

## 平台化学品短链支链脂肪酸和短链支链醇的微生物代谢工程

于爱群\* 庞亚如 胡智慧 肖冬光

(天津科技大学生物工程学院 省部共建食品营养与安全国家重点实验室 工业发酵微生物教育部重点实验室  
天津市工业微生物重点实验室 天津 300457)

**摘要:** 短链支链脂肪酸和短链支链醇均为重要的平台化学品,是合成多种高附加值产品的前体物质,市场需求巨大。目前两者的生产主要是利用基于石化原料的化学合成法。化学合成法存在着严重依赖化石燃料、反应效率低以及极易造成环境污染等缺点。微生物代谢工程的快速发展为这些平台化学品的生产提供了一条极具潜力的生物合成路线。利用微生物代谢工程技术构建生产这些平台化学品的微生物细胞工厂具有绿色清洁、可持续发展和经济效益好等独特优势。本文系统综述了近年来微生物代谢工程技术在短链支链脂肪酸和短链支链醇合成方面的研究进展,包括所涉及的宿主菌株、关键酶、代谢途径及其改造等,并探讨了未来的发展前景。

**关键词:** 短链支链脂肪酸,短链支链醇,平台化学品,代谢工程

## Advances in metabolic engineering for the microbial production of short branched-chain fatty acids and short branched-chain alcohols

YU Ai-Qun\* PANG Ya-Ru HU Zhi-Hui XIAO Dong-Guang

(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Short branched-chain fatty acids and short branched-chain alcohols (SBCFAs and SBCAs, C4–6) serve as versatile platform chemicals for the chemical industry. They are commonly used as starting materials or building blocks to produce a wide range of valuable end products in chemical, food and pharmaceutical industries. Therefore, there is a huge demand for such platform chemicals in the global market. Currently, SBCFAs and SBCAs are predominantly produced through traditional chemical synthesis. However, these chemical conversion processes are heavily dependent on fossil fuels and always lead to serious environmental pollution. Moreover, the efficiency of these processes is often low. Recently, rapid

**Foundation items:** Natural Science Foundation of Tianjin City (17JCYBJC40800); Research Foundation of Tianjin Education Committee (2017ZD03); Startup Fund for “Haihe Young Scholars” of Tianjin University of Science and Technology (1185/10278); Open Fund of Ministry of Education Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Nankai University

\*Corresponding author: Tel: 86-22-60602723; E-mail: yuaiqun@tust.edu.cn

**Received:** March 08, 2017; **Accepted:** May 18, 2017; **Published online** (www.cnki.net): May 25, 2017

**基金项目:** 天津市自然科学基金绿色通道项目(17JCYBJC40800); 天津市教委科研计划项目重点项目(2017ZD03); 天津科技大学“海河学者”培育计划引进人才基金(1185/10278); 南开大学分子微生物学与技术教育部重点实验室开放课题

\*通信作者: Tel: 86-22-60602723; E-mail: yuaiqun@tust.edu.cn

**收稿日期:** 2017-03-08; **接受日期:** 2017-05-18; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-05-25

developments in metabolic engineering of microbes provide a promising alternative to produce these platform chemicals. These bio-based manufacturing systems using microbial cell factories will help move the industrial production of SBCFAs and SBCAs towards more sustainable, environmentally friendly and economically competitive. Here, we reviewed the current status of metabolic engineering of microbes that produce SBCFAs and SBCAs including microbial hosts, key enzymes, metabolic pathways and engineering of SBCFA/SBCA biosynthesis. Furthermore, key challenges and future perspectives were discussed.

**Keywords:** Short branched-chain fatty acids, Short branched-chain alcohols, Platform chemicals, Metabolic engineering

短链支链脂肪酸(Short branched-chain fatty acids, SBCFAs)是指链长在4–6个碳原子且碳骨架上含有一两个支链(主要是甲基)的脂肪酸。短链支链醇(Short branched-chain alcohols, SBCAs)是指链长在4–6个碳原子且碳骨架上含有一两个支链(主要是甲基)的醇类化合物。由于短链支链脂肪酸和短链支链醇分别含有活性官能团羟基(–OH)和羧基(–COOH),因此它们可以作为重要的化学合成前体,被广泛应用于化工、食品和医药等领域<sup>[1]</sup>。以这两种平台化合物为原料可以制备合成一系列具有高附加值的产品,如燃料、材料、香料、药品及精细化学品等。因此,国内外市场对于短链支链脂肪酸和短链支链醇的需求正在不断扩大,预计2020年异丁酸和异丁醇的全球市场规模将分别超过3亿和10亿美元。

