



酵母人工合成细胞生产植物源天然产物

王冬, 戴住波*, 张学礼*

中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

摘要: 植物源天然产物在医疗保健领域有着广泛的应用。目前, 生产植物源天然产物的主要方式为从原植物直接提取, 但此法面临诸多问题。基于合成生物学的理念, 创建酵母人工细胞工厂发酵生产植物源天然产物是一种新的资源获取途径。本文将从植物源天然产物在药物和营养领域的应用前景, 发酵法生产青蒿素的研发历程, 部分萜类、生物碱和长链多不饱和脂肪酸的研究进展, 以及该领域相关技术前沿4个方面介绍酵母人工合成细胞生产植物源天然产物的近况。

关键词: 植物源天然产物, 青蒿素, 合成生物学, 人工合成细胞, 酵母

植物源天然产物一般为植物体生物合成的微量次生代谢物, 在生物体内主要发挥信号传导、化感、阻止病菌和昆虫入侵等作用^[1]。与此同时, 由于其在抗氧化^[2]、抗肿瘤^[3]、镇痛^[4]、抗病毒^[5]等方面的生物学活性, 已被广泛的应用于医疗保健和营养等领域。如一线抗癌药物紫杉醇^[6]和长春新碱^[7], 镇痛药吗啡^[8], 抗氧化剂白藜芦醇^[9]、番茄红素、虾青素^[2]等。

从原植物中直接提取是目前生产植物源天然产物的主要方式。如: 在野生或栽培的红豆杉树皮提取紫杉醇(含量约0.02%干重)^[10]; 在栽培的长春花中提取长春新碱(含量约0.0003%干重)^[11]; 稀有人参皂苷Rh2在红参中含量低于0.001%^[12]; 桦

木酸在白桦树中含量为0.025%^[13]。这些方法有较多的缺点, 包括含量很低且差异大, 植物生长周期长, 产品纯化难, 对生物资源尤其是野生植物资源造成严重破坏等。随着市场需求的日益增大, 野生名贵中药人参、三七、灵芝的原植物均已濒危, 目前的资源供给已经难以为继。大部分天然产物结构复杂, 具有较多的手性中心, 利用化学法合成时容易形成无活性甚至有机的、难以分离的旋光异构体, 而且合成过程步骤繁琐, 转化率低, 能耗高, 所用有机溶剂易造成污染, 无法满足工业化需求。植物组织细胞培养的方法操作复杂、生产周期长、生产成本过高, 目前只能用于高附加值产品的生产(如美国 Phyton Biotech

基金项目: 国家“863计划”(2012AA02A704); 国家自然科学基金(81202864); 中国科学院青年创新促进会(2015138)

*通信作者。张学礼, Tel/Fax: +86-22-84861983; E-mail: zhang_xl@tib.cas.cn; 戴住波, Tel/Fax: +86-22-84861946; E-mail: dai_zb@tib.cas.cn

收稿日期: 2015-09-14; 修回日期: 2015-12-04; 网络出版日期: 2015-12-23

公司用红豆杉植物细胞系培养生产紫杉醇^[14]。相比较而言, 利用微生物发酵法生产植物源天然产物具有生产周期短, 不受时节和原料供应的限制, 发酵产物比较单一易于分离纯化等优点, 容易实现大规模工业化生产。

基于合成生物学的原理, 设计和改造微生物菌株来发酵生产植物天然产物的方法能有效控制市场的原料供给, 并保护自然资源及环境, 其作为1条绿色生产链已被科学界及工业界认可^[15]。国际上较为常用的微生物宿主菌为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)。酿酒酵母是第一个被全基因组测序的模式真核生物, 相比于大肠杆菌, 具有独特的优势: (1) 属于一般公认安全的(generally recognized as safe, GRAS)菌株, (2) 含有内质网、线粒体、液泡等细胞器, 为植物源膜蛋白的定位和正确折叠提供了基础, (3) 具有很高的DNA 重组效率, 能一次性引入几十kb 甚至上百kb 的外源基因^[16-17]。近年来, 随着合成生物学的飞速发展, 酿酒酵母合成植物源天然产物的种类不断增多, 产量也在逐年攀升^[15,18-19]。在本文中, 我们将从植物源天然产物在药物和营养领域的市场前景, 发酵法结合化学半合成法生产青蒿素的研发历程, 部分萜类、生物碱和长链多不饱和脂肪酸的研发进展以及该领域相关技术前沿四个方面介绍酵母人工合成细胞生产植物源天然产物的近况。

1 植物源天然产物在药物和营养领域应用前景

全球约70亿人口的医疗、保健和美容需求, 为医药健康化学品提供了非常巨大的市场。据社科院医药蓝皮书《中国药品市场报告(2012)》称, 中国的药品市场2012年总规模为9261亿元, 预计到2020年, 中国药品市场的规模将达到2.3万亿元^[20]。植物源天然产物一直作为药物, 保健品

及化妆品的重要来源, 如: 吗啡、麻黄素、长春新碱、紫杉醇和青蒿素等药效显著的药物均属于植物源药物; 以薯蓣皂素、剑麻皂素和番麻皂素等植物皂素为基础生产原料的甾体激素药物品种占世界医药产品总额的10%, 年销售额超过400亿美元^[21]。Newman发布的研究报告中表明, 在2000年至2010年期间, 天然产物占新开发小分子药物的36.5%, 2010年这一比例甚至达到50%。在1980年至2010年之间, 有104种抗细菌小分子药物来源于天然产物, 占批准进入市场药物的75%。天然产物在抗真菌、抗病毒和抗癌药物方面也占有较高比例(分别为10.0%、44.4%和41.5%)。虽然组合化学的方法在药物发展中仍占主流优势, 但天然药物的发展速度已经快于化学药, 有着巨大的拓展空间^[22]。

与此同时, 高品质的天然产物, 如番茄红素、人参皂苷、花青素、玫瑰精油等, 是化妆品或者保健品的主要原料, 其开发和应用为植物提取行业创造了广阔的市场空间。以大豆提取物为例, 《中国大豆异黄酮产业调查及未来5年竞争战略研究报告(2015)》中指出, 2012年全球大豆提取物的市场销售额已经达到68.99亿美元, 2013年大豆提取物已上升为全球畅销排行榜的第1位。专家预测, 到2018年, 全球的大豆提取物有望达到92.14亿美元之巨, 全球保健品市场总销售额将达到2430亿美元。

2 青蒿素研发历史剖析

一线抗疟药物青蒿素(artemisinin), 是由20世纪70年代中国中医科学院中药研究所屠呦呦先生(我国在自然科学领域的第1个诺贝尔奖得主)及其研究团队在我国传统中草药青蒿中发现的一种倍半萜类(C₁₅)化合物。过去的生产方式为从黄花蒿中直接提取, 然而在2013年, JD Keasling 教授在第十八届生物化学与分子工程国际大会(BME

XVIII)上介绍：其团队历时10年，实现了青蒿酸在酵母中发酵生产，产量高达25 g/L，并经简单化学反应合成了抗疟药物青蒿素^[15]；经过计算，其在不到100 m³发酵车间年产青蒿素能达到35吨，相当于我国近5万亩耕地的种植产量。该项工作被认为是利用人工合成细胞生产植物源天然产物研究领域的里程碑。

