

# 原儿茶酸脱羧关键酶挖掘改造优化儿茶酚生物合成

田立岩<sup>1,2,3</sup>, 李静<sup>1,2,3</sup>, 江小龙<sup>2,3\*</sup>, 宋国田<sup>2,3</sup>, 路福平<sup>1</sup>, 戴宗杰<sup>2,3</sup>, 李庆刚<sup>1</sup>, 王钦宏<sup>2,3\*</sup>

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

3 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

田立岩, 李静, 江小龙, 宋国田, 路福平, 戴宗杰, 李庆刚, 王钦宏. 原儿茶酸脱羧关键酶挖掘改造优化儿茶酚生物合成[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3057-3071.

TIAN Liyan, LI Jing, JIANG Xiaolong, SONG Guotian, LU Fuping, DAI Zongjie, LI Qinggang, WANG Qinhong. Screening and engineering of a protocatechuic acid decarboxylase for efficient biosynthesis of catechol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3057-3071.

**摘要:** 儿茶酚(catechol, CA)是一种重要的化工和医药中间体, 应用范围极为广泛。目前制备 CA 的方法是苯酚羟化法, 但由于该方法存在对环境污染大、石化资源不可再生等问题, 使得生物合成儿茶酚的方法逐渐受到关注。但受制于原儿茶酸脱羧酶的活性不够高且生物合成儿茶酚生产效率较低, 难以满足大规模工业生产的要求。为了进一步提高儿茶酚生产效率, 本研究首先对不同来源的 21 个原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)脱羧酶进行筛选, 发现理研菌(*Rikenellaceae*)来源的 *RbAroY* 脱羧酶性能最好, 含有该酶的全细胞生物催化剂 ER11 能够合成 13.54 g/L 儿茶酚。然后利用在线工具 HotSpot Wizard 对该酶进行稳定性计算, 选取自由能下降最多的 10 个潜在突变位点进行验证, 发现含有突变子 *RbAroY*<sup>G99A</sup> 的全细胞生物催化剂 ERT01 能够催化合成 15.16 g/L 儿茶酚, 较野生型产量提高 12%。之后对生物催化条件进一步优化, 以原儿茶酸为底物, 全细胞生物催化剂 ERT01 能够催化合成 25.70 g/L 儿茶酚。最后, 以 3-脱氢莽草酸发酵液为底物, 同时表达 3-脱氢莽草酸脱水酶和原儿茶酸脱羧酶的全细胞生物催化剂 DER03, 催化合成 29.55 g/L 儿茶酚, 为目前国内报道的生物合成的最高产量。本研究为儿茶酚生物合成工业生产提供了重要参考。

**关键词:** 生物合成; 全细胞催化; 原儿茶酸脱羧酶; 儿茶酚

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901400); 国家自然科学基金(32200063); 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-CXRC-057); 中国博士后科学基金(2022M723339)

This work was supported by the National Key Research and Development Project of China (2018YFA0901400), the National Natural Science Foundation of China (32200063), the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-CXRC-057), and the China Postdoctoral Science Foundation (2022M723339).

\*Corresponding authors. E-mail: JIANG Xiaolong, jiang\_xl@tib.cas.cn; WANG Qinhong, wang\_qh@tib.cas.cn

Received: 2024-02-29; Accepted: 2024-04-10

# Screening and engineering of a protocatechuic acid decarboxylase for efficient biosynthesis of catechol

TIAN Liyan<sup>1,2,3</sup>, LI Jing<sup>1,2,3</sup>, JIANG Xiaolong<sup>2,3\*</sup>, SONG Guotian<sup>2,3</sup>, LU Fuping<sup>1</sup>,  
DAI Zongjie<sup>2,3</sup>, LI Qinggang<sup>1</sup>, WANG Qinhong<sup>2,3\*</sup>

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

**Abstract:** Catechol (CA) is an important chemical and pharmaceutical intermediate with wide applications. At present, CA is produced by phenol hydroxylation with non-renewable petrochemical resources, which causes serious environmental pollution. Hence, the biosynthesis of CA attracts much attention recently. However, due to the low activities of protocatechuic acid (PCA) decarboxylases, the production efficiency of biosynthetic catechol is too low to meet the requirements of large-scale industrial production. To improve the yield of CA, we screened 21 PCA decarboxylases from different species. *RbAroY* originated from *Rikenellaceae* had the best catalytic performance. The whole-cell biocatalyst ER11 with *RbAroY* was able to produce CA at a titer of 13.54 g/L. Then, the online tool HotSpot Wizard was employed to measure the enzyme stability, which revealed 10 potential mutation sites causing significant decreases in Gibbs free energy. The whole-cell biocatalyst ERT01 with the mutated *RbAroY*<sup>G99A</sup> could produce CA at a titer of 15.16 g/L, which increased by 12% compared with that of the wild-type whole-cell biocatalyst. After optimization of the biocatalytic conditions, the whole-cell biocatalyst ERT01 was able to produce CA at a titer of 25.70 g/L with PCA as the substrate. Finally, with the fermentation broth of 3-dehydroshikimate as the substrate, the whole-cell biocatalyst DER03 expressing both 3-dehydroshikimate dehydratase and PCA decarboxylase realized the production CA at a titer of 29.55 g/L, which is currently the highest biosynthetic titer reported. This study provides a reference for the industrial production of CA by biosynthesis.

**Keywords:** biosynthesis; whole-cell biocatalysis; protocatechuic acid decarboxylase; catechol

儿茶酚(catechol, CA)是一种重要的化工和医药中间体,应用范围极为广泛,能够应用于显影剂、偶氮染料、橡胶防老剂、食品稳定剂、涂料抗氧化剂、石油抗凝剂等<sup>[1-3]</sup>。同时,它也是低毒高效新型氨基甲酸酯类农药、黄连素、肾上腺素、香料香兰素、黄樟素、胡椒醛等重要医药品的原料<sup>[4]</sup>。儿茶酚目前主要通过化工合成获得,苯酚羟基化法是主流生产工艺。苯酚羟基

化法主要是自由基反应,由催化剂 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 催化,通过 Fe<sup>2+</sup>与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反应生成 Fe<sup>3+</sup>和羟基自由基,然后亲电子基团羟基自由基对苯酚邻位及对位进攻,从而形成儿茶酚和对苯二酚,再经过同分异构体的分离得到儿茶酚<sup>[5]</sup>。然而,该方法需要利用的苯酚、过氧化氢等原料均来自石油化工行业,难以实现可持续生产。同时,该生产工艺控制复杂、技术壁垒高,主要市场份额被日本宇部

