

生物合成己二酸的代谢工程研究进展

刘少奇[#], 耿娜[#], 孙新晓, 袁其朋^{*}

(北京化工大学化工资源有效利用国家重点实验室, 北京 100029)

摘要: 己二酸是一种重要的大宗化学品, 主要用于合成尼龙和聚氨酯泡沫塑料, 市场需求巨大, 其高效生物合成至今还未实现。本文概括了酿酒酵母中构建和优化新的己二酸合成途径研究进展。首先, 通过体内及体外活性测试, 对催化每一步反应的酶进行筛选, 构建初步的代谢途径。利用组学分析诊断和定位生物合成途径的瓶颈。对于途径中的限速酶采用蛋白质工程手段进行改造。其次, 利用合成生物学和代谢工程手段优化代谢途径。优化手段具体包括: 通过模块化优化, 平衡各个基因之间的表达; 利用蛋白支架, 构建酶反应的流水线, 减少中间产物的扩散, 提高反应效率; 通过 RNA 干扰技术抑制竞争代谢途径的流量, 提高目标代谢途径的通量。最后, 利用 CRISPR/Cas9 及全局转录机器工程(gTME)等最新技术进行基因组编辑、重排转录网络, 最终获得己二酸的高产菌株及适用于高效生产其他芳香族化合物的底盘酵母菌株。

关键词: 己二酸; 生物合成; 酿酒酵母

Metabolic engineering research progress of biosynthesis of adipic acid

LIU Shao-Qi[#], GENG Na[#], SUN Xin-Xiao, YUAN Qi-Peng^{*}

(Beijing University of Chemical Technology, State Key Laboratory of Chemical Effective Utilization of Resources, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: Adipic acid is an important bulk chemical and is mainly used for the synthesis of nylon and polyurethane foam. It has a huge market, but the efficient total biosynthesis of this compound has not been achieved yet. This paper summarized the fabrication and optimization of novel artificial adipic acid biosynthetic pathway from *Saccharomyces cerevisiae*. First, the *in vivo* and *in vitro* assays were carried out to screen for efficient enzymes. The initial biosynthetic pathways for adipic acid production were constructed. The possible bottlenecks of the biosynthetic pathways were detected using transcriptomics, proteomics and metabolomics tools. The rate-limiting steps in the pathways were eliminated using protein engineering methods. Then, the metabolic pathways were optimized and adipic acid overproducing strains were obtained through strategies of synthetic biology and metabolic engineering. The strategies included: balancing gene expression using modular optimization; building enzyme pipelines using protein scaffolds, reducing the diffusion of intermediates, and improving the reaction efficiency; using anti-sense RNAs to turn down competing pathways and increase the carbon flux through target pathway. In the end, the most advanced technologies, such as genome editing and global transcription machinery engineering were used to obtain chassis yeast platform for the production of adipic acid and other aromatic compounds.

基金项目: 国家自然科学基金项目(21636001)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (21636001)

*通讯作者: 袁其朋, 教授, 主要研究方向为天然活性成分的生物合成与高效分离。E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

*Corresponding author: YUAN Qi-Peng, Professor, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China. E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

[#]刘少奇、耿娜为共同第一作者

[#]LIU Shao-Qi and GENG Na are co-first authors.

KEY WORDS: adipic acid; biosynthesis; *Saccharomyces cerevisiae*

1 引言

己二酸是一种重要的石油化工原料和有机合成中间体, 近年来, 其需求量出现了稳定的增长趋势。2010 年, 全球己二酸的需求量约为 260 万吨^[1]。己二酸主要用于合成尼龙 66、增塑剂、润滑剂和聚氨酯等^[2]。