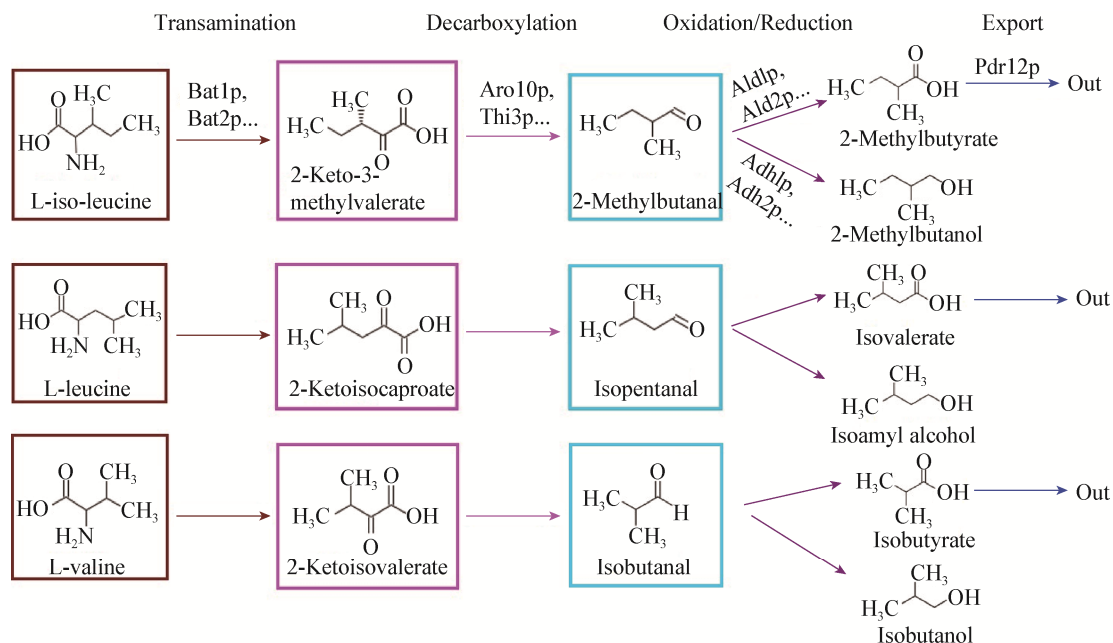
短链支链脂肪酸和短链支链醇的工业生产目前主要是通过化学合成法实现的。然而,传统的化学合成法存在诸多弊端,例如需要采用高温、高压条件和昂贵的催化剂,而且生产设备复杂、原料利用率低、环境污染严重。例如,异丁醇主要的生产方法是在镍的催化下由异丁醛加氢而得,异丁酸主要的生产方法是由异丁醇氧化而得;在生产过程中都要消耗大量的能源,同时产生废气、废水等污染物。近些年来,利用微生物代谢工程技术生产短链支链脂肪酸和短链支链醇已经成为一个研究热点。相比化学合成法,这种生物转化法具有不需要消耗化石燃料资源、反应条件温和、底物转化率高等优点,是典型的对环境友好型清洁生产技术,因此具有广阔的发展前景。本文系统总结了代谢工程技术在微生物法生产短链支链脂肪酸和短链支链醇中的应用,包括所涉及的宿主菌株、关键酶和代谢途径,尤其重点介绍了代谢网络改造思路。最后,本

文展望了利用代谢工程技术构建短链支链脂肪酸和短链支链醇生产菌的未来发展趋势。

## 1 短链支链脂肪酸和短链支链醇的生物合成途径

1904年,德国生物化学家Felix Ehrlich首次分离纯化得到支链氨基酸——异亮氨酸并确定了其分子结构。随后,Ehrlich推测2-甲基-1-丁醇(短链支链醇)来自于前体物质L-异亮氨酸(支链氨基酸)的分解代谢。接下来,科学家们用一系列实验证明了Ehrlich所作出的预测是正确的<sup>[2–4]</sup>。因此,在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中首先发现的由支链氨基酸生成短链支链脂肪酸和短链支链醇的代谢途径就被命名为Ehrlich途径(图1)。在Ehrlich途径中,支链氨基酸[异亮氨酸(Isoleucine)、亮氨酸(Leucine)和缬氨酸(Valine)]首先通过转氨基作用被转化成相应的 $\alpha$ -酮酸[3-甲基-2-氧代戊酸(2-Keto-3-methylvalerate)、4-甲基-2-氧代戊酸(2-Ketoisocaproate)和3-甲基-2-氧代丁酸(2-Ketoisovalerate)];然后,这些 $\alpha$ -酮酸经脱羧基作用生成相应的醛类[2-甲基正丁醛(2-Methylbutanal)、异戊醛(Isopentanal)和异丁醛(Isobutanal)];最后,这些醛类被氧化成相应的短链支链脂肪酸[2-甲基丁酸(2-Methylbutyrate)、异戊酸(Isovalerate)和异丁酸(Isobutyrate)],或者被还原成短链支链醇[2-甲基-1-丁醇(2-Methylbutanol)、异戊醇(Isoamyl alcohol)和异丁醇(Isobutanol)]<sup>[5]</sup>。

