

微生物合成白藜芦醇的研究进展

王长松 赵莹 赵广荣*

(天津大学 化工学院 制药工程系 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300072)

摘要: 白藜芦醇是植物源的多酚化合物, 具有清除自由基、抗氧化、延长寿命等生理活性, 在医药、保健品、化妆品等方面有着广阔的应用前景。目前, 白藜芦醇主要采用植物提取的方法, 对自然植物资源依赖严重, 而且受植物成分含量和提取效率低的限制。近年来, 合成生物学的迅速发展已使人们将注意力转向利用微生物合成白藜芦醇。通过在微生物中转入外源基因, 成功构建出了白藜芦醇工程菌株, 并从基因序列、组合方式及发酵工艺等方面进行了优化改造。本文综述了微生物合成白藜芦醇的研究进展。

关键词: 白藜芦醇, 生物合成, 重组工程菌

Advances on resveratrol production of engineered microorganisms

WANG Chang-Song ZHAO Ying ZHAO Guang-Rong*

(Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Resveratrol, a plant-derived polyphenolic compound, has significant physiological activities, including scavenging free radicals, antioxidant and extending lifespan. It has a pleasing market for health products, cosmetics and medicines. At present, resveratrol is mainly extracted from plant, which is limited by the low concentration and extraction efficiency. The rapid development of synthetic biology gives a new approach to produce resveratrol using microorganisms. Resveratrol has been biosynthesized through introducing exogenous genes into microorganisms. Moreover, the recombinant strains are optimized in encoding sequences and combination of genes with suitable fermentation process control. This paper outlines the research achievement on resveratrol production in engineered microorganisms.

Keywords: Resveratrol, Biosynthesis, Recombinant microorganisms

白藜芦醇(3,4',5-三羟基-反式-二苯乙烯, Resveratrol, 图 1)是一种非黄酮类多酚化合物, 存在于虎杖、葡萄、花生等 70 余种植物中, 是植物处于逆境下产生的一种植物抗毒素。白藜芦醇由于

“法国悖论”而受到人们的关注, 对其生理活性进行了大量研究。白藜芦醇可清除自由基^[1], 抑制由活性氧引起的脂质过氧化和脂蛋白修饰^[2], 从而起到对心血管系统的保护作用。白藜芦醇通过调节

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA02A701); 天津市自然科学基金重点项目(No. 13JCZDJC27600)

*通讯作者: Tel: 86-22-87401546; ✉: grzhao@tju.edu.cn

收稿日期: 2013-03-09; 接受日期: 2013-04-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-25

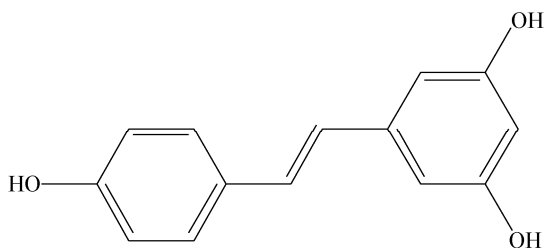


图1 白藜芦醇分子式

Figure 1 Structure of *trans*-resveratrol

转录因子^[3]、控制小 RNA 表达^[4]等机理表现出抗癌活性^[5]。有报道认为白藜芦醇具有延缓衰老的作用^[6],可以延长酵母^[7]、果蝇^[8]、线虫^[9]和小鼠^[10]的寿命。由于白藜芦醇具有诸多上述有益健康的生理作用,它在保健食品、化妆品、药品等方面有着广泛的应用前景。

到目前为止,从植物中提取仍是白藜芦醇最主要的生产方法。国外主要从葡萄皮和葡萄籽中提取,而国内则从中药材虎杖中提取。我国是目前白藜芦醇植物提取的主要生产国家^[11]。由于植物中含量低,提取白藜芦醇面临原料来源、生产能力、季节和地区等问题的限制。化学合成白藜芦醇步骤过于复杂,而且污染严重,不具有应用价值。近年来合成生物学在微生物合成植物源化合物方面取得了重要进展^[12-13],特别是2009年丹麦Fluxome公司使用酵母合成白藜芦醇,其产品于2011年3月通过了GRAS (Generally recognized as safe)认证(<http://www.naturalproductsinsider.com/news/2011/03/fluxome-resveratrol-affirmed-gras.aspx>),使人们越来越多地重视利用微生物合成白藜芦醇。本文综述了国内外在微生物合成白藜芦醇研究中取得的进展。