己二酸的天然合成途径在自然界中尚未发现。目前, 己二酸的生产主要以苯为原料, 通过化学方法合成, 原料和中间产物毒性很强, 而且过程中产生大量的 N₂O 等温室气体, 环境污染严重且不可持续, 因此, 近年来国内外加快探究环保的己二酸生产方法, 生物合成以其工艺流程简单、总投入成本低、可循环利用的优势成为了己二酸生产的主要突破方向。现今有很多通过生物合成物质的先例, Paddon 等^[3]利用基因工程酿酒酵母生产青蒿酸, 产量可以达到 25 g/L; 通过优化异戊二烯途径, 在大肠杆菌中紫杉醇的前体紫杉烯的产量可以达到 1 g/L^[4]; Atsumi 等^[5]利用非发酵途径生产支链高级醇, 异丁醇产量可以达到 22 g/L。研发绿色环保、可持续的己二酸及其前体生产的新方法具有重大现实意义。基于组合生物合成策略, 在微生物体内构建相关合成途径, 通过生物合成的方法来生产这些产品, 无论从资源利用还是从环境保护的角度来看, 都是非常具有前景和应用价值的研究方向。

2 己二酸的性质

己二酸又名肥酸(adipic acid, 简称 AA), 分子式 C₆H₁₀O₄, 相对分子质量 146.14, 熔点 152 °C, 沸点 330.5 °C, 常温下为白色单斜晶体; 微溶于水、环己烷和苯, 可溶于丙酮, 易溶于醇、醚等大多数有机溶剂^[6], 是脂肪族二元羧酸中最有应用价值的二元酸之一, 在医药、农药和染料等方面均有着广泛的应用。

3 大肠杆菌生物合成己二酸的研究进展及途径构建

虽然己二酸的天然合成途径不存在, 但是己二酸可以由粘糠酸经过化学催化加氢制得。在假单胞菌等微生物中存在降解芳香化合物的代谢途径, 粘糠酸是降解过程的中间体。表 1 列举了通过生物转化法将儿茶酚、苯甲酸等底物转化成粘糠酸的实例。但是, 这些底物仍来源于石油, 仍没有解决其资源不可持续获得的问题。

John Frost 等^[7]于 1994 年首次报道了利用基因工程大肠杆菌由葡萄糖合成粘糠酸, 再经过化学催化加氢生产己二酸。经过菌株改造在摇瓶中通过两步发酵, 产量可以达

到 2.4 g/L, 通过进一步发酵条件优化, 在发酵罐中的产量可以达到 38.6 g/L。该方法提供了可持续生产己二酸的思路, Frost 也因为这项工作获得了 1997 年的美国绿色化学奖。此代谢途径在过去 20 年中成为了唯一可行的生物合成途径。但是, 这个方法依然存在缺陷。例如高产菌株需要敲除莽草酸脱氢酶基因, 阻断许多生长必需物质的合成, 因此需要在培养基中添加多种昂贵底物(包括苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、对氨基苯甲酸、对羟基苯酸), 增加了培养基的复杂性以及生产成本。

表 1 利用生物转化法生产粘糠酸

Table 1 Producing furoic acid by the biological manufacturing method

菌株	底物	浓度(g/L)	时间(h)
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	儿茶酚	59	12
<i>P. putida</i> BM014	苯甲酸	32	40
<i>Arthrobacter</i>	苯甲酸	44.1	48
<i>P. putida</i> KT2440-JD1	苯甲酸	18.5	80

2014 年, Yu 等^[8]报道了一条以乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 为前体的己二酸生物合成途径, 该途径需要 10 步以上的酶促反应, 途径冗长且存在可逆反应, 最终己二酸的产量极低(低于 1 mg/L)。另外, 2015 年, Clomburg 等^[9]报道了利用脂肪酸反向 β 氧化途径合成 C₆~C₁₀ 二元羧酸, 该途径的不足之处在于产物为混合物, 无法避免副产物和竞争产物的产生, 而且己二酸的产量较低(约 150 mg/L)。这两条途径目前均不具备生产使用价值。

Sun 等^[10]陆续开发了 3 条生物合成粘糠酸的新途径, 并在大肠杆菌中进行了验证和优化。首先, 设计了一条以邻氨基苯甲酸为前体的粘糠酸合成途径(图 1A)。邻氨基苯甲酸是色氨酸合成的前体, 通过引入两个外源酶, 可以将其顺次转化为儿茶酚和粘糠酸。第二条途径是以水杨酸为前提的途径(图 1B), 在该途径中, 分支酸经异分支酸合成酶(ICS)和异分支酸丙酮酸裂解酶(IPL)催化合成水杨酸, 再经水杨酸单加氧酶(SMO)和儿茶酚双加氧酶(CDO)催化生成粘糠酸。经过优化, 摇瓶实验中水杨酸产量可以达到 1.2 g/L, 粘糠酸产量可以达到 1.5 g/L^[11], 该途径不需要添加昂贵底物, 在生产成本上更具竞争优势。第三条途径(图 1C)以 2,3-二羟基苯甲酸为前体。2,3-二羟基苯甲酸是大肠杆菌自身的代谢产物, 在 2,3-二羟基苯甲酸脱羧酶(BDC)和儿茶酚双加氧酶(CDO)的催化下即可生成粘糠酸。大肠杆菌摇瓶实验粘糠酸产量可以达到 480 mg/L。该途径的优点是 BDC 不需要任何辅因子, CDO 也只需要氧气就可催化

