

• 天然产物生物合成 •

赵广荣 天津大学教授、博士生导师。中国生物工程学会、药学会、中国微生物学会会员。从事合成生物学研究，主要进行人工染色体合成、植物天然产物的微生物合成与高效制造研究。现主持国家重点研发计划项目、国家自然科学基金项目、广东省重点领域研发计划项目。创新设计了丹参素的人工线性途径、红景天苷的汇聚途径、柠檬烯的正交途径，构建了10余种天然产物的细胞工厂。相关研究成果发表在*Science*、*Metabolic Engineering*、*ACS Synthetic Biology*等期刊上，获得天津市自然科学特等奖1项、技术发明二等奖和技术进步二等奖各1项。



植物多酚的微生物合成

李玲玲, 刘雪, 邱泽天, 赵广荣

天津大学 化工学院 教育部合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300350

李玲玲, 刘雪, 邱泽天, 等. 植物多酚的微生物合成. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2050-2076.

Li LL, Liu X, Qiu ZT, et al. Microbial synthesis of plant polyphenols. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2050-2076.

摘要: 植物多酚属于苯丙烷衍生物, 包括酚酸类、芪类、姜黄素类和黄酮类等。它们具有抗氧化、扩血管、抗凝血、抗炎、抗肿瘤、抗病毒等生理药理活性, 在医药、食品、化妆品、化工等领域具有巨大的应用市场。微生物具有生长快、培养简单、可工业化等优点, 成为异源合成天然产物的重要宿主。近年来, 合成生物学的发展促进了植物天然产物的微生物合成, 并取得了实质性进展。文中综述了植物多酚代谢途径在工程大肠杆菌、酿酒酵母等微生物中的构建、表达和产物合成现状, 讨论了提高产量的前体工程、动态调控、共培养等优化策略, 并就未来的多酚途径工程提出展望。

关键词: 植物多酚, 微生物, 合成生物学, 代谢工程, 酚酸类, 芪类, 姜黄素类, 黄酮类

Microbial synthesis of plant polyphenols

Lingling Li, Xue Liu, Zetian Qiu, and Guangrong Zhao

Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, Frontier Science Center for Synthetic Biology, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China

Abstract: Plant polyphenols are phenylpropanoid derivatives including phenolic acids, stilbenes, curcumins and flavonoids.

Received: November 24, 2020; **Accepted:** February 14, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31870077), the Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province, China (No. 2020B0303070002).

Corresponding author: Guangrong Zhao. Tel: +86-22-85356580; Fax: +86-22-27403389; E-mail: grzhao@tju.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 3187077), 广东省重点领域研发计划 (No. 2020B0303070002) 资助。

网络出版时间: 2021-02-23

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210222.1632.009.html>

These compounds display a variety of biological and pharmacological activities such as antioxidation, vasorelaxation, anti-coagulation, anti-inflammation, anti-tumor and anti-virus, conferring a huge application potential in the sectors of drugs, foods, cosmetics, and chemicals. Microorganisms have become important hosts for heterologous synthesis of natural products due to the advantages of fast growth, easiness of culture and industrial operation. In recent years, the development of synthetic biology has boosted the microbial synthesis of plant natural products, achieving substantial progress. In this review, we summarize the synthesis of plant polyphenols in engineered *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and other microorganisms equipped with the designed biosynthetic pathways of polyphenols. We also discuss the optimization strategies such as precursor engineering, dynamic regulation, and co-cultivation to improve the production of polyphenols and propose future prospects for polyphenol pathway engineering.

Keywords: plant polyphenols, microorganisms, synthetic biology, metabolic engineering, polyphenolic acids, stilbenes, curcuminoids, flavonoids

植物多酚 (Plant polyphenols) 是源自苯丙烷代谢途径的一类化合物, 含有至少 2 个酚环^[1]。据估计, 自然界存在 10–20 万种植物次级代谢产物, 光合作用固定的总碳中有 20% 流入了苯丙烷途径, 形成数量庞大、广泛分布、结构复杂的酚类化合物^[2]。按照分子碳骨架的不同, 植物多酚大致可分为酚酸类 (Polyphenolic acids) ((C6–C3)_n)、芪类 (Stilbenes) (C6–C2–C6)、姜黄素类 (Curcumins) (C6–C7–C6) 和黄酮类 (Flavonoids) (C6–C3–C6) (图 1)。其中, 黄酮类是最大的一个亚类, 根据苯环位置和羟基数目可以细分为黄烷酮 (Flavanones)、黄酮 (Flavones)、异黄酮 (Isoflavones)、黄酮醇 (Flavonols)、花青素 (Anthocyanidins) 及其衍生物。

植物多酚类产物的分子结构中存在多个羟基, 可与活性氧和活性氮结合^[1–3], 清除体内过多的自由基, 因此植物多酚表现出很强的抗氧化活性。植物多酚还具有扩张脑血管、抗血凝、抗炎、抗肿瘤、抗病毒等作用, 可作为治疗这些疾病的药物^[4]。丹参素、丹酚酸 B、灯盏花素已经被批准用于临床治疗脑栓塞、心肌梗塞和冠心病, 而姜黄素、阿克拉定及其衍生物等进入临床抗肿瘤药物的试验阶段。根皮苷具有降血糖作用, 以根皮苷为模型药效团, 开发上市了一系列治疗糖尿病的化学药物^[5]。最近发现丹酚酸 C 能阻止 S 蛋白六螺旋束核心的形成, 黄芩苷和黄芩素能抑制 3-胰凝乳蛋白酶样蛋白酶, 是新冠病毒的高效抑制剂^[6–7]。

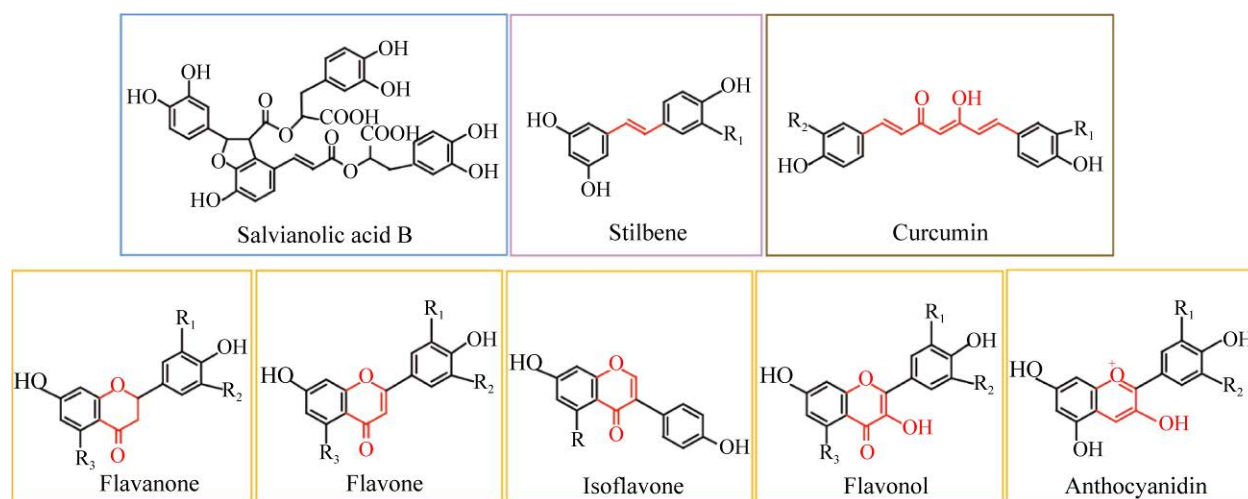


图 1 植物多酚的代表性骨架结构类型

Fig. 1 Representative skeleton structures of plant polyphenols.

植物多酚在保健品和食品等方面也有着重要的应用^[8]。作为营养补充剂,植物多酚能减少机体的氧化性应激、调节免疫系统、延缓衰老。姜黄素、花色苷是食品的增色剂,三叶苷的甜度约为蔗糖的 300 倍,可作为食品添加剂和商用的甜味剂。植物多酚还可以通过氢键、共价键和配位键等多种相互作用与其他分子结合,作为载体用于构筑各种新型功能材料^[9]。

植物多酚在医药、食品、化妆品、化工等领域具有巨大的市场应用前景。预计 2026 年黄酮类化合物的市场份额将达到 12.59 亿美元,2027 年白藜芦醇和姜黄素的市场份额将分别达到 1.49 亿美元和 1.519 亿美元。因此,需要开发大规模生产多酚的方法以满足市场需求。随着合成生物学的技术和工具发展,利用微生物合成天然产物成为一种高效、绿色和经济的方法。文中对丹酚酸、白藜芦醇、姜黄素、黄酮等植物多酚的微生物合成进行综述,以期推动植物源天然产物的工业化发展。

1 丹酚酸类的微生物合成

丹参酚酸类是中药丹参中的水溶性活性成分,包括丹参素 (Danshensu, salvanic acid A)、迷迭香酸 (Rosmarinic acid)、原紫草酸 (Prolithospermic acid)、丹酚酸 (Salvianolic acids)等。对香豆酸 (p-coumaric acid)、咖啡酸 (Caffeic acid) 是酚酸

类合成的关键前体,丹参素是丹酚酸类产物的另一个苯环的结构来源。丹酚酸可以看成是丹参素和咖啡酸的衍生物或酯化的聚合物。目前丹参素、迷迭香酸的途径已被解析,其他丹参酚酸途径仍然未知。从微生物的芳香氨基酸代谢出发,表达外源基因,可重构关键前体的微生物合成途径,再经过设计改造和表达酚酸类合成基因,可实现丹酚酸类的微生物合成。

1.1 咖啡酸

微生物从葡萄糖到咖啡酸有两条合成途径,一条是从酪氨酸的代谢节点切入,表达酪氨酸解氨酶 (Tyrosine ammonialyase, TAL)、对香豆酸-3-羟化酶 (*p*-coumarate 3-hydroxylase, C3H)/细胞色素 P450 还原酶 (Cytochrome P450 reductase, CPR),合成咖啡酸;另一条是从苯丙氨酸代谢节点切入,表达苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonialyase, PAL)、反式肉桂酸-4-羟化酶 (*Trans*-cinnamate 4-monooxygenase, C4H)/CPR,合成对香豆酸,进而 3'-羟化生成咖啡酸 (图 2)。由于该途径涉及的 C4H/C3H 是细胞色素 P450 酶类,在真核酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中表达具有一定的优势。在酿酒酵母中,表达 TAL、C3H 和 CPR,强化酪氨酸途径和优化培养基后,酿酒酵母利用葡萄糖合成了 29.58 mg/L 的对香豆酸和 11.3 mg/L 咖啡酸^[10] (表 1)。虽然 TAL

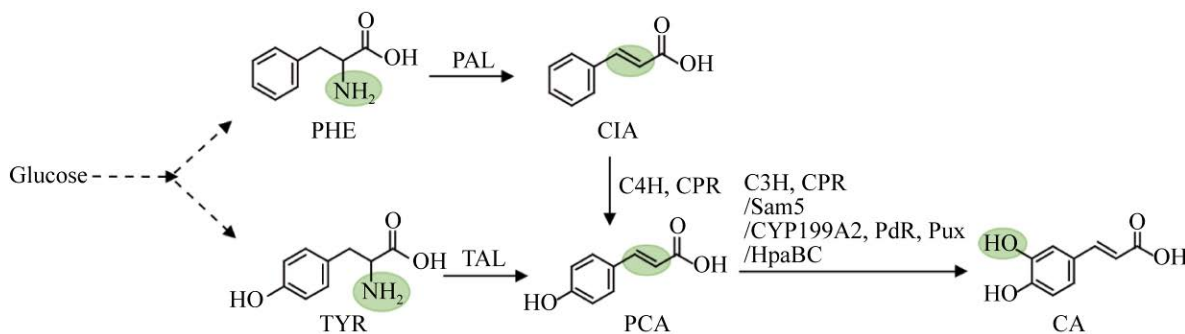


图 2 咖啡酸的微生物合成途径

Fig. 2 Biosynthetic pathway of Caffeic acid. PAL: phenylalanine ammonialyase; C4H: *Trans*-cinnamate 4-monooxygenase; CPR: cytochrome P450 reductase; TAL: tyrosine ammonia-lyase; C3H: *p*-coumarate 3-hydroxylase; CYP199A2: cytochrome P450 199A2; HpaBC: 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase complexes B and C; TYR: tyrosine; PHE: phenylalanine; CIA: cinnamic acid; PCA: *p*-coumaric acid; CA: caffeic acid.

能直接将酪氨酸转化为对香豆酸,比从苯丙氨酸出发缩短了合成途径,也规避了 C4H 的表达,但从目前的研究报道看,酿酒酵母中表达植物咖啡酸途径的效率仍然较低。

由于 C4H/C3H 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中表达较为困难,需要寻找替代酶。目前已经鉴定到西班牙糖丝菌 *Saccharothrix espanaensis* 的 Sam5^[11-12]、沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* 的 CYP199A2 及其突变体^[13],大肠杆菌^[14]和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*^[15]的 HpaBC,都可将对香豆酸高效转化为咖啡酸。利用高产酪氨酸大肠杆菌菌株,表达 TAL 和 HpaBC 两个酶,以甘油为主要碳源,合成了 766.7 mg/L 咖啡酸^[16]。在酿酒酵母表达铜绿假单胞菌来源的 HpaB 和肠道沙门氏菌 *Salmonella enterica* 来源的 HpaC,合成了 289.4 mg/L 的咖啡酸^[17],表明该途径在酵母中也是高效的。

1.2 丹参素

笔者课题组采用逆合成策略,从 4-羟基苯丙酮酸出发,设计了丹参素的微生物合成途径(图 3A)。在植物中丹参素途径未解析的情况下,通过生物大数据挖掘出两个关键酶,构建出一条丹参素的人工合成途径。该途径以 4-羟基苯丙酮酸为底物,大肠杆菌内源性的羟化酶 (HpaBC) 催化苯环间位羟基化,植物乳杆菌 *Lactobacillus pentosus* D-乳酸脱氢酶 (D-lactate dehydrogenase, D-LDH) 还原酮基,生成丹参素。在这个途径中,酮基还

原反应是限速步骤。采用突变体 D-LDHY52A,极大地提高了丹参素的产量。利用模块化工程和底盘菌株改造等策略,将丹参素途径与高产酪氨酸的底盘大肠杆菌进行适配化,获得了从葡萄糖发酵合成丹参素的工程菌株(图 3B)^[18]。

在上述工作的基础上,笔者课题组采用启动子工程,微调组成型表达丹参素途径。进而采用染色体工程,将酪氨酸途径强化基因模块和丹参素途径合成基因整合到大肠杆菌染色体上,构建了不使用抗生素和诱导剂的高产丹参素菌株(图 3C),补料发酵 60 h,丹参素产量达 5.6 g/L^[19]。该菌株遗传稳定,可放大培养,具备工业化生产的潜力。

除了工程微生物从头合成丹参素外,最近报道了生物转化制备丹参素。江南大学蔡宇杰课题组在大肠杆菌中表达 L-氨基酸脱氨酶和 D-乳酸脱氢酶,将原料 L-多巴转化为丹参素^[20-21];同时表达 L-谷氨酸脱氢酶或者葡萄糖脱氢酶用于 NADH 再生,转化得率为 95.2%^[21]。在此工程菌的基础上,表达酪氨酸酚裂解酶,将丹参素的转化路线推向传统化工原料邻苯二酚和丙酮酸^[22],转化得率为 59.6%。同济大学 Li Chao-课题组构建了 D-扁桃酸脱氢酶、苯丙氨酸-4-羟化酶和羟基苯乙酸酯-3-羟化酶的级联酶催化体系,添加 NADH 和 DMPH4 双辅因子循环酶和底物,将原料苯丙酮酸转化为丹参素,转化得率为 84.9%^[23]。这些新工艺路线具有绿色和可持续性,值得进一步优化和改进。

表 1 咖啡酸的微生物合成

Table 1 Production of caffeic acid in engineered microbes

Microbe	Genes	Substrate	Titer (mg/L)	References
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>aro4</i> ^{K229L} , <i>aro7</i> ^{G141S} , <i>Δpdc5</i> , <i>Δaro10</i> , <i>Rctal</i> , <i>Atc3h</i> , <i>Atcpr1</i>	Glucose	11.3	[10]
	<i>Rttal</i> , <i>PahpaB</i> , <i>SehpaC</i>	Tyrosine	289.4	[17]
<i>Escherichia coli</i>	<i>Rgtal</i> , <i>sam5</i>	Glucose	106.0	[12]
	<i>Rgtal</i> , <i>cyp199A2</i> , <i>pdr</i> , <i>pux</i>	Tyrosine	280.0	[13]
	<i>tyrA</i> ^{fbr} , <i>ppsA</i> , <i>tktA</i> , <i>aroG</i> ^{fbr} , <i>ΔpheLA</i> , <i>ΔtyrA</i> , <i>Rgtal</i> , <i>hpaBC</i>	Glycerol	766.7	[16]

Rc: *Rhodobacter capsulatus*; At: *Arabidopsis thaliana*; Rt: *Rhodospiridium toruloides*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Se: *Salmonella enterica*; Rg: *Rhodotorula glutinis*; fbr: feedback inhibition resistance.

