

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-049

## 大宗化学品细胞工厂的构建与应用

于勇, 朱欣娜, 张学礼

(中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

**摘要:** 随着合成生物学技术的发展, 越来越多的大宗化学品可通过微生物细胞工厂发酵生产, 为摆脱石油资源依赖、节能减排提供了可能。本文首先介绍了细胞工厂构建所需的关键技术, 包括基因组编辑技术、多基因同时调控技术、蛋白骨架技术、基因动态调控技术、高通量筛选技术。随后结合丁二酸细胞工厂这一具体案例, 从物质代谢、能量代谢及细胞生理代谢三方面阐述了如何解析微生物高效合成化学品的代谢调控机制, 为高效细胞工厂创建奠定理论基础。并对近年来成功构建的大宗化学品细胞工厂作了举例介绍, 包括L-丙氨酸、L-甲硫氨酸、丁二酸、D-乳酸、丙二酸、L-苹果酸、戊二酸、己二酸、1,3-丙二醇、1,4-丁二醇和异丁醇等。未来, 进一步增加原料利用效率和拓宽产物范围是微生物细胞工厂的发展方向, 但新酶设计与改造是限制代谢途径设计的主要瓶颈。相信随着研究的深入, 微生物细胞工厂将在替代化学法生产大宗化学品方面有更广泛的应用。

**关键词:** 合成生物学; 大宗化学品; 细胞工厂; 代谢工程; 代谢调控; 基因组编辑

**中图分类号:** Q81 **文献标志码:** A

## Construction and application of microbial cell factories for production of bulk chemicals

YU Yong, ZHU Xinna, ZHANG Xueli

(Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Science, Tianjin 300308, China)

**Abstract:** With the development of synthetic biology, more and more bulk chemicals can be produced through microbial cell factories, which can avoid the dependence on petroleum resources and decrease energy cost and pollution. In this review, the key technologies for construction of microbial cell factories were firstly introduced, including genome editing, simultaneous modulation of multiple genes, protein scaffold, gene dynamic modulation and high throughput screening technologies. How to characterize the metabolic regulation mechanisms for efficient production of chemicals was then introduced in three aspects: carbon metabolism, energy metabolism and physiological metabolism, and succinate cell factory was used as an example. Successful bulk chemical cell factories in recent years were then summarized, including L-alanine, L-methionine, succinate, D-lactate, malonate, L-malate,

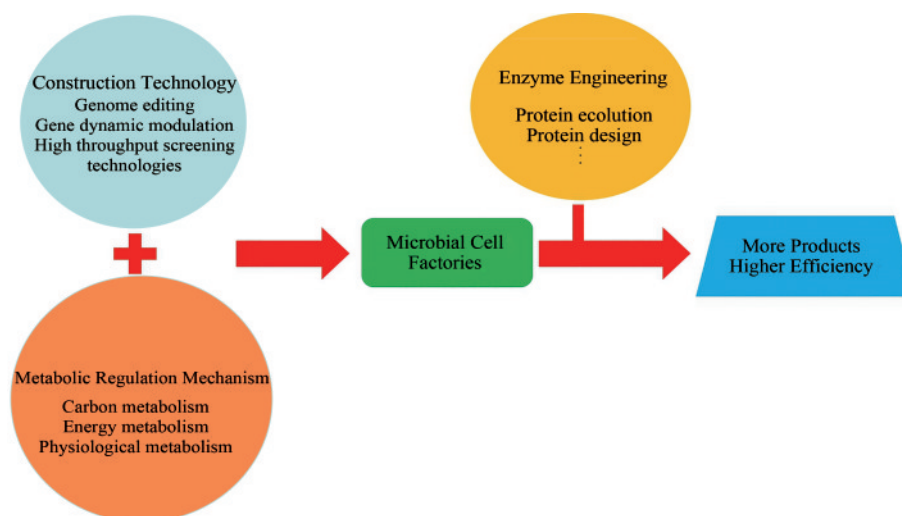
收稿日期: 2020-04-16 修回日期: 2020-09-25

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0904900)

引用本文: 于勇, 朱欣娜, 张学礼. 大宗化学品细胞工厂的构建与应用[J]. 合成生物学, 2020, 1(6): 674-684

Citation: YU Yong, ZHU Xinna, ZHANG Xueli. Construction and application of microbial cell factories for production of bulk chemicals[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(6): 674-684

glutarate, adipate, 1,3-propanediol, 1,4-butanediol, isobutanol, *etc.* In the future, further increasing the efficiency of substrates utilization and broadening the range of products will be the directions of development of microbial cell factories, but the design and engineering of new enzymes are the key bottleneck limiting the design of metabolic pathways. It is believed that with the deepening of research, microbial cell factories will be more widely used in the production of bulk chemicals besides chemical methods.



**Keywords:** synthetic biology; bulk chemicals; cell factories; metabolic engineering; metabolic regulation; genome editing

通过合成生物学技术构建微生物细胞工厂，能够将糖类等可再生的生物资源转化为多种大宗化学品，实现大宗化学品的绿色清洁生产，可以摆脱对石油资源的依赖，解决石化制造过程中的高耗能和高污染问题，对促进国民经济可持续发展至关重要<sup>[1]</sup>。本文对微生物细胞工厂构建技术、代谢调控机制及大宗化学品生物制造的典型案例进行了综述，并对细胞工厂的未来进行了展望。

## 1 微生物细胞工厂构建技术

### 1.1 基因组编辑技术

基因组编辑技术是细胞工厂代谢途径构建及优化的重要技术。通常的基因编辑技术有：Red 同源重组技术<sup>[2-3]</sup>、锌指核酸酶技术（zinc-finger nucleases, ZEN）<sup>[4]</sup>、转录激活因子效应物核酸酶技术（transcription activator-like effector nucleases,

TALEN）<sup>[5]</sup>等。这些基因编辑技术在合成生物学的发展中具有“里程碑”式的意义，但存在耗时长、成本高及宿主局限性等缺陷，无法满足高效构建细胞工厂的需求。