兴产公司、法国索尔维公司、意大利埃尼公司等头部公司瓜分,我国竞争优势较小。

根据往年国内市场需求量和增长率推算,近年来,我国市场对儿茶酚的需求量超过 2 万 t,国内的供应量也逐步提高,但仍存在不少缺口<sup>[4]</sup>。供应量不足和产品的不可持续性生产,催生了寻找其他替代方法的需求。生物合成能够代替传统的化工合成,利用可再生原料进行可持续生产,具有污染物排放少、绿色低碳等优势。因此,生物合成儿茶酚(图 1)的方式日渐受到关注。2006 年,张宗武等构建的菌株在苯胺浓度 0.5 g/L 时生物催化 20 h,儿茶酚产量为 0.546 g/L<sup>[6]</sup>。2012 年,Weber 等改造酿酒酵母细胞,在添加 5 mmol/L 原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)的培养基中摇瓶发酵 120 h,得到 0.6 g/L 儿茶酚<sup>[7]</sup>。前人的工作已经显著提升了前体物 3-脱氢莽草酸(3-dehydroshikimate, DHS)<sup>[8-9]</sup>和 PCA<sup>[10-11]</sup>的含量,但因儿茶酚的生物毒性,其产量仍然较低。基于此,Li 等利用原位树脂萃取法降低了发酵培养基中儿茶酚的浓度,从而降低了毒性,使儿茶酚的产量达到 8.5 g/L<sup>[3]</sup>。然而,这种策略大幅度增加了工业化生产 CA 的成本。全细胞催化合成是一种使用静息状态的细胞作为催化剂合成产物的生产方式<sup>[12]</sup>,无需考虑产物对细胞生长的影响,克服产物毒性对微生物发酵的限制,非常适合具有细胞毒性的芳香族化合物的工业生产。2022 年,Song 等通过优化辅因子供应和原儿茶酸脱羧酶的表达,经发酵合成原儿茶酸-全细胞生物催化合成儿茶酚的两步法,获得了 17.7 g/L 的 CA<sup>[13]</sup>。

虽然现有的生物合成方法中,儿茶酚产量得到了提升,但是仍然有大量的底物原儿茶酸未被转化,说明原儿茶酸脱羧酶的活性仍然不够高,工业生产的成本仍然较高。因此,需要深入挖掘高性能的原儿茶酸脱羧酶用于生物合成儿茶酚,以进一步降低儿茶酚的生产成本。

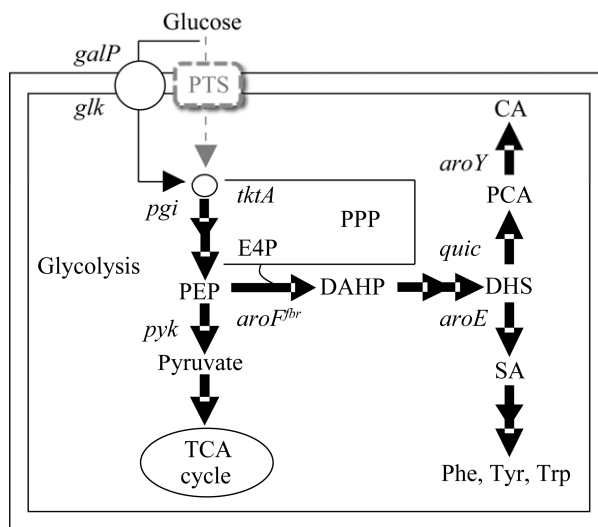


图 1 大肠杆菌中儿茶酚生物合成途径

Figure 1 The biosynthetic pathway of catechol in *Escherichia coli*. PPP: Pentose phosphate pathway; *pgi*: Glucose-6-phosphate isomerase gene; *galP*: Galactose permease gene; *glk*: Glucokinase gene; *tktA*: Transketolase I gene; *quic*: 3-dehydroshikimate dehydratase gene; *aroY*: Protocatechuic acid decarboxylase gene; *pyk*: Pyruvate kinase gene; *aroF<sup>br</sup>*: Feedback relieved 3-deoxy-arabino-heptulonate 7-phosphate synthase. gene; *aroE*: Shikimate dehydrogenase; E4P: D-erythrose 4-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; DAHP: 3-deoxy-arabino-heptulonate 7-phosphate; DHS: 3-dehydroshikimate; SA: Shikimic acid; Phe: L-phenylalanine; Tyr: L-tyrosine; Trp: L-tryptophan; PCA: Protocatechuic acid; CA: Catechol.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒如表 1 所示。

#### 1.1.2 主要试剂

氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)购自北京迈瑞达科技有限公司;原儿茶酸购自上海源叶生物科技有限公司;儿茶酚购自上海麦克林生化科技股份有

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Names	Relevant characteristics	Sources
<b>Strains</b>		
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> -m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Beijing Tsingke Biotech Co., Ltd.
WJ060	DSM 1576 P1- <i>aroE</i> <sup>TTG</sup> P2- <i>aroF</i> <sup>fbr</sup> $\Delta$ <i>tyrR</i> P4- <i>tktA</i> $\Delta$ <i>ptsI</i> P1- <i>galP</i> P4- <i>glk</i> P1- <i>pykF</i> <sup>TTG</sup> P1- <i>pykA</i> <sup>TTG</sup> P1- <i>pgi</i> <sup>TTG</sup>	[14]
DER02	BL21(DE3) $\Delta$ <i>ldhA</i> ::P4- <i>ubix</i>	This study
DER03	DER02 harboring pRSFduet- <i>quic-RbaroY</i> <sup>G99A</sup>	This study
ER01	DER02 harboring pET30a- <i>Ekaroy</i>	This study
ER02	DER02 harboring pET30a- <i>Emaroy</i>	This study
ER03	DER02 harboring pET30a- <i>Eraroy</i>	This study
ER04	DER02 harboring pET30a- <i>Edaroy</i>	This study
ER05	DER02 harboring pET30a- <i>EspAaroy</i>	This study
ER06	DER02 harboring pET30a- <i>Enaroy</i>	This study
ER07	DER02 harboring pET30a- <i>Eharoy</i>	This study
ER08	DER02 harboring pET30a- <i>EspSEaroy</i>	This study
ER09	DER02 harboring pET30a- <i>Elaroy</i>	This study
ER10	DER02 harboring pET30a- <i>EspSGaroy</i>	This study
ER11	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i>	This study
ER12	DER02 harboring pET30a- <i>Csaroy</i>	This study
ER13	DER02 harboring pET30a- <i>Alisaroy</i>	This study
ER14	DER02 harboring pET30a- <i>Gmaroy</i>	This study
ER15	DER02 harboring pET30a- <i>Gkaroy</i>	This study
ER16	DER02 harboring pET30a- <i>Azcharoy</i>	This study
ER17	DER02 harboring pET30a- <i>Acsiaroy</i>	This study
ER18	DER02 harboring pET30a- <i>Pacaroy</i>	This study
ER19	DER02 harboring pET30a- <i>Tbaroy</i>	This study
ER20	DER02 harboring pET30a- <i>Psparoy</i>	This study
ER21	DER02 harboring pET30a- <i>Ecaroy</i>	This study
ERT01	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>G99A</sup>	This study
ERT02	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>D253E</sup>	This study
ERT03	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>L160F</sup>	This study
ERT04	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>G394W</sup>	This study
ERT05	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>E97D</sup>	This study
ERT06	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>S117P</sup>	This study
ERT07	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>T166G</sup>	This study
ERT08	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>N276F</sup>	This study
ERT09	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>S360A</sup>	This study
ERT10	DER02 harboring pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>S370A</sup>	This study
<b>Plasmid</b>		
pET30a	<i>pBR322 kan lacI</i>	Shanghai D&B Biotech Co., Ltd.
pRSFduet-1	<i>RSF1030 kan lacI</i>	Beijing Xinbosheng Biotech Co., Ltd.

