

DOI: 10.13376/j.cbls/2019055

文章编号: 1004-0374(2019)04-0413-10



钟建江, 1986年本科毕业于华东化工学院, 1993年获大阪大学工学博士学位。1996年任华东理工大学教授。2006年9月加盟上海交通大学。曾获长江学者特聘教授、国家自然科学基金杰出青年科学基金。一直从事生物工程与生物反应器工程、发酵调控、代谢工程与合成生物学研究。至今在 *Trends Biotechnol.*、*Biotechnol Adv.*、*Metabolic Eng.*、*Biotechnol Bioeng* 等国际主流专业期刊发表SCI论文250篇, 出版国际编著7本, 据Google Scholar统计被引用11400次; 获授权国家发明专利30余项。获教育部自然科学奖一等奖2次(第一完成人)、湖北省自然科学奖一等奖和贵州省科技进步奖一等奖各1次(第二完成人), 日本生物工学会首届“亚洲年轻生物技术学家奖”等。受邀在国际学术会议做大会报告及其他邀请报告70余次。兼任4种SCI期刊的主编和副主编。

## 合成生物学驱动的智能生物制造研究进展

王文方, 钟建江\*

(上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 教育部代谢与发育科学国际合作联合实验室, 上海200240)

**摘要:** 合成生物学的迅猛发展给包括药物和化学品在内的生物制造带来了强劲动力。它助力生物合成关键元件的挖掘, 丰富了智能生物制造所必需的基础(催化)元件库; 底盘细胞的性能优化为高效生物制造奠定了基石和平台。合成生物学经典的“设计-构建-测试-学习”则是创建高效智能细胞工厂的核心研发内容。天然宿主的系统代谢工程和合成生物学以及无细胞体系的体外合成生物学, 是实现高效生物制造和替代底盘细胞体系的可选途径。该文简要综述近年国内外的相关研究进展。

**关键词:** 合成生物学; 生物制造; 催化元件; 底盘细胞; 天然药物和化学品

中图分类号: Q819 文献标志码: A

## Recent advances in smart biomanufacturing driven by synthetic biology

WANG Wen-Fang, ZHONG Jian-Jiang\*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology,  
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** The rapid development of synthetic biology has given strong impetus to biological manufacturing, including drugs and chemicals. It helps to mine the key elements of biosynthesis, enriches the essential basic (catalytic) element library for intelligent biological manufacturing, and optimizes the performance of chassis cells, which lays the foundation and platform for efficient biological manufacturing. The classic “design-build-test-learning” of synthetic biology is central to the creation of efficient smart cell factories. Systematic metabolic engineering and biosynthetic biology of natural hosts as well as *in vitro* cell-free biosynthetic systems are alternative approaches to efficient biological production and replacement of chassis cell systems. This article briefly reviews the research progress at home and abroad in recent years.

**Key words:** synthetic biology; biomanufacturing; catalytic element; chassis cell; natural drug and chemicals

收稿日期: 2019-01-11; 修回日期: 2019-02-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31770037); 科技部“973”计划(2012CB721006)

\*通信作者: E-mail: jjzhong@sjtu.edu.cn

生物制造 (Biomufacturing) 是综合运用现代制造科学和生命科学的原理和方法, 利用细胞或酶本身具有的或经改造后获得的生理代谢功能或催化功能, 以生物技术的手段取代原本物理或化学等方式制造产品的技术。生物制造技术突破了传统物理化学制造的界限, 极大地扩展了人类改造自然、制造产品的能力, 并因其低碳循环、高效清洁等优势, 已成为当今世界各国技术竞争的制高点和产业发展的战略重点。

现代生物学的发展汇聚工程科学和系统科学等思想, 催生了一门按人类自身意愿改造生物系统, 甚至从头构建新生命的新兴学科——合成生物学。合成生物学的兴起与迅猛发展掀起了生命科学研究的崭新一页, 被誉为是继 DNA 双螺旋结构解析、人类基因组计划之后的第三次生命科学革命。合成生物学主要目标之一是重构生命或者将已有细胞改造为“超级细胞工厂”。其“人造生命”的基本特征就是在接受人类特定的信号输入 (input) 后, 获得可控且稳定的输出 (output)。相比于传统的物理装置或化学转化, 合成生命更加智能、高效而且温和, 并具有按人类意愿不断“进化”的潜能。近年来合成生物学驱动的新兴生物制造技术发展迅速, 并相继在能源、材料、环境、医药等关系国计民生的重大领域取得了令人瞩目的科研成果<sup>[1-9]</sup>。这些进展的取得离不开合成生物学关键科学问题的深入研究与破解。当然, 也仍有不少相关科学问题需进一步攻关, 以使其在生物制造, 尤其在高附加值 (非) 天然产物领域发挥更大作用。这些问题主要包括元件的挖掘鉴定、底盘细胞的优化、基因线路的设计 - 组装 - 检测等。同时, 天然宿主的合成生物学改造以及无细胞体外合成系统在生物制造领域也具有不可或缺的地位。以下就相关研究进展进行简要综述和讨论。

## 1 关键元件的挖掘及功能鉴定

生物元件是指经过功能表征, 编码某种生物学功能的核苷酸序列。合成生物学融合了工程学思想, 将不同特性的 DNA 生物元件 (基因、启动子等) 构建为标准化的元件库。生物元件越丰富, 就越可能针对目标天然化合物进行人工设计, 构建相应的模块或合成途径, 转入到合适的底盘细胞中进行异源表达, 获得功能增强或者全新的细胞工厂, 实现高效生物制造以满足人类的需求。显而易见, DNA 元件是构建高效细胞工厂实现生物制造的基础单

元, 因而对 DNA 元件的挖掘和功能鉴定是通过合成生物学手段实现高效智能生物制造的第一步, 它既是基础性的, 也是根本性的。

### 1.1 候选元件的挖掘

随着人类对地球物种认知的扩展 (尤其是对深海、沙漠等极端环境物种的研究) 以及对天然化合物分离纯化及鉴定水平的不断提高, 天然产物库中的化合物数量飞速增加。可惜对于绝大多数具有生物活性的天然产物而言, 决定其生物合成的众多基因元件都不清楚, 因此, 挖掘出合成途径中的关键基因元件尤为重要。根据一般的化学反应原理及已知的中间体结构并辅以同位素示踪, 可推测可能的生物合成途径<sup>[10]</sup>。