CRISPR/Cas（clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins）基因编辑技术具有操作简单、基因编辑效率高、成本低廉等优势，近年来得到了深入的开发，并广泛应用于生物及医药领域。在大宗化学品代谢途径构建和改造中，CRISPR/Cas 基因编辑技术显示了广泛的适用范围，成功地应用于大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、丙酮丁酸梭菌、链球菌、芽孢杆菌等原核微生物及酿酒酵母、曲霉等真核微生物细胞工厂的构建<sup>[6-7]</sup>。

首先，CRISPR/Cas 技术可成功地应用于基因表达强度的调控。Heo 等<sup>[8]</sup>将该技术用于丁醇代谢途径的改造，通过高效编辑大肠杆菌柠檬酸合成酶基因（*gltA*）的启动子区域降低该基因的表达

强度，将柠檬酸合成酶的活性调整为出发菌的55%，将丁醇的产量提高了1.3倍。

其次，CRISPR/Cas技术还可用于基因整合。Bassalo等<sup>[9]</sup>使用该技术将*alsS*、*ilvC*、*ilcD*、*kivD*和*adhA*等5个与异丁醇合成相关的基因构成的长达10 kb的基因簇一步整合进大肠杆菌基因簇，并获得了异丁醇产量达2.2g/L的菌株。向丙酮丁醇羧菌中引入异丙醇的合成途径，得到了产量达4.45g/L的异丙醇生产菌<sup>[10]</sup>。

再次，CRISPR/Cas技术还可用于基因敲除。Cho等<sup>[11]</sup>使用该技术敲除了谷氨酸棒杆菌中 $\gamma$ -氨基丁酸合成途径的竞争途径，将 $\gamma$ -氨基丁酸的产量提高到27.5 g/L。

近年来，科学家们开发出更为简便的CRISPR/Cas单碱基编辑技术，不需要同源臂，可在染色体上直接对基因进行定点突变。其基本原理为利用CRISPR/Cas系统确定突变位点，通过脱氨酶催化脱氨使单碱基发生转换。如：通过偶联胞嘧啶脱氨酶实现C到T的转换；通过偶联腺苷脱氨酶实现A到G的转换。David R. Liu团队将CRISPR/Cas9和逆转录酶融合表达，开发了“Prime Editing”系统，突破了CRISPR/Cas碱基突变类型，能进行C到T、T到C、A到G、G到A四种碱基置换<sup>[12]</sup>，拓展了基因编辑技术的应用范围。

## 1.2 多基因同时调控技术

通常情况下，高效的产物合成途径不仅受限于某个单一的限速步骤，而是依赖多个酶的协同平衡<sup>[13]</sup>。虽然通过质粒过表达的方式可以实现单一基因的过表达，但同时也会造成细胞代谢高负荷，对生长代谢和产物合成均不利。近些年来，科学家们开发了多基因同时调控技术，合理调控代谢途径表达的平衡。

Keasling团队<sup>[14]</sup>开发了一种多基因同时调控技术，称为可调控基因区域文库（tunable intergenic regions, TIGRs）技术。这一技术被成功用于大肠杆菌中外源甲羟戊酸（mevalonate）途径的多基因协调表达，将甲羟戊酸的产量提高了7倍。Warner等<sup>[15]</sup>开发了一种基因组可追踪多元重组工程技术（trackable mutiplex recombinerring, TRMR），能同时对上千个位点进行分析和修饰。

Isaacs等<sup>[16]</sup>构建了多元自动基因组工程技术（multiplex automated genome engineering, MAGE），能同时瞄准并改造单个细胞基因组上的多个靶点，从而在一个细胞群体中形成基因组多样性。利用自动化的MAGE技术，对番茄红素生产途径上的24个基因同时改造，一天可以产生数十亿不同基因型的突变株，经过3天的进化，从中挑选到番茄红素生产能力提高了5倍的菌株。

本文作者团队开发了一种CRISPR/Cas9辅助的染色体多基因同时编辑技术，基于未发生重组的菌株染色体被活性Cas9切割导致死亡的特征，显著提高了筛选效率，能在染色体上同时对三个基因进行快速的文库调控，三个基因同时编辑的效率达到了70%，操作周期为4天。采用该技术，快速获得了木糖代谢速率提高了3倍的多基因编辑菌株<sup>[17]</sup>，极大地缩短了途径优化周期。该技术解决了传统Red同源重组系统只能对单个基因进行文库调控的缺点，为代谢途径多基因同时调控提供了新思路。

## 1.3 蛋白骨架技术

在细胞工厂的代谢途径中，参与反应的酶与底物之间的距离及合成途径上相邻的酶所处的空间位置是影响代谢途径效率的一个重要因素。通过人工合成蛋白质骨架的技术，使酶按照特定的空间位置锚定在骨架上，可以使相关的酶聚集在特定的区域，增加了酶与底物的结合概率，进而提高产物合成速率<sup>[18]</sup>。另外，蛋白质骨架也可以调节酶的催化效率，获得最优的催化效率组合，最终提高产物合成效率<sup>[19]</sup>。利用蛋白骨架技术，Keasling团队将甲羟戊酸合成途径的三个酶组装到蛋白质骨架上，将甲羟戊酸产量提高了77倍<sup>[19]</sup>。近来，香港中文大学和武汉大学团队，利用RIAD和RIDD短肽，将途径中的多个酶按不同数量进行连接和组装，构建出多酶复合体，能快速提高萜类化合物合成途径的效率，并在酿酒酵母产番茄红素细胞工厂中得到验证<sup>[20]</sup>。

## 1.4 基因动态调控技术

细胞内的代谢活动是一个复杂而精密的动态过程，传统的诱导型或固定强度启动子虽然可以

实现转录水平的调控，但外源代谢途径往往会干扰细胞生长造成干扰，如有毒中间产物积累。另外，基因表达太弱又难以得到产物。因此，基因动态调控技术受到越来越多的关注。基因动态调控技术的基本思路是：设计人工基因回路，使细胞能够感应外部环境条件的变化，在适当时间开启或关闭基因表达从而实现代谢通路的动态调控。已经建立的基因动态调控技术有：环境信号诱导的表达调控系统（如碳源调控系统、光调控系统和温度调控系统等）和内源信号诱导的表达调控系统（如群体感应调控系统和压力感应调控系统）<sup>[21]</sup>。基因动态调控技术为细胞根据外部环境按需调控目的基因表达强度提供了技术方法。