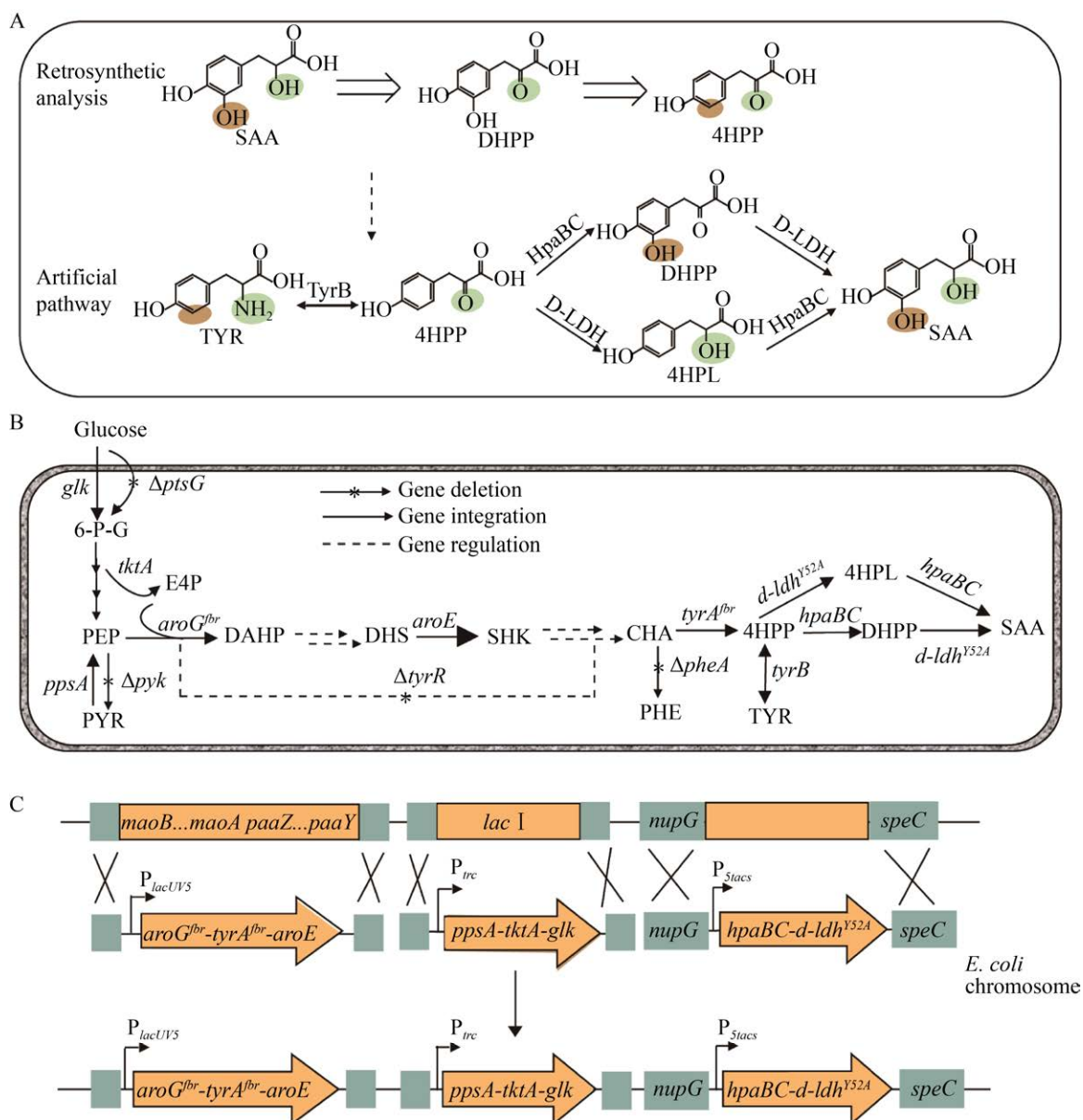


图3 工程大肠杆菌合成丹参素

Fig. 3 Biosynthesis of salvanic acid A in engineered *E. coli*. (A) SAA retrosynthetic pathway. (B) The artificial synthetic pathway of SAA from glucose. (C) The targeted integration of three modules into chromosome of engineered *E. coli*. 6-P-G: 6-phosphate D-glucose; PEP: phosphoenolpyruvate; PYR: pyruvate; DAHP: 3-deoxy-arabino-heptulonate 7-phosphate; DHS: 3-dehydroshikimic acid; SHK: shikimic acid; CHA: chorismic acid; 4HPP: 4-hydroxyphenylpyruvate; DHPP: 3,4-dihydroxyphenylpyruvate; 4-HPL: 4-hydroxyphenyllactate; TYR: tyrosine; PHE: phenylalanine; SAA: salvanic acid A.

1.3 迷迭香酸

迷迭香酸合成酶 (Rosmarinic acid synthase, RAS) 催化丹参素和咖啡酰 CoA 的酯化反应, 在酿酒酵母中合成了迷迭香酸^[24], 表明迷迭香

酸合成酶在酵母中具有功能。在酿酒酵母中表达植物迷迭香酸合成途径, 包括约氏黄杆菌 *Flavobacterium johnsoniae* FjTAL、拟南芥 4-香豆酰 CoA 连接酶 (4-coumarate:coenzyme A ligase)

At4CL、褐家鼠 *Rattus norvegicus* 酪氨酸转氨酶 (Tyrosine aminotransferase) RnTAT、彩叶草 *Plectranthus scutellarioides* 对羟基苯丙酮酸还原酶 (Hydroxyphenylpyruvate reductase, HPPR) CbHPPR、CbRAS、大肠杆菌 EcHpaBC、丹参 *Salvia miltiorrhiza* SmCYP98A14 和 SmCPR (图 4), 并通过正交设计优化基因表达强度, 利用葡萄糖合成了 5.95 mg/L 迷迭香酸, 同时对羟基

肉桂酸、对羟基苯丙酮酸、对羟基-苯乳酸等中间产物大量积累^[24], 表明植物迷迭香酸途径在酿酒酵母中是低效的。这可能是由于植物中合成迷迭香酸涉及细胞色素 P450 酶催化的苯环羟化反应, 需要氧化还原伴侣酶参与。在大肠杆菌中没有采用植物合成路线, 而采用微生物合成丹参素途径 (HpaBC 和 D-LDH)、植物合成咖啡酸途径 (PAL 和 4CL) 和 RAS 构成的迷迭香酸杂合途径, 以葡

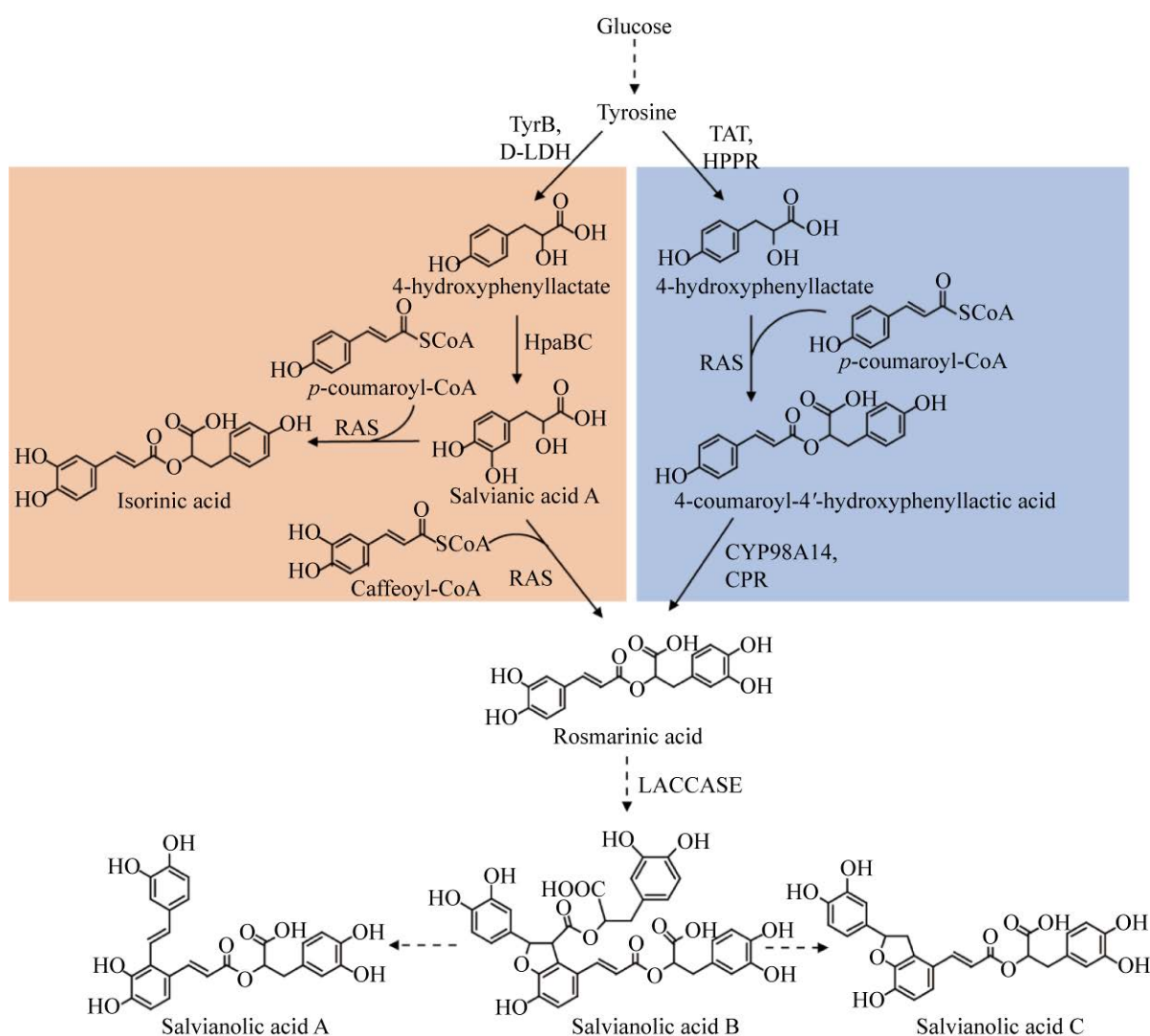


图 4 迷迭香酸的微生物合成途径

Fig. 4 Biosynthetic pathways of rosmarinic acid. Artificial sythetic pathway is shown in left column and plant-derived pathway in right column. TAT: tyrosine aminotransferase; HPPR: hydroxyphenylpyruvate reductase; HpaBC: 4-hydroxyphenyllactate 3-hydroxylase complexes B and C; RAS: rosmarinic acid synthase; CYP98A14: cytochrome P450 98A14; CPR: cytochrome P450 reductase.

葡萄糖为底物合成了 0.65 mg/L 迷迭香酸^[25]。迷迭香酸合成酶是限速因素,一方面该酶活性较低,即使添加底物丹参素和咖啡酸,迷迭香酸产量仍然较低;另一方面,该酶的底物特异性不强,在合成迷迭香酸的同时,还合成了副产物咖啡酰-对-4'-羟基苯乳酸、对香豆酰-苯乳酸^[26]。

2 芪类的微生物合成

芪类化合物,又称二苯乙烯类多酚化合物,主要包括白藜芦醇 (Resveratrol)及其羟基化衍生物白皮杉醇 (Piceatannol)、甲氧基化产物松茛 (Pinostilbene) 和紫檀芪 (Pterostilbene)、糖基化产物虎杖苷 (Polydatin, piceid) (图 5)。

2.1 白藜芦醇

TAL、4CL 和白藜芦醇合成酶 (Stilbene synthase, STS) 组成了白藜芦醇的合成途径 (图 5)。由 STS 催化对香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA 生成白藜芦醇,目前已经在大肠杆菌、酿酒酵母、谷氨酸棒杆菌和解脂耶氏酵母等微生物中合成 (表 2)。

对白藜芦醇途径中的 4CL、STS 进行了筛选,包括来源于拟南芥、欧芹 *Petroselinum crispum*、紫草 *Lithospermum erythrorhizon*、烟草 *Nicotiana tabacum*、链霉菌的 4CL,葡萄 *Vitis vinifera*、花生 *Arachis hypogaea*、虎杖 *Polygonum cuspidatum*、松叶蕨 *Psilotum nudum*、马尾松 *Pinus massoniana*、北美乔松 *Pinus strobus*、赤松 *Pinus densiflora* 的 STS,

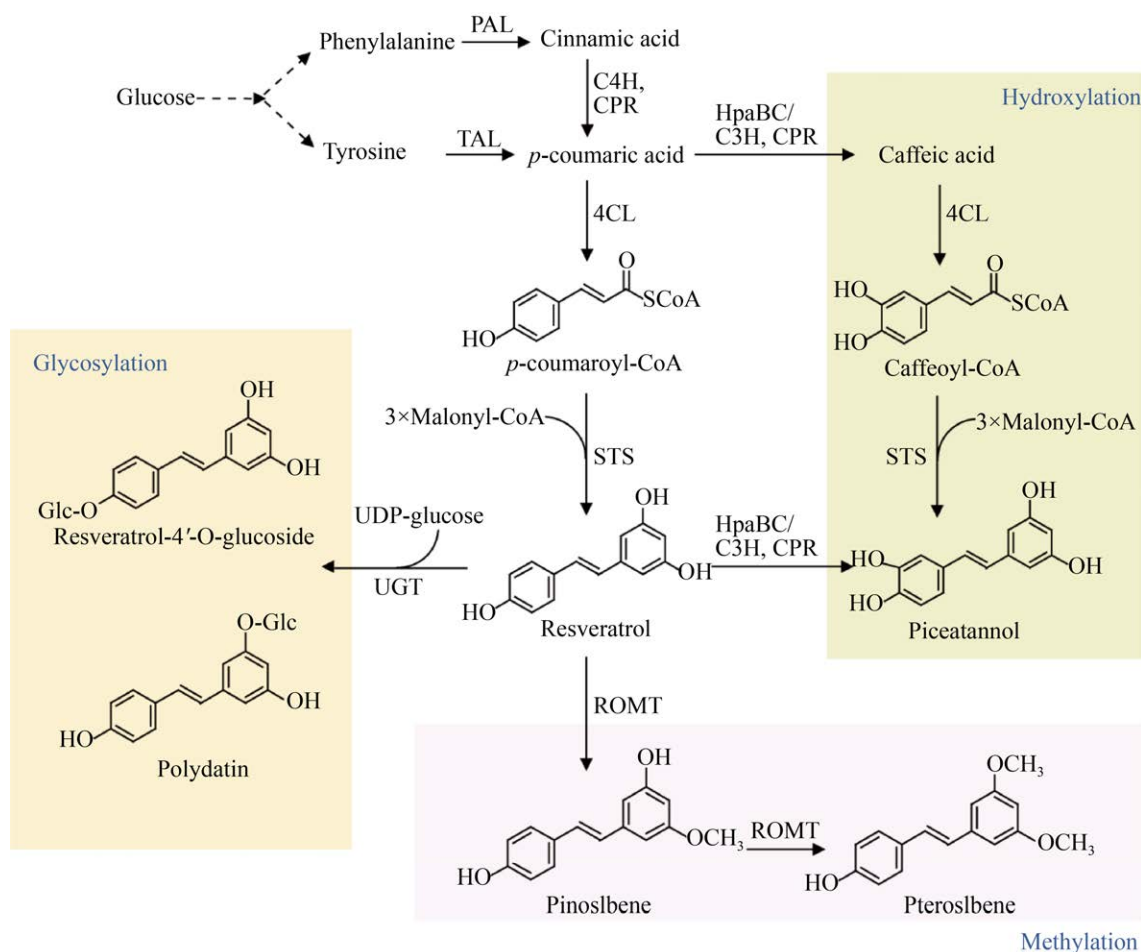


图 5 芪类的微生物合成途径

Fig. 5 Biosynthetic pathways of stilbenes. 4CL: 4-coumarate-CoA ligase; STS: stilbene synthase; UGT: UDP-glucosyltransferase; ROMT: resveratrol-O-methyltransferase.