1 白藜芦醇的生物合成途径

植物中白藜芦醇的生物合成途径属于苯丙烷途径。如图2所示,以苯丙氨酸为底物,经苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)催化,或以酪氨酸为底物,酪氨酸解氨酶(TAL)催化生成对香豆酸,再经4-香豆酰辅酶A连接酶

(4CL)、二苯乙烯合酶(STS),最终生成白藜芦醇。其中苯丙氨酸可以通过苯丙氨酸羟化酶(PAH)催化,实现苯丙氨酸到酪氨酸的转化。STS是白藜芦醇合成的关键步骤,它催化白藜芦醇的合成过程属于聚酮合成途径,需要3个丙二酰辅酶A分子提供碳原子形成苯环,因此,丙二酰辅酶A也是合成白藜芦醇必需的底物。在白藜芦醇生物合成过程中因C4H属于P450酶系,很难在原核微生物中实现异源表达,因此,研究较多的是由酪氨酸或对香豆酸为前体,经生物转化合成白藜芦醇。

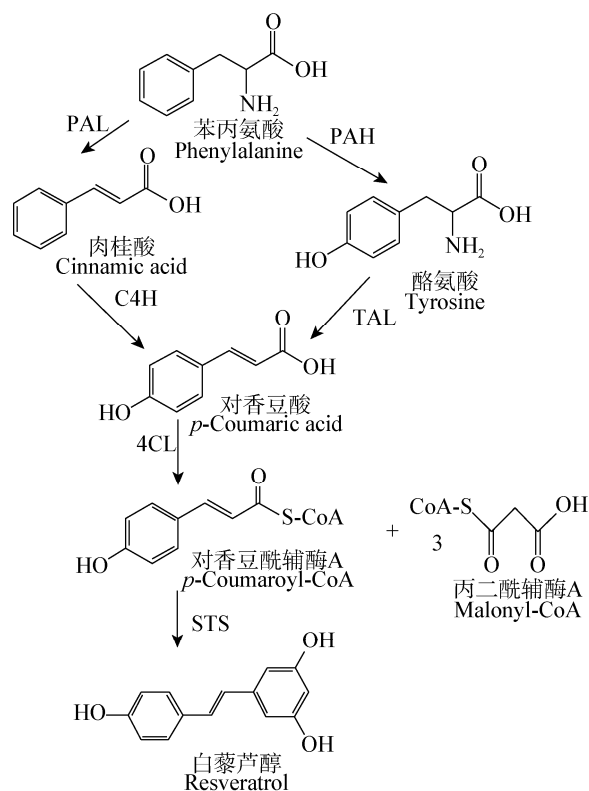


图2 白藜芦醇的生物合成途径

Figure 2 Metabolic pathway of *trans*-resveratrol

注: PAL: 苯丙氨酸解氨酶; C4H: 肉桂酸-4-羟化酶; PAH: 苯丙氨酸羟化酶; TAL: 酪氨酸解氨酶; 4CL: 4-香豆酰辅酶A连接酶; STS: 二苯乙烯合酶。

Note: PAL: Phenylalanine ammonia lyase; C4H: Cinnamate-4-hydroxylase; PAH: Phenylalanine hydroxylase; TAL: Tyrosine ammonia lyase; 4CL: Coumaroyl-CoA ligase; STS: Stilbene synthase.

2 重组工程菌合成白藜芦醇

由于基因操作方法与工具的限制,目前多使用大肠杆菌或酿酒酵母构建白藜芦醇重组工程菌株。由于构建重组菌株添加前体的不同,需要对白藜芦醇生物合成途径中的 *PAL*、*C4H*、*TAL*、*4CL*、*STS* 基因进行有效组合。近年来微生物合成白藜芦醇的主要研究结果如表 1 所示。