早在21世纪初，该研究组便开始探索植物源萜烯类化合物在微生物中的合成，但受限于种属界限，植物源功能基因无法在微生物宿主细胞中高效表达，且宿主没有足够的前体供给，萜烯类化合物的产量停留在 μg/L水平^[23]。

2003年，他们试图通过代谢工程的手段，改造大肠杆菌中DXP途径以增加萜烯类化合物产量。然而萜烯类化合物的产量并没有大幅度提高，推测可能是内源的DXP途径受到严格调控造成的。于是，他们创造性地将酿酒酵母MVA途径引入到大肠杆菌中，并在此基础上引入紫槐二烯合成酶ADS，工程菌株可生产24 mg/L石竹烯当量的紫槐二烯^[24]。随后，他们对ADS的密码子和发酵条件进行优化，所得工程菌株的紫槐二烯产量达到了0.5 g/L^[25]。2009年，该研究组将酿酒酵母来源的tHMG1替换为金黄色葡萄球菌的HMGR，并提出了限制性氮源和碳源的补料策略，最终，人工大肠杆菌可发酵生产27.4 g/L的紫槐二烯^[26]。

虽然紫槐二烯在大肠杆菌中的产量已经达到很高水平，但是利用青蒿酸(紫槐二烯的氧化物)化学合成青蒿素的方法较紫槐二烯更为简单、高效。2006年，他们从黄花蒿中克隆出细胞色素P450氧化酶CYP71AV1及相关的还原伴侣AaCPR，经设计和组装集成，置于特定的元件下，整合至已经增加FPP供给、下调分支途径代谢通量、并引入ADS的底盘细胞中，成功地在酿酒酵母中合成了青蒿酸^[27]。

酿酒酵母合成青蒿酸所取得的进展，使该团队对大肠杆菌作为最优的青蒿素生产菌株产生了

怀疑。虽然酿酒酵母中紫槐二烯的产量(150 mg/L)远低于大肠杆菌(27.4 g/L)，但是大肠杆菌不具有细胞器，不适合表达真核生物来源的P450酶，是否能高产青蒿酸也未可知。在后续研究中，虽然大肠杆菌能表达CYP71AV1，合成1 g/L的青蒿酸^[28]，但20 °C的低温发酵条件不利于工业化。于是，他们将工作重心转移到酿酒酵母上。

通过优化批次发酵培养基、弱化分支途径表达的方法，对酿酒酵母工程菌株进行高密度发酵，青蒿酸的产量提高至2.5 g/L^[29]。随后，他们进一步对青蒿酸的下游合成模块、底盘细胞、前体合成模块和发酵过程进行了优化，使得紫槐二烯在酿酒酵母中产量达到40 g/L^[30]。2013年，他们通过优化工程菌株中CYP71AV1与AaCPR的比例，并逐步将黄花蒿中克隆得到的3个与青蒿酸合成相关的酶(CYB5、ALDH1、ADH1)引入到酵母细胞中，首次在微生物中完成了完整青蒿酸合成途径(图1)的构建工作。在此基础上，他们通过采用两相萃取发酵，变更补料方式的手段，使得青蒿酸的产量达到了25 g/L。最后，他们还设计了一套简单而完整的化学转化路线，使青蒿素的半合成方法取得了巨大突破^[15]。目前Amyris和Sanofi-Aventis正式展开合作，利用酵母细胞生产青蒿酸进行青蒿素的半合成生产。这一系列的工作不仅实现了青蒿素的大规模合成，更为萜类化合物乃至天然产物的异源合成提供了新的策略。

3 生物碱、萜类和不饱和脂肪酸的研发进展

3.1 阿片类生物碱

阿片类生物碱是从罂粟中提取出的一类苄基异喹啉类生物碱(Benzylisoquinoline alkaloids, BIAs)，主要包括吗啡、二氢吗啡、可待因等，能缓解疼痛、使人产生欣快感，是临床上常用的镇痛药物^[4,8]。

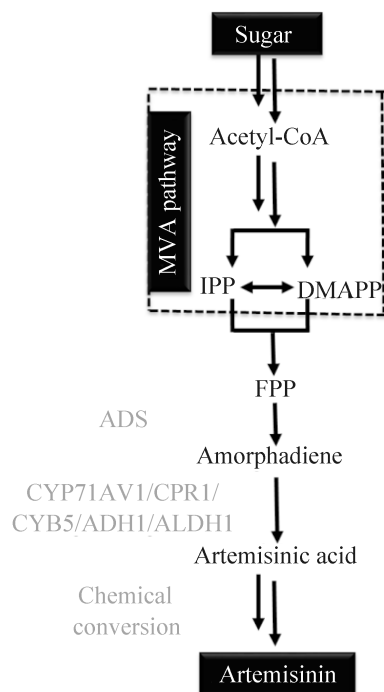


图 1. 半合成法合成青蒿素

Figure 1. Method of semi-synthesis artemisinin. Single arrows represent the one-step conversion, while double arrows represent multiple steps. ADS, amorphadiene synthase; CYP71AV1, cytochrome P450 that converts amorphadiene to artemisinic alcohol; CPR1, cytochrome P450 reductase 1; CYB5, cytochrome b5; ADH1, artemisinic alcohol dehydrogenase; ALDH1, artemisinic aldehyde dehydrogenase.

S-牛心果碱是多种BIAs合成的前体物质(图2)。2008年, Smolke 研究组成功地构建出可生产*S*-牛心果碱酿酒酵母工程菌株。首先, 他们在酿酒酵母中引入3种植物来源的甲基转移酶(6-OMT, CNMT, 4'-OMT), 并在培养基中添加商品化的(*R,S*)-全去甲劳丹碱作为底物, 得到了外消旋混合物(*R,S*)-牛心果碱。接着, 他们通过筛选不同来源的6-OMT、CNMT、4'-OMT, 提高底物(*R,S*)-全去甲劳丹碱的浓度及优化3种同酶的表达量的方法对牛心果碱的合成进行了优化^[31]。

2014年, 该小组又完成了阿片类生物碱最后几步生物合成途径在酿酒酵母的创建及优化工

作。首先, 他们将蒂巴茵至吗啡生物合成途径中的2-氧化戊二酸/ Fe^{2+} 依赖型的T6ODM 和CODM, NADPH 依赖型的醛酮还原酶COR引入酿酒酵母中, 在添加蒂巴茵作为底物的培养基中培养96 h 后, 吗啡的产量仅为0.2 mg/L。然后, 他们通过在培养基中添加辅底物2-氧化戊二酸及可增加2-氧化戊二酸池的谷氨酸钠, 吗啡的产量提高至2.5 mg/L。接着, 他们采用调节各基因拷贝数的策略, 得出T6ODM:COR:CODM为2:1:3时, 吗啡的产量和生成率最高, 分别达到5.2 mg/L和52%。同时, 为增加neopinone 重排成可待因酮的时间以提高吗啡的生成率, 该小组在COR 的C 端加入了一段锚定至内质网的跨膜序列(ER1), 吗啡的产量和生成率分别达到3.1 mg/L和86%。此外, 他们还在宿主菌中引入恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) M10中吗啡脱氢酶(morA)和吗啡酮还原酶(morB), 利用生物法合成了多个有价值的半合成阿片类药物, 其中包括51 mg/L的氢可酮、70 mg/L的氧可酮和1 mg/L的氢化吗啡酮^[32]。