目前,酿酒酵母Ehrlich途径中的3步反应以及催化这3步反应的关键酶已被研究得较为清楚,3种关键酶分别为转氨酶、脱羧酶、醇脱氢酶/醛脱氢酶。在酿酒酵母中发现至少存在4个酶能够行使

图 1 酿酒酵母的 Ehrlich 途径<sup>[5]</sup>Figure 1 Ehrlich pathway of *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[5]</sup>

支链氨基酸转氨酶的功能, 催化 Ehrlich 途径中的第 1 步反应(转氨作用)。这 4 个酶分别为 Bat1p (又称为 Twt1p 或 Eca39p)、Bat2p (又称为 Twt2p 或 Eca40p)、Aro8p 和 Aro9p。其中, Bat1p 和 Bat2p 为支链氨基酸转氨酶。Bat1p 存在于线粒体中, 该酶在对数生长期表现为快速表达并大量积累, 进入稳定期后其表达受到抑制; 而 Bat2p 位于细胞质中, 该酶在对数生长期并不合成, 进入稳定期后才开始合成并大量积累<sup>[6-7]</sup>。与 Bat1p 和 Bat2p 相比, Aro8p 和 Aro9p 具有更广泛的底物特异性, 比如它们同时还具有芳香族氨基酸转氨酶的功能<sup>[8]</sup>。目前在酿酒酵母中发现至少存在 5 个酶能够行使  $\alpha$ -酮酸脱羧酶的功能, 催化 Ehrlich 途径中的第 2 步反应(脱羧作用)。这 5 个酶分别为 Aro10p、Thi3p、Pdc1p、Pdc5p 和 Pdc6p, 焦磷酸硫胺素作为这些脱羧酶的辅酶参与  $\alpha$ -酮酸的氧化脱羧反应。Pdc1p、Pdc5p 和 Pdc6p 同时还具有丙酮酸脱羧酶的功能<sup>[9-12]</sup>。其中, Aro10p、Pdc1p、Pdc5p 和 Pdc6p 存在于细胞质中; Thi3p 则既存在于细胞核中, 也存在于细胞质中; Thi3p 在 4-甲基-2-氧代戊酸的脱羧过程中起到了主要作用; Pdc1p、Pdc5p

和 Pdc6p 被证实均具有 3-甲基-2-氧代丁酸脱羧酶的活性; Aro10p、Thi3p、Pdc1p、Pdc5p 和 Pdc6p 被证实均能够行使 3-甲基-2-氧代戊酸脱羧酶的功能。目前在酿酒酵母中发现至少存在 15 个醇脱氢酶和 6 个醛脱氢酶, 催化 Ehrlich 途径中的第 3 步反应(氧化还原作用)。其中, 在正常培养条件下, Ehrlich 途径中醇脱氢酶的活性显著高于醛脱氢酶的活性<sup>[13]</sup>; 以葡萄糖为限制性底物时, Ehrlich 途径中醛脱氢酶的活性则显著高于醇脱氢酶的活性<sup>[14-15]</sup>。醇脱氢酶分别为 Adh1p、Adh2p、Adh3p、Adh4p、Adh5p、Adh6p、Adh7p、Sfa1p、Aad3p、Aad4p、Aad6p、Aad10p、Aad14p、Aad15p 和 Aad16p; 醛脱氢酶分别为 Ald1p、Ald2p、Ald3p、Ald4p、Ald5p 和 Ald6p; 这些酶在 Ehrlich 途径中的具体地位目前尚不明确<sup>[16-18]</sup>。短链支链脂肪酸和短链支链醇合成后, 一部分可以通过单纯扩散的方式由细胞内分泌到细胞外。Pdr12p 是一类 ATP 依赖型膜转运蛋白, 它被证实参与了短链支链脂肪酸由细胞内分泌到细胞外的过程<sup>[19]</sup>, War1p 被证实参与了 *PDR12* 基因的转录激活<sup>[20]</sup>。然而到目前为止, 还没有任何关于短链支链醇转运蛋白的报道。