2.1 重组酵母菌合成白藜芦醇

Backer 等^[24]第一次报道了利用酿酒酵母合成白藜芦醇,在酿酒酵母 FY23 中表达杨树(*Hybrid poplar*) *4CL* 基因和葡萄 *STS* 基因,添加对香豆酸前体,得到 1.5 $\mu\text{g/L}$ 的白藜芦醇。Ververidis 等^[23]在酿酒酵母中引入了大豆 *C4H* 和 *4CL* 基因及葡萄 *STS* 基因,添加苯丙氨酸前体,得到 0.29 mg/L 的白藜芦醇。Boles 等^[20]在巴西蔗糖发酵工业酵母菌株中引入拟南芥 *4CL* 基因和葡萄 *STS* 基因,在营养丰富的天然培养基中白藜芦醇的产量达到 391 mg/L,是目前已报道文献中重组酵母菌株的最高产量。

2.2 重组大肠杆菌合成白藜芦醇

Katsuyama 等^[16]用 T7 启动子驱动深红酵母(*Rhodotorula rubra*) *PAL* 基因和紫草(*Lithospermum erythrorhizon*) *4CL* 基因及花生 *STS* 基因在大肠杆菌中表达,添加酪氨酸前体,白藜芦醇产量为 37 mg/L。Beekwilder 等^[15]在大肠杆菌中表达烟草(*Nicotiana tabacum*) *4CL* 和葡萄 *STS* 基因,添加对香豆酸前体,白藜芦醇产量为 20 mg/L。Watts 等^[14]在大肠杆菌中表达拟南芥 *4CL* 和花生 *STS* 基因,添加对香豆酸前体,白藜芦醇产量达到 104.5 mg/L。

2.3 重组酵母菌株与重组大肠杆菌合成白藜芦醇的比较

由于使用基因的来源、宿主菌株、表达强度、培养方式等不同,不同研究者得到的最终白藜芦醇产量也不尽相同,相同的基因在大肠杆菌和酵母中对白藜芦醇产量的影响也不相同。如 Beekwilder 等^[15]克隆了烟草 *4CL* 基因和葡萄 *STS* 基因,分别在大肠杆菌和酿酒酵母中表达,以相同浓度的对香

豆酸为前体,白藜芦醇的产量分别为 12–20 mg/L 和 5.8 mg/L。众多的研究结果显示,表达相同基因的重组大肠杆菌合成白藜芦醇的产量约为酵母的 3 倍左右,其原因尚不清楚。

重组大肠杆菌作为工程菌株具有遗传背景简单,基因操作容易,培养时间短,产量相对较高等优势,但大肠杆菌中表达 *TAL/PAL* 酶活性低、专一性差,是提高白藜芦醇产量的限制性因素。酿酒酵母为真核生物,其可以表达植物来源的 *C4H* 基因并具有功能。同时,酿酒酵母在生物安全方面的优势是大肠杆菌不可比拟的,但目前在重组酵母菌株中白藜芦醇产量较低,需要进一步优化改造。总之,利用重组大肠杆菌或酿酒酵母生产白藜芦醇具有各自的优缺点。随着合成生物学技术的迅速进步,使用微生物合成白藜芦醇将逐步实现工业化。

3 重组工程菌合成白藜芦醇的优化策略

虽然重组菌株能够合成白藜芦醇,但产量仍然较低。需要对重组菌株进行一系列的优化探索,提高其产量。

3.1 对基因密码进行优化

在重组菌株中引入的合成白藜芦醇相关基因属于外源基因,存在密码子偏好性等问题,因此,需要对编码序列进行优化,以实现在宿主菌中的高效表达。Lim 等^[17]对植物源的 *STS* 基因进行密码子优化后全合成,使其在大肠杆菌中高效表达。在 Zhang 等的研究工作中,由于球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)的 *TAL* 基因在酿酒酵母中虽能够被翻译却没有功能^[21],Wang 等^[25]对此基因序列按照酿酒酵母的密码子偏好性进行了重新设计,成功地实现了在酿酒酵母中由酪氨酸合成白藜芦醇。

3.2 选择不同来源基因进行组合

Lim 等^[17]对比了来自葡萄、花生、虎杖、松叶兰(*Psilotum nudum*)、马尾松(*Pinus massoniana*)、北美乔松(*Pinus strobes*)、日本红松(*Pinus densiflora*)的 *STS* 基因,发现只有葡萄、花生、马尾松、北美