对生物合成途径的合理推测有助于挖掘催化反应元件, 其传统挖掘方法是以突变体库的筛选为典型代表。人工构建或者天然存在的一些表型不同的突变体是发现关键催化元件的良好素材。在燕麦中存在一种突变体 *Sad2* (Saponin deficient 2), 可以积累大量的  $\beta$ -amyrin, 这暗示在皂苷合成途径中由于上游的基因发生突变, 造成  $\beta$ -amyrin 不能被催化转化为相应的萜类和皂苷。Geisler 等<sup>[11]</sup> 鉴定发现 CYP51H10 发生了突变, 并证实 CYP51H10 可同时催化  $\beta$ -amyrin 的环氧化和羟化。通过突变体表型定位鉴定出起关键催化作用的元件十分有效, 但该筛选方法费时费力, 难以满足合成生物学的发展要求。

随着高通量测序技术的快速发展, 越来越多物种的基因组被测序, 但从海量的基因组信息中筛选出可能参与特定天然产物生物合成的元件依然是一项挑战性工作。在漫长的进化过程中, 生物体为更经济地应对环境变化, 形成了严谨的调控网络, 同一产物生物合成途径中的基因往往受到统一的调控而具有相似的表达谱。在共表达特征基础上再结合代谢组的分析, 可以有效地缩小特定途径候选基因的筛选范围, 有效地提高后续元件挖掘的效率 (图 1)。如黄三文课题组通过破解黄瓜的基因组数据, 并结合代谢组学、比较基因组学等, 最终发现 9 个与黄瓜中葫芦素 C 合成相关的基因, 并鉴定了其中 4 个酶的功能, 破解了黄瓜苦味合成及调控的机制, 为三萜葫芦素的生物合成奠定了重要基础<sup>[12-13]</sup>。Lau 和 Sattely<sup>[14]</sup> 通过对植物质叶鬼臼的转录挖掘, 确定了 29 个候选基因, 从中鉴定了 6 个和鬼臼毒素生物合成相关的基因。本实验室结合陈士林课题组报道的灵芝基因组和转录数据<sup>[15]</sup> 以及灵芝培养过程中灵芝酸的积累规律, 从 219 个灵芝 P450 基因中确

定了可能参与灵芝酸生物合成的 82 个候选 P450 基因, 随后借助酵母筛选平台, 发现了参与从羊毛甾醇后修饰生物合成灵芝酸的一个关键基因元件 CYP5150L8<sup>[16]</sup>。这不仅打开了解析灵芝酸后修饰途径之门, 也为其合成生物学生产奠定基础<sup>[16]</sup>。相信随着测序技术的不断进步以及各种筛选方法和检测手段的发展, 今后会有越来越多生物合成途径中的关键元件被发现和鉴定, 为通过合成生物学技术智能制造目标产物奠定物质基础。

## 1.2 候选元件的功能验证

通过突变体筛选或者多组学 (基因组、转录组、代谢物组) 比较分析, 可有效缩小候选基因的范围, 提高后续功能验证效率。但由于天然产物的结构多样、酶种类繁多及其功能宽泛性, 尤其是参与次级代谢的 P450 酶<sup>[17]</sup>, 因此, 每个酶的功能鉴定都带有一定的独特性, 这也是天然产物合成途径解析最关键, 也最具挑战性的一步。在天然宿主中, 一般通过基因敲除缺失酶的功能, 然后检测细胞内次生代谢产物含量的变化 (一般而言, 酶的功能缺失会导致上游底物的积累和下游产物的减少), 来确定酶的催化功能。如 Davison 等<sup>[18]</sup>在青霉菌中发现, 合成托酚酮类物质密挤青霉酸 (stipitatic acid) 的基因簇, 并通过基因敲除成功鉴定了其中 tropA (非还

原型聚酮合酶)、tropB (FAD 依赖的单加氧酶)、tropC (非血红素依赖的双加氧酶)、trop (细胞色素 P450 氧化酶) 的功能。

对于遗传操作手段不成熟, 难以实现 (多) 基因编辑的菌株, 将候选基因克隆出来并在异源系统中表达, 以内源产生或外源添加的办法提供底物, 进而通过色谱、质谱、核磁等技术对产物进行分析鉴定, 从而确定酶的催化活性是目前常用手段<sup>[19]</sup>。基于合成生物学平台挖掘鉴定催化元件功能的流程图归纳在图 1 中。常用于候选基因功能验证的异源表达系统包括大肠杆菌和酵母等。如 Koeduka 等<sup>[20]</sup>将来自菖蒲 (*Acorus calamus*) 的一个氧甲基转移酶 AcOMT1 在大肠杆菌中表达, 进而研究 AcOMT1 对白藜芦醇及其多种衍生物的催化特征, 发现白藜芦醇和异丹叶大黄素是其两个最适底物,  $K_m$  值分别是 1.8  $\mu\text{mol/L}$  和 4.2  $\mu\text{mol/L}$ 。Iijima 等<sup>[21]</sup>基于杜鹃 (*Rhododendron dauricum*) 幼嫩叶子转录组数据的筛选, 发现一个新的 DCA (daurichromenic acid) 合酶, 通过将其在毕赤酵母中表达并且纯化, 证实其催化了具有抗 HIV 活性的杂萜类化合物 DCA 中法尼基组分 (farnesyl moiety) 的环化。由于具有成熟高效的遗传转化体系, 并且在蛋白质的翻译后修饰上更复杂和多样化, 一些模式植物, 如拟南芥、烟草等