(待续)

(续表 1)

Names	Relevant characteristics	Sources
pRSFduet- <i>quic-RbaroY</i> <sup>G99A</sup>	<i>RSF1030 kan lacI P<sub>T7</sub>-quic P<sub>T7</sub>-RbaroY</i> <sup>G99A</sup>	This study
pET30a- <i>quic</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-quic</i>	This study
pET30a- <i>Ekaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Ekaroy</i>	This study
pET30a- <i>Emaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Emaroy</i>	This study
pET30a- <i>Eraroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Eraroy</i>	This study
pET30a- <i>Edaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Edaroy</i>	This study
pET30a- <i>EspAaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-EspAaroy</i>	This study
pET30a- <i>Enaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Enaroy</i>	This study
pET30a- <i>Eharoy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Eharoy</i>	This study
pET30a- <i>EspSEaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-EspSEaroy</i>	This study
pET30a- <i>Elaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Elaroy</i>	This study
pET30a- <i>EspSGaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-EspSGaroy</i>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i>	This study
pET30a- <i>Csaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Csaroy</i>	This study
pET30a- <i>Alisaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Alisaroy</i>	This study
pET30a- <i>Gmaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Gmaroy</i>	This study
pET30a- <i>Gkaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Gkaroy</i>	This study
pET30a- <i>Azcharoy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Azcharoy</i>	This study
pET30a- <i>Acsiaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Acsiaroy</i>	This study
pET30a- <i>Pacaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Pacaroy</i>	This study
pET30a- <i>Tbaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Tbaroy</i>	This study
pET30a- <i>Psparoy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Psparoy</i>	This study
pET30a- <i>Ecaroy</i>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Ecaroy</i>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>G99A</sup>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i> <sup>G99A</sup>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>D253E</sup>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i> <sup>D253E</sup>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>L160F</sup>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i> <sup>L160F</sup>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>G394W</sup>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i> <sup>G394W</sup>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>E97D</sup>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i> <sup>E97D</sup>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>S117P</sup>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i> <sup>S117P</sup>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>T166G</sup>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i> <sup>T166G</sup>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>N276F</sup>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i> <sup>N276F</sup>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>S360A</sup>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i> <sup>S360A</sup>	This study
pET30a- <i>Rbaroy</i> <sup>S370A</sup>	<i>pBR322 kan lacI P<sub>T7</sub>-Rbaroy</i> <sup>S370A</sup>	This study

限公司。DNA 聚合酶、TransStart *FastPfu* DNA 聚合酶均购自北京全式金生物技术有限公司；KOD One DNA 聚合酶购自北京百灵克生物科技有限责任公司。无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。胶回收和提质粒试剂盒均购自北京康润诚业生物技术有限公司。大肠杆菌 BL21(DE3)购自北京擎科生物科技股份有限公司。

☎: 010-64807509

限公司。质粒 pET30a 购自上海笛柏生物技术有限公司。质粒 pRSFduet-1 购自北京欣博盛生物技术有限公司。

### 1.1.3 培养基

LB 培养基和 NBS 培养基按参考文献[13]配制。

蔗糖 LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋

✉: cjb@im.ac.cn

白朊 10.0, 蔗糖 100.0, 固体平板添加琼脂粉 15.0–20.0。

发酵罐全细胞催化剂培养基 (g/L):  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  7.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.0,  $(NH_4)_2SO_4$  1.6,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.075 6, Citric acid 2.0,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.004 5,  $Na_2SO_4$  0.02,  $ZnSO_4$  0.006 4,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.004,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.000 6, 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, 甘油 40.0。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因整合方法

以大肠杆菌 BL21(DE3)为出发菌株, 利用 Red 同源重组技术将目的基因整合至大肠杆菌基因组中<sup>[15]</sup>。第一步将带有靶位点 60 bp 同源臂的 *cat-sacB* 的片段整合至基因组, 用于替换原有基因。第二步将目的片段整合至基因组, 用于替换掉第一步的 *cat-sacB*。首先以 *cat-sacB* 片段为模板, *ldhA-cat-sacB-F* 和 *ldhA-cat-sacB-R* 为引物扩增第一步的同源重组片段, 该片段用于替换原有基因 *ldhA*。以大肠杆菌 BL21(DE3)基因组为模板, *Up500-ldhA-F* 和 *Up500-ldhA-R* 为引物扩增片段 A; 以 *M1-93* 为模板, *PM1-F* 和 *PM1-R* 为引物扩增片段 B; 以 *ubix* 为模板, *ubix-F* 和 *ubix-R* 为引物扩增片段 C; 以大肠杆菌 BL21(DE3)基因组为模板, *Down500-ldhA-F* 和 *Down500-ldhA-R* 为引物扩增片段 D; 以片段 A、B、C 和 D 为模板, *Up500-ldhA-F* 和 *Down500-ldhA-R* 为引物扩增得到第二步同源重组片段 E, 该片段包含合成调控元件 *M1-93* 和基因 *ubix*, 用于替换掉第一步整合的 *cat-sacB* 片段, 得到菌株 DER02, 相关引物见表 2。

### 1.2.2 质粒构建

以 *EcAroY* (GenBank 登录号: ADF61496)为模板, 在 NCBI 数据库中进行 BLAST, 选取其中 20 条原儿茶酸脱羧酶氨基酸序列在北京擎科生物科技股份有限公司进行密码子优化和全基因合成, 并委托公司将基因连接至 pET30a 载体上

的 *Nde I* 和 *Xho I* 酶切位点之间, 获得原儿茶酸脱羧酶基因表达载体。同样将密码子优化后的 DHS 脱水酶 *Quic*<sup>[16]</sup>编码基因(AAC37159.1), 委托北京擎科生物科技股份有限公司进行全基因合成并连接至 pET30a 载体上的 *Nde I* 和 *Xho I* 酶切位点之间, 获得 DHS 脱水酶基因表达载体。以 pET30a-*quic* 为模板, *pRSFduet-quic-F* 和 *pRSFduet-quic-R* 为引物, 扩增片段 *quic*, 将 *pRSFduet* 质粒用 *Fp-pRSFduet-F* 和 *Fp-pRSFduet-R* 引物扩增得到骨架, 同源重组得到质粒 *pRSFduet-quic*。然后将质粒 *pRSFduet-quic* 用 *Fp-F* 和 *Fp-R* 引物扩增得到骨架, 以突变体 *RbaroY<sup>G99A</sup>* 为模板, *pRSFduet-RbaroY<sup>G99A</sup>-F* 和 *pRSFduet-RbaroY<sup>G99A</sup>-R* 为引物扩增片段, 同源重组得到质粒 *pRSFduet-quic-RbaroY<sup>G99A</sup>*。以质粒 pET30a-*RbaroY* 为模板, *Fp-G99A-F* 和 *Fp-G99A-R* 为引物, 经扩增、回收、体外组装, 转化得到质粒 pET30a-*RbaroY<sup>G99A</sup>*。同理, 得到其他 9 个突变体质粒。

### 1.2.3 全细胞生物催化体系构建

小剂量催化体系: 挑取重组大肠杆菌单菌落或吸取 10  $\mu$ L 冻存液接种于 2 mL 含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、250 r/min 过夜培养作为种子液; 取 400  $\mu$ L 种子液转接到 50 mL 含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、250 r/min 培养至  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 在 30  $^{\circ}$ C、250 r/min 条件下诱导表达 3.5 h; 诱导表达结束后, 5 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞即为全细胞催化剂。

