

· 产品篇 ·

**王钦宏** 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员、博士生导师、副所长。国务院特殊津贴获得者，天津市创新人才推进计划创新团队入选者，荣获天津市五一劳动奖章等荣誉。主要从事工业微生物的进化与代谢工程研究，包括重要化学品高性能细胞工厂创制、基因组水平编辑和实验室进化筛选、液滴微流控高通量筛选平台搭建及应用等。近年来在 *Metab Eng*、*Biotechnol Biofuels*、*ACS Synth Biol*、*Anal Chem* 等领域主流国际期刊发表科研论文 50 余篇，获授权专利 13 项，参与了国家科学技术部、国家发展和改革委员会、中国科学院相关领域战略规划编制。现为学术期刊 *Scientific Reports* 和《生物工程学报》编委。



## 芳香族化合物微生物代谢工程研究进展

吴凤礼<sup>1,2</sup>，王晓霜<sup>1,2,3</sup>，宋富强<sup>1,2,3</sup>，彭彦峰<sup>1,2</sup>，王钦宏<sup>1,2</sup>

1 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院系统微生物工程重点实验室，天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心，天津 300308

3 天津科技大学 生物工程学院，天津 300457

吴凤礼，王晓霜，宋富强，等. 芳香族化合物微生物代谢工程研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1771-1793.

Wu FL, Wang XS, Song FQ, et al. Advances in metabolic engineering for the production of aromatic chemicals. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1771-1793.

**摘要:** 代谢工程从 20 世纪 90 年代初期发展至今已有近 30 年历史，对微生物菌种改良和选育工作起到了极大的推动作用。芳香族化合物是一类可以通过微生物发酵生产的化学品，广泛应用于医药、食品、饲料和材料等领域。利用代谢工程手段对莽草酸和芳香族氨基酸合成途径进行理性改造，微生物细胞可以定向地大量积累人们需要的各种芳香族化合物。笔者对近 30 年来国内外代谢工程改造微生物合成各种芳香族化合物的研究策略和生物合成途径进行了梳理和总结，以期为开展相关研究提供参考。

**关键词:** 芳香族化合物，芳香族氨基酸，莽草酸途径，代谢工程，微生物发酵

**Received:** November 11, 2020; **Accepted:** February 4, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0903700), Drug Innovation Major Project (No. 2018ZX09711001-006-003), National Natural Science Foundation of China (No. 31700080).

**Corresponding author:** Qinzhong Wang. Tel: +86-22-84861950; E-mail: wang\_qh@tib.cas.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0903700), “重大新药创制”科技重大专项(No. 2018ZX09711001-006-003), 国家自然科学基金(No. 31700080) 资助。

# Advances in metabolic engineering for the production of aromatic chemicals

Fengli Wu<sup>1,2</sup>, Xiaoshuang Wang<sup>1,2,3</sup>, Fuqiang Song<sup>1,2,3</sup>, Yanfeng Peng<sup>1,2</sup>, and Qinhong Wang<sup>1,2</sup>

1 CAS Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

3 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** Metabolic engineering has been developed for nearly 30 years since the early 1990s, and it has given a great impetus to microbial strain breeding and improvement. Aromatic chemicals are a variety of important chemicals that can be produced by microbial fermentation and are widely used in the pharmaceutical, food, feed, and material industry. Microbial cells can be engineered to accumulate a variety of useful aromatic chemicals in a targeted manner through rational engineering of the biosynthetic pathways of shikimate and the derived aromatic amino acids. This review summarizes the metabolic engineering strategies and biosynthetic pathways for the production of aromatic chemicals developed in the past 30 years, with the aim to provide a valuable reference and promote the research in this field.

**Keywords:** aromatic chemicals, aromatic amino acid, shikimate pathway, metabolic engineering, microbial fermentation

芳香族化合物 (Aromatic chemicals) 是一类重要的微生物发酵化学品, 广泛应用于医药、化工、食品和饲料等领域<sup>[1-3]</sup>。莽草酸途径 (Shikimate pathway) 是生物体合成芳香族化合物的基础途径, 广泛存在于植物、藻类、真菌和细菌等细胞内<sup>[4-5]</sup>。在自然条件下, 芳香族化合物在微生物细胞中的含量很低, 难以满足发酵生产的需求。通过代谢工程手段, 对细胞内的中心代谢途径和莽草酸途径进行理性改造, 必要时引入异源合成途径, 使细胞具有更强的目的产物合成能力或合成新的芳香族化合物的能力<sup>[1]</sup>。此外, 植物来源的木质素、单宁酸等复杂有机质通过微生物发酵也可以转化为某些重要的芳香族化合物及其衍生物<sup>[6-8]</sup>。近 30 年来, 微生物合成芳香族化合物的代谢工程研究取得了一系列重要研究进展, 并且许多芳香族化合物已经实现工业化发酵生产 (图 1), 在国民经济乃至世界经济的发展过程中发挥着重要的推动作用。本文中, 笔者主要对微生物生产各种芳香族化合物的代谢工程研究策略和合成途径进行梳理和总结, 以期对工业发酵菌种的优化改造研究提供参考。

## 1 芳香族化合物生物合成途径

芳香族化合物生物合成的基础代谢途径涉及糖酵解途径 (Glycolytic pathway 或 Embden-Meyerhof-Parnas pathway, EMP)、磷酸戊糖途径 (Pentose phosphate pathway, PPP) 和莽草酸途径 (Shikimate pathway)。莽草酸途径以糖酵解途径产生的磷酸烯醇式丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate, PEP) 和磷酸戊糖途径产生的赤藓糖-4-磷酸 (D-erythrose 4-phosphate, E4P) 为前体, 缩合生成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸 (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP)。DAHP 再经过莽草酸途径的六步催化反应生成分支酸。以分支酸为前体, 通过两条途径将分支酸分别转化为 3 种芳香族氨基酸, 其中一条途径首先转化为预苯酸, 然后分别合成 L-苯丙氨酸 (L-phenylalanine, L-Phe) 或 L-酪氨酸 (L-tyrosine, L-Tyr), 另一条经由邻氨基苯甲酸生成 L-色氨酸 (L-tryptophan, L-Trp)。其中莽草酸途径中间代谢产物 3-脱氢莽草酸 (3-dehydroshikimate, DHS) 和上述 3 种芳香族氨基酸, 通过代谢途径的理性

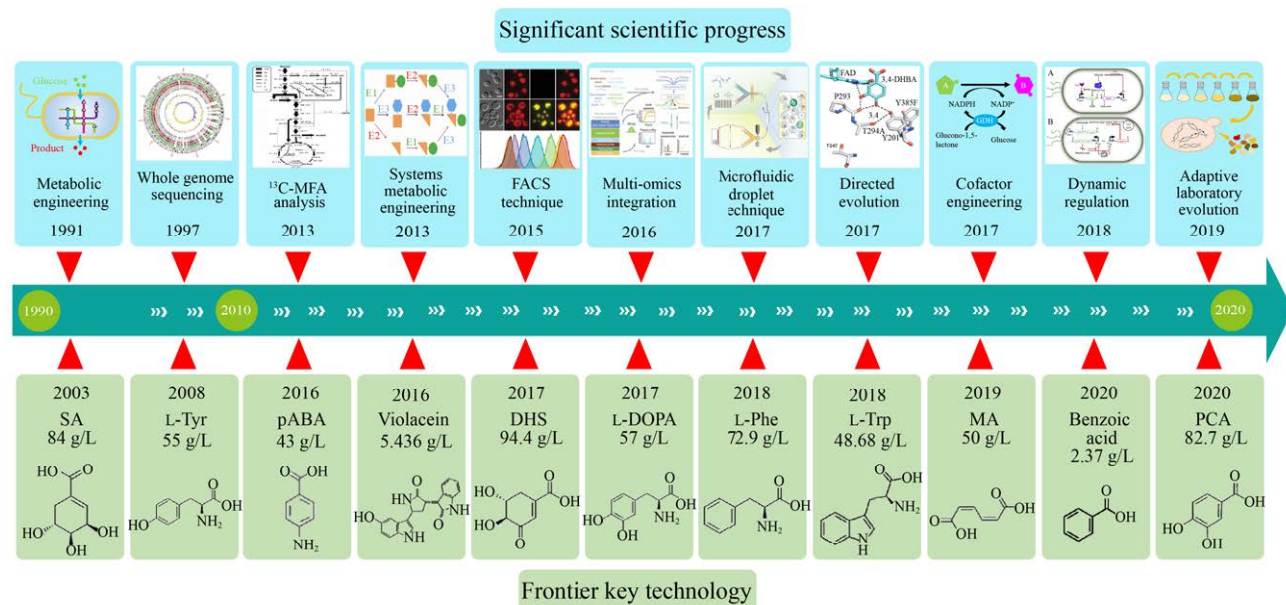


图 1 芳香族化合物代谢工程研究发展历程 (部分示意图节选自参考文献<sup>[9-13]</sup>)。SA: 莽草酸 shikimate; L-Tyr: L-酪氨酸 L-tyrosine; pABA: 对氨基苯甲酸 p-aminobenzoic acid; 紫色杆菌素 violacein; DHS: 3-脱氢莽草酸 3-dehydroshikimate; L-DOPA: 左旋多巴; L-Phe: L-苯丙氨酸 L-phenylalanine; L-Trp: L-色氨酸 L-tryptophan; MA: 顺,顺-粘康酸 cis,cis-muconic acid; 苯甲酸 benzoic acid; PCA: 原儿茶酸 protocatechuic acid)  
Fig. 1 Advances in metabolic engineering for the production of aromatic chemicals.

设计可以衍生为多种芳香族衍生物。近 30 年来发展起来的各种代谢工程研究策略为芳香族衍生物的生物合成研究提供行之有效的解决方案。

## 2 芳香族化合物代谢工程研究策略

### 2.1 途径工程

受氨基酸和核苷酸等生产菌株代谢工程策略的启发, 鄢芳清等<sup>[14]</sup>认为芳香族化合物生物合成途径的代谢工程改造策略也可以总结为“进”“通”“节”“堵”“出”5 个字。

“进”: 增加代谢流量, 例如加快底物 (如葡萄糖) 向细胞内的转运、增加前体物质供应等 (图 2)。当以葡萄糖为碳源时, 大肠杆菌 *Escherichia coli* 利用磷酸转移酶转运系统 (Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, PTS) 将胞外一分子葡萄糖转运至胞内生成一分子葡萄糖-6-磷酸的同时, 伴随消耗一分子 PEP<sup>[15]</sup>。用非

PTS 型葡萄糖转运系统代替 PTS 系统可以减少莽草酸途径底物 PEP 的消耗。将来源于大肠杆菌的半乳糖透性酶 GalP 或运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 的葡萄糖透性酶 Gif 与葡萄糖激酶 Glk 进行共表达, 既增加葡萄糖向胞内的转运, 又减少胞内 PEP 的消耗, 显著提高莽草酸途径的代谢流量<sup>[16-17]</sup>。E4P 是莽草酸途径的另一个前体物质。过表达转酮醇酶基因 *tktA* 可以增加 E4P 的供应, 从而增加莽草酸途径的代谢流量<sup>[18]</sup>。

“通”: 使合成途径畅通, 例如解除产物反馈抑制、增加关键酶基因的表达量或酶活力、敲除负调控因子基因等 (图 2)。芳香族氨基酸生物合成途径有两个关键的节点受代谢产物的反馈抑制, 分别是催化 PEP 和 E4P 缩合的 DAHP 合成酶和催化分支酸进入芳香族氨基酸合成途径的双功能酶分支酸变位酶/预苯酸脱水酶或邻氨基苯甲酸合成酶。大肠杆菌 DAHP 合成酶有 3 种, 分别