### 1.5 高通量筛选技术

细胞工厂的快速构建离不开高通量筛选技术的助力。高通量筛选实验的成功，依赖于恰当的实验设计、良好的分析方法和质量控制方法，通过获取可靠的测量值并选择合适的阈值，从而“命中”目标样品<sup>[22]</sup>。微孔板是常用的高通量筛选试验器具，孔板内发生的生物、化学和物理变化事件可以由多功能酶标仪、流式细胞仪、液相色谱仪和质谱仪等检测仪器连续自动化读取。高通量筛选技术已用于基因调控元件强度分析<sup>[23]</sup>、酶元件的新活性检测<sup>[24]</sup>、基因线路的活性检测<sup>[25]</sup>、天然产物的活性筛选<sup>[26]</sup>等。可以预见，高通量筛选技术将在元件工程、线路工程、基因组工程、

基因编辑和微生物组工程等合成生物学研究的多个层面拓宽研究思路。

## 2 微生物高效合成化学品的代谢调控机制

要获得一个高效的细胞工厂，就需要从物质代谢、能量代谢和细胞生理代谢三方面深入解析微生物高效合成化学品的代谢调控机制。物质代谢方面，需要研究元件与合成途径的适配机制，解除限速步骤，避免有毒中间代谢物积累，使碳代谢流最大程度地流向目标化学品。能量代谢方面，需解析能量对合成代谢的调控机制，使细胞代谢底物时产生足够的还原力和ATP去满足化学品合成需求。细胞生理代谢方面，需阐明细胞耐渗透胁迫机制，提高化学品的产量。下面以作者团队在丁二酸细胞工厂上的研究为例，从物质代谢、能量代谢和细胞生理代谢三方面做具体的阐述（图1）。

### 2.1 物质代谢调控

微生物化学品的合成途径由多步生化反应组成，参与反应的酶元件与合成途径的适配性，影响着产物合成的效率。蛋白酶催化活性太低，成为整条途径的限速步骤；蛋白酶催化活性太高，而下游蛋白催化活性又较低，又会造成中间代谢

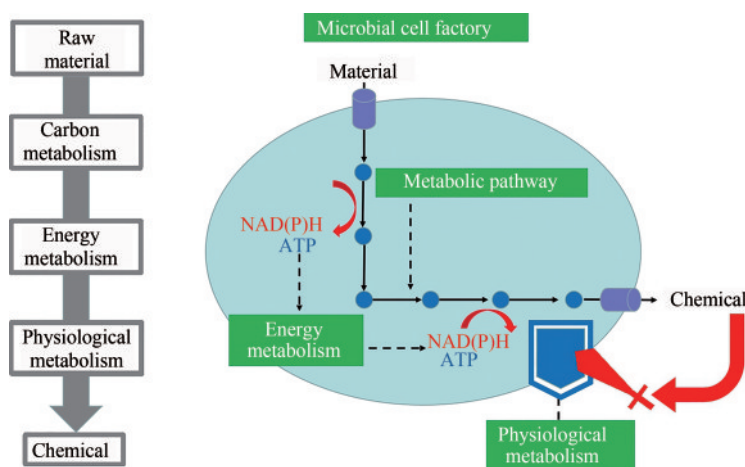


图1 微生物高效合成化学品的代谢调控机制

Fig. 1 Mechanisms of metabolic regulation for efficient production of chemicals

物的积累。某些中间代谢物甚至对细胞会有较大的毒性，影响细胞的生长。作者团队通过研究丁二酸合成途径中各个酶的活性与丁二酸生产速率之间的相互关系，从合成途径的19步生化反应中

系统解析出4个限速酶：葡萄糖转运蛋白<sup>[27]</sup>、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶<sup>[28]</sup>、丁二酸转运蛋白<sup>[29]</sup>和转醛酶<sup>[30]</sup>（图2）。优化这4个酶元件与途径的适配性，构建出了丁二酸高效合成途径。

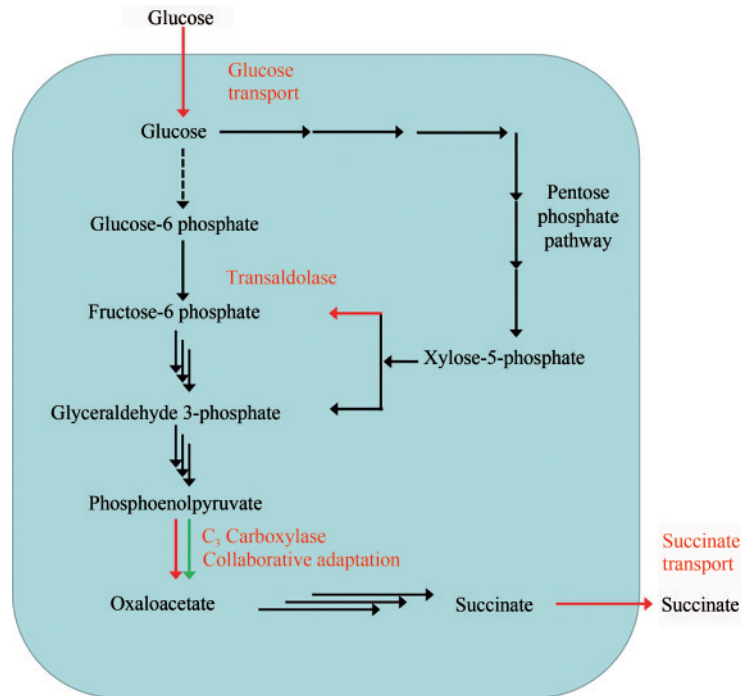


图2 丁二酸合成的4个限速步骤

Fig. 2 Four rate-limiting steps for synthesis of succinate

## 2.2 能量代谢调控

还原力和ATP是能量代谢的关键调控因素。细胞在代谢葡萄糖等底物时产生还原力，在合成化学品时需要还原力。还原力供给量若小于需求量，会影响化学品的转化率和合成途径效率。另外，细胞需产生足够的ATP供细胞生长和产物合成。

