

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-005

合成生物学与食品制造

刘延峰^{1,2}, 周景文^{2,3}, 刘龙^{1,2}, 陈坚^{2,3}

(¹ 江南大学未来食品科学中心, 江苏 无锡, 214122; ² 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡, 214122; ³ 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡, 214122)

摘要: 随着全球环境污染加剧、气候持续变化和人口不断增长, 如何保障安全、营养和可持续的食品供给面临巨大挑战。这些挑战对未来食品供给方式和功能提出了新的要求。采用合成生物学技术, 创建适用于食品工业的细胞工厂, 将可再生原料转化为重要食品组分、功能性食品添加剂和营养化学品是解决食品领域所面临问题的重要途径。本文首先介绍了合成生物学对食品制造领域创新和突破的重要性。其次, 以基于合成生物学制造植物蛋白所需关键组分、黄酮类植物天然提取物和母乳寡糖这三种典型食品为例, 探讨了目前食品合成生物学的任务与挑战。最后, 对我国合成生物学与食品制造领域的发展趋势进行了总结和展望。通过加强食品合成生物学等具有重大意义的食品生物技术的开发和应用, 开展新食品资源开发和高值利用、多样化食品生产方式变革、功能性食品添加剂和营养化学品制造, 并率先实现产业化, 将抢占世界科技的前沿和产业高地, 造福人类。

关键词: 合成生物学; 食品制造; 人造食品; 植物天然产物; 母乳寡糖

中图分类号: Q819; TS201.1 **文献标志码:** A

Synthetic biology and food manufacturing

LIU Yanfeng^{1,2}, ZHOU Jingwen^{2,3}, LIU Long^{1,2}, CHEN Jian^{2,3}

(¹Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; ²Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; ³National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: As global environmental pollution intensifies, climate continues to change, and population continues to grow, how to ensure safe, nutritious and sustained food supply faces huge challenges. These challenges put forward new requirements for the future food supply and function. Using synthetic biology technologies to create cell factories applicable in the food industry to convert renewable raw materials into important food components, functional food additives and nutritional chemicals is an important way to solve the problems facing the food industry. This article first introduces the importance of synthetic biology to the innovation and breakthroughs in the field of food manufacturing. Secondly, taking artificial food, plant natural products and human milk oligosaccharide, three typical food products

收稿日期: 2020-02-27 修回日期: 2020-04-09

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1600400); 国家自然科学基金 (31830068)

引用本文: 刘延峰, 周景文, 刘龙, 陈坚. 合成生物学与食品制造[J]. 合成生物学, 2020, 1(1): 84-91

Citation: LIU Yanfeng, ZHOU Jingwen, LIU Long, CHEN Jian. Synthetic biology and food manufacturing[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(1): 84-91

from biological manufacturing, as examples, the current tasks and challenges of food synthetic biology are discussed. Finally, the development trends of synthetic biology and food manufacturing in China are summarized and prospected. By strengthening the development and application of food synthetic biology and the related food biotechnologies and being the first to achieve their industrialization, researchers will be able to seize the frontiers of science and technology and industrial highlands globally and benefit mankind.

Key words: synthetic biology; food manufacturing; artificial food; plant natural products; human milk oligosaccharide

健康、安全、可持续的食品制造是人类健康和社会可持续发展的关键要素。由于环境污染、气候变化、人口增长和资源面临枯竭,如何保障安全、营养和健康的食品供给面临巨大挑战。利用细胞工厂制造替代传统食品获取方式,建立可持续的食品制造新模式,将大幅降低食品生产对资源和能源的需求,减少温室气体的排放,并且提升食品生产与制造的可控性,有效避免潜在的食品安全风险和健康风险。

利用合成生物学技术创建细胞工厂,并且提升重要食品组分、功能性食品添加剂和营养化学品的合成效率,是解决目前食品制造面临的问题和主动应对未来挑战的重要研究方向。本文首先对食品合成生物学的重要意义与主要内涵进行了讨论。其次,本文针对基于合成生物学技术的重要食品组分、功能性食品添加剂和营养化学品的典型代表性产品的生物制造进展进行了介绍。最后,对合成生物学与食品制造领域的发展趋势进行了展望。