## 2 短链支链脂肪酸和短链支链醇的代谢工程应用实例

由于市场对于短链支链脂肪酸和短链支链醇的需求日益增加,因此开发生产短链支链脂肪酸和短链支链醇可再生的生物合成法(微生物合成法)来补充甚至代替原有的化学合成法就具有重要的理论意义和应用价值。近年来,代谢工程研究发展迅速,已经成为生命科学领域一个新的研究热点。代谢工程是指有目的性的对细胞代谢途径和代谢网络进行改造,从而实现对细胞代谢过程的定向干预。代谢工程的主要目的是提高原有细胞生产特定目的产物的能力或者构建生产特定目的产物(天然或非天然产物)的全新的细胞工厂。利用代谢工程技术对特定微生物的代谢途径进行改造,研究者们已经成功实现了短链支链脂肪酸和短链支链醇的异源合成(表 1)。短链支链醇属于高级醇类,同时还可以用作生物燃料。由于生物能源的开发成为近些年来国内外的研究热点,所以

更多的研究集中在短链支链醇的生产上。基于生物质资源的平台化学品制造正在成为一个新的研究热点,所以势必很快会有更多相关研究成果出现。现将该方向的最新进展和研究思路进行举例介绍。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是第一个被改造以生产短链支链醇的微生物底盘细胞,也是利用代谢工程手段所构建的短链支链醇微生物细胞工厂中目前产量最高的工程菌株(表 1)。由于大肠杆菌缺少  $\alpha$ -酮酸脱羧酶(催化 Ehrlich 途径的第 2 步反应)和醇脱氢酶(催化 Ehrlich 途径的第 3 步反应),因此并不具有完整的 Ehrlich 途径。要生产短链支链醇,就需要利用代谢工程技术对其代谢途径进行改造。2008 年,Atsumi 等<sup>[35]</sup>在大肠杆菌中引入  $\alpha$ -酮酸脱羧酶和醇脱氢酶,最终成功合成了短链支链醇(异丁醇、2-甲基-1-丁醇和异戊醇)。研究者分别选择了 5 种不同来源的  $\alpha$ -酮酸脱羧酶,包括酿酒酵母的 Pdc6p、Aro10p 和 Thi3p,乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的 2-酮异戊酸脱羧酶

表 1 合成短链支链脂肪酸和短链支链醇的微生物细胞工厂

Table 1 Examples of SBCFAs and SBCAs produced by metabolically engineered microorganisms

产物 Chemical	宿主 Organism	产量 Titer (g/L)	参考文献 References
Isobutanol	<i>E. coli</i>	50.00	[21]
Isobutanol	<i>S. cerevisiae</i>	1.62	[22]
Isobutanol	<i>B. subtilis</i>	2.62	[23]
Isobutanol	<i>C. cellulolyticum</i>	0.66	[24]
Isobutanol	<i>G. thermoglucosidasius</i>	0.60	[25]
Isobutanol	<i>C. thermocellum</i>	5.40	[26]
Isobutanol	<i>S. elongatus</i> PCC7942	0.45	[27]
Isobutanol	<i>R. eutropha</i>	0.85	[28]
Isoamyl alcohol	<i>S. cerevisiae</i>	0.56	[29]
Isoamyl alcohol	<i>C. glutamicum</i>	2.76	[30]
Isoamyl alcohol	<i>E. coli</i>	1.28	[31]
Isoamyl alcohol	<i>R. eutropha</i>	0.57	[28]
2-Methyl-1-butanol	<i>S. cerevisiae</i>	0.16	[29]
2-Methyl-1-butanol	<i>E. coli</i>	1.25	[32]
2-Methyl-1-butanol	<i>C. glutamicum</i>	0.37	[30]
2-Methyl-1-butanol	<i>S. elongatus</i> PCC7942	0.20	[33]
Isobutyrate	<i>S. cerevisiae</i>	0.07	[34]
Isovalerate/2-methylbutyrate	<i>S. cerevisiae</i>	0.32	[34]

(2-Ketoisovalerate decarboxylase, KIVD)和丙酮丁醇梭状芽孢杆菌(*Clostridium acetobutylicum*)的丙酮酸脱羧酶(Pyruvate decarboxylase, PDC), 以及来自酿酒酵母的醇脱氢酶 Adh2p。结果证明, KIVD、Aro10p 和 Pdc6p 均能表现出支链  $\alpha$ -酮酸脱羧酶的活性, 其中 KIVD 的酶活性最强; 再加上醇脱氢酶 Adh2p 的作用, 能够将  $\alpha$ -酮酸(3-甲基-2-氧代丁酸, 3-甲基-2-氧代戊酸, 4-甲基-2-氧代戊酸)分别转化生成相应的短链支链醇(异丁醇, 2-甲基-1-丁醇, 异戊醇); PDC 只能特异性地行使 3-甲基-2-氧代丁酸脱羧酶的功能且活性较低(异丁醇产量低); 而 Thi3p 并未能在大肠杆菌中表现出任何支链  $\alpha$ -酮酸脱羧酶的活性。紧接着, 研究者以共表达 KIVD 和 Adh2p 的大肠杆菌工程菌株作为研究对象, 考察了在其培养基中外源添加  $\alpha$ -酮酸对于短链支链醇终产量的影响。结果发现, 外源添加  $\alpha$ -酮酸能够显著提高相应短链支链醇的产量。这就