本文作者团队系统研究了丁二酸厌氧合成的能量代谢调控机制。葡萄糖厌氧生产丁二酸的理论转化率为1.71 mol/mol。通过糖酵解途径，大肠杆菌每代谢1 mol葡萄糖产生2 mol NADH，而合成1.71 mol丁二酸需要3.42 mol NADH，这导致NADH供给量与需求量之间的不平衡。为了解决这个问题，作者团队设计了一种新的还原力供给模式，用C<sub>5</sub>磷酸戊糖途径替代C<sub>6</sub>糖酵解途径，并结合转氢酶，将1 mol葡萄糖代谢产生的NADH从

2 mol提高到3.67 mol（图3），满足了丁二酸最大转化率的还原力要求。在实际生产中，将丁二酸的糖酸转化率从1.12 mol/mol提高到1.61 mol/mol（从理论最大值的65%提高到94%）<sup>[31]</sup>。

甘油是一种高还原力碳源，用于丁二酸生产有较大优势：1 mol甘油与1 mol CO<sub>2</sub>理论上可合成1 mol丁二酸。但在厌氧条件下，从甘油到丁二酸的合成途径不能产生出足够的ATP，导致丁二酸产量和生产速率相当低。作者团队使用来自克雷伯氏菌的ATP依赖型二羟基丙酮激酶（DhaK）替代了大肠杆菌原有的PEP依赖型二羟基丙酮激酶（DhaKLM），在大肠杆菌中构建出一条新的甘油厌氧代谢途径。和原有途径相比，新途径能产生质子动力势为细胞生长和丁二酸外排提供额外能量。丁二酸产量、比生产速率和胞内ATP含量分别增加了282%、63%和338%<sup>[32]</sup>。利用质子动力势提高ATP供给也为途径中能量代谢调控提供了思路（图4）。

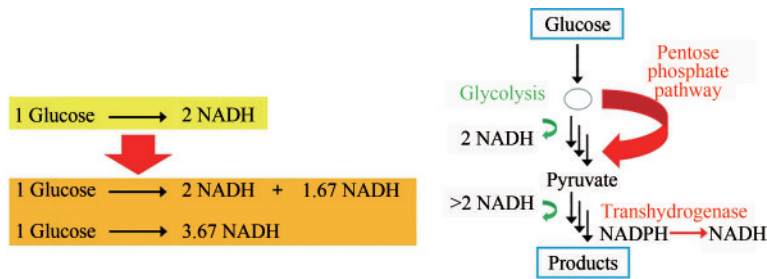


图3 调控葡萄糖能量代谢模式解决了丁二酸合成中的还原力问题

Fig. 3 Regulation of glucose energy metabolism to solve reducing equivalent problem for synthesis of succinate

Traditional pathway:  $1 \text{ Gly} + 1 \text{ CO}_2 = 1 \text{ Suc} + 1 \text{ ATP}$   
New pathway:  $1 \text{ Gly} + 1 \text{ CO}_2 = 1 \text{ Suc} + 1 \text{ ATP} + 4 \text{ H}^+_{\text{out}}$

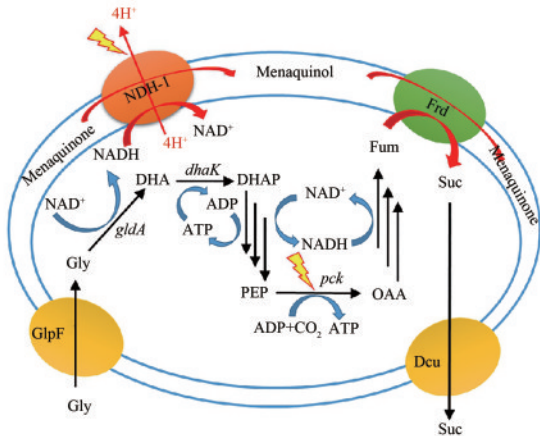


图4 调控甘油能量代谢模式解决了丁二酸合成中的能量问题

Fig. 4 Regulation of glycerol energy metabolism to solve energy problem for synthesis of succinate

## 2.3 细胞生理代谢调控

优越的细胞生理性能是获得高效细胞工厂的关键因素之一。耐渗透胁迫是细胞生理性能的重要方面。对于分泌到胞外的大宗化学品，产量越高，渗透胁迫越大，细胞需具备耐渗透胁迫能力才能获得高产量。作者团队在丁二酸细胞工厂中发现了大肠杆菌细胞耐渗透胁迫的一种新机制。高渗透胁迫在厌氧条件下造成胞内  $\text{Cu}(\text{I})$  的积累，对 Fe-S 簇生物合成机器和含 Fe-S 簇的重要代谢酶具有很大的破坏性，导致细胞在生理和代谢层次的全局紊乱。cusCFBA 基因簇的激活能提升细胞外排  $\text{Cu}(\text{I})$  的能力，使细胞具备更强的耐渗透胁迫能力。外源添加  $\text{Cu}(\text{I})$  螯合剂含硫氨基酸（甲硫氨酸或半胱氨酸）也能提高大肠杆菌细胞的耐渗透胁迫能力<sup>[33]</sup>（图5）。该研究是首次发现含

硫氨基酸可作为厌氧条件下的渗透保护物质，为提升细胞耐渗透能力提供了一种新思路。

## 3 大宗化学品生物制造的具体案例

利用上述的技术路线和策略，国内外研究人员构建出了一系列的微生物细胞工厂，实现了多种大宗化学品的生物制造。本文将对氨基酸、有机酸和有机醇三类大宗化学品细胞工厂进行阐述。

### 3.1 氨基酸

L-丙氨酸不仅是一种重要的氨基酸，还是重要的平台化学品。用于生产新型环保无磷螯合剂甲基甘氨酸二乙酸（MGDA）、维生素  $\text{B}_6$  和氨基丙醇等，全球市场容量约 5 万吨/年。作者团队通过合成途径的设计与构建，代谢进化及细胞性能优化，构建出了能够将葡萄糖高效转化为 L-丙氨酸的细胞工厂<sup>[34]</sup>，在  $250 \text{ m}^3$  发酵罐中，发酵 40 h，产量达  $155 \text{ g/L}$ ，糖酸转化率高达 95%。目前利用该技术在安徽华恒生物科技股份有限公司建成年产 2.6 万吨 L-丙氨酸的生产线，在国际上首先实现发酵法 L-丙氨酸的产业化，生产成本比传统技术降低 50% 以上。L-丙氨酸生产成本的降低，促进了下游产品 MGDA 的应用。目前 MGDA 全球需求量约 16 万吨，预计未来 3~5 年全球 MGDA 市场将以约 22% 的年复合增长率保持增长趋势，进而将带动 L-丙氨酸需求的不断增加。MGDA 的推广应用对保护水体生态环境意义重大<sup>[1]</sup>。该案例是国际上首个成功实现产业化的厌氧发酵氨基酸品种，大幅减少资源和能源消耗，有效降低产品成本，并实现生产过程二氧化碳零排放。除 L-丙氨酸以