1 中国食品科技与合成生物学

我国食品工业与食品科技在全球占据重要地位。食品工业方面,我国食品产业产值和食品进出口量均居世界第一,为我国融合全球供应链和提升我国国际竞争力提供重要支撑^[1]。食品领域科研方面,我国食品领域专利申请数、授权数、论文发表量和引用数均位居全球第一,并且我国大学在“软科”发布的2019年全球食品学科排名前十的榜单中占据了5席^[1]。

传统食品获取方式和供给模式由于环境污染、

气候变化和人口增长日益面临巨大挑战,相关挑战对未来食品供给方式和功能提出了新的要求。食品获取方式和功能的改变将成为人类未来生产方法和生活方式改变的代表性问题,未来食品应该具备“更安全、更营养、更方便、更美味、更持续”的特征^[1]。其中,合成生物学为食品重要组分、功能性食品配料和重要功能营养因子的生物制造提供了关键技术和方法支撑。食品合成生物学是在传统食品制造技术基础上,采用合成生物学技术,特别是食品微生物基因组设计与组装、食品组分合成途径设计与构建等,创建具有食品工业应用能力的人工细胞、多细胞人工合成系统以及无细胞人工合成系统,将可再生原料转化为重要食品组分、功能性食品添加剂和营养化学品,实现更安全、更营养、更健康 and 可持续的食品获取方式^[1]。

2 食品合成生物学:任务与挑战

食品合成生物学的发展可以划分为三个阶段:

①通过最优合成途径构建及食品分子修饰,实现重要食品功能组分的有效、定向合成和修饰,为“人造功能产品”细胞的合成做准备;②建立高通量高灵敏筛选方法,筛选高效的底盘细胞工厂,实现重要食品功能组分的高效生物制造,初步合成具有特殊功能的“人造功能产品”细胞;③实现人工智能辅助的全自动生物合成过程的设计及实施,通过精确靶向调控,大幅度提高重要食品功能产品在异源底盘和原底盘细胞中的合成效率,最终实现“人造功能产品”细胞的全细胞利用^[1]。食品细胞工厂的设计与精准调控是各类食品、食

品配料或者添加剂的生物制造过程中所面临的共性和挑战。本文针对基于合成生物学技术合成植物蛋白肉所需关键组分、黄酮类植物天然产物和母乳寡糖三类典型代表性产品,介绍相关的生物制造研究进展,并且讨论目前食品合成生物学任务与挑战。

2.1 植物蛋白肉所需关键组分的生物制造

人造食品的总体技术路线是构建细胞工厂种子,以车间生产方式合成奶、肉、糖、油、蛋等,缓解农业压力,满足日益增长的食品需求。人造食品主要包括人造蛋、人造肉和人造奶等,其中人造肉是食品领域新兴和突破技术,人造肉规模化制造技术的突破将有望降低传统农业中资源与能源的消耗^[2-6]。近年来,人造肉因其来源可追溯、食品安全性高、绿色可持续等优势引起了广泛的关注,并且被 *MIT Technology Review* 评为2018年全球十大突破技术之一。人造肉可分为植物蛋白肉和细胞培养肉两大类。其中,植物蛋白肉成本相对较低、技术要求低、市场接受度高,因此植物蛋白肉现阶段具有技术成熟的优势和优先发展的潜力。近年来,Impossible Foods、Beyond Meat等多家公司已开发出以植物蛋白为原料的植物蛋白肉制品并且已经实现商业化生产。细胞培养肉与天然肉相似,不过目前成本较高,市场潜力大但仍需开发。目前细胞培养肉相关产品仍主要处于实验室研究阶段,商业化细胞培养肉大规模上市并且得到市场广泛认可还需要更加全面的研究和应用推广^[7-8]。植物蛋白肉和细胞培养肉均需要在制备过程中利用由微生物细胞工厂酶制剂、血红素、维生素和脂类等关键成分,将所获得的食物原料和功能成分进行有机整合,最终获取风味协调、质构稳定和拟真度高的重组食品,实现色、香、味、形的食品化整合。