2015年, Martin 等在酵母中共表达罂粟中的沙罗泰里啉合成酶(PsSAS)、沙罗泰里啉还原酶(PsSAR)和salutaridinol乙酰基转移酶(PsSAT)的方法, 构建了*R*-牛心果碱至蒂巴茵的生物合成途径。然后, 他们通过优化培养基pH的方法, 增加了蒂巴茵的供给。最后, 他们还在宿主菌种引入了与吗啡合成相关的酶T6ODM、COR和CODM, 在外源添加*R*-牛心果碱的情况下, 实现了吗啡在酵母体内的生物转化过程^[33]。

同年, Deloache 等根据酶偶联法发明了一种新的传感器。利用此法, 他们鉴定出甜菜来源的CYP716AD1 具有酪氨酸羟化酶活性。通过PCR突变的方法对CYP716AD1 进行定向进化, 产物L-DOPA产量调高了2.8倍; 共表达DOPA 脱羧酶时, 多巴胺产量提高了7.4 倍。最终, 他们在酿酒酵母中组装了一条将酪氨酸合成*S*-牛心果碱的生物合成途径, 并首次在酿酒酵母中完成了葡萄糖到*S*-牛心果碱生物转化的过程^[34]。

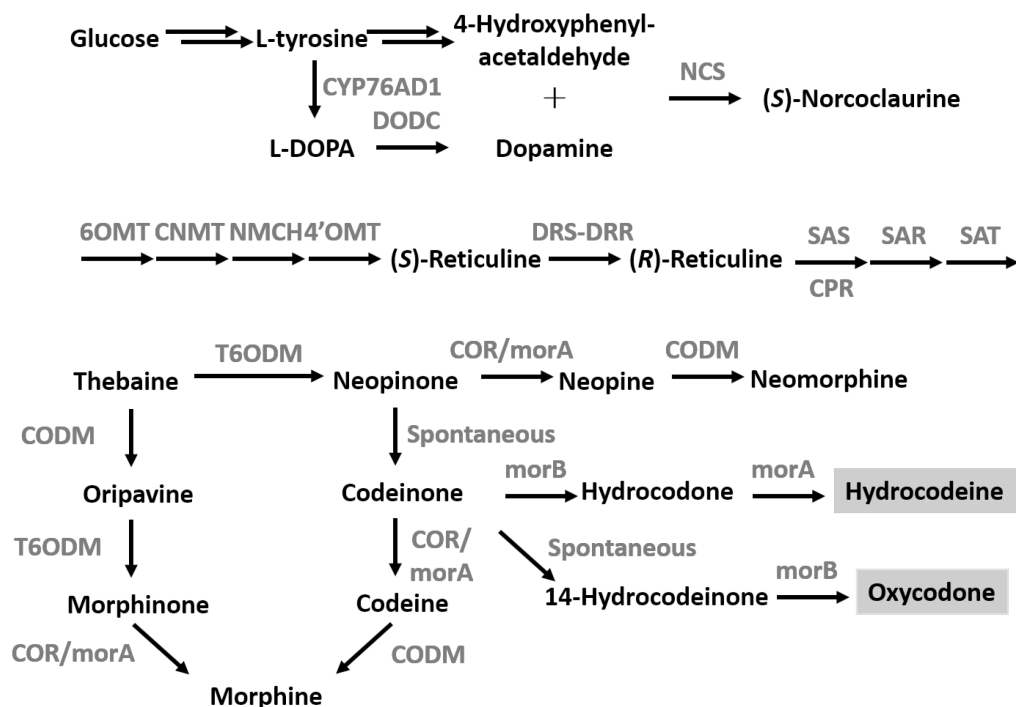


图 2. 阿片类生物碱及半合成阿片类药物的生物合成途径

Figure 2. Biosynthetic pathways of natural and semi-synthetic opioids. Single arrows represent the one-step conversion, while double arrows represent multiple steps. CYP76AD1, tyrosine hydroxylase; DODC, DOPA decarboxylase; NCS, norcoclaurine synthase; 6OMT, 6-O-methyltransferase; CNMT, coclaurine N-methyltransferase; NMCH, N-methylcoclaurine hydroxylase; 4'OMT, 4'-O-methyltransferase; DRS-DRR, which has a cytochrome P450 oxidase 82Y1-like domain and a COR-like domain in a single open reading frame; SAS, salutaridine synthase; CPR, cytochrome P450 reductase; SAR, salutaridinol reductase; SAT, salutaridinol acetyltransferase; T6ODM, thebaine 6-O-demethylase; COR, codeinone reductase; CODM, codeine-O-demethylase; morA, NADP⁺-dependent morphine dehydrogenase; morB, NADH-dependent morphinone reductase.

近期，罂粟中催化*S*-牛心果碱生成*R*-牛心果碱的酶已经被多个研究组解析出来^[35-37]。Smolke研究组结合基因挖掘、酶工程、代谢途径优化及菌株优化等手段，分别将21个和23个动物、植物、细菌、酵母自身来源的基因导入酵母中，成功地构建出可将糖转化为蒂巴茵和氢可酮的人工酵母细胞，实现了一锅法生产阿片类生物碱的突破^[37]。

3.2 萜类化合物

萜类化合物广泛存在于自然界中，目前已发现的萜类化合物已经超过5万种，其中大部分是药用植物中的有效成分^[38]。抗疟一线药物青蒿素、

抗癌药物紫杉醇、具有保健作用的人参皂苷及作为抗氧化剂的类胡萝卜素类化合物均属于萜类。

3.2.1 紫杉醇：紫杉醇是从红豆杉属中分离出的二萜化合物，其能与微管蛋白相互作用从而抑制有丝分裂，是一种重要的抗癌药物^[6]。紫杉二烯是紫杉醇生物合成途径中第一个中间体。2010年，Stephanopoulos研究组在大肠杆菌中引入了紫杉二烯合成酶，并对上游MEP途径及下游萜类合成途径进行精确调控，最终获得了高产紫杉二烯的大肠杆菌，紫杉二烯的产量达1 g/L^[39]。2015年，他们综合大肠杆菌具备高效合成紫杉二烯的能力和酿酒酵母适于表达细胞色素P450，可对紫杉二

烯进一步氧化的性能, 将紫杉二烯合成模块及紫杉二烯氧化模块分别引入到大肠杆菌和酿酒酵母中, 通过共培养的方法初步实现了紫杉烷的生产。为解决葡萄糖做为碳源时, 共培养过程中大肠杆菌生长受酵母合成的高浓度乙醇抑制的问题, 他们基于大肠杆菌可利用酵母不能利用的木糖生产乙酸, 乙酸可以作为唯一碳源用于酵母生长, 乙酸的消耗能增加大肠杆菌生长速率的原理, 提出了木糖发酵的策略。而后, 通过采取加大酵母接种量、适时地添加营养物、替换P450启动子、过表达乙酸合成基因的策略, 紫杉二烯的氧化物产量由2 mg/L (72 h)增加至33 mg/L (120 h)。最后, 他们通过在酵母中引入TAT和10 β CYP及CPR基因, 利用共培养的方法第一次在微生物中合成了单乙酰基二氧化紫杉烷^[40], 加速了微生物法异源合成紫杉醇的进程。