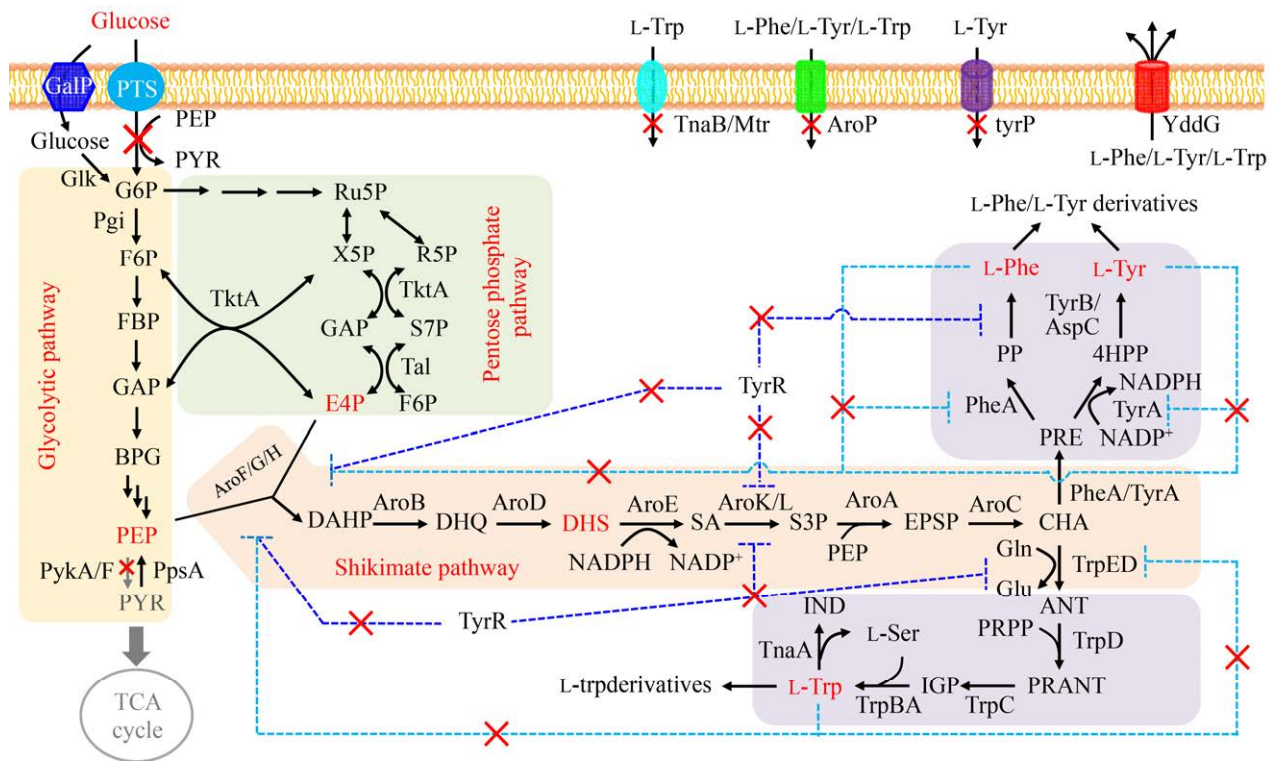


图 2 芳香族氨基酸生物合成途径

Fig. 2 Biosynthetic pathway of aromatic amino acids. PTS: Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system; GalP: galactose permease; Glk: glucokinase; TnaB: low affinity tryptophan transporter; Mtr: high affinity tryptophan transporter; AroP: aromatic amino acid transporter; TyrP: L-tyrosine-specific transporter; YddG: aromatic amino acid exporter; Pgi: glucose-6-phosphate isomerase; TktA: transketolase I; Tal: transaldolase; PpsA: phosphoenolpyruvate synthase; PykA/PykF: pyruvate kinase; AroF/AroG/AroH: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase; AroB: 3-dehydroquinase synthase; AroD: 3-dehydroquinase dehydratase; AroE: dehydroshikimate reductase; AroK/AroL: shikimate kinase; AroA: EPSP synthase; AroC: chorismate synthase; PheA: chorismate mutase/prephenate dehydratase; TyrA: chorismate mutase/prephenate dehydrogenase; TyrB: aromatic-amino-acid transaminase; AspC: aspartate aminotransferase; TrpED: anthranilate synthase complex; TrpC: bifunctional phosphoribosylanthranilate isomerase/indole-3-glycerol phosphate synthase; TrpBA: tryptophan synthase complex; TnaA: tryptophanase. PEP: phosphoenolpyruvate; PYR: pyruvate; G6P: glucose-6-phosphate; F6P: fructose-6-phosphate; FBP: fructose-1,6-biphosphate; GAP: glyceraldehyde-3-phosphate; BPG: 1,3-bisphosphoglycerate; Ru5P: ribulose-5-phosphate; R5P: ribose-5-phosphate; X5P: xylulose-5-phosphate; S7P: sedoheptulose-7-phosphate; E4P: D-erythrose 4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; DHQ: 3-dehydroquinone; DHS: 3-dehydroshikimate; SA: shikimate; S3P: shikimate-3-phosphate; EPSP: 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate; CHA: chorismate; PRE: prephenate; PP: phenylpyruvate; 4HPP: 4-hydroxyphenylpyruvate; ANT: anthranilate; PRPP: 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate; PRANT: 5-phosphoribosylanthranilate; IGP: indole-3-glycerol phosphate; IND: indole.

为 AroG、AroF、AroH。它们分别受 L-苯丙氨酸、L-酪氨酸和 L-色氨酸的反馈抑制，其中 AroG 和 AroF 起主要催化作用<sup>[19]</sup>。代谢工程改造也主要对 AroG 和 AroF 突变体进行表达调控。目前，已报道多种有效的 AroG 和 AroF 解除反馈抑制的突变体，过表达这些突变体基因 (*aroG<sup>fbr</sup>* 和 *aroF<sup>fbr</sup>*) 可以

显著增加莽草酸途径的代谢流量<sup>[14,18,20-21]</sup>。另一个关键节点分支酸变位酶/预苯酸脱水酶 (*pheA* 和 *tyrA* 编码) 或邻氨基苯甲酸合成酶 (*trpE* 编码)，分别控制合成 L-苯丙氨酸、L-酪氨酸和 L-色氨酸，并受对应氨基酸的反馈抑制。过表达相应突变体基因 (*pheA<sup>fbr</sup>*、*tyrA<sup>fbr</sup>*、*trpE<sup>fbr</sup>*) 可以显著提高相

应氨基酸的产量<sup>[14,22-25]</sup>。此外,细胞中还存在负调控转录因子。例如转录因子 TyrR 对莽草酸途径中关键基因 *aroF*、*aroG* 和 *aroL* 以及 L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸合成途径中 *tyrB* 的表达起负调控作用,敲除 *tyrR* 可以显著提高上述酶的催化活性<sup>[26]</sup>。另一个转录因子 TrpR 对 L-色氨酸的合成也起负调控作用<sup>[25,27]</sup>。

“节”: 阻断或弱化代谢副产物合成途径,使代谢流量更多地流向目标产物。芳香族化合物合成途径有 3 处关键的节点需要进行代谢流量调控,分别是葡萄糖-6-磷酸进入 EMP 和 PPP 途径节点、PEP 进入莽草酸途径和转化为丙酮酸节点、分支酸进入 3 种芳香族氨基酸合成途径节点(图 2)。(1) 提高磷酸戊糖途径代谢流量比例,增加莽草酸途径前体 E4P 的供应。野生型大肠杆菌在以葡萄糖为碳源时,进入 EMP 和 PPP 的碳代谢流量比例大约分别为 73% 和 27%<sup>[9,28]</sup>,导致细胞内 E4P 与 PEP 的比例极其不平衡。对 EMP 途径中的 6-磷酸葡萄糖异构酶基因 *pgi* 进行弱化调控,促使代谢流量进入 PPP 途径,提高细胞内 E4P 的比例。(2) 增加莽草酸途径前体 PEP 的供应。在自然条件下,PEP 主要转化为丙酮酸,只有少量的 PEP 进入莽草酸途径<sup>[9,28]</sup>。敲除丙酮酸激酶基因 *pykF* 或 *pykA*,减少 PEP 转化为丙酮酸,可以显著提高莽草酸途径中间代谢产物的产量<sup>[29-30]</sup>。在敲除 *pykA* 的同时,过表达磷酸烯醇丙酮酸合酶基因 *ppsA*,可以进一步提高 DHS 的产量<sup>[30]</sup>。(3) 阻断分支酸到其他芳香族氨基酸支路途径,促使细胞积累某一种芳香族氨基酸。例如在构建高产 L-苯丙氨酸菌株时,阻断 L-酪氨酸合成途径,有利于提高 L-苯丙氨酸产量<sup>[22,31]</sup>;反之,则用来构建高产 L-酪氨酸菌株<sup>[32-33]</sup>。L-色氨酸合成途径代谢流量很小,又存在反馈抑制效应,因此在构建 L-苯丙氨酸或 L-酪氨酸高产菌株时,无需改造 L-色氨酸合成途径。在构建高产 L-色氨酸菌株时,阻断 L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸合成途径有利于提高 L-色

氨酸产量<sup>[34]</sup>;但是由于存在反馈抑制效应,未阻断这两个分支途径也可获得较高的 L-色氨酸产量<sup>[24-25]</sup>,表明只要保证 L-色氨酸合成途径的畅通,该分支途径就不是影响 L-色氨酸生物合成的主要因素。

“堵”: 阻断目标产物降解途径,促进产物积累(图 2)。例如 DHS 是莽草酸途径中的代谢中间产物。在构建高产 DHS 菌株时,敲除莽草酸脱氢酶基因 *aroE* 虽然可以阻断 DHS 到下游产物的转化,但是由于细胞无法继续合成芳香族氨基酸、叶酸等重要营养物质,导致发酵培养时需要向培养基中添加这些物质或者添加大量的酵母粉、蛋白胨等有机营养成分<sup>[30,35]</sup>。笔者所在课题组利用弱启动子和将起始密码子 ATG 替换为 TTG 组合弱化调控的方式弱化 *aroE* 的表达,促使细胞积累 DHS,这样既不影响细胞生长,又无需添加外源营养物质<sup>[36]</sup>。色氨酸酶(TnaA)催化 L-色氨酸转化为吲哚和 L-丝氨酸,敲除该基因可以减少 L-色氨酸降解<sup>[37-38]</sup>。通过敲除转运蛋白,减少胞外产物向胞内转运也可以提高目标产物的产量,如 L-酪氨酸特异性转运蛋白<sup>[23]</sup>、L-色氨酸透性酶<sup>[39]</sup>等。

“出”: 增加目标产物向细胞外运输,降低产物反馈抑制或细胞毒性(图 2)。过表达芳香族氨基酸外排蛋白基因 *yddG* 可以降低产物的反馈抑制效应,从而提高芳香族氨基酸产量<sup>[24,31,40]</sup>。利用水相-有机相两相发酵的方式,将目的产物不断萃取到有机相,可以减弱目的产物的细胞毒性。

## 2.2 高通量筛选技术

对于基因组水平或单个基因的随机突变体文库筛选,需要具备高通量的筛选技术,例如流式细胞术、液滴微流控等分选技术,将阳性突变体从复杂的文库中有效地筛选出来。高通量筛选技术依赖于稳定、高效的检测信号或指标,如荧光信号、颜色或吸光度信号、生长速率变化指标等。

### 2.2.1 基于荧光信号变化筛选

基于荧光信号变化筛选大多数是采用转录因

子类型的传感器。笔者所在课题组利用转录组测序技术筛选出能够特异性响应 DHS 浓度变化的基因 *cusR*, 将其与绿色荧光蛋白基因 *gfp* 进行融合表达, 形成能够特异性响应胞内 DHS 浓度变化的生物传感器, 然后分别利用流式细胞术和液滴微流控筛选技术从随机突变体文库中成功筛选出 DHS 产量显著提高的突变体<sup>[41-42]</sup>。Liu 等<sup>[43]</sup>利用转录因子 ShiR 和其作用的靶基因 *shiA* 启动子序列构建响应莽草酸浓度变化的生物传感器, 从表达 *tktA* 的 RBS 文库突变体中成功筛选出莽草酸产量提高 90% 的菌株。基于转录因子 TyrR 和 PadR 的生物传感器也分别在大肠杆菌和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中实现了 L-苯丙氨酸<sup>[44]</sup>和对香豆酸<sup>[45]</sup>高产菌株的筛选。Chen 等<sup>[46]</sup>利用不动杆菌 *Acinetobacter baylyi* ADP1 来源的 P<sub>sal</sub> 启动子和 SalR 调节系统, 在大肠杆菌中开发并表征了一种简单、灵敏的阿司匹林诱导生物传感器 SalR/P<sub>sal</sub>。利用不同强度的启动子以及 P<sub>sal</sub> 启动子, 分别尝试了简单调节基因线路 (SRS) 和自动调节基因线路 (PAR), 并证明在 0.05–1.00 μmol/L 阿司匹林浓度范围内, 两种基因线路都以剂量依赖性的方式发挥调控作用。虽然目前已经实现了水杨酸的从头合成, 但是由于缺乏有效的乙酰基转移酶, 尚未发现由水杨酸进一步合成阿司匹林的报道。笔者认为阿司匹林生物传感器的开发可能有助于筛选有效的乙酰基转移酶。

除了转录因子类型的传感器外, Abatamarco 等<sup>[10]</sup>开发了一种基于 RNA Spinach-based aptamers 类型的传感器, 将胞外产物浓度变化转化为荧光信号, 实现了 L-酪氨酸高产菌株的筛选, 并证明可以应用于 L-苯丙氨酸和 L-色氨酸高产菌株的筛选。

某些关键中间代谢产物 (如 E4P、PEP) 供应直接影响芳香族化合物的产量。因此, 构建响应中间代谢产物的生物传感器也可以间接表征目标产物的合成能力。为了实现对中心代谢途径 (如 EMP 和 PPP) 代谢物的实时监控, Ding 等<sup>[47]</sup>以人源的次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶为配体结

合域, 通过酶定向进化技术分别建立了 5-磷酸核糖-1-焦磷酸、E4P 和 3-磷酸甘油酸生物传感器。然后结合流式筛选提高了 E4P 生物传感器的响应度, 并将该元件成功应用于筛选高产 L-苯丙氨酸菌株的代谢工程改造。这项工作不仅为实时动态检测 EMP 与 PPP 途径的代谢过程提供了很好的技术支撑, 也为大范围分子生物传感器的计算设计及开发提供了一种新的研究策略。

### 2.2.2 基于颜色或吸光度变化筛选

L-酪氨酸是黑色素的合成前体。在产 L-酪氨酸的大肠杆菌中表达酪氨酸酶基因会导致菌落变黑, 并且在一定浓度范围内, 黑色深浅与 L-酪氨酸产量的高低呈正相关<sup>[48]</sup>。利用该筛选技术, 在基于全局性转录调控因子随机突变体文库中成功筛选到 3 株 L-酪氨酸产量提高 91%–113% 的高产菌株<sup>[33]</sup>。笔者所在研究组利用对香豆酸在 310 nm 处有特异性吸收峰的特性, 建立了对香豆酸含量的高通量检测方法, 利用该方法从酪氨酸解氨酶随机突变体文库中筛选到了催化活性提高 1 倍的突变体<sup>[49]</sup>。

### 2.2.3 基于生长速率指标筛选

将细胞的生长速率与酶活性或产物浓度相耦合, 生长速率越快, 酶活性或代谢物产量越高, 从而在突变体文库中筛选出酶活性或产量显著提高的突变体。Liu 等<sup>[44]</sup>将 TyrR 传感器中的报告基因 *yfp* 替换成链霉素抗性基因 *strA*, 因此突变菌株的 L-苯丙氨酸产量越高, 细胞在抗性平板上生长的速率越快。通过 4 轮突变筛选, L-苯丙氨酸产量提高菌株的阳性率达 68.9%, 其中产量最高提升了 160.2%。Kramer 等<sup>[50]</sup>利用大肠杆菌作为宿主细胞, 阻断 NADPH 到 NADH 的转化, 导致胞内积累大量 NADPH, 引起细胞还原力失衡, 菌株生长极其缓慢。然后利用该菌株筛选 NADPH 依赖型的羧酸还原酶突变体文库, 使胞内的 NADPH/NADP<sup>+</sup> 趋于平衡, 细胞生长速率明显加快; 酶催化活力越高, 细胞生长速率越快, 由此筛选到酶活力显著提高的突变体。该系统也可以