然而,目前植物蛋白肉与禽肉的品质还存在较大差距,急需在质构仿真、营养优化、风味调节及成品定制等方面取得突破。利用特定功能的酶对植物蛋白肉进行质构仿真、营养优化和风味调节,能够实现植物蛋白肉结构强度改造、结构亲疏水性改造、过敏原等成分降解、蛋白质利用

率提升、糖脂蛋白的整合、异味成分的降解和风味物质提升。血红素和高核酸酵母提取物的添加对于风味品质提升同样具有重要作用。协同利用特定功能的酶和风味物质将有助于植物蛋白肉品质提升,并且为基于3D打印食品化的成品定制过程奠定基础。

植物蛋白肉质结构仿真方面,由于植物蛋白缺乏肌肉蛋白特有的纤维结构,因此感官品质较差。交联酶、脱酰胺酶和具有结构功能的动物蛋白的制备和综合利用是解决该问题的关键。谷氨酰胺转氨酶和漆酶是目前在食品加工中应用最多的交联酶^[9-12]。谷氨酰胺酶和天冬酰胺酶分别催化蛋白质肽链中谷氨酰胺和天冬酰胺脱酰胺^[13-15]。交联酶、脱酰胺酶的应用有望促进植物蛋白质类纤维结构的形成。在植物蛋白肉营养优化方面,如何高效特异性降解植物蛋白致敏源是需要解决的关键问题。作为植物蛋白肉主要基材的大豆蛋白等含有多种致敏原,因此筛选特异性蛋白酶降解致敏原蛋白有望解决植物蛋白肉脱敏的问题。在植物蛋白肉风味调节方面,目前主要针对如何消除引起豆腥味的醇、醛等挥发性化合物以及导致苦味的苦味肽开展研究。植物蛋白中的亚油酸或亚麻酸可转化为小分子醇、醛等挥发性化合物,导致豆腥味产生。同时,蛋白质在降解过程中形成的苦味肽会导致苦味的产生,严重影响植物蛋白肉的风味。应用醇、醛脱氢酶破坏醇、醛分子,补充复合蛋白酶将促进氨基酸生成(美拉德反应的前体),可以显著改善植物蛋白肉的风味。

植物蛋白肉生产关键酶制备路线主要包括4个步骤:①获得应用性能理想的酶,从自然界或基因数据库中筛选目标酶,并且基于应用需求进行分子改造,获得理想的目标酶;②构建安全易用的生产宿主,以食品安全级生产菌株为基础,开发高效转化方法,优化转录、翻译与蛋白质转运系统,构建安全易用的宿主;③设计普适性强的表达策略,对酶编码基因序列进行深度优化,提高目标酶基因与宿主的适配性,构建表达元件库,提高目标酶表达水平;④开发高效的过程控制技术,在系统分析酶分子合成与分泌的基础上,结合诱导条件和流加策略,实现菌体生产与目标酶

合成的平衡。

细胞培养组织、植物拉丝蛋白均缺乏真实的肉色，添加血红蛋白能够赋予植物蛋白肉和细胞培养肉真实的色香味感受。合成生物学技术是实现微生物发酵法制备血红蛋白的关键技术^[16-19]。血红蛋白生物合成需要利用成熟的微生物底盘细胞（酿酒酵母、毕赤酵母等）来表达植物根瘤组织来源或动物血红细胞来源的血红蛋白。血红蛋白合成代谢途径主要包含珠蛋白合成和血红素合成两个模块^[20-23]。在底盘细胞中优化与适配高效珠蛋白合成模块和高效血红素合成模块，有望提升血红蛋白合成效率。最后，在获得高效血红蛋白合成菌株的基础上开展发酵过程优化，为菌株生长和血红蛋白合成过程提供适宜的营养条件和环境条件，助力细胞工厂发酵法高效合成血红蛋白。