全细胞催化体系: 在 15 mL 一次性试管中依次加入 5 mL 含有 200 或 300 mmol/L PCA 的 NBS 培养基(pH 5.5、6.0 或 6.5), 1.0–5.0  $OD_{600}$  的全细胞催化剂, 10 mmol/L 抗坏血酸, 在 30  $^{\circ}$ C 培养箱条件下静置反应 12 h, 取样检测催化液中 PCA、CA 的含量。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')
ldhA-cat-sacB-F	AAATTTTGTAAAATATTTTATAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAAAGTCT TTCCTGGTGTCCCTGTTGATACC
ldhA-cat-sacB-R	ATGAAAGGTCATTGGGGATTATCTGAATCAGCTCCCCTGGGTTGCAGGGGAGCGGCA AGAATAGATACATCAGAGCTTTTACGAG
PM1-F	TTATCTCTGGCGGTGTTG
PM1-R	AGCTGTTTCCTGGTTTAAAC
Up500-ldhA-F	ATTCGCCAGACAAGCAG
Up500-ldhA-R	CAACACCGCCAGAGATAACAGTGATGTTGAATCACA
ubix-F	TTAAACCAGGAAACAGCTATGAAACGACTCATTGTAG
ubix-R	TGCAGGGGAGCGGCAAGATTATGCGCCCTGCCAGCG
Down500-ldhA-F	TCTTGCCGCTCCCCTGCAAC
Down500-ldhA-R	TGTCGTTTTCGCGGTCGC
Fp-pRSFduet-F	ATGTATATCTCCTTATTAAG
Fp-pRSFduet-R	AAGCTTGC GGCCG CATAATG
pRSFduet-quick-F	TAATAAGGAGATATACATATGAAACTGACCAGCCTG
pRSFduet-quick-R	ATTATGCGGCCGCAAGCTTTTAACGCATTTTAACTG
Fp-F	CATATGTATATCTCCTTC
Fp-R	TAATCTACTAGCGCAGCTTA
pRSFduet-RbaroY <sup>G99A</sup> -F	AAGAAGGAGATATACATATGGAAAAACAACCGCAAAG
pRSFduet-RbaroY <sup>G99A</sup> -R	AGCTGCGCTAGTAGATTATTTTTCATCCAGTCCGG
Fp-G99A-F	CTCGCCCATGTGTTTCGCTAATTCTCTTGC
Fp-G99A-R	GCAAGAGAATTAGCGAAACACATGGGCGAG
Fp-D253E-F	GTTTAACTGTAAGTCTCAACCAGTTCAACACC
Fp-D253E-R	GGTGTGAACTGGTTGAAGCAGTTACAGTTAAAC
Fp-L160F-F	CCGGATCACTACCAAAAACCGCCCATAC
Fp-L160F-R	GTATGGGCCTGGTTTTTGGTAGTGATCCGG
Fp-G394W-F	GTTCACTATAAATCCAAAATGCCATCAGTG
Fp-G394W-R	CACTGATGGCATTGTTGGATTATAGTGAAC
Fp-E97D-F	GTGTTTACCTAAATCTCTTGCCGGTGCACC
Fp-E97D-R	GGTGCACCGGCAAGAGATTTAGGTAAACAC
Fp-S117P-F	CACAGTGCTTTACTCGGATCAACGAAAACC
Fp-S117P-R	GGTTTTCGTTGATCCGAGTAAAGCACTGTG
Fp-T166G-F	CATCGGTATGACCGCCATCCGGATCACTAC
Fp-T166G-R	GTAGTGATCCGGATGGCGGTCATACCGATG
Fp-N276F-F	CTGCAACGCGAATAAACGGCAGTATTTAC
Fp-N276F-R	GTGAAATACTGCCGTTTATTCGCGTTGCAG
Fp-S360A-F	CCACCAGACGGATGCGCGTAAACATTCTGC
Fp-S360A-R	GCAGAATGTTTACGCGCATCCGTCTGGTGG
Fp-S370A-F	GCTTTTAACTTGCAGAATCGCCAGAAATTTACC
Fp-S370A-R	GGTAAATTTCTGGCGATTCTGCAAGTTAAAAAGC

发酵罐放大催化体系：挑取重组大肠杆菌单菌落或吸取 10  $\mu\text{L}$  冻存液接种于 20 mL 含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 培养基中，37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 过夜培养作为一级种子液；将一级种子液全部转接到含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 200 mL LB 培养基中，37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 过夜培养，得到二级种子液。将二级种子液以火焰接种的方式转接至含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素 2.6 L 培养基中，发酵过程使用 50% 甘油进行补料，搅拌速度为 300–900 r/min，以维持溶氧水平在 30%，培养基 pH 值通过自动添加氨水(25%质量分数)控制在 6.8，发酵温度控制在 37  $^{\circ}\text{C}$ ，培养 7.5 h 左右，菌体  $OD_{600}$  值约为 8.0，此时开始降温至 30  $^{\circ}\text{C}$ ，然后加入 IPTG (培养体系中浓度为 0.5 mmol/L) 诱导发酵罐内菌体表达蛋白，同时补加 3 mL 卡那霉素至终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以防质粒丢失，培养 20 h，菌体  $OD_{600}$  值约为 15.0，此时诱导终止。随后发酵液在常温下，8 000 r/min 离心 15 min，收集细胞沉淀，即为全细胞催化剂。催化体系为 1 L，取一定量全细胞催化剂，50 g/L 或 80 g/L DHS 发酵液，10 mmol/L 抗坏血酸。在整个催化过程中，使用稀盐酸全程控制 pH 稳定在 6.0。转速维持在 100 r/min，催化 1、2、3、4 h 后分别取样，制备 HPLC 检测样品检测 PCA 和 CA 的含量。

#### 1.2.4 高效液相色谱分析

将生物催化液 12 000 r/min 离心 10 min，并稀释至适当浓度，用 0.22  $\mu\text{m}$  水系滤膜过滤后进行液相色谱分析。使用配备 Innoval C18 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )和 DAD 紫外检测器高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)进行检测。检测条件为 A 流动相 100% 甲醇:B 流动相 1% 磷酸溶液=20:80，流速 0.8 mL/min，柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ，上样量 10  $\mu\text{L}$ ，检测波长 210 nm 和 280 nm。检测时间 15 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同物种来源的原儿茶酸脱羧酶的挖掘

以阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)来源的原儿茶酸脱羧酶(GenBank 登录号: ADF61496)作为模板序列，在 NCBI 中进行蛋白序列同源比对，随机选取氨基酸相似度 50% 以上的 20 组不同物种来源的蛋白序列，GenBank 登录号依次为 WP\_047027013.1、WP\_108417434.1、WP\_177317483.1、WP\_214575790.1、WP\_133549024.1、WP\_045334891.1、WP\_119936638.1、WP\_208762888.1、WP\_078774058.1、WP\_104948527.1、MCC8019203.1、MBM7742104.1、MCD8102405.1、WP\_115720513.1、WP\_206035314.1、AJE21333.1、WP\_227322091.1、WP\_205985767.1、MCD8044513.1、WP\_230508540.1。将上述筛选的 20 个及报道的 *EcAroY* 基因分别连接至 pET30a 载体的 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点之间。异戊二烯核黄素在芳香族化合物的脱羧基反应中起着重要作用<sup>[13]</sup>，因此将生成辅因子异戊二烯核黄素的基因 *ubix* 过表达，使用 *MI-93* 启动子进行强化<sup>[17]</sup>，获得基因工程菌，命名为 DER02 (表 1)。随后将连接在 pET30a 载体上的脱羧酶质粒分别转入 DER02 中，获得 ER01–ER21 菌株(表 1)。在摇瓶中进行 ER01–ER21 菌株的诱导表达，得到全细胞生物催化剂。

