

分类号：
学 号：20222307217

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

博士学位论文



代谢工程改造大肠杆菌合成香草醛 的途径重构与优化

学位申请人	邱笛
指导教师	张根林教授
学位门类级别	工学博士
学科、专业名称	化学工程与技术
研究方向	代谢工程与合成生物学
所在学院	化学化工学院

中国·新疆·石河子
2025年6月

分类号：
学 号：20222307217

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

博士学位论文



代谢工程改造大肠杆菌合成香草醛 的途径重构与优化

学 位 申 请 人	邱笛
指 导 教 师	张根林教授
学 位 门 类 级 别	工学博士
学 科 、 专 业 名 称	化学工程与技术
研 究 方 向	代谢工程与合成生物学
所 在 学 院	化学化工学院

中国·新疆·石河子

2025年6月

Reconstruction and optimization of vanillin biosynthesis in
Escherichia coli

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Doctor of Engineering

By

Qiu Di

(Metabolic Engineering and Synthetic Biology)

Dissertation Supervisor: Prof. Zhang Gen-Lin

June, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：邱笛

时间：2025 年 5 月 25 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：邱笛

时间：2025 年 5 月 25 日

导师签名：何树才

时间：2025 年 5 月 25 日

摘要

香草醛 ($C_8H_8O_3$, 4-羟基-3-甲氧苯甲醛) 是一种有价值的植物衍生芳香类化合物, 是天然香草的主要成分, 被广泛应用于食品、医药、化妆品等领域。天然来源的香草醛严重依赖于土地资源和气候条件, 远远不能满足市场需求。化学合成香草醛大部分都是以愈创木酚和木质素为原料, 经缩合、氧化及脱羧制成香草醛, 但使用有毒害的化学试剂不符合可持续发展和绿色化学的理念。因此香草醛的生物合成已成为研究热点。然而, 生物合成香草醛仍受限于前体物 L-酪氨酸及辅因子供应不足、关键酶活性低与底物特异性差、以及产物对宿主的抑制等因素, 导致香草醛产量低。为了解决上述问题, 本论文通过在大肠杆菌中重构香草醛合成途径、平衡代谢通量、提高大肠杆菌对香草醛的耐受性等策略引导碳流更快更多地流向提香草醛, 进而提升香草醛的产量。论文主要结果如下:

(1) 香草醛大肠杆菌细胞工厂的构建。设计了以 L-酪氨酸为起始底物、经对香豆酸、咖啡酸、阿魏酸等中间产物合成香草醛的途径, 为了促进阿魏酸向香草醛的快速转化, 首先筛选了不同来源的烯酰辅酶 A 水合酶/醛缩酶 (*ech*) 和阿魏酰辅酶 A 合成酶 (*fcs*) 基因, 发现来源于丁香假单胞菌的 *ech2*、*fcs2* 基因更有利于香草醛的从头合成 (13.48 mg/L)。由于阿魏酰辅酶 A 合成酶催化阿魏酸转化需要辅酶 A 的参与, 因此通过突变柠檬酸合酶 *gltA* 为 *gltA*^{C207S/E208A} 解除 NADH 对 *gltA* 的别构抑制和敲除异柠檬酸脱氢酶 *icdA* 促使异柠檬酸转入乙醛酸支路提高辅酶 A 供应, 形成的 Δ I2M 菌株在以 2 g/L 阿魏酸为底物时, 香草醛产量比原始菌株提高了 52.7%。同时, 通过组合表达来源于海洋分支杆菌的羧酸还原酶 (CAR) 和枯草芽孢杆菌的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (PPTase) 还原副产物香草酸, 并敲除大肠杆菌内源醇脱氢酶 (*yahK*、*yjgB*、*yqhD*) 阻断副产物香草醇的形成, 使香草醛产量达到 143.52 mg/L (Q7 菌株)。