2.2 黄酮类化合物的生物制造

植物天然提取物具有生物活性和药理活性，这使得其在营养保健和医药健康领域具有广泛应用^[24]。然而，植物生长周期一般较长，而且植物中生物活性物质的含量一般非常低，每千克植物仅含有若干微克或若干毫克目标化合物^[25]。大规模植物天然提取物的生产和应用可能会导致植物群落破坏，甚至导致植物的灭绝。另外，植物中存在的活性物质类似物会增加提取工艺的复杂程度，并且增加产品纯化的成本^[26]。因此，以植物为单一来源获取植物天然提取物往往存在生产周期长、提取费用昂贵和对自然资源破坏严重的问题。利用合成生物学技术改造微生物、开发植物天然提取物的生物制造工艺引起了广泛关注。相比于传统提取工艺，生物制造工艺以可再生生物质为原料，生产过程能耗低，并且污染物排放少^[27]。目前，典型植物天然提取物的生物制造取得了显著进展，包括萜类化合物、苯丙素类化合物以及生物碱类化合物^[28-38]。

植物天然提取物的生物制造包括基因挖掘、细胞改造和发酵提取三个主要方面。具体步骤包括：①通过基因组学、转录组学和代谢组学等组学技术分析原生植物，挖掘植物天然提取物关键基因和代谢途径；②通过关键基因异源表达、前

体供给强化和辅因子再生强化等细胞改造技术，建立目标产物合成途径并且实现目标产物高效合成；③通过发酵过程优化为植物天然提取物生产菌株提供合适的营养条件和环境条件，提升目标产物合成效率，并且进一步对产物进行分离提取，获得大量目标产物。

黄酮类化合物是苯丙素类植物天然提取物中一类重要的化合物，基于合成生物学的黄酮类化合物生物制造是目前的研究热点之一^[39-44]。黄酮类化合物广泛分布于植物界中，已报道超过8000余种。黄酮类天然产物具有类似的合成途径，其中柚皮素、生松素是关键平台化合物。以柚皮素、生松素平台化合物为前体，可以合成结构和功能多样的黄酮类化合物。因此，设计与构建柚皮素和生松素的底盘细胞是实现黄酮类化合物高效生物制造的基础。生产黄酮类化合物的酿酒酵母底盘细胞的构建主要以下6个策略：①强化芳香族氨基酸和香豆酸/肉桂酸合成途径；②减少黄酮代谢副产物积累；③去除不必要的糖苷水解酶；④扩张细胞内质网；⑤强化糖基供体；⑥降低过氧化物酶活性。在生产黄酮类化合物酿酒酵母底盘细胞的基础上，通过组装与优化来源于深红酵母、香芹、矮牵牛、紫花苜蓿、拟南芥、甘草和淫羊藿的基因，已实现了最复杂黄酮类化合物之一的淫羊藿苷的生物合成。相关研究为以淫羊藿苷为主要成分的数百种药物和保健品的原料供给提供了新的途径^[39]。因此，利用合成生物学技术构建以廉价碳源、无机盐为底物合成高附加值黄酮类化合物的微生物细胞工厂，有望实现定制化生产数以千计的黄酮类化合物，为黄酮类化合物高效获取提供重要途径。

2.3 母乳寡糖的生物合成

母乳寡糖是母乳与牛乳含量差别最大的物质，牛乳中寡糖含量大约仅有0.05%，而母乳中这一比例达到5%~15%。母乳寡糖主要以半乳糖和N-乙酰氨基糖交替组成的碳骨架并且与乳糖相连，进一步经过岩藻糖基化或唾液酸基化修饰而成。母乳寡糖中有大约80%是岩藻糖基化的寡糖，而牛乳中不含岩藻糖基化的寡糖。母乳寡糖中岩藻糖

基化的寡糖对婴儿早期减少感染和肠道菌群的建立等诸多方面起着重要作用。另外, 母乳寡糖中约20%为唾液酸基母乳寡糖, 主要包括3'-唾液酸基乳糖和6'-唾液酸基乳糖等。唾液酸基母乳寡糖能够促进婴儿肠道益生菌增殖、神经系统代谢、肝脏和肌肉组织发育^[45]。因此, 母乳寡糖是婴儿配方奶粉的关键功能营养因子。母乳寡糖高效制备为实现婴儿配方奶粉对母乳的“深度模拟”提供重要技术支撑^[46-50]。