全细胞生物催化生成特定目标产物通常需要在一定的 pH 范围内进行，因此采用不同 pH (5.5、6.0、6.5) 进行反应，催化结果显示，这些全细胞生物催化剂催化能力各不相同。21 个脱羧酶中 *RbAroY* 表现出最好的催化能力，在 pH 5.5 时儿茶酚产量有 3.32 g/L，而其他脱羧酶在这个条件下，儿茶酚含量较低(图 2A)；在 pH 6.0 和 6.5 条件下，*RbAroY* 合成儿茶酚的产量分别为 13.54 g/L 和 10.23 g/L (图 2B 和图 2C)，均为同等条件下最高；但催化液中仍有 11.50 g/L 和 15.50 g/L 原儿茶酸剩余，意味着该脱羧反应过程仍有较大的提升空间。



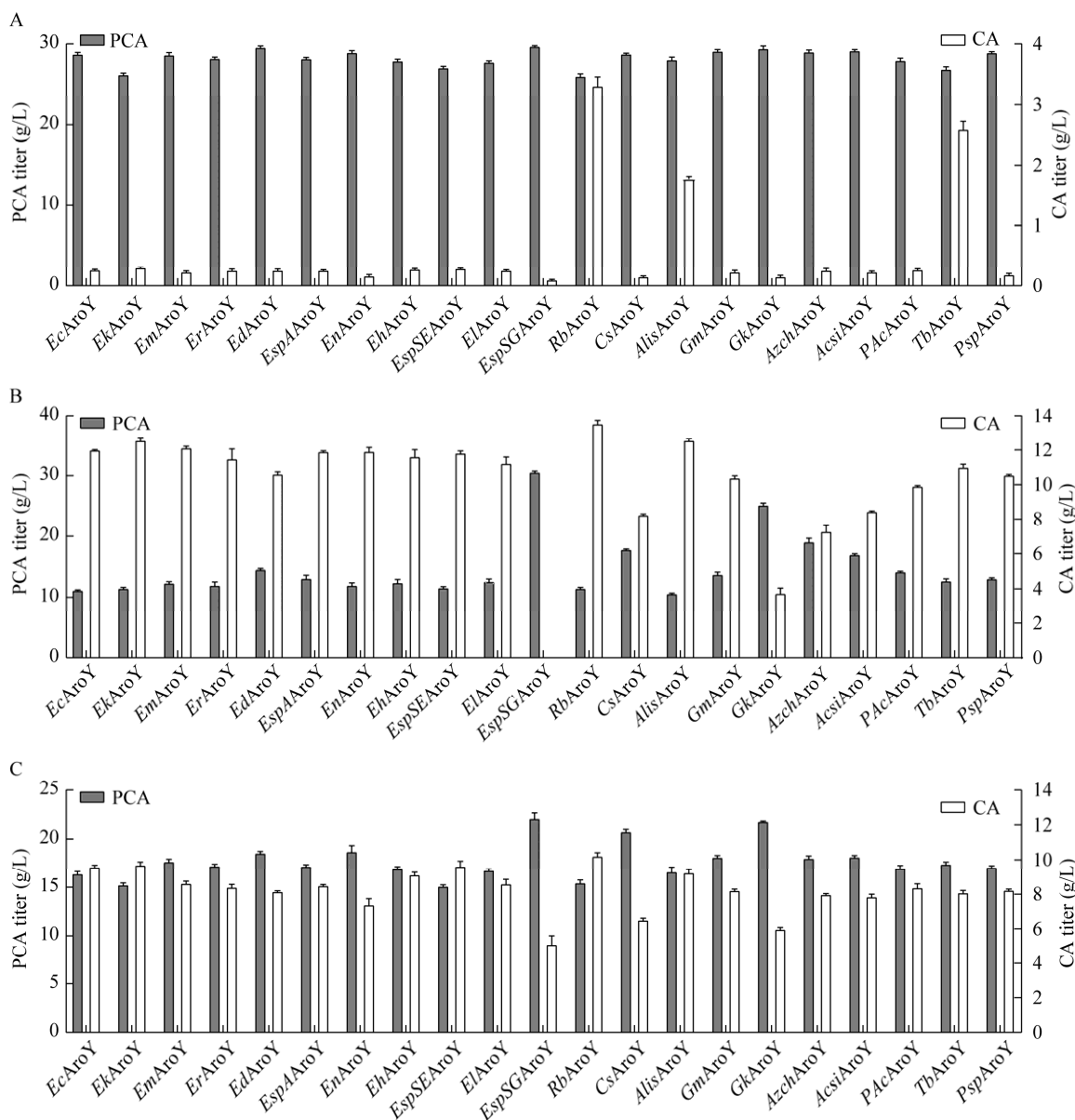


图 2 不同 pH 条件下全细胞催化筛选脱羧酶

Figure 2 Screening of PCA decarboxylases under different pH values through whole-cell catalysis. A: pH 5.5. B: pH 6.0. C: pH 6.5. The accession numbers of 21 decarboxylases: *EcAroY* (GenBank: ADF61496); *EkAroY* (GenBank: WP\_047027013.1); *EmAroY* (GenBank: WP\_108417434.1); *ErAroY* (GenBank: WP\_177317483.1); *EdAroY* (GenBank: WP\_214575790.1); *EspAAroY* (GenBank: WP\_133549024.1); *EnAroY* (GenBank: WP\_045334891.1); *EhAroY* (GenBank: WP\_119936638.1); *EspSEAroY* (GenBank: WP\_208762888.1); *ElAroY* (GenBank: WP\_078774058.1); *EspSGAroY* (GenBank: WP\_104948527.1); *RbAroY* (GenBank: MCC8019203.1); *CsAroY* (GenBank: MBM7742104.1); *AlisAroY* (GenBank: MCD8102405.1); *GmAroY* (GenBank: WP\_115720513.1); *GkAroY* (GenBank: WP\_206035314.1); *AzchAroY* (GenBank: AJE21333.1); *AcsiAroY* (GenBank: WP\_227322091.1); *PAcAroY* (GenBank: WP\_205985767.1); *TbAroY* (GenBank: MCD8044513.1); *PspAroY* (GenBank: WP\_230508540.1).

## 2.2 定点突变 *RbAroY* 提升脱羧酶的稳定性, 提高儿茶酚产量

采用在线的 HotSpot Wizard 软件 (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard/>) 对 *RbAroY* 进行自由能计算, 评估突变蛋白质折叠的吉布斯自由能的相关变化可帮助预测有益突变。一般来说, 能量降低越多, 预示着突变体越稳定。根据自由能降低幅度选择 10 个位点进行定点突变(表 3), 分别为 G99A、D253E、L160F、G394W、E97D、S117P、T166G、N276F、S360A、S370A。将这 10 个质粒分别转入 DER02 中, 获得 ERT01–ERT10 菌株(表 1)。

在 pH 6.0、PCA 200 mmol/L 条件下进行全细胞催化, G99A 突变体 ERT01 的产量有所提高, 由野生型的 13.50 g/L 提高至 15.16 g/L, 产量提高了 12%, 原儿茶酸剩余 9.49 g/L (图 3)。因此, 将该突变体用于接下来的实验。

## 2.3 PCA 高效转化为 CA 的反应条件优化

### 2.3.1 不同菌量及添加抗坏血酸对儿茶酚生物合成的影响

因底物原儿茶酸仍有不少剩余, 因此探索增加催化剂量以期进一步降低底物剩余量, 提升产物含量。催化结果显示, 随着催化剂量的提高 (1.0、2.0、3.0、4.0、5.0  $OD_{600}$ ), 儿茶酚产量逐