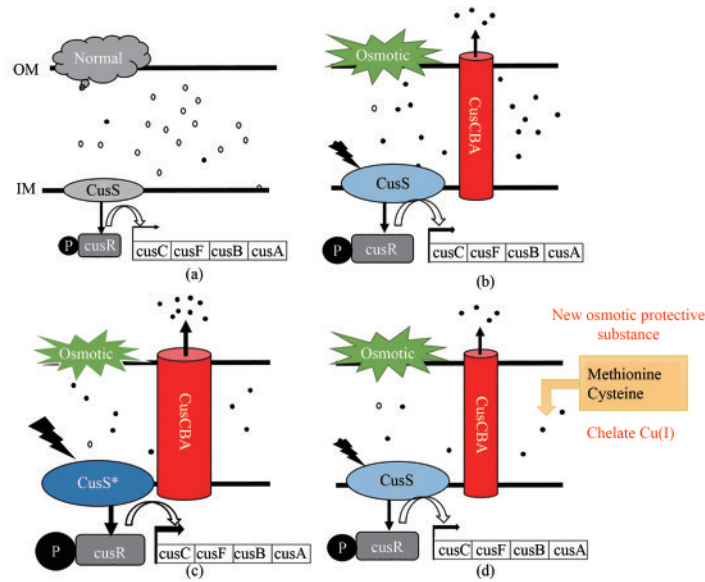


图5 大肠杆菌细胞耐渗透胁迫的新机制

Fig. 5 New osmotolerance mechanism of *Escherichia coli*

(a) 在正常渗透压条件下 (5% 葡萄糖), 铜离子大多以低毒的二价离子形式存在, Cus 系统不激活; (b) 在高渗透压条件下 (12% 葡萄糖), 周质空间中的一价铜离子含量升高, 激活了 *copA*、*cusS*、*cusR* 和 *cusCFAB* 表达量提高, 转运一价铜离子的能力增强; (c) 在高渗透压条件下 (12% 葡萄糖), 突变后的 *cusS* 及 *cusCFAB* 表达量提高, 转运一价铜离子的能力增强; (d) 甲硫氨酸、半胱氨酸等渗透保护物种可整合一价铜离子

(a) Under normal conditions (5% glucose), copper exists mostly in the form of less-toxic Cu (II), and the CopA and Cus system was not induced; (b) Under high osmotic pressure (12% glucose), increasing free Cu (I) in the periplasmic space activates the expression of *copA*, *cusS*, *cusR* and *cusCFAB* to expel toxic Cu (I); (c) Under high osmotic pressure (12% glucose), expression levels of *cusS* and *cusCFAB* are increased to expel more Cu (I) from the periplasmic space; (d) Osmotic protective substances such as methionine and cysteine can chelate valence copper ions.

外, 作者团队与华恒生物公司以相同的思路开发出 L-缬氨酸厌氧发酵技术, 推动我国氨基酸产品在厌氧发酵领域的进一步发展。

L-甲硫氨酸是人体必需氨基酸, 在食品、医药及饲料添加剂方面有广泛应用。工业上主要通过化学法合成 DL-甲硫氨酸, 存在环境污染、分离困难等问题。韩国希杰集团拥有成熟的生物法制备 L-甲硫氨酸技术, 其与阿克玛共同投资 4.5 亿美元在马来西亚建设世界首个生物 L-甲硫氨酸工厂, 产能达 8 万吨<sup>[35]</sup>, 其生产的 L-甲硫氨酸比化学法合成的 DL-甲硫氨酸的生物利用率提高了 20%~40%<sup>[36]</sup>。浙江工业大学采用系统分析的策略<sup>[37]</sup>, 上调或抑制了中央代谢和氨基酸合成途径中的 80 个基因, 探究了它们对积累 L-甲硫氨酸的影响, 并以此优化了 L-甲硫氨酸的代谢途径, 最优菌株补料分批发酵 48 h 产 16.86 g/L 的 L-甲硫氨酸。该研究探究了 L-甲硫氨酸的生产瓶颈, 对 L-甲硫氨酸的发酵生产有很大的指导意义。

### 3.2 有机酸

丁二酸是一种重要的平台化合物, 与其还原产物 1,4-丁二醇聚合可生成重要的生物降解塑料聚丁二酸丁二醇酯 (PBS), 全球潜在市场达 160 亿美元/年。目前其生产方式是以顺酐为原料的石化路线。作者团队通过对丁二酸合成途径进行设计、调控和性能优化, 在产业化生产中将糖酸转化率提高至 1.02 g/g。在山东兰典生物科技股份有限公司成功应用, 已建成年产 2 万吨的生产线, 在国内首次实现了发酵法生产丁二酸的产业化, 成本与传统石化路线相比降低了 20%。该技术对降低丁二酸成本, 促进 PBS 可降解塑料产业实践具有重要意义<sup>[1]</sup>。

D-乳酸 (光学纯度 99.5% 以上) 是合成聚乳酸的关键原料。作者团队以大肠杆菌为底盘细胞, 使 D-乳酸成为厌氧条件下丙酮酸代谢的唯一途径, 并通过进化代谢的方法构建出高效生产高光学纯度 D-乳酸的大肠杆菌细胞工厂。该技术在山东寿

光巨能金玉米得到产业化应用，D-乳酸光学纯度超99.5%。建成了年产1万吨D-乳酸的生产线，在国内首次实现发酵法D-乳酸的产业化。该技术对降低高光纯度D-乳酸成本，促进聚乳酸可降解塑料产业推广具有重要意义<sup>[1]</sup>。