说明  $\alpha$ -酮酸是合成短链支链醇的关键中间体, 引导代谢流更多地流向中间产物  $\alpha$ -酮酸, 有望进一步提高菌株合成短链支链醇的能力(图 2)。为了推动代谢流流向 3-甲基-2-氧代丁酸, 大肠杆菌的 *ilvIHCD* 基因簇被过表达, 结果证明 3-甲基-2-氧代丁酸合成量的增加导致终产物异丁醇的产量提高了 5 倍。竞争性基因 *adhE* (Aldehyde-alcohol dehydrogenase gene, 醛/醇脱氢酶基因)、*ldhA* (Lactate dehydrogenase A gene, 乳酸脱氢酶 A 基因)、*frdAB* (Fumarate reductase gene, 延胡索酸还原酶基因)、*fnr* (Regulatory gene for fumarate and nitrate reduction, 延胡索酸和硝酸盐还原调控基因)、*pta* (Phosphate acetyltransferase gene, 磷酸转乙酰酶基因)被敲除后, 能够进一步增大流向 3-甲基-2-氧代丁酸的代谢流, 异丁醇产量也得到进一步增加。用来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 *alsS* (Acetolactate synthase gene, 乙酰乳酸合酶基

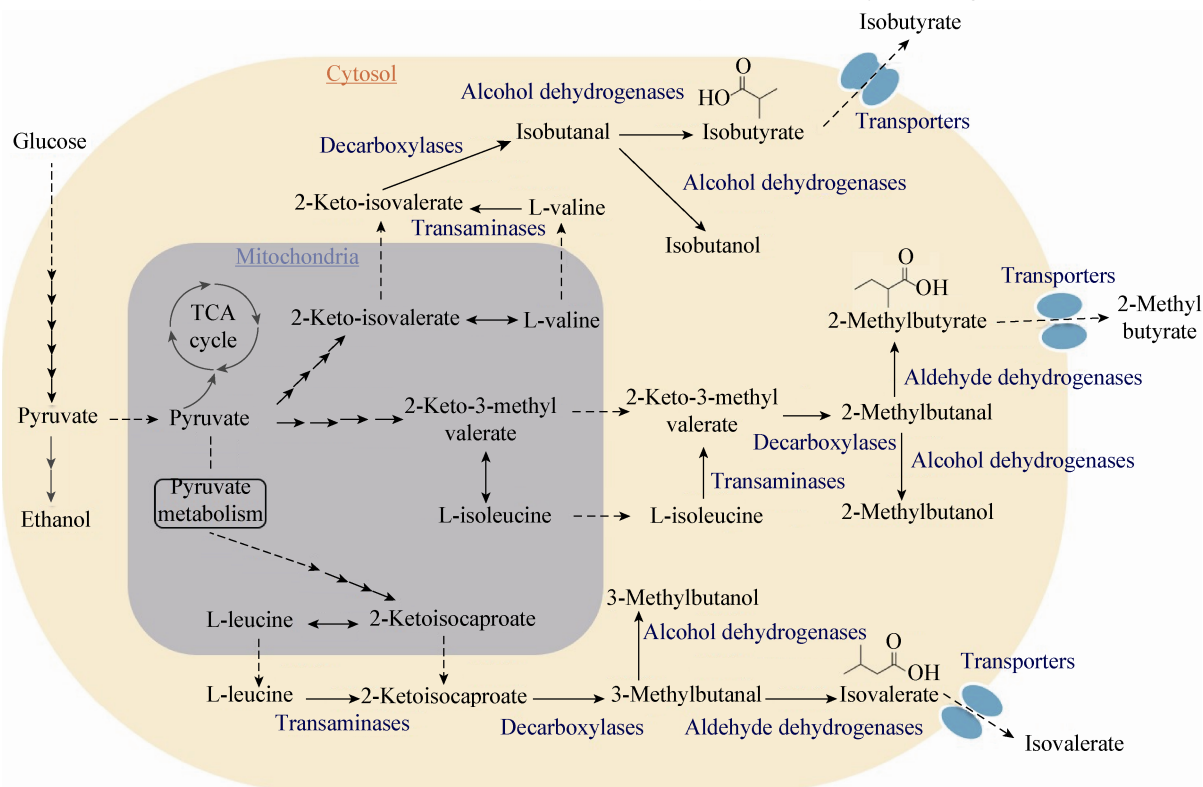


图 2 代谢工程技术改造微生物合成短链支链脂肪酸和短链支链醇的代谢途径

Figure 2 Overview of metabolic pathways that lead to the production of SBCFAs and SBCAs in engineered microbes