其中拟南芥的 4CL、葡萄和花生的 STS 使用最为广泛。在大肠杆菌和酿酒酵母中表达不同来源的 4CL 和 STS, 可以对香豆酸为底物合成白藜芦醇。4CL 和 STS 的不同表达方式直接影响白藜芦醇的产量。用甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸 (Gly-Ser-Gly, GSG) 接头使 4CL 和 STS 的融合表达优于独立表达^[27], 而用蛋白支架 GBD-SH3-PDZ 调控 4CL 和 STS 的比例, 白藜芦醇的产量比融合表达提高了 1.7 倍^[28]。DNA 支架也可用于途径的优化, 将 4CL 和 STS 的基因分别与锌指蛋白结构域 Zif268 和 PBS II 融合, 通过调整锌指结合位点的重复度、间距和顺序优化 4CL 和 STS 表达量, 白藜芦醇的产量比融合表达策略提高 50 倍^[29]。这些结果表明蛋白质支架和 DNA 支架是增强白藜芦醇代谢效率更优秀的策略。

在酿酒酵母合成白藜芦醇的过程中, 利用酵母提取物、蛋白胨和葡萄糖的富营养培养基, 组成型强启动子 *HXT7* 表达 *At4cl* 和 *Vvsts*, 白藜芦醇的产

量达到 262 mg/L^[30], 可见培养基成分对酵母合成白藜芦醇有较大影响。染色体整合多拷贝 *Hatal*、*At4cl*、*Vvsts*, 同时过表达 *aro4*^{K229L} 和 *aro7*^{G141S} 强化酪氨酸供给, 过表达 *acc1*^{S659A,S1157A} 提高胞内丙二酰 CoA, 乙醇补料发酵 110 h, 酿酒酵母合成了 531 mg/L 的白藜芦醇^[31]。异源表达 PAL、C4H 和 CPR、4CL、STS, 葡萄糖补料发酵, 酿酒酵母可通过苯丙氨酸途径合成 812 mg/L 白藜芦醇^[32]。

与酿酒酵母类似, 解脂耶式酵母 *Yarrowia lipolytica* 可从酪氨酸或苯丙氨酸途径合成白藜芦醇^[33]。以葡萄糖为碳源, 当单拷贝表达时, PAL-C4H-4CL-STS 途径产量略高于 TAL-4CL-STS 途径; 而两拷贝表达时, 以甘油为碳源时, 采用酪氨酸-苯丙氨酸联合途径 (TAL、PAL、C4H、4CL、STS) 效果更优, 在 5 L 发酵罐中合成了 430 mg/L 白藜芦醇^[34]。进一步改造酪氨酸途径、增加基因拷贝数和分批补料培养, 发酵 90 h, 解脂耶式酵母从头合成了 12.4 g/L 白藜芦醇^[35]。

表 2 白藜芦醇的微生物合成

Table 2 Production of resveratrol in engineered microbes

Microbe	Genes	Substrate	Titer (mg/L)	References
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>At4cl-GSG-Vvsts</i>	<i>p</i> -coumaric acid	5.2	[27]
	<i>At4cl-SH3, Vvsts-PDZ, GBD₁SH3₂PDZ₄</i>	<i>p</i> -coumaric acid	14.4	[28]
	<i>Zif268-4cl, PBS II-sts</i>	<i>p</i> -coumaric acid	>250	[29]
	<i>At4cl, Vvsts</i>	<i>p</i> -coumaric acid	262	[30]
	<i>aro4</i> ^{K229L} , <i>aro7</i> ^{G141S} , <i>acc1</i> ^{S659A,S1157A} , <i>Hatal</i> , <i>At4cl, Vvsts</i>	Ethanol	531.4	[31]
	<i>aro4</i> ^{K229L} , <i>aro7</i> ^{G141S} , <i>acc1</i> ^{S659A,S1157A} , <i>acs</i> ^{L641P} , <i>Δaro10, Atpal, Atc4h, Atatr, cyb5, At4cl, Vvsts</i>	Glucose	812	[32]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>aro4</i> ^{K229L} , <i>aroG</i> ^{S180F} , <i>aro1, aro2, aro3, aro4, aro5, tkt, Δtrp2, Δtrp3, Δaro8, Δaro9, Δpyk, Δpha2, Rgtal, Pc4cl, Vvsts</i>	Glucose	12.6	[33]
	<i>Fjtal, Vvpal, Atc4h, At4cl, Vvsts</i>	Glycerol	430	[34]
	<i>aro7</i> ^{G139S} , <i>aro4</i> ^{K221L} , <i>Δpdc, Δaro10, acc1, Fjtal, At4cl, Vvsts</i>	Glucose	12 400	[35]
	<i>At4cl, Vvsts</i>	<i>p</i> -coumaric acid	2 340	[36]
<i>Escherichia coli</i>	<i>ΔtyrR, ΔtrpED, Rgtal, Pc4cl, Vvsts</i>	Glucose	4.6	[37]
	<i>Setal, Sc4cl, Ahsts</i>	Glucose	5.2	[38]
	<i>Δcg0344-47, Δcg2625-40, Δcg1226, Δcg0502, Fjtal, Pc4cl, Ahsts, EcaroH</i>	Glucose	59	[39]

Vv: *Vitis vinifera*; Ha: *Herpetosiphon aurantiacus*; Pc: *Petroselinum crispum*; Sc: *Streptomyces coelicolor*; Ah: *Arachis hypogaea*.

与酵母相比,大肠杆菌合成白藜芦醇的研究相对滞后。虽然以对香豆酸为底物,使用大肠杆菌 BW27784,用 *GAP* 启动子驱动 *At4cl* 和 *Vvsts* 的双顺反子表达替代 *T7* 启动子驱动的单顺反子表达,白藜芦醇的产量达到 2.34 g/L^[36]。但无论游离质粒表达 *tal*、*4cl*、*sts* 基因,还是定点整合到大肠杆菌的染色体上合成白藜芦醇,大肠杆菌从头合成白藜芦醇的效果都不理想^[37-38],需要增强酪氨酸和丙二酰 CoA 供给,从而优化白藜芦醇在大肠杆菌中的合成。

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 是另一种合成白藜芦醇有潜力的微生物,敲除芳香族化合物的 4 个降解基因簇,并表达 TAL、AroH、4CL 和 STS,以葡萄糖为碳源,重组菌合成了 59 mg/L 白藜芦醇^[39],与大肠杆菌相比,表现出一定的优越性。

2.2 白藜芦醇衍生物

白皮杉醇是白藜芦醇在 3'位发生羟基化形成,有两条合成途径:第一条途径是异源表达 4CL、STS,从咖啡酸合成白皮杉醇^[39-40];第二条途径是异源表达 TAL、4CL、C3H 或 HpaBC 和 STS,经过对香豆酸合成白皮杉醇^[41](图 5)。

白藜芦醇的甲氧基化产物主要包括松芪和紫檀芪,分别由甲氧基转移酶 (*O*-methyltransferase, OMT) 催化白藜芦醇的 5-位和 3,5-二位顺序发生

甲氧基化生成。葡萄和高粱的 ROMT 能以白藜芦醇为底物,在大肠杆菌中生成微量的松芪和紫檀芪^[42]。将拟南芥的 *Atcomt* 与 *Setal*、*Nt4cl2*、*Vvsts* 在高产酪氨酸的大肠杆菌中表达,添加 L-甲硫氨酸提高胞内甲基供体,从头合成了 33.6 mg/L 紫檀芪^[43](表 3)。在酿酒酵母中表达葡萄和高粱的 *Romt* 与 *Atpal2*、*Atc4h*、*Atatr2*、*At4cl2* 和 *Vvsts1*,以葡萄糖为底物,生成了松芪和紫檀芪^[32]。

白藜芦醇糖苷主要包括虎杖苷(白藜芦醇-3-*O*-葡萄糖苷)和白藜芦醇-4'-*O*-葡萄糖苷。由于地衣芽孢杆菌来源的糖基转移酶 YjiC 具有非特异性糖基化活性,在大肠杆菌中异源表达 *Setal*、*Sc4cl*、*Ahsts* 和 *yjic*,催化底物白藜芦醇在 3-位和 4'位发生糖基化反应,但倾向于合成白藜芦醇-4'-*O*-葡萄糖苷,而不是虎杖苷^[44]。

3 姜黄素类的微生物合成

姜黄素类包括姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素等。已经鉴定的姜黄素合成酶有两种,一种是单酶姜黄素类合酶 (Curcuminoid synthase, CUS),另一种是双酶,即双酮 CoA 合酶 (Diketide-CoA synthase, DCS) 和姜黄素合酶 (Curcumin synthase, CURS) (图 6)。姜黄素类产物异源合成的研究主要集中在大肠杆菌中,最近在解脂耶式酵母中也有报道^[45](表 4)。

表 3 白藜芦醇衍生物的微生物合成

Table 3 Production of resveratrol derivatives in engineered microbes

Products	Microbe	Genes	Substrate	Titer (mg/L)	References
Piceatannol	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	$\Delta phdB$, $\Delta pcaF$, $\Delta pobA$, <i>Pc4cl</i> , <i>Ahsts</i>	Caffeic acid	55.0	[39]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>At4cl</i> , <i>Ahsts</i>	Caffeic acid	13.2	[40]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Setal</i> , <i>At4cl</i> , <i>Sec3h</i> , <i>Ahsts</i>	Tyrosine	21.5	[41]
Pterostilbene	<i>Escherichia coli</i>	<i>Setal</i> , <i>Nt4cl2</i> , <i>Vvsts</i> , <i>Atcomt</i>	Glucose	33.6	[43]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Atpal2</i> , <i>Atc4h</i> , <i>Atatr2</i> , <i>At4cl2</i> , <i>Vvsts1</i> , <i>VvRomt</i>	Glucose	34.9	[32]
Pinostilbene	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Atpal2</i> , <i>Atc4h</i> , <i>Atatr2</i> , <i>At4cl2</i> , <i>Vvsts1</i> , <i>SbRomt</i>	Glucose	1.9	[32]
Resveratrol-3- <i>O</i> -glucoside	<i>Escherichia coli</i>	<i>Setal</i> , <i>Sc4cl</i> , <i>Ahsts</i> , <i>yjic</i>	Glucose	2.5	[44]
Resveratrol-4'- <i>O</i> -glucoside	<i>Escherichia coli</i>	<i>Setal</i> , <i>Sc4cl</i> , <i>Ahsts</i> , <i>yjic</i>	Glucose	7.5	[44]

Nt: *Nicotiana tabacum*; Sb: *Sorghum bicolor*.

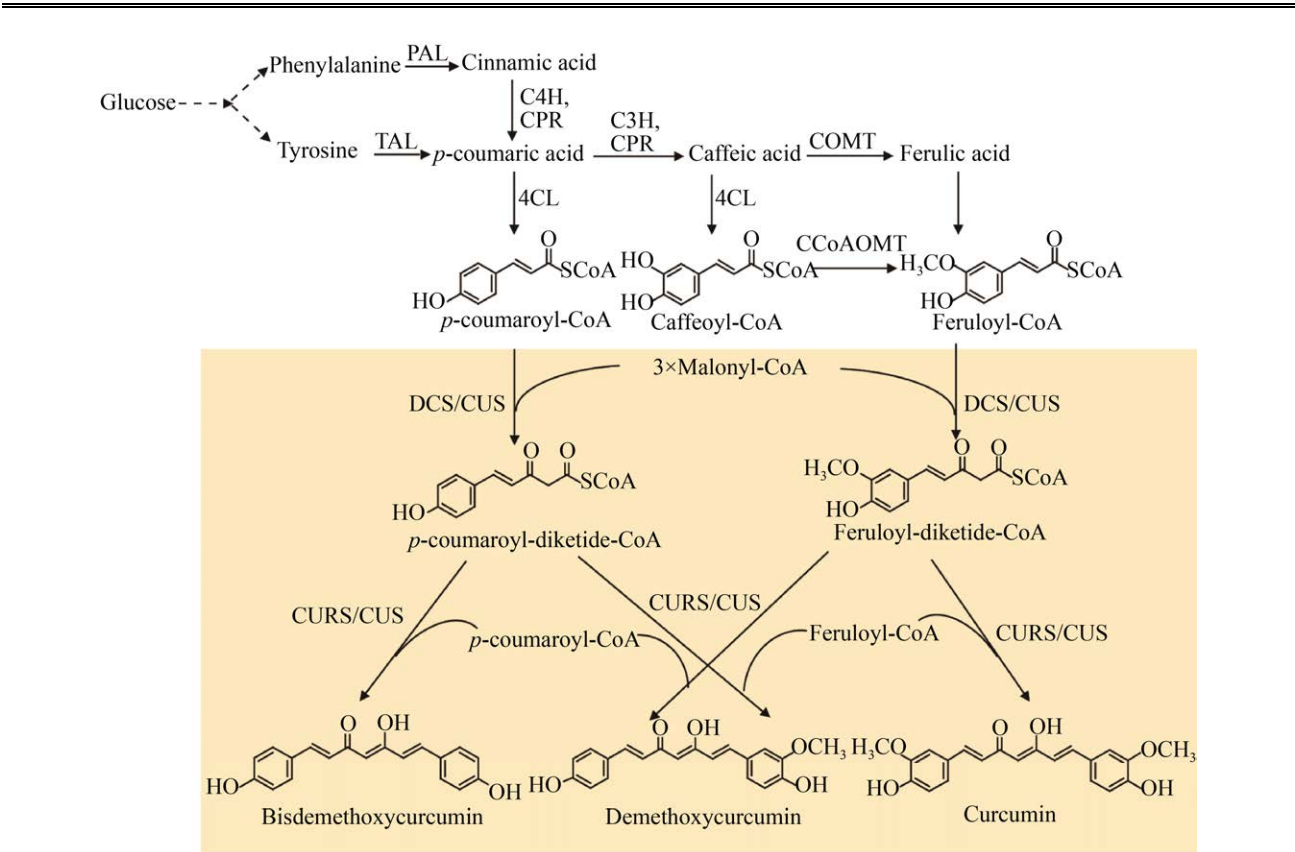


图 6 姜黄素类的微生物合成途径
Fig. 6 Biosynthetic pathways of Curcuminoids. CUS: curcuminoid synthase; DCS: diketide-CoA synthase; CURS: curcumin synthase; CCoAOMT: caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase.