反应。这就使得粘糠酸的生物合成变成非生长依赖型^[12]。

尽管大肠杆菌生物合成己二酸研究方面取得了阶段性的进展,但仍存在 3 方面的不足。首先,大肠杆菌作为宿主存在如下问题:(1)易感染噬菌体。一旦感染,去除将十分困难,导致长时间停产,损失不可估量;(2)虽然已经有不少利用大肠杆菌生产乳酸、琥珀酸等的文献报道^[13,14],但是大肠杆菌生长条件接近中性,因此在产酸过程中需不断加入碱以调节 pH,产生的盐会增加渗透压,不利于菌株的高密度生长,而且在后续纯化工程中又要对发酵液进行酸化,增加了生产成本。其次,工程菌株需敲除莽草酸脱氢酶基因,阻断了下游多种生长必需物质的合成,因此需要在培养基中添加这些昂贵成分(包括苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、对氨基苯甲酸、对羟基苯酸),增加了培养基的复杂性以及生产成本。第三,化学加氢存在催化剂昂贵难以回收的问题。

酸、对氨基苯甲酸、对羟基苯酸),增加了培养基的复杂性以及生产成本。第三,化学加氢存在催化剂昂贵难以回收的问题。

4 酿酒酵母生物合成己二酸研究进展及研究策略

4.1 酿酒酵母生物合成己二酸研究进展

在宿主选择上,与大肠杆菌相比,酿酒酵母是更好的生产有机酸的宿主,因为其可耐受低 pH 且不易染菌,不存在噬菌体污染的问题,对有机化合物有较高的耐受性,适合大规模发酵。例如,Myriant、BioAmber、Reverdia 3 家公司已经构建了高产琥珀酸的酿酒酵母菌株以取代大肠杆

