZN111 是发酵性乳酸脱氢酶基因 *ldhA* 和丙酮酸甲酸裂解酶基因 *pfl* 双突变菌株,该菌株不能发酵葡萄糖^[18]。Chatterjee 等获得了 NZN111 的葡萄糖磷酸转移酶基因 *ptsG* 自发突变株 AFP111,该菌株发酵产物中无乳酸、甲酸积累,乙

酸浓度较低,琥珀酸产量可达 36 g/L,收率 67%^[19]。Jantama 以 *E. coli* C (ATCC 8739) 为出发菌株敲除 *ldhA*、*adhE*、*ackA*、*focA* (编码甲酸转运蛋白)、*pflB*、*mgsA* (编码甲基乙二醛合酶)和 *poxB* (编码丙酮酸氧化酶) 等多种基因构建了 KJ073 菌株,在没有任何复杂营养素的矿物盐培养基中通过简单分批发酵,琥珀酸浓度可达 688 mmol/L (约 78.9 g/L),琥珀酸对葡萄糖的转化率为 1.2 mol/mol,生产强度 0.82 g/(L·h),但发酵液中含有大量乙酸、苹果酸和丙酮酸等副产物^[20]。进一步敲除 *tdcD*、*tdcE*、*citF*、*aspC*、*sfcA* 和 *pta* (依次编码苏氨酸脱羧酶、2-酮丁酸-甲酸裂解酶、柠檬酸裂解酶、天冬氨酸氨基转移酶、NAD⁺偶联的苹果酸酶和乙酸磷酸转移酶),副产物乙酸、苹果酸和丙酮酸大幅降低,而琥珀酸转化率升高 (1.5 mol/mol),产量略有下降 (606 mmol/L,约 71.6 g/L)^[21]。考虑到琥珀酸厌氧发酵过程中细胞密度小、碳源利用速度慢等缺点,Lin 等通过有氧发酵的方式生产琥珀酸,敲除 *ptsG*、*sdh* (编码琥珀酸脱氢酶)、*poxB*、*ack-pta* 和 *aceBAK* 操纵子 (编码乙醛酸循环的 3 种酶) 阻遏物基因 *iclR*,构建了包含乙醛酸循环和 TCA 循环氧化支路的双途径代谢工程菌株。该菌株在有氧条件下,经 59 h 补料分批发酵,琥珀酸浓度可达 58.3 g/L,琥珀酸对葡萄糖的收率为 0.85 mol/mol^[22-23]。

此外,研究人员还综合利用上述两种策略构建了多种工程菌株。Sánchez 等通过敲除 *adhE*、*ldhA*、*ack-pta* 和 *iclR* 4 个基因获得了工程菌株 SBS550MG,在其中共表达来源于乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 的丙酮酸羧化酶基因 *pyc* 和来源于枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的对 NADH 不敏感的柠檬酸合酶基因 *citZ*,发酵结果显示琥珀酸对葡萄糖的收率为 1.6 mol/mol,生产强度 1.2 g/(L·h),琥珀酸最终浓度约 40 g/L^[24]。Zhang 等解析了 *E. coli* 高产琥珀酸的生化机制,解决了琥珀酸生产过程中

的前体和能量供给问题。他们通过两种策略改变外周代谢途径将琥珀酸产量比出发菌株提高了 5 倍:

1) 敲除 *ppc* 并提高 *pck* 活性,提高了 OAA 含量并伴有 ATP 输出; 2) 敲除 *ptsI* 阻断原生 PEP 依赖型磷酸转移酶葡萄糖摄取系统,同时过表达 *galP* 和 *glk* (分别编码半乳糖透性酶和葡萄糖激酶) 构建了新的葡萄糖摄取途径替代原途径,减少了 ATP 的消耗^[25-26]。Vemuri 等在 *E. coli* AFP111 菌株^[19]中表达来自于菜豆根瘤菌 *Rhizobium etli* 的 *pyc* 基因,所得菌株通过两阶段发酵最终发酵液中琥珀酸浓度达到 99.2 g/L,相对葡萄糖的收率为 1.1 mol/mol,生产强度 1.3 g/(L·h),是目前已报道的产量最高的菌株^[27]。