通过异源表达红酵母 *Rhodotorula rubra* RrPAL、紫草 Le4CL、水稻 OsCUS，以酪氨酸为底物，合成双去甲氧基姜黄素^[46]；通过敲除大肠杆菌酪氨酸途径负调控基因，提高酪氨酸前体供应，从头合成了双去甲氧基姜黄素^[47]。

在大肠杆菌中异源表达 4CL、CUS 或 DCS 和 CURS，可将阿魏酸转化为姜黄素^[46,48]。使用大肠

杆菌 BL21(DE3) 为宿主优于 K12，对诱导条件、培养基成分和碳源浓度等参数进行优化，以阿魏酸为底物合成 353.4 mg/L 的姜黄素^[49]。由于 At4CL 对阿魏酸的催化效率低，表达 PAL、C3H 和咖啡酰 CoA-3-O-甲基转移酶 (Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, CCoAOMT)，可绕过阿魏酸，外源添加酪氨酸底物，合成了姜黄素^[48]，但产量仍然很低。

表 4 姜黄素类的微生物合成
Table 4 Production of curcuminoids in engineered microbes

Products	Microbe	Genes	Substrate	Titer (mg/L)	References
Bisdemethoxycurcumin	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Nt4cl, Oscus, acc1</i>	4-coumaric acid	0.2	[45]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rrpal, Le4cl, Oscus</i>	Tyrosine	53.4	[46]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>ΔtyrR, ΔpheA, Setal, Os4cl, Oscus</i>	Glucose	4.6	[47]
Curcumin	<i>Escherichia coli</i>	<i>Le4cl, Oscus</i>	Ferulic acid	113.0	[46]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>At4cl, Cldcs, Clcurs</i>	Ferulic acid	70.0	[48]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>At4cl, Cldcs, Clcurs</i>	Ferulic acid	353.4	[49]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rgtal, At4cl, Setal, CCoAomt, Cldcs, Clcurs</i>	Tyrosine	0.2	[48]

Rr: *Rhodotorula rubra*; Le: *Lithospermum erythrorhizon*; Cl: *Curcuma longa*; Os: *Oryza sativa*.

4 黄酮类的微生物合成

根据黄酮类的生物合成途径,查耳酮合成酶(Chalcone synthase, CHS)催化 1 分子对香豆酰 CoA 和 3 分子丙二酰 CoA 发生克莱森缩合反应,生成了黄酮类的核心骨架结构,即黄烷酮。然后黄烷酮经过修饰转化生成黄酮、异黄酮、黄酮醇及其衍生物。

4.1 黄烷酮、异黄酮和黄酮

黄烷酮、异黄酮、黄酮等产物(图 7)已经在 大肠杆菌、酿酒酵母、解脂耶氏酵母和链霉菌中合成(表 5)。

黄烷酮主要包括柚皮素(Naringenin)、圣草酚(Eriodictyol)、甘草素(Liquiritigenin)和根皮素(Phloretin)等产物。PAL 具有一定的底物泛杂性,它对酪氨酸也具有氨基裂解的催化活性。大肠杆菌表达 PAL、4CL、查耳酮合成酶(Chalcone synthase, CHS)(图 7)生成查耳酮,查耳酮在水相中自发形成柚皮素。引入查耳酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)催化查耳酮立体异构化闭环,用高产酪氨酸的底盘大肠杆菌细胞,则实现了葡萄糖发酵合成柚皮素^[50]。通过在大肠杆菌中建立柚皮素动态调控系统、优化前体酪氨酸通量和培养条件优化,无需诱导剂和前体添加,合成了 588 mg/L 柚皮素^[51]。

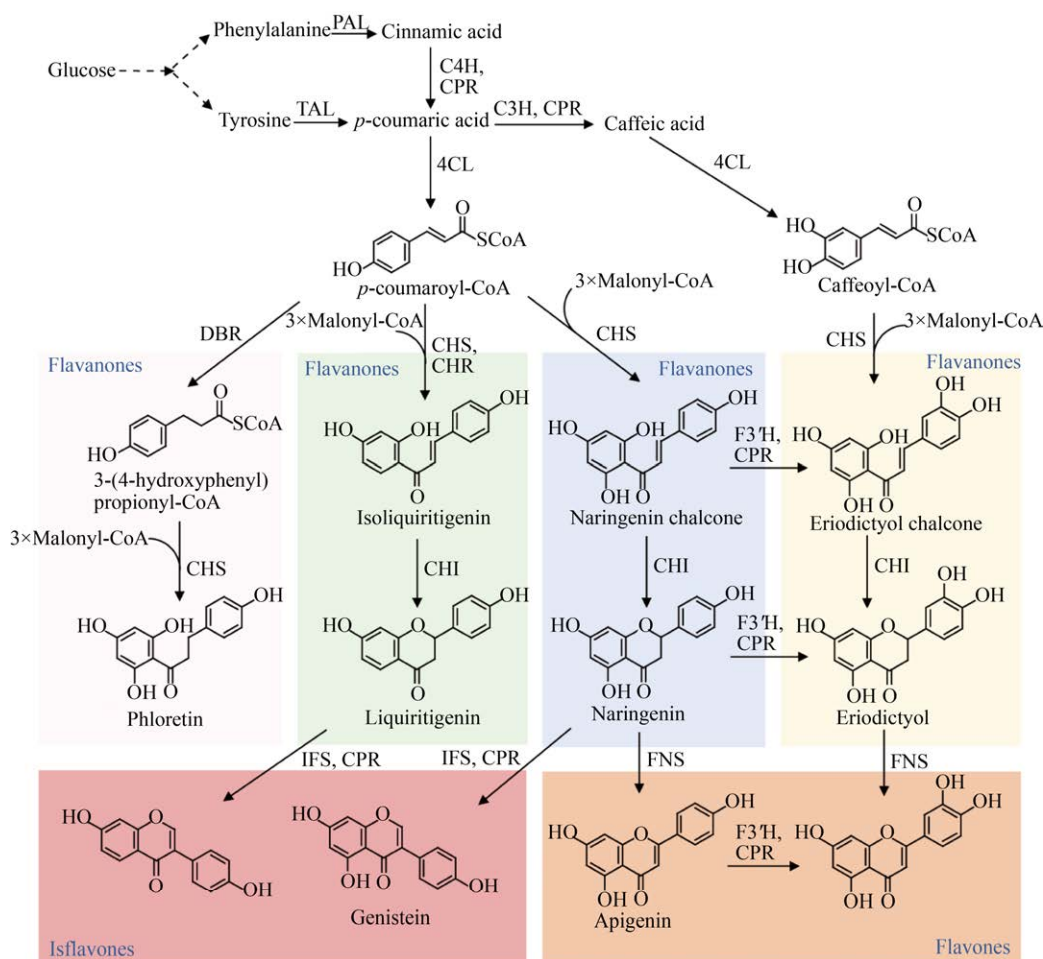


图 7 黄烷酮、异黄酮、黄酮的微生物合成途径

Fig. 7 Biosynthetic pathways of flavanones, isoflavones and flavones. CHS: chalcone synthase; CHI: chalcone isomerase; CHR: chalcone reductase; DBR: double bond reductase; F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase; IFS: isoflavone synthase; FNS: flavone synthase.

与在大肠杆菌中类似,酿酒酵母表达植物来源的基因 *4cl*、*chs* 和 *chi*,采用启动子工程策略,构建和筛选一系列不同强度的天然启动子优化这三步基因的表达,从对香豆酸合成了 1.21 g/L 柚皮素^[52-53]。虽然在酿酒酵母表达 P450 酶比大肠杆菌表达具有一定的优势,表达 PAL、C4H 和 CPR、4CL、CHS 和 CHI,经过苯丙氨酸途径,能合成柚皮素^[54-55],但合成能力不及酪氨酸途径^[56-57]。

除了大肠杆菌和酿酒酵母,委内瑞拉链霉菌 *Streptomyces venezuelae* 和解脂耶式酵母也被开发为柚皮素合成平台。在委内瑞拉链霉菌中表达 *Sc4cl*、*Atchs*、*Atchi* 和 *matBC*,从对香豆酸合成柚皮素^[58]。产油酵母体内具有丰富的乙酰 CoA 和丙二酰 CoA 以及疏水性环境,在合成黄酮产物上具有显著的优势。将柚皮素途径引入解脂耶式酵母底盘^[59],通过筛选高活性酶、提高限速步骤 CHS 的表达拷贝和前体代谢流,在 3 L 发酵罐中,柚皮素产量达 898 mg/L^[45]。

从结构上看,圣草酚 (Eriodictyol) 是 3'-羟基-柚皮素。有两种策略实现圣草酚的微生物合成。第一种策略是以咖啡酸为前体,在酿酒酵母^[60]中表达 4CL、CHS、CHI,合成圣草酚 (图 7),但产量较低。第二种策略是在柚皮素途径基础上再表达黄酮-3'-羟化酶 (Flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H) 和 CPR,构成圣草酚途径 (图 7)。由于途径中 F3'H 是细胞色素 P450 酶,采用截短跨膜区域和融合表达策略,在大肠杆菌中表达 F3'H 和 CPR 的融合蛋白,显著提高了 F3'H 在细胞内环境中的活性,以酪氨酸为底物合成出圣草酚^[61]。此外,在解脂耶式酵母^[59]和白色链霉菌 *Streptomyces albus*^[62]中也实现了从头合成圣草酚。由于白色链霉菌是原核细胞,直接表达 F3'H 存在困难,产量很低。因此,选择真核宿主酵母和加强 F3'H 的表达效率有利于圣草酚产量提高。

与合成圣草酚的思路相反,在柚皮素途径中表达查耳酮还原酶 (Chalcone reductase, CHR),则可构成甘草素 (5-去羟基-柚皮素) 途径 (图 7)。

由于 CHS 催化生成的四酮中间体在水溶液中极易转化为柚皮素,需要加快中间体向 CHR 的传递。在大肠杆菌中构建 TAL、4CL、CHS、CHR、CHI 的代谢途径,将 CHS 和 CHR 融合表达,甘草素产量提高了约 4 倍^[63]。对酪氨酸途径改造,利用酵母内源辅因子,从头合成了甘草素,但产量仍然很低,副产物柚皮素积累严重^[64-65]。甘草素途径在大肠杆菌和酿酒酵母中都表现较低的效率,主要问题是生成了副产物柚皮素,需要进一步筛选高活性的 CHR 酶,优化整个途径中酶的表达方式。

根皮素的合成途径与前 4 种产物不同,需要表达双键还原酶 (Double bond reductase, DBR) 催化对香豆酰 CoA,生成 p-二氢香豆酰 CoA,然后在 CHS 作用下生成根皮素,而无需 CHI 催化闭环反应 (图 7)。根皮素的合成主要在酿酒酵母中,鲜见在大肠杆菌中合成的报道。酵母内源性的 TSC13 具有 DBR 活性,表达 AtPAL2、AmC4H、CPR1、At4CL2、浆果金丝桃 *Hypericum androsaemum* HaCHS,实现了从头合成根皮素^[66]。根皮素合成途径中的异源酶比柚皮素和圣草酚途径少,但产量却较低,主要问题是生成副产物柚皮素和脱轨产物二氢-双去甲基-洋高宁 (Dihydro-bisnoryangonin, 2H-BNY)、二氢-香豆酰三乙酸内酯 (Dihydro-coumaroyl triacetic acid lactones, 2H-CTAL)。对 8 种植物来源的 CHS 筛选表明,金丝桃的 CHS 合成根皮素的产量最高,苹果和梨的 CHS 倾向于合成柚皮素而不是根皮素^[66]。对 14 种植物来源的 CHS 进行筛选结果表明^[67],灯盏花的 CHS 合成根皮素的能力最高,降低了脱轨产物的比例。

从黄烷酮途径出发,在微生物中异源表达一步异黄酮合成酶 (Isoflavone synthase, IFS) 和 CPR,则生成异黄酮;异源表达黄酮合成酶 (Flavone synthase, FNS),则合成黄酮产物 (图 7)。

IFS 属于细胞色素 P450 酶,催化黄烷酮 B 环从 C2 向 C3 迁移。在酿酒酵母中,将整条染料木素 (Genistein) 途径 (PAL、C4H、4CL、CHS、CHI、IFS、CPR) 导入酵母,从头合成染料木素

的产量极低,即使培养基添加苯丙氨酸、对香豆酸或柚皮素前体,也只能检测到 0.1–7.7 mg/L 的产物^[54] (表 5)。在大肠杆菌中表达 IFS 和 CPR,染料木素的产量较低,这与大肠杆菌中 P450 酶表达差是一致的。为增强 IFS 的催化效率,将 N 端跨膜域替换为哺乳动物来源的亲水性序列 (MALLLAVF),截除 CPR 的跨膜域,在大肠杆菌中融合表达 IFS-CPR,提高了染料木素产量^[68]。虽然 IFS 催化甘草素生成大豆苷元 (Daidzein),

但未见从葡萄糖合成大豆苷元的报道。

由 FNS 分别催化柚皮素和圣草酚,生成黄酮产物芹菜素 (Apigenin) 和木犀草素 (Luteolin)。FNS 酶有两种类型,一类是 α -酮戊二酸双加氧酶,另一类是 NADPH 依赖的 P450 单加氧酶。这两类酶在酵母菌和大肠杆菌中,都能合成芹菜素^[69-70],但 α -酮戊二酸双加氧酶类 FNS 更适合黄酮途径的异源构建。木犀草素既可以经过圣草酚合成^[71],也可以从芹菜素合成^[62,69]。

表 5 黄烷酮、异黄酮、黄酮的微生物合成

Table 5 Production of flavanones, isoflavones and flavones in engineered microbes

Products	Microbe	Genes	Substrate	Titer (mg/L)	References
Naringenin	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rst1, Sc4cl, Atchs, Plchi</i>	Glucose	29	[50]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>aroG^{flr}, tyrA^{flr}, ΔtyrR, Tctal, Pc4cl, Phchs, Mschi</i>	Glucose	588	[51]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Mschi</i>	<i>p</i> -coumaric acid	1 210	[53]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pdppal, Gmc4h, Pdpcpr, Gm4cl, Gmchs, Gmchi</i>	Glucose	15.6	[54]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>aro4^{G226S}, Δaro3, Δaro10, Δpdcs5, Δpdcs6, Atpal, Atc4h, Atcpr, At4cl3, Atchs3, Atchi</i>	Glucose	108	[55]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>aro4^{K229L}, Δaro10, Δpdcs5, Δtrp2, Δpha2, Fjtal, At4cl, Hachs, Mschi</i>	Glucose	~90	[56]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>aro4^{K229L}, aro7^{G141S}, Δpdcs1, Δpdcs5, Δpdcs6, Δdpp1, Δtsc13, acc1, Mdecr, pdh, Fjtal, At4cl, Atchs, Atchi</i>	Glucose	144.1	[57]
	<i>Streptomyces venezuelae</i>	<i>Sc4cl, Atchs, Atchi, matBC</i>	<i>p</i> -coumaric acid	35.6	[58]
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>aro1, acs, acc1, Rttal, Pc4cl, Phchs, Mschi</i>	Glucose	252.4	[59]
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>aro4^{K221L}, pex10, acc1, Setal, Nt4cl, Sesam8, Hspks</i>	Glucose	898	[45]
Eriodictyol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Phchi</i>	Caffeic acid	6.5	[60]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rgtal, Pc4cl, Phchs, Mschi, Ghf3'h-Crcpr, acc, acs, ΔackA</i>	Tyrosine	107	[61]
	<i>Streptomyces albus</i>	<i>Rctal, Sc4cl, Gmchs, Gmchi, Atf3'h</i>	Glucose	0.002	[62]
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>aro1, acs, acc1, Rttal, Pc4cl, Phchs, Mschi, Ghf3'h, Crcpr</i>	Glucose	134.2	[59]
Liquiritigenin	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rst1, Pc4cl, Phchs-Amchr, Mschi</i>	Tyrosine	1.84	[63]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Gupal, Guc4h, Gu4cl, Guchs, Guchi</i>	Glucose	0.3	[64]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Fjtal, Pc4cl, Phchs, Amchr, Mschi</i>	Glucose	5.3	[65]
Phloretin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Atpal2, Amc4h, Secpr1, At4cl2, Hachs, tsc13</i>	Glucose	42.7	[66]
Genistein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pdppal, Pdpcpr, Gmc4h, Gm4cl, Gmchs, Gmchi, Gmifs</i>	Glucose	0.1	[54]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Os4cl, Pechs, Tpifs, Oscpr</i>	<i>p</i> -coumaric acid	35	[68]
Apigenin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Phchi, Amfns, Sccpr1</i>	<i>p</i> -coumaric acid	2	[69]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rrpal, Sc4cl, Gechs, Plchi, Pcfns, Cgacc</i>	Tyrosine	13	[70]
	<i>Streptomyces albus</i>	<i>Rctal, Sc4cl, Gmchs, Gmchi, Pcfns</i>	Glucose	0.08	[62]
Luteolin	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Mschi, Pcfns</i>	Caffeic acid	4	[71]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Phchi, Pcfns</i>	Caffeic acid	2	[69]
	<i>Streptomyces albus</i>	<i>Rctal, Sc4cl, Gmchs, Gmchi, Atf3'h, Pcfns</i>	Glucose	0.09	[62]

Rs: *Rhodobacter sphaeroides*; Pl: *Pueraria lobata*; Tc: *Trichosporon cutaneum*; Ph: *Petunia X hybrida*; Ms: *Medicago sativa*; Pdp: *Poplar hybrid Populus trichocarpa* P. *deltoides*; Gm: *Glycine max*; Md: *Malus x domestica*; Hs: *Huperia serrata*; Cr: *Catharanthus roseus*; Gh: *Gerbera hybrid*; Am: *Astragalus mongholicus*; Gu: *Glycyrrhiza uralensis*; Pe: *Populus euramericana*; Tp: *Trifolium pretense*.