因)取代大肠杆菌内源的 *ilvIH* (Acetolactate synthase 3 gene, 乙酰乳酸合酶 3 基因)后, 进一步提高了异丁醇的产量。通过这些策略, 大肠杆菌中异丁醇的最高产量达到 22 g/L<sup>[35]</sup>。随后, Liao 研究组利用代谢工程策略分别进一步增加了前体物 3-甲基-2-氧代戊酸和 4-甲基-2-氧代戊酸的产量, 将终产物 2-甲基-1-丁醇和异戊醇的产量分别提高到 1.25 g/L<sup>[32]</sup>和 1.28 g/L<sup>[31]</sup>。

2011 年, Li 等将异源的 Ehrlich 途径(KIVD 和 Adh2p)引入到枯草芽孢杆菌底盘细胞中, 实现了异丁醇的异源合成。内源基因 *alsS*、*ilvC* (Ketol-acid reductoisomerase gene, 乙酮醇酸还原异构酶基因)、*ilvD* (Dihydroxyacid dehydratase gene, 二羟酸脱水酶基因)被过表达, 因此前体物 3-甲基-2-氧代丁酸的产量得以增加, 异丁醇的终产量达到 2.62 g/L<sup>[23]</sup>。2012 年, Li 等在真养罗氏菌 (*Ralstonia eutropha*)中引入了 Ehrlich 途径的相关基因, 从而构建了由二氧化碳转变生成异丁醇和异戊醇的代谢途径。通过过表达 *alsS*、*ilvCD*、*kivd*、*yqhD* (Aldehyde reductase gene, 醇脱氢酶基因)以及敲除 *phaCIAB1* 基因簇(负责聚三羟基丁酸酯的合成)后, 异丁醇和异戊醇的产量分别为 846 mg/L 和 570 mg/L<sup>[28]</sup>。

与以上表达宿主不同, 酿酒酵母具有完整的 Ehrlich 途径, 因此本身具备催化支链氨基酸代谢生成短链支链脂肪酸和短链支链醇的能力。2012 年, Kondo 等以酿酒酵母作为研究对象进行了异丁醇的生产。研究组选择了 3 种不同来源的  $\alpha$ -酮酸脱羧酶, 包括酿酒酵母的 Aro10p、Thi3p 以及来自乳酸乳球菌的 KIVD。选择了酿酒酵母的 6 个醇脱氢酶, 包括 Adh1p、Adh2p、Adh5p、Adh6p、Adh7p、Sfa1p。组合过表达的结果证明, 当 KIVD 与 Adh6p 同时过表达后, 异丁醇的产量最高。由此可见, 异源 KIVD 的酶活性高于来自酿酒酵母内源的  $\alpha$ -酮酸脱羧酶的活性。