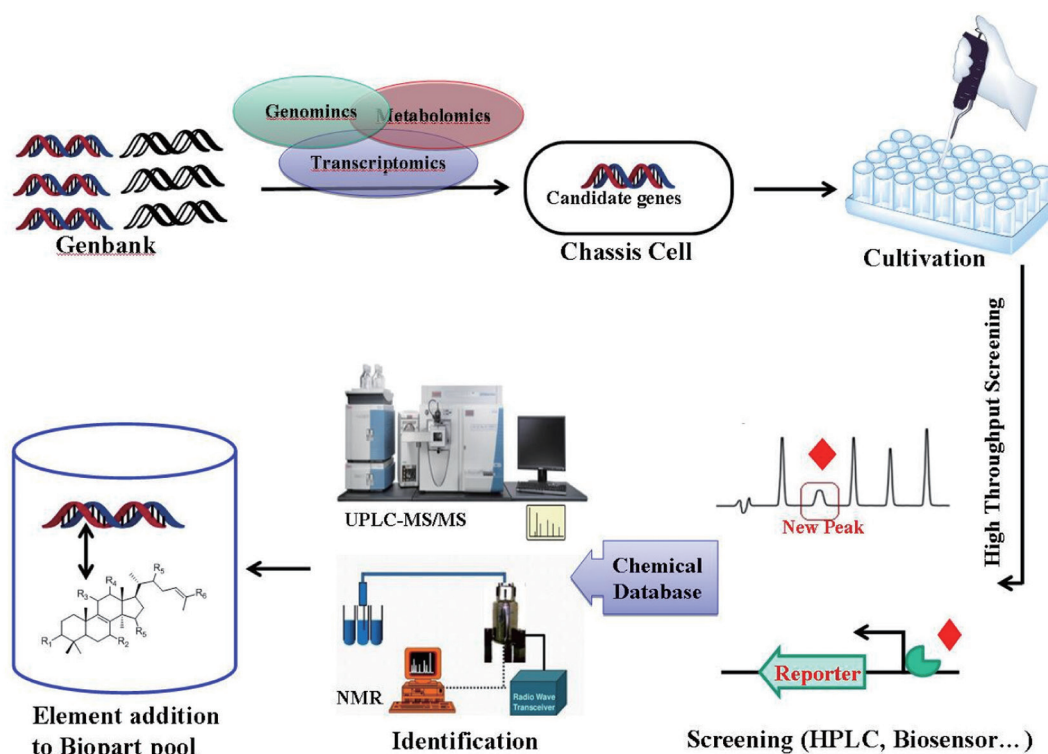


图1 基于合成生物学筛选平台的基因元件挖掘路线图



也常被作为合成生物学底盘,用于异源基因的表达和鉴定<sup>[22-23]</sup>。如上文提到的Lau和Sattely<sup>[14]</sup>即是将盾叶鬼臼筛选到的候选基因在烟草中表达,鉴定其代谢产物变化,从而确定了6个关键基因的催化功能。

### 1.3 合成生物学技术助力元件功能鉴定

候选元件的功能确认需要在底盘细胞体系考察其作用,但多数候选基因来源的物种与底盘细胞在遗传和生理代谢等方面相差甚大,可能导致异源基因表达困难或表达的蛋白质没有催化活性,这样就难以确认候选基因的功能。通过合成生物学技术来工程化改造底盘细胞为解决这些问题提供了基础。

通过改造底盘细胞的转录机器,拓展其启动子识别的广谱性及转录强度<sup>[24-25]</sup>,或者使用高效的诱导表达体系<sup>[26]</sup>,或者利用人工构建的更适合底盘的启动子<sup>[27]</sup>,都是提高外源基因转录水平的有效策略。在翻译水平上,通过增强翻译步骤中关键的蛋白质,提高与mRNA核糖体结合位点结合水平,可以提升外源基因的表达<sup>[28]</sup>。此外,在底盘细胞中表达辅助因子,有助于异源蛋白更好折叠或后修饰,形成有活性的蛋白质<sup>[29]</sup>。将这些转录、翻译过程中重要的基因元件,应用于底盘细胞的改造,不仅有利于构建高效生物制造细胞工厂,也为新元件挖掘提供良好平台。值得注意的是,在通常的实验条件下,人们要引入底盘的基因元件并不是宿主菌生长所必需的,大量表达其编码的蛋白质意味着宿主菌巨大的能量消耗和代谢负担。删除底盘细胞非必需基因,减少其代谢负担,有助于提高底盘细胞活力,提升异源蛋白表达水平<sup>[30]</sup>。底盘细胞基因组的最小化也是相关研究内容,见后述。

利用合成生物学原理和方法,设计生物传感器,准确、快速地鉴定功能元件催化的产物,可使元件的筛选鉴定更加高效智能。生物传感器是将改造的基因(网络)与报告基因(绿色荧光蛋白或荧光素酶等)整合,通过直观的表型观察来筛选阳性克隆的高效筛选鉴定工具<sup>[31]</sup>。如Yeom等<sup>[32]</sup>采用来自粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)的NitR调控蛋白作为传感器,经工程改造提高其检测内酰胺化合物的特异性,并以荧光蛋白为输出信号构建了“己内酰胺-检测酶筛选系统”,针对海洋宏基因组高效筛选,得到一个可以环化 $\omega$ -氨基脂肪酸生成内酰胺的酶。Trabelsi等<sup>[33]</sup>利用FdeR转录因子和红色荧光蛋白构建了响应柚皮素的传感器系统,并通过

质粒拷贝数、RBS区等因素考察了传感器的敏感性,为响应不同化合物调整传感器参数提供了模型参考。

尽管近年有越来越多的重要天然产物合成途径中关键催化元件被发现并鉴定,但进展依然缓慢,一些具有重大商业价值的天然产物,如紫杉醇、长春碱、灵芝酸等的合成途径至今尚未被完全解析。随着高通量测序技术的进步,廉价快速获得基因组信息成为可能。一些重要的药用生物,如灵芝<sup>[15,34]</sup>、丹参<sup>[35]</sup>和长春花<sup>[36]</sup>等的基因组相继绘制完成,结合转录组、代谢组等组学技术,必将极大地促进各种天然产物合成途径解析,为天然产物的合成生物学提供丰富的元件,推动高附加值产品生物制造产业的快速发展。