4.2 黄酮醇

黄酮醇产物包括山萘酚 (Kaempferol)、槲皮素 (Quercetin)、杨梅黄酮 (Myricetin) 和非瑟酮 (Fisetin) 等。从黄烷酮出发, 经过一步或几步黄烷酮羟化酶 (F3H、F3'H、F3'5'H) 催化生成二氢黄酮醇, 然后在黄烷酮合酶 (Flavonol synthase, FLS) 作用下合成黄酮醇 (图 8)。其中 F3'H 和 F3'5'H 属于细胞色素 P450 酶。

在柚皮素途径基础上再表达 F3H、FLS 两步酶, 则生成山萘酚。在大肠杆菌中, 表达 4CL、CHS、CHI、F3H、FLS, 添加对香豆酸底物, 合成了产物山萘酚^[72] (表 6)。然而检测到大量中间

产物二氢山萘酚的积累, 可见 FLS 是限制性因素。通过筛选 F3H 和 FLS 酶、设计融合蛋白、增加基因拷贝数和优化发酵参数, 以柚皮素为前体, 合成了 1.18 g/L 山萘酚^[73]。在酿酒酵母中, 筛选 5 种植物来源的 FLS, 其中美洲黑杨、拟南芥、柑橘的 FLS 兼具 F3H 功能, 从对香豆酸合成山萘酚, 同时减少了副产物的积累^[74]。改造乙酸利用途径, 或强化酪氨酸途径, 异源表达山萘酚途径, 实现了酵母中从葡萄糖合成山萘酚^[65,74]。筛选 F3H 和 FLS 表达组合, 敲除苯乙醇竞争途径、添加前体以及优化碳源等策略^[74], 可进一步提高山萘酚的产量。

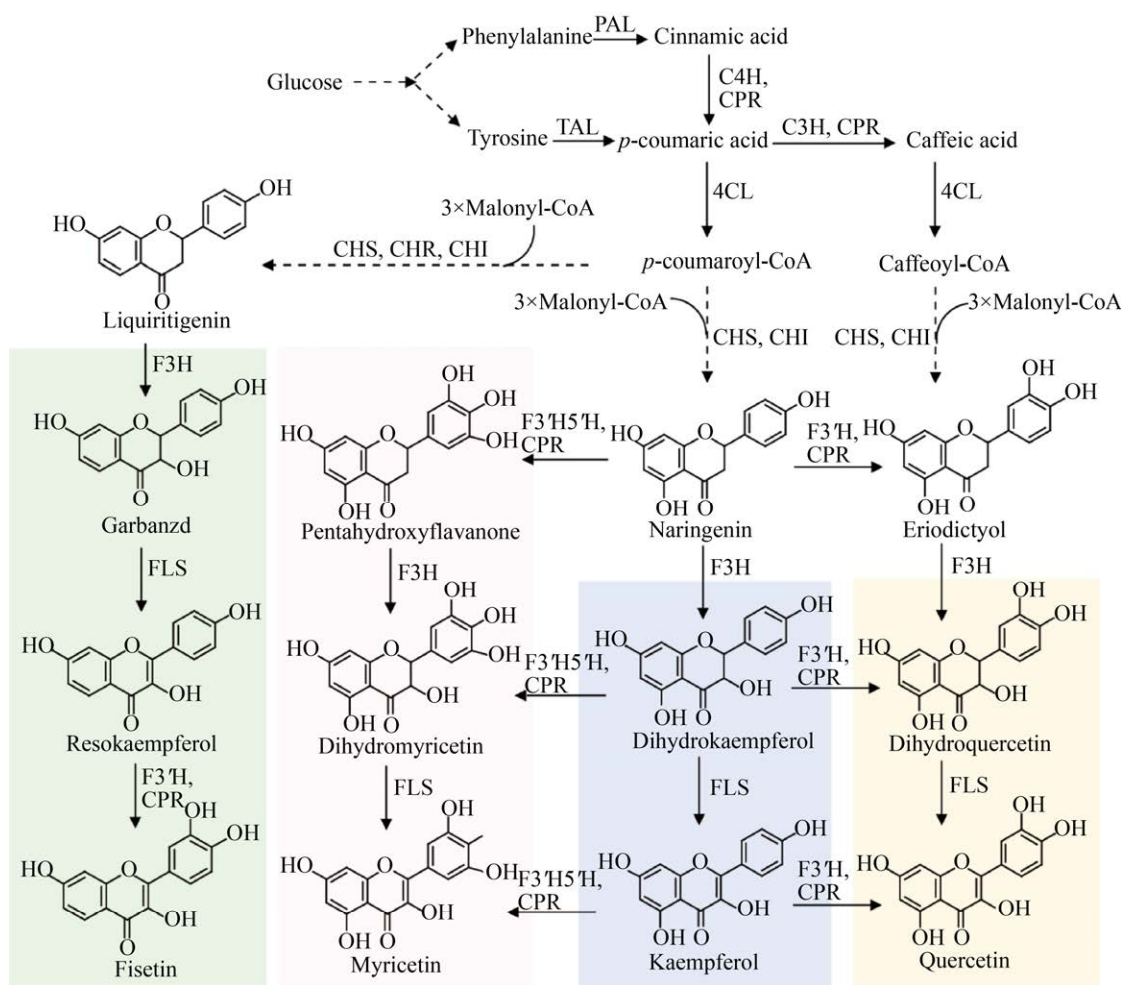


图 8 黄酮醇的微生物合成途径

Fig. 8 Biosynthetic pathways of flavonols. F3H: Flavanone-3-hydroxylase; F3'5'H: Flavonoid-3',5'-hydroxylase; FLS: Flavonol synthase.

槲皮素是山萘酚的 3'-羟基化产物。在山萘酚途径中,表达 F3'H 酶和 CPR,以柚皮素或对香豆酸为底物或前体,酿酒酵母可合成槲皮素。也可以咖啡酸为中间产物,构建工程酿酒酵母,合成槲皮素^[74]。将槲皮素途径引入高产酪氨酸的酵母底盘中,融合表达 F3'H 和 CPR,从葡萄糖合成了槲皮素^[54]。此外,已报道白色链霉菌和天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 从头合成槲皮素^[75],但效率远远低于酵母菌。

杨梅黄酮是山萘酚的 3'-和 5'-二羟基化产物,由 F3'5'H 催化山萘酚生成。F3'5'H 已经在大肠杆菌、白色链霉菌和天蓝色链霉菌中实现功能性表达,合成了杨梅黄酮^[72,75],但未见在酿酒酵母中的报道。

在甘草素途径基础上,依次经过 F3H、FLS 和 F3'H 催化反应,大肠杆菌利用酪氨酸底物,合成了菲瑟酮^[63];而酿酒酵母则实现了以葡萄糖为

底物合成菲瑟酮^[54]。

4.3 黄酮衍生物

黄酮类经后修饰反应,包括糖基化、异戊烯基化、甲基化等形成黄酮衍生物(图 9)。在大肠杆菌和酿酒酵母中合成黄酮糖苷、异戊二烯柚皮素和甲基柚皮素等产物(表 7)。

黄酮糖基化产物是目前研究最多的一类黄酮衍生物,由糖基转移酶催化活化的糖基从供体转移到黄酮苷元上形成,如槲皮素糖苷、根皮素糖苷和花色苷、芹菜素糖苷。槲皮素含有 5 个羟基(3-OH、5-OH、7-OH、3'-OH、4'-OH),均可发生 O-糖基化反应,大肠杆菌表达糖基转移酶,以槲皮素为底物,已经实现了多种槲皮素糖苷的合成^[76]。这里主要介绍根皮素糖苷、花色苷、芹菜素糖苷和甘草苷的微生物合成。

表 6 黄酮醇的微生物合成

Table 6 Production of flavonols in engineered microbes

Products	Microbe	Genes	Substrate	Titer (mg/L)	References
Kaempferol	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Phchi, Mdf3h, Atfls</i>	<i>p</i> -coumaric acid	0.3	[72]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Csf3h, Cuf3h</i>	Naringenin	1 180	[73]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ebpa1, Ebc4h, Eb4cl, Ebchs, Ebchi, Atf3h, Pdf3h, adh2, ald6, acs, acc1</i>	Glucose	66.2	[74]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Fjtal, Pc4cl, Phchs, Mschi, Amf3h, Atfls</i>	Glucose	26.5	[65]
	<i>Streptomyces albus</i>	<i>Rctal, Sc4cl, Gmchs, Gmchi, Atfls, Pcf3h</i>	Glucose	0.06	[75]
Quercetin	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Phchi, Mdf3h, Atfls, Crf3'h, Crcpr</i>	<i>p</i> -coumaric acid	0.05	[72]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pdpal, Ppdcp, Gmc4h, Gm4cl, Gmchs, Gmchi, Gmf3h, Gmf3'H, Stfls</i>	Glucose	0.3	[54]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Phchi, Phf3h, Pdf3h</i>	Caffeic acid	10	[74]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Fjtal, Pc4cl, Phchs, Mschi, Amf3h, Atfls, Phf3'h, Crcpr</i>	Glucose	20.3	[65]
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Rctal, Sc4cl, Gmchs, Gmchi, Atfls, Atf3'h, Pcf3h</i>	Glucose	0.03	[75]
	<i>Streptomyces albus</i>	<i>Rctal, Sc4cl, Gmchs, Gmchi, Atfls, Atf3'h, Pcf3h</i>	Glucose	0.10	[75]
Myricetin	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Phchi, Mdf3h, Atfls, Crf3'h, Crcpr</i>	Naringenin	0.01	[72]
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Rctal, Sc4cl, Gmchs, Gmchi, Atfls, Pcf3h, Phf3'h</i>	Glucose	0.03	[75]
	<i>Streptomyces albus</i>	<i>Rctal, Sc4cl, Gmchs, Gmchi, Atfls, Pcf3h, Phf3'h</i>	Glucose	0.04	[75]
Fisetin	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rstl, Pc4cl, Phchs, Amchr, Mschi, Atf3h, Phf3'h, Atfls, Crcpr</i>	Tyrosine	0.3	[63]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Fjtal, Pc4cl, Phchs, Mschi, Amchr, Amf3h, Phf3'h, Atfls, Crcpr</i>	Glucose	2.3	[54]

Cs: *Citrus sinensis*; Cu: *Citrus unshiu*; St: *Solanum tuberosum*; Eb: *Erigeron breviscapus*; Pd: *Populus deltoides*.

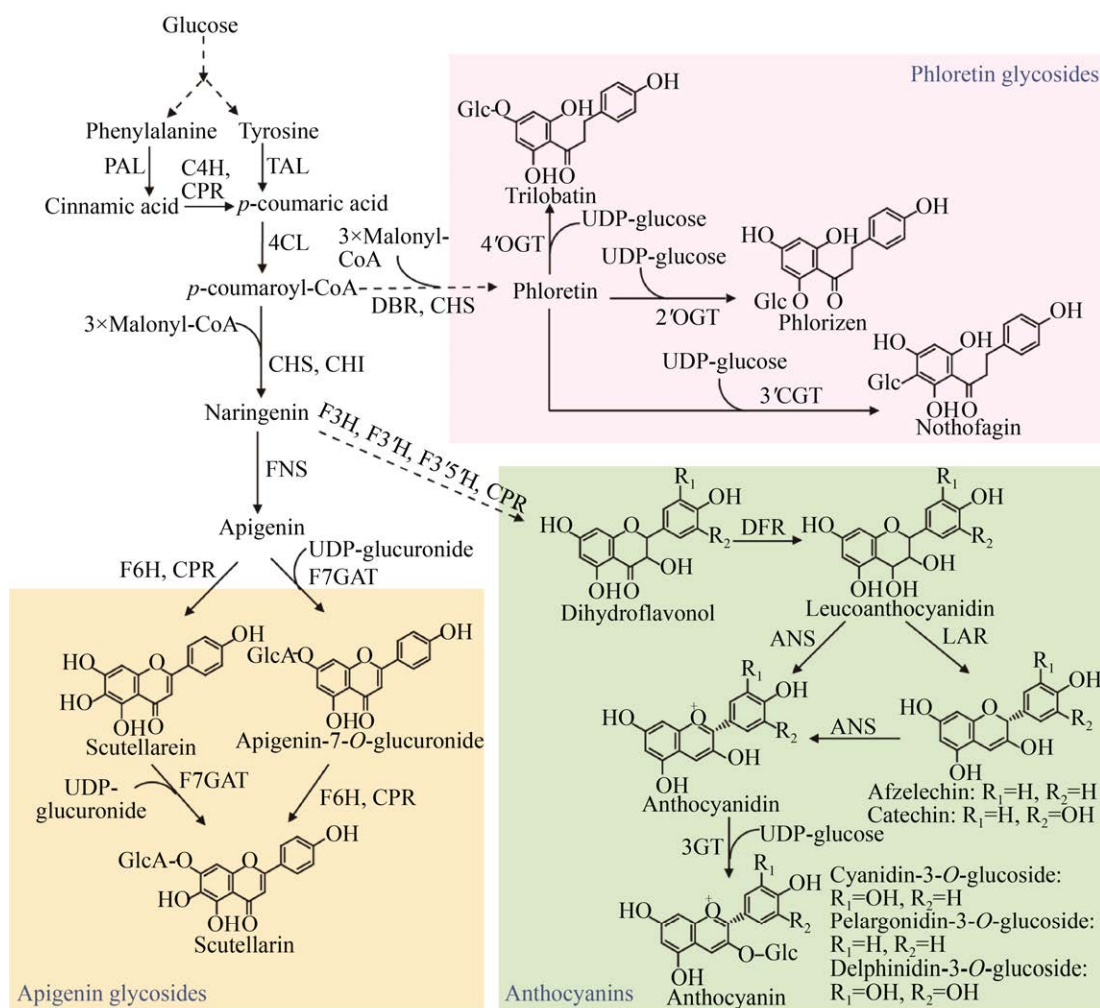


图9 黄酮糖苷的微生物合成途径

Fig. 9 Biosynthetic pathways of flavonoid glycosides. F6H: flavone-6-hydroxylase; F7GAT: flavonoid-7-O-glucuronosyltransferase; DFR: dihydroflavonol-4-reductase; ANS: anthocyanidin synthase; LAR: leucoanthocyanidin reductase; 3GT: anthocyanidin-3-O-glycosyltransferase; OGT: O-UDP-glycosyltransferase; CGT: C-glycosyltransferase.