3.2.2 人参皂苷: 人参皂苷是名贵中药人参(*Panax ginseng*)和西洋参(*Panax quinquefolium*)的有效活性成分, 是由原人参二醇、原人参三醇和

齐墩果酸三类苷元在糖基转移酶的催化下形成的系列化合物的总称, 具有抗肿瘤^[41-43]、促免疫、降血糖^[44]等功能。2013年, 本课题组在酿酒酵母中共整合人参来源的达玛二烯合成酶基因(*PgDDS*), 原人参二醇合成酶基因(*CYP716A47*)和拟南芥(*A. thaliana*)来源的*AtCPR1*基因, 构建出能够初步生产原人参二醇的微生物细胞工厂(图3)。然后, 系统调控*tHMG1*、*ERG20*、*ERG9*、*ERG1*等基因的表达以增加前体物质鲨烯和2,3-环氧鲨烯的供给, 同时优化了*PgPPDS*的密码子, 原人参二醇的产量提高了262倍。最终高密度发酵时, 原人参二醇的产量达到1189 mg/L, 单位细胞含量达到8.40 mg/g干重细胞^[45]。在过表达三萜合成相关基因的底盘细胞基础上, 尝试多个目标活性成分同时合成, 利用高通量基因整合技术在酿酒酵母染色体中引入了外源三类苷元的生物合成途径, 成功地构建出能同时高效合成三类人参皂苷苷元的第一代“人参酵母”细胞工厂^[46]。

2014年, Zhou等利用NCBI公布的表达序列

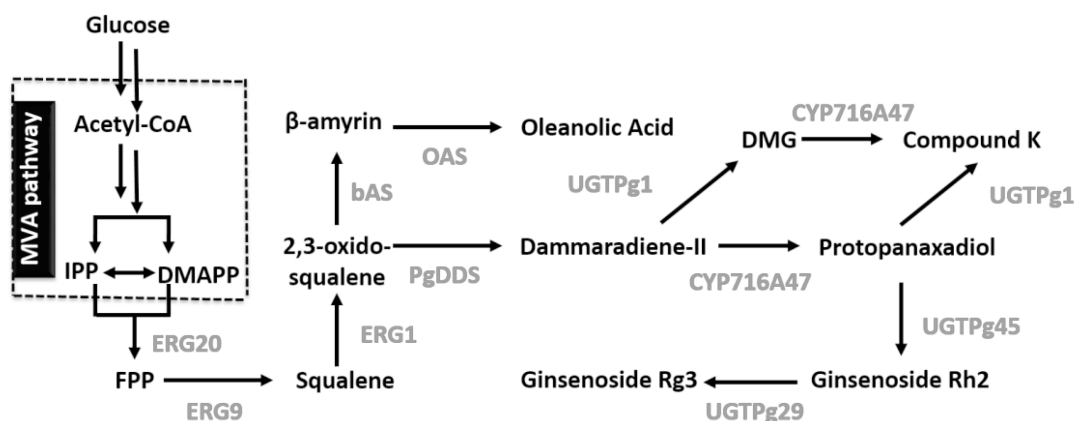


图3. 酿酒酵母细胞合成齐墩果酸、原人参二醇、CK、Rh2和Rg3

Figure 3. Synthesis of oleanolic acid, protopanaxadiol, compound K, Rh2 and Rg3 by engineered yeast. Single arrows represent the one-step conversion, while double arrows represent multiple steps. ERG20, farnesy diphosphate (FPP) synthase; ERG9, squalene synthase; ERG1, squalene cyclase; bAS, beta-amyrin synthase; OAS, oleanolic acid synthase; PgDDS, dammaradiene-II synthase from *Panax ginseng*; CYP716A47, cytochrome P450 that converts dammaradiene-II and 20S-O- β -(D-glucosyl)-dammarenediol-II (DMG) to protopanaxadiol and compound K, respectively; UGTPg1, UDP-glucose transferase 1 from *Panax ginseng*; UGTPg45, UDP-glucose transferase 45 from *Panax ginseng*; UGTPg29, UDP-glucose transferase 29 from *Panax ginseng*.

标签(expressed sequence tags, ESTs) 数据和cDNA 数据库, 先后克隆出合成人参皂苷CK、Rh2和Rg3活性的糖基转移酶UGTPg1^[47]、UGTPg45和UGTPg29^[12], 实现了CK、Rh2和Rg3在酿酒酵母细胞中的生产。

3.2.3 类胡萝卜素: 类胡萝卜素为四萜化合物, 主要包括: 番茄红素(lycopene)、 β -胡萝卜素(β -carotene)、玉米黄素(zeaxanthin)、角黄素(cathaxanthin)和虾青素(astaxanthin)等, 具有较强的抗氧化性^[2]。Li等通过对红发夫酵母来源的*CrtYB*和*CrtI*进行密码子优化, 并使用金黄色葡萄球菌来源的HMGR, β -胡萝卜素的产量提高了2倍^[48]; Reyes等对 β -胡萝卜素生产菌株进行适应性进化, β -胡萝卜素的产量由6 mg/g 提升至18 mg/g^[49]; Xie等利用定向进化策略对红发夫酵母来源的类胡萝卜素合成基因进行定向进化, 而后结合代谢工程的手段, 番茄红素的产量达到了24.41 mg/g^[50]。

3.3 ω -3长链不饱和脂肪酸

α -亚麻酸(ALA, C18:3)、二十碳五烯酸(EPA, C20:5)和二十二碳六烯酸(DHA, C22:6)等 ω -3长链多不饱和脂肪酸(PUFAs)被广泛应用于医药保健及化妆品行业^[10,51]。深海鱼油是EPA和DHA的主要来源, 也有利用微藻(如寇氏隐甲藻、裂壶藻)生产DHA的方法^[52-53]。近来, 改造酵母生产这类化合物也取得了进展。

(1) Taveres等在酿酒酵母中引入5个脂肪酸去饱和酶和延长酶, 并对不同来源的 $\Delta 5$ 去饱和酶进行了筛选, EPA的产量不到总脂的1%^[54]。另一方面, 在脂肪酸含量可占40%细胞干重的耶罗维亚酵母中, 引入21个编码5种不同酶的外源基因, 工程菌株可生产占15%细胞干重的EPA^[55]。

(2) Heinz等通过检索5个物种的EST数据库和基因组数据库, 克隆得到了一些可用于DHA合成的去饱和酶和延长酶。在酿酒酵母中共表达相关酶, 发酵4 d后发现, 可检测到占总脂0.5%的DHA的生成^[56]。Li等利用LA-PCR的方法, 分别从球