有报道称,要利用工程 *E. coli* 经济可行地实现琥珀酸的产业化生产,理想条件下需要满足以下多种要求:琥珀酸对葡萄糖的质量转化率达到 0.88 g/g;生产强度 1.8~2.5 g/(L·h);产物浓度达到 80 g/L 以上^[28]。到目前为止,已报道的菌株中没有一个能够同时满足上述所有标准。

2 3-羟基丙酸

3-羟基丙酸 (3-hydroxypropionic acid, 3-HP, 见图 1 中化合物 2) 是一种工业上重要的功能性有机酸,可用于生产多种重要的化学物质,如 1,3-丙二醇、丙二酸、丙烯酸、丙烯酰胺和聚 3-羟基丙酸等^[6,29],被广泛应用于化妆品、化工、食品和制药等领域。研究人员提出了多条以葡萄糖或甘油为底物在工程 *E. coli* 中合成 3-HP 的代谢途径 (图 3)^[30]。

葡萄糖是构成生物物质的重要结构单元,开发以葡萄糖为底物的 3-HP 生产菌株是现代生物炼制技术的一项重要研究内容。Rathnasingh 等在 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株中表达来源于橙色绿屈挠菌 *Chloroflexus aurantiacus* 的 NADPH 依赖型丙二酸单酰辅酶 A 还原酶基因 *mcr*,并过表达来源于 *E. coli* K-12 菌株的乙酰辅酶 A 羧化酶基因 *accADBCb*

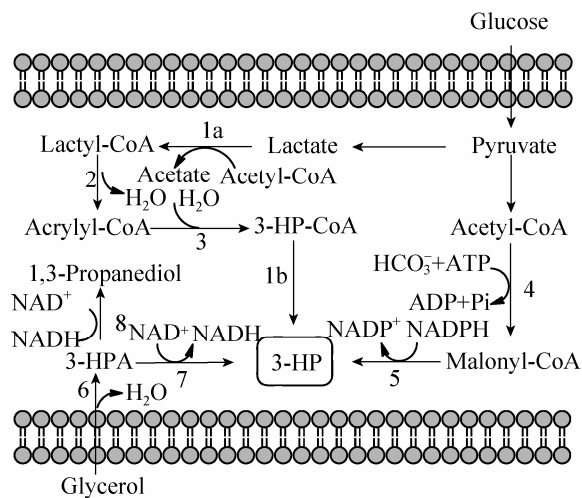


图3 3-羟基丙酸合成途径^[30]

Fig. 3 Fermentation pathways for the production of 3-HP using glucose or glycerol as substrate^[30]. Some intermediate steps in glycolysis have been omitted for clarity. Enzymes involved: 1 (1a, 1b): propionate CoA-transferase; 2: lactyl-CoA dehydratase; 3: 3-HP-CoA dehydratase; 4: acetyl-CoA carboxylase; 5: malonyl-CoA reductase; 6: glycerol dehydratase; 7: aldehyde dehydrogenase; 8: 1,3-propanediol oxidoreductase; 3-HPA: 3-hydroxypropionaldehyde.

(需要维生素 B₁₂ 作为辅酶)、烟酰胺核苷酸转氢酶基因 *pntAB* (可将 NADH 转化为 NADPH), 成功构建了 3-HP 合成途径, 3-HP 产量为 2.14 mmol/L^[31]。美国 Cargill 公司在研究由葡萄糖生产 3-HP 方面做了大量工作, 他们利用乳酸→3-HP 途径, 在 2002 年申请的专利中 3-HP 产量最高达到 20 g/L^[32]。

甘油是另外一种廉价的碳源, 利用甘油生产 3-HP 也受到研究者的广泛关注。在 *E. coli* 中利用甘油生产 3-HP 主要涉及两种酶: 甘油脱水酶和醛脱氢酶。前者催化甘油生成 3-羟基丙醛 (3-HPA), 是该途径的限速酶; 后者催化 3-HPA 生成 3-HP 和 NADH。该途径需要其他电子受体, 如硫酸盐和 CO₂。野生型 *E. coli* 缺乏甘油脱水酶且自身醛脱氢酶活性低, 不能代谢甘油生成 3-HP^[33]。研究人员利用代谢工程技术, 在 *E. coli* 中成功地将甘油转化