根皮素的糖苷包括根皮苷 (Phlorizen)、诺瑟法根 (Nothofagin) 和三叶苷 (Trilobatin), 其糖基转移酶已被鉴定出来。在合成根皮素的酿酒酵母菌中^[66], 表达苹果 *Malus x domestica* MdUGT88A1 或西洋梨 *Pyrus communis* PcUGT88F2, 催化根皮素 2'位发生 O-糖基化, 合成根皮苷; 表达水稻 OsCGT, 催化 3'位发生 C-糖基化, 合成诺瑟法根; 表达拟南芥 AtUGT73B2, 催化 4'位 O-糖基化, 合成了三叶苷。

花色苷是花青素的糖基化形式, 通过拓展黄酮醇合成途径, 异源表达 F3H、二氢黄酮醇-4-还原酶 (Dihydroflavonol-4-reductase, DFR)、花青

素合成酶 (Anthocyanidin synthase, ANS) 和花青素-3-O-葡萄糖基转移酶 (Anthocyanidin-3-O-glycosyltransferase, A3GT), 可在微生物中重构花色苷合成途径。另一条合成途径由 F3H、DFR、无色花色素还原酶 (Leucoanthocyanidin reductase, LAR)、ANS、3GT 组成, 经过黄烷-3-醇合成花色苷。由于花青素合成过程中经历多步 CYP450 酶, ANS 的底物谱宽泛, 花青素及其糖苷在酸性条件下稳定 ($\text{pH} \leq 5$), 在中性条件下会迅速降解, 因此多以酿酒酵母为宿主合成花色苷。表达花青素人工途径, 测试了 2 种 F3'H、4 种 F3'5'H、

5 种 DHF、9 种糖基转移酶, 对 6 步途径酶筛选优化的基础上, 从头合成了微量的天竺葵素-3-*O*-葡萄糖苷 (Pelargonidin-3-*O*-glucoside)、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷 (Cyanidin-3-*O*-glucoside) 和飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷 (Delphinidin-3-*O*-glucoside) 等花色苷^[77]。

灯盏花素 (Scutellarin) 是灯盏花 (*Erigeron breviscapus*) 中药的主要活性成分, 临床上用于治疗脑供血不足。采用基因组、转录组分析和高通量筛选技术, 从灯盏花中挖掘和鉴定了灯盏花素合成途径的两步关键酶: 黄酮-6-羟化酶 (Flavone-6-hydroxylase, F6H) 和黄酮-7-*O*-葡萄糖醛酸转移酶 (Flavonoid-7-*O*-glucuronosyltransferase, F7GAT), 在工程酿酒酵母中, 从葡萄糖合成了芹菜素-7-*O*-

糖苷 (Apigenin-7-*O*-glucuronide) 和灯盏花素^[78]。甘草苷 (Liquiritin) 是濒危药材甘草的活性成分, 其微生物合成备受关注。在甘草素途径基础上, 表达糖基转移酶, 酿酒酵母合成了甘草苷^[64]。

相对于黄酮糖苷, 异戊烯基化和甲基化黄酮产物较少, 而且大多数的转移酶未被鉴定出来, 限制其在微生物中的合成。目前, 在合成柚皮素的酿酒酵母中, 表达苦参 *Sophora flavescens* 的异戊二烯基转移酶 (Flavonoid prenyltransferase) SIFPT, 从头合成了 8-异戊二烯柚皮素 (8-prenylnaringenin)^[79]。在大肠杆菌中, 通过改造莽草酸途径和柚皮素途径, 表达两种甲基转移酶, 分别合成了樱花素 (7-*O*-甲基柚皮素, Sakuranetin) 和异樱花素 (7'-*O*-甲基柚皮素, Ponciretin)^[80]。

表 7 黄酮衍生物的微生物合成

Table 7 Production of flavonoid derivatives in engineered microbes

Products	Microbe	Genes	Substrate	Titer (mg/L)	References
Glycosylation					
Phlorizin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Atpal, Amc4h, Sccpr, At4cl, Hachs, Sctsc13, Pycugt88F2</i>	Glucose	65	[66]
Nothofagin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Atpal, Amc4h, Sccpr, At4cl, Hachs, Sctsc13, Oscgt</i>	Glucose	59	[66]
Trilobatin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Atpal, Amc4h, Sccpr, At4cl, Hachs, Sctsc13, Atugt73B2</i>	Glucose	32.8	[66]
Pelargonidin-3- <i>O</i> -glucoside	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Atpal, Amc4h, Sccpr, Hachs, Mschi, At4cl, Mdf3h, Aadfr, Phans, Dca3gt</i>	Glucose	0.8	[77]
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Atpal, Amc4h, Sccpr, Hachs, Mschi, At4cl, Mdf3h, Phf3'h, Ptdfr, Phans, Faa3gt</i>	Glucose	1.5	[77]
Delphinidin-3- <i>O</i> -glucoside	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Atpal, Amc4h, Sccpr, Hachs, Mschi, At4cl, Mdf3h, Slf3'5'h, Ihdfr, Phans, Faa3gt</i>	Glucose	1.8	[77]
Apigenin-7- <i>O</i> -glucuronide	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ebpal, Ebc4h, Eb4cl, Ebchs, Ebchi, Ebfns, Ebf7gat</i>	Glucose	185	[78]
Scutellarin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ebpal, Ebc4h, Eb4cl, Ebchs, Ebchi, Ebfns, Ebf6h, Ebf7gat</i>	Glucose	105	[78]
Liquiritin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Gupal, Guc4h, Gu4cl, Guchs, Guchr, Guchi, Guugt</i>	Glucose	0.4	[64]
Prenylation					
8-prenylnaringenin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Atpal, Atc4h, Atcpr, At4cl, Atchs, Atchi, Sffpt</i>	Glucose	0.1	[79]
Methylation					
Ponciretin	<i>Escherichia coli</i>	<i>Setal, Os4cl, Pechs, Gmsomt</i>	Glucose	42.5	[80]
Sakuranetin	<i>Escherichia coli</i>	<i>Setal, Os4cl, Pechs, Osnomt</i>	Glucose	40.1	[80]

Pyc: *Pyrus communis*; *Aa*: *Anthurium andraeanum*; *Pt*: *Populus trichocarpa*; *Ih*: *Iris hollandica*; *Sl*: *Solanum lycopersicum*; *Dc*: *Dianthus caryophyllus*; *Fa*: *Fragaria × ananassa*; *Sf*: *Sophora flavescens*.

5 微生物合成多酚类的调控工程

5.1 前体代谢工程

芳香氨基酸是微生物异源合成多酚产物的前体之一。芳香氨基酸代谢途径清楚,已经建立了多种策略,在大肠杆菌和酿酒酵母等底盘细胞中实现了酪氨酸和苯丙氨酸的高效合成^[16,18,51,52],因此不再赘述。这里讨论多酚合成的另一个底物丙二酰 CoA 的代谢调控。

在黄酮、白藜芦醇、姜黄素等生物合成过程中,都需要 3 分子丙二酰 CoA 作为二碳单元的链延伸底物。微生物细胞内丙二酰 CoA 浓度低,是多酚合成的一个主要限速因子。丙二酰 CoA 由乙酰 CoA 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase, ACC) 催化乙酰-CoA 合成,在细胞中主要用于脂肪酸合成。通过开源节流的方式提高胞内丙二酰 CoA 的水平,进而达到优化多酚合成途径的目的 (表 8)。

开源丙二酰 CoA 的方式是增加其供应。第一种策略是过表达 ACC。大肠杆菌的 ACC 由 4 个亚基组成,且其表达受酰基载体蛋白的反馈抑制。而谷氨酸棒杆菌的 CgACC 只有两个亚基 (AccBC 和 DtsR1),最常用来提高多酚产量如白藜芦醇、柚皮素等^[81-82]。ACC 是一种生物素依赖酶,将 ACC 和生物素连接酶 BirA 在大肠杆菌中共表达,使得黄烷酮的产量提高了 11.6 倍^[83]。另一种策略是改造乙酸同化途径,包括削弱乙酸和乙醇积累、干扰柠檬酸循环、强化葡萄糖到丙酮酸的代谢流等。协同过表达脂酰 CoA 合酶 (Acyl-CoA synthetase, Acs)、敲除乙酸激酶 (Acetate kinase, AckA) 和过表达 CgACC,使得大肠杆菌胞内丙二酰 CoA 浓度提高了 16.3 倍^[61]。第三种策略是构建丙二酸转化途径,包括丙二酰合酶 (Malonate synthetase, MatB) 基因和丙二酸转运蛋白 (Malonate carrier protein, MatC) 基因,把培养基中的丙二酸物转运到胞内,并转化为丙二酰 CoA,用于多酚的合成。采用此策略,大肠杆菌合成柚皮素和圣草酚产量分别提高了 2.69 倍和 3.55 倍^[71]。在合成根皮素的过程

中,联合两种策略,将乙醇脱氢酶 *adh2* (Alcohol dehydrogenase)、乙醛脱氢酶 *ald6* (Aldehyde dehydrogenase)、*acs* 和 *acc1* 整合到酵母染色体上,同时质粒过表达 *matBC*,根皮素产量提高约 1.3 倍^[67]。第四种策略是利用 β -氧化途径。过表达与过氧化物酶体的形成相关蛋白 PEX10,促进脂肪酸的 β -氧化形成乙酰 CoA,提高了解脂耶式酵母合成柚皮素和白藜芦醇的能力^[45]。

节流丙二酰 CoA 的方式是弱化脂肪酸合成途径,将丙二酰 CoA 导流到多酚合成途径。第一种策略是培养基中添加浅蓝菌素 (Cerulenin),浅蓝菌素可有效抑制脂肪酸合酶 FabB 和 FabF (β -ketoacyl-ACP synthase I/II) 的活性。谷氨酸棒杆菌在最适浅蓝菌素剂量下的白藜芦醇产量提升了 13 倍^[39]。第二种策略是利用反义 RNA (anti-RNA) 的基因沉默技术,微调脂肪酸代谢途径,平衡细胞生长和黄酮类产物合成对丙二酰 CoA 需求^[84],大肠杆菌的柚皮素产量提高了 4.31 倍。第三种策略是 CRISPRi 系统,它调控范围广,涉及多个内源性基因,效应更显著。用 CRISPRi 系统调控乙酰 CoA 途径的 17 个基因和脂肪酸途径的 7 个基因,抑制 *ppsA*、*eno*、*adhE*、*mdh*、*fumC*、*sdhA*、*sucC*、*citE*、*fabH*、*fabB*、*fabF* 和 *fabI* 等 12 个靶标基因,不显著影响细胞生长的同时提高细胞内丙二酰 CoA 的水平,使柚皮素产量提高了 7.4 倍,达到 421 mg/L^[85]。综合表达 CgACC、anti-RNA、促进产物外排,提高了白藜芦醇的产量^[86]。

随着计算生物学的发展,利用微生物代谢预测算法指导敲除或过表达靶标基因,提高胞内丙二酰 CoA 的水平。运用 OptForce 模型,在大肠杆菌中过表达了 *acc*、*pgk*、*pdh* 基因,同时敲除 *fumC*、*suuC* 基因,与野生型菌株相比,丙二酰 CoA 水平提高了 3.7 倍,柚皮素产量达到 474 mg/L^[87]。该模型也成功用于白藜芦醇途径调节和合成^[88]。

表 8 利用丙二酰 CoA 调控策略提高多酚产量

Table 8 Production of polyphenol enhanced by regulating the supply of malonyl-CoA

Products	Microbe	Pathway genes	Substrate	Strategies	Titer (mg/L)	References
Resveratrol	<i>Escherichia coli</i>	<i>Le4cl, Ahsts</i>	<i>p</i> -coumaric acid	<i>Cgacc</i>	171	[81]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>At4cl, Vvsts</i>	<i>p</i> -coumaric acid	OptForce	1 600	[88]
Naringenin	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rrpal, Sc4cl, Gechs, Plchi</i>	Tyrosine	<i>Cgacc</i>	60	[82]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Phchi</i>	<i>p</i> -coumaric acid	<i>Placc, PlBirA</i> and <i>acs</i>	119	[83]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rgtal, Pc4cl, Phchs, Mschi</i>	Glucose	<i>matBC</i>	84	[50]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Mschi</i>	<i>p</i> -coumaric acid	<i>matBC</i> , adding cerulenin	186	[71]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rgtal, Pc4cl, Phchs, Mschi</i>	Tyrosine	<i>matBC</i> , anti- <i>fabB/fabF</i>	391	[84]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rgtal, Pc4cl, Phchs, Mschi</i>	Tyrosine	CRISPRi regulation	421	[85]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Mschi</i>	<i>p</i> -coumaric acid	OptForce	474	[87]
Eriodictyol	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Phchi</i>	Caffeic acid	<i>Placc, PlBirA</i> and <i>acs</i>	52	[83]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rgtal, Pc4cl, Phchs, Mschi, Ghf3'h, Crepr</i>	Tyrosine	<i>Acc, Acs, ΔAckA</i>	107	[61]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pc4cl, Phchs, Mschi</i>	Caffeic acid	<i>matBC</i> , adding cerulenin	54	[71]
Phloretin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ha4cl, Ebchs</i>	Dihydro- <i>p</i> -coumaric acid	<i>adh2, ald6, acs, acc1, matBC</i>	619.5	[67]

5.2 途径动态调控工程

简单地过表达途径中的基因,可以有效提高细胞的生产效能,但这种静态调控策略无法实时调控基因的表达水平,且易受发酵环境的干扰。动态调控策略可以使微生物根据细胞中代谢物积累水平自动调节途径的表达强度,从而适应不断变化的细胞内、外环境。动态调控一般由信号输入、生物传感器、信号输出 3 部分组成,构建生物传感器是实现动态调控的关键。目前已经开发了多种响应代谢物的生物传感器,用于改善合成途径中关键酶的活性或获取高效重组菌。

以恶臭假单胞菌的调节蛋白 TtgR 作为白藜芦醇的传感器,设计了 TtgR 结合的启动子,以红色荧光蛋白为效应信号,构建 4CL 随机突变文库,筛选获得 4CL 变体,使工程大肠杆菌合成了 556.4 mg/L 白藜芦醇,提高了 4.7 倍。该突变体还适用于优化柚皮素的产量,大肠杆菌合成了 225 mg/L 柚皮素^[89]。RppA 催化 5 分子的丙二酰 CoA 生成红色的淡黄霉素,可用作胞内丙二酰 CoA 的丰度传感器,且具有较宽的动态响应范围。将 RppA 与大肠杆菌基因组规模的 anti-RNA 文库

结合起来,筛选出了 14 个增强丙二酰 CoA 的靶基因,用于指导优化工程大肠杆菌构建,白藜芦醇的产量为 51.8 mg/L,提高了 4.2 倍^[90]。类似地,基于柚皮素与 AlCl₃ 的黄色反应建立生物传感器,通过迭代高通量筛选组成型启动子,对柚皮素生物合成途径基因表达进行优化,工程大肠杆菌合成 191.9 mg/L 柚皮素^[91]。

偶联细胞生长的动态调节是一种较先进的模式,可用于优化多酚合成。积累的柚皮素激活转录调节激活子 FdeR,进而抑制酰基载体蛋白基因的表达,减少丙二酰 CoA 进入脂肪酸途径;当对香豆酸积累时,阻遏物 PadR 失活,开启 *acs* 和 *acc* 基因表达,从而增强丙二酰 CoA 的合成供应;这样建立了柚皮素-对香豆酸-丙二酰 CoA 的动态调控系统,并通过定向进化启动子,细胞生长得到改善,柚皮素产量达到 251.4 mg/L,提高了 8.4 倍^[92]。

群体效应 (Quorum-sensing, QS) 是一种依赖细胞自身信号的传感系统,也可用于代谢途径调控。在大肠杆菌中表达两种细菌 QS,设计两个开关: Lux 动态沉默脂肪酸途径基因以增加胞内

丙二酰 CoA 的水平, Esa 动态延迟 TAL-4CL 的表达以解除对香豆酰 CoA 对 TAL 的毒性作用; 通过双重 QS 系统调控, 柚皮素产量为 125.9 mg/L, 提高了 10 倍^[93]。

5.3 共培养工程

在自然界, 每种微生物之间形成劳动分工的相互作用关系, 构成稳定生态群落。植物多酚的生物合成途径较长, 可模仿自然生态群落, 将多酚合成途径分配到不同的菌株中, 从而构建多菌组成的共培养系统, 不仅可克服途径长、碳流效率低和还原力不足等问题, 而且也可分段优化、提高构建效率。这些策略已经应用于优化白藜芦醇、姜黄素、黄酮、迷迭香酸等的微生物合成 (表 9)。