(2) 强化前体物 L-酪氨酸和辅因子供应促进香草醛合成。设计了敲除全局调控因子 (*tyrR*) 和分支酸突变酶 (*pheA*) 阻断 L-苯丙氨酸竞争途径、过表达负反馈抗性基因 (*aroG*^{br} 和 *tyrA*^{br}) 解除 L-酪氨酸反馈抑制以及敲除磷酸转移酶 (*ptsG*、*pykA*、*pykF*) 提高磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 可用性三种方式协同促进 L-酪氨酸合成, 使香草醛产量提高至 209.48 mg/L, 比 Q7 菌株提高了 45.96%。为了弥补 4-香豆酸-3-羟化酶催化对香豆酸形成咖啡酸的转化过程中辅因子 NADPH 的不足, 筛选了不同来源的 NADPH 合成基因 (*zwf*、*icd*、*gnd*、*maeB*、*pos5* 以及 *pntAB*), 发现过表达来源于酿酒酵母的 *pos5* 可使香草醛合成前体阿魏酸累积量提高 32.5%。同时, 为了提高咖啡酸-O-甲基转移酶催化咖啡酸的甲基化效率, 引入 S-腺苷高半胱氨酸核苷酶 (*mtn*) 和 S-核糖基高半胱氨酸裂解酶 (*luxS*) 激活 SAM 再生, 阿魏酸的累积量比野生型菌株提高 46.4%, 说明促进 SAM 的再生比从头合成更能增加甲基化的效率。最后, 耦合辅因子 NADPH 与 SAM 再生策略使香草醛产量提高至为 279.17 mg/L (Q9 菌株), 证明强化前体物 L-酪氨酸和辅因子供应能进一步提高香草醛合成的效率。

(3) 解除咖啡酸-O-甲基转移酶 (*AtCOMT*) 的限制。咖啡酸甲基化是香草醛从头合成的关键步骤, 但 *AtCOMT* 的低活性和底物混杂仍然是高效生物合成香草醛的挑战, 因此通过同源建模、分子对接手段研究了 *AtCOMT* 的催化机制, 并优化了 *AtCOMT* 酶的表达条件。优化后的最佳诱导温度 16 °C、IPTG 浓度 0.6 mM、诱导时间 24 h, 野生型 *AtCOMT* 酶的最适温度为 42 °C、最适 pH 为 7.8。通过重塑底物结合袋, 增加氢键网络, 获得了具有较高催化效率和底物特异性的 L125R/I317E 突变体, 与野生型 *AtCOMT* 相比, k_{cat}/K_m 增加了 5.79 倍。分子动力学模拟证实 *AtCOMT* 活性和特异性的增加是由于所设计的氢键和盐桥产生的更紧密的底物结合袋和更强的酶-底物相互作用。过表达 L125R/I317E 后阿魏酸累积量提高到 1.273 g/L, 是野生型的 21.3 倍, 进一步使香草醛产量达到 554.93 mg/L, 表明关键酶改造之后能解除香草醛合成的瓶颈。

(4) 提高大肠杆菌对香草醛的耐受性及减轻细胞代谢负担。在外加香草醛胁迫下基于转录组及代谢组数据首次挖掘得到 *yqeI*、*aaeR* 基因在香草醛胁迫中表现出防御潜力, 分析发现 *yqeI*、*aaeR* 基因主要通过调控生物过程及分子功能有关基因减轻香草醛对细胞的毒害影响, 通过过表达后, 均能在 1 g/L 外加香草醛胁迫下正常生长。另外, 利用大肠杆菌-大肠杆菌共培养系统通过调节阿魏酸合成模块和香草醛合成模块, 优化接种比例 (2:3)、IPTG 诱导时间 (6 h), 香草醛的最终产量达到 883.12 mg/L, 证明利用共培养系统能降低细胞代谢负担进一步提高香草醛的产量。

关键词: 香草醛; 前体物优化; 咖啡酸-O-甲基转移酶; 辅因子供应; 共培养

Abstract

Vanillin ($C_8H_8O_3$, 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) is a valuable plant derived aromatic compound, which is the main component of natural vanilla and widely used in food, medicine, cosmetics and other fields. Due to the heavy reliance on land resources and climate conditions, naturally sourced vanillin is far from meeting market demand. Chemically synthesized vanillin mostly is derived from guaiacol and lignin by condensing, oxidizing, and decarboxylating. Thus, the vanillin through chemical synthesized not conform the concepts of sustainable development and green chemistry due to use the toxic chemical reagents. At present, the biosynthesis of vanillin has become a research hotspot. However, vanillin biosynthesis is still limited by insufficient supply of precursor L-tyrosine and cofactors, low activity of key enzyme and poor substrate specificity, and toxicity to the host, which resulting in low titer of vanillin. To address the aforementioned issues, this thesis employed strategies such as restructuring the vanillin synthesis pathway in *E. coli*, balancing metabolic flux, and enhancing the tolerance of *E. coli*. These strategies can guide carbon flow towards vanillin more quickly and efficiently, and further increase the yield of vanillin. The main research content and results are summarized as follows:

(1) Construction of vanillin *E. coli* cell factory. The metabolic pathway was designed of vanillin using L-tyrosine as substrate and intermediate products such as coumaric acid, caffeic acid, and ferulic acid. To promote the conversion of ferulic acid to vanillin, the *ech* (encode enoyl-CoA hydratase/aldolase) and *fcs* (encode feruloyl-CoA synthetase) were screened from different sources. It was demonstrated that the *ech2* and *fcs2* genes from *Pseudomonas syringae* were more suitable for *de novo* vanillin biosynthesis (13.48 mg/L). Due to the involvement of coenzyme A in the catalytic conversion of ferulic acid by feruloyl CoA synthase, the citrate synthase *gltA* was mutated to *gltA*^{C207S/E208A} to release the allosteric inhibition of NADH, and the isocitrate dehydrogenase *icdA* was knocked out to promote the transfer of isocitrate into the glyoxylate branch. The $\Delta I2M$ strain increased vanillin by 52.7% when the 2 g/L ferulic acid as substrate. At the same time, combing the expression of carboxylic acid reductase (CAR) and phosphopantetheinyl transferase (PPTase) were screened to weaken the accumulation of vanillic acid. Then, knocked out the alcohol dehydrogenases (*yahK*, *yjgB*, *yqhD*) to block the accumulation of the byproduct vanillyl alcohol. The titer of vanillin reached to 143.52 mg/L (Q7 strain).

(2) Strengthening the supply of precursor L-tyrosine and cofactors promotes vanillin synthesis. Three methods were designed to synergistically promote L-tyrosine synthesis: knocking out the global regulatory factor (*tyrR*) and branching acid mutase (*pheA*) to block the L-phenylalanine competition pathway, overexpressing negative feedback resistance genes (*aroG*^{fbr} and *tyrA*^{fbr}) to relieve L-tyrosine feedback inhibition, and knocking out phosphotransferases (*ptsG*, *pykA*, *pykF*) to increase phosphoenolpyruvate (PEP)

availability. As a result, vanillin production was increased to 209.48 mg/L, which is 45.96% higher than the Q7 strain. In order to compensate for the deficiency of the cofactor NADPH in the conversion process of coumaric acid to caffeic acid catalyzed by 4-hydroxyphenylacetic acid-3-hydroxylase, different sources of NADPH synthesis genes were screened. It was found that overexpression of *pos5* from *Saccharomyces cerevisiae* could increase the accumulation of ferulic acid. At the same time, in order to improve the methylation efficiency of caffeic acid-O-methyltransferase, 5'-methylglucosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase (*mtn*) and S-ribosyl-homocysteine lyase (*luxS*) were introduced to activate SAM regeneration. The accumulation of ferulic acid increased by 46.4% compared to the wild-type, indicated that promoting SAM regeneration was more effective than de novo synthesis. Finally, cofactor NADPH and SAM regeneration strategy were combined and the production of vanillin was increased to 279.17 mg/L (strain Q9), demonstrating that enhancing the supply of precursor L-tyrosine and cofactor can further improve the efficiency of vanillin synthesis.