为 3-HP。Suthers 等在 *E. coli* 中共表达来自肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumonia* 的甘油脱水酶基因 *dhaB* 和来自酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的醛脱氢酶基因 *ALD4* 或来源于人 *Homo sapiens* 的醛脱氢酶基因 *ALDH2*, 利用甘油可合成低浓度的 3-HP^[34]。Raj 等以 *E. coli* BL21 (DE3) 为宿主共表达了来源于 *K. pneumonia* 的 *dhaB* 和 *E. coli* 的 *aldH*, 所得菌株可以直接利用甘油生产 3-HP, 但其产量仅为 0.58 g/L^[35]。优化发酵参数后, 利用该菌株 3-HP 的产量可达到 31 g/L, 3-HP 对甘油产率为 0.35 mol/mol^[36]。3-HP 产量低可能是 DhaB 稳定性差以及 DhaB 和 AldH 之间的活性不匹配所致。

Rathnasingh 等通过表达甘油脱水酶再生酶基因 *gdrAB* 提高 DhaB 稳定性, 同时用 α -酮戊二酸半醛脱氢酶基因 *KGSADH* 替代 *aldH*, 3-HP 产量提高到 38.7 g/L^[37]。Kwak 等在 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株中共表达来源于短小乳杆菌 *Lactobacillus brevis* 的 *dhaB*、甘油脱水酶再生因子基因 *dhaR* 及 *E. coli* K-12 菌株的 *aldH*, 所得菌株 3-HP 产量 14.3 g/L^[38]。Yasuda 等对上述途径进行了改造 (图 3 中 6, 7, 8), 在生产 3-HP 的同时生产 1,3-丙二醇。他们在 *E. coli* 中共表达来自于罗伊氏乳杆菌 *L. reuleri* 的 *dhaB*、*dhaR*、1,3-丙二醇氧化还原酶基因 *dhaT*, 并过表达 *E. coli* K-12 菌株的醛脱氢酶基因 *aldB*, 3-HP 的产量可达 36 g/L^[39]。

虽然利用工程 *E. coli* 生产 3-HP 取得了一定进展, 但距商业化应用仍然还有很大差距。

3 葡萄糖二酸

葡萄糖二酸 (Glucaric acid, 见图 1 中化合物 3) 是一种天然化合物, 在哺乳动物和一些水果中都有发现, 具有降低人体胆固醇、预防和抑制癌症等多种作用^[40-42], 还可作为合成新型尼龙和超支化聚酯的单体原材料, 具有很大的应用潜力。

葡萄糖二酸作为哺乳动物的代谢终产物,在体内以葡萄糖为底物需要10步以上的反应才能得到。Moon等通过在*E. coli*中共表达*S. cerevisiae*的肌肌醇-1-磷酸合成酶基因*INO1*,小鼠的肌肌醇加氧酶基因*Miox*以及丁香假单胞菌*Pseudomonas syringae*的糖醛酸脱氢酶基因*udh*,构建了一条D-葡萄糖二酸合成途径。与天然途径相比,该途径简单、经济,葡萄糖二酸的产率超过1 g/L^[43]。进一步研究发现,MIOX是该途径的限速酶,其活性受底物肌肌醇浓度的影响较大,肌肌醇浓度越大,MIOX活性越高。为了提高肌肌醇的有效浓度,进而提高葡萄糖二酸的产量,他们利用蛋白之间的相互作用构建了模块化多肽骨架,将该途径中的3种酶组建成蛋白复合物,提高了酶的催化效率,使葡萄糖二酸的产量增加到2.5 g/L^[44]。到目前为止,工业上还没有通过微生物发酵生产葡萄糖二酸的报道。

4 甘油

甘油(Glycerol,见图1中化合物4)是一种重要的C3平台化合物,在化妆品、液体肥皂、食品、医药、润滑油、防冻液和烟草等行业具有广泛的应用,还可以通过进一步的化学修饰用于一些聚酯、聚醚和醇酸树脂的合成^[45]。

野生型*E. coli*细胞内缺乏高效合成甘油的代谢途径,而*S. cerevisiae*是目前已知最优良的甘油生产菌^[46],研究人员尝试在*E. coli*中构建来自于*S. cerevisiae*的甘油合成途径。甘油的合成主要涉及两种酶:甘油-3-磷酸脱氢酶Gpd1和甘油-3-磷酸酶Gpp2。在*E. coli*中单独表达其中的任意一种,甘油的产量都很低;但是共表达两种酶时,甘油产量可提高10~20倍^[47]。曾有研究者提出*E. coli*可以通过异质性进化获得其他微生物的整条代谢途径^[48-49]。为了验证这一理论,Meynial等通过代谢工程技术在*E. coli*细胞内定向进化出了*S. cerevisiae*的甘油