## 2 底盘细胞的优化为智能生物制造奠定根基

### 2.1 底盘细胞的重要性

因为生物元件需要在底盘细胞中发挥功能,所以合适的底盘细胞对于人工构建的生命系统的功能发挥至关重要。天然产物传统的生物制造方法主要是通过微生物大规模发酵或植物栽培进而分离提取。然而,天然菌株一般生长慢、不易培养和产量低;至今仅有1%的可培养微生物,而绝大多数的生物资源并未获开发利用<sup>[37]</sup>;虽然已测序的物种的基因组中富含大量可能的次级代谢基因簇,但很多基因(簇)在原始菌株中是沉默的<sup>[38]</sup>,暗示自然界存在着巨大的生物合成基因宝藏尚待开发。与原始产生菌相比,底盘细胞具有遗传背景清晰、遗传操作简便、生长快、易大规模培养等优势(表1)。将难以培养的菌株的感兴趣的基因或沉默基因导入底盘细胞,不仅可克服上述在天然宿主中存在的问题,也易于通过合成生物学手段来实现天然产物的发现和高效制造。其次,针对底盘细胞已有丰富的代谢工程手段提高目标产物产量并可以通过组合不同来源的催化元件使其合成结构新颖的非天然产物。另外,底盘细胞的研究日趋深入和广泛,有利于为不同研究者提供综合性的工程化交流平台,资源共享和技术整合。

底盘细胞的选择一般依据目标产物的来源及其代谢的类型,综合考虑元件与底盘细胞的适配性、前体的供应、代谢产物的耐受性、底盘细胞的可操作性以及安全性等多种因素。至今,尚缺乏一个通用的底盘供所有类型的初级或次级代谢产物合成途径的高效表达。在生物制造领域,底盘细胞起始主

要以微生物为主, 应用相对较广泛的有大肠杆菌、酿酒酵母、链霉菌、恶臭假单胞菌、枯草芽孢杆菌等<sup>[39-42]</sup>。几乎各大类天然产物, 如聚酮类、非核糖体肽类、萜类化合物和苯丙烷类、杂萜化合物等化合物都有报道可通过异源底盘来合成<sup>[43-45]</sup>。此外, 使用真菌作为底盘也得到较广泛应用<sup>[46]</sup>, 而且针对植物和哺乳动物细胞的合成生物学改造也受到越来越多的关注<sup>[47-48]</sup>。合理选择和利用这些底盘细胞是人工重构高效表达途径, 实现智能生物制造的关键。

### 2.2 底盘细胞的优化

尽管底盘细胞具有众多优势, 但依然存在一些问题。具体表现在其基因组水平上有很多非必需基因的表达, 竞争性地占用了底物、能量、前体等资源; 细胞本底的一些次级代谢产物会干扰目标产物的纯化及检测; 底盘细胞可能难耐受新构建的生物合成途径的中间体或产物所造成的抑制作用。而改造底盘细胞, 使优化的底盘细胞增加重构途径中的底物供应, 减少细胞内源的消耗, 解除引入产物对细胞

的反馈抑制或毒性作用, 使底盘具有更好的操作性、鲁棒性, 这些策略都是实现高效生物制造的关键(图2)。可以说, 底盘细胞的特性是左右生物制造潜力的一个决定性因素。

底盘细胞的构建通常有两种策略, 即“自上而下”和“自下而上”。“自上而下”是指通过删除非必需的基因, 精减基因组并改善细胞特性。将底盘细胞基因组简化, 可以有效降低细胞本底不必要的路径对底物、能量、还原力的消耗, 使细胞代谢途径得以优化, 更好地耐受引入的各种基因元件和代谢产物的代谢负担, 大幅提高细胞生理性能的可预测性和可控性<sup>[49]</sup>。采用 CRISPR-Cas9 技术、多元自动化基因组工程、位点特异的同源重组等基因组编辑技术, 可实现同时对基因组多个位点的编辑, 改造底盘细胞<sup>[50]</sup>。Umenhoffer 等<sup>[51]</sup>应用快速编辑宿主基因组的 CRISPR/Cas 辅助多重自动化基因组工程 (MAGE), 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中敲除噬菌体序列、插入序列等可能造成基因组不稳定

表1 用于生物制造的底盘细胞体系与天然宿主和无细胞体系的比较

	底盘细胞	天然宿主	无细胞体系
细胞生长	快	较慢	-
遗传操作	简单	较复杂	-
合成途径	外源导入或人工改进	天然	多酶复合体系, 适用于反应途径较简单的体系
活性物质合成能力	高、易改造	较低	高
分离纯化	较易	较难	易
用于营养保健领域	不宜	合适	-

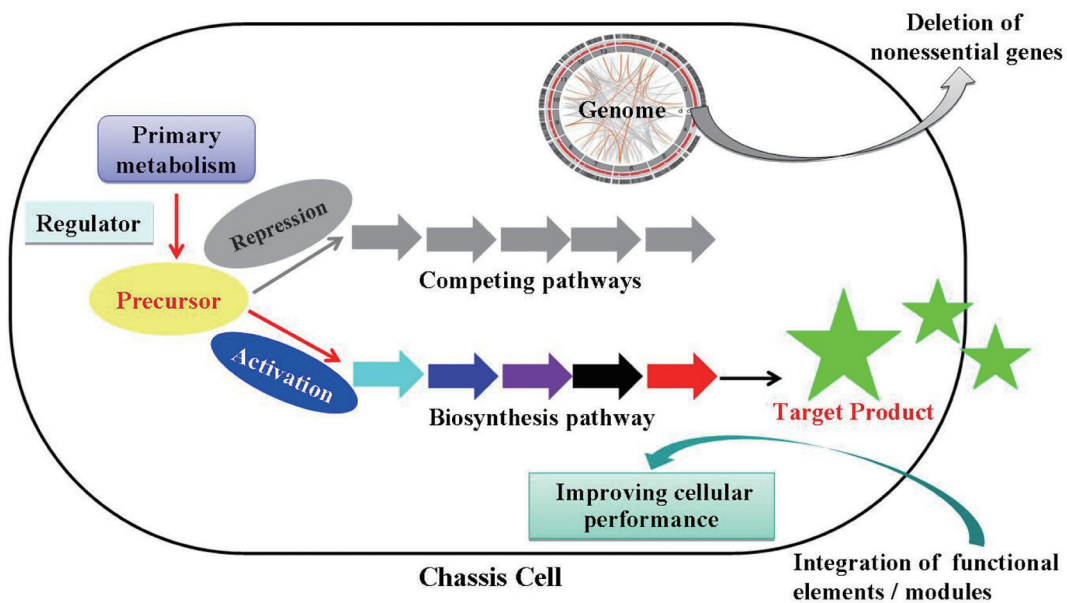


图2 底盘细胞的优化改造

的元件以及一些非必需序列,显著提高了细胞及基因组的稳定性,使其更适于异源酶或完整途径的高保真表达。不过,该方法局限于出发菌株的特性,而且基因敲除和确定其是否必需,这个过程不仅耗时,而且具一定盲目性。