(3) Releasing the restriction on caffeic acid O-methyltransferase (*AtCOMT*). The methylation of caffeic acid is a key step in the de novo synthesis of vanillin, however, the low activity and substrate promiscuity of *AtCOMT* remain challenges for efficient biosynthesis. Homologous modeling and molecular dock were utilized to elucidate the catalytic mechanism of *AtCOMT* and the heterologous expression conditions of *AtCOMT* enzyme was optimized. It was showed that optimal induction temperature was 16 °C, IPTG concentration was 0.6 mM. In addition, the enzymatic characteristics of *AtCOMT* were explored which the optimal temperature and pH for wild-type *AtCOMT* were 42 °C and 7.8, respectively. Through reshaping the substrate binding pocket and increasing the hydrogen bond network, L125R/I317E mutant with highly catalytic efficiency and substrate specificity was obtained. Compared with the wild-type *AtCOMT*, the k_{cat}/K_m increased by 5.79-fold. Molecular dynamics simulation verified that the increased activity and specificity of *AtCOMT* were derived from the tighter substrate binding pocket and stronger enzyme-substrate interactions produced by the designed hydrogen bonds and salt bridges. Eventually, 1.273 g/L ferulic acid was obtained by fed-batch fermentation, which was 21.3-fold compared with the WT. And, the titer of vanillin reached to 554.93 mg/L indicated that the key enzyme modification can alleviate the bottleneck in vanillin synthesis.

(4) Improving the tolerance of *E. coli* to vanillin and reducing metabolic burden of cell. Based on transcriptomic and metabolomic data, *yqeI* and *aaeR* showed defense potential under vanillin stress. After overexpression of *yqeI* and *aaeR*, both were able to grow normally under 1 g/L of vanillin stress. Meanwhile, utilizing the *E. coli* co-culture system, the accumulation of intermediate products can be flexibly adjusted by changing the ratio of upstream and downstream strains. By optimizing the initial inoculation ratio (2:3) and IPTG induction time (6 h), the titer of vanillin biosynthesis reached 883.12 mg/L.

Key words: Vanillin; Precursor optimization; Caffeic acid-O-methyltransferase; Cofactor supply; Co-culture

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第 1 章 绪论.....	1
1.1 香草醛简介.....	1
1.1.1 香草醛的结构与性质.....	1
1.1.2 香草醛的应用.....	1
1.2 香草醛的合成方法.....	2
1.2.1 植物提取法.....	2
1.2.2 化学合成法.....	2
1.2.3 生物合成法.....	3
1.3 微生物合成香草醛的进展.....	5
1.4 构建高产香草醛细胞工厂的工程策略.....	8
1.4.1 弱化竞争支路.....	8
1.4.2 前体物供应策略.....	9
1.4.3 辅因子供应策略.....	9
1.4.4 关键酶改造策略.....	10
1.4.5 共培养策略.....	11
1.4.6 提高宿主耐受性策略.....	11
1.5 本论文的研究意义和主要内容.....	12
1.5.1 论文的研究意义.....	12
1.5.2 论文主要研究内容.....	13
1.5.3 技术路线图.....	14
第 2 章 香草醛大肠杆菌细胞工厂的构建.....	15
2.1 引言.....	15
2.2 实验材料.....	15
2.2.1 质粒及菌株.....	15
2.2.2 引物.....	18
2.2.3 实验试剂.....	19
2.2.4 实验设备.....	21

2.2.5 溶液配制.....	21
2.3 实验方法.....	22
2.3.1 目的基因扩增.....	22
2.3.2 PCR 产物切胶回收.....	23
2.3.3 质粒提取.....	24
2.3.4 大肠杆菌基因组提取.....	24
2.3.5 酶切及连接.....	25
2.3.6 大肠杆菌常规转化流程.....	26
2.3.7 菌落 PCR 验证.....	27
2.3.8 基因敲除 (λ -Red 同源重组).....	27
2.3.9 细胞生长状态 (OD ₆₀₀) 测定.....	28
2.3.10 摇瓶发酵及放大发酵.....	28
2.3.11 样品处理及代谢物检测.....	29
2.3.12 数据处理.....	29
2.4 结果与讨论.....	29
2.4.1 从头合成香草醛的途径构建.....	29
2.4.2 强化乙酰辅酶 A 的利用.....	33
2.4.3 弱化竞争支路.....	34
2.5 本章小结.....	36
第 3 章 L-酪氨酸及辅因子供应优化促进香草醛合成.....	37
3.1 引言.....	37
3.2 实验材料.....	37
3.2.1 质粒及菌株.....	37
3.2.2 引物.....	40
3.2.3 实验试剂.....	41
3.2.4 实验设备.....	41
3.2.5 溶液配制.....	42
3.3 实验方法.....	42
3.3.1 质粒构建.....	42
3.3.2 还原力含量检测.....	43
3.3.3 样品处理及代谢物检测.....	43
3.4 结果与讨论.....	44
3.4.1 阻断竞争途径及解除抑制因子对 L-酪氨酸供应的影响.....	44
3.4.2 解除 L-酪氨酸的负反馈调节及改造 PTS 系统提高 PEP 的可用性.....	46