应用于其他 NADPH 依赖型催化酶突变体文库的筛选。

### 2.3 基因精细表达调控

细胞内的代谢网络是由许多代谢途径组成的复杂网络系统,而每条代谢途径一般是由多个酶分子构成的催化反应。每种催化酶基因表达量既要满足催化反应的需要,又不能过量表达而引起代谢网络的失衡。利用不同强度的启动子元件或 RBS 元件对靶基因进行转录水平或翻译水平的精细表达调控是一种常用又十分有效的代谢工程调控手段。用大肠杆菌自身 GalP-Glk 系统代替 PTS 系统可以减少胞内 PEP 的消耗,为莽草酸途径提供更多的合成前体。Lu 等<sup>[51]</sup>利用筛选的 3 种不同强度(强、中、弱)的启动子对 *galP* 和 *glk* 的表达进行组合调控,获得既有利于提高葡萄糖利用效率,又减少胞内 PEP 消耗的最佳的启动子组合。为了平衡莽草酸途径和三羧酸循环途径的碳流量, Kim 等<sup>[52]</sup>利用 5 种不同强度的 5'-非翻译区序列(包含 RBS)对 *ppsA* 的表达进行翻译后调控,获得的最佳调控菌株的 L-酪氨酸合成能力比对照菌株提高了大约 7 倍。

此外,模块化调控也是一种有效的代谢工程调控手段,即将代谢途径基因分成几个功能互补的调控模块,然后对每个模块分别进行调控,从而获得最佳的调控组合。Lin 等<sup>[53]</sup>设计了一条新的顺,顺-粘康酸合成途径,分别用低、中、高拷贝数的质粒对大肠杆菌内源的分支酸合成模块、异源的水杨酸和顺,顺-粘康酸合成模块进行组合调控,使顺,顺-粘康酸产量提升了 275 倍。

### 2.4 辅因子工程

代谢途径中的许多催化反应需要辅因子(如 NADH/NAD<sup>+</sup>、NADPH/NADP<sup>+</sup>、FADH<sub>2</sub>/FAD 等)的参与,例如脱氢反应、还原反应、羟化反应等等。虽然这些辅因子在细胞内的含量较低,但是如果打破辅因子平衡往往会影响细胞内物质和能量代谢的正常运行。因此,增加合成反应所需类

型的还原力供给或构建辅因子循环再生体系有利于提高某些化合物的产量。芳香族氨基酸生物合成途径有两个催化反应需要辅因子 NADPH/NADP<sup>+</sup>的参与,其中一个为莽草酸脱氢酶催化 DHS 生成莽草酸的反应,需要 NADPH 参与;另一个为预苯酸脱氢酶催化预苯酸生成 4-羟基苯丙酮酸的反应,需要 NADP<sup>+</sup>参与<sup>[54]</sup>。因此,根据合成途径分析,DHS 和 L-酪氨酸的合成途径辅因子循环体系是平衡的,但是合成莽草酸和 L-苯丙氨酸等化合物的合成辅因子是失衡的,需要增加胞内 NADPH 供应。Kogure 等<sup>[55]</sup>通过检测不同莽草酸菌株的胞内辅因子和 ATP 的含量,发现莽草酸产量高的菌株胞内 NADPH/NADP<sup>+</sup>比例显著低于产量低的菌株,表明莽草酸的合成消耗大量的 NADPH。另有研究报道,过表达葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 *zwf*<sup>[29]</sup>、转氢酶基因 *pantAB* 或 NAD 激酶基因 *nadK*<sup>[56]</sup>均可以提高胞内 NADPH/NADP<sup>+</sup>的比例,从而增强莽草酸的合成能力。Liu 等<sup>[44]</sup>通过筛选 L-苯丙氨酸工程菌株的突变体文库,发现 *pantB* (A167T) 和 *nadK* (A145V) 基因点突变显著提高了 L-苯丙氨酸的产量。

其他芳香族衍生物的生物合成也需要辅因子的参与,例如没食子酸、2-苯乙醇、L-苯乳酸、酪醇、左旋多巴等。因此,这些物质的生物合成除了要提高相应催化酶的酶活力以外,构建胞内辅因子循环再生体系也非常重要。为了提高 2-苯乙醇的产量,Wang 等<sup>[57]</sup>利用谷氨酸脱氢酶的脱氨和 NAD(P)H 再生活性,将芳香族氨基酸转氨酶和醇脱氢酶催化反应连接在一起,构成 NAD(P)H 循环再生系统,利用全细胞催化的方式将 L-苯丙氨酸转化为 2-苯乙醇。

### 2.5 适应性进化

利用实验室适应性进化 (Adaptive laboratory evolution, ALE) 技术可以对生长受限的菌株(如生长缓慢、对某种产物敏感、底物利用率低等)按照设定的培养条件进行适应性驯化改良,逐渐

自发积累有益突变,从而提高工程菌的发酵生产性能<sup>[58]</sup>。利用该技术, Krömer 等<sup>[59]</sup>通过 29 次传代培养,将酿酒酵母对对氨基苯甲酸的耐受性浓度由 0.62 g/L 逐渐提高至 1.65 g/L,驯化菌株的生长速率达到野生型菌株的 88.5%。笔者所在研究组为了促进对香豆酸的生物合成,将前体菌——高产 L-酪氨酸菌株在含有较高浓度对香豆酸的培养基中进行驯化传代培养,逐渐提高菌株的耐受性,为 L-酪氨酸到对香豆酸的生物合成提供合适的前体菌株(数据未发表)。

## 2.6 定向进化

许多芳香族化合物生物合成途径的催化酶来源于其他物种,并且这些异源酶的催化活性往往不能满足宿主细胞大量合成目标产物的需求,从而成为生物合成途径中的限速步骤。酶定向进化技术大大加快了酶活性改造的效率,为芳香族化合物的代谢工程研究提供有效的技术手段。天然的 4-羟基苯甲酸羟化酶 PobA 催化 4-羟基苯甲酸转化为原儿茶酸,其突变体 Y385F 可以进一步催化原儿茶酸羟化生成没食子酸<sup>[60]</sup>,但是催化活性较低。Chen 等<sup>[11]</sup>对 PobA<sup>Y385F</sup> 突变体催化中心位点关键氨基酸进行理性设计分析,通过酶活性检测成功筛选出新的突变体 PobA<sup>Y385F,T294A</sup>。该突变体对两种底物 4-羟基苯甲酸和原儿茶酸的催化效率分别提高了 4.5 倍和 4.3 倍,全细胞催化的 4-羟基苯甲酸生成没食子酸,摩尔转化率达到 93%。

## 2.7 全细胞或体外酶催化

对于某些合成途径较为复杂或产物毒性较强或消耗大量辅酶的芳香族化合物,利用简单、廉价的碳源从头合成的方式难以达到较高的产量或转化率,采用表达关键酶的细胞进行全细胞催化或利用未纯化的粗酶液或纯化酶液进行体外催化的方式有利于获得更高的产量或转化率。由于原儿茶酸具有较强的细胞毒性,笔者所在研究组前期以葡萄糖为碳源进行从头合成,只能获得大约 33.3 g/L 的原儿茶酸<sup>[61]</sup>。后来采用间接合成的方

式,首先通过补料发酵获得高浓度的 DHS 底物 (>90 g/L),然后利用表达 3-脱氢莽草酸脱水酶的大肠杆菌进行全细胞催化,获得 85 g/L 以上的原儿茶酸,基本检测不到 DHS 残留(数据未发表)。Romasi 和 Lee<sup>[62]</sup>在大肠杆菌中过表达氨基转移酶基因 *aspC*、吡啶-3-丙酮酸脱羧酶基因 *idpC* 和吡啶-3-乙酸脱氢酶基因 *iad1*,同时敲除色氨酸酶基因 *tnaA*,该菌株以 4 g/L 的 L-色氨酸为底物催化反应 24 h 获得 3 g/L 的吡啶-3-乙酸。体外生物酶催化具有产物专一、副产物少、易于纯化、不受产物毒性抑制等优点。利用葡萄糖脱氢酶 GDH 的辅酶再生功能,将其与消耗还原型辅酶的羧酸还原酶 CAR 相耦合,可以将含有羧基的化合物(如苯甲酸、苯甲酸的氯代或甲氧基化合物、反式肉桂酸等)转变为相应的醛类化合物,并且具有很强的立体选择性<sup>[63]</sup>。

## 2.8 产物毒性控制

许多芳香族化合物具有细胞毒性,例如没食子酸、原儿茶酸、对氨基苯甲酸、2-苯乙醇、苯乙烯、酪醇等。因此,研究人员尝试了多种方法来降低产物的细胞毒性,提高细胞合成芳香族化合物的能力。

### 2.8.1 选用耐受性强的宿主或提高宿主的耐受能力

上文提到,利用 ALE 技术可以对宿主细胞进行驯化改良,提高菌株的发酵生产性能。此外,选用耐受性更强的天然宿主细胞也是一种有效的备选方案。不同的宿主细胞对不同化学物质的耐受能力不同。选用耐受性强的宿主细胞有利于获得更高的产量或转化率。Kubota 等<sup>[64]</sup>比较谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum*、大肠杆菌、酿酒酵母、恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 4 种宿主对对氨基苯甲酸的耐受性,发现谷氨酸棒状杆菌在含有 400 mmol/L 对氨基苯甲酸的培养基中仍然能够生长,其他 3 种细胞的耐受性浓度均不超过 200 mmol/L,因此选取谷氨酸棒状杆



菌作为合成对氨基苯甲酸的宿主细胞。

### 2.8.2 利用全细胞催化或体外酶催化方式

上文提到,对于有细胞毒性的芳香族化合物,采用全细胞催化或体外酶催化的生产方式有助于避免产物对细胞产生毒性作用。

### 2.8.3 将目标化合物转化为无毒产物

将有毒的芳香族化合物转化为无毒的衍生物或转化为沉淀形式,然后采用化学方法再转化为目标产物。醛类化合物的化学稳定性较差,很难在细胞内大量积累。Hansen 等<sup>[65]</sup>首先在裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 中整合 3 个外源基因,分别为 3-脱氢莽草酸脱水基因 *3dsd*、芳香族羧酸还原酶基因 *acar*、*O*-甲基转移酶基因 *omt*,敲除醇脱氢酶基因 *adh6*,使细胞能够积累香草醛。通过表达异源的 UDP 葡萄糖基转移酶,促使香草醛转化为无毒的香草醛  $\beta$ -D-葡萄糖苷,细胞的合成能力得到进一步提升。当对氨基苯甲酸与还原性糖(如葡萄糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖等)共存时,氨基与还原糖的醛基会自发形成糖基化产物,该产物在酸性条件下会水解为原来的两种物质<sup>[64]</sup>。糖基化产物的形成可能有助于降低氨基苯甲酸类物质的细胞毒性。

除了目标产物外,某些副产物的生成也会抑制细胞生长。沸石是一种天然的多孔水合铝硅酸盐材料,具有吸附  $\text{NH}_4^+$  的特性,可以用来降低脱氨类反应产生的  $\text{NH}_4^+$  对细胞的毒害。Wang 等<sup>[57]</sup>在全细胞催化 L-苯丙氨酸合成 2-苯乙醇的反应液中添加 1 g/L 的沸石,底物的摩尔转化率由 60.8% 提高至 74.4%。

### 2.8.4 采用水-有机两相发酵

两相发酵是指利用目标产物在水相和有机相中的溶解度或分配系数差异,使产物从水相萃取到有机相中,达到产物和细胞分离的目的。该技术在 2-苯乙醇和苯酚等有较强细胞毒性的芳香族化合物的发酵研究中得到了广泛应用<sup>[66-68]</sup>。

## 2.9 动态调控

利用途径工程技术虽然可以显著提高目标产

物的产量,但是往往会导致细胞出现各种生理问题,例如细胞内碳源和能源的过度消耗、有毒中间代谢产物积累、氧化还原系统失衡等,这些问题会严重影响细胞的生长。利用代谢途径动态调控技术可以动态调控细胞生长和目的产物的合成,使两者达到动态平衡,从而有利于目的产物合成达到最大化。动态调控方式主要分为以下 3 种类型:基于发酵参数的调控、基于代谢产物的调控、基于群体感应的调控<sup>[12]</sup>。为了促进顺,顺-粘康酸的生物合成,Yang 等<sup>[69]</sup>利用恶臭假单胞菌 KT2440 来源的特异性响应顺,顺-粘康酸的转录因子 CatR 和其结合的 *catBCA* 启动子序列  $P_{MA}$ ,结合 RNA 干扰技术(RNAi),构建了能够平衡 PEP 在 EMP 和莽草酸途径中的代谢流量。首先,顺,顺-粘康酸的积累抑制 CatR 的转录激活活性,促进顺,顺-粘康酸合成途径基因的过表达;其次,CatR 的转录激活活性被抑制,导致 PEP 羧化酶的表达水平下调,促进 PEP 进入莽草酸途径。相反,PEP 则进入三羧酸循环途径进行分解代谢。Wu 等<sup>[70]</sup>构建一系列受 L-苯丙氨酸诱导的不同表达强度的启动子序列,然后利用这些启动子调控莽草酸途径中的关键基因 *aroK* 的表达,获得 L-苯丙氨酸产量提高 1.36 倍的菌株。

除了上述策略以外,芳香族化合物的代谢工程研究还有许多其他策略,比如高通量组学分析技术,包括基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学,以及将这些组学技术进行整合的多组学分析技术。这些组学分析技术有助于全面系统分析微生物生理代谢功能的状况以及可能出现的问题,提高了反向代谢工程中分析特殊生理表型可能存在的遗传调控机制。此外,利用质粒表达芳香族化合物合成途径的关键基因虽然相对容易获得产量较高工程菌株,但是质粒的不稳定性和对宿主细胞的代谢负担却是制约其应用于大规模工业化发酵生产的主要因素。通过基因组整合方式构建的工程菌株,虽然基因表达强度相对较弱、构建难度大,但是遗传稳定性好、无需添加抗生