乔松的 *STS* 能在大肠杆菌中表达出有活性的蛋白，并且葡萄和花生的 *STS* 酶活性明显高于其他两个 *STS* 酶。选用葡萄和花生 *STS* 基因与香芹或拟南芥中的 *4CL* 基因进行组合，同时采用了 T7 和 lac 两种启动子，在大肠杆菌 BL21 和 BW27784 中分别进行了发酵检测。结果表明，在 BW27784 中使用一个 lac 启动子同时表达拟南芥 *4CL* 基因和葡萄 *STS* 基因时，白藜芦醇的产量最高，达到 1 380 mg/L。

表 1 重组工程菌合成白藜芦醇 Table 1 Biosynthesis of resveratrol in recombinant microorganisms							
宿主菌株 Strains	引入基因及来源 Introduced genes and origin	启动子 Promoter	添加底物及浓度 Substrate concentration (mmol/L)	发酵方式 Way of fermentation	培养基 Medium	产量 Yield (mg/L)	参考文献 References
<i>E. coli</i> BW27784	<i>4CL</i> (拟南芥) <i>STS</i> (花生)	lac	对香豆酸 1	摇瓶发酵	M9	104.50	[14]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>4CL</i> (烟草) <i>STS</i> (葡萄)	T7	对香豆酸 5	摇瓶发酵	2*YT	12.00–20.00	[15]
<i>E. coli</i> BLR(DE3)	<i>PAL</i> (深红酵母) <i>STS</i> (花生)	T7	酪氨酸 3	菌体转化	M9	37.00	[16]
<i>E. coli</i> BW27784	<i>4CL</i> (紫草) <i>4CL</i> (拟南芥) <i>STS</i> (葡萄)	GAP	对香豆酸 15	菌体转化	YM9	2 390.00	[17]
<i>E. coli</i> BLR(DE3)	<i>4CL</i> (紫草) <i>STS</i> (花生)	T7	对香豆酸 1	菌体转化	M9	171.00	[18]
<i>E. coli</i> C41(DE3)	<i>TAL</i> (西班牙糖丝菌) <i>CCL</i> (天蓝色链霉菌) <i>STS</i> (花生)	T7	酪氨酸 2	菌体转化	M9	1.40	[19]
<i>S. cerevisiae</i>	<i>4CL</i> (烟草) <i>STS</i> (葡萄)	GAL1 GAL10	对香豆酸 5	摇瓶发酵	YNB	5.80	[20]
<i>S. cerevisiae</i> WAT11	<i>4CL</i> (拟南芥) <i>STS</i> (葡萄)	GAL	对香豆酸 0.073	菌体转化	SD	5.35	[21]
<i>S. cerevisiae</i> W303-1A	<i>4CL</i> (拟南芥) <i>STS</i> (花生)	GPD PGK	对香豆酸 0.093	摇瓶发酵	YPD	3.10	[22]
<i>S. cerevisiae</i> YPH499	<i>PAL</i> (杨树) <i>C4H</i> (大豆) <i>4CL</i> (大豆) <i>STS</i> (葡萄)	GAL1 GAL10	苯丙氨酸 10	摇瓶发酵	CM	0.29	[23]
<i>S. cerevisiae</i> FY23	<i>4CL</i> (杨树) <i>STS</i> (葡萄)	ADH2 ENO2	对香豆酸 0.061	摇瓶发酵	SCDL	1.45×10 ⁻³	[24]
<i>S. cerevisiae</i> WAT11	<i>TAL</i> (球形红细菌) <i>4CL</i> (拟南芥) <i>STS</i> (葡萄)	GAL10 GPD	酪氨酸 0.066	菌体转化	SD	1.90	[25]
<i>S. cerevisiae</i> WAT11	<i>4CL</i> (拟南芥) <i>STS</i> (葡萄)	GAL1	对香豆酸 0.1	菌体转化	SD	14.40	[26]
Industrial yeast	<i>4CL</i> (拟南芥) <i>STS</i> (葡萄)	HXT7	对香豆酸 15	摇瓶发酵	YEPD	391.00	[20]

注：菌体转化为先将菌体培养到一定阶段后收集菌体，再加入底物进行生物合成，此时菌体不再生长。
Note: Bio-catalytic: collecting the bacteria after they have grown to a certain stage, then supplying the substrates to biosynthesize resveratrol and the bacteria have stopped growing.