白藜芦醇合成途径中, 一株大肠杆菌以葡萄糖为底物合成对香豆酸, 另一株大肠杆菌负责供应丙二酰 CoA, 合成了白藜芦醇^[94]。也可将异源途径与内源途径偶联起来, 一株菌通过磷酸戊糖途径合成对香豆酸, 第二株菌通过糖酵解途径提供丙二酰 CoA, 平衡柠檬酸循环和丙二酰 CoA 供给, 合成白藜芦醇^[95]。除了同物种共培养系统, 大肠杆菌合成的对香豆酸, 转运到酿酒酵母中合成白藜芦醇, 由大肠杆菌-酿酒酵母组成的共培养系统实现了无诱导剂的白藜芦醇从头合成^[96]。

姜黄素异源合成途径包括 6 步反应, 两株大肠杆菌分别表达阿魏酸模块和姜黄素模块, 总姜黄素和姜黄素的产量与单一菌株相比, 分别提高 6.6 倍和 2.6 倍^[97]。将阿福豆素 (Afzelechin) 合成途径分解为依赖丙二酰 CoA 的上游模块 (4CL、CHS、CHI) 和依赖 NADPH 的下游模块 (F3H、DFR、LAR), 利用大肠杆菌-大肠杆菌共培养策略, 阿福豆素产量是单菌培养的 970 倍^[98]。

途径中不同基因表达需要不同的微环境, 选择不同种微生物进行共培养, 可提供多元化的酶

反应场所。以葡萄糖为碳源, 两株大肠杆菌共培养合成柚皮素时存在竞争^[99], 不同微生物的混合培养是一种新策略。以木糖为碳源, 在大肠杆菌和酿酒酵母之间建立起共存的关系, 大肠杆菌合成酪氨酸并分泌乙酸, 为利用乳酸酿酒酵母提了供前体和碳源, 大肠杆菌-酿酒酵母混菌与单一酵母菌合成柚皮素相比产量提高了 8 倍^[100]。在染料木素合成中, 将柚皮素途径在大肠杆菌中表达, P450 酶 IFS 分配到酿酒酵母中表达, 两种菌株共转化酪氨酸底物, 改善了染料木素的合成效率^[101]。

在两株酿酒酵母共培养系统中, 第一个工程菌负责从葡萄糖合成柚皮素, 第二个工程菌负责从柚皮素合成山萘酚, 较好地解决了中间产物积累问题^[102]。类似地, 让第二个酵母表达柚皮素的下游模块, 该共培养系统也成功应用于槲皮素、杨梅黄酮、天竺葵素和矢车菊素、飞燕草素等 5 种黄酮类产物的合成^[57]。

三菌共培养系统可用于平衡非线性-汇聚式的代谢途径。在迷迭香酸异源合成途径中, 丹参素途径和咖啡酸途径同时竞争酪氨酸前体, 且途径酶存在底物交叉反应, 单菌合成效率很低。将迷迭香酸合成途径划分为 3 个模块, 咖啡酸模块、丹参素模块和迷迭香酸模块, 分别置于 3 个独立的大肠杆菌中, 共培养的迷迭香酸产量较单菌培养提高了 38 倍, 达到 172 mg/L^[103]。

四菌共培养适合于较长的代谢途径。矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷的途径包括 9 个外源基因, 酶催化效率低下且表达多个基因给细胞带来严重的代谢负担。将花青素途径分成 4 个模块, 分别是酪氨酸模块、柚皮素模块、黄烷醇模块和花青素模块, 构建了 4 株大肠杆菌的共培养体系, 首次在大肠杆菌中实现了花青素的异源从头合成^[104]。

表 9 共培养系统合成植物多酚

Table 9 Production of polyphenols in coculture system

Products	Coculture system and genes	Substrate	Titer (mg/L)	References
Resveratrol	<i>Escherichia coli</i> 1: <i>tktA^{fb}</i> , <i>aroG^{fb}</i> , Δ <i>pheA</i> , <i>Rgtal</i> ; <i>Escherichia coli</i> 2: <i>Sc4cl</i> , <i>Ahsts</i>	Glycerol	22.6	[94]
	<i>Escherichia coli</i> 1: Δ <i>pgi</i> , Δ <i>tyrR</i> , <i>tyrA^{fb}</i> , <i>aroG^{fb}</i> , <i>Rgtal</i> ; <i>Escherichia coli</i> 2: Δ <i>zwf</i> , <i>Cgacc</i> , <i>Pc4cl</i> , <i>Ahsts</i>	Glucose	55.7	[95]
	<i>Escherichia coli</i> : Δ <i>tyrR</i> , <i>aroG^{fb}</i> , <i>tyrA^{fb}</i> , <i>Tctal</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : <i>acc1^{S659A,S1157A}</i> , <i>At4cl</i> , <i>Vvsts</i>	Glucose	36.0	[96]
Curcumin	<i>Escherichia coli</i> 1: <i>Rgtal</i> , <i>Sec3h</i> , <i>Atcomt</i> ; <i>Escherichia coli</i> 2: <i>At4cl</i> , <i>Cldcs</i> , <i>Clcurs</i>	Tyrosine	15.9	[97]
Afzelechin	<i>Escherichia coli</i> 1: Δ <i>sucC</i> , Δ <i>fumC</i> , <i>At4cl</i> , <i>Phchs</i> , <i>Cmchi</i> ; <i>Escherichia coli</i> 2: <i>Csf3h</i> , <i>Fadfr</i> , <i>DuLAR</i>	<i>p</i> -coumaric acid	40.7	[98]
Naringenin	<i>Escherichia coli</i> 1: <i>Rgtal</i> ; <i>Escherichia coli</i> 2: <i>Rgtal</i> , <i>Pc4cl</i> , <i>Phchs</i> , <i>Mschi</i>	Glucose	41.5	[99]
	<i>Escherichia coli</i> : Δ <i>ptsG</i> , Δ <i>tyrR</i> , Δ <i>pykA</i> , Δ <i>pykF</i> , Δ <i>pheA</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : <i>Rttal</i> , <i>Pc4cl</i> , <i>Phchs</i> , <i>Phchi</i>	Xylose	21.2	[100]
Genistein	<i>Escherichia coli</i> : <i>Rrpal</i> , <i>Sc4cl</i> , <i>Gechs</i> , <i>Plchi</i> , <i>Cgacc</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : <i>Geifs</i>	Tyrosine	5.8	[101]
Kaempferol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1: <i>aro4^{K229L}</i> , <i>Fjtal</i> , <i>At4cl</i> , <i>Hachs</i> , <i>Phchi</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2: <i>Atfls</i> , <i>Csf3h</i>	Glucose	200.0	[102]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1: Δ <i>aro10</i> , Δ <i>pdcs</i> , Δ <i>tsc13</i> , <i>aro4^{K229L}</i> , <i>aro7^{G141S}</i> , <i>acc1</i> , <i>Ecpdh</i> , <i>Fjtal</i> , <i>At4cl</i> , <i>Atchs</i> , <i>Atchi</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2: <i>Ntf3h</i> , <i>Atfls</i>	Glucose	168.1	[57]
Quercetin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1: Δ <i>aro10</i> , Δ <i>pdcs</i> , Δ <i>tsc13</i> , <i>aro4^{K229L}</i> , <i>aro7^{G141S}</i> , <i>acc1</i> , <i>Ecpdh</i> , <i>Fjtal</i> , <i>At4cl</i> , <i>Atchs</i> , <i>Atchi</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2: <i>Ntf3h</i> , <i>Phf3'h</i> , <i>Atfls</i>	Glucose	154.2	[57]
Myricetin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1: Δ <i>aro10</i> , Δ <i>pdcs</i> , Δ <i>tsc13</i> , <i>aro4^{K229L}</i> , <i>aro7^{G141S}</i> , <i>acc1</i> , <i>Ecpdh</i> , <i>Fjtal</i> , <i>At4cl</i> , <i>Atchs</i> , <i>Atchi</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2: <i>Ntf3h</i> , <i>slf3'5'h</i> , <i>Phf3'h</i> , <i>Atfls</i>	Glucose	145.0	[57]
Pelargonidin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1: Δ <i>aro10</i> , Δ <i>pdcs</i> , Δ <i>tsc13</i> , <i>aro4^{K229L}</i> , <i>aro7^{G141S}</i> , <i>acc1</i> , <i>Ecpdh</i> , <i>Fjtal</i> , <i>At4cl</i> , <i>Atchs</i> , <i>Atchi</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2: <i>Ntf3h</i> , <i>Aadfr</i> , <i>Ghans</i>	Glucose	33.3	[57]
Cyanidin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1: Δ <i>aro10</i> , Δ <i>pdcs</i> , Δ <i>tsc13</i> , <i>aro4^{K229L}</i> , <i>aro7^{G141S}</i> , <i>acc1</i> , <i>Ecpdh</i> , <i>Fjtal</i> , <i>At4cl</i> , <i>Atchs</i> , <i>Atchi</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2: <i>Ntf3h</i> , <i>Phf3'h</i> , <i>Aadfr</i> , <i>Ghans</i>	Glucose	31.7	[57]
Delphinidin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1: Δ <i>aro10</i> , Δ <i>pdcs</i> , Δ <i>tsc13</i> , <i>Fjtal</i> , <i>At4cl</i> , <i>Atchs</i> , <i>Atchi</i> , <i>acc1</i> , <i>Ecpdh</i> , <i>aro4^{K229L}</i> , <i>aro7^{G141S}</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2: <i>Ntf3h</i> , <i>Phf3'h</i> , <i>slf3'5'h</i> , <i>Aadfr</i> , <i>Ghans</i>	Glucose	26.1	[57]
Rosmarinic acid	<i>Escherichia coli</i> 1: Δ <i>pheA</i> , Δ <i>tyrR</i> , <i>tyrA^{fb}</i> , <i>aroG^{fb}</i> , Δ <i>ptsH</i> , Δ <i>ptsI</i> , Δ <i>crr</i> , Δ <i>aroE</i> , Δ <i>ydiB</i> , <i>Rgtal</i> , <i>hpaBC</i> ; <i>Escherichia coli</i> 2: Δ <i>xylA</i> , <i>aroE</i> , <i>aroL</i> , <i>aroA</i> , <i>aroC</i> , <i>tyrA^{fb}</i> , <i>aroG^{fb}</i> , <i>hpaBC</i> , <i>Lpd-ldh</i> ; <i>Escherichia coli</i> 3: Δ <i>pheA</i> , Δ <i>tyrR</i> , <i>tyrA^{fb}</i> , <i>aroG^{fb}</i> , Δ <i>ptsH</i> , Δ <i>ptsI</i> , Δ <i>crr</i> , Δ <i>aroE</i> , Δ <i>ydiB</i> , <i>Pc4cl</i> , <i>MoRAS</i>	Glucose	172.0	[103]
Pelargonidin-3-O-glucoside	<i>Escherichia coli</i> 1: <i>tyrA^{fb}</i> , <i>aroG^{fb}</i> , <i>Rgtal</i> ; <i>Escherichia coli</i> 2: Δ <i>sumC</i> , Δ <i>fumC</i> , Δ <i>pheA</i> , Δ <i>tyrR</i> , <i>tyrA^{fb}</i> , <i>aroG^{fb}</i> , <i>At4CL</i> , <i>Phchs</i> , <i>Cmchi</i> , <i>RtmatBC</i> ; <i>Escherichia coli</i> 3: <i>Csf3h</i> , <i>Fadfr</i> , <i>DuLAR</i> ; <i>Escherichia coli</i> 4: <i>Phans</i> , <i>At3gt</i>	Glucose	9.5	[104]

6 总结与展望

植物多酚的微生物合成研究, 早期是培养基中添加咖啡酸、肉桂酸、对香豆酸等, 从植物中间代谢物出发合成产物。随后是衔接到微生物代谢节点, 如酪氨酸和苯丙氨酸, 打通了植物多酚的微生物合成途径。葡萄糖是发酵工业的廉价原料, 经过十几年的发展, 终于在模式微生物大肠杆菌和酿酒酵母中建立了植物多酚骨架结构的从头合成途径, 先后实现了咖啡酸、丹参素、迷迭香酸、白藜芦醇、姜黄素、黄烷酮、黄酮醇、异黄酮等的合成。同时部分多酚的糖基化、甲基化、异戊烯基化等衍生物也被合成, 为深度后修饰多酚产物奠定了基础。

近年来, 植物多酚的异源合成宿主已经拓展到谷氨酸棒杆菌、链霉菌、解脂酵母等微生物, 期待着未来深入开发和应用。谷氨酸棒杆菌是生产氨基酸的优质微生物, 基因组相对较小; 而链霉菌具有强大的丙二酰 CoA 供给能力, 但芳香氨基酸合成途径较弱, 今后可改造提高酪氨酸途径通量, 应用于多酚的合成。这些革兰氏阳性工业细菌没有脂多糖和内毒素的困扰, 从生物工程下游制备产品的角度看, 它们优于革兰氏阴性细菌大肠杆菌。解脂酵母的芳香氨基酸合成能力与酿酒酵母相当, 而丙二酰 CoA 供给能力优于酿酒酵母, 柚皮素等产物的合成能力似乎超过了模式微生物, 是极具潜力的多酚合成宿主。毕赤酵母 *Pichia pastoris* 是表达异源蛋白的良好宿主, 具有高密度发酵能力, 而且没有乙醇抑制效应, 有待开发成为多酚产物合成宿主。

在黄酮类产物的微生物合成中, 由于 CHS 的底物非特异性, 催化缩合不同数量丙二酰 CoA 生成副产物和脱轨产物, 成为 CHS 酶催化反应中共性的问题。植物细胞合成黄酮的研究结果表明, CHIL (CHI-like) 蛋白能够与 CHS 发生相互作用, 形成复酶体, 增强催化效率^[105], 同时纠正 CHS 的功能, 减少副产物产生^[106]。深入研究 CHIL-CHS

之间的适配性, 将是减少副产物和脱轨产物生成的一种策略。

由于多酚的从头合成途径较长, 异源途径优化和底盘适配是今后提升多酚产量的主要策略。除了常规的启动子工程、模块化工程、融合表达、前体工程用于优化合成代谢途径外, 近年来发展的动态调控和共培养系统为植物多酚的微生物合成提供了新策略。目前的共培养研究仍局限于大肠杆菌和酿酒酵母。可扩大共培养微生物的种类和培养方式, 根据各种微生物的生理生化特点和培养特性, 对代谢途径进行合理分工, 深入研究异源途径和内源代谢的相互作用, 有望延长异源合成路线、扩大合成的产物范围, 从头高效合成更多的植物多酚。细胞器工程已经在化学品和其他天然产物的微生物合成中展现优势^[107-108], 这种区域化定位表达, 有可能提高酶的催化活性, 协调各反应步骤之间的平衡; 同时隔离非特异性底物与酶的接触, 有望大幅度减少副产物和脱轨产物的生成, 提高多酚产物的合成能力。

REFERENCES

- [1] Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50(3): 586-621.
- [2] Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, et al. Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules*, 2009, 14(6): 2202-2211.
- [3] Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, et al. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1618-1640.
- [4] Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, et al. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients*, 2016, 8(9): 552-568.
- [5] Bays H. Sodium glucose co-transporter type 2 (SGLT2) inhibitors: targeting the kidney to improve glycemic control in diabetes mellitus. *Diabetes Ther*, 2013, 4(2): 195-220.
- [6] Yang C, Pan XY, Xu XF, et al. Salvianolic acid C potently inhibits SARS-CoV-2 infection by blocking