3.4.3 辅因子策略强化 NADPH 的再生	48
3.4.4 辅因子 SAM 合成途径的优化	51
3.5 本章小结	54
第 4 章 改造咖啡酸-O-甲基转移酶提高香草醛合成	56
4.1 引言	56
4.2 实验材料	56
4.2.1 质粒及菌株	56
4.2.2 引物	59
4.2.3 实验试剂	60
4.2.4 实验设备	61
4.2.5 溶液配制	61
4.3 实验方法	62
4.3.1 <i>comt</i> 片段的克隆及载体构建	62
4.3.2 定点突变	62
4.3.3 咖啡酸-O-甲基转移酶的诱导表达及纯化	63
4.3.4 主要化合物的测试方法	64
4.3.5 咖啡酸-O-甲基转移酶的酶活及最适条件测定	64
4.3.6 咖啡酸-O-甲基转移酶的动力学参数测定	65
4.3.7 同源建模及分子对接	65
4.3.8 动力学模拟	65
4.4 结果与讨论	66
4.4.1 <i>AtCOMT</i> 的关键位点筛选及酶学性质分析	66
4.4.2 重塑底物结合口袋及增强氢键网络	72
4.4.3 优势突变体组合筛选	78
4.4.4 分子动力学模拟	80
4.4.5 底物特异性分析	82
4.4.6 组合突变对香草醛产量的影响	83
4.5 本章小结	85
第 5 章 大肠杆菌耐受香草醛的改造及共培养体系构建	86
5.1 引言	86
5.2 实验材料	86
5.2.1 质粒及菌株	86
5.2.2 引物	92
5.2.3 实验试剂	101

5.2.4 实验设备	101
5.2.5 溶液配制	101
5.3 实验方法	101
5.3.1 目的基因过表达	101
5.3.2 细菌 RNA 提取及反转录	102
5.3.3 实时荧光定量 (RT-PCR)	102
5.3.4 细胞凋亡检测	104
5.3.5 转录组测定分析	104
5.3.6 代谢组测定分析	105
5.3.7 共培养系统的亚种群分析	105
5.3.8 外加香草醛胁迫对大肠杆菌的影响	106
5.3.9 样品处理及代谢物检测	106
5.3.10 数据处理	107
5.4 结果与讨论	107
5.4.1 转录组学分析	107
5.4.2 代谢组学分析	111
5.4.3 转录因子功能验证及分析	113
5.4.4 共培养策略优化	119
5.5 本章小结	121
第 6 章 结论与展望	122
6.1 结论	122
6.2 创新点	123
6.3 展望	123
参考文献	124
附录	136
致谢	144
作者简介	145

第1章 绪论

1.1 香草醛简介

1.1.1 香草醛的结构与性质

香草醛 ($C_8H_8O_3$, 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛) 又名香兰素, 是一种以醛、羟基和醚为官能团的酚类化合物 (图 1-1), 是天然香草中的主要成分。它是一种白色的针状结晶粉末, 具有浓烈的奶油香草香味, 易溶于甲醇、乙醇、吡啶等有机试剂^[1]。因其具有独特的香味被广泛应用于食品、饮料、制药等领域^[2-3]。除了以芳香性而闻名以外, 香草醛还具有抗癌、抗菌、抗氧化、抗群体感应等生物活性^[4-6]。预计到 2025 年, 香草醛的全球需求量将在 2016 年 18600 吨的基础上进一步增加 6.2%^[7]。