2'-岩藻糖基乳糖(2'-FL)和乳酰-N-新四糖(LNnT)是典型母乳寡糖。2'-FL被美国食品药品监督管理局(FDA)批准为婴幼儿奶粉的添加剂(2015年9月), 在欧盟被批准为新型食品添加剂。LNnT分别于2016年3月和2016年8月被美国和欧盟批准为食品添加剂。2'-FL在婴幼儿配方奶粉中的建议添加量为2g/kg, 按全球婴幼儿奶粉年产量270万吨计算, 预计需求量为32400吨/年。目前荷兰、德国公司投入巨资对母乳寡糖, 包括2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳酰-N-四糖、6'-唾液酸基乳糖和3'-唾液酸基乳糖进行研发, 预计3~5年内实现规模化生产。

目前母乳寡糖生物制造主要以大肠杆菌作为底盘细胞^[49, 51-55]。然而, 由于大肠杆菌生产的产品存在内毒素污染的风险, 影响了母乳寡糖的安全性。相比于大肠杆菌, 作为典型工业微生物的枯草芽孢杆菌是食品安全菌株, 并且无内毒素产生, 更适合于母乳寡糖的合成^[56-60]。另外, 枯草芽孢杆菌遗传背景清晰并且基因编辑技术成熟, 为基于合成生物学技术构建高效合成母乳寡糖工程菌提供了有利条件。

以枯草芽孢杆菌为宿主合成2'-FL已取得了显著研究进展。首先, 利用与凝血酶结合的DNA适配体的调节元件, 进行2'-FL合成途径基因表达水平的上调和内源乳糖运输抑制基因的表达水平的下调, 2'-FL的产量提高了27.3倍, 达到674mg/L^[61]。进一步在底物转运通道、途径酶表达和辅因子GTP的再生效率等方面进行系统调控, 2'-FL的合成效率显著提高, 摇瓶发酵2'-FL的产量达1035mg/L。最后, 将2'-FL合成菌株在3L发酵罐中进行补料分批培养, 2'-FL的最高产量达到5.01g/L, 底物得率达到0.85mol/mol岩藻糖。相关研究为未来进一步

提高2'-FL的合成效率奠定了良好基础^[62]。

利用细胞工厂合成LNnT是实现规模化制备LNnT的一种重要方法。研究人员利用枯草芽孢杆菌CRISPRi系统针对LNnT生物合成途径中的3条竞争途径的4个基因设计了一系列sgRNA, 对糖酵解途径中的*pfkA*和*pyk*基因、戊糖磷酸途径中的*zwf*基因和磷壁酸合成途径中的*mnaA*基因表达进行下调。通过单独抑制每条通路, 筛选获得提高LNnT/葡萄糖转化率的最佳靶向sgRNA。随后, 对糖酵解途径、戊糖磷酸途径和磷壁酸合成途径进行组合下调, LNnT产量由1.32g/L提高到1.55g/L。在此基础上, 为了提高中间代谢物乳酰-N-三糖II向LNnT的转化效率, 研究人员敲除了分支途径中*tuaD*基因, 并且过表达*lgtB*基因, 使得LNnT产量进一步提高到2.01g/L。最后, 通过优化诱导剂木糖的添加时间和用量, LNnT在摇瓶中产量达到2.30g/L, 在3L生物反应器中产量达到5.41g/L, 为生物法规规模化制备LNnT奠定了基础^[63]。

3 结论

合成生物学技术为解决食品制造面临的挑战提供了重要技术支撑, 是食品领域研究的重要方向。以植物蛋白肉关键组分、黄酮类植物天然产物和母乳寡糖为代表的典型食品组分、功能性食品添加剂和营养化学品的生物制造目前已取得显著进展。在食品合成生物学理论研究、技术方法建立和典型产物合成路径打通的基础上, 进一步扩展合成的目标产物的范围、创建智能化细胞工厂和大幅度提升食品组分、食品配料和功能营养品的合成效率, 实现全细胞利用和工业规模制备是未来研究的重要方向。