合成途径,所得菌株以葡萄糖为碳源,通过分批补料发酵,在发酵条件没有优化的情况下获得了很好的结果:甘油浓度130 g/L、收率1 mol/mol、生产强度16 g/(L·d)^[50]。*E. coli*能够利用甘油作为碳源,其中涉及两种酶:甘油激酶Glpk和甘油脱氢酶GldA。Nair等通过敲除相关代谢途径,降低甘油消耗量,使甘油产量超过200 g/L,接近理论产量的最高值^[51]。

甘油是生物柴油生产过程中不可避免的副产品,随着生物柴油产业化发展,甘油的产量也相对增加,因此研究者对微生物法生产甘油的关注度较少。然而,甘油作为散装平台化学品其重要性日益增加,微生物法仍是甘油生产的重要研究方向。工程*E. coli*由于其特殊的优点有望替代*S. cerevisiae*成为甘油生产的重要生物催化剂。

5 木糖醇

木糖醇(Xylitol,见图1中化合物5)是第一个拥有全球市场的稀有糖,发热量、甜度与蔗糖类似,但代谢过程中不需要胰岛素,还具有特殊的防龋功能,可作糖尿病人的营养甜味剂及儿童的防龋食品,木糖醇还具备类似甘油和其他多元醇的许多优异特性,因而广泛用于医药、化工、皮革、涂料及食品等行业^[52]。据估计,木糖醇的年市场份额可达3.4亿美元^[53]。目前,工业上木糖醇主要采用化学合成法来生产,成本高、环境污染大。为了降低木糖醇的生产成本和对环境的污染,科研人员开始关注微生物法生产木糖醇。

*E. coli*作为一种优秀的生物催化剂,除了可以代谢己糖,还可以吸收利用木糖等戊糖。木糖醇是木糖的衍生物,因此研究人员尝试以木糖为原料,通过工程*E. coli*来生产木糖醇。在酵母和丝状真菌中,木糖代谢的起始反应是在NADPH依赖的木糖还原酶的作用下转化为木糖醇,随后经两步反应进

入磷酸戊糖途径；与酵母菌及丝状真菌不同，细菌在木糖代谢的过程中不形成木糖醇。Suzuki 等在 *E. coli* 中表达了来自热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 的 D-木糖还原酶基因，成功将 D-木糖转化为木糖醇。将混合糖 (D-木糖 50 g/L、D-葡萄糖 5 g/L) 加入到 IPTG 诱导的细胞中培养 20 h 后，木糖醇产量达到 13.3 g/L^[54]。Cirino 等用不依赖环腺苷酸的环腺苷酸受体蛋白突变体 (CRP*) 取代 *E. coli* 的野生型 CRP，提高了 *E. coli* 从葡萄糖-木糖混合物中摄取木糖的能力；在此基础上，敲除木酮糖激酶基因 *xylB* 并过表达来自博伊丁假丝酵母 *C. boidinii* 的 NADPH 依赖型木糖还原酶基因 *CbXR*，以葡萄糖和木糖混合物为原料，木糖醇产量最高可达 38 g/L^[55]。进一步研究发现，如果培养基中含有葡萄糖，采用工程 *E. coli* 以木糖为原料生产木糖醇，要提高木糖醇产量，必须敲除 *xylB* 基因。这是由于 *E. coli* 细胞中存在葡萄糖效应，在有葡萄糖的情况下，*xylB* 催化木糖醇生成木糖醇-磷酸并在细胞内累积，后者抑制木糖向细胞内转运，最终导致木糖醇产量降低。Akinterinwa 利用来源于树干毕赤酵母 *Pichia stipitis* 的 D-木酮糖激酶基因 *XYL3* 取代 *E. coli* 自身的 *xylB*，并过表达 *CbXR*，所得菌株木糖醇产量明显提高^[56]。Khankal 等研究了木糖转运蛋白 (XylE 或 XylFGH) 对工程 *E. coli* 产木糖醇的影响，结果发现在 *xylB* 敲除菌株 (CRP 为野生型) 中过表达木糖转运蛋白基因 (*XylE* 或 *XylFGH*) 和 *CbXR*，木糖醇产量与 Cirino 所得菌株类似^[57]。之前的报道都是以木糖为原料生产木糖醇，Cheng 等克隆并在 *E. coli* 中异源表达了一种来自弱氧化醋酸菌 *Acetobacter suboxydans* 的形成 D-木酮糖的 NAD 依赖型 D-阿拉伯糖醇脱氢酶基因 *aArDH*，可以将 D-阿拉伯糖醇转化为木糖醇^[58]。