渐升高, 由 15.16 g/L 提升至 19.97 g/L (图 4)。

在催化过程中发现上清液会变红, 意味着 CA 会被氧化形成醌类物质。因此尝试添加抗坏血酸(vitamin C, Vc)抑制 CA 氧化。结果表明, 添加 10 mmol/L Vc 能够有效减少底物 PCA 的剩余, 未添加 Vc 时 5.0  $OD_{600}$  催化剂催化结束, 底物剩余 1.34 g/L, 而添加 Vc 后 4.0  $OD_{600}$  催化剂能够将 200 mmol/L 原儿茶酸全部催化, 儿茶酚产量由 19.90 g/L 提升至 21.50 g/L (图 4)。

表 3 HotSpot Wizard 软件计算 *RbAroY* 脱羧酶突变位点自由能的变化

Table 3 Calculation of free energy change of *RbAroY* decarboxylase mutant by HotSpot Wizard software

Mutation	FoldX (kcal/mol)	Rosetta (kcal/mol)
G99A	-1.62	-9.97
D253E	-1.05	-5.25
L160F	-1.06	-2.64
G394W	-1.96	-3.30
E97D	-1.17	-2.17
S117P	-1.26	-2.27
T166G	-1.31	-3.54
N276F	-1.14	-3.71
S360A	-1.17	-2.10
S370A	-1.55	-1.80

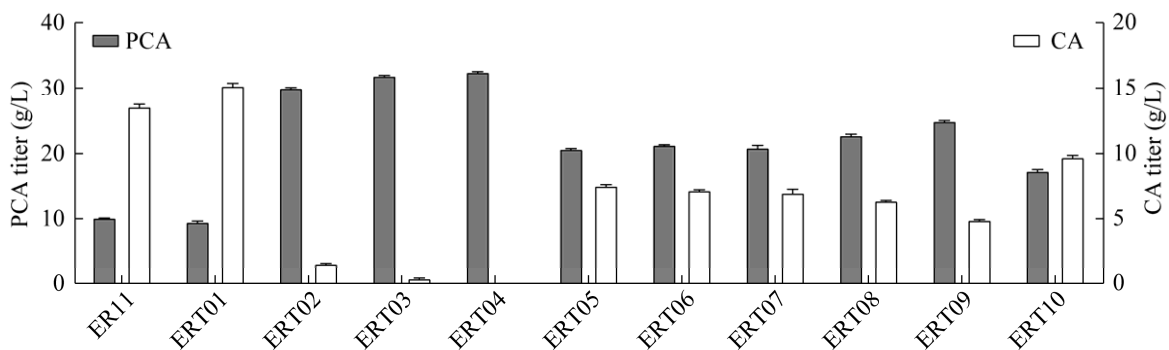


图 3 不同突变体全细胞合成儿茶酚

Figure 3 Catechol production by different mutant-containing whole-cell catalysis.

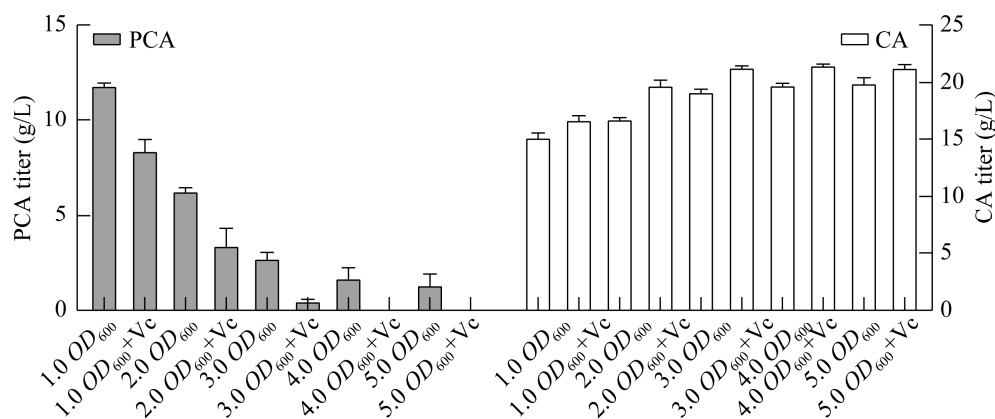


图 4 不同菌量及添加抗坏血酸下全细胞催化合成儿茶酚

Figure 4 Catechol production by various whole-cell catalysis amount and ascorbic acid.

### 2.3.2 增加底物浓度对儿茶酚生物合成的影响

全细胞催化剂 ERT01 菌株在用量 4.0  $OD_{600}$ 、添加 10 mmol/L Vc、pH 6.0 条件下能将 200 mmol/L 底物全部催化，因此，探索底物原儿茶酸浓度由 200 mmol/L 增加至 300 mmol/L 时，儿茶酚产量能否进一步提高。催化结果显示，增加底物浓度，儿茶酚产量由 21.50 g/L 提升到 25.70 g/L，但是有 10.00 g/L 的原儿茶酸残留(图 5)。

## 2.4 DHS 到 CA 的全细胞生物催化合成

### 2.4.1 试管水平全细胞生物催化 DHS 合成 CA

本实验室前期已经构建一株 DHS 高产菌株 WJ060<sup>[18]</sup>，该菌株在糖酵解途径、磷酸戊糖途径和莽草酸途径的关键基因进行过改造，发酵 52 h

生产 90 g/L DHS。本研究将含有 3-脱氢莽草酸脱水酶和原儿茶酸脱羧酶的菌株 DER03 进行诱导表达，离心收集菌体为全细胞催化剂，实现从 DHS 到 CA 的一步催化合成。具体过程为：在 15 mL 一次性试管中依次加入 5 mL 含有 80 g/L DHS 和 10 mmol/L 抗坏血酸的发酵液(pH 6.0)，加入 1.0、2.0 或 5.0  $OD_{600}$  全细胞催化剂，在 30 °C 培养箱条件下反应 12 h，取样检测催化液中儿茶酚的含量。随着催化剂量的增加，儿茶酚产量逐步上升，1.0  $OD_{600}$  催化剂能够生产 20.26 g/L 的儿茶酚，2.0  $OD_{600}$  催化剂能够生产 20.68 g/L 的儿茶酚，5.0  $OD_{600}$  催化 12 h 能够生产 22.64 g/L 的儿茶酚(图 6)。

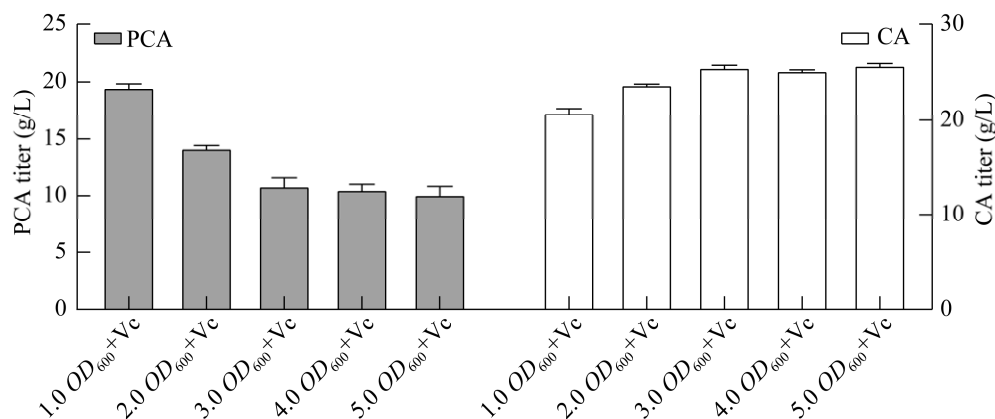


图 5 增加底物浓度时全细胞催化合成儿茶酚

Figure 5 Catechol production through whole-cell catalysis with increased PCA concentration.