综上所述, 食品合成生物学是解决未来食品面临的重大挑战的主要方法之一, 包括新食品资源开发和高值利用、多样化食品生产方式变革、功能性食品添加剂和营养化学品制造等。我国必须加强食品合成生物学等具有重大意义的食品生物技术的开发和应用, 并率先实现产业化, 抢占世界的科技前沿和产业高地, 造福人类。

参 考 文 献

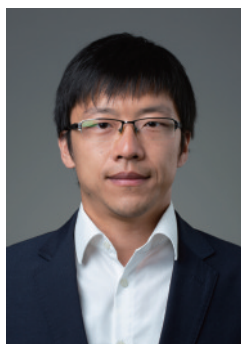
- [1] 陈坚. 中国食品科技:从2020到2035[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 1-5.
CHEN J. Food Science and technology in China: from 2020 to 2035 [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(12):1-5
- [2] ZHANG G, ZHAO X, LI X, et al. Challenges and possibilities for bio-manufacturing cultured meat[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 97: 443-450.
- [3] STEPHENS N, DI SILVIO L, DUNSFORD I, et al. Bringing cultured meat to market: technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 78: 155-166.
- [4] SPECHT E A, WELCH D R, REES CLAYTON E M, et al. Opportunities for applying biomedical production and manufacturing methods to the development of the clean meat industry[J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 132: 161-168.
- [5] TUOMISTO H L, TEIXEIRA De Mattos M J. Environmental impacts of cultured meat production[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(14): 6117-6123.
- [6] ESHEL G, SHEPON A, MAKOV T, et al. Land, irrigation water, greenhouse gas, and reactive nitrogen burdens of meat, eggs, and dairy production in the United States[J]. PNAS, 2014, 111(33): 11996-12001.
- [7] BHAT Z F, KUMAR S, FAYAZ H. *In vitro* meat production: challenges and benefits over conventional meat production[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(2): 241-248.
- [8] POST M J. Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects[J]. Meat Science, 2012, 92(3):297-301.
- [9] LIU S, WANG M, DU G, et al. Improving the active expression of transglutaminase in *Streptomyces lividans* by promoter engineering and codon optimization[J]. BMC Biotechnology, 2016, 16:75.
- [10] LIU S, WAN D, WANG M, et al. Overproduction of pro-transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* in *Yarrowia lipolytica* and its biochemical characterization[J]. BMC Biotechnology, 2015, 15:75.
- [11] CALLEJON S, SENDRA R, FERRER S, et al. Recombinant lactase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine[J]. PLoS One, 2017, 12(10). DOI: 10.1371/journal.pone.0186019.
- [12] BHOKISHAM N, PAKHCHANIAN H, QUAN D, et al. Modular construction of multi-subunit protein complexes using engineered tags and microbial transglutaminase[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 1-9.
- [13] VIDYA J, SAJITHA S, USHASREE M V, et al. Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: an overview[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1775-1781.
- [14] FENG Y, LIU S, JIAO Y, et al. Improvement of L-asparaginase thermal stability by regulating enzyme kinetic and thermodynamic states[J]. Process Biochemistry, 2018, 71: 45-52.
- [15] FENG Y, LIU S, JIAO Y, et al. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(4): 1509-1520.
- [16] NATARAJAN C, JIANG X B, FAGO A, et al. Expression and purification of recombinant hemoglobin in *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2011, 6(5):e20176.
- [17] LIU L F, MARTÍNEZ J L, LIU Z H, et al. Balanced globin protein expression and heme biosynthesis improve production of human hemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 21: 9-16.
- [18] MARTÍNEZ J L, LIU L, PETRANOVIC D, et al. Engineering the oxygen sensing regulation results in an enhanced recombinant human hemoglobin production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(1): 181-188.
- [19] JIN Y, HE X, ANDOH -KUMI K, et al. Evaluating potential risks of food allergy and toxicity of soy leghemoglobin expressed in *Pichia pastoris*[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62(1): 1700297.
- [20] ZHAO X, CHOI K R, LEE S Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for secretory production of free haem[J]. Nat. Catal., 2018, 1: 720-728.
- [21] ZHANG J, WENG H, ZHOU Z, et al. Engineering of multiple modular pathways for high-yield production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2019, 274, 353-360.
- [22] ZHANG J L, KANG Z, DING W W, et al. Integrated optimization of the *in vivo* heme biosynthesis pathway and the *in vitro* iron concentration for 5-aminolevulinic acid production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(6): 1252-1262.
- [23] ZHANG J, KANG Z, CHEN J, et al. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli* [J]. Sci. Rep., 2015, 5:8584.
- [24] ZHOU J W, DU G C, CHEN J. Novel fermentation processes for manufacturing plant natural products[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 25: 17-23.
- [25] ENGELS B, DAHM P, JENNEWEIN S. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10: 201-206.
- [26] GAZAK R, FUKSOVA K, MARHOL P, et al. Preparative method for isosilybin isolation based on enzymatic kinetic resolution of silymarin mixture[J]. Process Biochemistry, 2013, 48:184-189.