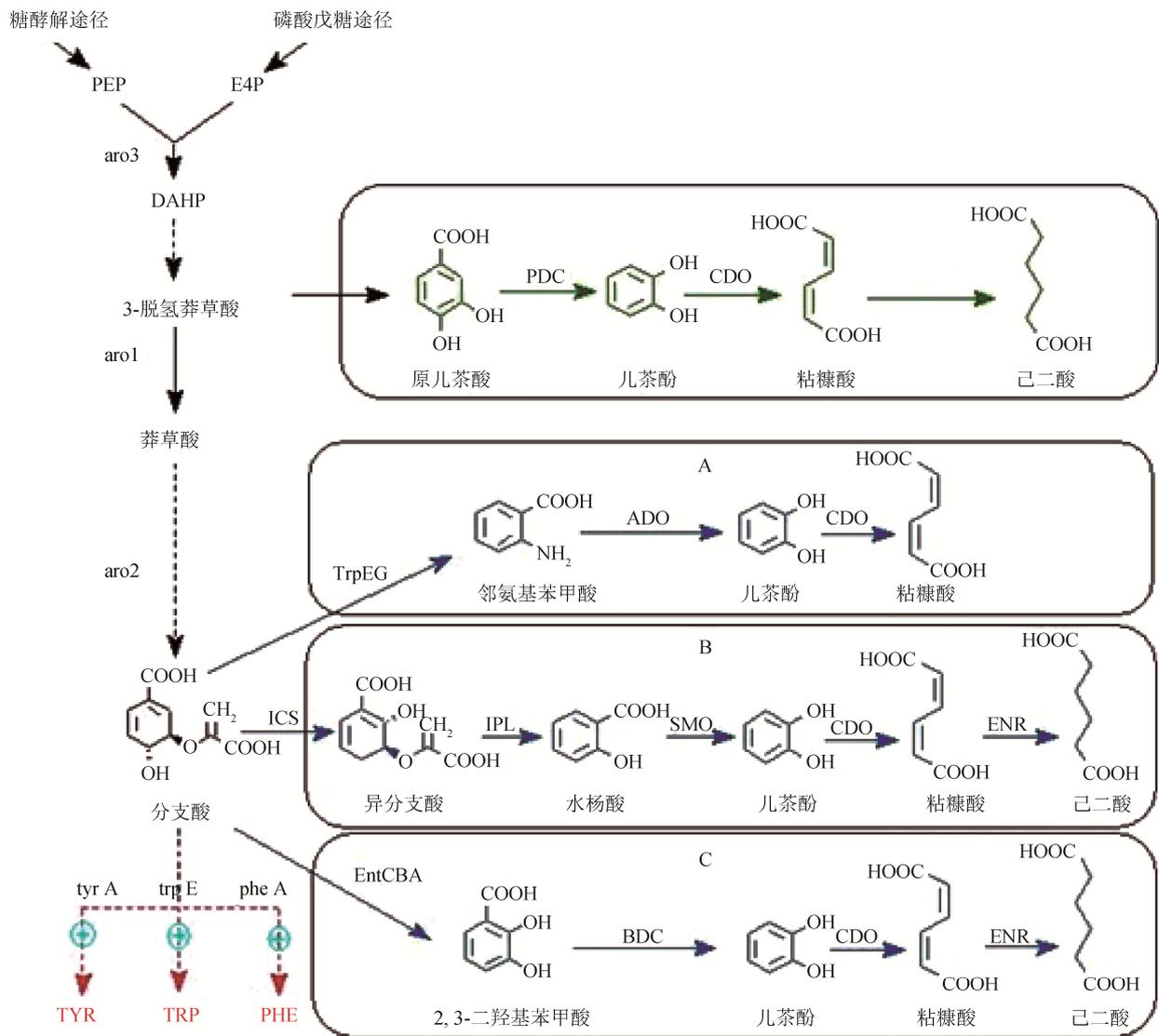


图 1 己二酸合成途径

Fig. 1 The synthesis pathway of adipic acid

菌生产琥珀酸, 有望减少碳源及能源消耗, 提高生产的可操作性^[15], 已经意识到利用酿酒酵母生产粘糠酸的潜力。最近, 研究人员在酿酒酵母中重新构建了上述途径。然而粘糠酸的产量很低, 分别为 1.56 mg/L 和 141 mg/L^[16,17]。其原因主要是酿酒酵母莽草酸途径的通量很低, 仅占总代谢通量的 3%。虽然通过关键限速酶的表达可以增加途径通量, 但仍达不到满意的产量及得率。

粘糠酸到己二酸还存在化学加氢催化剂昂贵且难以回收的问题, 故筛选出一个酶法加氢需要的高效还原酶仍是关键问题。基于本课题组已经从丙酮丁醇梭菌中筛选到一个烯酮还原酶, 且该酶能有效还原肉桂酸和香豆酸中的 C=C 双键, 通过途径整合优化实现了苯丙酸的生物合成, 在此基础上, 拟通过筛选及蛋白质工程改造, 获得高效还原粘糠酸的烯酮还原酶, 替代化学催化加氢, 以期实现己二酸的高效全生物合成。

4.2 酿酒酵母生物合成己二酸的研究策略

针对酿酒酵母生物合成存在的问题, 本课题组拟通过转录组学、蛋白组学及代谢组学系统分析酿酒酵母代谢网络, 确定关键的调控靶点, 利用最新的 CRISPR 技术结合其他代谢调控手段, 重构酿酒酵母代谢网络, 最大限度提高莽草酸途径通量, 为己二酸及其他芳香化合物的高效合成提供平台。