素、宿主代谢负担小。因此,该方法对于生产大宗化学品和某些精细化学品工程菌株的选育来说仍然是值得采用的构建方式。

### 3 芳香族衍生物合成途径拓展

DHS、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸、L-色氨酸分别是各自合成途径的重要平台化合物,可以进一步转化为许多重要的芳香族衍生物。因此,构建上述重要节点化合物的底盘细胞对于获得相应芳香族衍生物的高产细胞工厂具有重要意义。表1列举了一些具有代表性的芳香族衍生物高产细胞工厂构建的研究进展。

#### 3.1 DHS 底盘细胞构建及其衍生物的生物合成

DHS 是莽草酸途径中的一种代谢中间产物,既可作为一些化学合成制剂和药物的中间原料,还是一种十分有效的抗氧化剂<sup>[1]</sup>。DHS 极易溶于水,化学性质较稳定,对细胞毒性很小,合成过程不需要额外消耗还原力和能量。因此,发酵过程中大量积累 DHS,既不会抑制细胞生长,也不会扰乱细胞内辅酶和能量代谢平衡。对莽草酸途

径起始化合物 DAHP 合成途径进行化学计量分析,将丙酮酸循环计算在内,DAHP 相对于葡萄糖的理论摩尔转化率为 86%<sup>[71]</sup>。因为一分子 DHS 对应一分子 DAHP,所以 DHS 相对于葡萄糖的理论摩尔转化率也是 86%。密歇根州立大学的 J. W. Frost 研究组通过质粒表达关键基因的方式,先后评价了转酮醇酶基因 *tktA*、磷酸烯醇丙酮酸合酶基因 *ppsA*、葡萄糖转运系统基因对增加莽草酸途径代谢产物的重要作用,利用无机盐培养基进行补料发酵,获得了一系列高产 DHS 菌株<sup>[16,18,35]</sup>。Choi 等<sup>[30]</sup>在基因组上对 DHS 合成途径进行一系列遗传改造,获得高产 DHS 菌株 InhaM103。该菌株在添加少量酵母粉、蛋白胨等有机物质的无机盐培养基中,以葡萄糖和甘油混合碳源为底物,补料发酵 120 h 积累 117 g/L DHS。笔者所在研究组也通过在基因组上进行一系列遗传改造,获得 DHS 产量达 94.4 g/L 的高产菌株,所用发酵培养基为添加适量葡萄糖的无机盐培养基<sup>[36]</sup>。这些高产 DHS 菌株是构建下游芳香族氨基酸以及其他芳香族衍生物工程菌株的优良底盘细胞。

表 1 一些代表性的芳香族衍生物微生物合成研究进展

Table 1 Advances in microbial production of aromatic chemicals

Product	Regulated genes	Host	Feedstock	Culture style	Titer (g/L)	References
3-dehydroshikimate	Deletion of <i>tyrR</i> , <i>ptsG</i> and <i>pykA</i> . Overexpression of <i>aroB</i> , <i>aroD</i> , <i>ppsA</i> , <i>galP</i> , <i>aroG</i> and <i>aroF</i> in chromosome	<i>E. coli</i>	Glucose, glycerol, yeast extract, tryptone	Fed-batch	117.0	[30]
3-dehydroshikimate	Deletion of <i>ptsI</i> and <i>tyrR</i> . Down-regulation of <i>aroE</i> , <i>pykF</i> , <i>pykA</i> and <i>pgi</i> , and overexpression of <i>aroF<sup>tblr</sup></i> , <i>tktA</i> , <i>galP</i> and <i>glk</i> in chromosome	<i>E. coli</i>	Glucose	Fed-batch	94.4	[36]
<i>cis,cis</i> -muconic acid	Overexpression of <i>absF</i> , <i>aroY</i> and <i>catA</i> with plasmid in DHS chassis	<i>E. coli</i>	Glucose, glycerol, yeast extract, tryptone	Fed-batch	64.5	[30]
Shikimate	Deletion of <i>aroL</i> , <i>aroK</i> , <i>ptsH-ptsI-crr</i> , <i>aroB</i> and <i>serA</i> . Overexpression of <i>glf</i> , <i>glk</i> , <i>aroF<sup>tblr</sup></i> , <i>tktA</i> , <i>aroE</i> and <i>serA</i> in plasmid	<i>E. coli</i>	Glucose, yeast extract	Fed-batch	84.0	[72]
Shikimate	Deletion of <i>aroK</i> , <i>qusB</i> , <i>qusD</i> , <i>ptsH</i> and <i>hdpA</i> . Overexpression of <i>tkt</i> , <i>tal</i> , <i>iolT1</i> , <i>glk1</i> , <i>glk2</i> , <i>ppgk</i> and <i>gapA</i> in chromosome, and <i>aroG<sup>S180F</sup></i> , <i>aroB</i> , <i>aroD</i> and <i>aroE</i> in plasmid, respectively	<i>C. glutamicum</i>	Glucose, yeast extract, casamino acid	Fermenter-controlled growth-arrested cell reaction, 10% (W/V) wet cell weight	141.2	[55]

(待续)

(续表 1)

Product	Regulated genes	Host	Feedstock	Culture style	Titer (g/L)	References
Protocatechuic acid	Deletion of <i>qusD</i> , <i>pcaHG</i> and <i>poxF</i> . Overexpression of <i>aroG</i> <sup>S180F</sup> , <i>aroA</i> , <i>aroD</i> , <i>aroE</i> , <i>aroCKB</i> , <i>qusB</i> , <i>ubiC</i> and <i>pobA</i> in chromosome	<i>C. glutamicum</i>	Glucose, yeast extract, casamino acid	Fermenter-controlled growth-arrested cell reaction, 10% (W/V) wet cell weight	82.7	[73]
<i>p</i> -aminobenzoic acid	Deletion of <i>ldhA</i> . Overexpression of <i>aroB</i> , <i>aroD</i> , <i>aroE</i> , <i>aroK</i> , <i>aroA</i> , <i>aroC</i> and <i>aroG</i> <sup>S180F</sup> in chromosome, and <i>pabAB</i> and <i>pabC</i> in plasmid, respectively	<i>C. glutamicum</i>	Glucose, yeast extract, casamino acid	Fed-batch	43.0	[64]
L-phenylalanine	Deletion of <i>ptsH</i> . Mutation of <i>tyrR</i> . Combinatorial modulation of <i>galP</i> and <i>glk</i> in chromosome. Overexpression of <i>aroF</i> , <i>aroD</i> , <i>pheA</i> <sup>T326P</sup> in plasmid	<i>E. coli</i>	Glucose, yeast extract	Fed-batch	72.9	[22]
2-phenylethanol	Overexpression of <i>tyrB</i> , <i>aro10</i> and <i>par</i> (or <i>adh1</i> ) in plasmid	<i>E. coli</i>	L-phenylalanine, L-glutamic acid	Whole-cell biocatalyst	9.14	[57]
D-phenyllactic acid	Induction of <i>pprA</i> expression with plasmid in L-phenylalanine chassis	<i>E. coli</i>	Glucose	Fed-batch	29.2	[74]
Benzoic acid	Deletion of <i>tyrA</i> and <i>yddG</i> . Overexpression of <i>aroL</i> in chromosome. Induction of <i>phdB</i> , <i>phdC</i> , <i>phdE</i> , <i>RgPAL</i> and <i>ScCCL</i> <sup>A294G</sup> expression in plasmid	<i>E. coli</i>	Glucose	Fed-batch	2.37	[75]
L-tyrosine	Deletion of <i>pheLA</i> . Overexpression of <i>tyrA</i> in chromosome of L-phenylalanine chassis	<i>E. coli</i>	Glucose	Fed-batch	55.0	[32]
L-DOPA	Overexpression of <i>aroE</i> and <i>hpaBC</i> in chromosome of DHS chassis	<i>E. coli</i>	Glucose, yeast extract	Fed-batch	57.0	[76]
Hydroxytyrosol	Deletion of <i>hpaD</i> and <i>mhpB</i> . Overexpression of <i>gltS</i> , <i>nadA</i> and <i>pdxJ</i> in chromosome, and co-expression of <i>lcaro</i> , <i>bsgdh</i> , <i>pmkdc</i> and <i>ecadh2</i> in plasmid	<i>E. coli</i>	L-DOPA, L-glutamic acid	Whole-cell biocatalyst	169.2	[77]
Salvianic acid A	Deletion of <i>ptsG</i> , <i>tyrR</i> , <i>pykA</i> , <i>pykF</i> and <i>pheA</i> . Co-expression of <i>aroG</i> <sup>fbr</sup> , <i>tyrA</i> <sup>fbr</sup> , <i>aroE</i> , <i>ppsA</i> , <i>tktA</i> , <i>glk</i> , <i>d-ldh</i> <sup>Y52A</sup> and <i>hpaBC</i> in plasmid	<i>E. coli</i>	Glucose, yeast extract	Fed-batch	7.14	[78]
L-tryptophan	Deletion of <i>pta</i> and <i>mtr</i> , and overexpression of <i>yddG</i> in chromosome of L-tryptophan chassis	<i>E. coli</i>	Glucose, yeast extract	Fed-batch	48.68	[24]
Violacein	Overexpression of <i>vioA</i> , <i>vioB</i> , <i>vioC</i> , <i>vioD</i> and <i>vioE</i> with plasmid in L-tryptophan chassis	<i>C. glutamicum</i>	Glucose, corn steep liquor	Fed-batch	5.436	[79]
Indole-3-acetic acid	Deletion of <i>tnaA</i> . Overexpression of <i>aspC</i> , <i>idpC</i> and <i>iad1</i> in plasmid	<i>E. coli</i>	L-tryptophan	Whole-cell biocatalyst	3.0	[62]

DHS 作为平台化合物可以转化为多种芳香族衍生物 (图 3), 其合成途径所用的催化酶大多数来源于其他物种。目前, 已报道由 DHS 到儿茶酚有 5 条合成途径, 然后儿茶酚在儿茶酚 1,2-氧化酶催化下生成顺,顺-粘康酸<sup>[1,53,80-83]</sup>。但是研究较多、合成效率较高的是 DHS—原儿茶酸—儿茶酚—顺,顺-粘康酸途径, 其顺,顺-粘康酸产量最高

达 64.5 g/L。该途径中间产物原儿茶酸和儿茶酚细胞毒性较强, 并且发酵液中有少量 DHS 和原儿茶酸残留, 可能是因为原儿茶酸脱羧酶和儿茶酚 1,2-氧化酶的催化活性较低<sup>[30]</sup>。通过化学加氢方法, 顺,顺-粘康酸很容易转化为己二酸。利用生物酶催化法也有报道, 但是酶催化活性很低, 仅能催化 0.7 mmol/L 顺,顺-粘康酸底物, 转化率为 91.1%<sup>[84]</sup>。

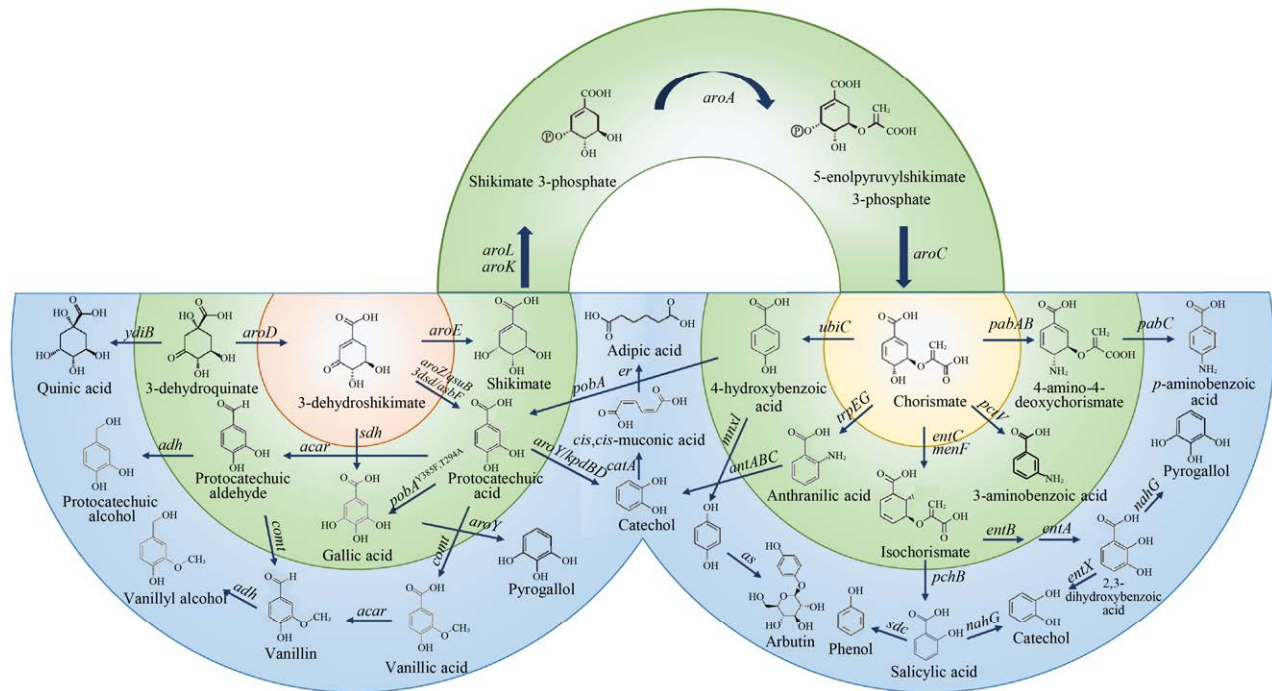


图 3 DHS 衍生物的生物合成 (3-脱氢莽草酸 3-dehydroshikimate, 莽草酸 shikimate, 3-脱氢奎尼酸 3-dehydroquinic acid, 奎尼酸 quinic acid, 原儿茶酸 protocatechuic acid, 原儿茶醛 protocatechuic aldehyde, 原儿茶醇 protocatechuic alcohol, 香草酸 vanillic acid, 香草醛 vanillin, 香草醇 vanillyl alcohol, 没食子酸 gallic acid, 焦性没食子酸 pyrogallol, 儿茶酚 catechol, 顺,顺-粘康酸 *cis,cis*-muconic acid, 己二酸 adipic acid, 莽草酸 3-磷酸 shikimate 3-phosphate, 5-烯丙丙酮酰莽草酸-3-磷酸 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate, 分支酸 chorismate, 4-羟基苯甲酸 4-hydroxybenzoic acid, 对苯二酚 hydroquinone, 熊果苷 arbutin, 邻氨基苯甲酸 anthranilic acid, 异分支酸 isochorismate, 水杨酸 salicylic acid, 苯酚 phenol, 2,3-二羟基苯甲酸 2,3-dihydroxybenzoic acid, 3-氨基苯甲酸 3-aminobenzoic acid, 4-氨基-4-脱氧分支酸 4-amino-4-deoxychorismate, 对氨基苯甲酸 *p*-aminobenzoic acid)