- [27] MAVEL S, DIKIC B, PALAKAS S, et al. Synthesis and biological evaluation of a series of flavone derivatives as potential radioligands for imaging the multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1/MRP1) [J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14:1599-1607.
- [28] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532
- [29] MUCHIRI R, WALKER K D. Taxol biosynthesis: tyrocidine synthetase A catalyzes the production of phenylisoserinyl CoA and other amino phenylpropanoyl thioesters[J]. *Chem. Biol.*, 2012, 19:679-685.
- [30] ZHAO J, LI Q Y, SUN T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 17:42-50.
- [31] WANG C, YOON S H, JANG H J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for a-farnesene production[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13:648-655.
- [32] ASADOLLAHI M A, MAURY J, SCHALK M, et al. Enhancement of farnesyl diphosphate pool as direct precursor of sesquiterpenes through metabolic engineering of the mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Bioengineering*, 2010, 106:86-96.
- [33] RICO J, PARDO E, OREJAS M. Enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76:6449-6454.
- [34] IGNEA C, TRIKKA F, KOURTZELIS I, et al. Positive genetic interactors of HMG2 identify a new set of genetic perturbations for improving sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factory*, 2012, 11:162.
- [35] IGNEA C, CVETKOVIC I, LOUPASSAKI S, et al. Improving yeast strains using recyclable integration cassettes, for the production of plant terpenoids[J]. *Microbial Cell Factory*, 2011, 10: 4-22.
- [36] FISCHER M J C, MEYER S, CLAUDEL P, et al. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast[J]. *Biotechnology Bioengineering*, 2011, 108:1883-1892.
- [37] SCALCINATI G, KNUF C, PARTOW S, et al. Dynamic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of plant sesquiterpene a-santalene in a fed-batch mode[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14:91-103.
- [38] ZHOU Y J J, GAO W, RONG Q X, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for mitratriene production[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134:3234-3241.
- [39] LYU Y B, ZENG W Z, DU G C, et al. Efficient bioconversion of epimedine C to icariin by a glycosidase from *Aspergillus nidulans*[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289: 121612.
- [40] LV Y K, XU S, LYU Y B, et al. Engineering enzymatic cascades for the efficient biotransformation of eugenol and taxifolin to silybin and isosilybin[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(7): 1660-1667.
- [41] XIU Y, JANG S, JONES J A, et al. Naringenin-responsive riboswitch-based fluorescent biosensor module for *Escherichia coli* co-cultures[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114 (10). DOI: 10.1002/bit. 26340.
- [42] LV Y K, GAO S, XU S, et al. Spatial organization of silybin biosynthesis in milk thistle *Silybum marianum* (L.) Gaertn[J]. *Plant Journal*, 2017, 92(6): 995-1004.
- [43] LUO Y, LI B Z, LIU D, et al. Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(15): 5265-5290.
- [44] SIEDLER S, STAHLHUT S G, MALLA S, et al. Novel biosensors based on flavonoid-responsive transcriptional regulators introduced into *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 21:2-8.
- [45] CHARBONNEAU M R, O'DONNELL D, BLANTON L V, et al. Sialylated milk oligosaccharides promote microbiota-dependent growth in models of infant undernutrition[J]. *Cell*, 2016, 164(5): 859-871.
- [46] ZHANG X, LIU Y, LIU L, et al. Microbial production of sialic acid and sialylated human milk oligosaccharides: advances and perspectives[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(5): 787-800.
- [47] FAIJES M, CASTEJÓN-VILATERSANA M, VAL-CID C, et al. Enzymatic and cell factory approaches to the production of human milk oligosaccharides[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(5): 667-697.
- [48] BYCH K, MIKŠ MH, JOHANSON T, et al. Production of HMOs using microbial hosts-from cell engineering to large scale production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019. 56: 130-137.
- [49] SPRENGER G A, BAUMGÄRTNER F, ALBERMANN C. Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 258:79-91.
- [50] BODE L, CONTRACTOR N, BARILE D, et al. Overcoming the limited availability of human milk oligosaccharides: challenges and opportunities for research and application[J]. *Nutrition Reviews*, 2016, 74(10): 635-644.
- [51] CHOI Y H, PARK B S, SEO J H, et al. Biosynthesis of the human milk oligosaccharide 3-fucosyllactose in metabolically engineered *Escherichia coli* via the salvage pathway through increasing GTP synthesis and β -galactosidase modification[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019,116: 3324-3332.
- [52] DROUILLARD S, MINE T, KAJIWARA H, et al. Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6, 6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered *E. coli* expressing a multifunc-