3.3 优化蛋白的适配比

传统的白藜芦醇代谢途径优化大多是通过 DNA 水平的启动子和 RBS 等基因元件的调节来实现的。而近年来随着对代谢途径优化认识的深入,融合蛋白和蛋白支架等蛋白水平的优化技术也逐渐应用在白藜芦醇的微生物合成上。Zhang 等^[21]在酿酒酵母中,利用 Gly-Ser-Gly 接头将拟南芥 *4CL* 基因和葡萄 *STS* 基因串联表达,形成 *4CL-STS* 的融合蛋白,从而提高催化速率,使白藜芦醇产量达到 5.25 mg/L,比分别表达 *4CL* 和 *STS* 蛋白,白藜芦醇的产量提高了 15 倍。Wang 等^[26]则在酿酒酵母中利用多肽构建蛋白支架,通过 *4CL* 和 *STS* 蛋白 C 端引入的特异性的抗体和抗原片段之间的结合,调控两个蛋白之间的适配比,从而最优化白藜芦醇的合成。优化结果表明,这两个蛋白在支架中的数量对白藜芦醇产量有明显影响,当 *4CL* 和 *STS* 蛋白的数量比为 2:4 时产量可以提高 5 倍,达到 14.4 mg/L。

3.4 提高丙二酰辅酶 A 的合成

丙二酰辅酶 A 是微生物合成脂肪酸的中间代谢物,一般情况下在微生物细胞内含量很少,而合成一分子白藜芦醇需三分子丙二酰辅酶 A 提供碳原子,因此,提高微生物细胞内丙二酰辅酶 A 的合成有利于提高白藜芦醇的产量。一方面可以通过代谢工程手段对宿主细胞进行改造。Katsuyama 等^[18]过表达了谷氨酸棒状杆菌的 *acc* (乙酰辅酶 A 羧化酶)基因,使大肠杆菌合成白藜芦醇的产量达到 171 mg/L;Zha 等^[27]的研究中通过敲除 *ackA* (乙酸激酶)、*pta* (磷酸转乙酰激酶)、*adhE* (乙醇脱氢酶)基因,过表达 *acc*、*acs* (乙酰辅酶 A 合成酶)、*fabF* (β -酮脂酰 ACP 合成酶)基因,使大肠杆菌细胞内的丙二酰辅酶 A 含量提高了 15 倍,使以丙二酰辅酶 A 为底物的根皮酚产量提高了 4 倍。另一方面,添加小分子化合物抑制脂肪酸的合成,也能提高细胞内丙二酰辅酶 A 含量,Lim 等^[17]通过添加浅蓝菌素抑制脂肪酸的合成途径,使白藜芦醇的产量提高了约 1 倍。

3.5 优化发酵工艺

研究发现培养基中碳源对白藜芦醇产量有很大影响。Watts 等^[14]对比了重组菌株在不同碳源培养基中白藜芦醇的产量,在以 1% 的葡萄糖为碳源时,白藜芦醇的产量仅为 3.8 mg/L,而以 0.5% 的甘油为碳源时白藜芦醇的产量可以达到 104.5 mg/L。他们推测可能是由于 *STS* 基因在以葡萄糖为碳源的培养基中表达水平降低所引起的,也可能是由于大肠杆菌在含有葡萄糖的培养基中生长时,苯丙素类化合物(Phenylpropanoids)的转运会受到抑制。两段发酵工艺是基因工程菌培养的常用策略,前期生长获得高密度菌体,然后添加前体(对香豆酸)和诱导剂(IPTG),合成白藜芦醇^[16]。对于植物源的外源基因,前期进行较高温度进行菌体生长,然后降低温度至 26 °C,进行菌体转化,以实现外源基因的可溶性表达^[21]。