Fig. 3 Biosynthesis of DHS derivatives from extended shikimate pathway. Genes and the enzymes they encode: *ydiB*: shikimate dehydrogenase/quinic acid dehydrogenase; *aroD*: 3-dehydroquinic acid dehydratase; *aroE*: shikimate dehydrogenase; *aroK/aroL*: shikimate kinase; *aroA*: 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase; *aroC*: chorismate synthase; *aroZ/qsuB/3dsd/asbF*: 3-dehydroshikimate dehydratase; *aroY/kpdBD*: protocatechuic acid decarboxylase; *catA*: catechol 1,2-dioxygenase; *er*: enoate reductase; *sdh*: shikimate dehydrogenases; *pobA*: 4-hydroxybenzoic acid hydrolyase; *acar*: aryl carboxylic acid reductase; *comt*: caffeate *O*-methyltransferase; *adh*: alcohol dehydrogenase; *ubiC*: chorismate lyase; *mnxI*: 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase; *as*: arbutin synthase; *trpEG*: anthranilate synthase; *antABC*: anthranilate 1,2-dioxygenase; *entC/menF*: isochorismate synthase; *entB*: isochorismatase; *pchB*: isochorismate pyruvate lyase; *nahG*: salicylate 1-monooxygenase; *sdc*: salicylate decarboxylase; *entA*: 2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase; *entX*: 2,3-dihydroxybenzoate decarboxylase; *pabAB*: 4-amino-4-deoxychorismate synthase; *pabC*: 4-amino-4-deoxychorismate lyase; *pctV*: 3-aminobenzoic acid synthase.

DHS 经分支酸可以进一步转化为对氨基苯甲酸, 而对氨基苯甲酸是合成叶酸的前体物质<sup>[85]</sup>。大肠杆菌中含有叶酸合成途径, 但是代谢流量很低。因此, 构建对氨基苯甲酸生产菌株需要阻断芳香族氨基酸合成途径, 提高相关酶催化活性。此外, DHS 还可以转化为没食子酸<sup>[11]</sup>、香草醛<sup>[65]</sup>、苯酚<sup>[86]</sup>、

3-氨基苯甲酸<sup>[87]</sup>、熊果苷<sup>[88]</sup>等多种芳香族化合物。

### 3.2 L-苯丙氨酸底盘细胞构建及其衍生物的生物合成

L-苯丙氨酸是人体和动物不能靠自身合成的一种必需氨基酸, 广泛应用于食品、饲料、医药等领域<sup>[11]</sup>。随着生物合成技术的日益发展, 利用

微生物发酵的方式生产 L-苯丙氨酸逐渐成为主流生产方法。早在 20 世纪 90 年代初,研究人员在 L-苯丙氨酸合成途径调控、发酵菌种的选育以及发酵条件优化等方面做了大量研究工作,发酵水平达到 50 g/L 左右<sup>[89-90]</sup>。进入 21 世纪以来,通过广大研究人员对 L-苯丙氨酸合成途径进行不断地设计、改造与优化,将 L-苯丙氨酸产量逐步提升至 72.9 g/L<sup>[22]</sup>。这些工作的开展为 L-苯丙氨酸衍生物的生物合成提供了坚实的工作基础。

以 L-苯丙氨酸及其合成前体苯丙酮酸为中心可以转化为多种芳香族衍生物(图 4)。苯丙酮酸可以直接转化为 D/L-苯乳酸<sup>[57,74]</sup>、D-苯丙氨酸<sup>[91]</sup>、S-扁桃酸<sup>[92]</sup>等,也可以间接转化为下游 D/L-苯甘氨酸<sup>[93-94]</sup>、R-扁桃酸<sup>[92]</sup>、2-苯乙醇<sup>[57]</sup>以及 L-高苯丙氨酸<sup>[95-96]</sup>等,但是这些途径大多数是需要辅酶参与的异源合成途径,因此产量一般较低。以 L-苯丙氨酸作为前体,通过构建辅酶循环再生体系,利用全细胞催化或体外酶催化的方式或许可以获得较高的产量或转化率。L-苯丙氨酸脱氨之后生成反式肉桂酸。反式肉桂酸也是一种重要的合成前体,可以直接转化为 3-苯基丙酸<sup>[97]</sup>、苯乙烯<sup>[98]</sup>,也可以经肉桂醛转化为肉桂醇<sup>[99]</sup>或经过肉桂酰辅酶 A 合成乔松素<sup>[100]</sup>、赤松素<sup>[101]</sup>等较复杂的芳香族化合物,还可以转化为对香豆酸<sup>[102]</sup>进入 L-酪氨酸衍生物合成途径。L-苯丙氨酸在酪氨酸脱羧酶作用下转化为苯乙胺,与催化 L-酪氨酸脱羧反应的脱羧酶相同<sup>[103]</sup>。L-苯丙氨酸是甜味剂阿斯巴甜的合成前体。目前未见从头合成阿斯巴甜的报道,但可以通过全细胞催化的方式实现从 L-苯丙氨酸到阿斯巴甜的生物转化<sup>[104]</sup>。Luo 等<sup>[75]</sup>尝试了两条不同的苯甲酸合成途径,一条是植物来源的以 L-苯丙氨酸为前体,一条是微生物来源的以苯丙酮酸为前体,均实现了从葡萄糖到苯甲酸的从头合成,其中植物来源的合成途径虽然较长,但合成效率较高,苯甲酸产量大约是微生物来源合成途径的 13 倍。

### 3.3 L-酪氨酸底盘细胞的构建及其衍生物的生物合成

L-酪氨酸是一种重要的营养必需氨基酸,广泛应用于食品、饲料、医药和化工等领域。通过敲除 *pheL* 和 *pheA*, 过表达 *tyrA*, 将高产 L-苯丙氨酸菌株改造成 L-酪氨酸生产菌株是一种简单、有效的构建方式。Patnaik 等<sup>[32]</sup>将该策略与发酵条件优化相结合,成功将 L-酪氨酸的产量提升至 55 g/L。Kim 等<sup>[23]</sup>增加 L-酪氨酸合成途径关键基因 *aroG<sup>fbr</sup>*、*aroL*、*tyrC* 的表达量,敲除 L-酪氨酸特异性转运蛋白基因 *tyrP*, 结合“DO-stat 补料策略”,最终 L-酪氨酸产量达到 43.14 g/L。在高产 L-酪氨酸细胞内整合内源或异源合成途径,可以获得不同 L-酪氨酸衍生物的细胞工厂。

以 L-酪氨酸及其合成前体 4-羟基苯丙酮酸为中心可以转化为多种芳香族衍生物(图 5)。L-酪氨酸衍生物合成途径中许多酶的底物专一性较差,导致某一种产物具有多种合成途径,并且某些酶也能参与 L-苯丙氨酸衍生物的合成。例如从 4-羟基苯丙酮酸出发,羟基酪醇的合成途径可归纳为 10 余条(图 5)<sup>[1,3,13,77]</sup>。但是受限于消耗大量辅酶、酶催化活性低以及产物毒性等原因,羟基酪醇的产量较低。蔡宇杰等<sup>[77]</sup>通过建立高效的辅酶循环再生体系,敲除酚类物质降解基因,强化表达合成途径相关基因,利用全细胞催化方式将 200 g/L 的左旋多巴转化为 169.2 g/L 的羟基酪醇,但是该方法只有在很高的细胞用量(200 g/L 菌体湿重)条件下才具有较好的催化效果。筛选具有更高催化活性的限速酶突变体(如 HpaBC<sup>23F9-M4</sup> 和 TYO<sup>YM9-2</sup>)有助于提高底物转化率<sup>[105]</sup>,进一步降低全细胞催化反应的细胞用量。羟基酪醇合成前体酪醇可以与 UDP-葡萄糖反应生成红景天苷和淫羊藿次甙 D2<sup>[106]</sup>。此外,4-羟基苯丙酮酸通过羟化和加氢反应可以转化为丹参素<sup>[78]</sup>,丹参素与咖啡酰辅酶 A 缩合生成迷迭香酸<sup>[107]</sup>。另一个重要的合成途径是 L-酪氨酸脱氨生成对香豆酸,以对香豆酸为中心进一步转化为多种芳香族衍

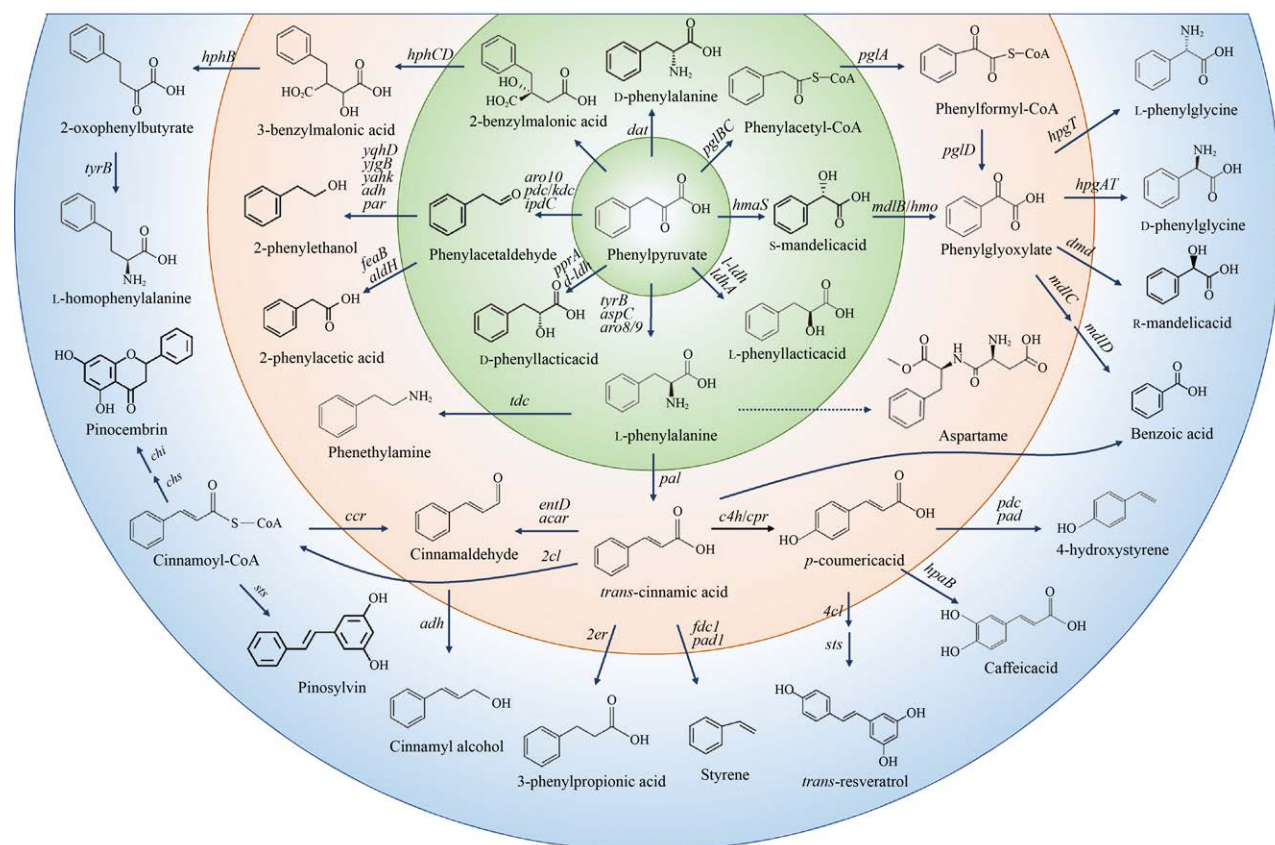


图 4 L-苯丙氨酸衍生物的生物合成 (苯丙酮酸 phenylpyruvate, L-苯丙氨酸 L-phenylalanine, D-苯丙氨酸 D-phenylalanine, 2-苄基丙二酸 2-benzylmalonic acid, 3-苄基丙二酸 3-benzylmalonic acid, 2-氧代苯基丁酸 2-oxophenylbutyrate, L-高苯丙氨酸 L-homophenylalanine, 苯乙醛 phenylacetaldehyde, 2-苯乙醇 2-phenylethanol, 2-苯乙酸 2-phenylacetic acid, D-苯乳酸 D-phenyllactic acid, 苯乙胺 phenethylamine, 反式肉桂酸 trans-cinnamic acid, 肉桂醛 cinnamaldehyde, 肉桂醇 cinnamyl alcohol, 肉桂酰辅酶 A cinnamoyl-CoA, 乔松素 pinocembrin, 赤松素 pinosylvin, 3-苯基丙酸 3-phenylpropionic acid, 苯乙烯 styrene, 对香豆酸 p-coumeric acid, 白藜芦醇 trans-resveratrol, 咖啡酸 caffeic acid, 4-羟基苯乙烯 4-hydroxystyrene, 阿斯巴甜 aspartame, L-苯乳酸 L-phenyllactic acid, S-扁桃酸 s-mandelic acid, 苯乙醛酸 phenylglyoxylate, 苯甲酸 benzoic acid, R-扁桃酸 R-mandelic acid, D-苯甘氨酸 D-phenylglycine, L-苯甘氨酸 L-phenylglycine, 苯乙酰辅酶 A phenylacetyl-CoA, 苯甲酰辅酶 A phenylformyl-CoA)

Fig. 4 Biosynthesis of L-phenylalanine derivatives from extended L-phenylalanine pathway. Genes and the enzymes they encode: *hphA*: benzylmalate synthase; *hphB*: 3-benzylmalate dehydrogenase; *hphCD*: 3-benzylmalate isomerase; *aro10/pdc/ipdC*: phenylpyruvate decarboxylase; *kdc*: 2-keto acid decarboxylase; *adh/yjgB*: alcohol dehydrogenase; *yqhD/yahK*: aldehyde reductases; *par*: phenylacetaldehyde reductase; *l-ldh/ldhA*: L-lactate dehydrogenase; *feaB*: phenylacetaldehyde dehydrogenase; *aldH*: aldehyde dehydrogenase H; *dat*: D-amino acid aminotransferase; *pglB*: pyruvate dehydrogenase E1 component  $\alpha$ -subunit; *pglC*: pyruvate dehydrogenase E1 component  $\beta$ -subunit; *pglA*: hydroxyacyl-dehydrogenase; *pglD*: thioesterase type II; *hmaS*: L-4-hydroxymandelate synthase; *hmo*: L-4-hydroxymandelate oxidase; *mdlB*: S-mandelic acid dehydrogenase; *hpgT*: L-(4-hydroxy)phenylglycine transaminase; *hpgAT*: D-(4-hydroxy)phenylglycine aminotransferase; *dmd*: D-mandelate dehydrogenase; *mdlC*: phenylglyoxylate decarboxylase; *mdlD*: benzaldehyde dehydrogenase; *tyrB/aro8/aro9*: aromatic amino acid transaminase; *tdc*: tyrosine decarboxylase; *aspC*: aspartate aminotransferase; *pal*: phenylalanine ammonia lyase; *pprA*: phenylpyruvate reductase; *acar*: aryl carboxylic acid reductase; *entD*: phosphopantetheinyl transferase; *4cl*: 4-coumarate:CoA ligase; *ccr*: cinnamoyl-CoA reductase; *c4h*: cinnamate 4-hydroxylase; *cpr*: cytochrome P450 reductase; *fdc1*: ferulate decarboxylase; *pad1*: phenylacrylic acid decarboxylase 1; *2er*: 2-enoate reductase; *sts*: stylopine synthase; *chs*: chalcone synthase; *chi*: chalcone isomerase.