#### 2.4.2 发酵罐水平全细胞生物催化 DHS 合成 CA

在小规模全细胞催化过程中, 缓冲液的 pH 波动较大, 会影响全细胞催化的结果, 因此使用发酵罐控制 pH 进行全细胞催化反应。在本实验中, 首先进行了补料分批发酵, 获得了 90 g/L 的 DHS, 然后加入 10 mmol/L Vc, 并稀释到 DHS 浓度为 80 g/L, 获得了儿茶酚催化合成的底物。将菌株 DER03 在发酵罐中培养 7.5 h, 此时  $OD_{600}$  为 8.0 时, 加入 0.5 mmol/L IPTG, 诱导培养 20 h,  $OD_{600}$  达到 15.0, 收集细胞为全细胞催化剂。在发酵罐中加入含有 10 mmol/L Vc 的 80 g/L 的 DHS 发酵液以及 5.0 或 10.0  $OD_{600}$  的全细胞催化剂。

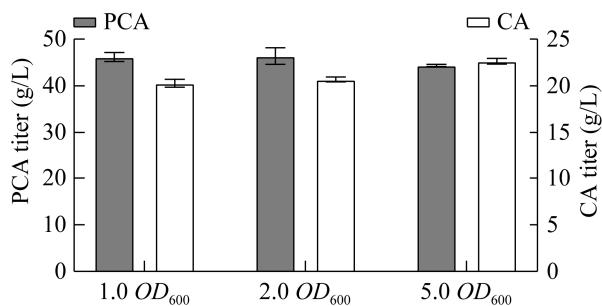


图 6 试管中以 DHS 发酵液为底物全细胞催化合成 CA

Figure 6 CA production in test tube through whole-cell catalysis using DHS fermentation broth as substrate.

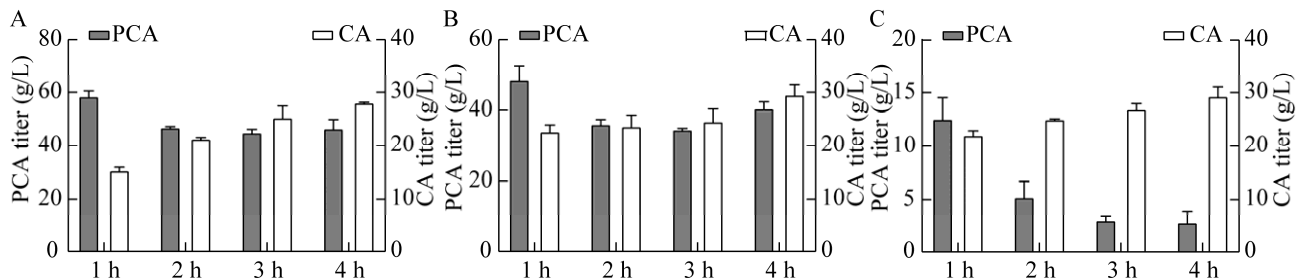


图 7 发酵罐中以 DHS 发酵液为底物全细胞催化合成 CA

Figure 7 CA production in fermentator through whole-cell catalysis using DHS fermentation broth as substrate. A: 5.0  $OD_{600}$ , 80 g/L DHS. B: 10.0  $OD_{600}$ , 80 g/L DHS. C: 10.0  $OD_{600}$ , 50 g/L DHS.

使用稀盐酸调控 pH, 使 pH 始终维持在 6.0。取样检测催化液中儿茶酚的含量, 从催化结果可以看到(图 7), 随着催化时间的延长, 儿茶酚的产量逐渐提高, 催化 4 h 儿茶酚产量最高, 延长催化时间后儿茶酚产量下降, 加入 5.0  $OD_{600}$  催化剂, 儿茶酚从 1 h 的 15.32 g/L 增长到 4 h 的 28.08 g/L (图 7A); 催化剂用量增加至 10.0  $OD_{600}$  时, 儿茶酚从 1 h 的 22.70 g/L 增长到 4 h 的 29.55 g/L (图 7B)。以 80 g/L DHS 为底物, 剩余大量原儿茶酸, 采用 50 g/L DHS 为底物, 加入 10.0  $OD_{600}$  催化剂, 催化 4 h 同样能产生 29.35 g/L 的儿茶酚(图 7C)。

### 3 讨论与结论

儿茶酚是一种重要的芳香族化合物, 广泛应用于各个领域, 并且还是顺, 顺-粘康酸等精细化学品前体物质<sup>[19]</sup>。目前儿茶酚的生产主要通过化学合成法和生物合成法, 化学合成法转化率低, 污染大; 而生物合成法具有绿色环保、可大规模生产等优点。生物合成主要包括两大类: 从头合成和全细胞催化。由于儿茶酚对大肠杆菌具有生物毒性, 从头合成难度较大, 从而抑制细胞生长导致从头合成儿茶酚产量非常低<sup>[3]</sup>。因此本研究采用全细胞催化的方式进行儿茶酚的合成。

基于已报道的 PCA 脱羧酶活性低的问题,本研究以已报道的 *E. cloacae* 来源的脱羧酶为模板,采用同源序列比对的方法,随机选择 20 条同源性大于 50% 的脱羧酶,采用全细胞催化的方法挖掘高效转化的原儿茶酸脱羧酶。结果显示,表达 *RbAroY* 脱羧酶的全细胞催化剂 ER11 表现出最好的催化性能,该催化剂能够在 pH 6.0,底物浓度为 200 mmol/L 原儿茶酸时生产儿茶酚 13.54 g/L,在相同条件下,较已报道的 *E. cloacae* 来源的脱羧酶催化剂,儿茶酚含量提升 1.50 g/L。同源序列比对能够高精度地识别序列间的相似性,能够处理各种类型的序列数据,包括 DNA、RNA 和蛋白质序列,且不依赖于序列长度,因此在生物信息学和分子生物学等领域广泛应用。

催化液中还有部分原儿茶酸未被催化,因此该脱羧反应需要进一步加强。为了提升酶的稳定性并进一步提升催化效率,使用 HotSpot Wizard 在线软件对该脱羧酶 *RbAroY* 进行自由能计算,自由能计算是评估分子稳定性和反应可能性的重要指标,能量降低越多,预示着突变体越稳定。根据自由能降低幅度筛选到 *RbAroY*<sup>G99A</sup> 突变蛋白的 ERT01 全细胞催化剂,能进一步提升儿茶酚产量,由野生型的 13.54 g/L 提高至 15.16 g/L。之后进一步优化全细胞催化剂量,发现随着催化剂量的提高,儿茶酚产量逐渐升高,由 15.16 g/L 提升至 19.97 g/L。在催化过程中发现催化液会变红,这是由于邻苯二酚结构的物质被氧化成醌类物质,而醌类物质为缺电子基团,易对富电子基团如氨基、巯基发生反应,在氨基酸或者核苷酸上形成加和物,破坏蛋白质或者染色体结构<sup>[20-21]</sup>。添加 Vc 有助于抑制原儿茶酸和儿茶酚的氧化反应,使得催化结束的催化液颜色由红色变为浅黄