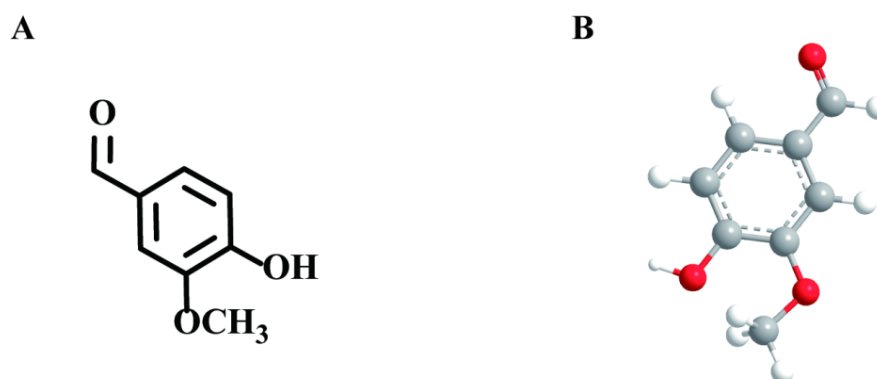


图 1-1 香草醛 2D 及 3D 结构式

Fig. 1-1 The 2D (A) and 3D (B) chemical structure of vanillin

1.1.2 香草醛的应用

香草醛由于其来源不同而具有不同的应用领域。天然来源的香草醛主要用于食品、饮料及制药工业。化学合成的香草醛主要用于化工领域。香草醛是世界上使用最广泛的食用香精之一, 广受人们喜爱。除了具有独特的香味被用于食品添加剂以外, 还由于抗菌及抗氧化的性质, 在食品工业中作为一种生物防腐剂^[8]。在制药领域, 香草醛是一种天然交联剂, 可用于制造伤口愈合的壳聚糖水凝胶。在原子水平上, 香草醛的醛基与一个壳聚糖分子的氨基进行络合碱基反应, 而其羟基与另一个壳聚糖分子上的羟基或氨基形成氢键^[9]。此外, 香草醛同样也是合成精细化学品如 L-多巴胺、3,4-2-羟基苯丙氨酸

的重要中间体^[10]。在脊髓损伤的大鼠模型中,香草醛表现出具有神经保护的作用,通过清除 ROS (活性氧)、减轻线粒体功能障碍达到减少组织中细胞凋亡的作用^[11]。在化工领域,香草醛主要来源于化学合成,可以作为橡胶中的防臭剂和植物生长的催熟剂^[12](图 1-2)。

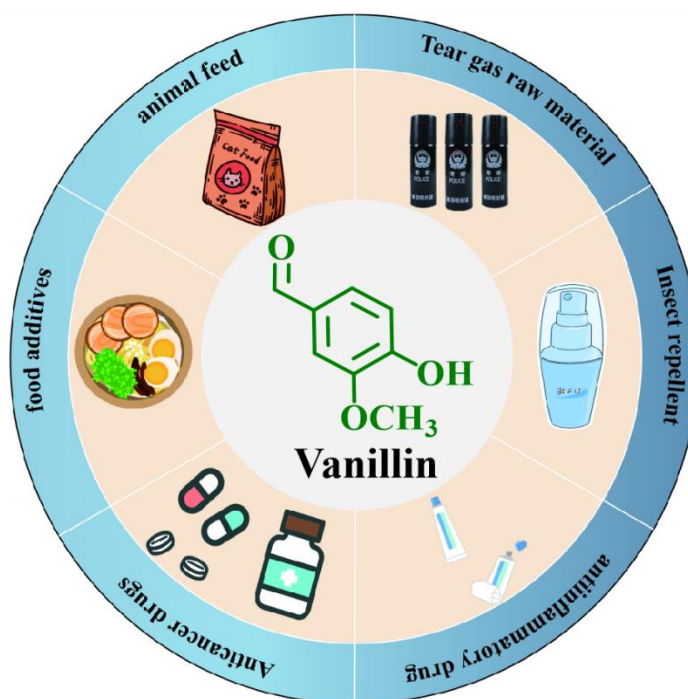


图 1-2 香草醛的用途

Fig. 1-2 The application of vanillin

1.2 香草醛的合成方法

1.2.1 植物提取法

植物提取的香草醛主要从香豆荚中获得,通过超临界 CO₂ 萃取、超声辅助提取以及油树脂法获得^[13-14]。由于生产 1 kg 的香草醛需要 500 kg 的香豆荚,这种天然合成的香草醛售价为 1200-1400 \$/kg^[15],因此植物提取香草醛是一种费时费力且成本极高的方法。目前,只有 1%的香草醛是从香豆荚中通过植物提取产生^[16]。因此,植物提取产生的香草醛由于成本高、产量低无法满足市场需求。

1.2.2 化学合成法

香草醛的化学合成主要是以愈创木酚、木质素为底物,占市场总香草醛的 95%^[17]。愈创木酚是一种石油基化合物,使用里德尔方法 (Riedel reaction)。首先,由于乙醛酸

具有高度的区域选择性，能避免副产物累积，因此采用乙醛酸作为缩聚剂与愈创木酚生成香草扁桃酸。随后，香草扁桃酸被氧化、脱羧进一步形成香草醛^[18]（图 1-3）。但以愈创木酚为底物化学合成香草醛的过程中，需要碱性环境且以 Cu^{2+} 作为催化剂，反应温度较高（80-130 °C），不符合绿色化学的概念。此外，愈创木酚来源于石油等烃类不可再生资源，因此不符合可持续发展战略。

木质素是地球上最丰富的可再生资源且是一种天然的芳香族聚合物，因此是合成芳香族类化合物极具吸引力的原材料^[19]。木质素主要以磺酸盐的形式存在于造纸厂废水中，首先用 NaOH 使木质素磺酸盐溶解，然后其部分氧化是利用化学氧化剂（如：臭氧、过氧化氢）产生香草醛，伴随着草酸、乙二醛等副产物。Sriprom 等人在碱性环境中从废水中的木质素合成香草醛和酚类物质^[20]。与愈创木酚相比，木质素因其独特的芳香结构和低成本非常适用于香草醛生产，然而木质素衍生单体的异质性及稳定性仍然是生产芳香族化合物的难点^[21]。根据欧盟（EU）规定，化学合成的香草醛被归类为人工香草醛，不能用于食品及饮料领域。因此，虽然化学合成的香草醛成本低（12 美元/千克）^[22]，但其使用受到严格的限制。

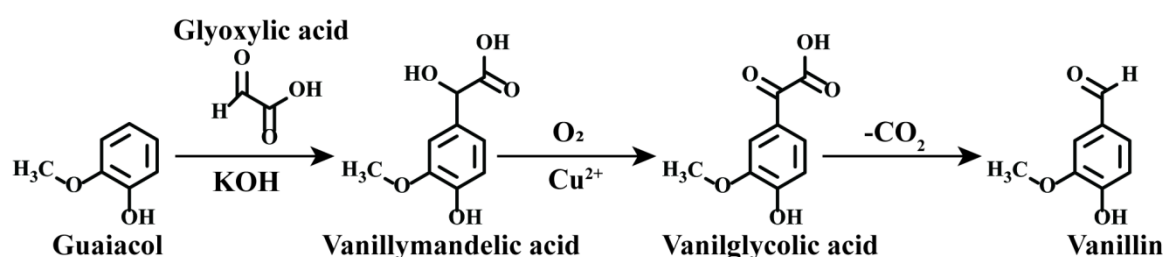


图 1-3 愈创木酚-乙醛酸化学合成香草醛

Fig. 1-3 Chemical synthesis vanillin by guaiaco-glyoxylic acid

1.2.3 生物合成法

通过在微生物宿主中重构合成途径、平衡代谢通量、解除关键酶的限制及提高菌株耐受性等策略引导碳流更快更多地流向目标产物以提高产量已成为研究热点。近 20 年来，随着合成生物学及代谢工程的发展，研究者们已经利用不同微生物细胞以 L-苯丙氨酸（L-phenylalanine）、L-酪氨酸（L-tyrosine）、丁香酚（Eugenol）、阿魏酸（Ferulic acid）等为底物生物合成香草醛^[23]（图 1-4）。在植物中，L-苯丙氨酸在苯丙氨酸裂解酶（PAL）的催化下脱氨生成反式肉桂酸（Trans-cinnamic acid），然后经过肉桂酸-4-羟化酶（C4H）和对香豆酸-3-羟化酶（C3H）连续两步羟化合成咖啡酸（Caffeic acid），最后被甲基转移酶（OMTs）甲基化合成香草醛的重要前体阿魏酸，最后在阿魏酰辅酶 A 合成酶（FCS）和水合酶/醛缩酶（ECH）作用下生物合成香草醛。以 L-酪氨酸为底物合