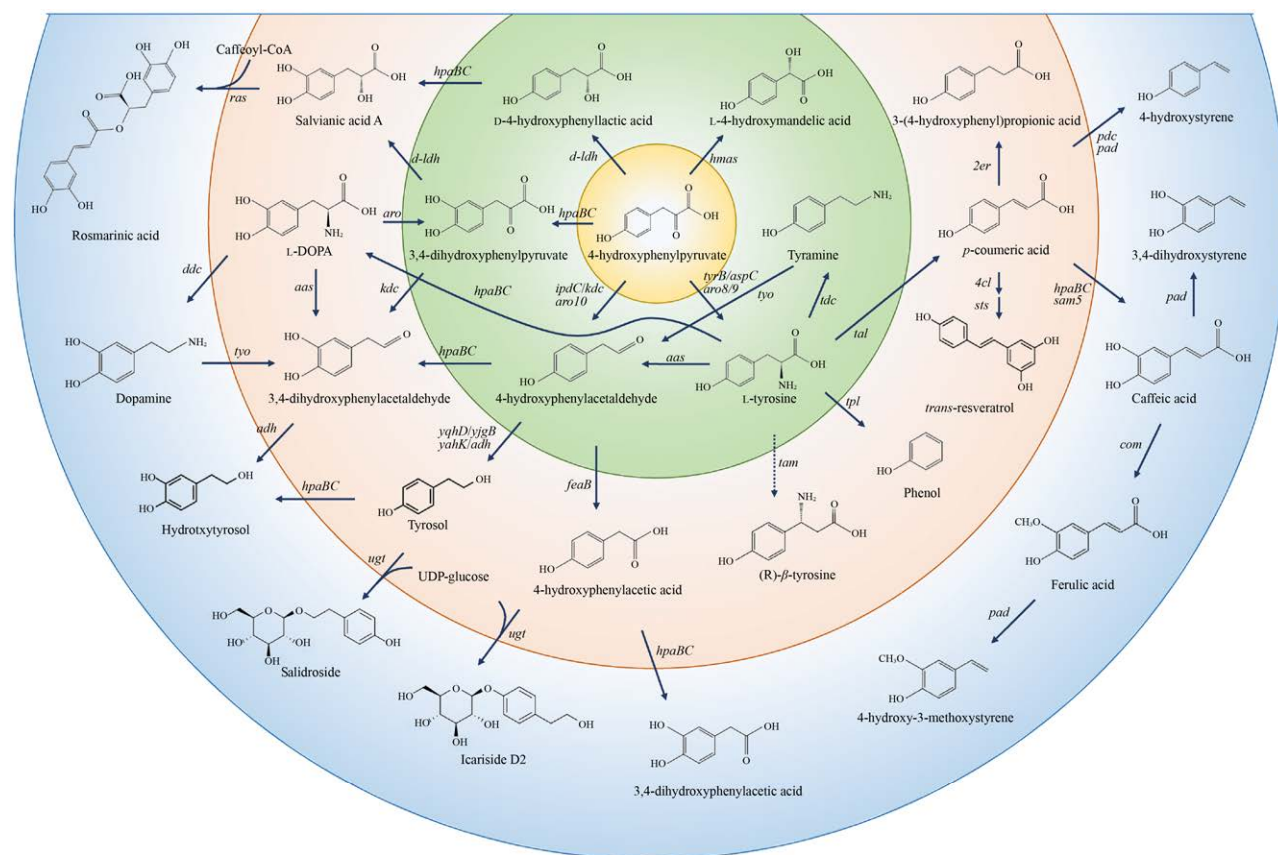


图5 L-酪氨酸衍生物的生物合成 (4-羟基苯丙酮酸 4-hydroxyphenylpyruvate, L-酪氨酸 L-tyrosine, D-4-羟基苯乳酸 D-4-hydroxyphenyllactic acid, 丹参素 salviatic acid A, 咖啡酰辅酶 A caffeoyl-CoA, 迷迭香酸 rosmarinic acid, 3,4-二羟基苯丙酮酸 3,4-dihydroxyphenylpyruvate, 左旋多巴 L-DOPA, 多巴胺 dopamine, 3,4-二羟基苯乙醛 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, 4-羟基苯乙醛 4-hydroxyphenylacetaldehyde, 酪醇 tyrosol, 羟基酪醇 hydroxytyrosol, UDP-葡萄糖 UDP-glucose, 红景天苷 salidroside, 淫羊藿次甙 D2 icariside D2, 4-羟基苯乙酸 4-hydroxyphenylacetic acid, 3,4-二羟基苯乙酸 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, (R)- $\beta$ -酪氨酸 (R)- $\beta$ -tyrosine, 苯酚 phenol, 酪胺 tyramine, L-4-羟基扁桃酸 L-4-hydroxymandelic acid, 对香豆酸 *p*-coumaric acid, 白藜芦醇 *trans*-resveratrol, 咖啡酸 caffeic acid, 阿魏酸 ferulic acid, 4-羟基-3-甲氧基苯乙烯 4-hydroxy-3-methoxystyrene, 3,4-二羟基苯乙烯 3,4-dihydroxystyrene, 3-(4-羟基苯基)丙酸 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, 4-羟基苯乙烯 4-hydroxystyrene)

Fig. 5 Biosynthesis of L-tyrosine derivatives from extended L-tyrosine pathway. Genes and the enzymes they encode: *dldh*: D-lactate dehydrogenase; *hpaBC*: 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (a two component flavin-dependent monooxygenase); *ras*: rosmarinic acid synthase; *ipdC/aro10*: phenylpyruvate decarboxylase; *kdc*: 2-keto acid decarboxylase; *adh/yjgB*: alcohol dehydrogenase; *yqhD/yahK*: aldehyde reductase; *ddc*: L-dopa decarboxylase; *tyo*: tyramine oxidase; *ugt*: uridine diphosphate dependent glycosyltransferase; *feaB*: phenylacetaldehyde dehydrogenase; *tyrB/aro8/aro9/aro*: aromatic amino acid transaminase; *aspC*: aspartate aminotransferase; *hmaS*: L-4-hydroxymandelate synthase; *aas*: aromatic aldehyde synthase; *tdc*: tyrosine decarboxylase; *tam*: tyrosine aminomutase; *tpl*: tyrosine phenol lyase; *tal*: tyrosine ammonia-lyase; *2er*: 2-enoate reductase; *4cl*: 4-coumarate:CoA ligase; *sts*: stilbene synthase; *sam5*: 4-coumarate hydroxylase; *pdc*: *p*-coumaric acid decarboxylase; *pad*: phenolic acid decarboxylase; *com*: caffeic acid methyltransferase.

生物, 如咖啡酸<sup>[108]</sup>、阿魏酸<sup>[109]</sup>、白藜芦醇<sup>[110]</sup>、3-(4-羟基苯基) 丙酸<sup>[97]</sup>等。催化 L-酪氨酸转化为对香豆酸的酪氨酸解氨酶催化活性较低, 并且对香豆酸具有较强的细胞毒性, 因此如何解决上述问题成为提高对香豆酸及其衍生物产量的重要因素。L-酪氨酸在酪氨酸氨基变位酶催化作用下转化为 (R)- $\beta$ -酪氨酸。酪氨酸氨基变位酶的催化活性在植物和微生物中均有报道<sup>[111-112]</sup>, 但是尚未发现将其应用于合成 (R)- $\beta$ -酪氨酸的代谢工程研究。

### 3.4 L-色氨酸底盘细胞构建及其衍生物的生物合成

L-色氨酸作为人和动物体内的一种必需氨基酸, 广泛应用于食品、药品、化工等领域, 主要通过微生物发酵的方式进行生产。L-色氨酸生物合成是一个消耗能量和 NADPH 的过程, 以 PEP 和 E4P 作为前体物质, 还需要 5-磷酸核糖-1-焦磷酸、L-谷氨酰胺、L-丝氨酸的参与。因此构建 L-色氨酸高产菌株需要增加这些前体物质的供应, 增加 L-色氨酸向胞外转运。Shen 等<sup>[113]</sup>敲除大肠杆菌 *trpR* 和 *tna*, 通过高拷贝质粒过表达 *aroG*<sup>fbr</sup>、*trpE*<sup>fbr</sup>、*serA*, 所得菌株通过分批补料发酵 40 h 可积累 35.9 g/L 的 L-色氨酸; 然后利用低拷贝质粒过表达 *tktA* 和 *ppsA*, 进一步增强 E4P 和 PEP 前体供应, L-色氨酸产量进一步提升至 40.2 g/L。Wang 等<sup>[24]</sup>系统分析了转运蛋白对 L-色氨酸产量的影响, 发现敲除 *mtr* 或过表达 *yddG* 或两者结合起来均可以提高 L-色氨酸产量。副产物乙酸的生成也会影响 L-色氨酸产量。Liu 等<sup>[34]</sup>用磷酸乙酰转移酶突变体基因 *pta1* 替换大肠杆菌自身野生型 *pta*, 使得 L-色氨酸产量提高了 15%, 乙酸减少了 35%。

L-色氨酸经植物、动物和微生物细胞内代谢可以进一步转化为多种芳香族衍生物 (图 6)。由于合成途径较长, 大部分 L-色氨酸衍生物从头合成的效率很低, 主要通过催化转化的方式进行合成。Sun 等<sup>[79]</sup>以高产 L-色氨酸谷氨酸棒状杆菌为宿主细胞, 通过质粒过表达异源 *vio* 基因簇, 并对

启动子和 RBS 类型、*vio* 基因排列顺序、发酵工艺等条件进行系统代谢工程优化, 最终菌株通过分批补料发酵合成 5.436 g/L 紫色杆菌素。L-色氨酸通过脱羧和羟化反应首先转化为血清素<sup>[114-115]</sup>, 然后血清素进一步转化为褪黑素<sup>[116]</sup>, 但是这些途径的微生物合成效率都比较低。Romasi 和 Lee<sup>[62]</sup>通过在大肠杆菌中表达 L-色氨酸到吲哚-3-乙酸 (生长素) 合成途径相关基因 *aspC*、*idpC*、*iad1*, 实现了 L-色氨酸到吲哚-3-乙酸的高效催化转化, 并且还检测到少量的色醇积累, 但是未能鉴定出相关酶的表达基因。另一条经吲哚-3-乙胺到吲哚-3-乙酸的合成途径尚未发现代谢工程相关研究报道。L-色氨酸在色氨酸酶的作用下转化为吲哚, 吲哚经黄素单加氧酶 Fmo 催化生成 2-或 3-羟基吲哚, 然后通过自发二聚化生成靛红和靛蓝。Fmo 的区域选择性受半胱氨酸的影响, 添加少量半胱氨酸可以增加 2-羟基吲哚的合成比例, 有利于积累更多的靛红<sup>[117]</sup>。此外, L-色氨酸可以参与卤代反应, 转化为 5、6 或 7 位的卤代产物<sup>[1,118-120]</sup>。某些微生物尤其是海洋微生物中富含各种各样的卤代酶, 但是相关卤代反应的催化效率仍然较低。利用上述卤代酶, Lee 等<sup>[121]</sup>构建了分别表达 Fre-SttH 和 TnaA 以及 Fmo 的大肠杆菌, 将 L-色氨酸溴化和 6-溴-色氨酸降解与 6-溴-吲哚二聚化反应分隔开来, 以 L-色氨酸为底物合成天然色素 6,6'-二溴靛蓝。研究人员还测试了该体系同样适用于 5 和 7 位氯代或溴代色氨酸的不同色素催化合成。芳香族化合物的卤代反应为芳香族衍生物的生物合成打开了新的合成大门。

## 4 总结与展望

芳香族化合物广泛应用于医药、化工、食品和饲料等领域, 市场前景广阔。通过代谢工程对芳香族化合物的合成途径进行理性设计与改造, 使微生物细胞定向地大量积累人们需要的各种芳香族化合物。这些研究对解决化石能源危机和环境可