在大肠杆菌中, KIVD 同样表现为酶活性最强。这就说明, 未来如需在其他宿主菌株中构建

异源 Ehrlich 途径时, 来自乳酸乳球菌的 KIVD 是催化 Ehrlich 途径第 2 步反应最理想的候选脱羧酶。在此基础上, 研究者们过表达了 *ILV2* (Acetolactate synthase gene, 乙酰乳酸合酶基因)并敲除了 *PDC1* 来增加前体物 3-甲基-2-氧代丁酸的产量, 以增强终产物异丁醇的生产。通过这些策略, 异丁醇的终产量达到 143 mg/L, 比原始野生型菌株产量提高近 13 倍<sup>[36]</sup>。2013 年, Matsuda 等在过表达 *kivd*、*ADH6* 和 *ILV2* 的基础上, 继续敲除了 *LPD1* (Dihydrolipoyl dehydrogenase gene, 二氢硫辛酸脱氢酶基因)以增加胞内丙酮酸的含量, 并且过表达了 *MAE1* (Malate dehydrogenase gene, 苹果酸脱氢酶基因)以增加辅酶 NADPH 的含量。通过这些策略, 异丁醇在酿酒酵母中的积累量达到 1.62 g/L, 这说明增加前体物丙酮酸和辅酶 NADPH 的积累有助于将代谢流导向目标产物短链支链醇<sup>[22]</sup>。2015 年, Yu 等通过过表达 *BAT1* (转氨酶基因)、*ARO10* ( $\alpha$ -酮酸脱羧酶基因)、*ALD2* (醛脱氢酶基因)和 *ALD6* (醛脱氢酶基因), 同时敲除 *ADH6* (醇脱氢酶基因)后, 酿酒酵母中短链支链脂肪酸(2-甲基丁酸、异戊酸、异丁酸)的总产量提高了 31 倍, 达到 387.4 mg/L。这也是第一篇利用代谢工程技术提高微生物中短链支链脂肪酸产量的报道<sup>[34]</sup>。值得注意的是, 强化酿酒酵母 Ehrlich 途径的第一步反应(过表达转氨酶基因 *BAT1*), 同样能够显著提高终产物短链支链脂肪酸的产量。而且作者成功验证了强启动子替换技术在提高酿酒酵母短链支链脂肪酸产量方面的显著作用; 同时证明了对于含有多步反应的 Ehrlich 途径, 基因的组合过表达是提高产物产量的有效策略, 这与 Kondo 的实验结论一致<sup>[36]</sup>。同时, 研究者发现过表达转运蛋白 Pdr12p 后, 短链支链脂肪酸由胞内分泌到胞外的速度明显提高, 后续可以利用蛋白质定向进化手段进一步提高该转运蛋白的效率和特异性。

### 3 结语和展望

由此可见, 短链支链脂肪酸和短链支链醇的



合成途径——Ehrlich 途径已经在不同底盘细胞中成功实现了同源或异源重构。目前利用代谢工程技术生产短链支链醇的研究主要集中在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母等模式菌株中,但是代谢工程技术应用在短链支链脂肪酸生产的研究报道还不多见,有待于进一步开展。

虽然 Ehrlich 途径已经在多种微生物宿主细胞中实现了异源表达,但总的来说,短链支链脂肪酸和短链支链醇在所构建的微生物细胞工厂中的产量还远没有达到工业化生产的要求。一方面,为短链支链脂肪酸和短链支链醇的生物合成寻找新的代谢途径以及新的、更理想的宿主菌株将是一个很好的研究方向,期望借此可以找到代谢通路与微生物宿主之间的最大兼容性。其次,代谢工程技术的革新是进一步提高微生物细胞工厂中短链支链脂肪酸和短链支链醇产量的基础。当前,短链支链脂肪酸和短链支链醇的生产主要还是依赖于传统意义上的代谢工程,即针对生物体特定代谢途径的改造,目前成功运用的代谢工程策略,包括通过基因过表达引导代谢流更多更快地流向目的产物积累的方向,通过多基因协同作用来实现目的产物产量最大化,通过基因敲除来降低或切断支路代谢途径,通过过表达特异性转运蛋白来促进代谢产物由胞内分泌到胞外以及辅因子工程策略,这些策略的综合应用已经在一定程度上提高了短链支链脂肪酸和短链支链醇的产量。未来的代谢工程技术需要更注重利用特定代谢途径之间的关系来控制胞内代谢流的流向。利用基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学和代谢流组学等多组学技术,帮助我们更深入了解微生物宿主细胞中复杂的代谢网络、基因调控网络、蛋白质相互作用网络和信号传导网络。这些基础理论知识的获得必将极大推动短链支链脂肪酸和短链支链醇代谢工程技术的快速发展和广泛应用。

最后, Ehrlich 途径中相关基因的表达调控机制

尚不明确,因此需要分别在转录水平、转录后水平、翻译水平和翻译后水平进一步研究 Ehrlich 途径的精细调控。对 Ehrlich 途径中相关酶三维结构的解析,将有助于了解各个酶的催化作用机理。目前,研究者们把酿酒酵母中 Ehrlich 途径的功能认定为只是生产杂酸(如短链支链脂肪酸)和杂醇(如短链支链醇),因此 Ehrlich 途径在整个代谢网络中的具体功能和地位目前尚不清楚,有待于进一步阐明。以上这些问题的解决能够帮助我们更理性地设计和利用代谢工程技术改造微生物,以提高短链支链脂肪酸和短链支链醇的产量,也为最终实现利用微生物细胞工厂大规模工业化生产短链支链脂肪酸和短链支链醇提供重要的理论指导。