等鞭金藻和巴夫藻中成功克隆出 $\Delta 4$ 脂肪酸脱氢酶IgFAD4-2^[57]和 $\Delta 5$ 脂肪酸延长酶PvElo5^[58], 并在酿酒酵母中完成了功能验证。然后, 他们利用IgFAD4-2和PvElo5, 在酿酒酵母中重构了 $\Delta 8$ 途径和 $\Delta 6$ 途径。通过Real-time PCR和DHA的含量分析发现, $\Delta 8$ 途径比 $\Delta 6$ 途径更为有效。最后, 他们还利用响应面法对底物添加量、诱导时间和诱导温度进行深入研究, DHA产量可达20.56 mg/(L·d)^[59]。

4 领域发展的技术前沿

4.1 生物合成途径的解析

基于基因测序技术和生物信息学的发展, 近年来在吗啡^[33,37]、葫芦素^[60]、丹参酮^[19,61]、罗汉果苷^[62]、稀有人参皂苷^[12,50]、依托泊苷^[63]等重要植物源天然产物生物合成途径的解析接连取得突破。目前, 功能基因组分析结合细胞工厂构建的方法依然被广泛用于天然产物的合成途径解析。如, 加拿大的PhytoMetaSyn项目^[64-65]及美国的药用植物基因组资源(MPGR)项目^[66-67], 意图结合基因组测序、目标代谢物组学、生物信息学和即插即用的功能基因组学等方法, 在酵母中快速鉴定出与目标途径相关的功能基因。利用此法, Guo等在丹参的地下茎及毛状根中初步确定了6个与丹参酮合成途径中二萜合成酶共调控的CYP候选基因, 而后通过底盘细胞的筛选验证, 成功地鉴定出可将次丹参酮二烯催化成铁锈醇的细胞色素P450氧化酶CYP76AH1^[61]。Sattely等通过转录组分析, 并将候选基因插入烟草细胞中获得盾叶鬼臼中抗癌药物依托泊苷元生物合成途径中的6个功能基因^[63]。

4.2 合成途径的组装

将各功能基因置于标准化的结构生物元件和调节元件下, 构成独立的功能模块, 再将各模块在酿酒酵母中进行有效地组装, 是酿酒酵母细胞

工厂构建中最为基础和关键的步骤。组装的更简便、更快速和高容量化是该技术的发展方向,目前已有一系列技术被开发应用,如BioBrick^[68]、SLIC^[69]、Gibson^[16]、CPEC^[70]、Golden Gate^[71]和DNA assembler^[17]等,这些技术可以在短时间内完成多个功能元件在体内或体外的一次性组装,不仅高效而且遗传更稳定。

4.3 合成途径的优化

异源合成途径在酿酒酵母中创建完成后,通常效率都很低,远达不到工业化生产要求,因此需要对合成途径进一步优化,以提高其效率。近年来,科研工作者们在以下方面取得了进展:

(1) 酶的改造:对于晶体结构未得到解析的酶,采用易错PCR方法对酶进行随机突变,而后再用DNA shuffling、多轮易错PCR、定点突变等方法对正突变残基进行进一步富集,酶的活性、热稳定性、对底物的亲和力和偏爱性会得到很大改善。如,Liao等通过两轮随机突变的方法,对球红细菌合成酶进行定向进化使之能催化合成番茄红素,而后通过定点突变的方法,工程菌株番茄红素的产量进一步提高了90%^[72]。再如,Yu等通过对红发夫酵母来源的CRTYB进行随机突变,失活了双功能酶CRTYB 番茄红素环化酶的活性,工程菌株番茄红素的产量也大为增加^[18]。

对于晶体结构、催化机理较为清晰的酶,也可采用半理性设计和理性设计的方法。如,Nidetzky等基于纤维假丝酵母(*Candida tenuis*)木糖还原酶(XR)的结构,对Lys²⁷⁴和Asn²⁷⁶进行了定点突变,XR对辅因子NADPH的偏爱性提高了170倍^[73]。

融合蛋白和搭建蛋白质手脚架的方法,可使代谢途径中各个酶形成可控的复合体提高底物的有效浓度,抑制有毒中间体的积累,从而达到提高底物转化率的效果。如,对酿酒酵母内源的FPP合成酶及GGPP合成酶进行融合,可显著提高酿酒酵母GGPP的合成能力^[19];通过搭建蛋白质手脚架的方法,优化甲羟戊酸的3个合成酶atoB

(大肠杆菌来源)、HMGS、HMGR的化学计量系数来提高产物生成量的同时降低细胞负担,最终在低的酶表达水平下甲羟戊酸的浓度提高了77倍^[74]。

(2) 合成途径的精确调控:通过建立启动子文库,精确控制基因的表达量,使合成途径中各基因协调表达,减少中间代谢产物积累,降低细胞负荷,最终提高工程菌株的发酵生产性能。Li等利用不同强度的启动子对利用乙酰辅酶A的脂肪酸合成途径和异源的桦木酸合成途径进行协同表达,发现工程菌株桦木酸的产量在0.01~1.92 mg/(L·OD)内变化^[75]。

(3) 代谢流控制:Keasling等在青蒿酸工程菌构建过程中,通过过表达生物合成途径上游基因、增加前体供给和抑制分支途径基因的表达来减少底物竞争的方案,显著提高了工程菌株发酵生产青蒿酸的能力^[29]。

(4) 建立动态网络模型指导途径优化:Xie等为减小酵母中异源萜烯类合成途径带来的代谢压力和FPP供给问题,筛选出在Glu⁺/Glu⁻两种情况下表达强度不同的启动子来控制基因表达顺序,最终在发酵过程中不添加任何诱导物的情况下,完成了第一阶段生长细胞,第二阶段生产胡萝卜素的发酵过程^[76]。

(5) 亚细胞区域的充分利用:Farhi等成功利用导肽的定位作用将FPP合酶和瓦伦烯合酶导入酵母细胞器线粒体中,促进瓦伦烯合成^[77];Smolke等为增加neopinone重排成可待因酮的时间以提高吗啡的生成率,在COR的C端加入了一段锚定至内质网的跨膜序列(ER1),吗啡的生成率由52%提升至86%^[32]。

4.4 生物传感器

微生物合成途径优化中极为重要的一环是对途径中各代谢物进行定量和监测。生物传感器(biosensor)依靠对某些代谢物敏感的特性,将代谢物转化为多种输出信号,可使菌株产生表型变

化。基于此特性,生物传感器可以应用于筛选高产菌株和构建动态代谢物调节途径增加目标化合物的产量。如,利用丙酰辅酶A的生物传感器,可在监测到胞内丙酰辅酶A积累的情况下,下调表达具有细胞毒性的乙酰辅酶A羧化酶的表达^[78-79];利用RNA微矩阵方法鉴定出的FPP生物传感器可用于平衡代谢流,增加紫槐二烯的产量^[80];基于二聚体依赖型的荧光蛋白研发出的荧光蛋白交换(FPX)生物传感器可以测定蛋白酶活性、第二信使信号强弱及胞内钙离子浓度^[81]。