自然界中很多微生物可以合成木糖醇，如某些酵母，然而工程 *E. coli* 生产木糖醇有其独特的优

点，具有很大的发展潜力。要通过生物技术实现木糖醇的产业化生产，除菌株构建外，还应关注原料供给、生物转化、下游加工、环境保护等其他过程技术及这些技术的集成^[53]。

6 其他高附加值平台化学品

1) 2,5-呋喃二甲酸 (2,5-furan dicarboxylic acid, 见图 1 中化合物 6) 可以用来生产琥珀酸、2,5-二甲氨基四氢呋喃、2,5-二羟基四氢呋喃、2,5-呋喃二甲醛等；可以替代对苯二甲酸，合成绿色可降解塑料；亦可以替代邻苯二甲酸，合成绿色无毒塑化剂^[6]。目前，该化合物还没有生物合成的报道。

2) 天冬氨酸 (Aspartic acid, 见图 1 中化合物 7) 和谷氨酸 (Glutamic acid, 见图 1 中化合物 8) 是结构上相似的两种天然化合物，也是多种医药和化妆品活性成分的构建单元，其微生物合成早有报道，如采用羽扇豆根瘤菌 *Rhizobium lupini*^[59] 或大豆根瘤菌 *R. japonicum*^[60]。植物中天冬氨酸的合成路径的研究也较多，目前已克隆并在 *E. coli* 中表达了多个基因^[61]。谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 是另外一种重要的谷氨酸生产菌，其代谢工程的研究也多有报道^[62-63]。

3) 衣康酸 (Itaconic acid, 见图 1 中化合物 9) 是另外一种重要的平台化合物，广泛用于树脂、纤维、塑料、橡胶、表面活性剂、石油添加剂和生物医学等领域^[64]。土曲霉 *Aspergillus terreus* 是生产衣康酸最成功的微生物，以糖为底物衣康酸的产量高于 80 g/L，但其生产成本仍然较高^[65]。

4) 乙酰丙酸 (Levulinic acid, 见图 1 中化合物 10) 具有广泛的用途，可用于制备树脂、医药、农药、香料、溶剂、涂料、油墨、橡胶、塑料助剂、润滑油添加剂、表面活性剂等高值下游产品^[66]。乙酰丙酸主要通过六碳糖经 5-甲基糠醛水解得到；或者通过 5-碳糖水解为糠醛，加氢生成糠醇进而水解

得到^[67], 还未见生物合成的报道。

5) 3-羟基- γ -丁内酯 (3-hydroxy- γ -butyrolactone, 3-HBL, 见图 1 中化合物 11) 是 3,4-二羟基丁酸的衍生物, 带有自由羟基, 也可看作是一种醇。3-HBL 是许多天然化合物的重要合成原料, 也是重要的医药中间体^[68], 主要通过化学合成得到, 自然界中尚未发现完整的生物合成途径。Nakagawa 等从肠杆菌 *Enterobacter* sp. DS-S-7 中克隆到一个水解酶基因, 在 *E. coli* 中表达以后, 可以将 3-羟基-4-氯-丁酸转化为 3-HBL^[69]。Martin 等开发了一种 3-羟基酸的合成平台, 有望实现 3-HBL 的生物合成^[70]。

6) 山梨糖醇 (Sorbitol, 见图 1 中化合物 12) 是一种低热量糖醇, 在食品和医药工业中具有广泛的应用^[71]。目前已经有多个利用代谢工程乳杆菌生产山梨糖醇的报道, 如 Yebra、Nissen 等采用干酪乳杆菌 *L. casei*^[72-73]、Ladero 等采用胚芽乳杆菌 *L. plantarum*^[74] 都成功实现了山梨醇的生物法合成。