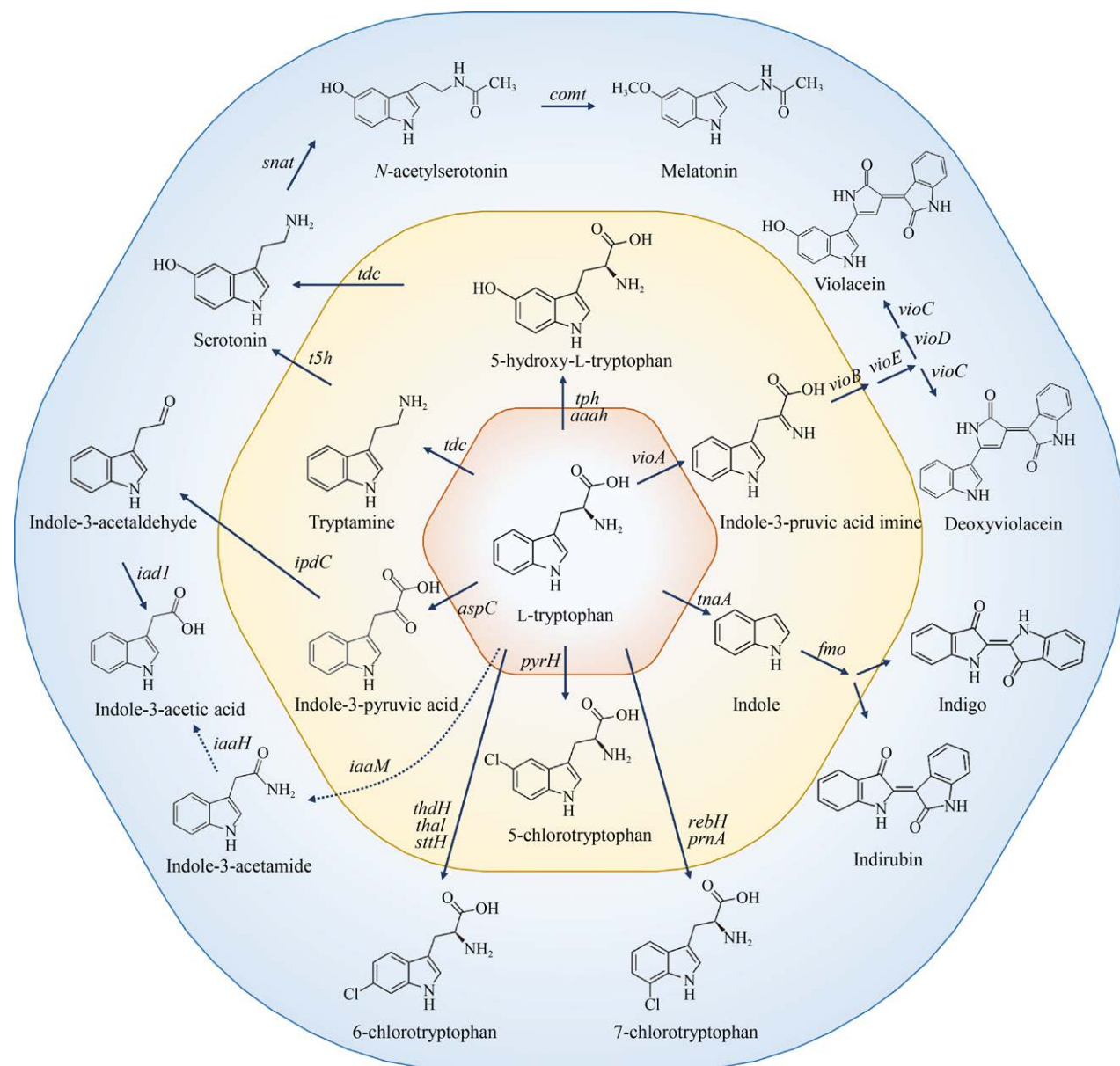


图 6 L-色氨酸衍生物的生物合成 (L-色氨酸 L-tryptophan, 5-羟基-L-色氨酸 5-hydroxy-L-tryptophan, 色胺 tryptamine, 血清素 serotonin, N-乙酰血清素 N-acetylserotonin, 褪黑素 melatonin, 吲哚-3-丙酮酸 indole-3-pyruvic acid, 吲哚-3-乙醛 indole-3-acetaldehyde, 吲哚-3-乙胺 indole-3-acetamide, 吲哚-3-乙酸 indole-3-acetic acid, 5/6/7-氯色氨酸 5/6/7-chlorotryptophan, 吲哚 indole, 靛蓝 indigo, 靛红 indirubin, 吲哚-3-丙酮酸亚胺 indole-3-pruvic acid imine, 紫色杆菌素 violacein, 脱氧紫色杆菌素 deoxyviolacein)

Fig. 6 Biosynthesis of L-tryptophan derivatives from extended L-tryptophan pathway. Genes and the enzymes they encode: *tph*: tryptophan hydroxylase; *aaah*: aromatic amino acid hydroxylase; *tdc*: tryptophan decarboxylase; *t5h*: tryptamine 5-hydroxylase; *snat*: serotonin N-acetyltransferase; *comt*: caffeic acid O-methyltransferase; *vioA*: L-amino acid oxidase; *vioB*: iminophenyl-pyruvate dimer synthase; *vioC*: monooxygenase; *vioD*: tryptophan hydroxylase; *vioE*: violacein biosynthesis protein; *tnaA*: tryptophanase; *fmo*: flavin-containing monooxygenase; *aspC*: aspartate aminotransferase; *ipdC*: indole-3-pyruvic acid decarboxylase; *iad1*: indole-3-acetic acid dehydrogenase; *iaaM*: tryptophan 2-monooxygenase; *iaaH*: indole-3-acetamide hydrolase; *pyrH*: tryptophan 5-halogenase; *thdH/thal/sttH*: tryptophan 6-halogenase; *rebH/prnA*: tryptophan 7-halogenase.

持续发展问题具有积极意义。但是,目前只有少数芳香族化合物实现了高效的工业化发酵生产,大部分芳香族化合物的合成效率仍然较低。一方面通过代谢工程手段,例如代谢途径理性设计改造、辅因子工程、酶定向进化、适应性进化、高通量筛选等技术,对宿主细胞进行系统改造,提升发酵生产菌种的鲁棒性。另一方面,通过设计新的反应途径,表达异源合成途径相关基因,拓宽微生物合成芳香族化合物的产物谱,获得某些具有重要应用价值的新型芳香族化合物。我们相信,随着代谢工程技术的不断发展,越来越多的芳香族化合物将在微生物细胞中实现高效生物合成。

## REFERENCES

- [1] Wu FL, Cao P, Song GT, et al. Expanding the repertoire of aromatic chemicals by microbial production. *J Chem Technol Biot*, 2018, 93(10): 2804-2816.
- [2] Thompson B, Machas M, Nielsen DR. Creating pathways towards aromatic building blocks and fine chemicals. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 36: 1-7.
- [3] Shen YP, Niu FX, Yan ZB, et al. Recent advances in metabolically engineered microorganisms for the production of aromatic chemicals derived from aromatic amino acids. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 407.
- [4] 吴凤礼, 彭彦峰, 徐毅诚, 等. 代谢工程改造微生物生产芳香族化合物的研究进展. *生物加工过程*, 2017, 15(5): 9-23.  
Wu FL, Peng YF, Xu YC, et al. Advances in microbial metabolic engineering for producing aromatic chemicals. *Chin J Bioproc Eng*, 2017, 15(5): 9-23 (in Chinese).
- [5] Jiang M, Zhang HR. Engineering the shikimate pathway for biosynthesis of molecules with pharmaceutical activities in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 42: 1-6.
- [6] Kohlstedt M, Starck S, Barton N, et al. From lignin to nylon: Cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Metab Eng*, 2018, 47: 279-293.
- [7] Cai CG, Xu ZX, Xu ML, et al. Development of a *Rhodococcus opacus* cell factory for valorizing lignin to muconate. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2020, 8(4): 2016-2031.
- [8] Banerjee R, Mukherjee G, Patra KC. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. *Bioresour Technol*, 2005, 96(8): 949-953.
- [9] Leighty RW, Antoniewicz MR. COMPLETE-MFA: complementary parallel labeling experiments technique for metabolic flux analysis. *Metab Eng*, 2013, 20: 49-55.
- [10] Abatemarco J, Sarhan MF, Wagner JM, et al. RNA-aptamers-in-droplets (RAPID) high-throughput screening for secretory phenotypes. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 332.
- [11] Chen ZY, Shen XL, Wang J, et al. Rational engineering of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase to enable efficient gallic acid synthesis via a novel artificial biosynthetic pathway. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(11): 2571-2580.
- [12] Shen XL, Wang J, Li CY, et al. Dynamic gene expression engineering as a tool in pathway engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 59: 122-129.
- [13] Chen W, Yao J, Meng J, et al. Promiscuous enzymatic activity-aided multiple-pathway network design for metabolic flux rearrangement in hydroxytyrosol biosynthesis. *Nat Commun*, 2019, 10: 960.
- [14] 鄢芳清, 韩亚昆, 李娟, 等. 大肠杆菌芳香族氨基酸代谢工程研究进展. *生物加工过程*, 2017, 15(5): 32-39, 85.  
Yan FQ, Han YK, Li J, et al. Metabolic engineering of aromatic amino acids in *Escherichia coli*. *Chin J Bioproc Eng*, 2017, 15(5): 32-39, 85 (in Chinese).
- [15] Flores N, Xiao J, Berry A, et al. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(5): 620-623.
- [16] Yi J, Draths KM, Li K, et al. Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(5): 1450-1459.
- [17] Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chavez G, et al. Expression of *galP* and *glk* in a

- Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83(6): 687-694.
- [18] Li K, Mikola MR, Draths KM, et al. Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 64(1): 61-73.
- [19] Bongaerts J, Krämer M, Müller U, et al. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng*, 2001, 3(4): 289-300.
- [20] Ger YM, Chen SL, Chiang HJ, et al. A single Ser-180 mutation desensitizes feedback inhibition of the phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthetase in *Escherichia coli*. *J Biochem*, 1994, 116(5): 986-990.
- [21] Liu SP, Xiao MR, Zhang L, et al. Production of L-phenylalanine from glucose by metabolic engineering of wild type *Escherichia coli* W3110. *Process Biochem*, 2013, 48(3): 413-419.
- [22] Liu YF, Xu YR, Ding DQ, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production. *BMC Biotechnol*, 2018, 18(1): 5.
- [23] Kim B, Binkley R, Kim HU, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the enhanced production of L-tyrosine. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(10): 2554-2564.
- [24] Wang J, Cheng LK, Wang J, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of L-tryptophan. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(17): 7587-7596.
- [25] Chen L, Zeng AP. Rational design and metabolic analysis of *Escherichia coli* for effective production of L-tryptophan at high concentration. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(2): 559-568.
- [26] Pittard J, Camakaris H, Yang J. The TyrR regulon. *Mol Microbiol*, 2005, 55(1): 16-26.
- [27] Chen YY, Liu YF, Ding DQ, et al. Rational design and analysis of an *Escherichia coli* strain for high-efficiency tryptophan production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45(5): 357-367.
- [28] Long CP, Gonzalez JE, Feist AM, et al. Fast growth phenotype of *E. coli* K-12 from adaptive laboratory evolution does not require intracellular flux rewiring. *Metab Eng*, 2017, 44: 100-107.
- [29] Rodriguez A, Martínez JA, Báez-Viveros JL, et al. Constitutive expression of selected genes from the pentose phosphate and aromatic pathways increases the shikimic acid yield in high-glucose batch cultures of an *Escherichia coli* strain lacking PTS and *pykF*. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 86.
- [30] Choi SS, Seo SY, Park SO, et al. Cell factory design and culture process optimization for dehydroshikimate biosynthesis in *Escherichia coli*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 241.
- [31] Liu SP, Liu RX, Xiao MR, et al. A systems level engineered *E. coli* capable of efficiently producing L-phenylalanine. *Process Biochem*, 2014, 49(5): 751-757.
- [32] Patnaik R, Zolandz RR, Green DA, et al. L-tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: fermentation optimization and recovery. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(4): 741-752.
- [33] Santos CNS, Xiao WH, Stephanopoulos G. Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(34): 13538-13543.
- [34] Liu LN, Duan XG, Wu J. L-tryptophan production in *Escherichia coli* improved by weakening the Pta-AckA pathway. *PLoS ONE*, 2016, 11(6): e0158200.
- [35] Yi J, Li K, Draths KM, et al. Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(6): 1141-1148.
- [36] 马延和, 王钦宏, 陈五九, 等. 生产 3-脱氢莽草酸大肠杆菌重组菌株及其构建方法与应用: CN, 201711002831.2. 2017-10-24.  
Ma YH, Wang QH, Chen WJ, et al. *Escherichia coli* recombinant bacterial strain for producing 3-dehydroshikimic acid as well as establishment method and application thereof: CN, 201711002831.2. 2017-10-24 (in Chinese).
- [37] Gu PF, Yang F, Kang JH, et al. One-step of tryptophan attenuator inactivation and promoter swapping to improve the production of L-tryptophan in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 30.