丙二酸是高价值的化学品，主要用于医药、特种材料和香料，丙二酸及衍生化学品的市场规模超过10亿美元。石化法生产丙二酸需要氯乙酸和氰化钠，成本高且污染环境。Lygos公司开发了一种丙二酸的发酵生产技术，利用蛋白质工程的方法，获得了高活性丙二酰辅酶A水解酶，能将丙二酰辅酶A催化为丙二酸，优化合成途径后，最终获得的高效的酵母细胞工厂，丙二酸产量可达100 g/L以上。该技术成功实现了丙二酸的大规模发酵法生产<sup>[38]</sup>，对环境污染少，生产成本显著低于石化法。

L-苹果酸是一种重要的有机酸，可作为酸味剂，添加在食品中有防腐的作用。传统的苹果酸生产主要基于石油基化工路线，产品为DL-苹果酸，应用范围有限。微生物发酵能生产高光学纯度的L-苹果酸，与DL-苹果酸相比利用率更高。目前，丝状真菌是合成苹果酸的主要微生物，诺维信公司从米曲霉出发，强化了还原型TCA途径和苹果酸转运，发酵产L-苹果酸产量可达154 g/L，转化率1.03 g/g<sup>[39]</sup>。然而，丝状真菌发酵需要以葡萄糖或甘油为碳源导致原料成本高；需常温（28~37℃），要进行冷凝处理导致能源成本高。针对这些问题，中国科学院天津工业生物技术研究所从能够耐高温且能以纤维素为原料的嗜热毁丝霉菌出发，构建了可在45℃高温条件下发酵产L-苹果酸的细胞工厂。在底物利用方面，不仅可以利用葡萄糖高效发酵合成L-苹果酸，还可以直接利用纤维素和半纤维素，产量超过180 g/L。这种新的L-苹果酸细胞工厂能高温发酵，能利用多种底物，显著降低了成本，具有广阔的应用前景。

戊二酸是一种重要的五碳平台化合物，可用于合成聚酯和聚酰胺。北京化工大学设计了新的戊二酸合成途径，利用大肠杆菌自身的赖氨酸降解途径合成戊二酸，将降解途径中伴生的L-谷氨酸和NAD(P)H回补于赖氨酸合成途径。辅因子被循环利用，形成强大的代谢驱动力，使代谢流最大程度地流向戊二酸合成途径。优化天然转运蛋

白的表达，解决了中间产物尸胺和5-氨基戊酸的胞外积累问题。最终获得的戊二酸细胞工厂，在补料发酵的条件下产量达54.5 g/L，转化率0.54 mol/mol，这是目前报道的大肠杆菌产戊二酸的最高水平<sup>[40]</sup>。

己二酸是一种六碳二元羧酸，主要用于合成尼龙66、尼龙56等尼龙纤维。己二酸的化工生产路线主要是硝酸氧化法（KA油法），但环境污染严重。在生物合成方面，美国Verdezyne公司、荷兰DSM公司和美国Genomatica公司都在积极开展生物合成己二酸项目。江南大学将嗜热裂胞菌*Thermobifida fusca*中的己二酸降解途径反转为己二酸合成途径，己二酸的产量达到了0.36 g/L。进一步确定了该途径的关键限速酶为5-羧基-2-戊酰-CoA还原酶，通过进一步的代谢调控，最终获得了己二酸细胞工厂，利用甘油发酵生产，产量达68 g/L<sup>[41]</sup>。

### 3.3 有机醇

1,3-丙二醇（PDO）是一种重要的化工材料，其与对苯二甲酸缩聚而成的对苯二甲酸丙二醇酯（PTT）是一种性能优异的新型材料，不仅生物可降解，还具有涤纶的抗污性、腈纶的蓬松性和尼龙的弹性等特点。美国杜邦公司设计并构建了以葡萄糖为原料生产1,3-丙二醇的细胞工厂，将来自酿酒酵母的甘油合成途径和来自克雷伯氏菌的1,3-丙二醇合成途径导入大肠杆菌中，减少进入TCA循环的碳代谢流，促进葡萄糖向甘油代谢，显著提高了PDO的转化率，1,3-丙二醇产量达135 g/L，生产速率达3.5 g/(L·h)，转化率达1.21 mol/mol<sup>[42]</sup>。与传统的石油化工路线相比，杜邦公司的1,3-丙二醇生产技术的能耗降低了40%，二氧化碳排放降低了40%。

1,4-丁二醇（1,4-BDO）主要用于制造聚酯和氨纶，每年的需求量达200万吨。自然界中尚未发现1,4-丁二醇的合成途径。Genomatica公司根据已知化合物官能团的转换，计算出10 000种可能的1,4-BDO合成途径。并基于操作可行性筛选出两种最优的1,4-BDO合成途径，在此基础上，在大肠杆菌中整合进多种不同来源的基因进而构建出1,4-BDO的合成途径，1,4-BDO产量初步达到

18 g/L<sup>[43]</sup>。通过进一步的调控, 1,4-BDO产量提升至200 g/L<sup>[44]</sup>。

异丁醇作为一种含有四个碳原子的高级醇, 广泛应用于食品、化学和药品等工业领域。由于异丁醇有高密度、较小的挥发和腐蚀性、较高的辛烷值等特点, 是一种优秀的燃油添加剂。利用氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)合成途径的中间代谢物2-酮酸, 在大肠中引入外源的2-酮酸脱羧酶(KDC)和醇脱氢酶(ADH), 即可将不同碳链的酮酸中间物转化为相应的长链醇。加州大学洛杉矶分校利用2-酮酸和Ehrlich途径构建和优化了异丁醇合成途径。最终获得的细胞工厂在微氧条件下, 112 h异丁醇产量达到23g/L; 进一步采用原位汽提技术, 减小异丁醇对细胞的毒性, 72 h异丁醇的产量高达50g/L<sup>[45]</sup>。