7 总结与展望

在化学工业中, 生物基平台化合物可以直接使用或经进一步加工用于生产各种高附加值产品, 近年来其研究日益受到关注。*E. coli* 作为一种优秀的细胞工厂, 可以被改造用于生产多种天然或非天然的小分子化合物, 具有超越其他细菌的多种优势。代谢工程大肠杆菌在工业应用领域的研究主要集中在菌株改良和代谢途径改造方面, 研究人员开发了多种优良的 *E. coli* 代谢工程菌株, 发酵过程易于控制, 目标化合物的生产效率较高。综合利用多种生物技术手段, 如基因表达调控、染色体缺失、构建底盘细胞等可以克服 *E. coli* 的多种原生代谢限制, 提高现有有机酸、醇类生成菌株的生产效率。在不久的将来, 有望利用工程 *E. coli* 实现图 1 中化

合物 1~5 的工业化生产。虽然其他高附加值有机酸、醇尚未见采用 *E. coli* 生产的报道, 特别是 2,5-呋喃二甲酸和乙酰丙酸还没有任何采用生物法生产的报道, 但有理由相信随着生物技术尤其是近年来合成生物学的发展, 在代谢工程 *E. coli* 中成功合成这些化合物的可能性非常大。

当然, *E. coli* 作为一种优秀的生物催化剂有其优点也有其固有的缺点。*E. coli* 是一种原核生物, 蛋白翻译后修饰功能不完善, 来源于真核生物的蛋白质在其中表达后活性有限; 更重要的是, *E. coli* 可产生种类繁多, 结构复杂的毒力因子, 如粘附素、内毒素、外毒素等, 在进行工业化生产尤其是生产一些食品或医药类产品 (如木糖醇) 时, 需要考虑这些毒力因子掺入到产品中的可能性, 有必要对其安全性进行综合评价。

REFERENCES

- [1] Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*, 2007, 315: 801-804.
- [2] Kerr RA. Global warming is changing the world. *Science*, 2007, 316: 188-190.
- [3] Steen EJ, Kang Y, Bokinsky YG, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 2010, 463: 559-562.
- [4] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, 451: 86-89.
- [5] Hatti-Kaul R, Törnvall U, Gustafsson L, et al. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals--a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol*, 2007, 25(3): 119-124.
- [6] Werpy T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass: volume I--results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. [US DOE]. [2013-5-10]. <http://www.osti.gov/bridge/servlets/purl/15008859-s6ri0N/native/>.
- [7] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999,

- 51: 545–552.
- [8] Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Rev, 1989, 63: 223–234.
- [9] Lin H, Bennett GN, San KY. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. Metab Eng, 2005, 7: 116–127.
- [10] Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. Curr Opin Microbiol, 2006, 9: 268–274.
- [11] Blackwood AC, Neish AC, Ledingham GA. Dissimilation of glucose at controlled pH values by pigmented and non-pigmented strains of *Escherichia coli*. J Bacteriol, 1956, 72: 497–499.
- [12] der Werf MJV, Guettler MV, Jain MK, et al. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. Arch Microbiol, 1997, 167: 332–342.
- [13] Millard C, Chao Y, Liao J, et al. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 1808–1810.
- [14] Goldberg I, Lonberg-Holm K, Bagley EA, et al. Improved conversion of fumarate to succinate by *Escherichia coli* strains amplified for fumarate reductase. Appl Environ Microbiol, 1983, 45: 1838–1847.
- [15] Wang X, Gong C, Tsao G. Bioconversion of fumaric acid to succinic acid by recombinant *E. coli*. Appl Biochem Biotechnol, 1998, 70: 919–928.
- [16] Kim P, Laivenieks M, Vieille C, et al. Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 1238–1241.
- [17] Wang D, Li Q, Li W, et al. Improvement of succinate production by overexpression of a cyanobacterial carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. Enzyme Microb Technol, 2009, 45: 491–497.
- [18] Bunch PK, Mat-Jan Lee FN, et al. The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Microbiology, 1997, 143: 187–195.
- [19] Chatterjee R, Millard CS, Champion K, et al. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 148–154.
- [20] Jantama K, Haupt M, Svoronos S, et al. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. Biotechnol Bioeng, 2008, 99: 1140–1153.
- [21] Jantama K, Zhang XL, Moore JC, et al. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. Biotechnol Bioeng, 2008, 101: 881–893.
- [22] Lin H, Bennett GN, San KY. Effect of carbon sources differing in oxidation state and transport route on succinate production in metabolically engineered *Escherichia coli*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005, 32: 87–93.
- [23] Lin H, Bennett GN, San KY. Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions. Biotechnol Bioeng, 2005, 90: 775–779.
- [24] Sánchez AM, Bennett GN, San KY. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. Metab Eng, 2005, 7: 229–239.
- [25] Zhang XL, Jantama K, Moore JC, et al. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 20180–20185.
- [26] Zhang XL, Jantama K, Shanmugam KT, et al. Re-engineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 7807–7813.
- [27] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. J Ind Microbiol Biotechnol, 2002, 28: 325–332.
- [28] Beauprez J. Metabolic engineering and modelling of *Escherichia coli* for the production of succinate [D]. Gent: Ghent University, 2010.
- [29] Brown SF. Bioplastic fantastic. Fortune, 2003, 148: 92–94.
- [30] Jiang X, Meng X, Xian M. Biosynthetic pathways for