## REFERENCES

- [1] Jang YS, Kim B, Shin JH, et al. Bio-based production of C2-C6 platform chemicals[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(10): 2437-2459
- [2] Lampitt LH. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemical Journal*, 1919, 13(4): 459-486
- [3] Thorne RSW. The assimilation of nitrogen from amino-acids by yeast[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 1937, 43(4): 288-293
- [4] Thorne RSW. The growth and fermentation of a strain of *S. cerevisiae* with amino acids as nutrients[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 1941, 47(5): 255-272
- [5] Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJA, et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2259-2266
- [6] Eden A, Simchen G, Benvenisty N. Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(34): 20242-20245
- [7] Kispal G, Steiner H, Court DA, et al. Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the *myc* oncogene-regulated Eca39 protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(40): 24458-24464
- [8] Iraqui I, Vissers S, Cartiaux M, et al. Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily[J]. *Molecular and General Genetics* MGG, 1998, 257(2): 238-248
- [9] Ter Schure EG, Flikweert MT, van Dijken JP, et al. Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(4): 1303-1307
- [10] Hohmann S. *PDC6*, a weakly expressed pyruvate decarboxylase gene from yeast, is activated when fused spontaneously under the

- control of the *PDC1* promoter[J]. *Current Genetics*, 1991, 20(5): 373-378
- [11] Hohmann S. Characterisation of *PDC2*, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and General Genetics* MGG, 1993, 241(5): 657-666
- [12] Hohmann S, Cederberg H. Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes *PDC1* and *PDC5*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1990, 188(3): 615-621
- [13] Dickinson JR, Salgado LE, Hewlins MJ. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(10): 8028-8034
- [14] Vuralhan Z, Luttk MA, Tai SL, et al. Physiological characterization of the *ARO10*-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(6): 3276-3284
- [15] Vuralhan Z, Morais MA, Tai SL, et al. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4534-4541
- [16] Ford G, Ellis EM. Characterization of Ypr1p from *Saccharomyces cerevisiae* as a 2-methylbutyraldehyde reductase[J]. *Yeast*, 2002, 19(12): 1087-1096
- [17] Hauser M, Horn P, Tournu H, et al. A transcriptome analysis of isoamyl alcohol-induced filamentation in yeast reveals a novel role for Gre2p as isovaleraldehyde reductase[J]. *FEMS Yeast Research*, 2007, 7(1): 84-92
- [18] Boer VM, Tai SL, Vuralhan Z, et al. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures[J]. *FEMS Yeast Research*, 2007, 7(4): 604-620
- [19] Hazelwood LA, Tai SL, Boer VM, et al. A new physiological role for Pdr12p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism[J]. *FEMS Yeast Research*, 2006, 6(6): 937-945
- [20] Kren A, Mamnun YM, Bauer BE, et al. War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(5): 1775-1785
- [21] Baez A, Cho KM, Liao JC. High-flux isobutanol production using engineered *Escherichia coli*: a bioreactor study with *in situ* product removal[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(5): 1681-1690
- [22] Matsuda F, Ishii J, Kondo T, et al. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1): 119
- [23] Li SS, Wen JP, Jia XQ. Engineering *Bacillus subtilis* for isobutanol production by heterologous Ehrlich pathway construction and the biosynthetic 2-ketoisovalerate precursor pathway overexpression[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(3): 577-589
- [24] Higashide W, Li YC, Yang YF, et al. Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for production of isobutanol from cellulose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(8): 2727-2733
- [25] Lin PP, Rabe KS, Takasumi JL, et al. Isobutanol production at elevated temperatures in thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 1-8
- [26] Lin PP, Mi L, Morioka AH, et al. Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 31: 44-52
- [27] Atsumi S, Higashide W, Liao JC. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(12): 1177-1180
- [28] Li H, Ogenorth PH, Wernick DG, et al. Integrated electromicrobial conversion of CO<sub>2</sub> to higher alcohols[J]. *Science*, 2012, 335(6076): 1596
- [29] Yuan JF, Chen X, Mishra P, et al. Metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced isoamyl alcohol production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(1): 465-474
- [30] Vogt M, Brüsseler C, van Ooyen J, et al. Production of 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol in engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 436-445
- [31] Connor MR, Liao JC. Engineering of an *Escherichia coli* strain for the production of 3-methyl-1-butanol[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(18): 5769-5775
- [32] Cann AF, Liao JC. Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(1): 89-98
- [33] Shen CR, Liao JC. Photosynthetic production of 2-methyl-1-butanol from CO<sub>2</sub> in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 and characterization of the native acetohydroxyacid synthase[J]. *Energy & Environmental Science*, 2012, 5(11): 9574-9583
- [34] Yu AQ, Juwono NK, Foo JL, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the overproduction of short branched-chain fatty acids[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 34: 36-43
- [35] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels[J]. *Nature*, 2008, 451(7174): 86-89
- [36] Kondo T, Tezuka H, Ishii J, et al. Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 159(1/2): 32-37