## 4 总结与展望

细胞工厂现有发展多是基于自然界中已有生物合成途径的化学品。然而, 绝大部分化学品是没有天然生物合成途径的, 这给生物制造产业发展带来了极大的挑战。酶是细胞完成代谢催化的基本功能单元, 是细胞工厂构建的源泉。为了获得所需要的功能基因, 科学家们发展出了从蛋白质非理性设计到半理性设计再到理性设计的蛋白质设计改造技术, 来获得具有催化新功能的酶元件。蛋白质非理性设计作为最早的蛋白质进化方法, 其并不需要事先了解蛋白结构信息和催化机制, 通过位点饱和突变、易错PCR及DNA shuffling等技术建立文库并筛选特定性状提高的突变体, 重复数轮积累有益突变最终获得性能改进或具有新功能的酶<sup>[46]</sup>。随着对蛋白质结构和功能的理解, 并借助蛋白保守位点和晶体结构分析, 科学家们开发出半理性设计技术, 通过预测一些蛋白的突变靶点, 构建具有针对性的突变体文库, 减少工作量。该技术广泛应用于酶的立体/区域选择性、稳定性和催化活性的改造<sup>[47]</sup>, 例如对P450-BM3单加氧酶进行改造, 使其与醇脱氢酶或过氧化物酶偶联用于手型二醇及衍生物的催化合成<sup>[48]</sup>。

蛋白质从头设计于2016年被*Science*杂志列入年度十大科学突破<sup>[49]</sup>, 目标是创造自然界不存在

的并具有特定功能的酶。其中最具有影响力的David Baker团队开发的Rosetta软件是目前最强大的蛋白质设计软件, 该软件集蛋白质从头设计、酶活性中心设计、配体对接、生物大分子计算建模与分析于一身<sup>[50]</sup>。目前已有很多具有重要生物功能的新酶被设计出来, 如以二氧化碳为碳源合成羟基丙酮的关键催化酶<sup>[51]</sup>、催化羟醛缩合反应(retro-aldol reaction)和狄尔斯-阿尔德反应(Diels-Alder reaction)的新酶<sup>[52-53]</sup>。中科院天津工业生物技术研究所、中科院微生物所和山东大学团队合作, 设计并创造了乙醇醛合酶, 继而创造了一个合成乙酰辅酶A的碳一(甲醛)代谢途径<sup>[54]</sup>。中科院微生物所从新酶设计催化的角度实现了 $\beta$ -丙氨酸的生物合成。将来源于*Bacillus sp.* YM55-1的天冬氨酸酶用计算机重新设计, 改变底物的偏好性, 不以天冬氨酸为底物而以烯酸为底物, 得到一系列位置选择性与立体选择性的人工 $\beta$ -氨基酸合成酶<sup>[55]</sup>, 其中以丙烯酸为底物的 $\beta$ -氨基酸合成酶被用于 $\beta$ -丙氨酸的合成。该技术已与安徽华恒生物股份有限公司合作, 实现了产业化生产。

随着新酶设计能力的不断提高, 我们希望细胞工厂能像化学合成一样, 基本实现所有化学品的生物合成。同时, 也希望通过合成生物学技术的辅助, 让越来越多化学品细胞工厂的生物制造成本不断降低, 与石化制造路线相比更有竞争力。

## 参 考 文 献

- [1] 于勇, 朱欣娜, 刘萍萍, 等. 微生物细胞工厂生产大宗化学品及其产业化进展[J]. 生物产业技术, 2019(1): 13-18.  
YU Y, ZHU X N, LIU P P, et al. Production of bulk chemicals through microbial cell factories and its Industrialization[J]. *Biotechnology & Business*, 2019(1):13-18.
- [2] MURPHY K C. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(8): 2063-2071.
- [3] ZHANG Y M, BUCHHOLZ F, MUYSERS J P P, et al. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*[J]. *Nature Genetics*, 1998, 20(2): 123-128.
- [4] URNOV F D, REBAR E J, HOLMES M C, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(9): 636-646.
- [5] MILLER J C, TAN S, QIAO G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(2): 143-148.

- [6] 何庆, 王茜, 朱清华, 等. 基因组工程在微生物细胞工厂构建中的应用进展 [J]. 生物产业技术, 2017(1): 31-36.  
HE Q, WANG Q, ZHU Q H, et al. Application progress of genome engineering for construction of microbial cell factories[J]. Biotechnology & Business, 2017(1): 31-36.
- [7] SHI S, LIANG Y, ZHANG M M, et al. A highly efficient single-step, markerless strategy for multi-copy chromosomal integration of large biochemical pathways in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 33: 19-27.
- [8] HEO M J, JUNG H M, UM J, et al. Controlling citrate synthase expression by CRISPR/Cas9 genome editing for *n*-butanol production in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(2): 182-189.
- [9] BASSALO M C, GARST A D, HALWEG-EDWARDS A L, et al. Rapid and efficient one-step metabolic pathway integration in *E. coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(7): 561-568.
- [10] WASELS F, JEAN-MARIE J, COLLAS F, et al. A two-plasmid inducible CRISPR/Cas9 genome editing tool for *Clostridium acetobutylicum*[J]. Journal of Microbiol Methods, 2017, 140: 5-11.
- [11] CHO J S, CHOI K R, PRABOWO C P S, et al. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42: 157-167.
- [12] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. Nature, 2019, 576(7785): 149-157.
- [13] WANG H H, ISAACS F J, CARR P A, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. Nature, 2009, 460(7257): 894-898.
- [14] PFLEGER B F, PITERA D J, SMOLKE C D, et al. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(8): 1027-1032.
- [15] WARNER J R, REEDER P J, KARIMPOUR-FARD A, et al. Rapid profiling of a microbial genome using mixtures of barcoded oligonucleotides[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(8): 856-862.
- [16] ISAACS F J, CARR P A, WANG H H, et al. Precise manipulation of chromosomes *in vivo* enables genome-wide codon replacement[J]. Science, 2011, 333(6040): 348-353.
- [17] ZHU X N, ZHAO D D, QIU H N, et al. The CRISPR/Cas9-facilitated multiplex pathway optimization (CFPO) technique and its application to improve the *Escherichia coli* xylose utilization pathway[J]. Metabolic Engineering, 2017, 43: 37-45.
- [18] LEE M J, MANTELL J, HODGSON L, et al. Engineered synthetic scaffolds for organizing proteins within the bacterial cytoplasm[J]. Nature Chemical Biology, 2018, 14(2): 142.
- [19] DUEBER J E, WU G C, MALMIRCHEGINI G R, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(8): 753.
- [20] KANG W, MA T, LIU M, et al. Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4248.
- [21] ZHANG F Z, CAROTHERS J M, KEASLING J D. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(4): 354.
- [22] ZHANG X D. Optimal high-throughput screening: practical experimental design and data analysis for genome-scale RNAi research[M]. New York: Cambridge University Press, 2011.
- [23] SALIS H M, MIRSKY E A, VOIGT C A. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(10): 946-950.
- [24] KAN S B, LEWIS R D, CHEN K, et al. Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: bringing silicon to life[J]. Science, 2016, 354(6315): 1048-1051.
- [25] SCHMIDL S R, EKNESS F, SOFJAN K, et al. Rewiring bacterial two-component systems by modular DNA-binding domain swapping[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(7): 690-698.
- [26] SIKORA A E, TEHAN R, MCPHAIL K. Utilization of *Vibrio cholerae* as a model organism to screen natural product libraries for identification of new antibiotics[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1839: 135-146.
- [27] LU J, TANG J L, LIU Y, et al. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2455-2462.
- [28] ZHANG X L, JANTAMA K, MOORE J C, et al. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(48): 20180-20185.
- [29] CHEN J, ZHU X N, TAN Z G, et al. Activating C-4-dicarboxylate transporters DcuB and DcuC for improving succinate production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(5): 2197-2205.
- [30] ZHU X N, TAN Z G, XU H T, et al. Metabolic evolution of two reducing equivalent-conserving pathways for high-yield succinate production in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 24: 87-96.
- [31] TAN Z G, CHEN J, ZHANG X L. Systematic engineering of pentose phosphate pathway improves *Escherichia coli* succinate production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 13.
- [32] YU Y, ZHU X N, XU H T, et al. Construction of an energy-conserving glycerol utilization pathways for improving anaerobic succinate production in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 56: 181-189.
- [33] XIAO M Y, ZHU X N, FAN F Y, et al. Osmotolerance in *Escherichia coli* is improved by activation of copper efflux genes or supplementation with sulfur-containing amino acids[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(7): 11.
- [34] 张学礼, 张冬竹. 一种高产 L-丙氨酸的 XZ-A26 菌株及构建方法与应用: CN102329765A[P]. 2011-08-17.  
ZHANG X L, ZHANG D Z. High-yield L-alanine XZ-A26 and construction method and application thereof: CN102329765A[P]. 2011-08-17.
- [35] 马桂燕. 2015 年蛋氨酸市场回顾及 2016 年趋势展望[J]. 中国畜牧业, 2016(10): 50-51.  
MA G Y. Review of methionine market in 2015 and prospect