- 3-hydroxypropionic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82: 995–1003.
- [31] Rathnasingh C, Raj SM, Lee Y, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA pathway using recombinant *Escherichia coli* strains. *J Biotechnol*, 2012, 157: 633–640.
- [32] Gokarn RR, Selifonova OV, Jessen H, et al. 3-Hydroxypropionic acid and other organic compounds: WO 02/42/418A2. 2002-05-30.
- [33] Jo J, Mohan RS, Rathnasingh C, et al. Cloning, expression, and characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* K-12 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81: 51–60.
- [34] Suthers PF, Cameron DC. Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms: US, 6852517. 2005-02-08.
- [35] Raj SM, Rathnasingh C, Jo JE, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. *Process Biochem*, 2008, 43: 1440–1446.
- [36] Mohan RS, Rathnasingh C, Jung W, et al. Effect of process parameters on 3-hydroxypropionic acid production from glycerol using a recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84: 649–657.
- [37] Rathnasingh C, Raj SM, Jo JE, et al. Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104: 729–739.
- [38] Kwak S, Park YC, Seo JH. Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from glycerol in recombinant *Escherichia coli* expressing *Lactobacillus brevis dhaB* and *dhaR* gene clusters and *E. coli* K-12 *aldH*. *Bioresour Technol*, 2013, 135: 432–439.
- [39] Yasuda S, Mukoyama M, Horikawa H, et al. Process for producing 1,3-propanediol and/or 3-hydroxypropionic acid: US 2007/0148749 A1. 2007-06-28.
- [40] Simone CB, Simone NL, Pallante M, et al. Cancer, lifestyle modification and glucarate. *J Orthomol Med*, 2001, 16: 83–90.
- [41] Walaszek Z, Szemraj J, Hanausek M, et al. D-glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterol-lowering effects of dietary D-glucarate in the rat. *Nutr Res*, 1996, 16: 673–681.
- [42] Singh J, Gupta KP. Induction of apoptosis by calcium D-glucarate in 7,12-dimethyl benz [a] anthracene-exposed mouse skin. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2007, 26: 63–73.
- [43] Moon TS, Yoon SH, Lanza AM, et al. Production of glucaric acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 589–595.
- [44] Moon TS, Dueber JE, Shiue E, et al. Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*. *Metab Eng*, 2010, 12: 298–305.
- [45] Behr A, Eilting J, Irawadi K, et al. Improved utilisation of renewable resources: new important derivatives of glycerol. *Green Chem*, 2008, 10: 13–30.
- [46] Taherzadeh M, Adler L, Liden G. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol—a review. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31: 53–66.
- [47] Bulthuis B, Gatenby A, Haynie S, et al. Method for the production of glycerol by recombinant organisms: US, 6358716. 2002-03-19.
- [48] Lu Z, Cabisco E, Obradorsi N, et al. Evolution of an *Escherichia coli* protein with increased resistance to oxidative stress. *J Biol Chem*, 1998, 273: 8308–8316.
- [49] Membrillo-Hernandez J, Echave P, Cabisco E, et al. Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. *J Biol Chem*, 2000, 275: 33869–33875.
- [50] Meynial SI, Forchhammer N, Croux C, et al. Evolution of a *Saccharomyces cerevisiae* metabolic pathway in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2007, 9: 152–159.
- [51] Nair R, Payne M, Trimbur D, et al. Method for the production of glycerol by recombinant organisms: US, 2006/0286653 A1. 2006-10-21.
- [52] Granstrom T, Izumori K, Leisola M. A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 273–276.
- [53] Prakasham R, Rao R, Hobbs P. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. *Curr Trends Biotechnol Pharm*, 2009, 3: 8–36.