- tional sialyltransferase from the *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 [J]. *Carbohydr. Res.*, 2010, 345, 1394-1399.
- [53] FIERFORT N, SAMAIN E. Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides [J]. *J. Biotechnol.*, 2008, 134, 261-265.
- [54] GUO Y, JERS C, MEYER A S, et al. A *Pasteurella multocida* sialyltransferase displaying dual trans-sialidase activities for production of 3'-sialyl and 6'-sialyl glycans[J]. *J. Biotechnol.*, 2014, 170: 60-67.
- [55] HUANG D, YANG K, LIU J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose through modular pathway enhancement[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 23-38.
- [56] LIU Y F, LIU L, LI J H, et al. Synthetic biology toolbox and chassis development in *Bacillus subtilis*[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(5): 548-562.
- [57] GU Y, XU X H, WU Y K, et al. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 109-121.
- [58] LIU Y F, LI J H, DU G C, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: recent advances and future directions[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(1): 20-30.
- [59] YZTÜRK S, YALIK P, ÖZDAMAR T H. Fed-batch biomolecule production by *Bacillus subtilis*: a state of the art review[J]. *Trends in Biotechnology*, 2016, 34(4): 329-345.
- [60] VAN DIJL J M, HECKER M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1): 3.
- [61] DENG J Y, GU L Y, CHEN T C, et al. Engineering the substrate transport and cofactor regeneration systems for enhancing 2'-fucosyllactose synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 28(10): 2418-2427.
- [62] DENG J, CHEN C, GU Y, et al. Creating an *in vivo* bifunctional gene expression circuit through an aptamer-based regulatory mechanism for dynamic metabolic engineering in *Bacillus subtilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 179-190.
- [63] DONG X, LI N, LIU Z, et al. CRISPRi-guided multiplexed fine-tuning of metabolic flux for enhanced lacto-*N*-neotetraose production in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(8): 2477-2484.



通讯作者：陈坚(1962—),男,教授,中国工程院院士,研究方向为发酵工程、食品生物技术。
E-mail:jchen@jiangnan.edu.cn



第一作者：刘延峰(1987—),男,博士,副研究员,研究方向为微生物代谢工程。
E-mail:yanfengliu@jiangnan.edu.cn