“自下而上”是指从头开始构建人工底盘。快速和低成本 DNA 合成和组装技术的发展为从头完整重建全基因组提供了技术保障。如酵母基因组中几条染色体已通过人工方式设计合成,并且在合成的酵母染色体中引入了 SCRaMbLE 系统 (Synthetic Chromosome Recombination and Modification by LoxP-Mediated Evolution),即通过在染色体非必需基因位点处插入 LoxPsym 位点(类似 LoxP 位点),在 Cre 酶介导下重组。通过诱导 SCRaMbLE 系统,可以在短时间内制造大量的在染色体水平上大范围重组的突变体库<sup>[52]</sup>。因染色体重排会对基因表达造成一定影响,借此优化底盘细胞,使细胞对某一种性状更适应。将盘尼西林生物合成途径放入酵母中,通过 SCRaMbLE 系统对合成染色体进行基因重排,最终使盘尼西林产量提高了 2 倍;通过 SCRaMbLE 系统来改进酵母菌,还可提高其木糖的利用率<sup>[53]</sup>。这显示出通过合成生物学手段人工合成染色体所构建的底盘细胞具有很大潜能,可望在短时间内获得所需性能的优化底盘<sup>[54]</sup>。

随着合成生物学的发展,将来可能会开发出种类更多的、更佳的底盘,针对不同目标产物,它们具有独特优势。另外,不同物种的细胞常常具有不同的生理特征,根据合成生物学工程化的思想,人们或许可以将不同细胞的不同优点整合到同一个底盘细胞中,从而创造出更具普适性、鲁棒性的超级底盘。总之,底盘细胞至少满足如下优点:易于培养、遗传操作简单高效、本底简洁,并能与不同来源的标准化元件契合,可实现目标产物的稳定高产,有利于工业化推广。

### 3 合成途径的系统设计优化是高效生物制造的重要研发内容

生物元件是实现生物制造的基本物质单元,性能良好的底盘细胞是实现高效生物制造的基本保障,合成线路的“设计-构建-检测-学习”循环 (Design-Build-Test-Learn Cycle, DBTL) 则是合成生物学研发的重要内容。

转化率、生产速率和产量是衡量细胞工厂是否能实现工业应用的 3 个关键指标。通过设计最优的

合成路线、途径优化及细胞系统优化,能够显著提高生物制造产品的转化率、生产速率及产量。在设计目标产物合成途径时,碳代谢流和还原力是两个关键因素。为获得最大的转化率,一般需要改变细胞底物的碳流,使其更多地流向目标化学品的合成,避免副产物的竞争,并使产品合成在热力学上可行,底物代谢所产的还原力供给充足<sup>[55]</sup>。大多数情况下,细胞工厂合成途径中各个酶的催化效率并不协调,有些酶的催化速率慢,成为限速步骤,并且导致中间代谢物积累,对细胞有毒性作用,制约了整个合成途径的高效运转。通过调整各个酶的活性,检测中间代谢物的含量变化,从而确定出最优的组合,实现途径的高效运作<sup>[56-57]</sup>;也可采用能响应关键中间代谢物的元件,构建动态感应调控系统来调控基因的表达。使目标基因在中间体浓度升高时高效表达,降低毒性;在底物浓度偏低时降低转录,节约细胞能量,从而智能地维持代谢途径的平衡,提高产品的合成能力<sup>[58]</sup>。

Keasling 课题组与 Amyris 公司合作,通过“DBTL”的合成生物学经典循环,历时多年终于实现了酵母异源高效生产青蒿酸,是至今合成生物学发展史上的代表性事例<sup>[59]</sup>。但是,为每一个化合物量身订造一个“DBTL”框架仍是高成本、低效率的,如何更有效地通过“DBTL”更快、更系统地提高细胞工厂的效率,是亟待解决的关键科学问题。Scrutton 团队发展了一个自动化、整合的“DBTL”框架,通过统计取样的方法考虑设计参数、途径元件变量,并辅以自动的实验程序,快速地把框架的原型制造出来。他们用该方法来改善大肠杆菌类黄酮 pinocembrin 的生产,考虑了合成途径里 4 个重要的酶,即苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、查尔酮合成酶 (CHS)、查尔酮异构酶 (CHI) 和 4-香豆酸:辅酶 A 连接酶 (4CL),以及每个酶的 4 个重要的参数及变量,总共 2 592 个可能的组态 (configurations)。仅用了两轮 DBTL 循环,他们就把可能的组态的数目大幅缩小至 36 个,然后通过实验验证,最后使 pinocembrin 的产量提高了 500 倍。利用该框架对生物碱 reticuline 和 scoulerine 的生物合成也取得显著效果,证实该框架具有一定的普适性<sup>[60]</sup>。Jeffryes 等<sup>[61]</sup>总结了目前一些可支持对已有途径、根据已知反应新组合途径,甚至利用已存在的酶行使全新的功能从而构建的全新合成途径设计和建模的算法和数据库。这一系列的数据库及算法不仅可以预测合成途径在细胞内代谢模型,也可以识别可能影响



最终产物的副反应, 最终实现对整合代谢途径的优化。值得一提的是, 发展高通量、全局性、精准的分析检测方法也是更好加快整个 DBTL 循环的重要方面; 有关生物制造、医药设计的生物技术领域分析手段的最新进展可参见文献<sup>[62]</sup>。这些日渐成熟的合成生物学技术和方法将会极大推动目标产物在细胞工厂中的高效合成。

#### 4 天然宿主的改造

目前绝大多数重要天然化合物的合成途径仍未解析或仅有部分解析, 它们尚无法通过异源底盘细胞来合成。因此, 针对其天然宿主展开研究, 提高目标化合物的产量是十分必要的, 这也是至今研究的主流。另外, 从原理上说, 对于生物合成途径清晰的目标物质可以通过在底盘细胞中重构途径和 DBTL 循环优化来提高产量, 最终实现异源底盘生产。如赛诺菲公司采用工程酵母生产抗疟疾药物青蒿素, 年产量约 60 吨, 约占市场总量的三分之一。但随着青蒿素药物价格的不断降低且市场总需求量处于平台期, 通过从黄花蒿中提取获得青蒿素比通过酵母发酵生产更具优势<sup>[63]</sup>。对天然宿主黄花蒿的改造可以大幅提高其产量, 如上海交通大学唐克轩课题组研究发现黄花蒿腺毛特异表达的 AaORA 和 AaTCP14 蛋白相互作用, 激活青蒿素合成途径的关键基因双键还原酶和醛脱氢酶, 过表达这两个调控基因可使青蒿素含量提高两倍以上<sup>[64]</sup>。无疑, 针对天然宿主的合成生物学研究也是高效生物制造的重要组成部分。