- [54] Suzuki T, Yokoyama S, Kinoshita Y, et al. Expression of *xyrA* gene encoding for D-xylose reductase of *Candida tropicalis* and production of xylitol in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87: 280–284.
- [55] Cirino PC, Chin JW, Ingram LO. Engineering *Escherichia coli* for xylitol production from glucose-xylose mixtures. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95: 1167–1176.
- [56] Akinterinwa O, Cirino P. Heterologous expression of D-xylulokinase from *Pichia stipitis* enables high levels of xylitol production by engineered *Escherichia coli* growing on xylose. *Metab Eng*, 2009, 11: 48–55.
- [57] Khankal R, Chin J, Cirino P. Role of xylose transporters in xylitol production from engineered *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2008, 134: 246–252.
- [58] Cheng H, Li Z, Jiang N, et al. Cloning, purification and characterization of an NAD-dependent D-arabitol dehydrogenase from acetic acid bacterium, *Acetobacter suboxydans*. *Protein J*, 2009, 28: 263–272.
- [59] Lillich T, Elkan G. The biosynthesis of aspartic acid, glutamic acid, and alanine in *Rhizobium japonicum*. *Can J Microbiol*, 1971, 17: 683–688.
- [60] Kretovich W, Kariakina T, Weinova M, et al. The synthesis of aspartic acid in *Rhizobium lupini* bacteroids. *Plant Soil*, 1981, 61: 145–156.
- [61] Azevedo R, Lancien M, Lea P. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids*, 2006, 30: 143–162.
- [62] Kimura E. Metabolic engineering of glutamate production. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 79: 37–58.
- [63] Schultz C, Niebisch A, Gebel L, et al. Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76: 691–700.
- [64] Okabe M, Lies D, Kanamasa S, et al. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84: 597–606.
- [65] Willke T, Vorlop K. Biotechnological production of itaconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56: 289–295.
- [66] Cha JY, Hanna MA. Levulinic acid production based on extrusion and pressurized batch reaction. *Ind Crop Prod*, 2002, 16: 109–118.
- [67] Corma A, Iborra S, Velty A. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. *Chem Rev*, 2007, 107: 2411–2502.
- [68] Christos P, Claude B. Use of enzymic hydrolysis of dimethyl malates for a short synthesis of tulipalin B and of its enantiomer. *J Org Chem*, 1985, 50: 1144–1145.
- [69] Nakagawa A, Idogaki H, Kato K, et al. Improvement on production of (R)-4-Chloro-3-hydroxybutyrate and (S)-3-hydroxy- γ -butyrolactone with recombinant *Escherichia coli* cells. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101: 97–103.
- [70] Martin CH, Dhamankar H, Tseng HC, et al. A platform pathway for production of 3-hydroxyacids provides a biosynthetic route to 3-hydroxy- γ -butyrolactone. *Nat Commun*, 2013, 4: 1414.
- [71] Silveira M, Jonas R. The biotechnological production of sorbitol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59: 400–408.
- [72] Yebra M, Pérez-Martínez G. Cross-talk between the L-sorbose and D-sorbitol (D-glucitol) metabolic pathways in *Lactobacillus casei*. *Microbiology*, 2002, 148: 2351–2359.
- [73] Nissen L, Pérez-Martínez G, Yebra M. Sorbitol synthesis by an engineered *Lactobacillus casei* strain expressing a sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene within the lactose operon. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 249: 177–184.
- [74] Ladero V, Ramos A, Wiersma A, et al. High-level production of the low-calorie sugar sorbitol by *Lactobacillus plantarum* through metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 1864–1872.

(本文责编 郝丽芳)