- the formation of six-helix bundle core of spike protein. *Signal Transduct Ter*, 2020, 5(1): 220.
- [7] Su HX, Yao S, Zhao WF, et al. Anti-SARS-CoV-2 activities *in vitro* of Shuanghuanglian preparations and bioactive ingredients. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(9): 1167-1177.
- [8] Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct*, 2019, 10(2): 514-528.
- [9] 崔可建, 蔡超, 朱才镇. 基于植物多酚构筑新型功能材料. *材料导报*, 2018, 32(5): 755-764, 771.
Cui KJ, Cai C, Zhu CZ. Creating novel functional materials based on plant polyphenols: a review. *Mater Rev*, 2018, 32(5): 755-764, 771 (in Chinese).
- [10] Li YZ, Mao JW, Liu QL, et al. *De novo* biosynthesis of caffeic acid from glucose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(4): 756-765.
- [11] Berner M, Krug D, Bihlmaier C, et al. Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. *J Bacteriol*, 2006, 188(7): 2666-2673.
- [12] Zhang HR, Stephanopoulos G. Engineering *E. coli* for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(8): 3333-3341.
- [13] Furuya T, Arai Y, Kino K. Biotechnological production of caffeic acid by bacterial cytochrome P450 CYP199A2. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(17): 6087-6094.
- [14] Lin YH, Yan YJ. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 42-50.
- [15] Furuya T, Kino K. Catalytic activity of the two-component flavin-dependent monooxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* toward cinnamic acid derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(3): 1145-1154.
- [16] 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.
- [17] Liu LQ, Liu H, Zhang W, et al. Engineering the biosynthesis of caffeic acid in *Saccharomyces cerevisiae* with heterologous enzyme combinations. *Engineering*, 2019, 5(2): 287-295.
- [18] Yao YF, Wang CS, Qiao J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvianic acid A via an artificial biosynthetic pathway. *Metab Eng*, 2013, 19: 79-87.
- [19] Zhou L, Ding Q, Jiang GZ, et al. Chromosome engineering of *Escherichia coli* for constitutive production of salvianic acid A. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 84-94.
- [20] Xiong TZ, Jiang J, Bai YJ, et al. Redox self-sufficient biocatalyst system for conversion of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine into (*R*)- or (*S*)-3,4-dihydroxyphenyllactic acid. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(8): 1081-1090.
- [21] Xiong TZ, Jiang J, Bai YJ, et al. Biosynthesis of D-danshensu from L-DOPA using engineered *Escherichia coli* whole cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 102(15): 6097-6105.
- [22] Xiong TZ, Jia P, Jiang J, et al. One-pot, three-step cascade synthesis of D-danshensu using engineered *Escherichia coli* whole cells. *J Biotechnol*, 2019, 300: 48-54.
- [23] Li C, Zhang ZD, Wang J. A thermophilic biofunctional multienzyme cascade reaction for cell-free synthesis of salvianic acid A and 3,4-dihydroxymandelic acid. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2019, 7(22): 18247-18253.
- [24] 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.
- [25] Bloch SE, Schmidt-Dannert C. Construction of a chimeric biosynthetic pathway for the *de novo* biosynthesis of rosmarinic acid in *Escherichia coli*. *ChemBioChem*, 2014, 15(16): 2393-2401.
- [26] Jiang JJ, Bi HP, Zhuang YB, et al. Engineered synthesis of rosmarinic acid in *Escherichia coli* resulting production of a new intermediate, caffeoyl-phenyllactate. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(1): 81-88.
- [27] Zhang YS, Li SZ, Li J, et al. Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(40): 13030-13031.
- [28] Wang YC, Yu O. Synthetic scaffolds increased resveratrol biosynthesis in engineered yeast cells. *J*

- Biotechnol, 2012, 157(1): 258-260.
- [29] Conrado RJ, Wu GC, Boock JT, et al. DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(4): 1879-1889.
- [30] Sydor T, Schaffer S, Boles E. Considerable increase in resveratrol production by recombinant industrial yeast strains with use of rich medium. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(10): 3361-3363.
- [31] Li MJ, Kildegaard KR, Chen Y, et al. *De novo* production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2015, 32: 1-11.
- [32] Li MJ, Schneider K, Kristensen M, et al. Engineering yeast for high-level production of stilbenoid antioxidants. *Sci Rep*, 2016, 6: 36827.
- [33] Gu Y, Ma JB, Zhu YJ, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a chassis for *de novo* synthesis of five aromatic-derived natural products and chemicals. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(8): 2096-2106.
- [34] He Q, Szczepańska P, Yuzbashev T, et al. *De novo* production of resveratrol from glycerol by engineering different metabolic pathways in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng Commun*, 2020, 11: e00146.
- [35] Sáez-Sáez J, Wang GK, Marella ER, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for high-level resveratrol production. *Metab Eng*, 2020, 62: 51-61.
- [36] Lim CG, Fowler ZL, Hueller T, et al. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(10): 3451-3460.
- [37] Liu XL, Lin J, Hu HF, et al. *De novo* biosynthesis of resveratrol by site-specific integration of heterologous genes in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(8): fnw061.
- [38] Kang SY, Lee JK, Choi O, et al. Biosynthesis of methylated resveratrol analogs through the construction of an artificial biosynthetic pathway in *E. coli*. *BMC Biotechnol*, 2014, 14: 67-77.
- [39] Kallscheuer N, Vogt M, Stenzel A, et al. Construction of a *Corynebacterium glutamicum* platform strain for the production of stilbenes and (2S)-flavanones. *Metab Eng*, 2016, 38: 47-55.
- [40] Watts KT, Lee PC, Schmidt-Dannert C. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 22-33.
- [41] Wang SY, Zhang SW, Xiao AF, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of various phenylpropanoid derivatives. *Metab Eng*, 2015, 29: 153-159.
- [42] Jeong YJ, An CH, Woo SG, et al. Production of pinostilbene compounds by the expression of resveratrol *O*-methyltransferase genes in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol*, 2014, 54: 8-14.
- [43] Heo KT, Kang SY, Hong YS. *De novo* biosynthesis of pterostilbene in an *Escherichia coli* strain using a new resveratrol *O*-methyltransferase from *Arabidopsis*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 30-37.
- [44] Choi O, Lee JK, Kang SY, et al. Construction of artificial biosynthetic pathways for resveratrol glucoside derivatives. *J Microbiol Biotechnol*, 2014, 24(5): 614-618.
- [45] Palmer CM, Miller KK, Nguyen A, et al. Engineering 4-coumaroyl-CoA derived polyketide production in *Yarrowia lipolytica* through a β -oxidation mediated strategy. *Metab Eng*, 2020, 57: 174-181.
- [46] Katsuyama Y, Matsuzawa M, Funai N, et al. Production of curcuminoids by *Escherichia coli* carrying an artificial biosynthesis pathway. *Microbiology (Reading)*, 2008, 154(9): 2620-2628.
- [47] Kim EJ, Cha MN, Kim BG, et al. Production of curcuminoids in engineered *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 27(5): 975-982.
- [48] Rodrigues JL, Araújo RG, Prather KLJ, et al. Production of curcuminoids from tyrosine by a metabolically engineered *Escherichia coli* using caffeic acid as an intermediate. *Biotechnol J*, 2015, 10(4): 599-609.
- [49] Couto MR, Rodrigues JL, Rodrigues LR. Optimization of fermentation conditions for the production of curcumin by engineered *Escherichia coli*. *J Roy Soc Interface*, 2017, 14(133): 20170470.
- [50] Santos CNS, Koffas M, Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. *Metab Eng*, 2011, 13(4): 392-400.
- [51] Zhou SH, Hao TT, Zhou JW. Fermentation and

- metabolic pathway optimization to *de novo* synthesize (2*S*)-naringenin in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(10): 1574-1582.
- [52] Gao S, Lyu YB, Zeng WZ, et al. Efficient biosynthesis of (2*S*)-naringenin from *p*-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(4): 1015-1021.
- [53] Gao S, Zhou HR, Zhou JW, et al. Promoter-library-based pathway optimization for efficient (2*S*)-naringenin production from *p*-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(25): 6884-6891.
- [54] Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2009, 11(6): 355-366.
- [55] Koopman F, Beekwilder J, Crimi B, et al. *De novo* production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 155-169.
- [56] Lyu XM, Ng KR, Lee JL, et al. Enhancement of naringenin biosynthesis from tyrosine by metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(31): 6638-6646.
- [57] Du Y, Yang BR, Yi ZQ, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* coculture platform for the production of flavonoids. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(7): 2146-2154.
- [58] Park SR, Ahn MS, Han AR, et al. Enhanced flavonoid production in *Streptomyces venezuelae* via metabolic engineering. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21(11): 1143-1146.
- [59] Lv YK, Marsafari M, Koffas M, et al. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(11): 2514-2523.
- [60] Yan YJ, Kohli A, Koffas MAG. Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(9): 5610-5613.
- [61] Zhu SL, Wu JJ, Du GC, et al. Efficient synthesis of eriodictyol from L-tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(10): 3072-3080.
- [62] Marín L, Gutiérrez-Del-Río I, Yagüe P, et al. *De novo* biosynthesis of apigenin, luteolin, and eriodictyol in the actinomycete *Streptomyces albus* and production improvement by feeding and spore conditioning. *Front Microbiol*, 2017, 8: 921-932.
- [63] Stahlhut SG, Siedler S, Malla S, et al. Assembly of a novel biosynthetic pathway for production of the plant flavonoid fisetin in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2015, 31: 84-93.
- [64] Yin Y, Li YP, Jiang D, et al. *De novo* biosynthesis of liquiritin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(4): 711-721.
- [65] Rodriguez A, Strucko T, Stahlhut SG, et al. Metabolic engineering of yeast for fermentative production of flavonoids. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 1645-1654.
- [66] Eichenberger M, Lehka BJ, Folly C, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for *de novo* production of dihydrochalcones with known antioxidant, antidiabetic, and sweet tasting properties. *Metab Eng*, 2017, 39: 80-89.
- [67] Jiang CM, Liu XN, Chen XQ, et al. Raising the production of phloretin by alleviation of by-product of chalcone synthase in the engineered yeast. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(11): 1734-1743.
- [68] Kim BG. Biological synthesis of genistein in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2019, 30(5): 770-776.
- [69] Leonard E, Yan YJ, Lim KH, et al. Investigation of two distinct flavone synthases for plant-specific flavone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(12): 8241-8248.
- [70] Miyahisa I, Funa N, Ohnishi Y, et al. Combinatorial biosynthesis of flavones and flavonols in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 71(1): 53-58.
- [71] Leonard E, Yan YJ, Fowler ZL, et al. Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids. *Mol Pharmaceutics*, 2008, 5(2): 257-265.
- [72] Leonard E, Yan YJ, Koffas MAG. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2006, 8(2): 172-181.
- [73] Pei JJ, Chen AN, Dong P, et al. Modulating heterologous pathways and optimizing fermentation

- conditions for biosynthesis of kaempferol and astragalin from naringenin in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(2): 171-186.
- [74] Duan LJ, Ding WT, Liu XN, et al. Biosynthesis and engineering of kaempferol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 165-174.
- [75] Marín L, Gutiérrez-Del-Río I, Entrialgo-Cadierno R, et al. *De novo* biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0207278.
- [76] 封悦洋, 王颖, 姚明东, 等. 生物合成槲皮素糖苷类衍生物的研究进展. *化工学报*, 2020, 71(7): 2945-2955.
- Feng YY, Wang Y, Yao MD, et al. Advances in biosynthesis of quercetin glycoside derivatives. *J Chem Ind Eng (China)*, 2020, 71(7): 2945-2955 (in Chinese).
- [77] Eichenberger M, Hansson A, Fischer D, et al. *De novo* biosynthesis of anthocyanins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2018, 18(4), DOI: 10.1093/femsyr/foy046.
- [78] 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(1): 448-457.
- [79] Levisson M, Araya-Cloutier C, De Bruijn WJC, et al. Toward developing a yeast cell factory for the production of prenylated flavonoids. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(49): 13478-13486.
- [80] Kim MJ, Kim BG, Ahn JH. Biosynthesis of bioactive *O*-methylated flavonoids in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(16): 7195-7204.
- [81] Katsuyama Y, Funa N, Miyahisa I, et al. Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chem Biol*, 2007, 14(6): 613-621.
- [82] Miyahisa I, Kaneko M, Funa N, et al. Efficient production of (2*S*)-flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(4): 498-504.
- [83] 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.
- [84] Wu JJ, Yu O, Du GC, et al. Fine-tuning of the fatty acid pathway by synthetic antisense RNA for enhanced (2*S*)-naringenin production from L-tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(23): 7283-7292.
- [85] Wu JJ, Du GC, Chen J, et al. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 13477.
- [86] Zhao Y, Wu BH, Liu ZN, et al. Combinatorial optimization of resveratrol production in engineered *E. coli*. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(51): 13444-13453.
- [87] Xu P, Ranganathan S, Fowler ZL, et al. Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 578-587.
- [88] Bhan N, Xu P, Khalidi O, et al. Redirecting carbon flux into malonyl-CoA to improve resveratrol titers: proof of concept for genetic interventions predicted by OptForce computational framework. *Chem Eng Sci*, 2013, 103: 109-114.
- [89] Xiong DD, Lu SK, Wu JY, et al. Improving key enzyme activity in phenylpropanoid pathway with a designed biosensor. *Metab Eng*, 2017, 40: 115-123.
- [90] Yang D, Kim WJ, Yoo SM, et al. Repurposing type III polyketide synthase as a malonyl-CoA biosensor for metabolic engineering in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(40): 9835-9844.
- [91] Zhou SH, Lyu YB, Li HZ, et al. Fine-tuning the (2*S*)-naringenin synthetic pathway using an iterative high-throughput balancing strategy. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(6): 1392-1404.
- [92] Zhou SH, Yuan SF, Nair PH, et al. Development of a growth coupled dynamic regulation network balancing malonyl-CoA node to enhance (2*S*)-naringenin synthesis in *E. coli*. *BioRxiv Synth Biol*, 2020, DOI: 10.1101/2020.07.07.192633.
- [93] Dinh CV, Prather KLJ. Development of an autonomous and bifunctional quorum-sensing circuit for metabolic flux control in engineered *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(51): 25562-25568.

- [94] Camacho-Zaragoza JM, Hernández-Chávez G, Moreno-Avitia F, et al. Engineering of a microbial coculture of *Escherichia coli* strains for the biosynthesis of resveratrol. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 163-173.
- [95] Hong J, Im DK, Oh MK. Investigating *E. coli* coculture for resveratrol production with ^{13}C metabolic flux analysis. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(11): 3466-3473.
- [96] Yuan SF, Yi XN, Johnston TG, et al. *De novo* resveratrol production through modular engineering of an *Escherichia coli*-*Saccharomyces cerevisiae* co-culture. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 143-154.
- [97] Rodrigues JL, Gomes D, Rodrigues LR. A combinatorial approach to optimize the production of curcuminoids from tyrosine in *Escherichia coli*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 59-73.
- [98] Jones JA, Vernacchio VR, Sinkoe AL, et al. Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids. *Metab Eng*, 2016, 35: 55-63.
- [99] Ganesan V, Li ZH, Wang XN, et al. Heterologous biosynthesis of natural product naringenin by co-culture engineering. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(3): 236-242.
- [100] Zhang W, Liu H, Li X, et al. Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Eng Life Sci*, 2017, 17(9): 1021-1029.
- [101] Katsuyama Y, Miyahisa I, Funa N, et al. One-pot synthesis of genistein from tyrosine by coincubation of genetically engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 73(5): 1143-1149.
- [102] Lyu XM, Zhao GL, Ng KR, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for *de novo* production of kaempferol. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(19): 5596-5606.
- [103] Li ZH, Wang XN, Zhang HR. Balancing the non-linear rosmarinic acid biosynthetic pathway by modular co-culture engineering. *Metab Eng*, 2019, 54: 1-11.
- [104] Jones JA, Vernacchio VR, Collins SM, et al. Complete biosynthesis of anthocyanins using *E. coli* polycultures. *mBio*, 2017, 8(3): e00621-17.
- [105] Ban ZN, Qin H, Mitchell AJ, et al. Noncatalytic chalcone isomerase-fold proteins in *Humulus lupulus* are auxiliary components in prenylated flavonoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(22): E5223-E5232.
- [106] Waki T, Mameda R, Nakano T, et al. A conserved strategy of chalcone isomerase-like protein to rectify promiscuous chalcone synthase specificity. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 870-883.
- [107] Hammer SK, Avalos JL. Harnessing yeast organelles for metabolic engineering. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(8): 823-832.
- [108] Wei SP, Qian ZG, Hu CF, et al. Formation and functionalization of membraneless compartments in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(10): 1143-1148.

(本文责编 陈宏宇)