4 结论与展望

随着合成生物学的发展,利用微生物生产植物源的化合物已经成为国际发展趋势。白藜芦醇作为苯丙烷类合成途径中的代表,在过去十年间微生物合成白藜芦醇研究中取得了很好的成果。未来微生物合成白藜芦醇将有可能在以下方面取得更大的进步:(1) 由生物质碳源如葡萄糖直接通过微生物合成白藜芦醇。在现有研究工作中均需要添加相应前体才能合成白藜芦醇,如果对宿主细胞进一步改造,提高前体与发酵底物葡萄糖、木糖之间的代谢通量,则可实现白藜芦醇真正意义上的“从头合成”。(2) 基因间的优化组合及表达强度的微调优化。在目前的研究工作中,只是对白藜芦醇合成途径中的 3 个基因的组合和表达强度做了一些优化的探索。如果对外源基因全面组合并进行表达微调,使每个蛋白的表达量达到最适,则白藜芦醇的产量将会有大幅度提高。(3) 实现酶的工程改造。现阶段的研究工作使用天然结构蛋白,存在底物专一性差、酶活性低等问题。随着对酶的不断认识,将会实现人工设计酶分子结构,使酶活性达到最大,从而提高白藜芦醇产量。

参 考 文 献

- [1] Zhao GR, Tian LL, Ma Q, et al. Peroxynitrite scavenging activities of resveratrol and piceid[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2012, 28(6): 953-956.
- [2] Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine[J]. Food Chemistry, 2007, 101(2): 449-457.
- [3] Whitlock NC, Baek SJ. The anticancer effects of resveratrol: modulation of transcription factors[J]. Nutrition and Cancer, 2012, 4(64): 493-502.
- [4] Lancon A, Kaminski J, Tili E, et al. Control of microRNA expression as a new way for resveratrol to deliver its beneficial effects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36): 8783-8789.
- [5] Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes[J]. Science, 1997, 275(5297): 218-220.
- [6] Pan MH, Lai CS, Tsai ML, et al. Molecular mechanisms for anti-aging by natural dietary compounds[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2012, 1(56): 88-115.
- [7] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan[J]. Nature, 2003, 425(6954): 191-196.
- [8] Griswold AJ, Chang KT, Runko AP, et al. Sir2 mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(25): 8673-8678.
- [9] Gruber JAN, Tang SY, Halliwell B. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007, 1100(1): 530-542.
- [10] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet[J]. Nature, 2006, 444(7117): 337-342.
- [11] Donnez D, Jeandet P, Clement C, et al. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(12): 706-713.
- [12] Martin VJ, Pitera DJ, Keasling JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(7): 796-802.
- [13] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KEJ, et al. *Escherichia coli* in isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction[J]. Science, 2010, 330(70): 70-74.
- [14] Watts K, Lee P, Schmidt DC. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. BMC Biotechnology, 2006, 6(22): 1-12.
- [15] Beekwilder J, Wolswinkel R, Jonker H, et al. Production of resveratrol in recombinant microorganisms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5670-5672.
- [16] Katsuyama Y, Funa N, Horinouchi S. Precursor-directed biosynthesis of stilbene methyl ethers in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Journal, 2007, 2(10): 1286-1293.
- [17] Lim CG, Fowler ZL, Hueller T, et al. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10): 3451-3460.
- [18] Katsuyama Y, Funa N, Miyahisa I, et al. Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*[J]. Chemistry & Biology, 2007, 14(6): 613-621.
- [19] Choi O, Wu CZ, Kang SY, et al. Biosynthesis of plant-specific phenylpropanoids by construction of an artificial biosynthetic pathway in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 10(38): 1657-1665.
- [20] Sydor T, Schaffer S, Boles E. Considerable increase in resveratrol production by recombinant industrial yeast strains with use of rich medium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 10(76): 3361-3363.
- [21] Zhang Y, Li SZ, Li J, et al. Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128 (40): 13030-13031.
- [22] Shin SY, Han NS, Park YC, et al. Production of resveratrol from *p*-coumaric acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing 4-coumarate: coenzyme A ligase and stilbene synthase genes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 48(1): 48-53.
- [23] Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2009, 6(11): 355-366.
- [24] Becker JVW, Armstrong GO, Merwe MJ, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol[J]. FEMS Yeast Research, 2003, 4(1): 79-85.
- [25] Wang Y, Halls C, Zhang J, et al. Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(5): 455-463.
- [26] Wang Y, Yu O. Synthetic scaffolds increased resveratrol biosynthesis in engineered yeast cells[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 157(1): 258-260.
- [27] Zha W, Rubin PSB, Shao Z, et al. Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2009, 11(3): 192-198.