- [38] Liu Q, Cheng YS, Xie XX, et al. Modification of tryptophan transport system and its impact on production of L-tryptophan in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2012, 114: 549-554.
- [39] Gu PF, Yang F, Li FF, et al. Knocking out analysis of tryptophan permeases in *Escherichia coli* for improving L-tryptophan production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(15): 6677-6683.
- [40] Doroshenko V, Airich L, Vitushkina M, et al. YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 275(2): 312-318.
- [41] Li LP, Tu R, Song GT, et al. Development of a synthetic 3-dehydroshikimate biosensor in *Escherichia coli* for metabolite monitoring and genetic screening. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(2): 297-306.
- [42] Tu R, Li LP, Yuan HL, et al. Biosensor-enabled droplet microfluidic system for the rapid screening of 3-dehydroshikimate acid produced in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2020. DOI: 10.1007/s10295-020-02316-1.
- [43] Liu C, Zhang B, Liu YM, et al. New intracellular shikimate acid biosensor for monitoring shikimate synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(2): 591-601.
- [44] Liu YF, Zhuang YY, Ding DQ, et al. Biosensor-based evolution and elucidation of a biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(5): 837-848.
- [45] Siedler S, Khatri NK, Zsohar A, et al. Development of a bacterial biosensor for rapid screening of Yeast *p*-coumaric acid production. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(10): 1860-1869.
- [46] Chen JX, Steel H, Wu YH, et al. Development of aspirin-inducible biosensors in *Escherichia coli* and SimCells. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(6): e02959-18.
- [47] Ding DQ, Li JL, Bai DY, et al. Biosensor-based monitoring of the central metabolic pathway metabolites. *Biosens Bioelectron*, 2020, 167: 112456.
- [48] Santos CN, Stephanopoulos G. Melanin-based high-throughput screen for L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(4): 1190-1197.
- [49] 霍亚楠, 吴凤礼, 宋国田, 等. 定向进化改造酪氨酸解氨酶提高大肠杆菌合成对香豆酸产量. *生物工程学报*, 2020, 36(11): 2367-2376.
- Huo YN, Wu FL, Song GT, et al. Directed evolution of tyrosine ammonia-lyase to improve the production of *p*-coumaric acid in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2020, 36(11): 2367-2376 (in Chinese).
- [50] Kramer L, Le X, Rodriguez M, et al. Engineering carboxylic acid reductase (CAR) through a whole-cell growth-coupled NADPH recycling strategy. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(7): 1632-1637.
- [51] Lu J, Tang JL, Liu Y, et al. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2455-2462.
- [52] Kim SC, Min BE, Hwang HG, et al. Pathway optimization by re-design of untranslated regions for L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 13853.
- [53] Lin YH, Sun XX, Yuan QP, et al. Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2014, 23: 62-69.
- [54] Maeda H, Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2012, 63: 73-105.
- [55] Kogure T, Kubota T, Suda M, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for shikimate overproduction by growth-arrested cell reaction. *Metab Eng*, 2016, 38: 204-216.
- [56] Cui YY, Ling C, Zhang YY, et al. Production of shikimate acid from *Escherichia coli* through chemically inducible chromosomal evolution and cofactor metabolic engineering. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 21.
- [57] Wang PC, Yang XW, Lin BX, et al. Cofactor self-sufficient whole-cell biocatalysts for the production of 2-phenylethanol. *Metab Eng*, 2017, 44: 143-149.
- [58] Sandberg TE, Salazar MJ, Weng LL, et al. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metab Eng*, 2019, 56: 1-16.
- [59] Krömer JO, Nunez-Bernal D, Aversch NJ, et al.

- Production of aromatics in *Saccharomyces cerevisiae* — a feasibility study. *J Biotechnol*, 2013, 163(2): 184-193.
- [60] Kambourakis S, Draths KM, Frost JW. Synthesis of gallic acid and pyrogallol from glucose: Replacing natural product isolation with microbial catalysis. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(37): 9042-9043.
- [61] 王钦宏, 陈五九, 江小龙, 等. 一株生产原儿茶酸的大肠杆菌基因工程菌及其构建方法与应用: 中国, 201711390790.9. 2017-12-21.  
Wang QH, Chen WJ, Jiang XL, et al. *Escherichia coli* genetically-engineered bacterium for producing protocatechuic acid and construction method and application of *Escherichia coli* genetically-engineered bacterium: CN, 201711390790.9. 2017-12-21 (in Chinese).
- [62] Romasi EF, Lee J. Development of indole-3-acetic acid-producing *Escherichia coli* by functional expression of IpdC, AspC, and Iad1. *J Microbiol Biotechnol*, 2013, 23(12): 1726-1736.
- [63] Strohmeier GA, Eiteljörg IC, Schwarz A, et al. Enzymatic one-step reduction of carboxylates to aldehydes with cell-free regeneration of ATP and NADPH. *Chemistry*, 2019, 25(24): 6119-6123.
- [64] Kubota T, Watanabe A, Suda M, et al. Production of *para*-aminobenzoate by genetically engineered *Corynebacterium glutamicum* and non-biological formation of an *N*-glucosyl byproduct. *Metab Eng*, 2016, 38: 322-330.
- [65] Hansen EH, Møller BL, Kock GR, et al. *De novo* biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(9): 2765-2774.
- [66] Kim B, Park H, Na D, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of phenol from glucose. *Biotechnol J*, 2014, 9(5): 621-629.
- [67] Kim B, Cho BR, Hahn JS. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(1): 115-124.
- [68] Chreptowicz K, Mierzejewska J. Enhanced bioproduction of 2-phenylethanol in a biphasic system with rapeseed oil. *New Biotechnol*, 2018, 42: 56-61.
- [69] Yang YP, Lin YH, Wang J, et al. Sensor-regulator and RNAi based bifunctional dynamic control network for engineered microbial synthesis. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3043.
- [70] Wu J, Liu YF, Zhao S, et al. Application of dynamic regulation to increase L-phenylalanine production in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2019, 29(6): 923-932.
- [71] Patnaik R, Spitzer RG, Liao JC. Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 46(4): 361-370.
- [72] Chandran SS, Yi J, Draths KM, et al. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(3): 808-814.
- [73] Kogure T, Suda M, Hiraga K, et al. Protocatechuate overproduction by *Corynebacterium glutamicum* via simultaneous engineering of native and heterologous biosynthetic pathways. *Metab Eng*, 2020. DOI: 10.1016/j.ymben.2020.11.007.
- [74] Fujita T, Nguyen HD, Ito T, et al. Microbial monomers custom-synthesized to build true bio-derived aromatic polymers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(20): 8887-8894.
- [75] Luo ZW, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of benzoic acid from glucose. *Metab Eng*, 2020, 62: 298-311.
- [76] 马延和, 王钦宏, 陈五九, 等. 生产左旋多巴大肠杆菌重组菌株及其构建方法与应用: 中国, 201711003046.9. 2017-10-24.  
Ma YH, Wang QH, Chen WJ, et al. Recombinant strain for producing levodopa *Escherichia coli* as well as construction method and application thereof: CN, 201711003046.9. 2017-10-24 (in Chinese).
- [77] 蔡宇杰, 刘金彬, 李朝智, 等. 一种生产羟基酪醇的方法: 中国, 201811234787.2. 2018-10-23.  
Cai YJ, Liu JB, Li CZ, et al. Method for producing hydroxytyrosol: CN, 201811234787.2. 2018-10-23 (in Chinese).
- [78] Yao YF, Wang CS, Qiao JJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvianic acid A via an artificial biosynthetic

- pathway. *Metab Eng*, 2013, 19: 79-87.
- [79] Sun HN, Zhao DD, Xiong B, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for violacein hyper production. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 148.
- [80] Niu W, Draths KM, Frost JW. Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(2): 201-211.
- [81] Sun XX, Lin YH, Huang Q, et al. A novel muconic acid biosynthesis approach by shunting tryptophan biosynthesis via anthranilate. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(13): 4024-4030.
- [82] Sun XX, Lin YH, Yuan QP, et al. Biological production of muconic acid via a prokaryotic 2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase. *Chem Sus Chem*, 2014, 7(9): 2478-2481.
- [83] Sengupta S, Jonnalagadda S, Goonewardena L, et al. Metabolic engineering of a novel muconic acid biosynthesis pathway via 4-hydroxybenzoic acid in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(23): 8037-8043.
- [84] Joo JC, Khusnutdinova AN, Flick R, et al. Alkene hydrogenation activity of enoate reductases for an environmentally benign biosynthesis of adipic acid. *Chem Sci*, 2017, 8(2): 1406-1413.
- [85] Koma D, Yamanaka H, Moriyoshi K, et al. Production of *p*-aminobenzoic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 78(2): 350-357.
- [86] Thompson B, Machas M, Nielsen DR. Engineering and comparison of non-natural pathways for microbial phenol production. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(8): 1745-1754.
- [87] Hirayama A, Eguchi T, Kudo F. A single PLP-dependent enzyme PctV catalyzes the transformation of 3-dehydroshikimate into 3-aminobenzoate in the biosynthesis of pactamycin. *Chem Bio Chem*, 2013, 14(10): 1198-1203.
- [88] Shen XL, Wang J, Wang J, et al. High-level *de novo* biosynthesis of arbutin in engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2017, 42: 52-58.
- [89] Backman K, O'Connor MJ, Maruya A, et al. Genetic engineering of metabolic pathways applied to the production of phenylalanine. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, 589(1): 16-24.
- [90] Konstantinov KB, Nishio N, Seki T, et al. Physiologically motivated strategies for control of the fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* for phenylalanine production. *J Ferment Bioeng*, 1991, 71(5): 350-355.
- [91] Liu RX, Liu SP, Cheng S, et al. Screening, characterization and utilization of D-amino acid aminotransferase to obtain D-phenylalanine. *Appl Biochem Microbiol*, 2015, 51(6): 695-703.
- [92] Sun ZT, Ning YY, Liu LX, et al. Metabolic engineering of the L-phenylalanine pathway in *Escherichia coli* for the production of S- or R-mandelic acid. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 71.
- [93] Müller U, Van Assema F, Gunsior M, et al. Metabolic engineering of the *E. coli* L-phenylalanine pathway for the production of D-phenylglycine (D-Phg). *Metab Eng*, 2006, 8(3): 196-208.
- [94] Liu SP, Liu RX, El-Rotail AAMM, et al. Heterologous pathway for the production of L-phenylglycine from glucose by *E. coli*. *J Biotechnol*, 2014, 186: 91-97.
- [95] Koketsu K, Mitsunashi S, Tabata K. Identification of homophenylalanine biosynthetic genes from the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* PCC73102 and application to its microbial production by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(7): 2201-2208.
- [96] Liu ZN, Lei DW, Qiao B, et al. Integrative biosynthetic gene cluster mining to optimize a metabolic pathway to efficiently produce L-homophenylalanine in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(11): 2943-2954. DOI: 10.1021/acssynbio.0c00363.
- [97] Sun J, Lin YH, Shen XL, et al. Aerobic biosynthesis of hydrocinnamic acids in *Escherichia coli* with a strictly oxygen-sensitive enoate reductase. *Metab Eng*, 2016, 35: 75-82.
- [98] McKenna R, Nielsen DR. Styrene biosynthesis from glucose by engineered *E. coli*. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 544-554.
- [99] Zhou W, Bi HP, Zhuang YB, et al. Production of cinnamyl alcohol glucoside from glucose in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(10): 2129-2135.
- [100] Leonard E, Lim KH, Saw PN, et al. Engineering central metabolic pathways for high-level flavonoid production in *Escherichia coli*. *Appl Environ*

- Microbiol, 2007, 73(12): 3877-3886.
- [101] Wu JJ, Zhang X, Zhu YJ, et al. Rational modular design of metabolic network for efficient production of plant polyphenol pinosylvin. *Sci Rep*, 2017, 7: 1459.
- [102] Liu XN, Cheng J, Zhang GH, et al. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. *Nat Commun*, 2018, 9: 448.
- [103] Marcobal A, De Las Rivas B, Landete JM, et al. Tyramine and phenylethylamine biosynthesis by food bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2012, 52(5): 448-467.
- [104] 徐堃, 顾汉章, 刘龙, 等. 一种采用全细胞转化生产阿斯巴甜的方法: 中国, 201710391200.8. 2017-05-27.  
Xu K, Gu HZ, Liu L, et al. Method of producing aspartame by means of whole cell conversion: CN, 201710391200.8. 2017-05-27 (in Chinese).
- [105] Yao J, He Y, Su NN, et al. Developing a highly efficient hydroxytyrosol whole-cell catalyst by de-bottlenecking rate-limiting steps. *Nat Commun*, 2020, 11: 1515.
- [106] Bai YF, Bi HP, Zhuang YB, et al. Production of salidroside in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2014, 4: 6640.
- [107] Babaei M, Zamfir GMB, Chen X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Rosmarinic Acid Production. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(8): 1978-1988.
- [108] Huang Q, Lin YH, Yan YJ. Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(12): 3188-3196.
- [109] Kang SY, Choi O, Lee JK, et al. Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 153.
- [110] Lim CG, Fowler ZL, Hueller T, et al. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(10): 3451-3460.
- [111] Yan J, Aboshi T, Teraishi M, et al. The tyrosine aminomutase TAM1 is required for  $\beta$ -tyrosine biosynthesis in rice. *Plant Cell*, 2015, 27(4): 1265-1278.
- [112] Wanninayake U, Walker KD. A bacterial tyrosine aminomutase proceeds through retention or inversion of stereochemistry to catalyze its isomerization reaction. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(30): 11193-11204.
- [113] Shen T, Liu Q, Xie XX, et al. Improved production of tryptophan in genetically engineered *Escherichia coli* with TktA and PpsA overexpression. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 605219.
- [114] Park S, Kang K, Lee SW, et al. Production of serotonin by dual expression of tryptophan decarboxylase and tryptamine 5-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(5): 1387-1394.
- [115] Mora-Villalobos JA, Zeng AP. Synthetic pathways and processes for effective production of 5-hydroxytryptophan and serotonin from glucose in *Escherichia coli*. *J Biol Eng*, 2018, 12: 3.
- [116] Byeon Y, Back K. Melatonin production in *Escherichia coli* by dual expression of serotonin *N*-acetyltransferase and caffeic acid *O*-methyltransferase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(15): 6683-6691.
- [117] Han GH, Gim GH, Kim W, et al. Enhanced indirubin production in recombinant *Escherichia coli* harboring a flavin-containing monooxygenase gene by cysteine supplementation. *J Biotechnol*, 2012, 164(2): 179-187.
- [118] Zehner S, Kotzsch A, Bister B, et al. A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005. *Chem Biol*, 2005, 12(4): 445-452.
- [119] Milbredt D, Patallo EP, Van Pee KH. A tryptophan 6-halogenase and an amidotransferase are involved in thienodolin biosynthesis. *Chem Bio Chem*, 2014, 15(7): 1011-1020.
- [120] Bitto E, Huang Y, Bingman CA, et al. The structure of flavin-dependent tryptophan 7-halogenase RebH. *Proteins*, 2008, 70(1): 289-293.
- [121] Lee J, Kim J, Song JE, et al. Production of tyrian purple indigoid dye from tryptophan in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(1): 104-112.

(本文责编 陈宏宇)