4.2.1 蛋白质工程研究进展及应用

生物催化剂已经被广泛用于大宗化学品以及药物的生产。然而, 许多天然酶的性质包括底物选择性、对映体选择性、稳定性等, 并不能满足实际应用的要求。蛋白质工程的出现克服了天然酶作为生物催化剂的诸多缺陷, 已经成为设计和改变酶性质的强有力工具。蛋白质工程存在两种策略: 蛋白质的理性设计和定向进化。这两种策略均有许多成功应用的实例。例如, Marcus 等^[18]运用理性设计的方法, 通过简单的点突变就改变了来源于 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 的二级醇脱氢酶的异构体选择性。Di Nardo 等^[19]通过定向进化的方法筛选得到了 *Bacillus megaterium* P450 BM-3 的突变体, 显著提高了 astemizole 的选择性和活性。一系列用于构建突变文库的分子生物学工具的出现, 加上合适的高通量筛选方法, 使定向进化变得简单可行。定向进化已经成为蛋白质工程的标准方法, 与蛋白质理性设计互补使用将大大加快蛋白质改造的进程。酿酒酵母全生物合成己二酸的关键问题之一, 就是寻找一个可以将粘糠酸还原成己二酸的烯酮还原酶。除了自然界中筛选烯酮还原酶, 将蛋白质工程运用于改造已有的烯酮还原酶, 也是获得高效烯酮还原酶的有效途径。

4.2.2 以 NAD(P)H 为辅因子的氧化还原酶筛选平台的研究进展及应用

最近, 以 NAD(P)H 为辅因子的氧化还原酶筛选平台

已经在大肠杆菌中建立。该菌株敲除了 *adhE*、*ldhA* 和 *frd* 基因, 但在厌氧条件下胞内会积累 NAD(P)H, 抑制糖酵解和三羧酸循环, 导致细胞无法在厌氧条件下生长。通过导入消耗 NAD(P)H 的酶并在培养基中加入相应底物, 胞内 NAD(P)H 得到消耗, 细胞即可以恢复生长, 而且细胞生长的快慢与外源酶的活性存在正相关性。因此, 该菌株可以作为筛选平台用于突变文库的筛选。含有高活性突变酶的细胞生长较快而逐步得到富集。该筛选平台已经成功应用于提高正丁醇和己醇的生物合成中关键酶的催化活性^[20,21]。该平台也可以应用于高活性的烯醇还原酶的筛选。

4.2.3 模块适配性研究的进展及应用

在构建外源途径的过程中, 仅仅具有高催化活性的酶还是不足以保证获得高效的生物合成。如果途径中的酶之间以及外源途径和自身代谢之间不能相互协调, 会导致中间代谢产物积累, 菌体生长受到抑制, 最终影响目标产物的产量。模块化优化提供了一种简单有效的途径优化的方法。首先把整个代谢途径中的基因分配到几个模块中, 然后通过调整质粒的拷贝数、启动子的强度、核糖体结合位点的强度以及 RNA 的稳定性, 达到模块之间的协调, 最终实现代谢途径的顺畅。Xu 等^[22]利用该方法优化大肠杆菌脂肪酸的生产, 摇瓶实验中脂肪酸的产量提高了 20 倍, 在分批补料发酵实验中, 脂肪酸的产量可以达到 8.6 g/L。Juminaga 等^[23]利用该方法优化大肠杆菌中酪氨酸的生产, 摇瓶实验中酪氨酸的产量达到 2 g/L。Ajikumar 等^[4]利用该技术成功提高了紫杉醇前体紫杉烯的产量。Lin 等^[24,25]运用该技术优化大肠杆菌合成粘糠酸以及香豆素, 有效提高了产量, 积累了相关经验。在酿酒酵母全生物合成己二酸的研究中, 也可以应用该技术协调模块间适配性, 达到优化代谢途径的目的。

4.2.4 蛋白质支架技术的研究进展及应用

除了模块化优化, 蛋白质支架技术也可用于途径的优化。在多步酶催化的代谢途径中, 中间产物的过多积累会对宿主细胞产生毒害, 此外, 中间产物在胞液中任意扩散会降低目标产物的产量。为此, 加州大学研究人员受支架蛋白和基因簇结构的启示, 将各个酶锚定在蛋白支架上, 代谢流得到协调, 目标产物甲羟戊酸的产量提高了 77 倍^[26]。由于胞内表达支架蛋白需要消耗转录和翻译的相应资源, 对细胞代谢产生负担, 哈佛大学 Delebecque 等^[27]设计并构建了 RNA 自组装支架, 该支架同样可将代谢途径中的若干酶聚拢在一起, 提高整体催化效率。与蛋白支架和 RNA 支架集结酶的原理相似, DNA 支架特异性地结合锌指蛋白结合域, 后者再与酶结合, 使各个酶依照顺序进行催化, 避免了中间代谢产物的积累及扩散, 提高了目标产物的产量^[28]。Wang 等^[29]利用蛋白质支架技术使酿酒酵母白藜芦醇的产量提高了 5 倍, 证明了该技术在酿酒酵母中应用的可行性。此技术和模块化优化技术协同解决途径中可能出现的限速步骤。