- of trend in 2016[J]. China Animal Industry, 2016(10): 50-51.
- [36] 希杰 L-蛋氨酸生物利用率高出 40% [J]. 中国食品工业, 2015(2): 27.  
The bioavailability of CJ L-methionine was 40% higher[J]. China Food, 2015(2): 27.
- [37] HUANG J F, SHEN Z Y, MAO Q L, et al. Systematic analysis of bottlenecks in a multibranch and multilevel regulated pathway: the molecular fundamentals of L-methionine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(11): 2577-2589.
- [38] DIETRICH J A, FORTMAN J L, STEEN E J. Recombinant host cells for the production of malonate: US 10472653[P]. 2019-11-12.
- [39] KNUF C, NOOKAEW I, REMMERS I, et al. Physiological characterization of the high malic acid-producing *Aspergillus oryzae* strain 2103a-68[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(8): 3517-3527.
- [40] LI W N, MA L, SHEN X L, et al. Targeting metabolic driving and intermediate influx in lysine catabolism for high-level glutarate production[J]. Nature Communications, 2019, 10: 8.
- [41] ZHAO M, HUANG D X, ZHANG X J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing adipic acid through the reverse adipate-degradation pathway[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 254-262.
- [42] NAKAMURA C E, WHITED G M. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14(5): 454-459.
- [43] YIM H, HASELBECK R, NIU W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol[J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7(7): 445-452.
- [44] VAN DIEN S J, BURGARD A P, HASELBECK R, et al. Microorganisms for the production of 1,4-butanediol and related methods: US 10273508[P]. 2019-04-30.
- [45] ATSUMI S, HANAI T, LIAO J C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels[J]. Nature, 2008, 451(7174): 86-89.
- [46] SHELDON R A, PEREIRA P C. Biocatalysis engineering: the big picture[J]. Chemical Society Reviews, 2017, 46(10): 2678-2691.
- [47] 曲戈, 朱彤, 蒋迎迎, 等. 蛋白质工程: 从定向进化到计算设计[J]. 生物工程学报, 2019, 35(10): 1843-1856.  
QU G, ZHU T, JIANG Y Y, et al. Protein engineering: from directed evolution to computational design[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(10): 1843-1856.
- [48] YU D, WANG J B, REETZ M T. Exploiting designed oxidase-peroxygenase mutual benefit system for asymmetric cascade reactions[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(14): 5655-5658.
- [49] The runners-up[J]. Science, 2016, 354(6319): 1518-1523.
- [50] LEAVER-FAY A, TYKA M, LEWIS S M, et al. ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules[J]. Methods in Enzymology, 2011, 487: 545-574.
- [51] SIEGEL J B, SMITH A L, POUST S, et al. Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(12): 3704-3709.
- [52] JIANG L, ALTHOFF E A, CLEMENTE F R, et al. *De novo* computational design of retro-aldol enzymes[J]. Science, 2008, 319(5868): 1387-1391.
- [53] SIEGEL J B, ZANGHELLINI A, LOVICK H M, et al. Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction[J]. Science, 2010, 329(5989): 309-313.
- [54] LU X Y, LIU Y W, YANG Y Q, et al. Constructing a synthetic pathway for acetylcoenzyme A from one-carbon through enzyme design[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1-10.
- [55] LI R, WIJMA H J, SONG L, et al. Computational redesign of enzymes for regio- and enantioselective hydroamination[J]. Nature Chemical Biology, 2018, 14(7): 664-670.



通讯作者: 张学礼(1981—),男,博士,研究员。研究方向为代谢工程、合成生物学。  
E-mail: zhang\_xl@tib.cas.cn



第一作者: 于勇(1992—),男,博士,博士后。研究方向为代谢工程、合成生物学。  
E-mail: yu\_yong@tib.cas.cn



第一作者: 朱欣娜(1975—),女,博士,副研究员。研究方向为代谢工程、合成生物学。  
E-mail: zhu\_xn@tib.cas.cn