对于很多结构复杂的天然产物, 其生物合成途径元件多达数十个, 即便能够在底盘细胞中实现途径重构, 但由于催化元件与底盘细胞适配性等一系列问题, 或者代谢产物对底盘细胞的毒副作用等原因, 造成其目标产物含量很低。Smoke 课题组通过在酵母中表达 21 个酶实现了阿片类药物的异源合成, 但其含量仅微克级<sup>[65]</sup>。Janardhan Garikipati 和 Peebles<sup>[66]</sup> 在大肠杆菌中导入来自 *Pseudomonas putida* S12 的 *srpABC* 蛋白, 使大肠杆菌株可以耐受苯酚从而实现其合成, 但是改造后的大肠杆菌的苯酚产量并没有其天然宿主高。与一般的底盘细胞相比, 天然宿主不仅拥有目标产物合成所需的各种底物, 也更适合目标途径各种酶表达及功能的正常发挥, 不存在元件和细胞的适配性问题, 并且在漫长的进化历史中天然宿主逐渐和其代谢产物相互适应, 具备耐受自身代谢产物的机制。针对天然宿主开展合

成生物学研究, 如通过敲除或抑制竞争途径、优化关键催化元件启动子、重塑调控网络、增加天然宿主中合成基因簇的拷贝数等手段, 也可大大提高其目标产物的产量<sup>[67-69]</sup>, 也是可替代底盘细胞体系, 实现高效生物制造的可供选择的途径。

必须指出的是, 对于目标产物不是单一的产品, 而是包括多种生物活性和营养价值的一系列化合物的场合, 有效利用天然宿主将是一个不错的选择(表 1)。比如, 要将用灵芝酸(种类繁多)、灵芝多糖及灵芝其他活性代谢产物用于营养保健产业, 把灵芝细胞这一天然宿主进行细胞工厂的合理改造和优化, 不失为一个具有良好应用前景的研发方向<sup>[70]</sup>。

#### 5 体外合成生物学体系

药物、化学品、材料和能源产品等的生物制造主要通过细胞工厂来实现, 然而体外酶体系催化也在世界范围内获得越来越广泛的关注。特别是当底物或产物对底盘细胞毒副作用很大, 无细胞体系仅通过在反应器中添加酶及相应的辅因子就可将原料快速、高效转化为目标产品, 因而具有显著优势。并且, 由于减去了细胞代谢的复杂的背景, 后续目标产物的分离纯化也更加简便(表 1)。Kim 等<sup>[71]</sup> 构建了包括 15 个超嗜热酶的体外反应途径, 该系统通过分解淀粉激发的电能以极高的效率将水分解制, 造氢气, 这种生物氢制造系统具有高化学能效和反应速率, 有望解决氢气的存储、运输等实际应用的重要问题。中国科学院天津工业生物技术研究所张以恒和游淳团队设计了利用体外多酶系统将纤维素生物质磷酸解, 用于制造生物化学品<sup>[72]</sup>。他们以肌醇为最终产品, 发现通过体外多酶系统催化的纤维素生物转化产率达 98%, 并且该体外系统还可利用含有多种对细胞有毒的物质的玉米秸秆水解液作为底物生产肌醇。这种新的纤维素的酶法磷酸解法为通过体外系统生产其他高附加值化学品提供了新的思路。

#### 6 展望

合成生物学的快速发展不仅可高效制造天然存在的物质, 而且随着越来越多的生物学标准元件的发掘与改造, 人们还可以构建新的途径, 生产非天然物质, 大大拓展了生物制造的应用潜能。在人工设计的过程中借助生物信息学方法进行分析、建模和预测, 可为后续实验提供理论指导和提高实验的效率。对人工构建的细胞工厂通过 DBTL 循环不

断优化, 不仅能获得性能提高, 适用于生物制造的工程细胞, 也能构建工程细胞完整的代谢模型, 促进人们对生命运行本质的理解。合成生物学使人类能够在短时间内快速创制出大量性状各异的细胞, 但是, 要从中高效筛选出符合人类需求的最优化的工程菌株则依赖于高通量筛选方法的创建, 这也是合成生物学驱动的智能生物制造研究中一个亟待解决的科学问题。

随着人类改造生命的技能越来越成熟, 除了一般意义上通过大规模高效生物制造来替代传统的物理、化学等方式获得各类产品之外, 生物制造也可能将在更精细层面上发挥重要作用。比如, 通过在细胞中设计构建可以响应病原刺激的“基因路径”, 当细胞受到病原入侵时, 激发“基因路径”的功能, 合成杀死病原的药物, 通过细胞原位的生物制造, 直接抵御外界刺激。

合成生物学的发展显著拓展了人们对生命的认知及设计改造能力。不仅如此, 人工构建的细胞工厂在各种性能上更加贴合人类的需求, 对实现传统化工制造到生物“智造”的产业转型具有决定性的作用。并且, 随着合成生物学的不断发展, 生物制造的概念已逐渐突破一般化学产品的概念, 而具有了更广泛的内涵, 如可以“制造”具有某些特性的细胞、器官、动物模型等。但是, 人类目前掌握的知识和技能尚远远达不到可以重建一个“完美”生命的目标, 脱离基础规律的认知和伦理职业规范, 去强行使用未成熟的技术去“编辑生命”是不可取的。至今已有研究在关注如何将人工遗传改造的生命体限制于受控的环境中, 如敲除某些改造的细胞生长的关键基因, 使其必须依赖人类可控的因素维持生存。Hirota 等<sup>[73]</sup>利用基于亚磷酸盐营养缺陷型策略, 即便有逃逸到环境中的细胞, 但因缺乏生长必需的磷酸盐而无法存活, 达到了迄今为止基于营养缺陷型防逃逸所报道的最低逃逸概率。另外, 也可以通过密码子正交设计<sup>[74]</sup>或复杂调控网络<sup>[75]</sup>来防止人造生命的不可控逃逸。