4.2.5 RNA 干扰技术的研究进展及应用

芳香族氨基酸及其他一些菌体生长必需的代谢产物均来自于莽草酸途径。一方面, 这些产物的合成造成了碳流量的分流, 另一方面, 它们对上游途径的一些酶具有反馈抑制作用, 限制了目的产物的产量。传统的基因敲除手段删除相关的竞争途径虽然可行, 但是存在一些弊端, 即需要在培养基中添加额外的氨基酸等营养物质以维持菌体的正常生长, RNA 干扰技术提供了替代的解决方案。RNA 干扰通过促进目标 RNA 的降解以及阻碍蛋白质的翻译下调目的蛋白在细胞内的丰度。与基因敲除方法不同, 该方法并不完全阻断目标蛋白的合成, 在削弱竞争途径的同时, 也解决了向培养基中添加氨基酸的问题。Dokyun 等^[30]利用 RNA 干扰技术使尸胺在大肠杆菌里的产量提高了 55%。此技术可以用于调控和限制酿酒酵母中芳香族氨基酸的合成, 达到提高目的代谢流量的目的。

4.2.6 CRISPR/Cas9 及 gTME 技术的进展及应用

一些最新技术的出现, 为从基因编辑和全局转录调控水平改造酿酒酵母代谢网络, 进一步提高目标产物产量提供了可能。例如, 哈佛大学 Church 课题组发明了 RNA 指导下的 Cas9 核酸酶大量剪切基因序列的新技术 (CRISPR/Cas9)。利用该技术进行基因敲除具有无物种选择性(尤其适合真核细胞的基因敲除), 可同时敲除多个基因, 属于无痕敲除, 不需进行蛋白质工程操作, 比 RNAi 的脱靶率低等优点^[31], 并已成功应用于酿酒酵母基因组的改造^[32](图 2)。Alper 等利用全局转录机器工程 (gTME) 重排转录网络, 成功获得了耐受高浓度葡萄糖以及乙醇的酿酒酵母菌株^[33]。利用这两项技术对宿主网络进行系统改造, 最终获得己二酸的高产菌株及适用于高效生产其他芳香族化合物的底盘酵母菌株。

5 结 论

传统的己二酸生产虽然技术比较成熟, 但对环境危害较大, 无法满足绿色化工的要求。因此, 研发绿色环保而且具有可持续性的新的生产方法来生产己二酸及其前体具有重大现实意义。基于组合生物合成策略, 在酿酒酵母体内构建相关合成途径, 通过生物合成的方法来生产这些产品, 无论从资源利用还是从环境保护的角度来看, 都是非常具有前景和应用价值的研究方向。