色,有助于儿茶酚产量的提升,在 4.0  $OD_{600}$  和 10 mmol/L Vc 条件下能够将底物 200 mmol/L 原儿茶酸全部催化,产量提升至 21.50 g/L。提高底物浓度至 300 mmol/L,儿茶酚产量由 21.50 g/L 进一步提升至 25.70 g/L。

本实验室前期已经构建一株 DHS 高产菌株 WJ060,因此尝试以发酵液中的 DHS 为底物合成 CA。将已报道的 Quic 脱水酶<sup>[16]</sup>和突变体 *RbAroY*<sup>G99A</sup> 脱羧酶连接至 pRSFduet 质粒,转化到底盘菌株 DER02 中,得到菌株 DER03。该全细胞催化剂用量在 5.0  $OD_{600}$  时,催化 12 h 能够在试管中合成 22.64 g/L 的儿茶酚。基于在小规模水平上优化得到菌株的最适生长条件和全细胞催化生成 CA 的条件,为了进一步提高 CA 的生成量,在 5 L 发酵罐上进行放大催化。结果表明催化 4 h 儿茶酚产量最高,儿茶酚产量最高达到 29.55 g/L。与前期报道<sup>[13]</sup>的全细胞催化原儿茶酸合成 17.70 g/L 儿茶酚相比,本研究中得到的儿茶酚生成量有明显提高。

不论以原儿茶酸还是 DHS 发酵液作为底物,催化反应结束后,催化液中仍然含有大量原儿茶酸未被反应,提高催化剂的量并不能降低原儿茶酸含量。为提高儿茶酚产量以满足工业化生产需求,后期需要进一步对脱羧酶进行理性设计并对菌株培养条件、全细胞催化过程以及放大工艺等进行系统优化。

本研究无需使用石油化工原料,通过挖掘和改造高活性的原儿茶酸脱羧酶,利用生物催化技术实现了儿茶酚的高效生产,有助于推动实现儿茶酚合成路线的转变,将化工合成污染的末端治理转变为源头控制,对于破解我国儿茶酚长期依赖进口的困境,建立绿色、低碳与可持续的儿茶酚生产工艺具有较大意义。

## REFERENCES

- [1] PUGH S, McKENNA R, OSMAN M, THOMPSON B, NIELSEN DR. Rational engineering of a novel pathway for producing the aromatic compounds p-hydroxybenzoate, protocatechuate, and catechol in *Escherichia coli*[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(11): 1843-1850.
- [2] BALDERAS-HERNÁNDEZ VE, TREVIÑO-QUINTANILLA LG, HERNÁNDEZ-CHÁVEZ G, MARTINEZ A, BOLÍVAR F, GOSSET G. Catechol biosynthesis from glucose in *Escherichia coli* anthranilate-overproducer strains by heterologous expression of anthranilate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 136.
- [3] LI WS, XIE DM, FROST JW. Benzene-free synthesis of catechol: interfacing microbial and chemical catalysis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(9): 2874-2882.
- [4] 庞振涛, 焦凤茹, 刘晓东. 邻苯二酚技术进展与市场分析[J]. *化工中间体*, 2008(1): 27-29.  
PANG ZT, JIAO FR, LIU XD. Market analysis and technological progress of pyrocatechol[J]. *Chemical Intermediates*, 2008(1): 27-29 (in Chinese).
- [5] 胡智涛. 苯酚羟基化制备苯二酚工艺研究[J]. *中国石油和化工标准与质量*, 2023, 43(15): 196-198.  
HU ZT. Study on preparation of hydroquinone by hydroxylation of phenol[J]. *China Petroleum and Chemical Standard and Quality*, 2023, 43(15): 196-198 (in Chinese).
- [6] 张宗武, 梁璇, 张敏, 李俊芳, 武波. 产邻苯二酚工程菌的构建及发酵条件的优化[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(9): 67-71.  
ZHANG ZW, LIANG X, ZHANG M, LI JF, WU B. The formation of recombinant strain producing catechol and the optimization of fermentation conditions[J]. *China Biotechnology*, 2006, 26(9): 67-71 (in Chinese).
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] CHOI SS, SEO SY, PARK SO, LEE HN, SONG JS, KIM JY, PARK JH, KIM S, LEE SJ, CHUN GT, KIM ES. Cell factory design and culture process optimization for dehydroshikimate biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 241.
- [10] LI J, YE BC. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for high-yield production of protocatechuic acid[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 319: 124239.
- [11] KOGURE T, SUDA M, HIRAGA K, INUI M. Protocatechuate overproduction by *Corynebacterium glutamicum* via simultaneous engineering of native and heterologous biosynthetic pathways[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 65: 232-242.
- [12] 郭明, 胡昌华. 生物转化: 从全细胞催化到代谢工程[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(4): 110-115.  
GUO M, HU CH. Bioconversion—from whole cell biocatalysis to metabolic engineering[J]. *China Biotechnology*, 2010, 30(4): 110-115 (in Chinese).
- [13] SONG GT, WU FL, PENG YF, JIANG XL, WANG QH. High-level production of catechol from glucose by engineered *Escherichia coli*[J]. *Fermentation*, 2022, 8(7): 344.
- [14] WANG XS, WU FL, ZHOU D, SONG GT, CHEN WJ, ZHANG CY, WANG QH. Cofactor self-sufficient whole-cell biocatalysts for the relay-race synthesis of shikimic acid[J]. *Fermentation*, 2022, 8(5): 229.
- [15] DATSENKO KA, WANNER BL. One-step inactivation

- of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [16] ZHOU D, WU FL, PENG YF, QAZI MA, LI RS, WANG YZ, WANG QH. Multi-step biosynthesis of the biodegradable polyester monomer 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid from glucose[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 92.
- [17] LU J, TANG JL, LIU Y, ZHU XN, ZHANG TC, ZHANG XL. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2455-2462.
- [18] 吴凤礼, 彭彦峰, 徐毅诚, 曹鹏, 陈五九, 王钦宏. 代谢工程改造微生物生产芳香族化合物的研究进展[J]. 生物加工过程, 2017, 15(5): 9-23.
- WU FL, PENG YF, XU YC, CAO P, CHEN WJ, WANG QH. Advances in microbial metabolic engineering for producing aromatic chemicals[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2017, 15(5): 9-23 (in Chinese).
- [19] 宋国田, 江小龙, 陈五九, 彭彦峰, 路福平, 王钦宏. 产顺,顺-粘康酸细胞工厂的构建与优化[J]. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1212-1223.
- SONG GT, JIANG XL, CHEN WJ, PENG YF, LU FP, WANG QH. Construction and optimization of microbial cell factories for producing *cis,cis*-muonic acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(9): 1212-1223 (in Chinese).
- [20] CABRERA-VALLADARES N, MARTÍNEZ A, PIÑERO S, LAGUNAS-MUÑOZ VH, TINOCO R, de ANDA R, VÁZQUEZ-DUHALT R, BOLÍVAR F, GOSSET G. Expression of the *mela* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(6): 772-779.
- [21] ITO S, WAKAMATSU K. Chemistry of mixed melanogenesis: pivotal roles of dopaquinone[J]. Photochemistry and Photobiology, 2008, 84(3): 582-592.

(本文责编 陈宏宇)