4.5 基因组编辑技术

微生物的复杂性状往往是由多个基因共同决定的。基因组编辑技术(genome editing)通过人工设计的序列对靶DNA进行特异的识别,而后利用核酸内切酶对识别位点进行特异的切割产生双链断裂(double-strand break, DSB),最终通过非同源末端连接(NHEJ)或同源重组修复(HDR)对DSB进行修复,可实现基因组的有效设计和高效改造,如在基因组上多重位点进行同步改写、高效的删除、替换或插入,可构建大规模、可协同、多位点的调控平台,实现多个代谢途径的组合优化和外源代谢途径大片段基因组整合,具有极其广泛的应用前景和研究价值。目前,国际上较为成熟的基因组编辑技术主要包括:锌指核酸酶(ZFNs)^[82]、转录激活样效应因子核酸酶(TALENs)^[83]和成簇规律间隔短回文重复技术(CRISPR/Cas9)^[84-85]。近年来,基因组编辑技术已经有一些成功案例,如:Li等应用水稻黄单胞菌TALE蛋白的4种碱基识别单元,经模块化组装,构建了10个不同的TALENs,可对酵母基因组上3个基因的5个不同位点进行编辑^[86];Zhang等基于TALENs特异性识别修饰真核启动子关键区域,引起不同基因的差异表达,形成多性状菌体库,通过结合高效的荧光蛋白筛选策略,实现基因组有益修饰位点的不断积累,加速了酵母遗传性状的进化改造^[87];Jakounas等利

用CRISPR/Cas9系统,通过设计gRNA对竞争途径中相关基因进行敲除和弱化的方法,一次性对5个位点进行了修饰,甲羟戊酸的产量提高了41倍^[88];Ronda等利用CRISPR/Cas9系统,在不使用筛选标记的同时一次性将 β -胡萝卜素合成途径中3个基因分别插入到不同位点,整合效率达到84%^[89];Konermann等通过对Cas9复合物的结构进行改造和对sgRNA进行有效设计,可以在基因组水平对多个基因进行同时激活^[90]。

5 总结和展望

近年来,基于合成生物学原理设计人工合成细胞工厂发酵生产植物源天然产物的研究,已经取得了一系列坚定领域发展信心的成绩,如青蒿素、番茄红素、人参皂苷及吗啡等细胞工厂的成功创建。相比传统生产方式,这种新的资源获取策略在资源可持续性利用和经济效应等方面均具有很显著的优势,可以认为是传统模式的一种革新。据统计,仅我国就有上万种含有生物活性成分的药用植物,然而从目前的发展来看,这类产物的生物合成途径的规模化解析,生物途径高通量组装和优化,人造系统的调试等多种技术还处于初级发展阶段。因此可以预见,随着植物基因组的测序技术成熟,高通量化学合成基因技术的完善,以全局代谢网络为基础的代谢途径优化理念和操作的进一步突破,最终人们将真正迎来植物源天然产物人工合成的新时代。

参考文献

- [1] Marienhagen J, Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *Journal of Biotechnology*, 2013, 163(2): 166-178.
- [2] Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as antioxidants — a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1997, 41(3): 189-200.
- [3] Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Current*

- Medicinal Chemistry*, 2001, 8(12): 1467–1486.
- [4] Seya M-J, Gelders SFAM, Achara OU, Milani B, Scholten WK. A first comparison between the consumption of and the need for opioid analgesics at country, regional, and global levels. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*, 2011, 25(1): 6–18.
- [5] Qian KD, Kuo RY, Chen CH, Huang L, Morris-Natschke SL, Lee KH. Anti-AIDS agents 81. Design, synthesis and structure-activity relationship study of betulinic acid and moronic acid derivatives as potent HIV maturation inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53(8): 3133–3141.
- [6] Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to polymerized tubulin *in vitro*. *Journal of Cell Biology*, 1981, 91(2): 479–487.
- [7] Jiang L. Anti-cancer analgetic preparation has lappaconitine and vincristine as main active anticancer components for resisting liver cancer, lung cancer, cancer of uterus and breast cancer and stopping the pain. China: CN1682733-A; CN1316972-C. 2005
- [8] Leonard E, Runguphan W, O'Connor S, Prather KJ. Opportunities in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(5): 292–300.
- [9] Becker JW, Armstrong GO, Van der Merwe MJ, Lambrechts MG, Vivier MA, Pretorius IS. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Research*, 2003, 4(1): 79–85.
- [10] Ye VM, Bhatia SK. Metabolic engineering for the production of clinically important molecules: Omega-3 fatty acids, artemisinin and taxol. *Biotechnology Journal*, 2012, 7(1): 20–33.
- [11] Kuboyama T, Yokoshima S, Tokuyama H, Fukuyama T. Stereocontrolled total synthesis of (+)-vincristine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(33): 11966–11970.
- [12] Wang PP, Wei YJ, Fan Y, Liu QF, Wei W, Yang CS, Zhang L, Zhao GP, Yue JM, Yan X, Zhou ZH. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 97–105.
- [13] Gaudet D, Pichette A. Process for preparing natural product derivatives from plants in a single step, particularly for preparing derivatives of betulin or lupeol from birch bark. WO200026174-A; US6280778-A; WO200026174-A2; CA2250481-A1; CA2288361-A1; AU200010217-A; US6280778-B1; CA2288361-C. 1999.
- [14] Exposito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili MH, Cusido RM, Palazon J. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2009, 9(1): 109–121.
- [15] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, Leavell MD, Tai A, Main A, Eng D, Polichuk DR, Teoh KH, Reed DW, Treynor T, Lenihan J, Fleck M, Bajad S, Dang G, Dengrove D, Diola D, Dorin G, Ellens KW, Fickes S, Galazzo J, Gaucher SP, Geistlinger T, Henry R, Hepp M, Horning T, Iqbal T, Jiang H, Kizer L, Lieu B, Melis D, Moss N, Regentin R, Secrest S, Tsuruta H, Vazquez R, Westblade LF, Xu L, Yu M, Zhang Y, Zhao L, Lievens J, Covello PS, Keasling JD, Reiling KK, Renninger NS, Newman JD. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496(7446): 528–531.
- [16] Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, Zaveri J, Algire MA, Moodie M, Montague MG, Venter JC, Smith HO, Hutchison CA. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(51): 20404–20409.
- [17] Shao ZY, Zhao H, Zhao HM. DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(2): 10.
- [18] Xie WP, Lv XM, Ye LD, Zhou PP, Yu HW. Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 69–78.
- [19] Dai ZB, Liu Y, Huang LQ, Zhang XL. Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(11): 2845–2853.
- [20] 程锦锥, 朱恒鹏. 中国药品市场报告. 2012版. 北京: 社会科学文献出版社, 2012.
- [21] Liu D, Zhang Y, Zhou X, Yuan YJ. Research prospects of synthetic biotechnology in steroid hormone intermediate production. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013(10): 958–965. (in Chinese)
刘夺, 张莹, 周晓, 元英进. 合成生物技术生产甾体激素中间体的研究展望. *生命科学*, 2013(10): 958–965.
- [22] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(3): 311–335.
- [23] Martin VJJ, Yoshikuni Y, Keasling JD. The *in vivo* synthesis of

