

综述与专论

DOI: 10.11949/0438-1157.

木质素生物漏斗驱动芳香化学品绿色合成

杨晶茹^{1,2}, 王雨佳^{1,2}, 刘志华^{1,2}

(1 合成生物技术全国重点实验室, 天津 300072; 2 天津大学合成生物与生物制造学院, 天津 300072)

摘要: 木质素作为自然界储量最丰富的可再生芳香聚合物, 木质素“生物漏斗”路线通过多酶级联将结构各异的木质素解聚产物定向汇聚为少数或者单一平台化合物。系统综述了基于“生物漏斗”策略的木质素生物转化研究进展, 重点阐述了香兰素、原儿茶酸、对羟基苯乙烯等芳香化学品的合成途径与工程化策略, 并讨论了合成生物学、人工智能辅助酶工程和代谢调控等前沿技术在推动木质素生物转化应用中的关键作用。该综述有望为木质素生物转化合成高价值产物提供基础理论和关键技术支撑。

关键词: 木质素; 生物漏斗; 芳香化学品; 生物转化; 合成生物学

中图分类号: TQ 353

文献标志码: A

文章编号: 0438-1157 (XXXX) XX-0001-22

Lignin biological funneling drives green synthesis of aromatic chemicals

YANG Jingru^{1,2}, WANG Yujia^{1,2}, LIU Zhihua^{1,2}

(1 National Key Laboratory of Synthetic Biotechnology, Tianjin 300072, China; 2 School of Synthetic Biology and Biomanufacturing, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Lignin, as the most abundant renewable aromatic polymer in nature. The "biological funnel" pathway directs structurally diverse depolymerization products into a few platform compounds via multi-enzyme cascade. Recent advances in lignin valorization based on the biological funnel strategy are systematically reviewed, with an emphasis on the biosynthetic routes and engineering strategies for aromatic chemicals such as vanillin, protocatechuic acid, and 4-hydroxystyrene. Furthermore, the applications of synthetic biology, artificial intelligence, and enzyme engineering in pathway reconstruction and key enzyme modification are analyzed. To address challenges such as product toxicity and the low conversion efficiency of S-type monomers, future directions including adaptive evolution, intelligent enzyme design, and full-chain synergistic conversion are discussed. This review provides theoretical guidance and a technical reference for the systematic engineering of lignin biological funnel pathways.

Keywords: lignin; biological funneling; aromatic chemicals; bioconversion; synthetic biology

引言

生物制造已成为全球战略性新兴产业。据经

济合作与发展组织预测, 至2030年全球将有35%的化学品实现生物基替代, 但这一进程长期受限于芳香族碳源的结构性短缺。木质素是一类结构复杂

收稿日期: 2026-06-15 修回日期: 2026-07-21

通信作者: 刘志华(1987—), 男, 博士, zhliu@tju.edu.cn

第一作者: 杨晶茹(2002—), 女, 博士研究生, yangjr_2025@tju.edu.cn; 王雨佳(2003—), 女, 硕士研究生, yujiaaa@tju.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFC3403500)

引用本文: 杨晶茹, 王雨佳, 刘志华. 木质素生物漏斗驱动芳香化学品绿色合成[J]. 化工学报, XXXX, XX(XX): 1–22

Citation: YANG Jingru, WANG Yujia, LIU Zhihua. Lignin biological funneling drives green synthesis of aromatic chemicals[J]. CIESC Journal, XXXX, XX(XX): 1–22

的天然芳香族聚合物,由紫丁香基(S)、愈创木基(G)和对羟基苯基(H)三种苯丙烷结构单元经自由基耦合反应聚合而成^[1]。其分子结构单元之间以碳-氧键、碳-碳键等多种键型连接,分子链上含有丰富的甲氧基、羰基、羟基和羧基等活性官能团^[2]。木质素是木质纤维素生物质的三大核心组分之一,也是工业生物制造领域极具应用潜力的天然芳香族可再生原料。然而,其单体聚合形成的致密三维网状结构、分子间复杂的键合方式及固有的抗降解特性,导致资源潜力远未被充分挖掘^[3]。自然界中微生物经过亿万年进化,获得可以实现木质素生物转化代谢的完整途径,可将结构各异的木质素及其衍生物定向转化为高值化合物^[4]。因此,优化木质素生物转化路径不仅有望突破解聚产物组成分散的转化瓶颈,也为推动生物经济发展和实现“双碳”目标提供技术支撑^{[5][6]}。

目前,木质素生物转化已形成一条较为成熟的路线,包含胞外解聚、胞内定向转化与目标产物合成三个关键阶段^[7]。在胞外解聚阶段,生物法解聚主要依赖于漆酶、锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶、多功能过氧化物酶及脱色过氧化物酶等关键降解酶的协同作用,将复杂的大分子聚合物转化为可被微生物同化的小分子芳香族衍生物^[8]。随后,这些衍生物通过木质素分解菌株转运系统跨越细胞膜进入胞内,利用菌株特有的代谢网络进行分解代谢。在目标产物合成阶段,菌株以上述中间代谢物为前体,通过特异性的转化途径,定向产出各类高附加值精细化学品^[9]。“生物漏斗”路线是胞内定向转化阶段关键环节,通过多酶级联催化反应,将结构各异的芳香族解聚产物定向汇聚为原儿茶酸、儿茶酚或没食子酸等单一的芳香族平台化合物。这一完整的生物转化体系,不仅揭示了非粮生物质从复杂聚合物向单一化学品转化的内在机制,也为实现木质素资源的高效化利用提供了创新的解决思路^[10]。然而,尽管木质素生物转化策略具有显著优势,该策略的工程化构建仍面临诸多难题^[11]。首先,木质素复杂的异质聚合结构导致解聚产物呈高度混合性,天然菌株难以将结构繁杂的芳香族混合物高效汇聚为单一目标平台分子。其次,“生物漏斗”路线中关键酶系的催化效能不足,制约级联反应效率^[12]。最后,宿主代谢网络的复杂性导致调控目标产物合成的效率低下^[13]。因此,亟需通过重构“生物漏斗”路线、强化关键酶效能及调控细胞全局代谢

网络,以提高芳香产物的合成效率。针对木质素生物转化领域的上述瓶颈,本文主要系统综述“生物漏斗”路线在木质素生物转化中的应用。首先,系统总结异质木质素高值化利用的关键路线。接着,以不同微生物底盘,综述“生物漏斗”途径合成各类平台化合物生物的最新进展。然后,阐述合成生物学与人工智能等前沿技术在该转化体系优化升级中的核心作用。本综述以“生物漏斗”路线为基础,通过整合合成生物学与人工智能的前沿策略,为木质素生物转化体系中代谢通路的重构与关键酶元件的定向进化提供了具体的理论依据。上述三类瓶颈,包括产物混杂汇聚、关键酶催化效能不足和宿主代谢网络调控低效,分别对应漏斗途径的路线设计、催化元件改造和细胞全局调控三个层面的工程化挑战,后文将在各产物合成体系的具体案例与前沿技术应用中分别呈现针对性解决方案的突破进展。

1 异质木质素“生物漏斗”高值化利用路线

细胞外木质素解聚后,多种异质性的木质素衍生芳香化合物会被转运至木质素分解微生物细胞内,并通过“生物漏斗”路线代谢为关键中间产物。这些异质性木质素混合物通常由愈创木酚(G)、丁香酚(S)和羟基苯酚(H)亚单元组成。这些芳香族化合物的代谢首先经过漏斗式途径,生成中心芳香中间体,如原儿茶酸、儿茶酚或没食子酸^[14]。随后,这些芳香环中间体通过芳香环裂解途径进一步裂解,产生乙酰辅酶A和琥珀酰辅酶A,可以用于细胞生长并最终转化为高附加值产品。

H型木质素单元在小麦秸秆和玉米秸秆等禾本科生物质中含量丰富^[15]。对香豆酸(*p*-CA)通常代表木质素衍生的H型芳香族化合物。如图3粉色模块所示,细菌降解对香豆酸涉及四种途径,包括辅酶A依赖性 β 氧化途径、辅酶A依赖性非 β 氧化途径、辅酶A非依赖性途径以及脱羧途径^[16]。辅酶A依赖性 β 氧化途径广泛存在于变形菌门的部分细菌中,如芳香杆菌属、假单胞菌属及谷氨酸棒杆菌^[17]。该途径起始于对香豆酸辅酶A连接酶(PhdA)催化的辅酶A连接反应,生成羟基肉桂酰辅酶A硫酯;继而由烯酰辅酶A水合酶(PhdE)催化硫酯双键的水合反应,引入羟基;随后,羟基中间体经羟基酰基辅

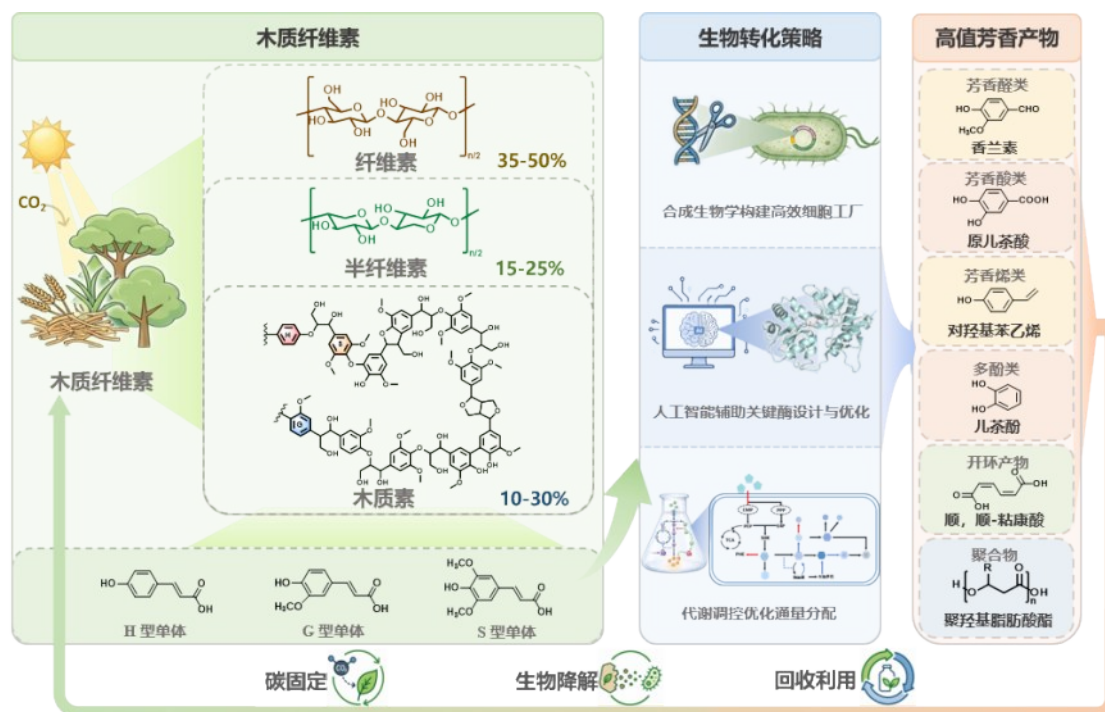


图1 木质素解聚与高值芳香产物合成的生物转化策略(植物通过光合作用固碳生成木质纤维素,包含纤维素、半纤维素和木质素,其中木质素由H、G、S三类苯丙烷单体构成。借助合成生物学构建工程菌株、AI优化催化酶、代谢调控分配通量等生物转化技术降解生物质,可产出芳香醛、芳香酸、芳香烯、开环衍生物、聚合物等多类高附加值芳香产物。最终产物完成资源化回收,形成生物质碳资源循环利用体系)

Fig. 1 Bioconversion strategies for targeted lignin depolymerization and high-value aromatic product synthesis (Plants synthesize lignocellulose via photosynthetic carbon fixation, which contains cellulose, hemicellulose and lignin consisting of H-, G-, S-type phenylpropane monomers. Biomass bioconversion adopts synthetic biology to fabricate engineered strains, artificial intelligence to refine catalytic enzymes, and metabolic regulation to redistribute carbon flux. This workflow produces high-value aromatics covering aldehydes, acids, olefins, ring-opened derivatives as well as polymers. Product recycling establishes a circular utilization system for biomass carbon resources)

酶A脱氢酶(PhdB)氧化生成酮基,最终被苯甲酰辅酶A裂解酶(PhaC)裂解生成苯甲酰辅酶A和乙酰辅酶A^[18]。研究在谷氨酸棒杆菌中鉴定了负责对香豆酸、阿魏酸和咖啡酸等苯丙烷类化合物利用的 phd 基因簇,证明该菌可通过Phd通路将对香豆酸导向4-羟基苯甲酸等中间体,进一步解析了羟基肉桂酸降解,证实对香豆酸和阿魏酸诱导相关降解基因,并通过辅酶A依赖性非 β 氧化途径进入4-羟基苯甲酸和原儿茶酸节点^[19]。辅酶A依赖性非 β 氧化途径分布于不动杆菌属、假单胞菌属、红球菌属及鞘氨醇菌属中。如图3中由对香豆酸经对羟基苯甲醛导向原儿茶酸的路径所示,在假单胞菌属中,该途径前两步反应与辅酶A依赖性 β 氧化途径相同;区别在于后续利用酰基辅酶A合成酶(Fcs)和烯酰-CoA水合酶(Ech)催化对香豆酸并形成羟基。该羟基中间体可直接经烯酰辅酶A水合酶直接裂解,生成对

羟基苯甲醛和乙酰辅酶A。对羟基苯甲醛随后在香兰素脱氢酶和4-羟基苯甲酸3-单加氧酶的催化下生成原儿茶酸,后者是木质素转化过程中的核心平台中间体之一^[20]。利用伯克霍尔德氏菌*Burkholderia glumae* BGR1中天然对香豆酸转化途径,通过删除 β -酮己二酸途径中降解对羟基苯甲酸的关键基因,实现对香豆酸向对羟基苯甲酸的积累量提高超过100倍,表明阻断下游芳环开裂可有效强化H型单体向芳香酸平台化合物的积累^[21]。在辅酶A非依赖途径中,H型芳香族化合物无需形成辅酶A硫酯即可生成羟基苯基- β -羟基丙酸,后者经氧化反应生成对羟基苯甲酸。芽孢杆菌属中H型芳香族化合物脱羧途径已得到深入研究。如图3中由对香豆酸经酚酸脱羧酶直接催化生成对羟基苯乙炔的路径所示,对羟基苯甲醛可被对羟基苯甲醛脱羧酶(pHBD)直接脱羧,生成对羟基苯乙炔和二

氧化碳。芳香族双加氧酶(Ado)能进一步催化对羟基苯乙烯生成对羟基苯甲醛。该途径已被用于生产对羟基苯乙烯。研究推测,脱羧途径也可能将对羟基苯甲醛转化为原儿茶酸,后者可进一步由原儿茶酸脱羧酶(AroY)催化,生成儿茶酚。对香豆酸可在酚酸脱羧酶催化下生成对羟基苯乙烯和二氧化碳,该路径已被用于对羟基苯乙烯的生物合成。从解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 中筛选得到对对香豆酸具有较高催化效率的酚酸脱羧酶(BAPAD),其 k_{cat}/K_m 可达到 $9.3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$,但表达酚酸脱羧酶(BAPAD)的重组大肠杆菌在单相体系中对香豆酸向对羟基苯乙烯的转化率仅为22.7%,主要受产物抑制限制^[22]。由此可见,H型单体转化效率不仅取决于核心降解酶活性,也受到产物毒性、下游降解竞争及底物与产物跨膜转运效率等因素共同影响。

G型木质素结构单元在生物质中分布广泛,尤其在软木类生物质中占比超过95%^[23]。阿魏酸通常作为典型的G型芳香族化合物代表。如图3蓝色模块所示,细菌对阿魏酸的代谢主要经由三条途径实现,包括辅酶A依赖性 β 氧化、辅酶A依赖性非 β 氧化、非氧化性脱羧。其中,辅酶A依赖性 β 氧化途径的关键酶系与前述H型对香豆酸的代谢酶系高度相似。以谷氨酸棒杆菌为例,首先对香豆酸辅酶A连接酶将阿魏酸活化生成阿魏酰辅酶A,随后经烯酰辅酶A水合酶/醛缩酶催化发生水合反应;生成的羟基中间体经羟基酰基辅酶A脱氢酶作用下氧化生成酮基,最终由苯甲酰辅酶A裂解酶裂解,生成香草酸与乙酰辅酶A^[24]。在假单胞菌属中,辅酶A依赖性非 β 氧化途径同样与对香豆酸代谢途径的酶系相同,并最终导向香草酸。通过分别插入失活恶臭假单胞菌KT2440中的阿魏酰辅酶A合成酶基因 fcs 、水合酶/醛缩酶基因 ech 和香草醛脱氢酶基因 vdh ,证明这三个基因分别参与阿魏酸活化、侧链裂解和香草醛氧化,是阿魏酸经香草醛转化为香草酸的关键功能模块^[25]。在香草醛生物制造方面,以恶臭假单胞菌KT2440为底盘,通过删除香草醛脱氢酶基因 vdh 并增强阿魏酰辅酶A合成酶基因 fcs 与水合酶/醛缩酶基因 ech 表达,构建了无质粒工程菌株,使阿魏酸向香草醛的摩尔产率在3 h内达到最高86%,且副产物水平较低,说明阻断香草醛再氧化并增强上游通量是提高G型单体定向转化效率的关键策略^[26]。近年来,该路径还与原位产物移除策略结合

用于缓解香草醛毒性。研究构建恶臭假单胞菌KT2440衍生菌株可由阿魏酸积累0.64 g/L香草醛,此前工程化恶臭假单胞菌由阿魏酸生产香草醛的最高报道滴度约为1.3 g/L,说明产物毒性和再催化仍是限制香草醛积累的主要瓶颈^[27]。在非氧化性脱羧途径中,如图3中阿魏酸经4-乙炔基愈创木酚转化为香兰素的路径所示,脱羧酶可催化阿魏酸生成4-乙炔基愈创木酚^[28],后者经乙炔基愈创木酚脱氢酶(VGDH)氧化生成香草醛,该途径已被成功重构于大肠杆菌中用于香草醛的生物合成。在异源重构方面,研究将阿魏酸脱羧酶与来源于惰性柄杆菌 *Caulobacter segnis* 的辅酶非依赖性类胡萝卜素裂解加氧酶2(Cso2)组合,在大肠杆菌中构建了辅酶非依赖的脱羧级联反应,使阿魏酸经4-乙炔基愈创木酚转化为香草醛,总体转化率可达到约80%^[29]。此外,有研究从萎蔫芽孢杆菌 *Bacillus atrophaeus* 中表征了新的酚酸脱羧酶(BaPAD),并利用表达酚酸脱羧酶(BaPAD)的大肠杆菌全细胞在双相体系中进行阿魏酸脱羧,实现高浓度4-乙炔基愈创木酚生产,进一步说明通过提高脱羧酶有机溶剂耐受性、热稳定性和双相传质效率,可显著改善G型单体向乙炔基芳香族化合物的生物转化。此外,在厌氧环境下,阿魏酸可通过侧链还原途径代谢,首先在芳香还原酶催化下生成二氢阿魏酸,再经脱羧酶催化生成乙酸和香草酸。通过上述多样化的代谢网络中,G型木质素衍生物均可转化为香草酸,并进一步经O-去甲基化酶(O-DML)催化生成原儿茶酸^[30]。如图3中香草酸经香草酸O-去甲基化酶(VanAB/LigM)转化为原儿茶酸的节点所示,研究通过在谷氨酸棒杆菌ATCC 21420中表达来源于高效棒杆菌 *Corynebacterium efficiens* 的香草酸脱甲基酶基因 $vanAB$,将阿魏酸经香草酸进一步转化为原儿茶酸,工程菌FVan在48 h内可将4.57 mM阿魏酸转化为2.87 mM原儿茶酸,摩尔产率为62.8%,补料转化体系中原儿茶酸产量达到6.91 mM,表明G型单体可作为原儿茶酸等芳香族平台化合物的有效前体^[31]。

S型木质素衍生物主要源于硬木及禾本科植物木质素的解聚过程。此类单元的芳香环上通常连有两个甲氧基,其典型代表化合物为丁香酸。丁香酸不仅是微生物生物转化中常用的碳源,也是S型木质素单体解聚后的主要产物^[11]。然而,受限于木质素分解菌的去甲基化能力不足,目前S型芳香族化合物的微生物代谢效率仍不尽人意^[32]。在已报道

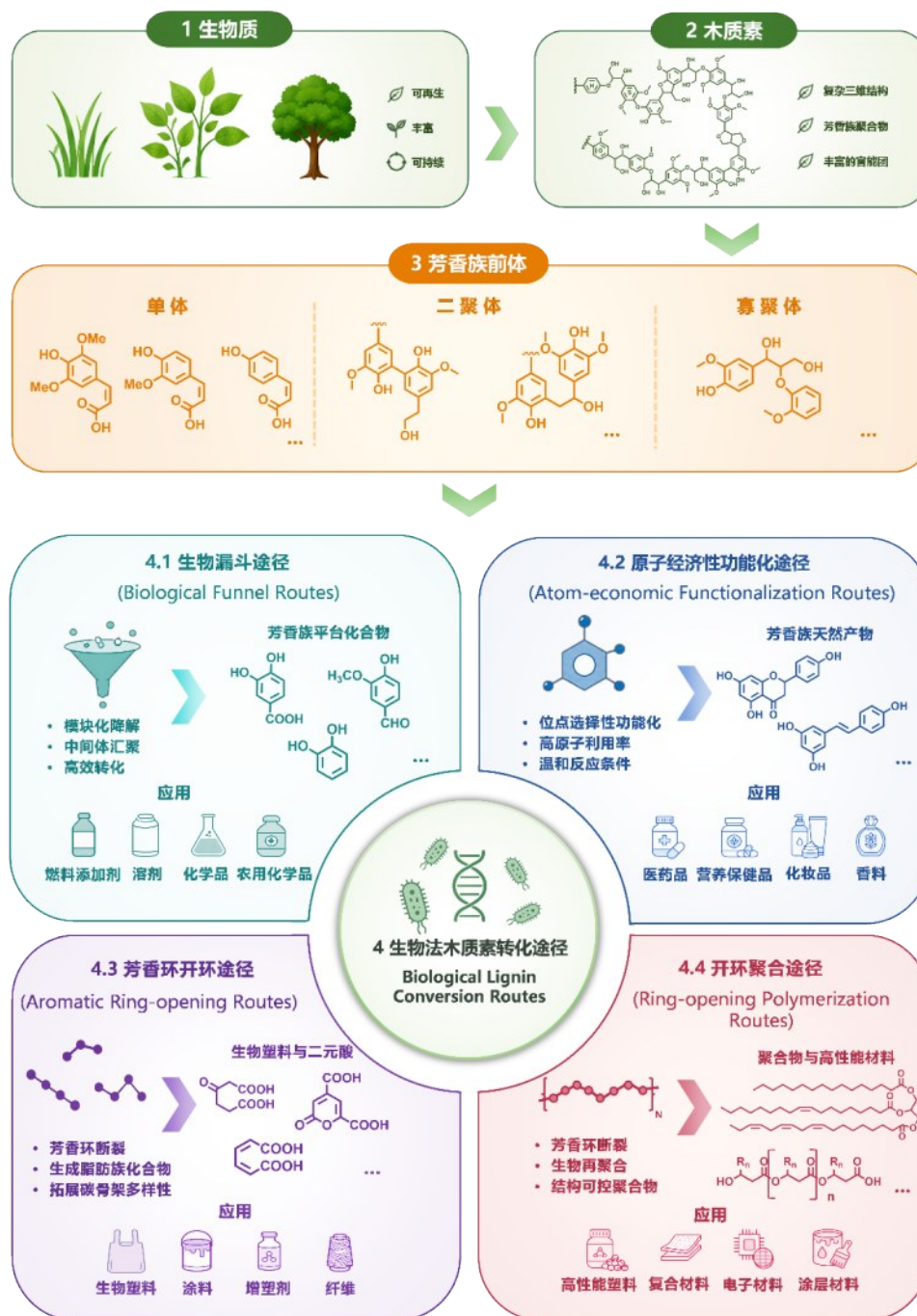


图2 利用生物法转化木质素分子获取高附加值产品(从路径分类维度,将木质素生物转化归纳为四种核心代谢路线,分别是“生物漏斗”路线、原子经济性功能化路线、芳香环开环路线以及开环聚合路线。四种路线在转化逻辑、催化策略、产物类型和应用方向上各有侧重,共同构成木质素高值化利用的完整体系)

Fig. 2 Exploiting biological lignin conversion routes (BCLRs) to obtain value-added products from lignin valorization (From a pathway-classification perspective, lignin bioconversion can be categorized into four core metabolic routes, namely the biological funneling route, the atom-economic functionalization route, the aromatic ring-opening route, and the ring-opening polymerization route. These four routes differ in their transformation logic, catalytic strategies, product types, and application directions, collectively constituting a comprehensive system for the high-value utilization of lignin)

的菌种中,鞘氨醇单胞菌属是研究最为深入的S型芳香族化合物降解菌株。如图3黄色模块所示,该菌降解丁香酸的途径始于四氢叶酸依赖性O-去甲

基化酶催化的反应,生成3-甲氧基没食子酸(3MGA)。随后,3-甲氧基没食子酸通过生成3-甲氧基没食子酸,再经四氢叶酸依赖性O-去甲基化酶

(LigM)催化再次去甲基化生成没食子酸;而在降解途径中,3-甲氧基没食子酸与没食子酸共同构成了丁香酸代谢的两个核心中间体^[33]。鞘氨醇单胞菌 SYK-6 中四氢叶酸依赖型 O-去甲基化酶(LigM)的基因功能研究表明,其对香草酸和丁香酸代谢至关重要,相关突变会显著影响菌株对这些甲氧基芳香酸的利用,说明 O-去甲基化是 S 型单体生物漏斗转化的关键限速步骤。近年来, S 型芳香族代谢研究进一步从通路解析拓展到转录调控和转运强化层面。研究利用定量 RT-PCR 发现,鞘氨醇单胞菌 SYK-6 中参与香草酸及丁香酸代谢的丁香酸 O-脱甲基酶(DesA)、四氢叶酸依赖型 O-去甲基化酶(LigM)和没食子酸双加氧酶(DesB)在香草酸和丁香酸诱导下转录水平提高 5.8 至 37 倍,并鉴定了 MarR 型调控因子 DesR。后续研究进一步证明,编码丁香酸 O-去甲基化酶基因 *desA* 受 IclR 型调控因子 DesX 调控,表明 S 型单体代谢不仅受酶催化效率影响,也受到底物诱导和转录调控网络的限制^[34]。除胞内去甲基化外,芳香酸转运也会影响 S 型单体转化速率。已有研究证明鞘氨醇单胞菌 SYK-6 中的 MFS 家族转运蛋白 PcaK 不仅参与原儿茶酸和香草酸摄取,也介导 4-羟基苯甲酸、丁香酸和阿魏酸摄取, PcaK 缺失使丁香酸转化能力在 90 min 内降至野生型的 46%,而在 pH 9.0 条件下丁香酸转化速率进一步降至野生型的 14%;相反,提高 *Sl-pcaK* 表达可使丁香酸、香草酸和阿魏酸转化速率分别提高约 1.33、1.31 和 1.13 倍。这些定量结果说明,提高 S 型单体转化效率不能仅依赖 O-去甲基化酶的挖掘,还需同步优化芳香酸摄取、底物诱导表达和下游开环代谢^[35]。除鞘氨醇单胞菌 SYK-6 外, *Rhodococcus jostii* RHA1 等菌中也发现了参与甲氧基芳香族化合物降解的 O-去甲基化和芳环开裂酶系,且部分酶表现出底物谱重叠和功能冗余,提示通过挖掘跨属来源的去甲基化模块并进行组合表达,可能是提高 S 型木质素单体转化效率的重要策略^[36]。

上述研究结果表明,木质素分解菌能够利用“生物漏斗”路线将三种类型的木质素衍生芳香族化合物转化为关键中间体。图 3 以三种颜色模块系统汇总了上述三类单体的完整代谢网络,清晰地呈现了各条途径的底物、酶系、中间体及汇聚节点。如前所述,不同木质素分解菌对木质素衍生芳香族化合物存在显著的代谢偏好性,这可能源于其酶系组成与代谢通路的差异。目前,尚无单一菌株能够

同步高效代谢所有类型的木质素衍生芳香族化合物;即便某些菌株具备代谢不同芳香族化合物的通路,三类化合物也难以同时实现高效的同速转化。因此,利用合成生物学等前沿技术,设计与调控针对这三类木质素单元的“生物漏斗”路线,是突破当前细菌木质素转化瓶颈的必要策略。

2 微生物转化木质素制备高价值芳香平台化合物

基于生物漏斗策略提供的代谢汇聚体系,结合经筛选与理性设计的适配性微生物底盘,木质素生物转化可实现一系列平台化合物的高效生物合成。目前,相关研究围绕该转化体系下几类核心产物的高效合成,已取得系列重要研究进展。

2.1 木质素基芳香醛类化合物生物合成

以香兰素为代表的芳香醛类化合物作为全球产量最高的香料单体及关键的医药合成中间体,其市场需求巨大。目前,芳香醛类化合物的生产主要依赖于不可再生的石化原料或者通过天然植物提取,存在过程不环保以及原子经济性差等问题。因此开发绿色高效的生物制造路线可满足可持续发展以及绿色制造产业升级。利用木质素作为生产芳香醛的原料可充分利用其独特的资源禀赋。目前香兰素的生物合成主要依托三类微生物底盘展开。

在利用天然木质素降解菌合成香兰素的代谢工程中,核心策略是强化内源木质素单体转化网络并阻断产物降解支路,以积累目标芳香化学品。以假单胞菌为底盘,针对对香豆酸、阿魏酸和香草酸三种主要解聚单体,研究进行了系统的工程改造。在荧光假单胞菌 BF13 中,通过靶向失活香兰素脱氢酶编码基因 *vdh*,并表达阿魏酰辅酶 A 合成酶基因 *fcs* 与水合酶/醛缩酶基因 *ech*,赋予菌株积累香兰素的能力,将该途径导入恶臭假单胞菌并以 *tac* 启动子表达,3 h 内摩尔转化率即达 86%,并且副产物极少^[25]。为进一步提升底盘性能,研究通过适应性实验室进化(ALE)对恶臭假单胞菌进行预优化,在选择性压力下获得的进化菌株携带香草酸 O-脱甲基酶基因 *vanB*、甲酰亚胺谷氨酸水解酶基因 *fghA* 及全局调控因子的协同突变,其香草酸代谢通量提升 5 倍,为后续途径工程提供了高耐受性、代谢通畅的出发菌株^[37]。基于该进化底盘,系统代谢工程通过

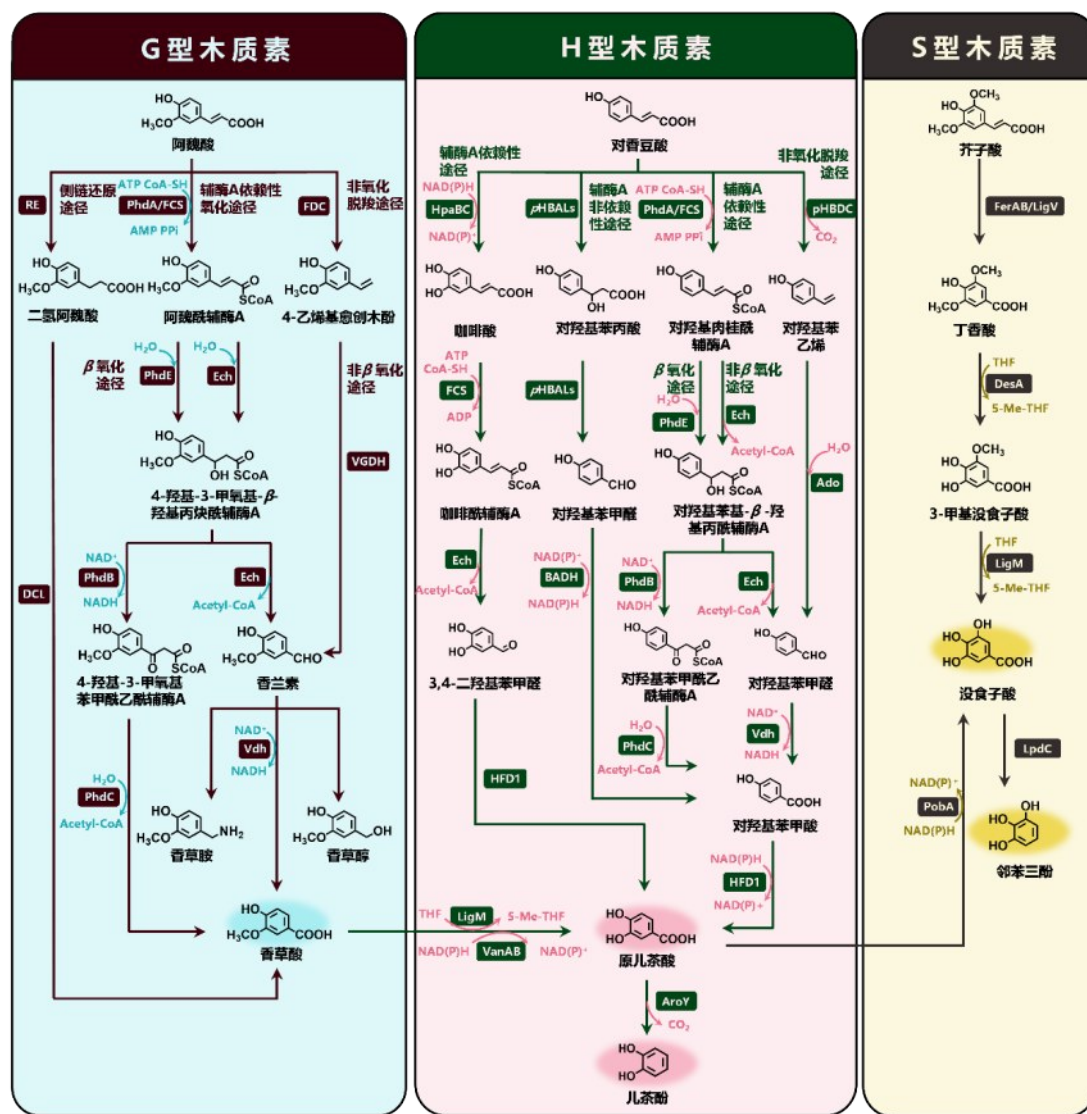


图3 木质素生物漏斗路线生产芳香平台化合物(蓝色、粉色及黄色模块分别代表G型、H型及S型木质素单体在菌株中的代谢途径)

Fig. 3 Biological funneling pathway of lignin for the production of aromatic platform chemicals (Blue, pink, and yellow modules represent the metabolic pathways of G-, H-, and S-type lignin monomers in engineered strains)

敲除原儿茶酸开环关键基因 *pcaGH* 阻断前体旁路代谢,敲除香兰素脱氢酶基因 *vdh* 抑制产物降解,并优化香草酸 O-脱甲基酶 (VanAB) 的表达,将碳流导向香兰素合成,产量达 4.47 g/L。为提高转化效率,后续研究对内源阿魏酰-CoA 合成酶/水合酶-醛裂解酶 (FCS-ECH) 操纵子的核糖体结合位点进行理性设计并共表达分子伴侣 GroEL/GroES,使关键酶复合体的催化效率提升了 2.6 倍;同时系统敲除 8 个醛类降解相关基因含醛还原酶基因 *areA* 及钼酸盐转运蛋白簇,彻底阻断钼辅因子依赖与非依赖的两条产物降解途径。结合树脂原位吸附缓解产物抑制,摇瓶水平下阿魏酸到香兰素的摩尔转化率超

90%^[38]。该系列研究完整展现了从底盘预适应、途径重构到降解网络根除的系统工程逻辑,为利用天然降解菌实现木质素单体的高值化转化提供了清晰的技术范式。

在以红球菌为底盘合成香兰素的研究中,首先针对红球菌内源 P450 酶 (PbdA),在 Ser87 与 Ser237 位点引入定点突变以重塑底物结合口袋,首次实现该酶对香草醛、对甲氧基苯甲醛等醛类底物的高效脱甲基催化,为香兰素的一步法合成提供了全新的酶催化工具^[39]。随后,通过敲除浑浊红球菌 RHA1 的香兰素脱氢酶基因 *vdh*,阻断了香兰素向香草酸的转化。以小麦秸秆木质纤维素为底物,经“一锅

法”发酵即获96 mg/L香兰素,首次证明了从天然木质纤维素直接生物合成香兰素的可行性。进一步研究发现,大量香兰素被内源还原酶还原为香草醇。通过敲除关键香兰素还原酶基因*Pd630_LPD03722*并引入外源香兰素脱氢酶,以香兰素为底物时粘康酸的摩尔产率从10%大幅提升至97.8%^[40]。松柏醇脱氢酶基因*calA*与松柏醛脱氢酶基因*calB*,以及香草醇氧化酶基因*vaoA*,构建了从丁香酚经阿魏酸再到香兰素的完整级联代谢通路,显著拓宽了木质素解聚单体的转化范围^[41]。上述工作从催化元件开发、代谢网络重塑及底物谱拓展等方面,证实了红球菌作为木质素源香兰素合成底盘的系统潜力。

鉴于天然菌株内源代谢网络复杂,在遗传背景清晰、抑制物耐受性强的模式工业菌株酿酒酵母中从头构建简化的人工生物漏斗途径成为另一条重要技术路线。研究首先通过系统性敲除醛还原酶基因*ari1*、醛酮还原酶基因*gre2*与醛脱氢酶基因*hfd1*,构建了可稳定积累香兰素及其前体的底盘菌株。在此基础上,引入以阿魏酸和对香豆酸为底物的香兰素合成途径,过表达4-香豆酰辅酶A连接酶基因*4cl*与烯酰-CoA水合酶基因*ech*,实现了底物的定向转化。为突破限速步骤,进一步耦合蛋白质工程与代谢调控策略,采用柔性连接肽将羟基化酶组分HpaC与HpaB融合表达,并强化S-腺苷甲硫氨酸循环以保障甲基供体供给,香兰素最高产量达2.49 mM。随后,通过构建己糖与戊糖的协同利用途径并协同调控分支酸与莽草酸途径,首次实现了酿酒酵母对葡萄糖、木糖与木质素单体的同步代谢,以玉米秸秆水解液为底物获得1.97 mM的香兰素。后续研究构建了工程化酿酒酵母全细胞催化剂,经过培养基成分与转化条件系统优化,在分批补料发酵中香兰素产量达15.3 mM,约2.32 g/L,摩尔产率71%^[42]。引入壳聚糖膜介导的原位产物分离(ISPS)技术,利用膜上氨基与香兰素醛基形成席夫碱实现特异性捕获与洗脱有效缓解产物抑制,产量提升2.6倍;最终,以麦麸提取的真实木质素水解液为底物进行验证,香兰素滴度达21.1 mM,相当于每克麦麸产1.8 mg香兰素,为木质素基香兰素的工业化生产提供了高效、可放大的技术路径^[43]。综上所述,通过底盘代谢背景精简、途径重建、辅因子工程及原位产物分离技术的系统集成,酿酒酵母成功实现了从木质素单体到香兰素的高效定向转化,展现了模式工业菌株在木质素芳香化学品合成中

的巨大潜力。

目前,香兰素的生物合成研究已从早期的单一路径功能验证,发展至多底盘细胞中融合途径重构、代谢网络调控与酶工程定向改造的系统优化阶段。然而,目前微生物合成香兰素领域仍存在一些問題。多数高效合成体系严重依赖价格较高的纯化单体作为底物,对真实的木质素原料的适配性和转化效率仍有待突破。此外,产物香兰素对宿主细胞固有的毒性抑制作用,以及其在内源代谢网络中易被降解的问题仍是限制最高产量和生产率的关键瓶颈。此外,微生物底盘代谢网络复杂,导致对合成途径进行理性设计和优化成为主要难点。针对上述问题,未来研究可从以下几个方面寻求突破。在原料利用层面,需着力开发能直接高效利用木质素粗原料或复杂水解液的菌株与体系,其中涉及构建具有广谱底物利用能力的工程酶、设计解聚菌株与转化菌株分工协作的混菌体系等。在宿主细胞层面,必须系统性研究解聚产物抑制与降解问题,具体策略包括通过蛋白质工程理性设计或敲除内源降解酶编码基因以阻断副反应,利用适应性进化与外排泵过表达等策略强化宿主耐受性,并结合原位分离耦合发酵等工艺解除产物抑制。在代谢网络层面,应避免对单一途径的简单叠加,充分利用基因组尺度代谢模型与多组学分析等工具理性地识别瓶颈,并通过模块化工程与动态调控策略对细胞生长、产物合成途径、竞争途径之间的关系进行平衡。最终,面向产业化应用,将上述合成生物学改造策略与适配复杂原料的发酵工艺、反应器设计及高效回收工艺进行多尺度整合实现香兰素合成的全过程优化。

2.2 木质素基芳香酸类化合物生物合成

在木质素“生物漏斗”代谢途径中,原儿茶酸与对羟基苯甲酸是密切联系的两类芳香酸产物。原儿茶酸处于“生物漏斗”路线的核心汇聚节点,可由G/H/S三类木质素单体通过各自代谢支路汇聚而得。对羟基苯甲酸则位于H型单体代谢支路的下游节点,在对羟基苯甲酸羟化酶催化下进一步羟化为原儿茶酸。基于此,本节先以原儿茶酸为对象,再以对羟基苯甲酸为对象,系统综述二者在天然降解菌与模式工业菌株两类底盘中实现多类型单体汇聚的工程化策略。

原儿茶酸是木质素“生物漏斗”路线定向汇聚的核心芳香平台化合物,更因其兼具抗氧化、抗菌

表 1 通过“生物漏斗”路径微生物利用异质木质素衍生物合成芳香醛

Table 1 Aromatic aldehydes transformed from heterogeneous lignin derivatives via microbial “biological funnel” pathways

芳香化 学品	宿主菌株	底物	基因	工程化策略	产量	产率	参考 文献
香兰素	荧光假单胞菌 BF13	阿魏酸	<i>vdh; fcs; ech</i>	1. 靶向失活香兰素脱氢酶基因 <i>vdh</i> 2. 过表达阿魏酰辅酶 A 合成酶基因 <i>fcs</i> 与水合酶/醛缩酶 <i>ech</i>	8.41 mM	—	[36]
香兰素	恶臭假单胞菌	阿魏酸		1. 过表达阿魏酰辅酶 A 合成酶基因 <i>fcs</i> 与水合酶/醛缩酶基因 <i>ech</i> 2. 使用强启动子 <i>tac</i> 表达途径基因	—	86%	[25]
香兰素	恶臭假单胞菌	对香豆酸 阿魏酸		适应性实验室进化	—	—	[37]
香兰素	恶臭假单胞菌 KT2440	阿魏酸	<i>Vdh; vanAB; calA; PP_3827 - 3832</i>	1. 敲除香兰素脱氢酶基因 <i>vdh</i> 、香草酸 O-脱甲基酶基因 <i>vanAB</i> 、松柏醇脱氢酶基因 <i>calA</i> 及钼酸盐转运蛋白簇 <i>PP_3827 - 3832</i> 2. 引入非 CoA 依赖型通路 3. 利用 SpyTag/SpyCatcher 系统	4.47 g/L	—	[38]
香兰素	红球菌 HR199	丁香酚 阿魏酸	<i>calA; calB; vaoA</i>	引入松柏醇脱氢酶基因 <i>calA</i> 、松柏醛脱氢酶基因 <i>calB</i> 及香草醇氧化酶基因 <i>vaoA</i>	—	—	[40]
香兰素	酿酒酵母	阿魏酸/对 香豆酸	<i>ARI1; GRE2; HFD1; 4CL; ech; HpaC; HpaB</i>	1. 敲除醛还原酶基因 <i>ARI1</i> 2. 过表达 4-香豆酰辅酶 A 连接酶基因 <i>4CL</i> 与烯酰-CoA 水合酶基因 <i>ech</i> 3. 采用柔性连接肽融合表达等	2.49 mM 1.97 mM	—	[40]
香兰素	酿酒酵母	真实木质 素水解液		1. 构建工程化全细胞催化剂 2. 优化培养基成分与转化条件 3. 引入壳聚糖膜介导的原位产物分离技术	21.1 mM	1.8 mg/g	[43]
香兰素	嗜木质素芽孢 杆菌 L1	麦秆	<i>vdh</i>	敲除香兰素脱氢酶基因 <i>vdh</i>	352 mg/ L	—	[96]
香兰素	短小芽孢杆菌 ZB1	异丁香酚、丁香酚、香草醇		将菌株置于基础培养基中培养 24 小时	71.99 mg/L	61.1%	[98]
香兰素	桑南链霉菌 MTCC 6637	脱淀粉小麦麸		对阿魏酸酯直接进行生物转化	0.708 g/ L	—	[99]
香兰素	脓肿分枝杆菌	香草酸		异源表达并测试十四种肉桂酰辅酶 A 还原酶 (CARs)	2.86 g/L	—	[100]
香兰素	梭形芽孢杆菌 CGMCC1347	异丁香酚		1. 从土壤中分离出新型梭形芽孢杆菌菌株 CGMCC1347 2. 通过添加 HD-8 树脂避免产物抑制	8.10 g/L	78.4%	[101]

和抗炎等多种生物活性。目前,其生产主要依赖于从植物中提取或利用石油基原料化学合成,存在收率低及成本高等问题。木质素结构单元本身含有合成原儿茶酸所需的芳香环骨架,是合成原儿茶酸理想且廉价的生物基原料。然而,木质素结构的高度复杂性与解聚产物的异质性阻碍其定向高效转化为单一目标产物。当前研究的核心技术路线是依托“生物漏斗”路线,并聚焦于关键酶催化的定向脱甲基化与羟化反应,将结构各异的木质素衍生物单体高效转化为原儿茶酸。目前,构建高效合成原儿茶酸的微生物细胞工厂主要围绕两类底盘微生物深入展开。

在天然木质素降解菌底盘中,以恶臭假单胞菌

为宿主的研究成果显著。该菌内源的香草酸 O-脱甲基酶(VanAB)是催化 G 型木质素单体转化的核心限速酶。研究通过敲除原儿茶酸开环降解基因 *pcaHG*、过表达香草酸 O-脱甲基酶基因 *vanAB* 并重构甲醛代谢途径,敲除全局调控因子 Crc 消除分解代谢物阻遏、并利用不同强度的启动子精细调控限速酶基因 *pobA* 与 *vanAB* 的染色体整合表达,成功消除了中间体对羟基苯甲酸和香草酸的积累;构建的无质粒工程菌株 PCA1601 在 H/G 型木质素单体混合物中产生 22.7 mM 原儿茶酸,摩尔产率 94.5%,补料分批发酵进一步提升至 113.6 mM,并在真实木质素水解液中展示了 2.4 g/L 的实际转化能力,实现了从木质素流到单一芳香平台化合物的高效生物漏

斗转化^[44]。针对S型木质素单体代谢瓶颈,研究通过染色体水平组成型表达香草酸O-脱甲基酶基因*vanAB*构建了Sy-1菌株,使其在丁香酸为唯一碳源的环境下实现生长,并进一步通过适应性实验室进化将生长速率提升7倍,基因组测序与反向工程揭示了*agmR*、*gbdR*等多个关键调控位点的突变,证实了香草酸O-脱甲基酶VanAB介导的S型底物去甲基化途径的可行性,为三种木质素类型的同步转化奠定了酶学基础^[45]。

红球菌属凭借其卓越的芳香族化合物耐受性与高度互联的天然降解网络,已成为木质素解聚单体高值化转化的特色底盘。早期研究通过阻断内源性原儿茶酸3,4-双加氧酶编码基因并异源导入原儿茶酸4,5-双加氧酶基因,成功将原儿茶酸的代谢流向从 β -酮己二酸途径重定向至2,4-吡啶二羧酸合成支路,利用小麦秸秆木质纤维素为底物实现了330 mg/L的产物积累,较原始菌株提升近3倍,不仅证实了原儿茶酸作为木质素降解枢纽中间体的可行性^[46]。在此基础上,针对遗传操作系统尚不完善的菌株,研究开发了基于选择性羟肟酸类酶抑制剂的化学干预策略,利用对原儿茶酸3,4-双加氧酶具有高抑制活性的小分子D13,在不进行基因编辑的前提下直接阻断原儿茶酸的开环降解,成功在野生型菌株中实现原儿茶酸的积累,这种无需遗传操作即可精准调控代谢通量的方法,为木质素降解菌的代谢调控提供小分子开关^[47]。之后的研究首次在菌株红球菌*Rhodococcus jostii* RHA1中发现并完整解析了一条以羟基氢醌为核心的原儿茶酸替代代谢途径,通过基因敲除证实经典途径阻断后该菌仍能代谢原儿茶酸,进而鉴定出中间代谢物羟基氢醌,并成功定位与功能验证了关键基因簇*ro01857*–*ro01860*,体外重构了其编码的单加氧酶与脱羧酶协同催化原儿茶酸转化为羟基氢醌的关键步骤,这一发现证明原儿茶酸–羟基氢醌这一新节点可作为代谢工程的全新改造靶点^[48]。

在模式工业菌株中构建人工途径也取得了成功。在大肠杆菌中构建以油棕空果串木质素衍生物为底物的全细胞催化系统,通过整合阿魏酰辅酶A合成酶/烯酰辅酶A合成酶(*Fcs*/*Ech*)–香草酸O-去甲基化酶(*VanAB*)–4-羟基苯甲酸3-单加氧酶(*PobA*)途径,实现将香草酸、阿魏酸、对香豆酸等多种G型和H型芳香族化合物汇聚为对香豆酸,在模拟天然比例的底物混合物中实现了400 mg/L的产

量^[49]。以高产莽草酸菌株*E. coli* SA09为底盘,阻断莽草酸积累,使前体3-脱氢莽草酸(DHS)在30L发酵罐中积累达126.4 g/L^[50]。之后研究以大肠杆菌*E. coli* SA09为出发菌株,筛选高活性3-脱氢莽草酸脱水酶(*ApAroZ*),并通过分子动力学模拟进行定点突变(R363A),缓解了产物抑制,结合适应性实验室进化(ALE)和基于生物传感器的高通量筛选,最终在5 L发酵罐中,原儿茶酸滴度达46.65 g/L,葡萄糖产率0.23 g/g^[51]。值得注意的是,上述两项研究均主要验证了H型和G型单体的高效转化,对于S型单体的转化仍需引入额外的去甲基化酶,如鞘氨醇单胞菌*Sphingobium sp.* SYK-6的原儿茶酸4,5-双加氧酶(*LigAB*)以实现3-O-甲基没食子酸到原儿茶酸的转化。

研究在酿酒酵母中系统构建木质素单体向原儿茶酸的“生物漏斗”途径。首先通过敲除乙醇脱氢酶6(*ADH6*)、乙醇脱氢酶7(*ADH7*)等副产物代谢基因构建底盘菌株,并引入源自欧芹的4-香豆酸辅酶A连接酶(*4CL*)、恶臭假单胞菌的烯酰辅酶A水合酶(*Ech*)及香草醛脱氢酶(*Vdh*)组成的辅酶A依赖非 β -氧化途径,实现了对香豆酸(H型)向原儿茶酸的转化,产量125 mg/L;针对G型单体阿魏酸路径中香草酸O-去甲基化酶(*LigM*)受四氢叶酸(THF)代谢限制的瓶颈,通过过表达同型半胱氨酸甲基转移酶(*MET6*)、敲除同型半胱氨酸S-甲基转移酶(*MHT1*)/S-腺苷甲硫氨酸合成酶(*SAM4*)及引入外源5-甲基四氢叶酸脱氢酶(*Metf1*)重构辅因子循环,使G型单体的原儿茶酸产量提升5倍至60 mg/L;最终通过多拷贝整合4-羟基苯甲酸3-单加氧酶(*PobA*)及代谢调控模块,实现了H型与G型单体的协同转化,并在真实的碱性木质素预处理液中验证了工艺可行性,原儿茶酸产量达810 mg/L^[52]。

在木质素生物漏斗途径中,对羟基苯甲酸是由H型单体定向转化而来的关键芳香中间体,是合成香兰素等高值化学品的重要前体。目前,其工业生产主要依赖于不可再生的石油基原料甲苯、苯酚等进行化学合成,面临过程能耗高、选择性低及环境压力大等问题。因此发展以可再生资源为原料的生物制造路线对于实现化学品绿色生产具有重要意义。木质素结构单元中富含可直接导向对羟基苯甲酸合成的对羟基肉桂醇结构,是合成该产物的天然前体。当前研究的核心技术在于构建“生物漏斗”路线,通过微生物细胞工厂内高度特异性的酶

催化网络,将木质素解聚产生的结构多样的H型及其他相关芳香单体,高效、专一汇聚为对羟基苯甲酸。近年来,基于不同微生物底盘的途径构建已取得重要进展。

假单胞菌因具备完整的芳香代谢网络,是该领域研究最广泛的底盘。研究系统阐明了野生型恶臭假单胞菌KT2440中H型木质素单体向4-对羟基苯甲酸的天然汇聚机制,证实对香豆酸、对羟基苯甲醛和对羟基苯甲酸通过Fcs/ Ech/ Vdh途径分别在4-对羟基苯甲酸节点汇聚,摩尔转化率分别达97.7%、98.5%和93.1%。在真实木质素流验证中,玉米芯水解液经工程菌株转化产生253.88 mg/g原儿茶酸,产率70.85%,为后续敲除对羟基苯甲酸羟化酶基因*pobA*将4-对羟基苯甲酸截获为终产物提供了理论基础。类似地,以台湾假单胞菌VLB120中敲除对羟基苯甲酸羟化酶基因*pobA*和4-羟苯丙酮酸双加氧酶*hpd*基因以消除降解支路和代谢旁路,并结合启动子工程强化前体供应,可使工程菌利用木质素衍生单体在补料分批发酵中生产3.8 g/L的对羟基苯甲酸^[53]。之后一系列研究从分子机制到系统代谢层面揭示了恶臭假单胞菌KT2440中4-对羟基苯甲酸积累的代谢逻辑,首先通过生化分析与X射线晶体结构解析证实,对羟基苯甲酸羟化酶(PobA)严格依赖NADPH且完全无法利用NADH,导致高通量条件下NADPH供不应求,进而造成4-对羟基苯甲酸积累;随后的多组学全景分析进一步发现以4-对羟基苯甲酸为碳源时对羟基苯甲酸羟化酶表达上调超200倍,同时细胞通过丙酮酸羧化酶(Pyc)上调30倍及乙醛酸分流激活实现代谢重塑,产生50%–60% NADPH与6倍ATP盈余,并通过¹³C示踪验证了多种底物共存时的碳通量分配规律,共同为敲除对羟基苯甲酸羟化酶基因*pobA*截获4-对羟基苯甲酸终产物提供了理论链条^[56]。

大肠杆菌虽缺乏天然木质素代谢途径,但凭借清晰的遗传背景,可通过异源途径实现定向转化。研究采用模块化策略。整合了木质素衍生物转化模块、莽草酸途径强化模块与对羟基苯甲酸合成模块。通过异源表达关键酶并强化合成通量,最终工程菌株以阿魏酸与对香豆酸混合底物发酵,产量达8.7 g/L,转化率达89%。酿酒酵母凭借其真核表达系统与发酵稳定性,成为另一理想宿主。一项以酿酒酵母为底盘构建能将H型和G型木质素单体统一转化为原儿茶酸的研究中,对羟基苯甲酸是该途径

的关键中间体,通过异源表达假单胞菌来源的*fcs*、*ech*、*vdh*基因构建辅酶A依赖非 β 氧化途径,可将对香豆酸转化为对羟基苯甲醛,进一步氧化为对羟基苯甲酸,接着被引入的对羟基苯甲酸羟化酶(PobA)羟化生成原儿茶酸,并敲除多个副产物合成基因,首次在酵母中构建了针对木质素单体的对羟基苯甲酸人工生物漏斗途径^[51]。

目前原儿茶酸的生物合成研究已形成针对不同底盘特性的差异化策略。对假单胞菌等天然菌株,重在强化内源代谢网络与关键酶系;对酵母、大肠杆菌等模式底盘,则侧重异源合成途径的从头构建与关键酶的异源表达优化。然而,该领域仍存在若干瓶颈。从木质素到原儿茶酸的“生物漏斗”途径较长,多步氧化还原反应涉及辅因子NADPH、O₂等,其整体热力学效率与代谢通量存在固有约束。合成的原儿茶酸自身化学性质活泼,在发酵体系中易发生非酶促氧化或聚合,导致产物损失并增加下游分离纯化的难度。且目前多数研究仍以模型底物为起点,工程菌株对真实木质素水解液中复杂不稳定的芳香混合物的耐受性与转化效率严重不足。未来的研究针对途径长、辅因子依赖性高的问题,可通过构建与关键酶空间偶联的工程化辅因子再生模块,并利用蛋白质工程改造关键酶的辅因子偏好性,以提升整体热力学效率。针对产物易降解的问题,最有效的策略是开发原位产物稳定化技术,例如在发酵过程中耦合原位吸附分离,或通过酶法将其即时转化为更稳定的衍生物。为提升对真实木质素水解液的适应性,可用复杂原料直接驯化工业菌株,并解析其耐受性机制加以强化。总而言之,突破原儿茶酸生物合成的现有瓶颈,不仅将直接获得一种高价值的生物基化学品,更能验证并完善从非均相生物质到化学品的生物漏斗策略,推动整个生物炼制产业的成熟。

在对羟基苯甲酸的生物合成研究中,针对大肠杆菌底盘的研究侧重于系统代谢工程改造与动态调控,以优化整体通量;而酿酒酵母底盘则利用其真核系统优势,侧重于异源途径的从头构建与整合验证。然而,现有体系仍面临独特挑战。对羟基苯甲酸的酸性会导致胞内pH失衡,在大肠杆菌中尤为突出,将直接抑制细胞生长。且工程菌对真实木质素水解液中复杂的H型单体混合物的利用效率低,其中抑制剂严重干扰细胞代谢。在大肠杆菌中分支酸供应受限,酿酒酵母中存在内源代谢物竞争

表 2 通过微生物“生物漏斗”途径从异质木质素衍生物转化而来的芳香酸

Table 2 Aromatic acids transformed from heterogeneous lignin derivatives via microbial “biological funnel” pathways

芳香 化学 品	宿主菌 株	底物	基因	工程化策略	产量	产率	参考 文献
原儿 茶酸	恶臭假 单胞菌 KT2440	木质素衍生单体; 真实玉米秸秆木 质素水解液	<i>pcaGH; pobA; vanAB</i>	1. 敲除原儿茶酸 3,4-双加氧酶基因 <i>pcaGH</i> , 阻断降解 2. 强启动子 Ptac 及整合至 <i>pcaGH</i> 位 点过表达限速酶 <i>PobA</i> 和香草酸 O-脱 甲基酶 <i>VanAB</i> , 3. 构建无质粒菌株 PCA1601	17.5 g/L 2.4 g/L	94.5% 72.9%	[43]
原儿 茶酸	恶臭假 单胞菌 KT2440	丁香酸	<i>vanAB; agmR; gbdR; fleQ; gstB</i>	1. 染色体组成型过表达内源香草酸 O-脱甲基酶基因 <i>vanAB</i> 2. 进行适应性实验室进化 ALE 3. 全基因组测序 <i>agmR</i> 、 <i>gbdR</i> 、 <i>fleQ</i> 及 <i>gstB-yadG</i> 基因间区等突变	进化菌株生长速 率较原始工程菌 提高 30%		[44]
原儿 茶酸	恶臭假 单胞菌 KT2440	水解木质素衍生 单体	<i>pcaGH; vanAB</i>	1. 敲除原儿茶酸 3,4-双加氧酶基因 <i>pcaGH</i> 2. 过表达香草酸 O-脱甲基酶基因 <i>vanAB</i>	253.88 mg/L	70.85 %	[53]
原儿 茶酸	恶臭假 单胞菌 KT2440	乙醇解聚木质素 衍生物	<i>pcaGH</i>	敲除原儿茶酸 3,4-双加氧酶基因 <i>pcaGH</i>	6.73 mg/L	17.5%	[54]
原儿 茶酸	恶臭假 单胞菌 KT2440	对香豆酸、阿魏酸	<i>pobA; vanAB; HcnK</i>	共表达对羟基苯甲酸羟化酶基因 <i>pobA</i> ; 香草酸 O-脱甲基酶基因 <i>vanAB</i> ; 氢化肉桂酸辅酶 A 连接酶 K 亚基 <i>HcnK</i>	12.7 g/L	—	[77]
原儿 茶酸	酿酒酵 母	对香豆酸、阿魏 酸; 玉米秸秆碱性 预处理液	<i>ADH6; ADH7; BDH2; FDC1; 4CL; ech; vdh; pobA; vanAB; ligM; MET6; MHT1; SAM4; metf1</i>	1. 敲除 ADH6/ADH7/BDH2 和 <i>FDC1</i> 引入 CoA 依赖型非 β -氧化途径 2. 表达对羟基苯甲酸羟化酶基因 <i>pobA</i> , 筛选 4-羟基苯甲酰辅酶 A 还原 酶基因 <i>ligM</i> , 过表达甲硫氨酸合成酶 基因 <i>MET6</i> 、敲除 S-腺苷甲硫氨酸合 成酶基因 <i>MHT1/SAM4</i> 、引入亚甲基四 氢叶酸还原酶基因 <i>metf1</i>	720 mg/L 120 mg/L 810 mg/L	—	[51]
吡啶 -2,4- 二甲 酸	红球菌 RHA1	1% 小麦秸秆木质 纤维素	<i>ligAB; praA</i>	质粒异源表达 4,5-双加氧酶基因 <i>ligAB</i> 和 2,3-双加氧酶基因 <i>praA</i>	80 mg/L	—	[45]
吡啶 -2,4- 二甲 酸	红球菌 RHA1	1% 小麦秸秆木质 纤维素	<i>ligAB; pcaHG; dyp2</i>	1. 敲除原儿茶酸 3,4-双加氧酶基因 <i>pcaHG</i> 并染色体整合 4,5-双加氧酶基 因 <i>ligAB</i> 用组成型及廉价诱导型启动 子驱动 <i>ligAB</i> 表达 3. 引入外源过氧化物酶基因 <i>dyp2</i> 并 添加金属离子促进木质素解聚	330 mg/L	产率 提高 > 10 倍	[46]
4-羟 基苯 甲酸	台湾假 单胞菌 VLB120	木质素衍生单体	<i>pobA; hpd</i>	1. 敲除对羟基苯甲酸羟化酶基因 <i>pobA</i> 和羟基苯乙酸脱氢酶基因 <i>hpd</i> 消 除降解支路和代谢旁路 2. 结合启动子工程强化前体供应	3.3 mmol	—	[55]
没食 子酸	大肠杆 菌	丁香酸	<i>desA; ligM; lpdc</i>	共表达丁香酸 O-脱甲基酶基因 <i>desA</i> , 香草酸 O-脱甲基酶基因 <i>ligM</i> 及原儿 茶酸脱羧酶基因 <i>lpdc</i>	59.6 mg/L	—	[102]

导致通量难以进一步提升。未来解决方案可聚焦以下核心突破。在大肠杆菌中应通过蛋白质工程改造关键酶解除反馈抑制以强化分支酸供应,并引入群体感应系统动态调控途径表达。在酿酒酵母中需将合成途径靶向过氧化物酶体,以隔离宿主竞争并利用其特有的辅因子环境。可尝试构建混菌体系,用工程菌先将复杂水解液专一化为对香豆酸,再由其他优化后的菌株高效转化。实现从复杂生物物质到单一高值化学品的完整生物漏斗转化途径,将为整个木质素高值化产业提供关键的可验证范例与技术范式。

2.3 木质素基芳香烯类化合物生物合成

对羟基苯乙烯是木质素衍生芳香烯类单体中最具代表性的化合物,兼具乙烯基和酚羟基两个活性官能团,具有抗真菌、抗氧化等生物活性,在医药和食品防腐领域前景广阔,且其生物合成对替代石油基苯乙烯、推动绿色高分子材料转型具有重要意义。对羟基苯乙烯的生物合成主要包括两条途径。其一为对香豆酸经酚酸脱羧酶(PAD)催化的一步非氧化脱羧反应,阿魏酸和芥子酸同样可经此路径分别转化为4-乙烯基愈创木酚和4-乙烯基丁香酚,此路线步骤最短、原子经济性最高。其二为H型和G型木质素单体先经O-脱甲基化、羟化等修饰反应转化为对羟基苯甲酸、香草酸等中间体,再经脱羧生成对应芳香烯产物,体现了生物漏斗途径将不同芳香单体统一转化为芳香烯的代谢逻辑。上述两条途径的核心优势在于酚酸脱羧酶具有宽底物谱特性,能够催化H、G、S三类木质素单体分别转化为对应的乙烯基芳香化合物,从而将原料结构异质性的瓶颈转化为产物多样性的优势。

目前对羟基苯乙烯的微生物合成主要依托恶臭假单胞菌与大肠杆菌两类底盘展开。恶臭假单胞菌凭借其天然芳香族化合物代谢能力、对酚类化合物的良好耐受性以及成熟的合成生物学操作体系,已成为对羟基苯乙烯生物合成的核心底盘^[57]。在途径构建层面,研究者提出了阻断降解与原位替代相结合的策略,直接利用麦秆或蔗渣水解液进行发酵,无需外源诱导剂^[58]。在过程强化层面,建立了三丁酸甘油酯与水两相萃取体系,通过原位萃取持续移除产物以解除反馈抑制,使对羟基苯乙烯产量达235.3 g/L,生产速率为3.0 g/L/h,4-乙烯基愈创木酚和4-乙烯基丁香酚产量分别达203.0 g/L和35.8 g/L,为目前木质素衍生芳香烯的最高产量记录^[59]。

在前体供应方面,有研究筛选了来源于胶红酵母的苯丙氨酸解氨酶(RmXAL),将关键前体反式肉桂酸的滴度提升至29.88 g/L,产率达5.99 g/L/h^[61]。上述进展表明,以恶臭假单胞菌为底盘的生物漏斗策略已能实现异质性木质素底物向对羟基苯乙烯的汇聚式转化。

大肠杆菌虽不具备天然的木质素衍生芳香酸脱羧途径,但凭借其清晰的遗传背景与成熟的异源表达体系,已成为酚酸脱羧酶筛选与表征的重要平台。在关键酶挖掘方面,肺炎克雷伯菌来源的非辅因子依赖型酚酸脱羧酶AFDKP具有较低的米氏常数,研究通过结构建模,从甘蔗渣水解液中转化对香豆酸生成对羟基苯乙烯的转化率为55%^[62]。另有研究构建了以甘油为碳源的无细胞体外五酶级联催化体系,精确调控各酶配比与辅因子供给,突破了活细胞传质限制与产物毒性抑制,实现对羟基苯乙烯产达到30.32 mM,摩尔产率达到84.2%^[63]。

综上,恶臭假单胞菌与大肠杆菌作为对羟基苯乙烯的核心生产底盘与酶元件筛选平台,构建了从途径工程、关键酶挖掘到过程强化的完整技术体系。然而,该领域仍面临产物毒性持续抑制细胞活性、S型木质素单体转化效率低等核心瓶颈。未来需借助蛋白质语言模型,加速高性能酚酸脱羧酶的定向进化,结合耐受性底盘构建与两相萃取等策略,突破反馈抑制与底物利用不均衡的双重制约。随着关键酶性能与底盘耐受性同步提升,木质素衍生芳香烯有望为生物基高分子单体绿色制造提供核心原料支撑。

2.4 木质素基多酚类化合物生物合成

多酚类化合物是木质素生物漏斗途径中经脱甲基和羟化反应生成的核心芳香中间体。其中,儿茶酚是G型和S型木质素单体经完全脱甲基后形成的关键节点代谢物,也可经开环裂解进一步转化为顺,顺-粘康酸等平台化学品^[1];羟基酪醇则可由酪醇经羟化生成,也可由对香豆酸经羟化和还原反应合成,是自然界中活性最强的天然抗氧化剂之一,具有极高的增值潜力^{[1][64]}。目前,研究者已在恶臭假单胞菌、大肠杆菌及酿酒酵母等多类底盘体系中实现了儿茶酚和羟基酪醇的高效生物合成,代表性研究汇总于表4。

恶臭假单胞菌凭借其芳香族代谢网络与毒性耐受优势,已成为木质素衍生儿茶酚生产的核心底盘。在生物漏斗途径设计层面,已有研究通过协同

表 3 通过微生物“生物漏斗”途径从异质木质素衍生物转化而来的芳香烯

Table 3 Aromatic alkenes transformed from heterogeneous lignin derivatives via microbial “biological funnel” pathways

芳香化学品	宿主菌株	底物	基因	工程化策略	产量	产率	参考文献
对羟基苯乙烯	恶臭假单胞菌 KT2440	小麦秸秆 甘蔗渣	<i>ech; padC</i>	1. 敲除羟基肉桂酰辅酶A水合酶-裂解酶基因 <i>ech</i> 2. 引入酚酸脱羧酶基因 <i>padC</i>	—	—	[58]
对羟基苯乙烯	恶臭假单胞菌 KT2440	阿魏酸 对香豆酸 芥子酸	<i>fcs; pad</i>	1. 敲除编码阿魏酰辅酶A合成酶基因 <i>fcs</i> , 引入酚酸脱羧酶基因 <i>pad</i> 2. 三丁酸甘油酯/水双相原位萃取 3. 将木质素单体—锅法转化	235.3 g/L		[59]
对羟基苯乙烯	恶臭假单胞菌 KT2440	真实木质素水 解液	<i>fcs; pad</i>	1. 敲除编码阿魏酰辅酶A合成酶基因 <i>fcs</i> , 引入酚酸脱羧酶基因 <i>pad</i> 2. 三丁酸甘油酯/水双相原位萃取	12.4 g/L		[59]
对羟基苯乙烯	大肠杆菌	葡萄糖	<i>PhpCAT</i>	1. 双菌共培养策略, 强化前体供给 2. 表达酪氨酸转运蛋白 PhpCAT, 增强酪氨酸传质效率	298 mg/L	提高 96%	[60]
对羟基苯乙烯	大肠杆菌 BL21	甘蔗渣	<i>afdkp</i>	1. 引入肺炎克雷伯菌来源的非辅因子依赖型酚酸脱羧酶基因 <i>afdkp</i> 2. 利用 AlphaFold Multimer 和 SWISS-MODEL 进行结构建模	—	—	[62]
对羟基苯乙烯	—	粗甘油		1. 构建了无细胞五酶级联反应系统 2. 采用两阶段反应策略	30.32 mM	84.2%	[63]

表达原儿茶酸脱羧酶 AroY 与限速脱甲基酶、辅以辅因子再生, 构建了多底物汇聚的儿茶酚合成漏斗, 将儿茶酚滴度从 8.8 mM 提升至 14.1 mM, 摩尔产率达 98.5%^[65]。在底物谱拓展层面, 研究者通过模块化移植策略, 将丛毛单胞菌属来源的对苯二甲酸双加氧酶基因导入恶臭假单胞菌 KT2440, 打通了对苯二甲酸到儿茶酚的转化路径, 产量达 8.51 mM, 摩尔产率 86.0%^[66]。在脱甲基途径优化方面, 研究者系统性比较了 VanAB 与 LigM 两条脱甲基途径, 组合正向突变后香草酸消耗速率达野生型的 5 倍, 为 G 型和 S 型单体的高效汇聚奠定了酶学基础^[67]。此外, 通过一锅法多酶级联策略, 儿茶酚向羟基酪醇的转化率达到 89.0%, 展示了平台化合物向下游高值产品拓展的潜力^[68]。

以大肠杆菌为底盘, 研究者同样在儿茶酚和羟基酪醇的生物合成方面开展了系统研究, 并取得了系列进展。在动态调控层面, 香草醛自诱导启动子 ADH7 耦合转运蛋白 CouP, 无需外源诱导剂, 将产量提升 30% 至 40%^[69]。在关键酶筛选改造层面, 针对羟化酶 HpaBC 的效率瓶颈, 研究者通过跨物种组合筛选与半理性设计, 获得的突变体使含儿茶酚骨架化合物的产量较野生型提升 4.6 至 10.1 倍, 为儿茶酚及羟基酪醇的酶促合成提供了通用方案^[64]。

在羟基酪醇生产方面, 以大肠杆菌为底盘的生物合成主要包括两条代谢路线: 其一为转化合成路

线, 以 L-酪氨酸或左旋多巴为底物, 经脱氨、脱羧、还原和羟化等步骤生成羟基酪醇; 其二为从头合成路线, 以葡萄糖或木质素衍生物对香豆酸为碳源, 通过莽草酸途径从头构建合成通路。在多模块协同层面, 四酶级联模块化策略将各模块独立优化后串联, 产量达到 32.35 mM, 转化率达 97.1%^[70]。辅因子自循环策略针对 NADH 依赖型反应与胞内辅因子供给之间的矛盾, 提出在多酶级联体系中引入葡萄糖脱氢酶, 利用底物葡萄糖驱动 NADH 持续循环再生, 8 h 内产量达 36.33 mM^[71]。在此基础上, 有研究进一步提出不可逆级联驱动策略, 利用不可逆脱氨反应从热力学层面将反应平衡持续拉向产物方向, 同时通过质粒拷贝数梯度优化实现各酶表达水平的精确配比, 6 h 内产量提升至 55.53 mM^[72]。

酿酒酵母可依托内源莽草酸途径与埃利希途径, 将葡萄糖或木质素衍生芳香单体经 L-酪氨酸和酪醇中间体汇聚至羟基酪醇, 构成一条天然的生物漏斗路线。由于酿酒酵母需以 L-酪氨酸为中间体经酪醇羟化生成羟基酪醇, 导入高效异源羟化酶并建立精准调控机制是实现从头合成的关键。在羟化酶筛选适配方面, 已有研究系统比较并确定铜绿假单胞菌来源的 PaHpaB 与大肠杆菌 EcHpaC 为最优组合, 同步解除莽草酸途径反馈抑制, 产量达 6.97 g/L^[73]。在动态自主调控方面, 针对静态代谢工程中酪醇过量积累导致的生长抑制瓶颈, 已有研究

挖掘出了酿酒酵母内源酪醇响应启动子PYOR153W, 将其与CRISPR/dSpCas9-VPR转录激活系统偶联, 首次构建了酪醇响应型自主调控生物传感器, 产量在5 L反应器中达4.26 g/L, 提升1.53倍^[75]。在代谢网络重塑层面, 已有研究采用[U-¹³C]-葡萄糖全标记示踪技术, 首次系统解析了酿酒酵母中羟基酪醇的完整代谢网络, 发现除经典酪醇羟化途径外, 还存在经左旋多巴和儿茶酚的非经典合成通路, 为通过双重通路实现碳流多通道汇聚提供了全新靶点^[76]。

总而言之, 儿茶酚与羟基酪醇已在多种底盘中实现了途径构建与过程调控的体系化研究, 为清晰对比各类技术方案的路径设计与合成表现, 将两类产物的代表性研究统一汇总于表4, 系统呈现宿主、底物、关键基因、工程化策略及产量产率等核心指标, 为后续菌株定向改造提供参考。尽管两种产物的产量已突破克升级水平, 其生物合成仍面临产物毒性持续抑制细胞活性、S型单体转化效率显著偏低等核心瓶颈。未来可通过蛋白质语言模型加速关键酶的定向进化, 结合动态调控回路实现产物合成与细胞生长的自主平衡, 强化多底物协同转化, 推动多酚类平台化合物产业化应用。

3 合成生物学与人工智能驱动木质素生物转化新范式

合成生物学整合了生物学、工程学与信息科学, 使木质素代谢途径的理性设计与重构成为可能, 人工智能则凭借数据驱动学习与预测能力, 为关键酶定向进化与代谢网络优化提供了新手段, 前沿合成生物技术及交叉学科策略进一步拓展了木质素增值的技术边界。这些集成策略共同为设计用于木质素增值的高效细胞工厂提供了系统框架, 推动木质素定向转化工程化变革。

3.1 合成生物学助力高效细胞工厂构建

木质素生物漏斗的核心价值在于将结构异质的解聚产物定向汇聚为少数平台化合物, 而合成生物学的核心任务正是构建和强化这一漏斗的转化效率。其核心在于将复杂的代谢系统解耦为可预测、可组合的标准化功能模块, 通过设计、构建、测试、学习的工程化循环实现漏斗途径的系统优化。

途径的模块化重构是合成生物学构建高效细胞工厂的核心方法, 其基本策略是将木质素生物转

化的完整代谢通路拆解为底物转运、催化转化、通量调控、产物耐受等标准化、可替换的功能模块, 通过理性拼接与调试替代盲目式单基因改造, 大幅提升菌株构建的可预测性与工程化效率。在底物感知模块, 已有研究在恶臭假单胞菌中开发了对香豆酸和阿魏酸的自调控系统, 将生物传感器与羟化酶、脱甲基酶及转运蛋白的表达相偶联, 原儿茶酸产量12.7 g/L, 省去了外源诱导剂的使用^[77], 生物传感器示意图如图4c所示。在催化转化模块中, 途径去冗余化是核心策略。已有研究通过强化限速酶、匹配辅因子并消除竞争支路, 构建了高汇聚度的人工生物漏斗^[65]。在自适应调控模块中, 以原儿茶酸为枢纽代谢物构建反馈回路, 实现罗尔斯通氏菌从木质素到PHB的一步转化^[78]。底盘与途径的适配性设计追求底盘代谢网络与异源途径之间的全局双向适配。在计算设计层面, 已有研究构建了恶臭假单胞菌的高质量基因组尺度代谢模型, 系统预测芳香代谢通量分布, 指导敲除方案设计^[79]。在基因组精简层面, 精简8.35%基因组的恶臭假单胞菌底盘以对香豆酸为唯一碳源实现PHA产量1685 mg/L, 含量82.19 wt%^[80]。在适应性进化层面, 长期驯化使菌株在20 g/L对香豆酸中延滞期缩短37小时, 且外排泵基因为关键耐受靶点^[37]。

合成生物学通过途径模块化重构与底盘适配性设计, 正将木质素生物漏斗从天然代谢途径提升为可理性设计的工程化体系。然而, 当前途径模块的标准化组装与全局通量调控仍缺乏通用方案, 未来需结合定向进化与自动化平台加速迭代, 推动通用底盘搭载功能模块的工程范式成熟。

3.2 人工智能赋能关键酶设计与优化

木质素生物转化路径中的限速步骤主要集中于脱甲基、脱羧和羟化三类关键酶反应。人工智能技术通过对酶序列、结构与功能之间复杂映射关系的学习与预测, 为关键酶的理性设计与定向进化提供了新的技术途径^[81]。

芳香族O-脱甲基化是G型与S型木质素单体进入分解代谢网络的首要限速步骤^[14]。蛋白质语言模型EvoZymePro-Cat将ESM1b嵌入位点饱和突变设计, 仅需少量数据即可锁定高性能突变体, 实现对突变效应的高精度预测^[82]。在此基础上, ESM-2与多层感知机迭代优化结合, 在10天内完成四轮进化, 获得活性提升2.4倍的突变体^[83]。在脱甲基酶的结构机理层面, 分子动力学与量子化学计算揭示第

表 4 通过微生物“生物漏斗”途径从异质木质素衍生物转化而来的木质素多酚类化合物

Table 4 Lignin-derived polyphenols transformed from heterogeneous lignin derivatives via microbial “biological funnel” pathways

芳香化 学品	宿主菌株	底物	基因	工程化策略	产量	产率	参考 文献
儿茶酚	恶臭假单胞菌 KT2440	阿魏酸、对香豆酸、苯酚、愈创木酚、苯甲酸钠、对苯二甲酸	<i>aroY; vanAB; pobA; catA/A2</i>	1. 敲除原儿茶酸 3,4-双加氧酶基因 <i>pcaHG</i> 与儿茶酚 1,2-双加氧酶基因 <i>catA/catA2</i> 2. 引入原儿茶酸脱羧酶基因 <i>aroY</i> , 过表达香草酸 O-脱甲基酶基因 <i>vanAB</i> 与对羟基苯甲酸羟化酶基因 <i>pobA</i> 3. 引入辅助蛋白基因 <i>kpdB</i> , 构建共培养混菌体系	14.1 mM	98.5 %	[65]
儿茶酚	恶臭假单胞菌 KT2440	对苯二甲酸	<i>tphBAabc; tphB; pcaHG; aroY; catA/A2; tpaK</i>	引入对苯二甲酸 1,2-双加氧酶基因 <i>tphAabc</i> , 脱氢酶基因 <i>tphB</i> , <i>aroY</i> 转运蛋白基因 <i>tpaK</i> , 敲除 <i>pcaHG</i> 及 <i>catA1/catA2</i>	8.51 mM	86.0 %	[66]
儿茶酚	恶臭假单胞菌 KT2440	玉米麸水解液制备的对香豆酸	<i>catA/A2; pcaHG</i>	敲除 <i>catA/catA2</i> 与 <i>pcaHG</i>	—	58%	[104]
儿茶酚	大肠杆菌 DH1	香草醛	<i>ligV; ligM; aroY; CouP</i>	1. 采用香草醛自诱导型启动子 ADH7 2. 异源表达香草醛脱氢酶 <i>ligV</i> , 香草酸 O-脱甲基酶基因 <i>ligM</i> 与 <i>aroY</i> 3. 共表达芳香转运蛋白 <i>CouP</i>	380 mg/L	95%	[69]
羟基酪醇	大肠杆菌	L-酪氨酸	<i>laad; ARO10; par; hpaBC</i>	1. 构建四酶级联催化途径 2. 全细胞催化并优化酶的表达配比	32.35 mM	97.1 %	[70]
羟基酪醇	大肠杆菌 BL21	L-3,4-二羟基苯丙氨酸	<i>tyrB; gdh; PmKDC; yahK</i>	1. 构建转氨酶介导的的四酶级联途径 2. 双质粒调控酶表达配比 3. 耦合辅酶与氨基供体循环再生	36.33 mM	—	[71]
羟基酪醇	大肠杆菌 BL21	L-3,4-二羟基苯丙氨酸	<i>laad; PmKDC; yahK; gdh</i>	1. 构建脱氨酶介导的三酶氧化脱氨途径 2. 双质粒调控酶表达配比 3. 耦合 NADH 循环再生	55.3 mM	—	[72]
羟基酪醇	酿酒酵母	葡萄糖	<i>PaHpaB; EcHpaC; tyrA^{br}; TRP2;</i>	1. 筛选最优羟化酶组合 <i>HpaBC</i> ; 下调邻氨基苯甲酸合酶基因 <i>TRP2</i> , 异源表达抗反馈抑制突变 2. 变体分支酸变位酶/预苯酸脱氢酶基因 <i>tyrA^{br}</i>	6.97 g/L		[73]
羟基酪醇	酿酒酵母	葡萄糖	—	筛选酪醇诱导/抑制启动子 P ^{YOR} 153W, 控制 dSpCas9-VPR 靶向激活 4-羟基苯乙酸 3-单加氧酶 <i>HpaBC</i> 表达, 促进酪醇转化	4.26 g/L		[75]

二配位球残基对选择性的调控机制,指导理性改造^[84]。超高通量筛选与机器学习结合,可在短时间内完成数万突变组合的功能扫描,将酶的催化效率常数提升至野生型的 24 倍^[85]。此外,以密度泛函理论计算的活性位点几何构型为输入条件的蛋白质骨架生成工具,已突破天然序列限制,为定制化脱

甲基酶的从头创建提供了可能^[86]。

脱羧酶是木质素生物漏斗途径中连接芳香酸中间体与高值烯烃产物的关键催化节点。在酚酸脱羧酶的结构动态解析方面,有研究通过 AI 辅助末端结构域工程调控分子柔性,拓宽对 S 型单体的催化效率^{[87][88]}。针对定向进化中序列空间巨大而筛选

通量有限的矛盾,已有研究提出了小样本数据驱动适应度景观建模的策略,实现底物偏好的高效重塑^[89]。在计算虚拟设计层面,ProteinMPNN 虚拟生成、AlphaFold2 结构过滤与分子动力学模拟评估的

计算闭环使突变体在 350 K 高温下维持良好结构稳定性,底物结合自由能较野生型提升约 22%^[90]。多目标优化框架还可同步权衡热稳定性、底物特异性与催化效率,突破单目标优化局限^[91]。

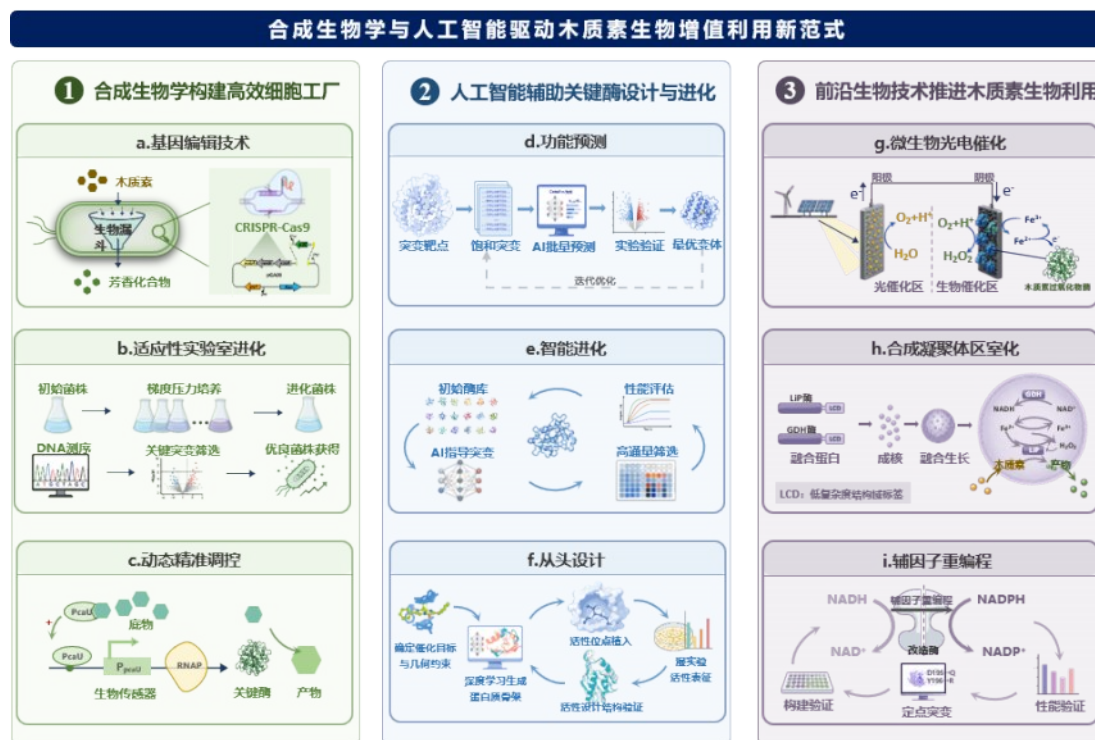


图4 合成生物学与人工智能驱动木质素生物增值利用新范式(第三章内容从技术体系维度,从三方面介绍木质素生物转化的核心支撑技术,三类技术在改造尺度、作用靶点、优化策略和应用方向上各有侧重,共同构成木质素高效生物高值化利用的完整技术体系)

Fig. 4 A new paradigm of lignin biological valorization driven by synthetic biology and artificial intelligence (Chapter 3 outlines three core enabling technologies for lignin bioconversion from a technical system perspective. Varying in scale, targets, strategies and applications, they form an integrated system for efficient lignin valorization)

羟化酶通过区域选择性引入羟基直接决定木质素衍生芳香化合物的结构多样性。在底物识别方面,已有研究将蛋白质语言模型与图注意力网络深度融合,构建了端到端的底物预测框架,对五种P450亚型预测准确率达0.882^[92]。在定向进化层面,已有研究提出了先稳定化再功能化的两步进化策略,利用ProteinMPNN仅进行三轮定向进化即获80倍功能增益突变体^[93]。在功能创建层面,新一代生成式AI蛋白质设计工具仅需输入DFT计算的活性位点几何构型,即可自动生成完整蛋白质骨架,首轮设计的最优突变体催化效率达 $16,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,较此前设计提升三个数量级^[86]。这一零样本设计能力将为定制化羟化酶提供不依赖天然序列的从头创建路径。

人工智能辅助设计正系统性地重塑木质素生

物转化关键酶的改造范式。当前面临的瓶颈在于高质量酶功能数据的匮乏与稳定性-功能权衡效应的制约。未来需构建木质素代谢酶专属数据库,结合生成式AI与自动化实验闭环迭代,推动酶改造从试错驱动转向预测驱动。

3.3 前沿生物技术协同推进木质素生物增值利用

合成生物学与人工智能的深度融合,正构成木质素生物漏斗工程化的核心引擎。通过空间区室化重构、辅因子网络重编程等合成生物学核心策略的系统优化,木质素生物增值正从传统生物催化范式迈向多维技术协同的新阶段。本节聚焦合成生物学范畴内的催化强化手段,以及可与合成生物学体系耦合的交叉协同技术,与图4中展示的技术框架对应。

合成凝聚体区室化技术依托液-液相分离原理

构建仿生化无膜微反应器,其过程如图4h所示。短阳离子肽标签轻量化设计可驱动蛋白自发组装为人工细胞器,为多酶催化与辅因子循环提供了通用工具^[94]。

辅酶偏好重编程是辅因子代谢调控的核心手段,辅因子重编程流程示意图如图4i所示。通过定点突变修饰辅酶结合域,可实现酶对辅酶识别偏好的定向反转,构建适配目标通路的辅因子供给系统,为代谢网络适配提供了可复用的分子改造范式^[95]。

除合成生物学核心改造策略外,微生物光电催化体系可作为合成生物学细胞工厂的外延补充手段,拓展木质素增值的技术边界。微生物光电催化体系以可再生电能或光能替代传统化学氧化剂,在室温水相中实现木质素电化学-酶法解聚,为木质素温和精准解聚提供了绿色路径,其反应示意图如4g所示^[96]。

上述前沿生物技术的持续积累,正为木质素生物增值提供超越传统范式的技术储备。随着多酶体系理性设计与杂化系统稳定化等核心难题的逐步攻克,建立从催化单元设计到全细胞系统集成的标准化工程闭环日益成为可能。因此,多技术融合驱动的系统集成正成为推动木质素高值化利用从点状突破迈向系统化工业实践的重要现实策略。

4 结论与展望

木质素作为自然界储量最丰富的可再生芳香族聚合物,其高效生物转化对于降低化石资源依赖、实现生物炼制全组分增值具有重要的战略意义^[1]。本文围绕生物漏斗这一核心策略,从代谢机制解析与底盘体系构建出发,系统综述了香兰素、原儿茶酸、对羟基苯乙烯、儿茶酚和羟基酪醇等关键芳香化学品的生物合成进展,阐述了合成生物学通过途径模块化重构与底盘适配性设计将木质素转化从被动发现提升为主动设计,人工智能通过虚拟筛选、机器学习辅助进化与生成式从头设计将限速酶改造从试错推向预测驱动。

然而,该领域在迈向工业化的道路上仍面临多重挑战。需要指出的是,当前研究多基于木质素单体类模型化合物开展途径优化,与工业场景下木质素解聚产生的复杂混合降解产物存在显著差距。木质素的高效低成本定向解聚、解聚产物与生物转

化的底物适配,以及两大过程的工艺耦合,是核心上游瓶颈。产物毒性对细胞活性的持续抑制尚未从菌株层面根本消除^[59],S型木质素单体因双甲氧基屏障导致转化效率远低于G型和H型单体^[67],天然脱甲基酶、羟化酶和脱羧酶的底物谱与稳定性仍难以满足工业需求,不同代谢途径模块之间缺乏统一的标准化组装规范。针对上述瓶颈,未来需在多个方向持续突破。需推动木质素解聚工艺与生物转化体系的协同设计,开发适配复杂降解产物的广谱代谢通路。通过耐受性适应性进化与产物外排泵的协同构建提升底盘对芳香族产物的耐受能力。建立木质素代谢酶专属的“序列-结构-功能”数据库以支撑人工智能模型的精准训练,并借助生成式AI与量子化学计算的深度融合实现不依赖天然序列的催化功能从头创建。

随着合成生物学与人工智能融合深度的持续增加,生物漏斗策略所建立的异质性可再生原料向标准化平台产品转化的通用设计逻辑,不仅适用于木质素,也为更广泛的复杂生物质资源高值化利用提供了可迁移的方法论框架。这一领域的持续突破将推动木质素成为替代石油的绿色原料,为全球生物经济的可持续发展和双碳目标的实现提供坚实的技术支撑。

参考文献

- [1] Liu Z H, Li B Z, Yuan J S, et al. Creative biological lignin conversion routes toward lignin valorization[J]. Trends in Biotechnology, 2022, **40**(12): 1550-1566.
- [2] Liu Z H, Liu H, Xu T, et al. Lignin valorization reshapes sustainable biomass refining[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2025, **211**: 115296.
- [3] 钟磊, 邱学青, 张文礼. 木质素衍生炭在碱金属离子电池负极中的研究进展[J]. 化工学报, 2022, (8): 3369-3380.
Zhong L, Qiu X Q, Zhang W L. Advances in lignin-derived carbon anodes for alkali metal ion batteries[J]. CIESC Journal, 2022, (8): 3369-3380.
- [4] 楼宏铭, 林美露, 邱珂贤, 等. 玉米芯残渣的碱性亚硫酸盐预处理及其反应动力学模型[J]. 化工学报, 2018, **69**(1): 507-514.
Lou H M, Lin M L, Qiu K X, et al. Alkaline sulfite pretreatment of corncob residue and its reaction kinetic model[J]. CIESC Journal, 2018, **69**(1): 507-514.
- [5] Liu Z H, Hao N, Wang Y Y, et al. Transforming biorefinery designs with 'Plug-In Processes of Lignin' to enable economic waste valorization[J]. Nature Communications, 2021, **12**: 3912.
- [6] Zhang X L, Liu Z H, Li B Z, et al. Tapping into the natural aromatic potential of microbial lignin valorization towards aromatic fine chemicals[J]. Green Chemistry, 2024, **26**(23): 11378-11405.
- [7] Lan H N, Liu R Y, Liu Z H, et al. Biological valorization of lignin

- to flavonoids[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, **64**: 108107.
- [8] Fu N, Liu R Y, Zhou Y, et al. Technological advances in ligninolytic enzymes for the biological valorization of lignin[J]. *Green Chemistry*, 2025, **27**(16): 4016–4039.
- [9] Liu H, Liu Z H, Zhang R K, et al. Bacterial conversion routes for lignin valorization[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, **60**: 108000.
- [10] Gao J Y, Ali M Y, Kamaraj Y, et al. A comprehensive review on biological funnel mechanism in lignin valorization: Pathways and enzyme dynamics[J]. *Microbiological Research*, 2024, **287**: 127835.
- [11] Perez J M, Kontur W S, Alherech M, et al. Funneling aromatic products of chemically depolymerized lignin into 2-pyrone-4-6-dicarboxylic acid with *Novosphingobium aromaticivorans*[J]. *Green Chemistry*, 2019, **21**(6): 1340–1350.
- [12] Erickson E, Bleem A, Kuatsjah E, et al. Critical enzyme reactions in aromatic catabolism for microbial lignin conversion[J]. *Nature Catalysis*, 2022, **5**(2): 86–98.
- [13] Liu R Y, Li B Z, Yuan Y J, et al. Multiscale metabolic engineering in biological lignin valorization[J]. *The Innovation*, 2025, **6**(11): 100993.
- [14] Li N, Zhu S Y, Bai L L, et al. Revolutionizing lignin valorization: key advances in demethylation, methylation, and methyl metabolism[J]. *Biotechnology Advances*, 2025, **83**: 108634.
- [15] Ceaser R, Chimphango A F A. A strategy for co-extracting hydroxycinnamic acids with hemicellulose, cellulose and lignin from wheat residues in an integrated biorefinery[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, **290**: 138925.
- [16] Odinet E, Bisotto-Mignot A, Frezouls T, et al. A new phenolic acid decarboxylase from the brown-rot fungus *Neolentinus lepideus* natively decarboxylates biosourced sinapic acid into canolol, a bioactive phenolic compound[J]. *Bioengineering*, 2024, **11**(2): 181.
- [17] He Z J, Xu T, Liu S C, et al. Structure–function–guided synergistic fractionation enhances valorization of wheat straw biomass[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, **508**: 160712.
- [18] Liu R Y, Lan H N, Liu Z H, et al. Microbial valorization of lignin toward coumarins: challenges and perspectives[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2024, **191**: 114205.
- [19] Khalid H R, Muqadass A, Ahmad Alghamdi H, et al. Genome-scale reconstruction of lignin-derived aromatic catabolism across *Pseudomonas* enables a modular chassis design for lignin bioconversion[J]. *Green Chemistry*, 2026, **28**(21): 8694–8715.
- [20] Incha M R, Thompson M G, Blake-Hedges J M, et al. Leveraging host metabolism for bisdemethoxycurcumin production in *Pseudomonas putida*[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2020, **10**: e00119.
- [21] Lubbers R J M, Dilokpimol A, Visser J, et al. A comparison between the homocyclic aromatic metabolic pathways from plant-derived compounds by bacteria and fungi[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, **37**(7): 107396.
- [22] 田立岩, 李静, 江小龙, 等. 原儿茶酸脱羧关键酶挖掘改造优化儿茶酚生物合成[J]. *生物工程学报*, 2024, **40**(9): 3057–3071.
- Tian L Y, Li J, Jiang X L, et al. Screening and engineering of a protocatechuic acid decarboxylase for efficient biosynthesis of catechol[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, **40**(9): 3057–3071.
- [23] Chen M J, Ralph J, Luterbacher J S, et al. Selecting suitable near-native lignins for research[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, **71**(51): 20751–20761.
- [24] Matsuzawa M, Ito J, Danjo K, et al. Vanillin production by *Corynebacterium glutamicum* using heterologous aromatic carboxylic acid reductases[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2024, **17**(1): 58.
- [25] Plaggenborg R, Overhage J, Steinbüchel A, et al. Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **61**(5): 528–535.
- [26] Graf N, Altenbuchner J. Genetic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for rapid and high-yield production of vanillin from ferulic acid[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, **98**(1): 137–149.
- [27] Ruhl I A, Woodworth S P, Haugen S J, et al, Johnson C. W. Production of Vanillin From Ferulic Acid by *Pseudomonas putida* KT2440 Using Metabolic Engineering and In Situ Product Recovery[J]. *Microbial Biotechnology*, 2025, **18**(5): e70152.
- [28] Li Z, Sun L N, Wang Y L, et al. Construction of a novel vanillin-induced autoregulating bidirectional transport system in a vanillin-producing *E. coli* cell factory[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, **72**(26): 14809–14820.
- [29] Furuya T, Miura M, Kuroiwa M, et al. High-yield production of vanillin from ferulic acid by a coenzyme-independent decarboxylase/oxygenase two-stage process[J]. *New Biotechnology*, 2015, **32**(3): 335–339.
- [30] Furuya T, Miura M, Kino K. A coenzyme-independent decarboxylase/oxygenase cascade for the efficient synthesis of vanillin[J]. *ChemBioChem*, 2014, **15**(15): 2248–2254.
- [31] Okai N, Masuda T, Takeshima Y, et al. Biotransformation of ferulic acid to protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21420 engineered to express vanillate O-demethylase[J]. *AMB Express*, 2017, **7**(1): 130.
- [32] Machovina M M, Mallinson S J B, Knott B C, et al. Enabling microbial syringol conversion through structure-guided protein engineering[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. USA, 2019, **116**(28): 13970–13976.
- [33] Kamimura N, Takahashi K, Mori K, et al. Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: New findings in a recent decade: Update on bacterial lignin catabolism[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2017, **9**(6): 679–705.
- [34] Araki T, Umeda S, Kamimura N, et al. Regulation of vanillate and syringate catabolism by a MarR type transcriptional regulator DesR in *Sphingobium* sp. SYK 6[J]. *Scientific Reports*, 2019, **9**: 18036.
- [35] Fujita M, Hirano R, Nagayoshi K, et al. Uptake system of lignin-derived aromatic acids in promising *Sphingomonadaceae* strains for lignin valorization through biological funneling[J]. *Scientific Reports*, 2025, **15**: 23644.
- [36] Wolf M E, Lalande A T, Newman B L, et al. The catabolism of lignin derived p methoxylated aromatic compounds by *Rhodococcus jostii* RHA1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, **90**(3): e0215523.
- [37] Mohamed E T, Werner A Z, Salvachúa D, et al. Adaptive laboratory evolution of *Pseudomonas putida* KT2440 improves p-coumaric and ferulic acid catabolism and tolerance[J]. *Metabolic*

- Engineering Communications, 2020, **11**: e00143.
- [38] Wen Q F, Xu X W, He Q H, et al. Dual-pathway engineering enables robust vanillin bioproduction in *Pseudomonas putida*[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, **526**: 171181.
- [39] Sainsbury P D, Hardiman E M, Ahmad M, et al. Breaking down lignin to high-value chemicals: the conversion of lignocellulose to vanillin in a gene deletion mutant of *Rhodococcus jostii* RHA1[J]. ACS Chemical Biology, 2013, **8**(10): 2151–2156.
- [40] Zhou H R, Xu Z X, Cai C G, et al. Deciphering the metabolic distribution of vanillin in *Rhodococcus opacus* during lignin valorization[J]. Bioresource Technology, 2022, **347**: 126348.
- [41] Plaggenborg R, Overhage J, Loos A, et al. Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, **72**(4): 745–755.
- [42] Xin X, Zhang R K, Liu S C, et al. Engineering yeast to convert lignocellulose into vanillin[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, **485**: 149815.
- [43] Liu S C, Xin X, He Z J, et al. Biological conversion of lignin-derived ferulic acid from wheat bran into vanillin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, **281**: 136406.
- [44] Chen Z, Liu H, Zong Q J, et al. Engineering strategies enabled protocatechuic acid production from lignin by *Pseudomonas putida* KT2440[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2024, **12**(49): 17726–17738.
- [45] Mueller J, Willett H, Feist A M, et al. Engineering *Pseudomonas putida* for improved utilization of syringyl aromatics[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, **119**(9): 2541–2550.
- [46] Spence E M, Calvo-Bado L, Mines P, et al. Metabolic engineering of *Rhodococcus jostii* RHA1 for production of pyridine-dicarboxylic acids from lignin[J]. Microbial Cell Factories, 2021, **20**(1): 15.
- [47] Sainsbury P D, Mineyeva Y, Mycroft Z, et al. Chemical intervention in bacterial lignin degradation pathways: Development of selective inhibitors for intradiol and extradiol catechol dioxygenases[J]. Bioorganic Chemistry, 2015, **60**: 102–109.
- [48] Spence E M, Scott H T, Dumond L, et al. The hydroxyquinol degradation pathway in *Rhodococcus jostii* RHA1 and *Agrobacterium* species is an alternative pathway for degradation of protocatechuic acid and lignin fragments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, **86**(19): e01561–e01520.
- [49] Lo T M, Hwang I Y, Cho H S, et al. Biosynthesis of commodity chemicals from oil palm empty fruit bunch lignin[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, **12**: 663642.
- [50] Li Z D, Gao C, Ye C, et al. Systems engineering of *Escherichia coli* for high-level shikimate production[J]. Metabolic Engineering, 2023, **75**: 1–11.
- [51] Wang M, Wang H M, Gao C, et al. Efficient production of protocatechuic acid using systems engineering of *Escherichia coli* [J]. Metabolic Engineering, 2024, **82**: 134–146.
- [52] Zhang R K, Tan Y S, Cui Y Z, et al. Lignin valorization for protocatechuic acid production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Green Chemistry, 2021, **23**(17): 6515–6526.
- [53] Jin X Z, Li X X, Zou L H, et al. Biological valorization of lignin-derived aromatics in hydrolysate to protocatechuic acid by engineered *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Molecules, 2024, **29**(7): 1555.
- [54] Nguyen L T, Tran M H, Lee E Y. Co-upgrading of ethanol-assisted depolymerized lignin: A new biological lignin valorization approach for the production of protocatechuic acid and polyhydroxyalkanoic acid[J]. Bioresource Technology, 2021, **338**: 125563.
- [55] Lenzen C, Wynands B, Otto M, et al. High-yield production of 4-hydroxybenzoate from glucose or glycerol by an engineered *Pseudomonas taiwanensis* VLB120[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, **7**: 130.
- [56] Zhou N Q, Wilkes R A, Chen X Y, et al. Quantitative decoding of coupled carbon and energy metabolism in *Pseudomonas putida* for lignin carbon utilization[J]. Communications Biology, 2025, **8**(1): 1310.
- [57] Zhou Q, Fransen A, De Winde H. Lignin-degrading enzymes and the potential of *Pseudomonas putida* as a cell factory for lignin degradation and valorization[J]. Microorganisms, 2025, **13**(4): 935.
- [58] Williamson J J, Bahrin N, Hardiman E M, et al. Production of substituted styrene bioproducts from lignin and lignocellulose using engineered *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Biotechnology Journal, 2020, **15**(7): e1900571.
- [59] Liu R Y, Wang C, Li B Z, et al. One-pot bioconversion of lignin to 4-vinylphenol derivatives[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, **499**: 156286.
- [60] Gargatte S, Li Z, Zhou Y, et al. Utilizing a tyrosine exporter to facilitate 4-hydroxystyrene biosynthesis in an *E. coli*-*E. coli* co-culture[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, **176**: 108178.
- [61] Antimanon S, Jensen S I, Woodley J M. Integrated experimental and mathematical modeling to guide microbial biocatalysis: *Pseudomonas putida* conversion of *L* - phenylalanine to *trans* - cinnamic acid[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2025, **122**(3): 525–537.
- [62] Correia dos Santos M B, Navarrete V G, Zaiter M A, et al. Bioconversion of phenolic acids from hydrolyzed sugarcane bagasse into vinyl derivatives by recombinant phenolic acid decarboxylase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2026, **193**: 110780.
- [63] Tang S M, Chen Y K, Liao D C, et al. A process for *p*-hydroxystyrene production from glycerol based on cell-free biosynthesis system[J]. Biochemical Engineering Journal, 2023, **195**: 108927.
- [64] Zheng X R, Li G P, Chen Q H, et al. Engineering non-P450 3-hydroxylase for *de novo* syntheses of catechol-containing compounds in *Escherichia coli*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2025, **10**(4): 1294–1305.
- [65] Zhou Y, Liu R Y, Fu N, et al. Artificial biological funnel design enabled valorization of aromatic derivatives into catechol[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, **73**(38): 24222–24236.
- [66] Lee E S, Son J, Song H M, et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for valorization of terephthalic acid to produce catechol and muconic acid[J]. New Biotechnology, 2026, **93**: 226–233.
- [67] Bleem A C, Kuatsjah E, Johnsen J, et al. Evolution and engineering of pathways for aromatic *O*-demethylation in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Metabolic Engineering, 2024, **84**: 145–157.

- [68] Zhao R Y, Huang S P, Gao L L, et al. One-pot biocatalytic upgrading of lignin-derived phenol and catechol to hydroxytyrosol[J]. Green Chemistry, 2024, **26**(10): 6180–6189.
- [69] Wu W H, Liu F, Singh S. Toward engineering *E. coli* with an autoregulatory system for lignin valorization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, **115**(12): 2970–2975.
- [70] Zeng B Y, Lai Y M, Liu L J, et al. Engineering *Escherichia coli* for high-yielding hydroxytyrosol synthesis from biobased L-tyrosine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, **68**(29): 7691–7696.
- [71] Li C Z, Jia P, Bai Y J, et al. Efficient synthesis of hydroxytyrosol from L-3,4-dihydroxyphenylalanine using engineered *Escherichia coli* whole cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, **67**(24): 6867–6873.
- [72] Huo J J, Bai Y J, Fan T P, et al. Hydroxytyrosol production from L-DOPA by engineered *Escherichia coli* co-expressing L-amino acid deaminase, α -keto acid decarboxylase, aldehyde reductase and glucose dehydrogenase with NADH regeneration[J]. Process Biochemistry, 2022, **122**: 275–281.
- [73] Jiang W J, Chen Z C, Fan W J, et al. Systems metabolic engineering for hydroxytyrosol production in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2026, **92**(5): e02455–e02425.
- [74] Liu H Y, Wu X X, Ma H, et al. High-level production of hydroxytyrosol in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, **11**(11): 3706–3713.
- [75] Hu H T, Sun R R, Zhai Q X, et al. Engineering a tyrosol-responsive dynamic system in *Saccharomyces cerevisiae* for adaptive regulation of hydroxytyrosol biosynthesis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2026, **74**(12): 10375–10386.
- [76] Gonzalez-Ramirez M, Masuero D, Cerezo A B, et al. Deciphering the synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* of the bioactives melatonin, serotonin, indoleacetic acid, hydroxytyrosol and tyrosol from glucose by using ^{13}C labelling precursors and UHPLC-MS[J]. Food Research International, 2025, **216**: 116596.
- [77] Li J, Yue C, Wei W, et al. Construction of a *p*-coumaric and ferulic acid auto-regulatory system in *Pseudomonas putida* KT2440 for protocatechuate production from lignin-derived aromatics[J]. Bioresource Technology, 2022, **344**: 126221.
- [78] Zhao Y Q, Xue L, Huang Z Y, et al. Lignin valorization to bioplastics with an aromatic hub metabolite-based autoregulation system[J]. Nature Communications, 2024, **15**: 9288.
- [79] Banerjee D, Menasalvas J, Chen Y, et al. Addressing genome scale design tradeoffs in *Pseudomonas putida* for bioconversion of an aromatic carbon source[J]. npj Systems Biology and Applications, 2025, **11**: 8.
- [80] Chen Y P, Liu Y J, Meng Y, et al. Systems metabolic engineering of genome-reduced *Pseudomonas putida* for efficient production of polyhydroxyalkanoate from *p*-coumaric acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, **73**(21): 12899–12907.
- [81] 徐舒萍, 汪金秀, 孟帅奇, 等. 人工智能赋能酶工程[J]. 化工学报, 2026: 1–15.
- Xu S P, Wang J X, Meng S Q, et al. Artificial intelligence-enabled enzyme engineering[J]. CIESC Journal, 2026: 1–15.
- [82] Xu R, Li X K, Sui J N, et al. EvoZymePro-Cat: a protein – ligand-aware deep learning framework for predicting mutation effects in enzyme function[J]. ACS Synthetic Biology, 2026, **15**(1): 321–330.
- [83] Zhang Q, Chen W Y, Qin M, et al. Integrating protein language models and automatic biofoundry for enhanced protein evolution[J]. Nature Communications, 2025, **16**: 1553.
- [84] Dias A H S, Cao Y X, Skaf M S, et al. Machine learning-aided engineering of a cytochrome P450 for optimal bioconversion of lignin fragments[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2024, **26**(25): 17577–17587.
- [85] Gantz M. Rationalising and accelerating enzyme engineering by quantitative sequence-function profiling in microdroplets[D]. Cambridge: University of Cambridge, 2025.
- [86] Kim D, Woodbury S M, Ahern W, et al. Computational design of metallohydrolases[J]. Nature, 2026, **649**(8095): 246–253.
- [87] Li Q, Chen Y Z, Zhao H M, et al. Enhancing the characteristics of phenolic acid decarboxylase via N-terminal substitution and investigating its immobilization[J]. BMC Biotechnology, 2025, **25**(1): 144.
- [88] Chen Y Z, Li Q, Hu K D, et al. C-terminal substitution for enhanced catalytic activity of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis* J6 and its molecular dynamics simulation[J]. Food Science, 2025, **46**(10): 95–107.
- [89] McDonald A D, Ellis J M, Steger-Wilson L, et al. Active site diversification of a non-canonical amino acid decarboxylase by merging substrate multiplexed screening with computationally guided recombination[J]. Protein Science, 2025, **34**(11): e70356.
- [90] 王富豪, 张雯雯, 吴新明, 等. 结合 ProteinMPNN 与分子动力学模拟提高谷氨酸脱羧酶的热稳定性与底物结合能力[J]. 食品与发酵工业, 2026, **52**(7): 26–33.
- Wang F H, Zhang W W, Wu X M, et al. Improving thermostability and substrate binding affinity of glutamate decarboxylase by integrating ProteinMPNN and molecular dynamics simulation[J]. Food and Fermentation Industries, 2026, **52**(7): 26–33.
- [91] Ozawa H, Unno I, Sekine R, et al. Development of evolutionary algorithm-based protein redesign method[J]. Cell Reports Physical Science, 2024, **5**(1): 101758.
- [92] Zhou Y L, Jiang D J, Wei X, et al. DeepMetab: a comprehensive and mechanistically informed graph learning framework for end-to-end drug metabolism prediction[J]. Chemical Science, 2025, **16**(40): 18884–18902.
- [93] King B R, Sumida K H, Caruso J L, et al. Computational stabilization of a non-heme iron enzyme enables efficient evolution of new function[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2025, **64**(2): e202414705.
- [94] Yeong V, Wang J, Horn J M, et al. Intracellular phase separation of globular proteins facilitated by short cationic peptides[J]. Nature Communications, 2022, **13**: 7882.
- [95] 胡力元, 刘璐瑶, 白仲虎, 等. 毕赤酵母甲酸脱氢酶辅因子特异性改造及应用[J]. 食品与发酵工业, 2023, **49**(13): 9–16.
- Hu L Y, Liu L Y, Bai Z H, et al. Cofactor specificity engineering and application of formate dehydrogenase from *Komagataella phaffii*[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, **49**(13): 9–16.
- [96] Mishyn V, Floret J, Chabbert B, et al. Step towards enzymatic bioelectrorefinery: design of a ligninolytic hybrid air-breathing biocathode[J]. ChemCatChem, 2025, **17**(3): e202401537.
- [97] Zhu D C, Xu L X, Sethupathy S, et al. Decoding lignin valorization pathways in the extremophilic *Bacillus ligniniphilus* L1 for vanillin biosynthesis[J]. Green Chemistry, 2021, **23**(23): 9554–

- 9570.
- [98] Zuo K J, Li H N, Chen J H, et al. Effective biotransformation of variety of guaiacyl lignin monomers into vanillin by *Bacillus pumilus*[J]. *Frontiers in Microbiology*., 2022, **13**: 901690.
- [99] Chattopadhyay P, Banerjee G, Sen S K. Cleaner production of vanillin through biotransformation of ferulic acid esters from agroresidue by *Streptomyces sannanensis*[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, **182**: 272–279.
- [100] Park J, Lee H S, Oh J, et al. A highly active carboxylic acid reductase from *Mycobacterium abscessus* for biocatalytic reduction of vanillic acid to vanillin[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, **161**: 107683.
- [101] Zhao L Q, Sun Z H, Zheng P, et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 with the addition of resin HD-8[J]. *Process Biochem.*, 2006, **41**(5): 1673–1676.
- [102] Zhao M T, Tao Y K, Wu X F, et al. One-pot efficient biosynthesis of 4-hydroxyphenylacetic acid and its analogues from lignin-related *p*-coumaric and ferulic acids[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, **9**(18): 6400–6409.
- [103] Fu B X, Xiao G Z, Zhang Y, et al. One-pot bioconversion of lignin-derived substrates into Gallic acid[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, **69**(38): 11336–11341.
- [104] Upadhyay P, Lali A. Engineered *Pseudomonas putida* for biosynthesis of catechol from lignin-derived model compounds and biomass hydrolysate[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2022, **52**(1): 80–88.