

分类号：
学 号：20232507002

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



解脂耶氏酵母合成苯乙醇的代谢途径优化

学 位 申 请 人

田占阳

指 导 教 师

张根林教授

申 请 学 位 类 别

材料与化工硕士

专 业 名 称

材料与化工

研 究 领 域

生物化工

所 在 学 院

化学化工学院

中国·新疆·石河子

2026年6月

分类号：
学号：20232507002

密级：
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



解脂耶氏酵母合成苯乙醇的代谢途径优化

学位申请人	田占阳
指导教师	张根林 教授
申请学位门类级别	工学硕士
学科、专业名称	材料与化工
研究方向	生物化工
所在学院	化学化工学院

中国·新疆·石河子

2026年6月

**Optimization of Metabolic Pathway for Phenyl Ethanol Synthesis by
Yarrowia lipolytica**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Materials and Chemical Engineering

By

Zhanyang Tian

(biochemistry engineering)

Dissertation Supervisor: Prof. Zhang Genlin

July, 2026

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： 田占阳

时间： 2026 年 5 月 26 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： 田占阳

时间： 2026 年 5 月 26 日

导师签名：

何桂叶

时间： 2026 年 5 月 26 日

摘要

2-苯乙醇 (2-Phenylethanol, 2-PE) 是一种具有细腻、淡雅且持久玫瑰香气的高级芳香醇, 因其优良的感官特性及安全性, 被广泛应用于食品添加剂、日用香料等领域。目前 2-苯乙醇的获取方式主要包括植物提取和化学合成, 因提取成本高或因化学合成使用剧毒物质氰化钾而存在环境和安全问题, 难以满足食品及香料工业对天然来源添加剂的质量标准。因此开发高效、安全的微生物合成已成为 2-苯乙醇天然来源的重要方向。解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 作为一种被公认安全 (GRAS) 的非常规酵母, 在高附加值天然产物合成方面具有良好潜力。本研究以解脂耶氏酵母为底盘菌株, 运用代谢工程策略重构并优化 2-苯乙醇的异源合成。主要研究结果如下:

1. 为了提高解脂耶氏酵母作为细胞工厂的适应性, 对其首先进行了形态修饰, 酵母从菌丝体形态变为酵母形态, 2-苯乙醇产量为 9.16 mg/L。敲除 2-苯乙醇合成的支路途径基因 (*ylTRP2*、*ylTRP3*、*ylTYR1*), 削弱了竞争性代谢通量, 合成 2-苯乙醇 119.63 mg/L, 提高了 13.06 倍。进一步通过强化莽草酸途径关键基因 (*ylARO1*、*ylARO2*) 表达、筛选并半理性改造催化苯乙醛合成苯乙醇的关键酶乙醇脱氢酶 *blyugJ^{H281T}*, 2-苯乙醇的产量提升至 298.70 mg/L, 相比 KL1 提高了 32.60 倍。

2. 为了提高艾氏途径催化效率, 利用 *G4S* 构建埃里希途径酶的融合蛋白 *ylPHA2-ylARO7*、*ylARO10-G4S-ylPHA2*、*blyugJ^{H281T}-G4S-ylARO10*, 合成 2-苯乙醇 891.87 mg/L, 相比 KL1 提高了 97.30 倍。通过引入大肠杆菌来源的 DAHP 合酶突变体 (*EcAROG^{D146N}*) 和分支酸变位酶突变体 (*EcPHEA^{T326P}*) 解除莽草酸途径的反馈抑制, 得到 2-苯乙醇 1120.07 mg/L, 相比 KL1 提高了 112.3 倍。结合辅因子供应优化策略, 敲除 *ylDGA1*、*ylDGA2* 促进胞质内 NADPH 积累, 为苯乙醛到苯乙醇提供还原力, 结合过表达酶 *ylG6PIE*、*ylRPI* 强化磷酸戊糖到莽草酸途径碳通量, 合成 2-苯乙醇 1334.78 mg/L, 相较 KL1 产量提高了 145.72 倍。最终将上述基因表达盒在 zeta 位点整合实现多拷贝表达获得工程菌 KL19, 摇瓶发酵合成 1515.25 mg/L 的 2-苯乙醇, 与初始菌株相比产量提高了 165.42 倍。

3. 通过发酵工艺优化 2-苯乙醇合成。在葡萄糖浓度为 40 g/L、硫酸铵添加浓度为 2 g/L 时, 2-苯乙醇摇瓶发酵产量达到 2.51 g/L。优化了 5 L 发酵罐补料分批发酵工艺, 在 48 h 进行二次补料, 工程菌 KL19 发酵 120 h, 2-苯乙醇产量提高至 3.45 g/L, 转化率 0.09 g/g_{glu}。

本研究通过途径关键酶筛选和半理性改造、途径酶融合表达、途径反馈抑制调控等多维代谢工程策略, 在解脂耶氏酵母中重构和优化了 2-苯乙醇合成途径, 2-苯乙醇产量提高了 165.42 倍, 为 2-苯乙醇的高效生物合成提供了参考。

关键词: 解脂耶氏酵母; 2-苯乙醇; 融合蛋白; 半理性设计; 多维代谢工程

Abstract

2-Phenylethanol (2-PE) is a kind of high-level aromatic alcohol with delicate, elegant and lasting rose aroma. It is widely used in food additives, daily spices and other fields because of its excellent sensory characteristics and safety. At present, the acquisition methods of 2-phenylethanol mainly include plant extraction and chemical synthesis. Due to the high extraction cost or the use of highly toxic substance potassium cyanide in chemical synthesis, there are environmental and safety problems, which are difficult to meet the quality standards of natural source additives in the food and flavor industry. Therefore, the development of efficient and safe microbial synthesis has become an important direction for the natural source of 2-phenylethanol. As a recognized safe (GRAS) unconventional yeast, *Yarrowia lipolytica* has good potential in the synthesis of high value-added natural products. In this study, the heterologous synthesis of 2-phenylethanol was reconstructed and optimized by metabolic engineering strategy using *Yarrowia lipolytica* as the chassis strain. The main results are as follows:

1. In order to improve the adaptability of *Yarrowia lipolytica* as a cell factory, it was first morphologically modified, and the yeast changed from mycelial morphology to yeast morphology, and the yield of 2-phenylethanol was 9.16 mg/L. By knocking out the branch pathway genes (*ylTRP2*, *ylTRP3*, *ylTYRI*) of 2-phenylethanol synthesis, the competitive metabolic flux was weakened, and the synthesis of 2-phenylethanol was 119.63 mg / L, which was increased by 13.06 times. Further, by enhancing the expression of key genes (*ylARO1*, *ylARO2*) in the shikimate pathway, screening and semi-rational modification of the key enzyme ethanol dehydrogenase *blyug^{JH281T}* that catalyzes the synthesis of phenylethanol from phenylacetaldehyde, the yield of 2-phenylethanol was increased to 298.70 mg/L, which was 32.60 times higher than that of KL1.

2. In order to improve the catalytic efficiency of the Ehrlich pathway, the fusion proteins of the Ehrlich pathway enzyme *ylPHA2-ylARO7*, *ylARO10-G4S-ylPHA2*, *blyug^{JH281T}-G4S-ylARO10* were constructed by using G4S, and 2-phenylethanol 891.87 mg/L was synthesized, which was 97.3 times higher than that of KL1. By introducing E. coli-derived *DAHPS* synthase mutant (*EcAROG^{D146N}*) and chorismate mutase mutant (*EcPHEA^{T326P}*), the feedback inhibition of shikimic acid pathway was relieved, and 2-phenylethanol was 1120.07 mg/L, which was 112.30 times higher than that of KL1. Combined with the optimization strategy of cofactor supply, knockout of *ylDGA1* and *ylDGA2* promoted the accumulation of NADPH in the cytoplasm, providing reducing power for phenylacetaldehyde to phenylacetaldehyde, combined with overexpression of enzymes *ylG6PIE* and *ylRPI* to enhance the carbon flux from pentose phosphate to shikimic acid pathway, the synthesis of 2-phenylethyl alcohol 1334.78 mg/L, which was 145.72 times higher than that of KL1. Finally, the above gene expression cassettes were integrated at the zeta site to achieve multi-copy expression

to obtain the engineering strain KL19. The 2-phenylethanol of 1515.25 mg/L was synthesized by shaking flask fermentation, which was 165.42 times higher than that of the initial strain.

3. The synthesis of 2-phenylethanol was optimized by fermentation process. When the concentration of glucose was 40 g/L and the concentration of ammonium sulfate was 2 g/L, the yield of 2-phenylethanol reached 2.51 g/L in shake flask fermentation. The fed-batch fermentation process in a 5 L fermentor was optimized. After 48 h of secondary feeding, the engineering strain KL19 was fermented for 120 h, and the yield of 2-phenylethanol was increased to 3.45 g/L, and the conversion rate was 0.09 g/g_{glu}.

In this study, the 2-phenylethanol synthesis pathway was reconstructed and optimized in *Y. lipolytica* by multi-dimensional metabolic engineering strategies such as pathway key enzyme screening and semi-rational modification, pathway enzyme fusion expression, and pathway feedback inhibition regulation. The yield of 2-phenylethanol was increased by 165.42 times, which provided a reference for the efficient biosynthesis of 2-phenylethanol.

Key words: *Yarrowia lipolytica*; 2-phenylethanol; Fusion protein; Semi-rational design; Multi-dimensional metabolic engineering

目录

摘要.....	I
Abstract	II
第 1 章 绪论.....	1
1.1 2-苯乙醇概述.....	1
1.2 2-苯乙醇的生产方式.....	2
1.2.1 物理提取.....	2
1.2.2 化学合成.....	2
1.2.3 生物合成.....	3
1.3 2-苯乙醇的生物合成途径.....	3
1.3.1 艾氏途径.....	3
1.3.2 莽草酸途径、苯丙酮酸途径.....	5
1.3.3 苯乙胺途径.....	6
1.4 代谢工程微生物合成 2-苯乙醇研究进展.....	6
1.4.1 大肠杆菌.....	6
1.4.2 酿酒酵母.....	7
1.4.3 其他微生物.....	8
1.5 解脂耶氏酵母生产苯乙醇.....	9
1.5.1 解脂耶氏酵母简介.....	9
1.5.2 解脂耶氏酵母代谢工程研究进展.....	10
1.6 论文的研究意义和内容.....	11
1.6.1 研究意义.....	11
1.6.2 研究内容.....	12
1.6.3 技术路线.....	13
第 2 章 2-苯乙醇合成途径的构建及乙醇脱氢酶的半理性改造.....	14
2.1 实验材料与设备.....	14
2.1.1 菌株与质粒.....	14
2.1.2 引物序列.....	16
2.1.3 实验试剂.....	20
2.1.4 仪器设备.....	22
2.2 实验方法.....	22
2.2.1 溶液和培养基的配制.....	22

2.2.2	基因合成及测序	23
2.2.3	PCR 反应体系和程序	23
2.2.4	酶切体系	24
2.2.5	无缝克隆连接	25
2.2.6	PCR 产物与酶切产物纯化	26
2.2.7	质粒抽提	26
2.2.8	基因组提取	26
2.2.9	大肠感受态制备与转化	26
2.2.10	解脂耶氏酵母制备与转化	27
2.2.11	解脂耶氏酵母转化子验证	27
2.2.12	苯乙醇的提取和检测	27
2.2.13	分子对接	28
2.2.14	统计分析	28
2.3	结果与讨论	28
2.3.1	细胞形态调控	28
2.3.2	芳香族支路氨基酸的敲除	29
2.3.3	莽草酸途径的过表达对 2-苯乙醇产量的提升	30
2.3.4	异源乙醇脱氢酶对 2-苯乙醇产量的影响	32
2.3.5	yugJ 蛋白分子建模及结果评估	33
2.3.6	yugJ 蛋白的分子拉氏图评估	34
2.3.7	苯乙醛与 yugJ 蛋白的分子对接分析	34
2.3.8	定点突变与酵母发酵验证	35
2.3.9	yugJ ^{H281T} 突变体的可视化分析	36
2.4	小结	37
第 3 章	解脂耶氏酵母合成 2-苯乙醇的途径系统优化	38
3.1	实验材料与设备	38
3.1.1	质粒	38
3.1.2	引物序列	40
3.1.3	实验试剂	43
3.1.4	仪器设备	43
3.2	实验方法	43
3.2.1	融合蛋白的构建	43
3.2.2	艾氏途径酶定位	44
3.2.3	过氧化物酶体区室化定位	44

3.2.4 莽草酸途径抗反馈调节	44
3.2.5 辅因子供应优化	45
3.2.6 前体物供应优化	45
3.2.7 关键基因多拷贝表达	45
3.3 结果与分析	45
3.3.1 融合蛋白工程改造对解脂耶氏酵母合成 2-苯乙醇的影响	45
3.3.2 艾氏酶定位分析	48
3.3.3 融合蛋白区室化定位分析	48
3.3.4 莽草酸途径抗反馈调节对 2-苯乙醇产量的影响	50
3.3.5 辅因子供应优化对 2-苯乙醇产量的影响	51
3.3.6 前体物供应优化对 2-苯乙醇产量的影响	52
3.3.7 基因多拷贝表达	53
3.4 小结	54
第 4 章 解脂耶氏酵母合成 2-苯乙醇发酵工艺优化研究	55
4.1 实验材料	55
4.1.1 工程菌	55
4.1.2 实验试剂	55
4.1.3 实验仪器	55
4.2 实验方法	55
4.2.1 碳源优化	55
4.2.2 氮源优化	56
4.2.3 pH 优化	56
4.2.4 分批补料发酵	56
4.3 结果与分析	56
4.3.1 碳源对工程菌 KL19 合成 2-苯乙醇的影响	56
4.3.2 氮源优化对 2-苯乙醇产量的影响	57
4.3.3 不同浓度 pH 对 2-苯乙醇产量的影响	58
4.3.4 5L 发酵罐补料分批发酵	59
4.4 小结	59
第 5 章 结论与展望	61
5.1 结论	61
5.2 创新点	61
5.3 展望	61
参考文献	63

致谢	70
作者介绍	71

第1章 绪论

1.1 2-苯乙醇概述

芳香族氨基酸衍生物通常具有明显而独特的香气特征，在食品、化妆品及医药等领域具有重要应用价值。此类化合物多来源于天然代谢过程，普遍具有较高附加值，其生物合成途径广泛存在于细菌、真菌与植物体内。多样化的代谢转化能力使芳香族氨基酸能够生成结构类型丰富的衍生物，为多种高价值化合物的生物合成提供关键前体物质。芳香族氨基酸的生物合成主要由三条分支途径构成，包括 L-色氨酸合成途径、L-苯丙氨酸合成途径与 L-酪氨酸合成途径^[1]。

表 1-1 部分芳香族化合物及其用途

Table 1-1 Some aromatic compounds and their uses

芳香族化合物	用途
白藜芦醇	抗氧化、保护心血管健康、延缓衰老
熊果苷	减少皮肤色素沉积，祛除色斑和雀斑
槲皮素	降低血压、增强毛细血管抵抗力
柚皮素	清除自由基、抗炎
褪黑素	提高睡眠质量
天麻素	镇静、安眠
维生素 B3	参与能量代谢

2-苯乙醇是多种植物果实与花朵挥发性香气的重要组成成分，分子式为 $C_8H_{10}O$ ，是一种具有玫瑰花样香气的芳香醇类化合物。在常温条件下，2-苯乙醇呈无色液体状态，微溶于水，可溶于乙醇、乙醚及甘油等有机溶剂，在空气与碱性环境中能够保持较高稳定性^[2]。2-苯乙醇具有细腻、柔和且持久的玫瑰花香，同时具备良好的食用安全性，在食品与化妆品工业中长期作为重要香料成分使用^[3]。稳定的理化性质与独特的香气品质使其成为多种香料化合物及药物分子的合成前体^[4]。

2-苯乙醇属于应用范围广泛的精细化工原料，在香料工业中占据重要地位，全球年产量约为万吨级规模，仅次于香兰素的使用量^[2]。该化合物及其衍生物具有较高应用价值，其中部分酯类衍生物可用于工业香精配制与有机溶剂体系^[5]。在食品工业中，2-苯乙醇被列为允许使用的食用香料，因其典型玫瑰香气特征，常用于糖果、口香糖、焙烤食品、冷饮、果汁、酱料、巧克力饮料、咖啡及面包等产品风味调配。日用化学品领域

中, 2-苯乙醇是皂用香精与化妆品香精的重要组分, 广泛应用于香水、护肤品及洗发产品配方, 同时在部分洗发剂与轻型去污剂体系中发挥增稠与泡沫调节作用^[6]。医药领域中, 以 2-苯乙醇为原料合成的苯乙醇苷类化合物具有一定抗菌与抗炎活性, 可用于部分外用制剂及消毒产品的开发^[6]。

1.2 2-苯乙醇的生产方式

近年来, 2-苯乙醇的全球需求持续增长, 香精香料、医药中间体及食品添加剂等下游产业规模扩大推动其市场快速发展。数据显示, 全球 2-苯乙醇市场规模由 2020 年的约 2.4 亿美元增长至 2024 年的约 2.91 亿美元, 预计 2030 年将达到约 3.70 亿美元, 其中香精香料领域占据主要消费比例, 需求占比超过 65%, 医药中间体领域增长速度较快, 年均增长率预计达到 18.7%^[7]。消费结构升级推动市场对高品质天然来源产品的需求增加, 绿色生产与健康属性逐渐成为行业关注重点。当前国际市场中, 化学合成 2-苯乙醇的价格约为每千克 3.50 美元, 而天然来源产品价格可达到每千克 1000 美元, 显示出显著的附加值差异。2-苯乙醇的制备方式主要包括化学合成法、天然产物提取法与微生物合成法, 不同方法在生产成本、产品纯度及天然属性方面存在明显差异。

1.2.1 物理提取

2-苯乙醇是一类在自然界中广泛存在的芳香族醇类化合物, 常见于玫瑰、西红柿及多种花卉和植物组织中, 其在多数植物体内的天然含量相对较低, 现阶段工业上可获得的天然来源主要依赖玫瑰花瓣提取。已有研究表明, 大约 5 t 玫瑰鲜花仅能够获得约 1 kg 2-苯乙醇^[8], 反映出该化合物在植物组织中的富集程度有限。由于玫瑰花原料本身价格较高且目标产物含量较低, 传统提取工艺往往需要经过原料预处理、溶剂萃取、分离纯化及后处理等多个步骤, 生产过程耗时较长并伴随较高的劳动投入与能量消耗, 从而在整体上表现出较低的工艺效率。上述因素在一定程度上限制了天然来源 2-苯乙醇的产量与稳定供应, 难以满足食品、香料及日化等领域不断增长的市场需求, 单纯依赖植物提取途径实现工业规模化生产的可行性受到明显制约, 因此探索更加高效、可持续的替代生产策略以提升 2-苯乙醇的供给能力迫在眉睫。

1.2.2 化学合成

化学合成法仍为当前工业生产 2-苯乙醇的主要技术途径, 相关工艺体系经过长期工业实践已形成较为成熟的技术路线, 常见方法包括环氧苯乙烷法与直接氢甲酰化法^[9]。如图 1-1 环氧苯乙烷法通常以苯乙烯为起始原料, 在次氯酸作用下生成 α -氯代苯乙醇中间体, 经催化加氢反应实现脱氯与还原转化获得目标产物 2-苯乙醇。直接氢甲酰化法以

苯乙烯为底物，在一氧化碳与氢气构成的合成气体系及金属络合催化剂作用下发生氢甲酰化反应生成苯丙醛中间体，经进一步加氢还原转化为 2-苯乙醇。上述化学合成路线在反应机理、催化体系与工艺控制方面均已建立较为稳定的技术基础，反应效率较高且生产周期相对较短，适用于连续化与规模化生产，在当前工业体系中仍占据重要地位并成为 2-苯乙醇商业化生产的主要来源。

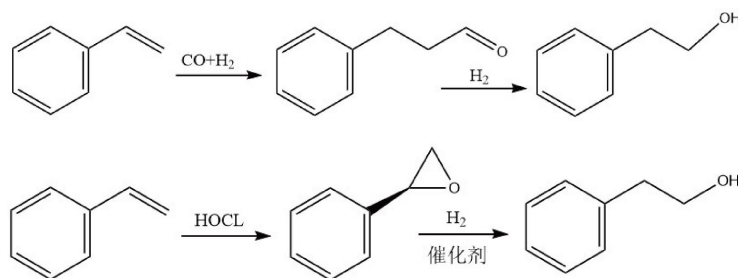


图 1-1 化学合成

Figure. 1-1 Chemical synthesis

1.2.3 生物合成

微生物合成法以酵母或细菌为底盘微生物，通过代谢途径优化或重构实现目标化合物的生物合成，研究过程中通常引入编码关键酶的功能基因并对副产物生成相关途径进行敲除或削弱以提高目标产物的代谢通量，从而增强 2-苯乙醇的合成能力。该类生产方式在温和条件下即可完成，反应过程对环境影响较小，副产物形成相对有限，发酵原料多来源于糖类或农业副产物，获取途径广泛且生产成本相对较低。通过微生物获得的 2-苯乙醇通常被归类为天然来源产物，其生产方式能够极大地缓解植物提取效率低与化学合成环境负荷较高等问题，基于生物合成策略的生产模式的可持续性与原料可再生等特点，已成为相关研究与产业技术发展的重要方向。

1.3 2-苯乙醇的生物合成途径

1.3.1 艾氏途径

艾氏途径由德国生物化学家艾氏提出，被认为是酵母细胞中普遍存在的一类氨基酸分解代谢途径，该途径能够将支链氨基酸、芳香族氨基酸及含硫氨基酸经一系列酶促反应转化为对应的高级醇或杂醇酸，其中芳香族氨基酸 L-苯丙氨酸可在代谢过程中进一步生成具有玫瑰香气特征的 2-苯乙醇^[10]。该代谢途径在模式微生物酿酒酵母中得到系统研究并形成较为清晰的反应框架^[11-12]。在具体反应过程中，L-苯丙氨酸首先在转氨酶催化作用下转化为苯丙酮酸，随后经苯丙酮酸脱羧酶催化脱羧生成苯乙醛，苯乙醛在乙醇脱氢酶或醛类还原酶作用下被进一步还原生成终产物 2-苯乙醇^[10]，相关反应构成了酵母细

胞中由氨基酸向芳香族高级醇转化的重要生物合成途径。

代谢工程研究表明,该途径关键酶表达水平变化能够显著影响碳流量在代谢网络中的分配并改变目标产物合成效率,通过利用强组成型启动子替换转氨酶与苯丙酮酸脱羧酶基因的天然启动子提高基因表达量后,工程化酿酒酵母中 2-苯乙醇产量提高约 5 倍^[13]。在细胞代谢网络中苯乙醛除参与还原生成 2-苯乙醇外,在乙醛脱氢酶催化下被进一步氧化为苯乙酸形成竞争分支途径,对相关基因进行敲除能够减少副产物形成并增强目标产物积累,在酿酒酵母体系中实现约 40%的产量提升^[8]。针对乙醇脱氢酶基因的单过表达未观察到显著增产效果,研究结果显示上游中间代谢物供应能力及还原辅因子再生水平可能是限制代谢通量的重要因素^[8,11]。在马克斯克鲁维酵母与酿酒酵母体系中协同过表达关键脱羧酶与还原酶基因后 2-苯乙醇产量分别提高约 5 倍与 6.5 倍^[8,12]。进一步研究表明细胞内还原力供给能力对该途径同样具有重要影响,提高谷氨酸脱氢酶表达水平可增强细胞内还原辅因子再生并促进目标产物积累^[8]。细胞脂质合成过程对胞质中代谢中间体及还原力存在一定消耗,通过削弱相关脂质合成途径能够减少代谢竞争并增强碳流量导向 2-苯乙醇合成方向,在工程酵母体系中获得约 1.1 倍以上的产量提升^[14],相关研究为通过系统代谢调控提升 2-苯乙醇生物合成效率提供了重要依据。

艾氏途径与细胞氮代谢体系之间存在紧密联系,途径中的代谢通量受到多种转录调控因子的协同控制,相关结构基因的表达水平直接影响 2-苯乙醇的合成能力及其积累效率。*Aro80p* 属于典型锌指结构域转录调控蛋白,被认为是该代谢途径的重要转录激活因子,在芳香族氨基酸存在的诱导条件下能够特异性识别并结合转氨酶基因与苯丙酮酸脱羧酶基因启动子区域中的重复调控序列,进而促进目标基因的转录表达并提高芳香族氨基酸分解代谢相关酶系的合成水平^[15]。转氨酶基因与苯丙酮酸脱羧酶基因同时受到 GATA 家族转录激活因子 *Gln3p* 和 *Gat1p* 的调控作用^[16-17],该类转录因子属于氮代谢调控网络中的关键组成部分,其活性受氮分解代谢抑制机制调节并随细胞氮源状态变化而发生定位与功能转变^{[17][18]}。在氮源充足条件下相关转录因子主要分布于细胞质中而处于相对失活状态,氮源受限条件下则转移至细胞核内并启动一系列对氮源变化敏感的基因转录,包括转氨酶基因、苯丙酮酸脱羧酶基因以及含有 GATA 调控序列的氨基酸转运蛋白基因,由此增强 L-苯丙氨酸的跨膜转运效率并促进其向 2-苯乙醇的转化过程^[16]。

除氮代谢调控外,碳代谢调控体系同样参与艾氏途径的表达调节并对芳香族高级醇合成产生影响。*Cat8p* 属于锌簇型转录激活因子,能够识别碳源响应组件并诱导多种糖异生相关基因表达,在细胞碳源转变过程中发挥重要调控作用^[19-20]。*Mig1p* 则是葡萄糖抑制调控体系中的核心转录因子,在高葡萄糖条件下通过抑制多种代谢基因的表达维持碳代谢优先利用模式^[17]。相关研究表明上述两类调控因子能够参与 2-苯乙醇生物合成调控过程,通过增强 *Cat8p* 表达水平或削弱 *Mig1p* 抑制功能可显著提高转氨酶与苯丙酮酸脱羧酶的酶活水平,从而增强 L-苯丙氨酸向 2-苯乙醇转化的代谢效率并提高产物合成

量^[26]。

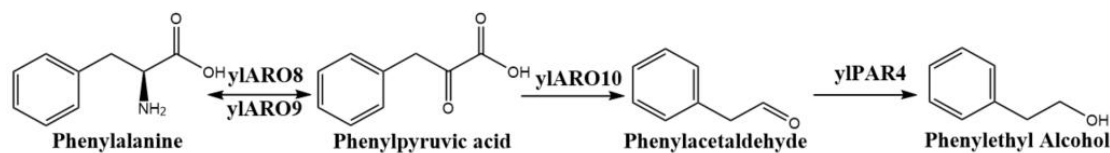


图 1-2 艾氏途径基因

Figure.1-2 Ehrlich pathway genes

1.3.2 莽草酸途径、苯丙酮酸途径

多数工程微生物能够通过艾氏途径将 L-苯丙氨酸转化为 2-苯乙醇并获得较高转化效率，L-苯丙氨酸作为外源添加底物价格较高且原料供应受限，难以支撑大规模工业生产过程中的成本控制与持续供给需求。酵母细胞具备以葡萄糖为唯一碳源经内源代谢网络从头合成芳香族化合物的能力。糖酵解途径的磷酸烯醇式丙酮酸与磷酸戊糖途径的 4-磷酸赤藓糖，经 3-脱氧-D-阿拉伯庚二酸 7-磷酸合成酶催化缩合生成 3-脱氧-D-阿拉伯庚二酸 7-磷酸，该中间体经莽草酸途径多步反应生成分支酸，再转化为苯丙酮酸，最后经脱羧和还原反应合成 2-苯乙醇，形成以葡萄糖为底物的芳香族高级醇从头生物合成途径。该代谢网络中 3-脱氧-D-阿拉伯庚二酸 7-磷酸合成酶与分支酸变位酶属于莽草酸途径关键限速酶，其活性受到 L-苯丙氨酸的负反馈调控，细胞内芳香族氨基酸积累导致关键酶活性降低并对碳流量进入莽草酸途径形成明显抑制^[21]。

针对负反馈抑制对代谢通量的限制，削弱或解除关键酶反馈调控被认为是提高 2-苯乙醇生物合成效率的重要策略。常见技术途径包括利用苯丙氨酸结构类似物进行抗反馈突变筛选获得耐受突变菌株，或通过基因工程手段构建关键酶抗反馈突变体并替换天然酶编码基因，使其在高浓度芳香族氨基酸环境中仍保持较高催化活性。相关研究已获得多种具有抗反馈特性的关键酶突变体，包括 3-脱氧-D-阿拉伯庚二酸 7-磷酸合成酶突变体与分支酸变位酶突变体，突变体在芳香族氨基酸存在条件下仍能够维持较高催化效率，通过提升途径限速步骤代谢通量显著增强细胞合成芳香族代谢产物的能力^[20,23-25]。

除关键酶反馈调控外，从头合成途径中前体物质供给不平衡同样构成重要代谢瓶颈。磷酸烯醇式丙酮酸与 4-磷酸赤藓糖以等摩尔比例参与缩合反应生成 3-脱氧-D-阿拉伯庚二酸 7-磷酸，细胞内 4-磷酸赤藓糖浓度远低于磷酸烯醇式丙酮酸，前体供给差异限制碳流向莽草酸途径分配并降低芳香族化合物生物合成效率。强化磷酸戊糖途径被认为是提升 4-磷酸赤藓糖供给能力的有效代谢工程策略，通过提高葡萄糖-6-磷酸相关异构酶与核糖-5-磷酸异构酶表达水平能够增强碳流进入磷酸戊糖途径并促进关键前体生成，从而提高整体代谢通量^[21]。相关研究表明提高核糖-5-磷酸异构酶表达水平能够促进碳源由糖酵解途径重新分配至磷酸戊糖途径并减少碳流回流至糖酵解途径，从而提高莽草酸等芳