随着全球生物经济的快速发展, 合成生物学驱动的智能生物制造受到世界各国的广泛关注。当然, 在其发展过程中, 必须建立科学完善的监管体制, 防止不当利用可能造成的危害。最后, 我们坚信, 基于合成生物学的新兴生物制造技术的变革, 将为解决关乎人类生存、社会经济健康的医药健康、能源和环境等重大问题发挥非常重要的作用。随着各国政府和企业对此领域越来越大的政策支持和资金

投入, 在可预见的未来, 将会涌现一批令人振奋的实际应用成果。

**致谢:**我们感谢邓子新院士、冯雁教授、林双君教授、肖晗副研究员等的支持和有益讨论。由于篇幅受限, 很多国内外同行的优秀成果没能一一引用, 请同行们谅解。

#### [参 考 文 献]

- [1] Li F, Li YX, Cao YX, et al. Modular engineering to increase intracellular NAD(H<sup>+</sup>) promotes rate of extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis*. *Nat Commun*, 2018, 9: 3637
- [2] Wang X, Pu J, An B, et al. Programming cells for dynamic assembly of inorganic nano-objects with spatiotemporal control. *Adv Mater*, 2018, 30: e1705968
- [3] Huang J, Liu S, Zhang C, et al. Programmable and printable *Bacillus subtilis* biofilms as engineered living materials. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 34-41
- [4] Ling C, Qiao GQ, Shuai BW, et al. Engineering NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in *Halomonas bluephagenesis* for enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHA). *Metab Eng*, 2018, 49: 275-86
- [5] Li Y, Li S, Thodey K, et al. Complete biosynthesis of noscapine and halogenated alkaloids in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E3922-31
- [6] Liu X, Cheng J, Zhang G, et al. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. *Nat Commun*, 2018, 9: 448
- [7] Shao J, Xue S, Yu G, et al. Smartphone-controlled optogenetically engineered cells enable semiautomatic glucose homeostasis in diabetic mice. *Sci Transl Med*, 2017, 9: eaal2298
- [8] Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits. *Cell*, 2016, 164: 770-9
- [9] Nissim L, Wu MR, Pery E, et al. Synthetic RNA-based immunomodulatory gene circuits for cancer immunotherapy. *Cell*, 2017, 171: 1138-50.e15
- [10] Guo J, Zhou YJ, Hillwig ML, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12108-13
- [11] Geisler K, Hughes RK, Sainsbury F, et al. Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of antimicrobial triterpenes in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E3360-7
- [12] Shang Y, Ma Y, Zhou Y, et al. Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber. *Science*, 2014, 346: 1084-8
- [13] Zhou Y, Ma Y, Zeng J, et al. Convergence and divergence of bitterness biosynthesis and regulation in *Cucurbitaceae*. *Nat Plants*, 2016, 2: 16183
- [14] Lau W, Sattely ES. Six enzymes from mayapple that com-



- plete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone. *Science*, 2015, 349: 1224-8
- [15] Chen S, Xu J, Liu C, et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat Commun*, 2012, 3: 913
- [16] Wang WF, Xiao H, Zhong J J. Biosynthesis of a ganoderic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by expressing a cytochrome P450 gene from *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115: 1842-54
- [17] Xiao H, Zhang Y, Wang M. Discovery and engineering of cytochrome P450s for terpenoid biosynthesis. *Trends Biotechnol*, 2018, pii: S0167-7799(18)30318-4
- [18] Davison J, al Fahad A, Cai M, et al. Genetic, molecular, and biochemical basis of fungal tropolone biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 7642-7
- [19] Moses T, Pollier J, Shen Q, et al. OSC2 and CY-P716A14v2 catalyze the biosynthesis of triterpenoids for the cuticle of aerial organs of *Artemisia annua*. *Plant Cell*, 2015, 27: 286-301
- [20] Koeduka T, Hatada M, Suzuki H, et al. Molecular cloning and functional characterization of an O-methyltransferase catalyzing 4'-O-methylation of resveratrol in *Acorus calamus*. *J Biosci Bioeng*, 2018, pii: S1389-1723(18)30617-0
- [21] Iijima M, Munakata R, Takahashi H, et al. Identification and characterization of daurichromenic acid synthase active in anti-HIV biosynthesis. *Plant Physiol*, 2017, 174: 2213-30
- [22] Holland CK, Jez JM. *Arabidopsis*: the original plant chassis organism. *Plant Cell Rep*, 2018, 37: 1359-66
- [23] Klein AP, Sattely ES. Biosynthesis of cabbage phytoalexins from indole glucosinolate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 1910-5
- [24] Engstrom MD, Pflieger BF. Transcription control engineering and applications in synthetic biology. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2: 176-91
- [25] Uchiyama T, Miyazaki K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20: 616-22
- [26] Terron-Gonzalez L, Medina C, Limon-Mortes MC, et al. Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Sci Rep*, 2013, 3: 1107
- [27] Rushton PJ. What have we learned about synthetic promoter construction? *Methods Mol Biol*, 2016, 1482: 1-13
- [28] Zelcbuch L, Antonovsky N, Bar-Even A, et al. Spanning high-dimensional expression space using ribosome-binding site combinatorics. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e98
- [29] Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature*, 2003, 426: 884-90
- [30] Posfai G, Plunkett G, Feher T, et al. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*, 2006, 312: 1044-6
- [31] Zhang J, Jensen MK, Keasling JD. Development of biosensors and their application in metabolic engineering. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 28: 1-8
- [32] Yeom SJ, Kim M, Kwon KK, et al. A synthetic microbial biosensor for high-throughput screening of lactam biocatalysts. *Nat Commun*, 2018, 9: 5053
- [33] Trabelsi H, Koch M, Faulon JL. Building a minimal and generalizable model of transcription factor-based biosensors: showcasing flavonoids. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115: 2292-304
- [34] Zhu Y, Xu J, Sun C, et al. Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense*. *Sci Rep*, 2015, 5: 11087
- [35] Xu H, Song J, Luo H, et al. Analysis of the genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Plant*, 2016, 9: 949-52
- [36] Kellner F, Kim J, Clavijo BJ, et al. Genome-guided investigation of plant natural product biosynthesis. *Plant J*, 2015, 82: 680-92
- [37] Berdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)*, 2012, 65: 385-95
- [38] Chiang YM, Chang SL, Oakley BR, et al. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15: 137-43
- [39] Liu R, Deng Z, Liu T. *Streptomyces* species: ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metab Eng*, 2018, 50: 74-84
- [40] Liu Y, Liu L, Li J, et al. Synthetic biology toolbox and chassis development in *Bacillus subtilis*. *Trends Biotechnol*, 2018, pii: S0167-7799(18)30301-9
- [41] Moses T, Mehrshahi P, Smith AG, et al. Synthetic biology approaches for the production of plant metabolites in unicellular organisms. *J Exp Bot*, 2017, 68: 4057-74
- [42] Nickel PI, de Lorenzo V. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: from native biochemistry to trans-metabolism. *Metab Eng*, 2018, 50: 142-55
- [43] Awan AR, Shaw WM, Ellis T. Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 105: 96-106
- [44] Liu X, Ding W, Jiang H. Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 125
- [45] Mattern DJ, Valiante V, Unkles SE, et al. Synthetic biology of fungal natural products. *Front Microbiol*, 2015, 6: 775
- [46] Anyaogu DC, Mortensen UH. Heterologous production of fungal secondary metabolites in *Aspergilli*. *Front Microbiol*, 2015, 6: 77
- [47] Liu W, Stewart CN Jr. Plant synthetic biology. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 309-17
- [48] Matsuura S, Ono H, Kawasaki S, et al. Synthetic RNA-based logic computation in mammalian cells. *Nat Commun*, 2018, 9: 4847
- [49] Kelkar YD, Ochman H. Genome reduction promotes increase in protein functional complexity in bacteria. *Genetics*, 2013, 193: 303-7
- [50] Csorgo B, Nyerges A, Posfai G, et al. System-level