参考文献

- [1] D Oct. Research and Markets: Adipic Acid (ADPA): 2011 World Market Outlook And Forecast [Z]. 2011.
- [2] 郝敬泉, 华卫琦, 查志伟, 等. 己二酸生产技术进展和 market 分析[J]. 现代化工, 2012, 32(8): 1-4.
Hao JQ, Hua WQ, Zha ZW, et al. Production technical progress and market analysis of adipic acid [J]. Mod Chem Ind, 2012, 32(8): 1-4.
- [3] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. Nature, 2013, 496: 528-532.
- [4] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KEJ, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. Science, 2010, 330: 70-74.
- [5] Atsumi S, Hanai T, Liao J C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels [J]. Nature, 2008, 451: 86-89.
- [6] 王常有, 李忠. 己二酸. 化工百科全书(第 7 卷)[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994.
Wang CY, Li Z. Adipic acid. Encyclopedia of chemical technology (Volume 7) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1994.
- [7] Niu W, Draths KM, Frost JW. Benzene-free synthesis of adipic acid [J]. Biotechnol Prog, 2002, 18: 201-211.
- [8] Yu JL, Xia XX, Zhong JJ, et al. Direct biosynthesis of adipic acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Bioeng, 2014, 111: 2580-2586.
- [9] Clomburg JM, Blankschien MD, Vick JE, et al. Integrated engineering of beta-oxidation reversal and omega-oxidation pathways for the synthesis of medium chain omega-functionalized carboxylic acids [J]. Metab Eng, 2015, 28C: 202-212.
- [10] Sun X, Lin Y, Huang Q, et al. A novel muconic acid biosynthesis approach by shunting tryptophan biosynthesis via anthranilate [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79: 4024-4030.
- [11] Lin Y, Sun X, Yuan Q, et al. Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli* [J]. Metab Eng, 2014, 23: 62-69.
- [12] Sun X, Lin Y, Yuan Q, et al. Biological production of muconic acid via a prokaryotic 2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase [J]. Chem Sus Chem, 2014, 7: 2478-2481.
- [13] Niu D, Tian K, Prior BA, et al. Highly efficient L-lactate production using engineered *Escherichia coli* with dissimilar temperature optima for L-lactate formation and cell growth [J]. Microb Cell Fact, 2014, 13: 78.
- [14] Zhang X, Jantama K, Shanmugam KT, et al. Reengineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 7807-7813.
- [15] Choi S, Chan WS, Shin JH, et al. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives [J]. Metab Eng, 2015, 28: 223-239.
- [16] Weber C, Brückner C, Weinreb S, et al. Biosynthesis of cis,cis-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78: 8421-8430.
- [17] Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, et al. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metab Eng, 2013, 15: 55-66.
- [18] Marcus SL, Polakowski R, Seto NOL, et al. A single point mutation reverses the donor specificity of human blood group B-synthesizing galactosyltransferase [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 12403-12405.
- [19] Di Nardo GI. Optimization of the bacterial cytochrome P450 BM3 system for the production of human drug metabolites [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13: 15901-15924.
- [20] Dekishima Y, Lan EI, Shen CR, et al. Extending carbon chain length of 1-butanol pathway for 1-hexanol synthesis from glucose by engineered

- Escherichia coli* [J]. J Am Chem Soc, 2011, 133: 11399–11401.
- [21] Shen CR, Lan EI, Dekishima Y, *et al.* Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77: 2905–2915.
- [22] Xu P, Gu Q, Wang W, *et al.* Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli* [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1409.
- [23] Juminaga D, Baido EEKo, Redding-Johanson AM, *et al.* Modular engineering of *L*-tyrosine production in *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78: 89–98.
- [24] Lin Y, Sun X, Yuan Q, *et al.* Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli* [J]. Metab Eng, 2014, 23: 62–69.
- [25] Lin Y, Shen X, Yuan Q, *et al.* Microbial biosynthesis of the anticoagulant precursor 4-hydroxycoumarin [J]. Nat Commun, 2013, 4: 2603.
- [26] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, *et al.* Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux [J]. Nat Biotechnol, 2009, 27: 753–759.
- [27] Delebecque CJ, Aldayel FA. Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies [J]. Science, 2011, 333: 470–474.
- [28] Conrado RJ, Wu GC, Boock JT, *et al.* DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40: 1879–1889.
- [29] Wang Y, Yu O. Synthetic scaffolds increased resveratrol biosynthesis in engineered yeast cells [J]. J Biotechnol, 2012, 157: 258–260.
- [30] Na D, Yoo SM, Chung H, Park H, *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs [J]. Nat Biotech, 2013, 31: 170–174.
- [31] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. Science, 2014, 346(6213): 1258096–1258096.
- [32] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, *et al.* Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems [J]. Nucl Acids Res, 2013, 41: 4336–4343.
- [33] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, *et al.* Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production [J]. Science, 2006, 314: 1565–1568.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



刘少奇, 硕士研究生, 主要研究方向为分子生物学。

E-mail: 1074300734@qq.com



耿娜, 硕士研究生, 主要研究方向为分子生物学。

E-mail: gengna@mail.buct.edu.cn



袁其朋, 博士, 教授, 主要研究方向为天然活性成分的生物合成与高效分离。

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn