

合成生物制造

李寅

中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

李寅. 合成生物制造. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1267-1294.

LI Y. Biomanufacturing driven by engineered microbes. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1267-1294.

摘 要: 本文对 2021 年《生物工程学报》在合成生物制造领域发表的综述和论文进行了评述。重点讨论了大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌、酿酒酵母、丝状真菌以及非模式细菌、非传统酵母等主要底盘细胞的设计改造, 氨基酸、有机酸、维生素、高级醇、天然化合物 (萜类、黄酮类、生物碱类)、抗生素类、酶与生物催化产品、生物聚合物等产品的生物制造及生物质和一碳原料利用, 以及构建细胞工厂所用到的调控、进化、高通量筛选等关键技术的进展情况。

关键词: 合成生物学; 生物制造; 工程生物; 初级代谢产物; 次级代谢产物; 细胞工厂

Biomanufacturing driven by engineered microbes

LI Yin

CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: This article summarized the reviews and research articles published in *Chinese Journal of Biotechnology* in the field of biomanufacturing in 2021. The article covered major chassis cells such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, filamentous fungi, non-model bacteria and non-conventional yeasts. Moreover, this article summarized the advances in the production of amino acids, organic acids, vitamins, higher alcohols, natural compounds (terpenoids, flavonoids, alkaloids), antibiotics, enzymes and enzyme-catalyzed products, biopolymers, as well as the utilization of biomass and one-carbon materials. The key technologies used in the construction of cell factories, such as regulation, evolution, and high-throughput screening, were

Received: April 11, 2022

Corresponding author: LI Yin. Tel: +86-10-64807485; E-mail: yli@im.ac.cn

also included. This article may help the readers better understand the R&D trend in biomanufacturing driven by engineered microbes.

Keywords: synthetic biology; biomanufacturing; engineered microbes; primary metabolites; secondary metabolites; cell factories

2021 年被称为合成生物学投资元年, 全年合成生物学领域融资超过了前十年, 一批合成生物领域初创企业进入市场。同年, “碳达峰、碳中和”正式成为国家战略目标, 具有“碳中和”属性的生物制造产业备受关注。“合成生物学”加持“生物制造”, 使得“合成生物制造”成为推动新一代生物技术在工业领域应用的主力军。

2021 年, 《生物工程学报》继续关注合成生物技术与合成生物制造领域的发展。承蒙中国科学院天津工业生物技术研究所王钦宏研究员组织出版了代谢工程 30 年专刊^[1]、江南大学邓禹教授和上海交通大学赵心清教授组织出版了工业微生物创新与突破专刊^[2]以及北京化工大学袁其朋教授和中国医学科学院药物研究所孔建强研究员组织出版了天然产物的生物合成专刊^[3], 《生物工程学报》全年在合成生物制造领域发表了一批优秀的综述和研究论文。这些综述和研究论文覆盖了主要的底盘细胞, 如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌、酿酒酵母、丝状真菌以及非模式细菌、非传统酵母等, 涉及到氨基酸、有机酸、维生素、高级醇、天然化合物 (萜类、黄酮类、生物碱类)、抗生素类、酶与生物催化产品、生物聚合物等主要产品类型及生物质和一碳原料利用, 以及构建细胞工厂所用到的调控、进化、高通量筛选等关键技术。

从这些综述和研究论文中, 基本可以了解到各领域国内外相关研究的最新进展。需要说明的是, 本文所评述的相关产品和技术, 主要

是 2021 年发表在《生物工程学报》上相关论文中所提到的产品和技术, 只是合成生物制造众多产品和技术中很小的一部分; 同时, 合成生物制造领域的发展非常迅速, 很多产品的技术指标不断被刷新, 本文所提到各种产品的技术指标, 站在今天看, 很多可能也已经不是最新或者最高的技术指标。但是, 当我们把《生物工程学报》2021 年全年发表的合成生物制造相关文章放在一起梳理时, 还是能够发现一些共性的规律。因此希望本文能够有助于本刊读者了解合成生物制造研究的现状和发展趋势, 也期待本刊的读者和作者能够继续将优秀的研究论文和综述文章投稿给《生物工程学报》, 为推动中国合成生物制造研究和产业的发展一起努力。

1 细胞工厂和底盘细胞

1.1 大肠杆菌

大肠杆菌由于遗传操作工具成熟, 是目前合成生物制造领域使用最广泛的底盘细胞。合成生物学的发展, 使大肠杆菌从一种模式微生物, 发展成为一种非常重要的细胞工厂。中国科学院天津工业生物技术研究所张学礼团队创制的厌氧生产 L-丙氨酸、L-缬氨酸、D-乳酸、丁二酸的大肠杆菌细胞工厂, 近年来已经在国内实现万吨级产业化, 具有示范意义。除此之外, 国内外相关企业利用大肠杆菌细胞工厂生产 1,3-丙二醇、L-赖氨酸、L-苏氨酸也已经达到数十万吨到百万吨的规模。于勇等^[4]从途径设

计、合成途径创建与优化和细胞全局优化 3 个方面,总结了构建大肠杆菌细胞工厂的重要技术。在途径设计方面,主要是优化大肠杆菌自身代谢途径、引入外源代谢途径以及创建自然界中不存在的全新途径。在合成途径创建方面,需要用到 DNA 片段组装技术、基因组编辑技术和基因表达调控技术,其中单基因调控、多基因调控和基因动态调控这些基因表达调控技术,对提高代谢途径效率至关重要,也是构建高效大肠杆菌细胞工厂的重要技术壁垒。在细胞全局优化方面,最重要的因素是要考虑如何实现辅因子平衡,为此经常需要根据途径中所使用酶的特性,或改变辅因子的偏好性,或改变辅因子的再生途径,在此基础上通过自适应进化,不断提高目标产品的生产效率。目前,以大肠杆菌为底盘生产特定的大宗化学品,对葡萄糖得率可以达到 0.8 g/g 以上,体积浓度普遍超过 100 g/L。考虑到大肠杆菌在较长时间之内仍然会是最容易进行遗传操作的微生物,预期未来将有更多非天然的全新途径在大肠杆菌中实现,这些全新途径可能会带来更高的产品得率,而大肠杆菌抗逆性能的不不断提升,则有可能将大宗化学品的体积浓度提升到数百 g/L 的水平,并带动一批生产精细化学品的大肠杆菌细胞工厂实现产业化。

1.2 枯草芽孢杆菌

枯草芽孢杆菌在过去较多用于生产 α -淀粉酶、 β -环糊精糖基转移酶、L-天冬酰胺酶、纳豆激酶、氨肽酶等工业酶以及核黄素。由于其公认安全 (Generally regarded as safe, GRAS) 的特性,近年来也被逐渐改造成为枯草芽孢杆菌细胞工厂。吕雪芹等^[5]从启动子工程、基因编辑、基因回路、辅因子工程以及途径酶组装等方面介绍枯草芽孢杆菌在代谢工程领域的应

用,康倩等^[6]则重点从基因组精简及优化、全局调控、多位点和多维度调控、动态调控、膜工程改造、蛋白表达以及分泌调控方面,总结了枯草芽孢杆菌细胞工厂的进展。相对于大肠杆菌而言,枯草芽孢杆菌可使用的启动子、核糖体结合位点、终止子以及其他一些调控基因表达的元件相对较少,近年来的工作使这些元件不断丰富。基于反向筛选标记、基于位点特异性重组和基于 CRISPR 的枯草芽孢杆菌基因编辑系统以及碱基编辑器也已经开发出来,并构建了可响应发酵环境变化、响应胞内代谢物浓度变化以及响应细胞密度的基因回路。针对枯草芽孢杆菌,还发展了基于无支架、DNA 支架、RNA 支架、蛋白支架以及微区化的酶组装策略。经过改造的枯草芽孢杆菌细胞工厂,可以发酵生产鲨肌醇等单糖衍生物、角鲨烯等萜类化合物、透明质酸、硫酸软骨素等活性多糖、核黄素等产品,其中乙偶姻的产量可达到 56.7 g/L, N-乙酰氨基葡萄糖产量超过 130 g/L。

1.3 谷氨酸棒杆菌

谷氨酸棒杆菌是一种重要的氨基酸生产菌株。自 20 世纪 50 年代日本味之素公司采用谷氨酸棒杆菌生产 L-谷氨酸以来,目前每年用该菌株生产的 L-谷氨酸和 L-赖氨酸超过 600 万 t。由于其 GRAS 的特性,生长速度快、营养需求低、底物谱广等优势,除了氨基酸之外,据报道谷氨酸棒杆菌也用于生产有机酸、醇类、植物天然产物、蛋白质等 70 余种产品,年产值超过千亿元。王钰等^[7]总结了针对谷氨酸棒杆菌开发的基因组编辑和碱基编辑技术,CRISPR 干扰和人工小 RNA 等基因表达调控技术,用于提高生长速度、胁迫耐受性和底物利用能力的适应性进化技术,以及用于氨基酸高通量筛选的生物传感器等代谢工程使能技术。谷氨酸棒

杆菌基因组的 3 000 余个基因中,仍有超过 40% 的基因功能未知或缺乏实验验证,开发能够高通量发掘谷氨酸棒杆菌基因功能的技术是该领域重要的努力方向。此外,由于谷氨酸棒杆菌生产氨基酸已经超过 100 g/L 的水平,谷氨酸棒杆菌在生产过程中经常会受到高渗透压胁迫、pH 波动导致的胁迫、氧胁迫以及大规模培养中生物反应器不均一性产生的氧气和底物浓度变化。徐美娟等^[8]总结了谷氨酸棒杆菌应对发酵过程中各种胁迫的耐受机制,并总结了通过功能基因元件增强耐热、耐酸、耐碱、耐氧、耐高渗性能,通过分泌转运蛋白工程增强氨基酸或有机酸外排,通过转录调控因子和小 RNA 调控目标基因表达提高抗逆性,以及利用适应性进化策略或设计基因线路来提高谷氨酸棒杆菌的工业鲁棒性。

1.4 非模式细菌

除了为人熟知的大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和谷氨酸棒杆菌等模式细菌,需钠弧菌 (*Vibrio natriegens*)、拜氏不动杆菌 (*Acinetobacter baylyi*)、运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)、扬氏梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*)、产乙醇梭菌 (*Clostridium autoethanogenum*)、真氧产碱杆菌 (*Cupriavidus necator*) 和盐单胞菌 (*Halomonas bluephagenesis*) 等非模式细菌近年来也被广泛用作底盘细胞改造,杨永富等^[9]对此进行了总结。这些非模式细菌都有一些特点。例如,需钠弧菌生长速度快,生长周期不到 10 min,底物谱很宽,能在低氧环境中固定氮气。拜氏不动杆菌转化效率高,能够在自然状态下摄取线性 DNA 并发生同源重组,能够天然积累脂质。运动发酵单胞菌具有特殊的乙醇生产模式,是唯一能够在厌氧条件下利用 ED 途径的微生物,乙醇得率高,还能够固定氮气。扬氏梭菌和产

乙醇梭菌能够利用一氧化碳(或二氧化碳和氢气)等一碳化合物生产乙醇等化学品,近期经改造的产乙醇梭菌还实现了以一氧化碳生产丙酮和异丙醇^[10]。真氧产碱杆菌和盐单胞菌能够生产聚羟基烷酸酯,而盐单胞菌表现出更适应工业生产 PHA 的潜力。非模式微生物一般分离自一些特殊的生长环境,具有一些特殊的代谢途径、生理性状及理想细胞工厂的优良特点,从底物利用、产物合成、抗逆性能方面,有可能可以和模式细胞工厂形成一个很好的互补。将模式细菌与非模式细菌的优势结合起来,有可能设计出功能更加强大的细胞工厂。

1.5 酿酒酵母

作为一种典型的模式真核生物,酿酒酵母由于其对苛刻发酵条件的耐受性、基因工程操作的高效性和公认的安全性,在真核生物中最先被发展成为细胞工厂。江丽红等^[11]首先总结了酿酒酵母的经典代谢工程方法,包括以启动子工程、终止子工程和基因拷贝数、辅因子平衡、转运子工程、调控蛋白改造为核心的基因表达调控技术和基因组靶向改造技术,随后讨论了基于基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学以及代谢通量组学分析,在基因组代谢网络模型指导下的系统代谢工程,进而归纳了以组合途径优化、代谢途径酶共定位、动态调控工程、组合基因组工程、全基因组进化等策略为核心的合成生物学驱动的代谢工程方法。李宏彪等^[12]则讨论了以酿酒酵母为对象的基因编辑技术进展,包括经典的酿酒酵母基因编辑技术,基于归巢核酸内切酶 (MegNs)、锌指蛋白核酸酶 (ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALENs) 的基因组编辑系统,以及基于 CRISPR/Cas 系统、碱基编辑器、异源代谢途径多拷贝整合和基因组规模基因编辑的研究

进展。酿酒酵母除了被越来越多地用于生产有机酸、氨基酸、核苷酸、药用蛋白、工业酶制剂,经过合成生物学改造的酿酒酵母能够生产 130 g/L 的 β -法尼烯、25 g/L 的青蒿酸、33.6 g/L 的游离脂肪酸,还可以生产大麻素、灯盏乙素、阿片类药物,以及多种萜烯类、黄酮类、生物碱类、芳香氨基酸等多种植物次生代谢产物。这些典型案例显示出在酿酒酵母中组装复杂途径和合成复杂化合物的潜力。

1.6 非传统酵母

酿酒酵母和裂殖酵母是最为人熟知的传统酵母,非传统酵母一般指解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*)、毕赤酵母 (*Pichia*)、假丝酵母 (*Candida*)、汉逊酵母 (*Hansenula*) 等。这些非传统酵母或者能够代谢甲醇或废乳清等特殊底物,或具有很宽的底物谱,生长通常比较快,抗逆性比较强,有些酵母胞内的乙酰-CoA 和 NADPH 供应充分。由于这些特点,非传统酵母被广泛用于生产蛋白质、油脂或生物合成不同的化学品。苏立秋等^[13]首先介绍了 CRISPR-Cas 基因编辑技术在非传统酵母中的应用进展,然后总结了在改造非传统酵母以拓宽底物利用谱、增强乙酰-CoA 前体供应、强化目标产物合成代谢通量以及细胞生理全局优化方面的进展。马克斯克鲁维酵母能够以木糖和甘油为碳源生产超过 300 g/L 的木糖醇,以菊粉为原料生产 203 g/L 的柠檬酸;解脂耶氏酵母可以甘油为原料生产 160 g/L 的丁二酸。近年来一些以非传统酵母生产萜类化合物的例子,显示出这些非传统酵母作为底盘细胞的潜力,以及进一步开发和利用酵母生物多样性的意义^[14]。

1.7 丝状真菌

丝状真菌是重要的工业微生物,已经被用

于生产纤维素酶、糖化酶等重要工业酶、柠檬酸、衣康酸等大宗有机酸以及抗生素等次级代谢产物。相对于原核生物和酵母等真核生物,对丝状真菌的工程改造相对缓慢。由于丝状真菌的重要应用价值,丝状真菌相关的合成生物学与代谢工程研究发展也非常快。李金根等^[15]总结了丝状真菌的遗传转化方法、基因敲除技术、基因组编辑技术、组学技术等技术的发展,并在代谢网络模型构建的基础上,总结了丝状真菌的相关应用。郑小梅等^[16]则重点讨论了针对黑曲霉的基因组编辑技术,介绍了 Cas 蛋白、sgRNA、供体 DNA 与转化方式等方面不同的设计策略,打破了黑曲霉高效遗传操作的屏障,使黑曲霉基因组中的基因失活、基因插入、碱基编辑与启动子替换等基因编辑与表达调控得以实现。黑曲霉生产柠檬酸是丝状真菌最重要的工业应用之一,全球每年产量近 200 万 t。目前已经可以在 3 d 内生产 170 g/L 的柠檬酸,转化率接近理论值。土曲霉生产衣康酸的水平也可达到 160 g/L,满足每年 10 万 t 左右的衣康酸市场。稗黑粉菌 (*Ustilago trichophora*) 能够以甘油生产 196 g/L 的苹果酸,江南大学改造的米曲霉可以生产 165 g/L 的苹果酸,天津科技大学改造的黑曲霉可以生产超过 200 g/L 的苹果酸,而中国科学院天津工业生物技术研究所以改造的嗜热毁丝霉,能够直接以纤维素为原料生产 180 g/L 的苹果酸。丝状真菌也是生产工业蛋白质的重要宿主,也可以用于生产他汀类、黄曲霉毒素等聚酮类、青霉素、头孢菌素和环孢菌素等非核糖体肽类抗生素、胡萝卜素等萜类化合物等。丝状真菌一般存在多核现象,因此遗传操作仍然是改造丝状真菌的限速步骤。丝状真菌存在多个细胞器,如果代谢途径分布在不同细胞器中,也会给代谢途径工程带来困难。鉴于

丝状真菌对多种底物的利用能力和丰富的代谢多样性, 增强对丝状真菌的基因组编辑能力, 有望进一步推动丝状真菌细胞工厂的改造。

2 生物制造

2.1 氨基酸

我国是氨基酸生产大国。马倩等^[17]详尽地总结了近年来合成生物学与代谢工程结合改造优化氨基酸生产菌株的进展。2019年, 我国氨基酸发酵产品总产量约为 609 万 t, 其中, L-谷氨酸 286.6 万 t, L-赖氨酸 253.3 万 t, L-苏氨酸 60.6 万 t, L-色氨酸 1.7 万 t, 其他氨基酸 6.9 万 t。氨基酸菌种生产水平不断提升, 谷氨酸棒杆菌工程菌生产 L-谷氨酸发酵水平可达 220 g/L、L-缬氨酸 227 g/L、L-亮氨酸 40 g/L。大肠杆菌工程菌生产 L-赖氨酸可达 240 g/L、L-苏氨酸 120 g/L、L-丙氨酸 120 g/L、L-异亮氨酸 60 g/L、L-酪氨酸 55 g/L、L-苯丙氨酸 73 g/L、L-色氨酸 49 g/L, L-高丝氨酸产量也可以达到 40 g/L^[18], 表现出超越谷氨酸棒杆菌的趋势。这些进展主要是通过代谢工程、系统代谢工程和基于合成生物学的代谢工程实现的。动态调控细胞代谢过程, 实现细胞生长与氨基酸生产的平衡重构, 对于提高目标氨基酸的转化率与生产效率具有重要的作用, 应在氨基酸育种研究中予以充分重视。此外, 传统的氨基酸发酵一般采用好氧发酵, 目标氨基酸的转化率较低。近年来, L-丙氨酸和 L-缬氨酸的厌氧发酵已实现产业化, 其技术关键在于实现辅因子平衡。氨基酸的厌氧发酵对减少能源消耗、提高原料利用率、有效降低成本意义重大, 也是氨基酸工程菌株构建新的方向。

2.2 有机酸

有机酸是一类重要的生物制造产品, 其中

含有一个或两个羧酸官能团的四碳有机酸, 如反丁烯二酸 (富马酸)、2-羟基丁二酸 (苹果酸)、丁二酸 (琥珀酸) 是重要的平台化学品, 在于食品、制药、化妆品、洗涤剂、聚合物和纺织等领域具有广泛的用途。四碳有机酸的生物合成理论上具有较高的得率。以葡萄糖为原料生物合成琥珀酸为例, 在生物合成过程中还能固定 CO₂, 因此总的得率超过 1 g/g。王颖珊等^[19]以富马酸、苹果酸、琥珀酸为例, 总结了四碳有机酸的不同生物合成路线和代谢工程策略。经工程改造的解脂耶氏酵母、琥珀酸放线杆菌和大肠杆菌, 琥珀酸的产量都可以超过 100 g/L。目前工程菌生产富马酸的水平相对还比较低, 基本上在 50–60 g/L 的水平, 得率最高可达到 0.88 g/g, 还无法与化学法竞争。四碳有机酸作为大宗化学品和平台化学品, 生产成本控制非常重要。若以葡萄糖为原料, 得率达到 0.9 g/g 以上, 体积浓度达到 100 g/L 以上, 可具有工业化生产的潜力。新的代谢途径设计、高效的关键酶筛选以及精细的途径调控, 对构建四碳有机酸高产工程菌十分关键。

2.3 维生素

维生素在医药、食品添加剂、饲料添加剂、化妆品等领域具有广泛用途。近年来合成生物学与代谢工程技术的发展, 极大地推动了维生素的生物合成不断替代化学合成。王岩岩等^[20]总结了维生素 B₁、B₂、B₃、B₅、B₆、B₇、B₉、B₁₂ 和维生素 C 的前体等水溶性维生素以及维生素 A、维生素 D 的前体、维生素 E、维生素 K 等脂溶性维生素的生物合成研究现状。维生素 B₁ (硫胺素) 的生物活性形式为焦磷酸硫胺素 (TPP), 目前生物合成产量还不到 1 mg/L, 而化学合成维生素 B₁ 的成本很低。维生素 B₂ (核黄素) 发酵生产水平可以达到 30 g/L 左右,

已经替代化学合成。维生素 B₃ 包括 3 种形式：烟酸、烟酰胺和烟酰胺核糖核苷，目前尚无发酵生产路径，化学合成结合生物催化是一个发展方向。维生素 B₅ (泛酸) 可以通过 D-泛解酸和 β -丙氨酸酶法合成获得，水平超过 100 g/L，但是 D-泛解酸的获取比较困难，发酵法直接生产泛酸的技术也正在发展中。维生素 B₆ 包括吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺及其相应的磷酸酯衍生物，发酵法目前可以达到 1 g/L 的水平；发酵法生产维生素 B₇ (生物素) 可以达到 15 g/L 的水平；但发酵法生产维生素 B₉ (叶酸) 目前仅在 mg/L 的水平。这 3 种维生素的生物合成路线都无法与化学合成竞争。维生素 B₁₂ (钴胺素) 的发酵水平为 200–300 mg/L，已经可以支撑工业生产。维生素 C 是一种大宗维生素，全球每年需求 10 万 t 以上^[21]，两步发酵法生产水平可以达到 100 g/L 以上，一步发酵法也在进展中。

在脂溶性维生素中，维生素 A 主要通过化学合成生产。维生素 D 根据其侧链结构的不同有 D₂、D₃、D₄、D₅、D₆ 和 D₇ 等多种形式，其中有些形式，如 D₂ 的前体麦角固醇可以通过发酵法生产；一些微生物也可以合成 25-羟基维生素 D₃，产量在 0.5 g/L 左右。维生素 E 是一组亲脂化合物，包含生育三烯醇和生育酚共 8 种自然形式。以微生物发酵合成的 β -法尼烯为中间体可以合成异植物醇，进而合成维生素 E，这一路线已经实现产业化。一些光合微生物在胞内也会积累维生素 E。维生素 K 则主要包括 K₁ (叶绿醌/叶绿基甲萘醌) 和 K₂ (甲萘醌)，其中 MK-7 被认为是维生素 K₂ 最具生物活性的形式，微生物最高可以合成到 400 mg/L。未来，哪些维生素的生物合成能够实现产业化，主要取决于生物合成途径设计、关键酶活性、途径调控水平和底盘细胞能力。

2.4 高级醇

碳原子数大于 2 的醇，如丙醇、丁醇、戊醇、己醇、庚醇等高级醇，具有与汽油接近的能量密度，同时兼备不吸湿与腐蚀性低的特性，可以与汽油以任意比例混合甚至完全取代汽油，因而被认为是最具前景的燃油替代品。近十年来，大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、恶臭假单胞菌、丙酮丁醇梭菌、丁酸梭菌、扬式梭菌、聚球藻、酿酒酵母等菌株被用于改造生产正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、2-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-丁醇等，马晓焉等作者^[22]对此进行了总结。采用气体吹提与发酵耦合的方式，高级醇的产量可以超过 100 g/L，但这样的方式难以在工业上放大。限制微生物生产高级醇的主要因素是其对葡萄糖的得率比较低。除此之外，胞内还原力的供应和平衡，以及高级醇对细胞的毒性也是高效生产高级醇需要解决的问题。在油价较低的情况下，发酵法生产的高级醇还难以在经济上有竞争力。因此也发展出了以木质纤维素水解液、蛋白质废弃物、一碳化合物为原料的高级醇生产技术，这些技术在理论上可以将成本降低到比以葡萄糖为原料更低的水平，例如酿酒酵母将木糖转化为高级醇或其他有用化学品^[23]。孙中贯等^[24]则对酿酒酵母中高级醇的代谢途径进行了总结，相关知识在改造生物合成高级醇的工程菌时也可以参考。

2.5 天然化合物

植物来源的天然活性产物在医药、农药、日化、护肤和保健品等领域具有重要用途，例如广为人知的抗疟药青蒿素、抗肿瘤药紫杉醇、心脑血管疾病药物丹参酮以及镇痛药吗啡等^[25]。这些天然化合物在植物中含量很低，提取分离困难。同时，这些天然化合物一般结构复杂，

化学合成不仅难度大,还容易造成环境污染。利用合成生物学技术通过微生物细胞工厂来重建这些植物来源天然化合物的生产方式,具有环境友好且不受外界环境影响、生产速度快、易于大规模实现等多种优势,是未来合成生物制造产业的重要方向。植物来源的天然化合物,最广为人知的是萜类化合物、黄酮类化合物和生物碱类化合物。姜逢霖等作者^[25]选择了一些最典型的植物来源的药用化合物,总结了合成生物学生产这些物质的进展。这些物质包括青蒿素、紫杉醇、人参皂苷、丹参酮等药用萜类化合物,长春新碱、吗啡等生物碱类化合物,以及灯盏花素等黄酮类化合物。植物天然化合物很多也都是芳香族化合物的衍生物。

2.5.1 萜类化合物

萜类化合物的生物合成通常经历 3 个阶段。第一阶段是通过莽草酸途径、糖酵解途径、甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 途径或甲基赤藓醇 4-磷酸途径 (methylerythritol 4-phosphate, MEP) 途径,生成异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP)。第二阶段是在异戊烯基转移酶的催化下,不同数目的 IPP 和一分子 DMAPP 可分别生成单萜化合物的前体——10 碳的牻牛儿基焦磷酸 (geranyl diphosphate, GPP)、倍半萜和三萜化合物的前体——15 碳的法尼基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 以及二萜和四萜化合物的前体——20 碳的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP)。第三阶段是 GPP、FPP 和 GGPP 通过不同的萜类合酶的催化及细胞色素 P450 单加氧酶 (CYP450 酶) 催化的羟化、环氧化、氮氧化、脱胺等氧化还原反应,形成多种多样的萜类化合物。陈明凯等^[26]对改造酿酒酵

母生产萜类化合物进行了总结。本文按照单萜、倍半萜和三萜、二萜和四萜的顺序进行评述。

以 GPP 为前体,引入不同的合酶,同时阻断目标化合物的降解或利用途径,可以合成不同的单萜化合物。如引入香叶醇合成酶生产无环单萜醇——香叶醇,产量 1.6 g/L 以上;引入柠檬烯合成酶,生产环状单萜——柠檬烯,产量接近 1 g/L。以 FPP 为前体,引入广藿香醇合酶,则可以合成超过 400 mg/L 的倍半萜醇——广藿香醇,在化妆和医药领域中具有重要用途。

姜龙瑜等^[27]对杜松烷型倍半萜天然产物生物合成途径的解析情况进行了总结。根据杜松烷型倍半萜化合物取代基以及氧化还原程度的不同,可以分为简单杜松醇类、芳环杜松烷类、杜松烷内酯/内酰胺类、杜松醛酮酸类以及复杂杜松烷衍生物共 5 大类,这些化合物具有抗菌、抗炎、降糖等活性。青蒿素和棉酚是两种具有代表性的杜松烷型倍半萜化合物,它们的生物合成途径已经被阐明。紫穗槐二烯合酶催化 FPP 环化生成紫穗槐二烯,随后在 CYP450 酶催化下逐次生成青蒿醇、青蒿醛和青蒿酸,再通过化学半合成生成青蒿素。目前紫穗槐二烯的产量可以达到 40 g/L,青蒿酸的产量可以达到 25 g/L。天然的青蒿素合成过程,是通过青蒿醛还原酶生成双氢青蒿醛,再由醛脱氢酶生成青蒿素的直接前体双氢青蒿酸,最后经过一步非酶促的光氧化步骤生成青蒿素。这一植物自然过程,目前还没有能在微生物中实现。棉酚则是在 FPP 生成 δ -杜松烯的基础上,经过 P450 单加氧酶、双加氧酶、醇脱氢酶等催化,生成带有 α,β -不饱和羰基的中间体,再通过芳构化最终偶联形成。

角鲨烯是合成三萜化合物和类固醇等工业产品的重要前体,目前已知的三萜化合物有

3 万种之多。李宁等^[28]所在实验室在天然含有 MEP 途径的大肠杆菌中引入 MVA 途径,过量表达法尼基焦磷酸合酶基因 *ispA*,显著提高了从 IPP 和 DMAPP 生产 FPP 的效率。在此基础上导入来自嗜热蓝细菌的角鲨烯合酶(其转化数是人源角鲨烯合酶的 3 倍以上),发酵液中角鲨烯浓度达到 167 mg/L,单位干重细胞生产能力为 16.5 mg/g。采用分批补料发酵,角鲨烯的水平可以超过 10 g/L。通过角鲨烯环氧化酶催化的 NADPH 依赖的环氧化反应,可以将角鲨烯转变为环氧角鲨烯,环氧角鲨烯再经过一系列环化酶的催化,可以形成如齐墩果烷型、乌苏烷型、木栓烷型、羽扇豆烷型等五环三萜衍生物。邵喜喜等^[29]发现将大鼠角鲨烯环氧化酶截短,可以在大肠杆菌中实现较高活性表达,并借助大肠杆菌内源类细胞色素 P450 还原酶蛋白,在大肠杆菌中实现了环角鲨烯的生物合成。香树脂醇是一种五环三萜类化合物,主要分为 α -和 β -两种构型,都具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等生物活性,可从 FPP 出发,经过两步反应生成 (3S)-2,3-氧化喹烯,再经香树脂醇合酶催化得到。 α -香树脂醇水平已经超过 1 g/L, β -香树脂醇水平接近 300 mg/L。

另一方面,FPP 经鲨烯合酶和鲨烯环氧化酶连续催化,碳链延长并被氧化、环化,形成 2,3-氧化鲨烯,该化合物是合成三萜和甾醇的分支点。2,3-氧化鲨烯经不同的氧化鲨烯环化酶催化,形成环阿屯醇和羊毛甾醇等甾醇类物质的合成前体,经多步氧化和成环反应,生成薯蓣皂素^[30]。薯蓣皂素经结构修饰后得到多种甾体激素类药物。高产 FPP 和胆固醇的工程酵母可以作为薯蓣皂素生物合成的底盘细胞。人参皂苷是由两分子 FPP 催化形成的鲨烯和 2,3-氧化鲨烯逐步转化而成原人参二醇或原人参三醇,经 UDP-糖

基转移酶催化形成不同类型的皂苷化合物。酵母由于能够产生人参皂苷最重要的前体 2,3-氧化鲨烯而被用于构建生产人参皂苷的工程菌株,关键中间产物原人参二醇的水平可以达到 10 g/L 以上,Rh2 型人参皂苷的水平可以达到几 g/L。糖基转移酶的种类和活性决定了不同类型人参皂苷的生产水平,甚至可以合成出非天然人参皂苷。由于人参皂苷的类型众多,大量生产功能明确的稀有皂苷,或者生产与天然人参成分接近的皂苷混合物,是进一步努力的方向。

紫杉醇是一种二萜化合物。首先由紫杉烯合酶将 GGPP 环化为紫杉烯,随后在一系列羟化酶、加氧酶和酰基转移酶催化下生成紫杉醇。目前大肠杆菌工程菌已经可以生产超过 1 g/L 的紫杉烯,由于从紫杉烯到紫杉醇的途径非常复杂,目前尚未在微生物中实现紫杉醇的从头合成。丹参酮(tanshinones)是一类松香烷二萜化合物,是丹参酮 II A、丹参酮 II B、丹参酮 I、隐丹参酮等一类化合物的总称。从 GGPP 开始,先经柯巴基焦磷酸合酶催化生成柯巴基焦磷酸,然后在类贝壳杉烯合酶催化下生成次丹参酮二烯,再经过杂环化、芳香化、去甲基化等形成相应的丹参酮类化合物。目前次丹参酮二烯产量可以达到 3.5 g/L。雷公藤甲素是一种松香烷内酯型二萜化合物。夏梦等^[31]研究发现,在雷公藤甲素的生物合成过程中,MVA 与 MEP 途径间存在 IPP 转运,表明 MVA 和 MEP 途径共同参与了雷公藤甲素的生物合成,且二者间存在交互作用。另一个比较有代表性的二萜衍生物是香紫苏醇,可用于合成重要的龙涎香替代品降龙涎醚。从 GGPP 出发,经 8-羟基-柯巴基焦磷酸,再由香紫苏醇合酶催化生香紫苏醇,目前可以达到替代植物提取的水平。

四萜化合物有为人们熟知的番茄红素、

β -胡萝卜素、虾青素等。从 GGPP 出发, 经过八氢番茄红素合酶和八氢番茄红素脱氢酶可合成番茄红素, 水平可达 5 g/L 以上。以番茄红素为底物, 在番茄红素环化酶的催化下两端 β -环化, 即可生成 β -胡萝卜素, 可达到 2% 细胞干重的水平。 β -胡萝卜素经过羟化和酮基化反应可合成虾青素。提高虾青素的生产水平, 需要平衡好 β -胡萝卜素羟化酶和酮化酶的活性和偏好性, 工程菌株生产虾青素可以达到数百 mg/L 的水平。番茄红素经过氧化裂解等步骤, 经胭脂素醛、降胭脂素, 可以合成脱辅基类胡萝卜素——胭脂素。胭脂素又称红木素, 是一种重要的食品着色剂和第二大天然色素^[32]。

2.5.2 芳香族天然化合物

以糖酵解途径产生的磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) 和磷酸戊糖途径产生的赤藓糖-4-磷酸 (D-erythrose 4-phosphate, E4P) 为前体, 缩合生成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸 (3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate, DAHP), 采用这种“3+4”的方式可以合成莽草酸, 经 3-脱氢莽草酸, 进而生成分支酸。从 3-脱氢莽草酸出发, 可以合成原儿茶酸、儿茶酚、粘康酸、己二酸等, 还可以合成没食子酸、香草醛、苯酚、3-氨基苯甲酸、熊果苷等。从分支酸出发, 一个方向可以合成苯丙氨酸和酪氨酸, 另外一个方向可以合成色氨酸。从苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸出发, 又可以合成数十种在医药、化工、食品和饲料等领域具有重要应用价值的芳香族化合物。吴凤礼等^[33]总结了芳香族化合物代谢工程的进展。从葡萄糖出发, 谷氨酸棒杆菌工程菌可以生产 141 g/L 莽草酸、83 g/L 原儿茶酸、43 g/L 对氨基苯甲酸, 大肠杆菌工程菌可以生产 117 g/L 的 3-脱氢莽草酸、64 g/L 顺,顺-粘康酸、73 g/L 苯丙氨酸、

55 g/L 酪氨酸以及 49 g/L 色氨酸。大肠杆菌工程菌可以生产超过 100 g/L 的 3-脱氢莽草酸, 在高产 3-脱氢莽草酸的底盘细胞基础上, 合成的原儿茶酸、酪氨酸、左旋多巴产量分别可以达到 85 g/L、55 g/L、70 g/L。刘堂浩等^[34]建立了基于酪氨酸前体甜菜黄素荧光强度变化的酪氨酸生物合成高通量筛选方法, 可以用于筛选酪氨酸或其下游对香豆酸生产菌株的筛选。

芳香类天然产物是一类来自生物界具有苯环结构的有机化合物, 包括对羟基肉桂酸及其衍生物、黄酮类、芪类、香豆素类和芳香类生物碱等, 其种类繁多, 数量庞大, 已知的有数万种以上。根据芳环数量和侧链碳链长度的不同, 主要分为 C_6-C_1 型, 如香草酸、原儿茶酸、没食子酸和苯甲酸等; C_6-C_2 型, 主要指羟基苯乙酰类化合物; C_6-C_3 型, 主要指阿魏酸、咖啡酸、对香豆酸、芥子酸和香豆素等对羟基肉桂酸及其衍生物, 这类化合物聚合后可形成木质素; $C_6-C_2-C_6$ 型, 主要指白藜芦醇、银松素、紫檀芪、松芪和银松素甲醚等芪类化合物; $C_6-C_3-C_6$ 型, 即黄酮、异黄酮、新黄酮等黄酮及其苷类, 以及原花青素和综合性单宁等化合物; $C_6-C_7-C_6$ 型, 主要指姜黄素类化合物。刘良叙等^[35]、庄以彬等^[36]、李玲玲等^[37]总结了芳香类天然产物的合成生物学研究进展。

C_6-C_3 型对羟基肉桂酸及其衍生物, 是由苯丙氨酸和酪氨酸衍生而来, 核心是从苯丙氨酸到对羟基肉桂酸 (对香豆酸) 的苯丙烷途径。苯丙烷途径占光合固碳的 20% 左右, 形成数量庞大、广泛分布、结构复杂的酚类化合物。从葡萄糖从头合成咖啡酸、阿魏酸和肉桂酸可以达到数百 mg/L 到 g/L 的水平, 对香豆酸从头合成最高可以达到 12 g/L, 酪氨酸生物转化则可以达到近 40 g/L。从对香豆酸出发, 可以合成

近 100 mg/L 的覆盆子酮 (又称树莓酮)。牛文清等^[38]在莱茵衣藻中克隆表达了 4-香豆酰-CoA 连接酶和聚酮合酶, 莱茵衣藻中的覆盆子酮含量可以达到 6.7 $\mu\text{g/g}$ 湿重。香豆酰-CoA 和阿魏酰-CoA 羟化后自动成环, 可以合成香豆素类衍生物伞形酮、东莨菪素和七叶皂素, 水平接近 100 mg/L。以水杨酸为中间体的对羟基香豆素产量接近 1 g/L。苯丙烷类衍生物还包括酚类化合物香兰素, 从阿魏酸生物转化而来的香兰素可以达到数十 g/L, 从头合成的香兰素也超过了 100 mg/L; 也可以衍生合成对苯二酚苷类化合物熊果苷, 大肠杆菌生产水平可以超过 10 g/L。其他芳香族天然产物, 如大肠杆菌工程菌可以从头合成 2 g/L 的苯乙醇、4 g/L 间苯三酚, 为合成重要玫瑰香味物质三甲氧基苯奠定了基础。

对香豆酸和咖啡酸是酚酸类合成的关键前体, 丹参素是丹酚酸类产物的另一个苯环的结构来源。丹酚酸类是中药丹参中的水溶性活性成分, 包括丹参素、迷迭香酸、原紫草酸、丹酚酸等。丹酚酸可以看成是丹参素和咖啡酸的衍生物或酯化的聚合物。大肠杆菌工程菌可以合成 5.6 g/L 的丹参素。丹参素也可以由 L-多巴和苯丙酮酸酶法转化而来, 转化率在 85% 以上。丹参素与咖啡酰 CoA 酯化反应可以生成迷迭香酸, 目前在工程酵母中迷迭香酸的合成水平还未超过 10 mg/L。

对香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA 在芪合酶催化下, 可以将苯丙烷类代谢物引向 $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-C}_6$ 型芪类化合物合成支路, 又称二苯乙烯类多酚化合物, 主要包括白藜芦醇及其羟基化衍生物白皮杉醇、甲氧基化产物松芪和紫檀芪、糖基化产物虎杖苷。解脂耶氏酵母可以合成 12 g/L 的白藜芦醇。白藜芦醇的 5-位和 3,5-二位顺序发生甲氧基化反应, 可以生成松芪和紫檀芪, 后

者从头合成的水平可以达到 30 mg/L。白藜芦醇在 3-位和 4'-位发生糖基化反应, 可以分别生成白藜芦醇-3-*O*-葡萄糖苷 (即虎杖苷), 以及白藜芦醇-4'-*O*-葡萄糖苷。

2.5.3 黄酮类和聚酮类化合物

对香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA 在查尔酮合酶催化下, 可以将苯丙烷类代谢物引向 $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ 型黄酮类合成支路。已知的黄酮类化合物主要在植物中发现, 有 9 000 多种, 根据苯环位置和羟基数目可以分为黄烷酮、黄酮、异黄酮、黄酮醇、二氢黄酮类和花色素类, 通常以糖苷的形式存在, 多为 *O*-糖苷, 也有 *C*-糖苷, 具有多样的生物学活性和药理活性。

黄烷酮主要包括柚皮素、圣草酚、甘草素和根皮素等。在工程菌中最高可以生产 500 mg/L 左右的柚皮素。圣草酚是 3'-羟基-柚皮素, 在柚皮素途径基础上表达黄酮-3'-羟化酶和细胞色素 P450 酶, 即可合成圣草酚, 产量可达到 100 mg/L。若在柚皮素途径基础上表达查耳酮还原酶, 则可生成 5-去羟基-柚皮素, 即甘草素。对香豆酰 CoA 在双键还原酶催化下生成 *p*-二氢香豆酰 CoA, 然后在查耳酮合成酶的作用下生成根皮素。从黄烷酮途径出发, 表达异黄酮合成酶和细胞色素 P450 酶可合成异黄酮, 例如催化甘草素生成大豆苷元; 若表达黄酮合成酶, 则合成黄酮产物, 例如分别催化柚皮素和圣草酚, 生成芹菜素和木犀草素。

从黄烷酮出发, 经过一步或几步黄烷酮羟化酶催化生成二氢黄酮醇, 然后在黄烷酮合酶催化下合成黄酮醇, 包括山萘酚、槲皮素、杨梅黄酮和菲瑟酮等。以柚皮素为前体, 可以合成了超过 1 g/L 的山萘酚, 山萘酚 3'-羟基化后可生成槲皮素。山萘酚和槲皮素都实现了在酿酒酵母中的从头合成。杨梅黄酮是山萘酚的

3'-和 5'-二羟基化产物。以甘草素为前体,则可以合成菲瑟酮。

黄酮类化合物经糖基化、异戊烯基化、甲基化等后修饰反应,形成黄酮衍生物,如黄酮糖苷、异戊二烯柚皮素和甲基柚皮素等产物,其中槲皮素糖苷、根皮素糖苷和花色苷、芹菜素糖苷等黄酮糖基化产物研究较多。槲皮素含有 5 个羟基 (3-OH、5-OH、7-OH、3'-OH、4'-OH),均可发生 *O*-糖基化反应。槲皮素 3-*O*-糖苷是糖基以糖苷键和槲皮素 C 环上的 C3 位相连形成的槲皮素衍生物。不同类型的糖基基团连接在槲皮素 C3 位上,可以形成种类繁多的 3-*O*-糖苷,具有广泛的药理活性。酰基化修饰可以提高槲皮素 3-*O*-糖苷的脂溶性,增强生物利用度。由于槲皮素 3-*O*-糖苷的多羟基特性,使得酶法酰基化修饰比化学法更具优势。王雪凝等^[39]总结了槲皮素 3-*O*-糖苷体外酶法修饰和全细胞生物转化法修饰的进展,所使用的酶包括酰基转移酶、脂肪酶、蛋白酶以及酯酶,来源于南极假丝酵母的脂肪酶 CAL-B 酰化效果最好。

根皮素的糖苷包括根皮苷、诺瑟法根和三叶苷。花色苷是花青素的糖基化形式,可通过拓展黄酮醇合成途径得到。灯盏花素是一种分离自灯盏花的治疗心血管疾病药物,其生物合成始于 L-苯丙氨酸或 L-酪氨酸,经脱氨、羟化、氧化、异构等反应生成柚皮苷。柚皮苷在黄酮合酶 II 催化下生成芹菜素,再经过羟化和葡萄糖醛酸转移生成灯盏花乙素,即灯盏花素的主要成分。目前工程菌柚皮苷的产量可以达到 400 mg/L,灯盏花乙素和芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸实现了从头合成,产量超过 100 mg/L。

姜黄素类化合物属于聚酮化合物,主要通过丙二酰辅酶 A 的中心碳单元将两个苯丙氨酸单元连接而成^[40],主要包括姜黄素、去甲氧基

姜黄素和双去甲氧基姜黄素等。其中,姜黄素是由两个芳香族丙烯酸聚合而成的二酮类化合物。阿魏酰-CoA 或香豆酰-CoA 与丙二酰-CoA 在二酮-CoA 合成酶催化下形成阿魏酰二酮-CoA,然后在姜黄素合酶催化下,水解成为酮酸,再与另一分子的起始底物阿魏酰-CoA 或香豆酰-CoA 缩合形成不同的姜黄素类化合物。添加不同羧酸时,大肠杆菌工程菌的产量可以超过 100 mg/L;直接以阿魏酸为底物时,姜黄素产量可以达到 300–500 mg/L^[41]。对解脂耶氏酵母、恶臭假单胞菌和米曲霉进行工程改造也可以生产姜黄素,但是产量不及大肠杆菌。以酪氨酸为前体时,可以从头合成 50 mg/L 的双去甲氧基姜黄素。

植物大麻素是由脂肪酸和异戊二烯为前体,经过混合生物合成途径合成的一系列次生代谢产物,根据其异戊烯残基、间苯二酚核和侧链之间的差异可以分为 11 种亚型。高萍等^[42]总结了大麻素的生物合成主要包括 3 个阶段:聚酮合成、异戊烯化和氧化环化。己酰-CoA 与三分子丙二酰-CoA 首先缩合生成橄榄醇,然后环化生成橄榄酸,即大麻素的聚酮核部分,也是大麻素生物合成的第一个节点。橄榄酸随后与 GPP 发生异戊烯化反应,缩合生成大麻萜酚酸,然后在 Δ^9 -四氢大麻酚合成酶和大麻二酚合成酶催化下,单萜部分氧化环化,分别转化为 Δ^9 -四氢大麻酚酸和大麻二酚酸,再通过非酶脱羧过程生成大麻二酚和 Δ^9 -四氢大麻酚,即大麻的主要药理成分。途径优化的大肠杆菌工程菌可以合成 80 mg/L 橄榄酸;工程酵母中的大麻萜酚酸可以达到 136 mg/L, Δ^9 -四氢大麻酚酸水平达到 8.0 mg/L,大麻二酚酸的水平为 4.2 μ g/L,为大麻素的从头生物合成奠定了基础。

鬼臼毒素是来源于中药八角莲、山荷叶和

桃儿七等鬼臼属植物的芳基四氢萘类木脂素, 含有 5 个环和 4 个连续手性中心, 其衍生物是重要的抗肿瘤药物。鬼臼毒素的生物合成途径可分为 5 个模块: 由苯丙烷途径合成木脂素前体松柏醇; 罗汉松脂酚合成; 脱氧鬼臼毒素合成; 4'-去甲基表鬼臼毒素合成; 鬼臼毒素糖基化修饰。孟振等^[43]总结了鬼臼毒素及其衍生物生物合成研究进展, 目前在烟草中已经可以合成 4.3 mg/g 叶片干重的(-)-脱氧鬼臼毒素, 而且还可检测到 4'-去甲基表鬼臼毒素。目前已发现了多种可以产生鬼臼毒素的内生真菌, 工程酵母可以合成松柏醇的重要前体对香豆酸, 大肠杆菌工程菌中则已经可以实现松柏醇和罗汉松脂酚的生物合成, 为建立植物来源鬼臼毒素乃至木脂素类化合物新的生产方式奠定了基础。

2.5.4 生物碱类化合物

生物碱类化合物主要可分为有机胺类、异喹啉类、吡啶类、吲哚类和莨菪烷类, 有 1.2 万种之多。其中吲哚类的抗肿瘤药长春新碱以及异喹啉类的镇痛药吗啡相关的合成生物学研究已有所进展。长春碱和长春新碱是分离自药用植物长春花的二萜类吲哚生物碱。吲哚生物碱的生物合成始于莽草酸途径(吲哚途径)和类甲羟戊酸途径(类萜途径)。前者主要是通过色氨酸生成色胺, 后者经过 GPP 产生裂环马钱子苷。色胺和裂环马钱子苷在异胡豆苷合酶催化下缩合产生异胡豆苷。异胡豆苷在糖苷酶、一系列氧化还原酶和酰基转移酶催化下生成单萜类长春质碱和水甘草碱。水甘草碱再经过一系列氧化还原反应生成文多灵, 然后和长春质碱缩合生成长春碱和长春新碱。工程酵母可以合成 2 g/L 的异胡豆苷以及文多灵, 但长春新碱的从头合成尚未实现。

来自罂粟的吗啡属于苄基异喹啉类生物碱,

其生物合成从 L-酪氨酸衍生物多巴胺和 4-羟苯乙酯缩合成去甲乌药碱, 经一系列甲基转移、羟化、异构化生成 (*R*)-牛心果碱, 再经过若干步反应生成可待因和吗啡的前体蒂巴因。牛心果碱的生物合成途径在大肠杆菌和酵母中都已经构建成功, 产量在 50 mg/L 左右。在酵母中已经实现蒂巴因和氢可酮等阿片类化合物 $\mu\text{g/L}$ 级的从头合成, 并且在酵母中也已经可以将蒂巴因转化为吗啡、可待因、氢吗啡酮、羟考酮等苄基异喹啉类生物碱, 总产量可以达到 130 mg/L。

在天然产物的生物合成中, 羟基化、糖基化、甲基化和戊烯基化这些后修饰反应, 极大地扩展了天然产物的分子多样性。其中, 依赖于 *S*-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 的甲基化修饰, 对改善天然产物的稳定性、溶解性和生物活性非常重要, 是生成阿魏酸、杜鹃花素、木质素等天然产物的关键步骤。张香燕等^[44]总结了甲基转移酶在天然产物生物合成中的作用。前述苯丙烷途径中, 大多数苯丙烷类化合物含有多个羟基结构。通过甲基转移酶对羟基的甲基化修饰, 可以显著改善其代谢稳定性和细胞膜通透性, 形成具有生理和药理活性的化合物。在苯丙氨酸和酪氨酸转化为咖啡酸、香豆酸、阿魏酸、芥子酸、类黄酮、花青苷等多种生物活性物质的过程中, 氧-甲基转移酶都发挥重要作用。例如通过咖啡酸-*O*-甲基转移酶和咖啡酰 CoA-*O*-甲基转移酶, 可以将咖啡酸转变为咖啡醇和松柏醇。利用咖啡酰 CoA-*O*-甲基转移酶, 还可以将 5-羟基松柏醛转化为芥子醛, 5-羟基松柏醇转化为芥子醇, 5-羟基阿魏酸转化为芥子酸, 进而参与 *S*-木质素的合成。黄酮类-*O*-甲基转移酶可以将槲皮素转化为不同的槲皮素甲基醚, 增加了鼠李素类化合物的多样性。有些甲基转移酶能够特异性地将 C-7 羟基转化为甲

氧基,将芹菜素、山奈酚、木犀草素和槲皮素转化为相应的 7-*O*-甲基化化合物。在香草醛的生物合成中,原儿茶酸的甲基化是香草醛合成途径中的限速步骤。利用儿茶酚-*O*-甲基转移酶,不仅可以提高香草醛的产量,还可以扩展产物谱,例如合成香草醇。羧甲基转移酶可以催化形成水杨酸甲酯、苯甲酸甲酯、茉莉酸甲酯和邻氨基苯甲酸甲酯等植物中常见的甲酯类化合物香味成分,邻氨基苯甲酸甲酯的产量已经超过 5 g/L。N-乙酰血清素氧甲基转移酶参与将 5-羟色胺转化为褪黑素,在芳香族聚酮抗生素、氨基醌类生物碱、苯酞异喹啉类生物碱等天然产物的生物合成中也发挥重要作用。甲基转移酶的底物专一性较差,一方面这导致催化活性较低,限制了天然产物的高效合成;另一方面,较差的底物专一性,也是天然产物结构多样性的来源。提高甲氧基转移酶的稳定性和底物特异性,可以拓展其在天然产物微生物合成中的应用。

酰基化反应与羟基化、甲基化、糖基化相结合,是形成植物天然化合物结构多样化的分子基础。酰基转移酶主要有依赖于 CoA 以及依赖于葡萄糖酯的酰基转移酶两种,王宇等^[45]总结了这类酶的结构、功能和应用。依赖葡萄糖酯的酰基转移酶与丝氨酸羧基转移酶,称为丝氨酸羧基转移酶样酰基转移酶。这类酶仅参与植物次生代谢途径,例如形成具有抗虫活性的酰化葡萄糖酯,具有抗氧化活性的芥子酰类化合物包括芥子酰苹果酸酯、芥子酰葡萄糖酯、芥子酰胆碱,与多羟基酚类化合物花色苷发生酰化反应以提高其颜色稳定性,三萜类皂苷化合物酰基化修饰提高抗病活性,黄烷-3-醇的没食子酸酰化提高抗氧化活性,形成生长素吲哚-3-乙酰基肌醇等。在构建单糖和氨基酸开始生物合成

生物碱莨菪碱和东莨菪碱的途径研究中,通过酰化莨菪碱中间体,重现了植物中托烷生物碱的空间组织定位合成。

有观点认为,未来将有 300 万种化合物可以通过合成生物学实现生产。其中很多是植物来源的天然化合物。植物源天然化合物种类繁多、结构多样,合成途径复杂,对原生植物的基因组测序和天然化合物生物合成途径的解析是构建微生物细胞工厂的基础。用于构建植物来源天然化合物合成途径的底盘细胞,最好能够产生目标化合物的前体;由于大多数植物来源天然化合物将用于医药、食品和化妆品领域,底盘细胞的安全性也是一个重要的考量指标。在微生物中引入大量外源基因之后,对基因表达水平进行动态调节,优化细胞生长和产物合成之间的平衡,对提高天然产物的微生物生产水平至关重要。萜类、生物碱类和黄酮类化合物的生物合成途径,通常都有一个重要的节点前体化合物,生物合成的关键是要提高节点前体化合物的胞内产量,然后通过具有明确功能的异源酶的组合,来扩展目标天然化合物的种类。

2.6 抗生素和抗菌肽

大环内酯类抗生素是指由一个多元碳的内酯环附着一个或多个脱氧糖所构成的聚酮类抗生素,常见的大环内酯类抗生素有 14–16 元环的红霉素类衍生物和乙酰螺旋霉素等。大环内酯类抗生素发展的方向是提高胃酸稳定性和生物利用度、扩大抗菌谱和降低耐药性。大环内酯类抗生素的生物合成,首先是通过 I 型聚酮合酶合成大环内酯骨架,之后是对大环内酯骨架进行 I 型聚酮合酶后修饰,包括糖基化、羟基化、氧化和甲基化等。I 型聚酮合酶催化的终产物碳链的长度及立体化学构型是由单元的组成和数目决定的,每个单元均含有酮基合成

酶、酰基转移酶、酰基载体蛋白、酮基还原酶、烯醇还原酶、羟基脱氢酶中的一个或几个,对这些酶进行改造,可以改变对底物的选择性和催化效率。郝天怡和赫卫清^[46]总结了利用代谢工程方法来获得新的大环内酯类抗生素衍生物以及提高产量,包括如何利用代谢工程构建和改造 16 元环大环内酯类新药可利霉素,包括如何利用 CRISPR-Cas9 系统与核糖体工程获得新型可利霉素产生菌^[47]。

链霉菌产生的天然产物是抗生素的主要来源,如链霉素、四环素和万古霉素。目前临床上超过一半抗生素来源于链霉菌。基因组分析发现,每个链霉菌菌株平均有 20–40 个天然产物生物合成基因簇,显示链霉菌具有巨大的生物合成潜力。但是这些天然产物的合成,很大程度上受到途径特异性调控因子的影响。研究清楚这些途径特异性调控因子的功能,就有可能来提升它们调控的天然产物的产量。过表达正调控基因,或敲除负调控基因,都可以较大幅度地提高对应天然产物的产量。熊婉等^[48]综述了对链霉菌中 TetR 家族、SARP 家族、LuxR 家族等途径特异性调控因子的操控来提升其活性天然产物产量的研究进展。在异源宿主中通过合理操控调控基因以及启动子重组等策略,也有望大幅度提升目标代谢物产量,或激活沉默的天然产物生物合成基因簇,创制抗生素生产细胞工厂。Angucycline/angucyclinone 类天然产物广泛存在于放线菌中,是一类芳香聚酮类化合物,主要由 II 型聚酮合酶利用 1 个乙酰辅酶 A 作为启动单元和 9 个丙二酰辅酶 A 作为延伸单元来合成其分子骨架。Angucycline/angucyclinone 类天然产物最早于 20 世纪 60 年代已经发现,张景琰等^[49]总结了这类天然产物近 10 年来的最新研究进展,包括新发现的此类

化合物的结构、活性和发现策略,结合基因编辑、药物设计、靶点预测等技术,将有助于通过合成生物学的方法发现具有独特分子结构或具有新作用机制的化合物,促进此类天然产物的临床开发。

微生物源农用抗生素在生物农药中占据重要地位,是植物病虫害防治和绿色可持续发展农业领域的研究热点。已经广泛应用的农用抗生素主要包括井冈霉素、阿维菌素、中生菌素、南昌霉素、春雷霉素、浏阳霉素、多抗霉素、申嗪霉素、武夷霉素、宁南霉素、多杀菌素、灭瘟素等。近十年来又发现了一批新的农用抗生素,如含氮杂环结构的吩嗪类抗生素,包括吩嗪-1-羧酸(申嗪霉素)、吩嗪-1-甲酰胺、2-羟基吩嗪;聚酮类抗生素如疏螺体素、米尔贝霉素、藤黄绿脓菌素、茴香霉素;多肽类抗生素如杆菌霉素 D、恩拉霉素;核苷类抗生素——新奥霉素。崔佳佳和张雪洪^[50]总结了微生物源农用抗生素近年来的研发进展,包括诱变育种、基因工程育种、基因组删减、核糖体工程等技术的应用。虫草素也是一种核苷类抗生素,又名 3'-脱氧腺苷,其生物合成途径被认为是腺苷磷酸化形成 3'-磷酸腺苷,然后去磷酸化生成 2'-羧基-3'-脱氧腺苷,再还原生成虫草素。霍春红等^[51]在酿酒酵母中导入磷酸水解酶和氧化还原酶,并经过发酵条件优化,6 d 可以生产近 140 mg/L 的虫草素。

微生物来源的非核糖体肽类天然产物是临床抗感染、抗肿瘤以及免疫抑制类药物的重要来源,如万古霉素、棘白菌素、达托霉素和环孢霉素等。非核糖体肽由模块化的非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS) 组装合成,每个模块主要包含识别和活化氨基酸装配单元的腺苷化结构域 A,运载氨

基酸和新生肽链的硫酯化结构域 T, 以及催化肽键形成的缩合结构域 C, 有时也会选择性地包括一些甲基化、氧化、杂环化、异构化结构域。不同结构域的排列组合形成了 NRPS 的多样性, 造就了非核糖体肽天然产物丰富的结构和多样的功能。王辰和徐玉泉^[52]总结了不同类型的 NRPS 的腺苷化结构域特异性调整、多结构域交换以及对接结构域改造等工程改造策略。确保杂合 NRPS 具备完整功能, 提升杂合 NRPS 的合成效率, 以及以理想的结构形式释放非核糖体肽终产物, 是未来 3 个主要努力的方向。杆菌肽就是一种主要由地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌产生的环肽类抗生素, 由 NRPS 催化合成。L-半胱氨酸是杆菌肽的 11 种组成氨基酸之一。李凌峰等^[53]通过强化 L-半胱氨酸及其前体物合成途径、改造胱氨酸转运途径等, 提高了地衣芽孢杆菌的杆菌肽产量。Oxysterlin 1 是从蛻螂中分离得到的具有 39 个氨基酸的两亲性阳离子抗菌肽, 属于昆虫抗菌肽中的天蚕素类, 具有线性的 α -螺旋结构且不含有半胱氨酸。由于抗菌肽对细菌宿主细胞的高毒性和对细胞内蛋白酶的敏感性, 抗菌肽的重组生产存在较大挑战。郭丽等^[54]采用存在温度相变的弹性蛋白样多肽 (elastin-like polypeptide, ELP) 与改进了对 pH、温度的敏感性以及 C-末端的断裂活性的蛋白质内含肽与抗菌肽融合表达, 通过降低 pH 和提高温度, 触发可控的 C-端断裂以释放靶蛋白, 从而最大程度上保证目标蛋白的活性。

天然生物活性多肽源自天然蛋白质, 一般由 2–50 个氨基酸组成, 例如从蛇毒中分离的具有降血压作用的替普罗肽 (pyroGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro), 其末端 7–9 位的 Ile-Pro-Pro 序列能够抑制血管紧张素转化酶, 达到降压效

果。从酸奶中也分离到了具有体内降血压活性的 Ile-Pro-Pro 和 Val-Pro-Pro 两种三肽序列。对目前已知序列及功能的多肽进行改造, 可获得功效更好的新型活性多肽, 例如提高半衰期。王彦珺等^[55]总结了天然活性多肽的发掘策略和生产技术。活性多肽可以“自上而下”, 通过直接提取、酶解和微生物发酵制备, 也可以“自下而上”, 以氨基酸为基本原料, 通过化学合成或生物合成方法制备。两种方法各有优缺点, 结合起来可以加速活性多肽的发掘和生产研发进程。

2.7 酶与生物催化

糖苷酶水解不同糖的糖苷键可生成一系列具有高附加值的糖及其衍生物, 在食品、医药、能源、纸浆等领域具有重要用途。糖苷酶在工业领域的应用一般需要在较高温度下进行, 因此提高糖苷酶的耐热性, 是改善糖苷酶工业生产性能的重要工作。刘蕊等^[56]总结了糖苷酶的催化机制与耐热性改造方法, 包括定向进化与高通量筛选方法、基于蛋白质结构与分子动力学模拟分析的理性设计与定点突变、结合定向进化与理性设计的半理性设计, 并对不同糖苷酶的耐热性改造结果进行了比较。未来, 利用计算设计辅助分子改造, 将是一个包括糖苷酶在内的工业酶耐热性改造的重要方向。 α -L-鼠李糖苷酶可以特异性地水解聚糖或者糖苷类化合物末端的多种 α 糖苷键, 释放 L-鼠李糖, 产生新的聚糖或糖苷类化合物, 在药物、化妆品和食品等领域用途广泛。朱小冲和唐双焱^[57]总结了不同来源的 α -L-鼠李糖苷酶的最适 pH、最适反应温度、热稳定性和底物特异性, 概括了 α -L-鼠李糖苷酶的催化机制和影响鼠李糖苷酶的因素, 为 α -L-鼠李糖苷酶的工业应用奠定基础。N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶是一种几丁质酶, 能特异性水解 β -1,4-糖苷键, 从壳二糖及其

聚合物和衍生物等的末端水解产生 N-乙酰氨基葡萄糖。由于 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶是外切水解，且酶活性较低，因此需要先用内切几丁质酶把几丁质切割为几丁寡糖，或由外切几丁质酶将几丁质水解为几丁二糖，然后再由 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶产生 N-乙酰氨基葡萄糖。李丛娜等^[58]在大肠杆菌中克隆表达来凝结芽孢杆菌来源的 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶并报道了其酶学特性，偶联外切几丁质酶可以实现 87% 的几丁质水解率。前面总结天然化合物的部分提到，白藜芦醇在 3-位发生糖基化反应，可以生成白藜芦醇-3-O-葡萄糖苷，即虎杖苷。虎杖是一种蓼科植物中药，其中虎杖苷含量为 1.5%–3.0%，白藜芦醇含量仅为 0.2%–0.4%。因此，采用 β -葡萄糖苷酶将植物来源的虎杖苷水解为白藜芦醇，也是制备白藜芦醇的一种方法。何成等^[59]从来自海洋的芽孢杆菌中克隆表达了一个新型 β -葡萄糖苷酶，35 °C 催化 2 h 虎杖苷的水解率可以达到 86%，具有一定的应用潜力。

偶合糖，又称呋喃葡萄糖基蔗糖，是在蔗糖分子的葡萄糖一侧通过 α -1,4-糖苷键连接数个葡萄糖而形成的多种低聚糖的总称，是一种可替代蔗糖的新型甜味剂，可通过环糊精葡萄糖基转移酶的偶合或歧化反应，将供体环糊精或淀粉链上的葡萄糖单元以 α -1,4-糖苷键连接到受体蔗糖的葡萄糖单元上来生产。黄燕等^[60]在食品级的枯草芽孢杆菌中克隆表达了环状芽孢杆菌的重组 β -环糊精葡萄糖基转移酶，胞内酶活达到 570 U/mL。添加 13.5 U/g 固定化 β -环糊精葡萄糖基转移酶与 45.0 U/g 异淀粉酶，可将 105 g/L 的马铃薯淀粉和 95 g/L 的蔗糖 95 g/L 以 90% 左右的产率转化为偶合糖。菊糖蔗糖酶能够以蔗糖为底物合成菊糖。菊糖的

β -(2,1) 糖苷键不能被人体消化，故可以视作一种益生元。微生物胞内通过菊糖蔗糖酶合成的菊糖，其分子量要比植物来源的菊糖高出两个数量级以上，在凝胶性能和稳定性方面具有更大优势。倪大伟等^[61]通过截断 N-端的信号肽和 C-端的细胞壁结合序列，在大肠杆菌中克隆表达了鸚鵡热乳杆菌的假定菊糖蔗糖酶并验证了其功能，可在 7 h 内催化 700 g/L 的蔗糖以 41% 的转化率生产 287 g/L 的菊糖。蔗糖磷酸合酶是一种糖基转移酶，也是蔗糖合成的限速酶。植物中蔗糖磷酸合酶的活性会影响淀粉和蔗糖的比例。苏纪勇等^[62]对蔗糖磷酸合酶的活性测定、抑制与激活、共价修饰调节，以及蔗糖磷酸合酶如何调节植物碳水化合物分配，如何促进植物生长和增加果实甜度的机制进行了总结。

静息巯基氧化酶是一种 FAD 依赖型巯基氧化酶家族蛋白，其同时包含了硫氧还蛋白结构域、富含螺旋结构结构域和 FAD 结合结构域，是目前已知唯一能够直接催化未折叠蛋白或小分子底物二硫键交联的多结构域蛋白质。含有 FAD 结合结构域的内质网氧化还原酶可以增强面团粘弹性，强化面筋网络结构以及提高面包、馒头等终端面制品品质的特性，静息巯基氧化酶理论上具有更高效的改良面制品品质的潜力。杜念等^[63]在大肠杆菌中重组表达了小麦静息巯基氧化酶，并证明该酶具有改善面包加工品质的能力。L-天冬酰胺酶催化 L-天冬酰胺水解生成 L-天冬氨酸和氨。在食品工业中，可以通过减少原料中 L-天冬酰胺的含量，降低生成丙烯酰胺的风险。在医药领域，L-天冬酰胺酶具有抗肿瘤活性。朱曼迟等^[64]对米黑根毛霉来源 L-天冬酰胺酶的活性中心、保守区域以外的部分位点进行定点突变，将酶活提高了 50%，

并提高突变酶在枯草芽孢杆菌中的表达量, 最终发酵酶活达到近 500 U/mL。

2,5-二甲基吡嗪是一种重要的香味化合物和药物中间体。从 L-苏氨酸出发, 在苏氨酸脱氢酶的催化作用下生成 2-氨基-3-酮丁酸, 再经 3 步自发反应即可形成 2,5-二甲基吡嗪。于海波等^[65]通过选择大肠杆菌来源的苏氨酸脱氢酶、引入 NADH 氧化酶、敲除参与分解 L-苏氨酸的途径以及甘氨酸合成途径和丙酮醛合成途径等策略, 构建的大肠杆菌工程菌可以在含有 5 g/L 的 L-苏氨酸体系中生成 1.1 g/L 的 2,5-二甲基吡嗪。

卤醇脱卤酶可通过相邻羟基和卤素分子进行亲核取代, 催化卤代醇底物的可逆反应, 脱卤形成相应的环氧化物和卤化氢。卤醇脱卤酶还可以催化环氧化物的不可逆开环反应, 形成新的 C-C、C-N 或 C-O 键, 因此可用于降解环境中的卤代醇类污染物, 以及制备环氧化合物和 β -取代醇等重要的手性药物、农药化学品及有机化学品合成中间体。徐纹静等^[66]报道了一种来源于红螺菌科细菌新型卤醇脱卤酶, 该酶低温稳定性较好, 30–40 °C 下半衰期 60 h, 具有一定的应用潜力。

金属有机框架是一种由有机配体和金属离子或团簇通过配位键自组装形成的具有分子内空隙的有机-无机杂化纳米材料, 能为不同酶分子创造稳定的微环境, 提高酶负载率的同时限制酶分子的泄露, 已被广泛应用于酶的固定化。林超平等^[67]利用金属有机框架固定化酰胺酶转化 N-苯乙酰-4-氟苯甘氨酸合成止吐药阿瑞匹坦的手性中间体 (S)-4-氟苯甘氨酸, 反应转化率达到 49.9%, *e.e.* 为 99.9%, 重复使用 20 次, 固定化酶仍保留 95.8% 的原始酶活力, 表现出良好的操作稳定性, 为工业生产奠定了基础。

2.8 生物质利用

里氏木霉是使用最为广泛的纤维素酶生产菌, 工程菌株的产酶水平可以达到 80 g/L, 对结晶纤维素具有较强的降解能力。曲霉酶系通常具有较高的淀粉酶、半纤维素酶、果胶酶及 β -葡萄糖苷酶活, 但对结晶纤维素的降解能力较弱。青霉在生态位上介于曲霉和木霉之间, 其所产酶系通常具有较高的 β -葡萄糖苷酶活性, 其纤维二糖水解酶 CBH I 和 CBH II 对结晶纤维素的降解能力均强于里氏木霉来源的同类蛋白, 木质素吸附能力相对较弱, 可以较少受到木质素“无效吸附”的影响。此外, 青霉酶系中半纤维素酶、果胶酶含量一般较为丰富。对于玉米皮、麦麸、甜菜粕、木薯渣等组分复杂的原料, 以及预处理后半纤维素保留较多的秸秆、木材原料, 利用青霉木质纤维素降解酶系来构建糖平台, 比木霉体系更有潜力。刘国栋等^[68]总结了青霉酶系的研究进展。对青霉菌株进行深度改造, 提高各种酶的表达和生产水平, 是青霉酶系是否有希望走向应用的关键。

在木质纤维素中, 木质素与纤维素、半纤维素直接交联, 还能形成碳水化合物-阿魏酸酯-木质素交联结构。阿魏酸能够通过酯键和醚键分别与半纤维素和木质素连接, 构成半纤维素-酯键-阿魏酸-醚键-木质素桥; 而对香豆酸不仅通过酯键和木质素侧链相连, 还通过氢键和范德华力粘附在纤维素表面。这些交联结构都增加了木质纤维素细胞壁的复杂性和抗降解性。为了利用木质纤维素, 首先需要使纤维素从木质素与半纤维素的包覆中暴露出来, 降低纤维素的结晶度和聚合度, 提高酶对纤维素的可及性。这就需要对木质纤维素进行预处理, 去除或减少阻碍糖化和发酵的木质素, 打破木质素形成的致密结构。酸法、碱法和有机溶剂法是化学

预处理的 3 种主要方法。酸法预处理中, 由于酸对半纤维素降解, 戊糖和己糖脱水分别形成糠醛和 5-羟甲基糠醛, 过程中还会形成甲酸、乙酸和乙酰丙酸。碱法预处理产生的抑制物主要是甲酸、乙酸和酚类, 包括酚醛、酚酸、酚酮和酚醇类, 其中对香豆酸和阿魏酸含量相对较高。有机溶剂预处理产生的抑制物与酸处理类似, 主要为甲酸、乙酸、乙酰丙酸以及糠醛、5-羟甲基糠醛等, 以及一些酚类物质。蒸汽爆破和氨纤维膨胀/爆破是两种常用的物理预处理方式。前者会产生一些酚类和糠醛类物质, 后者则会产生一些酚类物质和弱酸类物质。杨莉等^[69]总结了不同预处理方式产生抑制物的种类, 对酶和微生物的抑制机制, 以及如何降低和去除抑制剂。孙慧敏等^[70]也总结了如何利用微生物和酶法来去除木质纤维素水解液中的呋喃醛抑制物。

在木质纤维素预处理中希望去除的木质素, 是由对羟基苯基丙烷、愈创木基丙烷和紫丁香基丙烷等苯丙烷单元通过 C-O-C 和 C-C 键连接, 经自由基聚合反应而形成的无定形网状高聚物, 约占木质纤维素干重的 10%–20%, 是自然界可直接提供芳香环结构的储量丰富的可再生资源。张思莹等^[71]总结了木质素高值转化的研究进展。理想的预处理技术应该最大限度地保留木质素, 并能够实现分级分离, 以实现高效利用。木质素经过热化学转化、气化、加氢还原、氧化和生物转化, 是实现其高值化利用的主要方式。木质素是一种复杂的芳香聚合物, 其利用的难点在于结构复杂且不均一, 所以生物质组分的高效分离和分级是实现木质素高值化利用的前提和关键。

2.9 一碳生物技术

以二氧化碳和含能的一氧化碳、甲烷、甲

醇等一碳化合物为原料进行生物加工和转化, 生产蛋白质、燃料、材料和化学品, 在“碳达峰、碳中和”的背景下得到空前关注。

自然界中能够好氧转化甲烷的细菌, 首先通过甲烷氧化途径将甲烷氧化为甲醇、甲醛和甲酸, 然后分别通过单磷酸核酮糖循环、丝氨酸循环和卡尔文循环来实现甲烷的同化。郭树奇和费强^[72]总结了工程改造嗜甲烷菌利用甲烷生产化学品的研究进展。天然嗜甲烷菌利用甲烷就可以生产单细胞蛋白、聚羟基丁酸酯和四氢嘧啶等。经过改造的嗜甲烷菌可以初级代谢产物包括乳酸、3-羟基丙酸、丁烯酸、黏糠酸、脂肪酸、异丁醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇以及异戊二烯和萜类化合物 (如柠檬烯、法尼烯、番茄红素、角黄素、虾青素等), 但生产水平还比较低, 在数百 mg/L。嗜甲烷菌的低代谢活性和低碳源转化效率可能是制约甲烷生物转化最主要因素, 甲烷高效生物转化的实现, 不仅要从小微生物角度做工作, 还应多从工程角度考虑, 解决甲烷溶解度低、生物量低导致转化效率低的问题。

甲醇本身是一种重要的煤化工产品, 也可以通过二氧化碳加氢制备。我国甲醇的产能就超过 8 千万 t, 如能用于作为生物制造的原料, 可以显著扩展原料路线。目前有很多研究尝试把模式微生物改造成能够利用甲醇进行生物合成的细胞工厂, 但是收效甚微。因此另一条路线是对天然能够利用甲醇的微生物进行工程改造, 如甲基营养型酵母。高琳惠等^[73]选择分布在毕赤酵母属、汉逊酵母属和假丝酵母属中的代表性甲基营养型酵母——巴斯德毕赤酵母、多形汉逊酵母和博伊丁假丝酵母为例, 总结了改造这 3 种甲基营养型酵母生产重组蛋白和化学品的进展。博伊丁假丝酵母产生 86 g/L 的乳

酸及巴斯德毕赤酵母产生 75 g/L 的 2,3-丁二醇, 是甲基营养型酵母合成初级代谢产物中水平较高的。甲基营养型酵母也可以合成聚酮类、萜类、脂肪酸衍生物等次级代谢产物, 如在巴斯德毕赤酵母中合成倍半萜化合物诺卡酮、三萜化合物人参皂苷前体达玛烯二醇-II、四萜化合物番茄红素和 β -胡萝卜素, 但水平都不及酿酒酵母。由甲醇异化率高导致的甲醇同化效率低是一个迫切需要解决的关键问题。

由甲醇脱氢酶 (methanol dehydrogenase, MDH) 将甲醇氧化为甲醛, 是甲醇生物利用的一个必经之路。天然甲基营养菌中存在 3 类 MDH, 即吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quione, PQQ) 依赖型 MDH、氧依赖型醇氧化酶及烟酰胺腺嘌呤双核苷酸 (NAD) 依赖型 MDH。PQQ 依赖型 MDH 催化甲醇氧化产生的还原力较弱, 因此应用范围受限。氧依赖型醇氧化酶 (alcohol oxidase, AOX) 具有较高的甲醇氧化效率。NAD 依赖型的 MDH 底物谱较广泛, 对甲醇的亲合性较差, 催化甲醇氧化的活性较低。在非甲基营养菌中也发现了一些具有较好酶学性质的 MDH。利用 NAD 依赖型的 MDH 已经构建了多株人工甲基营养菌, 也有学者针对 MDH 对甲醇的 K_m 值较高、催化甲醇氧化反应的活性较低开展分子改造研究。凡立稳等^[74]总结了 MDH 的研究进展。要提高甲醇利用效率, 除了提高 MDH 的活性, MDH 产生的甲醛如何被细胞快速同化而不产生抑制作用, 也是一个重要的问题。

蓝藻 (又称蓝细菌) 是生长最快的光合生物, 聚球藻 UTEX 2973 的倍增时间不到 2 h。通过对蓝藻的代谢途径进行改造, 可以使蓝藻利用二氧化碳和光能, 生产烯烃、醇类、羧酸等不同的聚合物单体。钱美文等^[75]和肖建勋

等^[76]对此进行了总结。烯烃方面, 蓝藻利用二氧化碳可以生产乙烯、异戊二烯、柠檬烯、水芹烯, 每克干细胞最多可生产 5–10 mg 的目标烯烃。醇类方面, 蓝藻利用二氧化碳可以生产乙醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、2,3-丁二醇, 产量最高可以达到数 g/L 的水平。羧酸方面, 蓝藻利用二氧化碳可以生产琥珀酸、乳酸、3-羟基丙酸, 其中 D-乳酸可以达到 26 g/L 的水平, L-乳酸也可以达到数 g/L 的水平。提高蓝藻利用二氧化碳生产化学品水平有几个关键点需要考虑, 一是如何提高对光能的利用能力, 二是如何将蓝藻胞内的碳代谢流更多引向目标化学品。

2.10 生物聚合物

产油微生物主要包括细菌、酵母、丝状真菌及藻类等, 其油脂积累量从细胞干重的 20% 到 80% 以上不等^[77]。产油酵母合成的脂肪酸以十六碳和十八碳的饱和、不饱和脂肪酸为主, 而产油丝状真菌以十八碳以上的多不饱和脂肪酸为主, 如亚油酸、 γ -亚麻酸、花生四烯酸及二十碳五烯酸等。产油藻类能够合成高附加值的长链多不饱和脂肪酸, 尤其是二十二碳六烯酸。产油细菌胞内合成的脂质以类脂为主, 主要成分为聚羟基烷酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA)。陈心宇等^[78]和袁恺等^[79]总结了近 30 年来 PHA 的研究进展, 包括 PHA 的单体组成、生物合成途径和分类, 提高 PHA 的合成通量, 构建利用蔗糖蜜、木薯和玉米淀粉、木质纤维素水解物、乳清以及废弃物的代谢路径, 改造 β -氧化途径利用脂肪酸高效合成不同链长 PHA, 以及设计能够生产非天然 PHA 的代谢路径。为了降低 PHA 的成本, 研究人员通过形态工程^[80]或自絮凝发酵技术简化细胞的分离, 以及发展以更少淡水消耗、节能和持久为特点的

开放式发酵技术。聚 3-羟基丁酸乳酸酯 P(3HB-co-LA) 是 PHA 的一种, 在 PHA 合酶的作用下将 3-羟基丁酰辅酶 A 和乳酰辅酶 A 聚合而成, 兼具了 PLA 和 P(3HB) 的优点, 具有更优的弹性和透明度。魏香菊等^[81]发现缺失硫酯酶, 可提高木糖发酵中 P(3HB-co-LA) 的含量。鉴于 PHA 目前的生产成本还无法与聚乙烯等传统塑料竞争, 发展成本更低的原料路线, 提高 PHA 对原料的得率, 是推进 PHA 大规模产业化的必经之路。

3 关键技术

在底盘细胞中引入新酶、构建新途径后, 打破了细胞原有的生理平衡。为了使引入的新酶和新途径发挥预期作用, 必须对代谢途径进行精细调控, 使之与底盘细胞相互适应^[82]。代谢途径的精细调控一般在转录水平和翻译水平进行, 代谢途径调控技术是构建高效细胞工厂的关键技术, 也是形成技术壁垒的关键。代谢途径调控包括静态调控和动态调控, 其中动态调控是根据蛋白质按需表达的原则对途径进行精细调控, 更加满足细胞实际生理状态的需求, 包括通过创建基因回路来进行动态调控^[83]。代谢途径调控技术主要通过设计改造启动子直接调控基因的表达水平, 利用小 RNA、核糖开关、RNA 干扰和反义 RNA 等 RNA 调控元件调控靶基因的表达水平, 基于核糖体识别与结合核糖体识别位点调控目标蛋白的翻译水平, 以及通过翻译后修饰来调控蛋白质的降解水平。代谢工程应用导向的智能化动态调控系统是微生物细胞工厂代谢调控的发展方向。

完成工程菌株构建后, 增加对底物和产物的耐受性、提高生长速率、增加底物利用率和提高产物产量是提升工程菌株性能的目标, 这

时候可以通过延长微生物细胞的时序寿命来提升微生物细胞工厂的生产性能^[84], 或使用非理性的适应性进化技术^[85], 作为快速高效构建优良菌株的补充策略。适应性进化技术的特点是耗时, 进化产生的表型可能与预期相反, 进化菌株的遗传特性也可能不稳定。适应性进化依赖基于筛选压力的自然突变, 或者依赖化学或物理诱变建立突变体库进行高通量筛选^[86], 需要进行多轮突变和筛选, 难以实现连续的突变进化。而体内连续进化技术不依赖外界人工干预, 可以实现体内的连续突变和进化, 大大加速了进化筛选过程。其基本思路是通过 DNA 复制、修复、重组等过程进行干预, 实现高频率的基因组随机突变, 突破自然进化过程中突变率低、进化过程漫长的限制, 加速微生物的进化过程^[87]。连续进化技术不仅可以通过基因组突变来快速提高微生物的环境耐受性, 也可以针对某个或某几个特定靶蛋白的编码基因进行进化, 主要思路是设计一些能够特异性识别目标基因表达水平的分子生物学元件。无论采用哪种进化技术, 高通量筛选技术的发展都至关重要, 例如基于液滴微流控分选技术^[88]和荧光激活细胞分选技术^[89]的超高通量筛选方法。利用基于荧光的筛选方法, 可以快速获得重组蛋白表达水平提高的毕赤酵母菌株^[90]。

传统生命科学研究是基于实验观测的科学。随着物种基因组数据的不断增加, 数据驱动的科学逐渐成为生命科学研究的一种新范式, 帮助生命科学从纯实验科学, 走向数据驱动和假设驱动相结合的新生命科学。基于基因组数据构建基因组尺度代谢网络模型, 对基因组、代谢反应和蛋白三者之间的关系进行表征, 使解析工业微生物复杂代谢网络和调控机制成为可能, 可以增强对细胞功能的预测、模拟和

仿真, 加速细胞工厂的构建^[91]。为了提高基因组尺度代谢网络模型的预测精度, 需要增加一些约束条件, 以使模型能够更真实地反映细胞实际的生理状态。这些约束条件包括基于基因表达的转录组约束、基于酶量水平的蛋白组学约束和基于热力学数据的约束^[92]。增加约束条件后的代谢网络模型, 能够更加接近于反映细胞的真实代谢状态, 因此在化学品生产能力预测方面表现出更高的可信度。但由于生物体系的非线性和高度复杂性, 对生命体系的模拟和预测尚处在早期阶段。提高对生命体系各种参数的精细、实时、动态检测能力, 探索生命体系与环境的相互作用关系, 不仅有利于对生命体系获得更深入的定量理解, 也有助于建立实验-数据-模型一体化驱动的生物体系放大新方法^[93], 对加速合成生物制造产业的发展作出贡献。

4 结束语

高通量、低成本的 DNA 合成和编辑技术, 有可能从根本上重塑生物技术的发展面貌。从核酸元件的设计和改造, 到酶的设计和改造, 再到细胞工厂和生物体系的设计和改造, 合成生物的物种和功能多样性将得到极大的拓展, 细胞工厂的生物制造能力将得到极大的提升。2021 年《生物工程学报》在合成生物制造领域发表了近百篇论文, 我们有理由相信随着合成生物制造领域优秀人才的不断增加, 合成生物制造领域的原创成果将会不断涌现, 以颠覆性的合成生物学技术, 支撑一个快速成长的合成生物制造产业, 助力经济社会的绿色发展。

REFERENCES

- [1] 王钦宏. 代谢工程 30 年专刊序言(2021). 生物工程学报, 2021, 37(5): 1471-1476.
Wang QH. Preface for special issue on the 30th anniversary of metabolic engineering (2021). Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1471-1476 (in Chinese).
- [2] 邓禹, 赵心清. 工业微生物: 创新与突破专刊序言(2021). 生物工程学报, 2021, 37(3): 801-805.
Deng Y, Zhao XQ. Preface for special issue on industrial microorganisms: innovation and breakthrough (2021). Chin J Biotech, 2021, 37(3): 801-805 (in Chinese).
- [3] 袁其朋, 孔建强. 天然产物的生物合成专刊序言. 生物工程学报, 2021, 37(6): 1821-1826.
Yuan QP, Kong JQ. Preface to the special issue: biosynthesis of natural products. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 1821-1826 (in Chinese).
- [4] 于勇, 朱欣娜, 毕昌昊, 等. 大肠杆菌细胞工厂的创建技术. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1564-1577.
Yu Y, Zhu XN, Bi CH, et al. Construction of *Escherichia coli* cell factories. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1564-1577 (in Chinese).
- [5] 吕雪芹, 武耀康, 林璐, 等. 枯草芽孢杆菌代谢工程改造的策略与工具. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1619-1636.
Lü XQ, Wu YK, Lin L, et al. Strategies and tools for metabolic engineering in *Bacillus subtilis*. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1619-1636 (in Chinese).
- [6] 康倩, 向梦洁, 张大伟. 枯草芽孢杆菌在系统与合成生物技术中研究进展及工业应用. 生物工程学报, 2021, 37(3): 923-938.
Kang Q, Xiang MJ, Zhang DW. Research progress and industrial application of *Bacillus subtilis* in systematic and synthetic biotechnology. Chin J Biotech, 2021, 37(3): 923-938 (in Chinese).
- [7] 王钰, 郑平, 孙际宾. 谷氨酸棒杆菌的代谢工程使能技术研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1603-1618.
Wang Y, Zheng P, Sun JB. Recent advances in developing enabling technologies for *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1603-1618 (in Chinese).
- [8] 徐美娟, 上官春雨, 陈鑫, 等. 谷氨酸棒杆菌耐受胁迫机制及工业鲁棒性合成生物学研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(3): 831-845.
Xu MJ, Shangguan CY, Chen X, et al. Advances in stress tolerance mechanisms and synthetic biology for the industrial robustness of *Corynebacterium glutamicum*. Chin J Biotech, 2021, 37(3): 831-845 (in Chinese).
- [9] 杨永富, 耿碧男, 宋皓月, 等. 合成生物学时代基于非模式细菌的工业底盘细胞研究现状与展望. 生物

- 工程学报, 2021, 37(3): 874-910.
- Yang YF, Geng BN, Song HY, et al. Progress and perspective on development of non-model industrial bacteria as chassis cells for biochemical production in the synthetic biology era. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 874-910 (in Chinese).
- [10] Zhu HW, Li Y. Turning waste gases into valuables. *Synth Syst Biotechnol*, 2022, DOI: 10.1016/j.synbio.2022.04.002.
- [11] 江丽红, 董昌, 黄磊, 等. 酿酒酵母代谢工程技术. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1578-1602.
- Jiang LH, Dong C, Huang L, et al. Metabolic engineering tools for *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1578-1602 (in Chinese).
- [12] 李宏彪, 梁晓琳, 周景文. 酿酒酵母基因编辑技术研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 950-965.
- Li HB, Liang XL, Zhou JW. Progress in gene editing technologies for *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 950-965 (in Chinese).
- [13] 苏立秋, 张歌, 姚震, 等. 非传统酵母代谢工程研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1659-1676.
- Su LQ, Zhang G, Yao Z, et al. Advances in metabolic engineering of non-conventional yeasts. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1659-1676 (in Chinese).
- [14] 范婷婷, 王慕瑶, 李俊, 等. 酵母生物多样性开发及工业应用. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 806-815.
- Fan TT, Wang MY, Li J, et al. Exploration of yeast biodiversity and development of industrial applications. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 806-815 (in Chinese).
- [15] 李金根, 刘倩, 刘德飞, 等. 丝状真菌代谢工程研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1637-1658.
- Li JG, Liu Q, Liu DF, et al. Advances in metabolic engineering of filamentous fungi. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1637-1658 (in Chinese).
- [16] 郑小梅, 郑平, 孙际宾. 基于 CRISPR/Cas 系统的黑曲霉基因组编辑技术. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 980-990.
- Zheng XM, Zheng P, Sun JB. CRISPR/Cas-based genome editing in *Aspergillus niger*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 980-990 (in Chinese).
- [17] 马倩, 夏利, 谭森, 等. 氨基酸生产的代谢工程研究进展与发展趋势. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1677-1696.
- Ma Q, Xia L, Tan M, et al. Advances and prospects in metabolic engineering for the production of amino acids. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1677-1696 (in Chinese).
- [18] 张博, 姚臻豪, 柳志强, 等. 代谢工程改造大肠杆菌生产 L-高丝氨酸. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1287-1297.
- Zhang B, Yao ZH, Liu ZQ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-homoserine production. *Chin J Biotech*, 2021, 37(4): 1287-1297 (in Chinese).
- [19] 王颖珊, 郭峰, 严伟, 等. 四碳有机酸生物合成的代谢工程研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1697-1720.
- Wang YS, Guo F, Yan W, et al. Advances in the metabolic engineering for the production of tetracarbon organic acids. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1697-1720 (in Chinese).
- [20] 王岩岩, 刘林霞, 金朝霞, 等. 代谢工程在维生素生产中的应用及研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1748-1770.
- Wang YY, Liu LX, Jin ZX, et al. Advances in metabolic engineering for vitamins production. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1748-1770 (in Chinese).
- [21] 陈玥, 周景文, 陈坚. 维生素 C 生物合成相关脱氢酶研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1827-1844.
- Chen Y, Zhou JW, Chen J. Progress in vitamin C biosynthesis related dehydrogenases. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 1827-1844 (in Chinese).
- [22] 马晓焉, 王雪芹, 马炼杰, 等. 高级醇的微生物绿色制造. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1721-1736.
- Ma XY, Wang XQ, Ma LJ, et al. Microbial green manufacturing of higher alcohols. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1721-1736 (in Chinese).
- [23] 王明, 栾韬, 赵建志, 等. 酿酒酵母转化木糖生产化学品的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 1042-1057.
- Wang M, Luan T, Zhao JZ, et al. Progress in studies on production of chemicals from xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 1042-1057 (in Chinese).
- [24] 孙中贯, 刘琳, 王亚平, 等. 酿酒酵母高级醇代谢研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 429-447.
- Sun ZG, Liu L, Wang YP, et al. Higher alcohols metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: a mini review. *Chin J Biotech*, 2021, 37(2): 429-447 (in Chinese).
- [25] 姜逢霖, 巩婷, 陈晶晶, 等. 植物来源药用天然产物的合成生物学研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1931-1951.
- Jiang FL, Gong T, Chen JJ, et al. Synthetic biology of plants-derived medicinal natural products. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 1931-1951 (in Chinese).
- [26] 陈明凯, 叶丽丹, 于洪巍. 代谢改造酿酒酵母合成蒎

- 类化合物的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2085-2104.
- Chen MK, Ye LD, Yu HW. Advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for terpenoids biosynthesis. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2085-2104 (in Chinese).
- [27] 姜龙瑜, 温艳华, 彭雨, 等. 杜松烷型倍半萜天然产物的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(6): 1952-1967.
- Jiang LY, Wen YH, Peng Y, et al. Advances in biosynthesis of cadinane sesquiterpenes. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 1952-1967 (in Chinese).
- [28] 李宁, 刘波, 刁梦雪, 等. 产角鲨烯细胞工厂的构建及关键基因的筛选、克隆与表达. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2813-2824.
- Li N, Liu B, Diao MX, et al. Construction of squalene producing cell factories and screening, cloning and expression of key genes. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2813-2824 (in Chinese).
- [29] 邵喜喜, 孟云鹤, 周沈婷, 等. 环氧角鲨烯合成通路在大肠杆菌中的构建和优化. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2105-2115.
- Shao XX, Meng YH, Zhou ST, et al. Construction and optimization of squalene epoxide synthetic pathway in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2105-2115 (in Chinese).
- [30] 孙忠义, 赵鹏, 葛喜珍, 等. 生物合成薯蓣皂素的途径设计及关键酶分析. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1178-1188.
- Sun ZY, Zhao P, Ge XZ, et al. Pathway design and key enzyme analysis of diosgenin biosynthesis. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1178-1188 (in Chinese).
- [31] 夏梦, 张逸风, 高海云, 等. 异戊烯基焦磷酸转运对雷公藤甲素生物合成的影响. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2039-2049.
- Xia M, Zhang YF, Gao HY, et al. Effect of isopentenyl pyrophosphate translocation on the biosynthesis of triptolide. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2039-2049 (in Chinese).
- [32] 娄千, 浦香东, 宋经元. 胭脂素的生物合成及应用研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(6): 1986-1997.
- Lou Q, Pu XD, Song JY. Advances in the biosynthesis and application of bixin. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 1986-1997 (in Chinese).
- [33] 吴凤礼, 王晓霜, 宋富强, 等. 芳香族化合物微生物代谢工程研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1771-1793.
- Wu FL, Wang XS, Song FQ, et al. Advances in metabolic engineering for the production of aromatic chemicals. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1771-1793 (in Chinese).
- [34] 刘堂浩, 李由然, 张梁, 等. 高通量筛选高产酪氨酸的酿酒酵母菌株. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3348-3360.
- Liu TH, Li YR, Zhang L, et al. High-throughput screening of *Saccharomyces cerevisiae* efficiently producing tyrosine. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3348-3360 (in Chinese).
- [35] 刘良叙, 李朝凤, 王嘉伟, 等. 芳香类天然产物的合成生物学研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2010-2025.
- Liu LX, Li CF, Wang JW, et al. Synthetic biology for the synthesis of aromatic natural products: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2010-2025 (in Chinese).
- [36] 庄以彬, 吴凤礼, 殷华, 等. 芳香族香料化合物生物合成研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(6): 1998-2009.
- Zhuang YB, Wu FL, Yin H, et al. Advances in the microbial synthesis of aromatic fragrance molecules. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 1998-2009 (in Chinese).
- [37] 李玲玲, 刘雪, 邱泽天, 等. 植物多酚的微生物合成. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2050-2076.
- Li LL, Liu X, Qiu ZT, et al. Microbial synthesis of plant polyphenols. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2050-2076 (in Chinese).
- [38] 牛文清, 韦航涛, 薛飞燕, 等. 4-香豆酰-CoA 连接酶和聚酮合酶的融合蛋白在莱茵衣藻中表达促进树莓酮积累. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2495-2502.
- Niu WQ, Wei HT, Xue FY, et al. Overexpression of a fusion protein of 4-coumaroyl-CoA ligase and polyketide synthase for raspberry ketone production in *Chlamydomonas reinhardtii*. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2495-2502 (in Chinese).
- [39] 王雪凝, 孔建强. 酶法合成槲皮素 3-O-糖苷酰基化衍生物的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(6): 1900-1918.
- Wang XN, Kong JQ. Enzymatic synthesis of acylated quercetin 3-O-glycosides: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 1900-1918 (in Chinese).
- [40] 王璐瑶, 韩雪, 王凤忠, 等. 姜黄素类化合物生物合成研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(2): 404-417.
- Wang LY, Han X, Wang FZ, et al. Research progresses in the biosynthesis of curcuminoids. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 404-417 (in Chinese).
- [41] 张乐, 丁宁, 海燕, 等. 产姜黄素大肠杆菌工程菌的构建. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2077-2084.

- Zhang L, Ding N, Hai Y, et al. Production of curcumin by engineered *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 2077-2084 (in Chinese).
- [42] 高萍, 陈宇娟, 柯崇榕, 等. 新型靶向化合物——植物大麻素的生物合成途径及研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1968-1985.
- Gao P, Chen YX, Ke CR, et al. New targeted compounds—biosynthesis of phytocannabinoids. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 1968-1985.
- [43] 孟振, 姚婷婷, 赵巍, 等. 鬼臼毒素及其衍生物生物合成研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 2026-2038.
- Meng Z, Yao TT, Zhao W, et al. Research progress in biosynthesis of podophyllotoxin and its derivatives. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 2026-2038 (in Chinese).
- [44] 张香燕, 申晓林, 孙新晓, 等. 甲基转移酶在微生物合成天然产物中的应用. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1869-1886.
- Zhang XY, Shen XL, Sun XX, et al. Application of methyltransferases in microbial synthesis of natural products. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 1869-1886 (in Chinese).
- [45] 王宇, 杨燕, 刘恣之, 等. 植物丝氨酸羧肽酶样酰基转移酶的结构、功能和应用. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1887-1899.
- Wang Y, Yang Y, Liu MZ, et al. Structure, function and application of serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plants. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 1887-1899 (in Chinese).
- [46] 郝天怡, 赫卫清. 大环内酯类抗生素代谢工程的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1737-1747.
- Hao TY, He WQ. Advances in metabolic engineering of macrolide antibiotics. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1737-1747 (in Chinese).
- [47] 刘娟娟, 张妍, 赫卫清. 利用 CRISPR-Cas9 系统与核糖体工程获得新型可利霉素产生菌. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 2116-2126.
- Liu JJ, Zhang Y, He WQ. Construction of a novel carrimycin-producing strain by using CRISPR-Cas9 and ribosome engineering techniques. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 2116-2126 (in Chinese).
- [48] 熊婉, 段燕文, 颜晓晖, 等. 途径特异性调控因子介导的链霉菌来源天然产物的产量提升. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 2127-2146.
- Xiong W, Duan YW, Yan XH, et al. Improvement of natural product production in *Streptomyces* by manipulating pathway-specific regulators. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 2127-2146 (in Chinese).
- [49] 张景琰, 段燕文, 朱湘成, 等. 新型 angucycline/angucyclinone 类天然产物的研究进展(2010–2020). *生物工程学报*, 2021, 37(6): 2147-2165.
- Zhang JY, Duan YW, Zhu XC, et al. Novel angucycline/angucyclinone family of natural products discovered between 2010 and 2020. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 2147-2165 (in Chinese).
- [50] 崔佳佳, 张雪洪. 微生物源农用抗生素的研发与高产策略. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 1032-1041.
- Cui JJ, Zhang XH. Development and high yield strategies of microbial-derived antibiotics in agriculture. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 1032-1041 (in Chinese).
- [51] 霍春红, 李鸿宇, 李倩, 等. 产虫草素酿酒酵母菌株的构建与发酵优化. *生物工程学报*, 2021, 37(9): 3334-3347.
- Huo CH, Li HY, Li Q, et al. Construction and optimization of cordycepin-producing *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(9): 3334-3347 (in Chinese).
- [52] 王辰, 徐玉泉. 非核糖体肽合成酶工程改造研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1845-1857.
- Wang C, Xu YQ. Advances in engineering non-ribosomal peptide synthetase. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 1845-1857 (in Chinese).
- [53] 李凌峰, 刘佩, 罗文, 等. 代谢工程改造 L-半胱氨酸供给模块促地衣芽孢杆菌高效合成杆菌肽. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2803-2812.
- LI LF, Liu P, Luo W, et al. Metabolic engineering of L-cysteine supply modules for enhanced production of bacitracin in *Bacillus licheniformis*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(8): 2803-2812 (in Chinese).
- [54] 郭丽, 刘化鑫, 林琰. 利用 ELP 自断裂标签在大肠杆菌中生产抗菌肽 Oxysterlin 1. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2915-2923.
- Guo L, Liu HX, Lin Y. Production of antimicrobial peptide (Oxysterlin 1) in *Escherichia coli* with ELP self-cleavage tag. *Chin J Biotech*, 2021, 37(8): 2915-2923 (in Chinese).
- [55] 王彦珩, 李姝承, 关长阁, 等. 天然活性多肽的发掘策略和生产技术. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 2166-2180.
- Wang YJ, Li SC, Guan CG, et al. Functional discovery and production technology for natural bioactive peptides. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 2166-2180 (in Chinese).
- [56] 刘蕊, 柳雨, 李巧峰, 等. 糖苷酶耐热性改造策略与应用. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1919-1930.

- Liu R, Liu Y, Li QF, et al. Strategies for engineering the thermo-stability of glycosidase. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 1919-1930 (in Chinese).
- [57] 朱小冲, 唐双焱. α -L-鼠李糖苷酶特性简述及影响酶活的因素. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2623-2632.
- Zhu XC, Tang SY. Enzymatic properties of α -L-rhamnosidase and the factors affecting its activity: a review. *Chin J Biotech*, 2021, 37(8): 2623-2632 (in Chinese).
- [58] 李丛娜, 姜顺, 杜超, 等. 凝结芽孢杆菌耐热 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶在大肠杆菌的分泌表达及其在制备 GlcNAc 中的应用. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 218-227.
- Li CN, Jiang S, Du C, et al. Expression and characterization of β -N-acetylglucosaminidases from *Bacillus coagulans* DSM1 for N-acetyl- β -D-glucosamine production. *Chin J Biotech*, 2021, 37(1): 218-227 (in Chinese).
- [59] 何成, 吴言, 孟春雨, 等. 新型 β -葡萄糖苷酶 BglD2 异源表达及水解虎杖苷能力. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 580-592.
- He C, Wu Y, Meng CY, et al. Heterologous expression of a novel β -glucosidase BglD2 and its application in polydatin-hydrolyzing. *Chin J Biotech*, 2021, 37(2): 580-592 (in Chinese).
- [60] 黄燕, 杨玉路, 夏伟, 等. 重组 β -环糊精葡萄糖基转移酶生产偶合糖的工艺优化. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1415-1424.
- Huang Y, Yang YL, Xia W, et al. Optimization of maltooligosyl fructofuranosides production by recombinant β -cyclodextrin glycosyltransferase. *Chin J Biotech*, 2021, 37(4): 1415-1424 (in Chinese).
- [61] 倪大伟, 徐炜, 陈自卫, 等. 菊糖蔗糖酶的性质鉴定及菊糖的酶法合成. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 266-275.
- Ni DW, Xu W, Chen ZW, et al. Characterization of inulosucrase and the enzymatic synthesis of inulin. *Chin J Biotech*, 2021, 37(1): 266-275 (in Chinese).
- [62] 苏纪勇, 姚圆, 刘玉含, 等. 蔗糖磷酸合酶功能、结构与催化机制的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1858-1868.
- Su JY, Yao Y, Liu YH, et al. Function, structure and catalytic mechanism of sucrose phosphate synthase: a review. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 1858-1868 (in Chinese).
- [63] 杜念, 邓媛元, 魏振承, 等. 重组小麦静息巯基氧化酶的表达、酶学特性及其对面包品质的影响. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 593-603.
- Du N, Deng YY, Wei ZC, et al. Expression and characterization of recombinant wheat quiescin sulphydryl oxidase and its effect on bread quality. *Chin J Biotech*, 2021, 37(2): 593-603 (in Chinese).
- [64] 朱曼迟, 张显, 王志, 等. 米黑根毛霉来源 L-天冬酰胺酶的分子改造及高效表达. *生物工程学报*, 2021, 37(9): 3242-3252.
- Zhu MC, Zhang X, Wang Z, et al. Molecular modification and highly efficient expression of L-asparaginase from *Rhizomucor miehei*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(9): 3242-3252 (in Chinese).
- [65] 于海波, 徐建中, 刘立明, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化 L-苏氨酸合成 2,5-二甲基吡嗪. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 228-241.
- Yu HB, Xu JZ, Liu LM, et al. Biosynthesis of 2,5-dimethylpyrazine from L-threonine by whole-cell biocatalyst of recombinant *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(1): 228-241 (in Chinese).
- [66] 徐纹静, 陈志, 陈磊, 等. 一种来源于红螺菌科细菌新型卤醇脱卤酶的克隆表达及其酶学性质鉴定. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1298-1311.
- Xu WJ, Chen Z, Chen L, et al. Expression and characterization of a novel halohydrin dehalogenase from *Rhodospirillaceae bacterium*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(4): 1298-1311 (in Chinese).
- [67] 林超平, 汤江涛, 郑仁朝, 等. 基于金属有机框架的固定化酰胺酶制备及催化合成(S)-4-氟苯甘氨酸. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2936-2946.
- Lin CP, Tang JT, Zheng RC, et al. Synthesis of (S)-4-fluorophenylglycine by using immobilized amidase based on metal-organic framework. *Chin J Biotech*, 2021, 37(8): 2936-2946 (in Chinese).
- [68] 刘国栋, 高丽伟, 曲音波. 青霉生产木质纤维素降解酶系的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 1058-1069.
- Liu GD, Gao LW, Qu YB. Progress in the production of lignocellulolytic enzyme systems using *Penicillium* species. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 1058-1069 (in Chinese).
- [69] 杨莉, 谭丽萍, 刘同军. 木质纤维素预处理抑制物产生及脱除方法的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 15-29.
- Yang L, Tan LP, Liu TJ. Progress in detoxification of inhibitors generated during lignocellulose pretreatment. *Chin J Biotech*, 2021, 37(1): 15-29 (in Chinese).
- [70] 孙慧敏, 邹丽花, 郑兆娟, 等. 应用生物技术降解木质纤维素水解液中呋喃醛. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 473-485.

- Sun HM, Zou LH, Zheng ZJ, et al. Biodegradation of furan aldehydes in lignocellulose hydrolysates. *Chin J Biotech*, 2021, 37(2): 473-485 (in Chinese).
- [71] 张思莹, 陈彦, 刘志华, 等. 生物炼制过程中木质素高值转化研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(9): 3108-3128.
- Zhang SY, Chen Y, Liu ZH, et al. Advances in lignin valorization from a biorefinery concept. *Chin J Biotech*, 2021, 37(9): 3108-3128 (in Chinese).
- [72] 郭树奇, 费强. 甲烷生物利用及嗜甲烷菌的工程改造. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 816-830.
- Guo SQ, Fei Q. Bioconversion of methane by metabolically engineered methanotrophs. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 816-830 (in Chinese).
- [73] 高琳惠, 蔡鹏, 周雍进. 甲醇酵母代谢工程研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 966-979.
- Gao LH, Cai P, Zhou YJ. Advances in metabolic engineering of methylotrophic yeasts. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 966-979 (in Chinese).
- [74] 凡立稳, 王钰, 郑平, 等. 一碳代谢关键酶——甲醇脱氢酶的研究进展与展望. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 530-540.
- Fan LW, Wang Y, Zheng P, et al. Methanol dehydrogenase, a key enzyme of one-carbon metabolism: a review. *Chin J Biotech*, 2021, 37(2): 530-540 (in Chinese).
- [75] 钱美文, 谭春林, 倪俊, 等. 蓝细菌细胞工厂合成聚合物单体的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 1017-1031.
- Qian MW, Tan CL, Ni J, et al. Advances of polymer-monomer production by cyanobacterial cell factory. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 1017-1031 (in Chinese).
- [76] 肖建勋, Pier-Luc Tremblay, 张甜. 蓝细菌固碳合成乳酸技术的发展与展望. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1229-1236.
- Xiao JX, Pier-Luc T, Zhang T. Production of lactate from carbon fixation by cyanobacteria: development and prospect. *Chin J Biotech*, 2021, 37(4): 1229-1236 (in Chinese).
- [77] 卢恒谦, 陈海琴, 唐鑫, 等. 组学技术在产油微生物中的应用. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 846-859.
- Lu HQ, Chen HQ, Tang X, et al. Application of omics technology in oleaginous microorganisms. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 846-859 (in Chinese).
- [78] 陈心宇, 李梦怡, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯 PHA 代谢工程研究 30 年. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1794-1811.
- Chen XY, Li MY, Chen GQ. Thirty years of metabolic engineering for biosynthesis of polyhydroxyalkanoates. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1794-1811 (in Chinese).
- [79] 袁恺, 周卫强, 彭超, 等. 微生物发酵法生产聚羟基脂肪酸酯的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 384-394.
- Yuan K, Zhou WQ, Peng C, et al. Engineering progress in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *Chin J Biotech*, 2021, 37(2): 384-394 (in Chinese).
- [80] 冯丽丽, 王智文. 形态工程在生物基化学品生产中的应用进展. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2211-2222.
- Feng LL, Wang ZW. Development of morphology engineering for production of bio-based chemicals. *Chin J Biotech*, 2021, 37(7): 2211-2222 (in Chinese).
- [81] 魏香菊, 吴桦, 郭鹏业, 等. 短链硫酯酶缺失对大肠杆菌合成聚羟基丁酸乳酸酯的影响. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 196-206.
- Wei XJ, Wu J, Guo PY, et al. Effect of short-chain thioesterase deficiency on P(3HB-co-LA) biosynthesis in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(1): 196-206 (in Chinese).
- [82] 刘洋, 牟庆璇, 石雅南, 等. 微生物细胞工厂的代谢调控. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1541-1563.
- Liu Y, Mu QX, Shi YN, et al. Metabolic regulation in constructing microbial cell factories. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1541-1563 (in Chinese).
- [83] 丁娜娜, 周胜虎, 邓禹. 基于转录因子的代谢物生物传感器的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 911-922.
- Ding NN, Zhou SH, Deng Y. Progress in transcription factor-based metabolite biosensors. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 911-922 (in Chinese).
- [84] 刘佳, 郭亮, 罗秋玲, 等. 细胞寿命在大肠杆菌细胞工厂构建中的应用. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1277-1286.
- Liu J, Guo L, Luo QL, et al. Application of chronological lifespan in the construction of *Escherichia coli* cell factories. *Chin J Biotech*, 2021, 37(4): 1277-1286 (in Chinese).
- [85] 李建, 孔婧, 李圣龙, 等. 适应性实验室进化技术在微生物育种中的应用进展. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 130-141.
- Li J, Kong J, Li SL, et al. Advances in adaptive laboratory evolutionary engineering to microbial breeding. *Chin J Biotech*, 2021, 37(1): 130-141 (in Chinese).
- [86] 陈珏, 黄佳敏, 燕天鹤, 等. 随机突变文库构建与筛选研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 163-177.
- Chen J, Huang JM, Yan TH, et al. Progress in the construction and screening of random mutation library.

- Chin J Biotech, 2021, 37(1): 163-177 (in Chinese).
- [87] 翟昊天, 祁庆生, 侯进. 体内连续进化技术的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(2): 486-499.
Zhai HT, Qi QS, Hou J. Recent advances of continuous *in vivo* evolution. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 486-499 (in Chinese).
- [88] 郭肖杰, 王立言, 张翀, 等. 高通量自动化微生物微液滴进化培养与筛选技术及其装备化. 生物工程学报, 2021, 37(3): 991-1003.
Guo XJ, Wang LY, Zhang C, et al. Technology development and instrumentation of a high-throughput and automated microbial microdroplet culture system for microbial evolution and screening. Chin J Biotech, 2021, 37(3): 991-1003 (in Chinese).
- [89] 杨建花, 苏晓岚, 朱蕾蕾. 高通量筛选系统在定向改造中的新进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2197-2210.
Yang JH, Su XL, Zhu LL. Advances of high-throughput screening system in reengineering of biological entities. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2197-2210 (in Chinese).
- [90] 陈永安, 袁清焱, 李承, 等. 快速筛选高效表达重组蛋白毕赤酵母菌株新方法的建立及评价. 生物工程学报, 2021, 37(3): 939-949.
Chen YA, Yuan QY, Li C, et al. Development and evaluation of a novel method for rapid screening of *Pichia pastoris* strains capable of efficiently expressing recombinant proteins. Chin J Biotech, 2021, 37(3): 939-949 (in Chinese).
- [91] 张晨阳, 武耀康, 徐显皓, 等. 工业微生物代谢网络模型的研究进展及应用. 生物工程学报, 2021, 37(3): 860-873.
Zhang CY, Wu YK, Xu XH, et al. Current status and future perspectives of metabolic network models of industrial microorganisms. Chin J Biotech, 2021, 37(3): 860-873 (in Chinese).
- [92] 周静茹, 刘鹏, 夏建业, 等. 基于约束的基因组规模代谢网络模型构建方法研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1526-1540.
Zhou JR, Liu P, Xia JY, et al. Advances in the development of constraint-based genome-scale metabolic network models. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1526-1540 (in Chinese).
- [93] 王冠, 田锡炜, 夏建业, 等. 大数据-模型混合驱动下生物过程优化与放大的新机遇与挑战. 生物工程学报, 2021, 37(3): 1004-1016.
Wang G, Tian XW, Xia JY, et al. New opportunities and challenges for hybrid data and model driven bioprocess optimization and scale-up. Chin J Biotech, 2021, 37(3): 1004-1016 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)