- genome editing in microbes. *Curr Opin Microbiol*, 2016, 33: 113-22
- [51] Umenhoffer K, Draskovits G, Nyerges A, et al. Genome-wide abolishment of mobile genetic elements using genome shuffling and CRISPR/Cas-assisted MAGE allows the efficient stabilization of a bacterial chassis. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 1471-83
- [52] Shen Y, Stracquadanio G, Wang Y, et al. SCRaMBLE generates designed combinatorial stochastic diversity in synthetic chromosomes. *Genome Res*, 2016, 26: 36-49
- [53] Blount BA, Gowers GF, Ho JCH, et al. Rapid host strain improvement by *in vivo* rearrangement of a synthetic yeast chromosome. *Nat Commun*, 2018, 9: 1932
- [54] Szymanski E, Calvert J. Designing with living systems in the synthetic yeast project. *Nat Commun*, 2018, 9: 2950
- [55] McShan DC, Rao S, Shah I. PathMiner: predicting metabolic pathways by heuristic search. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1692-8
- [56] Garcia-Ruiz E, Hamedirad M, Zhao H. Pathway design, engineering, and optimization. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2018, 162: 77-116
- [57] Halper SM, Cetnar DP, Salis HM. An automated pipeline for engineering many-enzyme pathways: computational sequence design, pathway expression-flux mapping, and scalable pathway optimization. *Methods Mol Biol*, 2018, 1671: 39-61
- [58] Zhang F, Carothers JM, Keasling JD. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 354-9
- [59] Paddon CJ, Keasling JD. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 355-67
- [60] Carbonell P, Jarvis AJ, Robinson CJ, et al. An automated design-build-test-learn pipeline for enhanced microbial production of fine chemicals. *Commun Biol*, 2018, 1: 66
- [61] Jeffryes JG, Seaver SMD, Faria JP, et al. A pathway for every product? Tools to discover and design plant metabolism. *Plant Sci*, 2018, 273: 61-70
- [62] Shimizu H, Matsuda F. Editorial overview: recent progress in analytical technologies for design-build-test-learn cycle in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 54: 145-7
- [63] Peplow M. Synthetic biology's first malaria drug meets market resistance. *Nature*, 2016, 530: 389-90
- [64] Ma YN, Xu DB, Li L, et al. Jasmonate promotes artemisinin biosynthesis by activating the TCP14-ORA complex in *Artemisia annua*. *Sci Adv*, 2018, 4: eaas9357
- [65] Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 2015, 349: 1095-100
- [66] Janardhan Garikipati SV, Peebles TL. Solvent resistance pumps of *Pseudomonas putida* S12: applications in 1-naphthol production and biocatalyst engineering. *J Biotechnol*, 2015, 210: 91-9
- [67] Nielsen J, Keasling JD. Engineering cellular metabolism. *Cell*, 2016, 164: 1185-97
- [68] O'Connor SE. Engineering of secondary metabolism. *Annu Rev Genet*, 2015, 49: 71-94
- [69] Li L, Wei K, Liu X, et al. aMSGE: advanced multiplex site-specific genome engineering with orthogonal modular recombinases in actinomycetes. *Metab Eng*, 2018, 52: 153-67
- [70] Xiao H, Zhong JJ. Production of useful terpenoids by higher-fungus cell factory and synthetic biology approaches. *Trends Biotechnol*, 2016, 34: 242-55
- [71] Kim EJ, Kim JE, Zhang YH. Ultra-rapid rates of water splitting for biohydrogen gas production through *in vitro* artificial enzymatic pathways. *Energy Environ Sci*, 2018, 11: 2064-72
- [72] Meng D, Wei X, Zhang YPJ, et al. Stoichiometric conversion of cellulosic biomass by *in vitro* synthetic enzymatic biosystems for biomanufacturing. *ACS Catalysis*, 2018, 8: 9550-9
- [73] Hirota R, Abe K, Katsuura ZI, et al. A novel biocontainment strategy makes bacterial growth and survival dependent on phosphite. *Sci Rep*, 2017, 7: 44748
- [74] Ostrov N, Landon M, Guell M, et al. Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome. *Science*, 2016, 353: 819-22
- [75] Chan CT, Lee JW, Cameron DE, et al. 'Deadman' and 'passcode' microbial kill switches for bacterial containment. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 82-6