- plant sesquiterpenes by *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 75(5): 497–503.
- [24] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(7): 796–802.
- [25] Newman JD, Marshall J, Chang M, Nowroozi F, Paradise E, Pitera D, Newman KL, Keasling JD. High-level production of amorpha-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95(4): 684–691.
- [26] Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, Lenihan JR, Horning T, Anthony LC, Regentin R, Keasling JD, Renninger NS, Newman JD. High-level production of amorpha-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2009, 4(2): 12.
- [27] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MCY, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940–943.
- [28] Chang MCY, Eachus RA, Trieu W, Ro DK, Keasling JD. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(5): 274–277.
- [29] Lenihan JR, Tsuruta H, Diola D, Renninger NS, Regentin R. Developing an industrial artemisinic acid fermentation process to support the cost-effective production of antimalarial artemisinin-based combination therapies. *Biotechnology Progress*, 2008, 24(5): 1026–1032.
- [30] Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, Eng D, Woolard FX, Regentin R, Horning T, Tsuruta H, Melis DJ, Owens A, Fickes S, Diola D, Benjamin KR, Keasling JD, Leavell MD, McPhee DJ, Renninger NS, Newman JD, Paddon CJ. Production of amorphadiene in yeast and its conversion to dihydroartemisinic acid precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(3): 111–118.
- [31] Hawkins KM, Smolke CD. Production of benzylisoquinoline alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4(9): 564–573.
- [32] Thodey K, Galanie S, Smolke CD. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(10): 837–844.
- [33] Fossati E, Narcross L, Ekins A, Falgoutyret JP, Martin VJJ. Synthesis of morphinan alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 2015, 10(4): 15.
- [34] DeLoache WC, Russ ZN, Narcross L, Gonzales AM, Martin VJJ, Dueber JE. An enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast from glucose. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(7): 465–471.
- [35] Farrow SC, Hagel JM, Beaudoin GAW, Burns DC, Facchini PJ. Stereochemical inversion of (S)-reticuline by a cytochrome P450 fusion in *opium poppy*. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(9): 728–732.
- [36] Winzer T, Kern M, King AJ, Larson TR, Teodor RI, Donninger SL, Li Y, Dowle AA, Cartwright J, Bates R, Ashford D, Thomas J, Walker C, Bowser TA, Graham IA. Morphinan biosynthesis in *opium poppy* requires a P450-oxidoreductase fusion protein. *Science*, 2015, 349(6245): 309–312.
- [37] Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, Filsinger Interrante M, Smolke CD. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 2015.
- [38] Chang MCY, Keasling JD. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(12): 674–681.
- [39] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KEJ, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330(6000): 70–74.
- [40] Zhou K, Qiao K, Edgar S, Stephanopoulos G. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(4): 377–U157.
- [41] Chen SW, Wang Y, Wang Y, Wang LJ, He HM. Study on anti-tumor activity of ginsenoside Rg1 and Rh1. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2003(1): 25–28. (in Chinese)
陈声武, 王岩, 王毅, 王丽娟, 何忠梅, 王本祥. 人参皂苷 Rg1 和 Rh1 抗肿瘤作用的研究. *吉林大学学报(医学版)*, 2003(1): 25–28.
- [42] Xin Y, Ni JS, Jiang X, Wang XR, Shi B, Wu JX. Inhibitory effect of 20(S)-ginsenoside Rg3 on tumor growth. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2006(1): 61–63. (in Chinese)
辛颖, 倪劲松, 姜新, 王心蕊, 石博, 吴稼祥. 20(S)-人参皂苷 Rg3 抑制肿瘤生长的作用. *吉林大学学报(医学版)*, 2006(1): 61–63.
- [43] He C, Wu T, Hu XT, Liang JH, Chen P. Tumor suppression activity of ginsenoside Rg3 combined with TRAIL gene on human

- colon cancer cell line HCE8693. *China Journal of Chinese Material Medica*, 2004(8): 43–45. (in Chinese)
- 何超, 吴彤, 胡晓彤, 梁建华, 陈萍. 人参皂苷Rg₃与TRAIL联合应用对大肠癌细胞株HCE8693作用的实验研究. *中国药理学杂志*, 2004(8): 43–45.
- [44] Qi LW, Wang CZ, Yuan CS. Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity. *Phytochemistry*, 2011, 72(8): 689–699.
- [45] Dai ZB, Liu Y, Zhang XA, Shi MY, Wang BB, Wang D, Huang LQ, Zhang XL. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides. *Metabolic Engineering*, 2013, 20: 146–156.
- [46] Dai ZB, Wang BB, Liu Y, Shi MY, Wang D, Zhang XN, Liu T, Huang LQ, Zhang XL. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6.
- [47] Yan X, Fan Y, Wei W, Wang PP, Liu QF, Wei YJ, Zhang L, Zhao GP, Yue JM, Zhou ZH. Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast. *Cell Research*, 2014, 24(6): 770–773.
- [48] Li Q, Sun Z, Li J, Zhang Y. Enhancing beta-carotene production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Fems Microbiology Letters*, 2013, 345(2): 94–101.
- [49] Reyes LH, Gomez JM, Kao KC. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. *Metabolic Engineering*, 2014, 21: 26–33.
- [50] Xie W, Lv X, Ye L, Zhou P, Yu H. Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 69–78.
- [51] Adarme-Vega TC, Thomas-Hall SR, Schenk PM. Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 26: 14–18.
- [52] Barclay WR, Meager KM, Abril JR. Heterotrophic production of long-chain omega-3-fatty-acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 1994, 6(2): 123–129.
- [53] Wynn JP. Taking the fish out of fish oil. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 716–717.
- [54] Tavares S, Grotkjaer T, Obsen T, Haslam RP, Napier JA, Gunnarsson N. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of eicosapentaenoic acid, using a novel delta 5-desaturase from paramecium tetraurelia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1854–1861.
- [55] Papanikolaou S, Aggelis G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology*, 2002, 82(1): 43–49.
- [56] Meyer A, Kirsch H, Domergue F, Abadi A, Sperling P, Bauer J, Cirpus P, Zank TK, Moreau H, Roscoe TJ, Zahringer U, Heinz E. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 2004, 45(10): 1899–1909.
- [57] Shi TL, Yu AQ, Li M, Ou XY, Xing LJ, Li MC. Identification of a novel C22-delta 4-producing docosahexaenoic acid (DHA) specific polyunsaturated fatty acid desaturase gene from *isochrysis galbana* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(12): 2265–2274.
- [58] Shi TL, Yu AQ, Li M, Zhang M, Xing LJ, Li MC. Identification and characterization of a novel C20-elongase gene from the marine microalgae, *pavlova viridis* and its use for the reconstitution of two pathways of long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(8): 1271–1282.
- [59] 石桐磊. 多不饱和脂肪酸DHA合成途径在酿酒酵母中的重构. 南开大学硕士学位论文, 2013.
- [60] Shang Y, Ma YS, Zhou Y, Zhang HM, Duan LX, Chen HM, Zeng JG, Zhou Q, Wang SH, Gu WJ, Liu M, Ren JW, Gu XF, Zhang SP, Wang Y, Yasukawa K, Bouwmeester HJ, Qi XQ, Zhang ZH, Lucas WJ, Huang SW. Biosynthesis, regulation and domestication of bitterness in cucumber. *Science*, 2014, 346(6213): 1084–1088.
- [61] Guo J, Zhou YJ, Hillwig ML, Shen Y, Yang L, Wang Y, Zhang X, Liu W, Peters RJ, Chen X, Zhao ZK, Huang L. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(29): 12108–12113.
- [62] Liu Y, Hansen J, Houghton-Larsen J, Murali MP, Kumar S, Rasmussen NN, Murali PM. Producing mogrosin compound by contacting mogrol and/or glucosylated mogrol with enzyme or mixture of enzymes for catalysing glucosylation of mogrol and/or glucosylated mogrol to form mogrosin. WO2014086842-A1; US2015064743-A1; AU2015200486-A1; WO2014086842-A9; CA2893462-A1; SG11201503757-A1. 2013.
- [63] Lau W, Sattely ES. Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone. *Science*, 2015, 349(6253): 1224–1228.
- [64] Facchini PJ, Bohlmann J, Covello PS, De Luca V, Mahadevan R, Page JE, Ro D-K, Sensen CW, Storms R, Martin VJJ.

- Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30(3): 127–131.
- [65] Xiao M, Zhang Y, Chen X, Lee E-J, Barber CJS, Chakrabarty R, Desgagne-Penix I, Haslam TM, Kim Y-B, Liu E, MacNevin G, Masada-Atsumi S, Reed DW, Stout JM, Zerbe P, Zhang Y, Bohlmann J, Covello PS, De Luca V, Page JE, Ro D-K, Martin VJJ, Facchini PJ, Sensen CW. Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. *Journal of Biotechnology*, 2013, 166(3): 122–134.
- [66] Gongora-Castillo E, Childs KL, Fedewa G, Hamilton JP, Liscombe DK, Magallanes-Lundback M, Mandadi KK, Nims E, Runguphan W, Vaillancourt B, Varbanova-Herde M, DellaPenna D, McKnight TD, O'Connor S, Buell CR. Development of transcriptomic resources for interrogating the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids in medicinal plant species. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52506.
- [67] Yeo Y-S, Nybo SE, Chittiboyina AG, Weerasooriya AD, Wang Y-H, Gongora-Castillo E, Vaillancourt B, Buell CR, DellaPenna D, Celiz MD, Jones AD, Wurtele ES, Ransom N, Dudareva N, Shaaban KA, Tibrewal N, Chandra S, Smillie T, Khan IA, Coates RM, Watt DS, Chappell J. Functional identification of valerena-1,10-diene synthase, a terpene synthase catalyzing a unique chemical cascade in the biosynthesis of biologically active sesquiterpenes in valeriana officinalis. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(5): 3163–3173.
- [68] Sleight SC, Bartley BA, Lieviant JA, Sauro HM. In-fusion BioBrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(8): 2624–2636.
- [69] Jeong J-Y, Yim H-S, Ryu J-Y, Lee HS, Lee J-H, Seen D-S, Kang SG. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(15): 5440–5443.
- [70] Quan JY, Tian JD. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nature Protocols*, 2011, 6(2): 242–251.
- [71] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. Golden gate shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5553.
- [72] Wang CW, Liao JC. Alteration of product specificity of *Rhodobacter sphaeroides* phytoene desaturase by directed evolution. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(44): 41161–41164.
- [73] Petschacher B, Nidetzky B. Altering the coenzyme preference of xylose reductase to favor utilization of NADH enhances ethanol yield from xylose in a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7: 12.
- [74] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, Moon TS, Petzold CJ, Ullal AV, Prather KLJ, Keasling JD. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(8): 753–U107.
- [75] Li J, Zhang YS. Increase of betulinic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by balancing fatty acids and betulinic acid forming pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(7): 3081–3089.
- [76] Xie WP, Ye LD, Lv XM, Xu HM, Yu HW. Sequential control of biosynthetic pathways for balanced utilization of metabolic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 8–18.
- [77] Farhi M, Marhevka E, Masci T, Marcos E, Eyal Y, Ovadis M, Abeliovich H, Vainstein A. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(5): 474–481.
- [78] Liu D, Xiao Y, Evans BS, Zhang F. Negative Feedback Regulation of fatty acid production based on a malonyl-CoA sensor-actuator. *Acs Synthetic Biology*, 2015, 4(2): 132–140.
- [79] Xu P, Wang W, Li L, Bhan N, Zhang F, Koffas MAG. Design and kinetic analysis of a hybrid promoter-regulator system for malonyl-CoA sensing in *Escherichia coli*. *Acs Chemical Biology*, 2014, 9(2): 451–458.
- [80] Dahl RH, Zhang F, Alonso-Gutierrez J, Baidoo E, Batth TS, Redding-Johanson AM, Petzold CJ, Mukhopadhyay A, Lee TS, Adams PD, Keasling JD. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(11): 1039–1046.
- [81] Ding Y, Li J, Enterina JR, Shen Y, Zhang I, Tewson PH, Mo GCH, Zhang J, Quinn AM, Hughes TE, Maysinger D, Alford SC, Zhang Y, Campbell RE. Ratiometric biosensors based on dimerization-dependent fluorescent protein exchange. *Nature Methods*, 2015, 12(3): 195–198.
- [82] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(9): 636–646.
- [83] Joung JK, Sander JD. INNOVATION TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14(1): 49–55.
- [84] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing,

- regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(4): 347–355.
- [85] Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA. Advances in targeted genome editing. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2012, 16(3/4): 268–277.
- [86] Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(14): 6315–6325.
- [87] Zhang G, Lin Y, Qi X, Li L, Wang Q, Ma Y. TALENs-assisted multiplex editing for accelerated genome evolution to improve yeast phenotypes. *Acs Synthetic Biology*, 2015, 4(10): 1101–1111.
- [88] Jakounas T, Sonde I, Herrgard M, Harrison SJ, Kristensen M, Pedersen LE, Jensen MK, Keasling JD. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 213–222.
- [89] Ronda C, Maury J, Jakociunas T, Jacobsen SAB, Germann SM, Harrison SJ, Borodina I, Keasling JD, Jensen MK, Nielsen AT. CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 97.
- [90] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517(7536): 583–U332.

Production of plant-derived natural products in yeast cells - A review

Dong Wang, Zhubo Dai*, Xueli Zhang*

Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Plant-derived natural products (PNPs) have been widely used in pharmaceutical and nutritional fields. So far, the main method to produce PNPs is extracting them from their original plants, however, there remains lots of problems. With the concept of synthetic biology, construction of yeast cell factories for production of PNPs provides an alternative way. In this review, we will focus on PNPs' market and application, research progress for production of artemisinin, research progress for production of terpenes, alkaloids and polyunsaturated fatty acid (PUFAs) and recent technology development to give a brief introduction of construction of yeast cells for production of PNPs.

Keywords: plant-derived natural products, artemisinin, synthetic biology, artificial synthetic cells, yeast

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2012AA02A704), by the National Natural Science Foundation of China (81202864) and by the Youth Innovation Promotion Association of CAS (2015138)

*Corresponding author. Xueli Zhang, Tel/Fax: +86-22-84861983; E-mail: zhang_xl@tib.cas.cn; Zhubo Dai, Tel/Fax: +86-22-84861946; E-mail: dai_zb@tib.cas.cn

Received: 14 September 2015; Revised: 4 December 2015; Published online: 23 December 2015