营养化学品的生物制造研究进展

王南凯[1,2]， 龚劲松[3]， 史劲松[3]， 许正宏[*1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 生命科学与健康工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：基于绿色生物制造合成营养化学品是实现可持续发展的重要保障，该领域的技术发展和应用有望给食品、医药、化工及农业等行业带来颠覆性的技术变革。作者概述了生物信息学、基因组编辑技术、系统代谢工程策略以及酶工程技术等在营养化学品生物制造领域的应用研究进展；简述了功能糖类、氨基酸类、功能性脂质类、维生素类和黄酮类营养化学品的生物制造方法，展望了营养化学品的生物制造未来及可能存在的挑战，期待为提升绿色生物制造的竞争力提供参考。

关键词：营养化学品；生物制造；发酵；合成生物学；生命健康；生产工艺

中图分类号：Q 819；TS 2　**文章编号：**1673-1689(2022)08-0001-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.08.001

Research Advances in Biomanufacturing of Nutritional Chemicals

WANG Nankai[1,2]， *GONG Jinsong*[3]， *SHI Jinsong*[3]， *XU Zhenghong*[*1,2]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The green biomanufacturing of nutritional chemicals is an important guarantee for sustainable development. The technological development and application of this field are expected to bring disruptive technological changes in food, pharmaceutical, chemical and agricultural industries. In this paper, we summarized the progress of bioinformatics, genome editing technology, system metabolic engineering strategy and enzyme engineering technology in the field of biomanufacturing of nutritional chemicals. Furthermore, the biological manufacturing methods of functional sugars, amino acids, functional lipids, vitamins and flavonoids were briefly described. Finally, the possible challenges in the future of biomanufacturing of nutrient chemicals were prospected. It is expected to provide a reference and support for promoting the competitiveness of green biomanufacturing.

Keywords: nutritional chemicals, biomanufacturing, fermentation, synthetic biology, life health, production technology

收稿日期：2022-03-15

基金项目：国家重点研发计划项目(2021YFC2100900)。

* **通信作者：**许正宏(1971—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事营养化学品生物制造与功能评价和传统酿造食品微生物生态学方面的研究。E-mail：zhenghxu@jiangnan.edu.cn

营养化学品制造产业是我国大健康产业的重要组成部分，不仅代表了我国制造工业的技术发展，也体现了国民经济的综合水平。2017 年 10 月，习总书记在十九大报告中提出健康中国的发展战略，指出人民健康是民族昌盛和国家富强的重要标志，要完善国民健康政策，为人民群众提供全方位全周期健康服务。《“健康中国 2030”规划纲要》中也明确提出，到 2030 年我国健康产业规模将突破 16 万亿元，这些都标志着我国营养化学品制造也将随着大健康产业的发展共同进入一个新纪元。

目前，西方发达国家的营养化学品产业主要由相关行业巨头占据市场主导地位，如美国杜邦、联合利华、德国巴斯夫、荷兰帝斯曼、日本味之素等[1]。虽然我国是营养化学品制造大国，但制造技术仍不及发达国家，品种仍较为传统单一，大部分产品的产量低于行业平均水平。为了满足人们对健康和生活品质的需求，迫切需要推进我国健康产品制造业的发展。以合成生物学、人工智能等学科的发展为契机，随着基因编辑、生物信息学等生物制造产业相关技术的不断更迭，我国营养化学品的生物制造也将迎来新的机遇。通过产业技术升级，推动我国营养化学品制造由大国向强国跨越，见图 1。

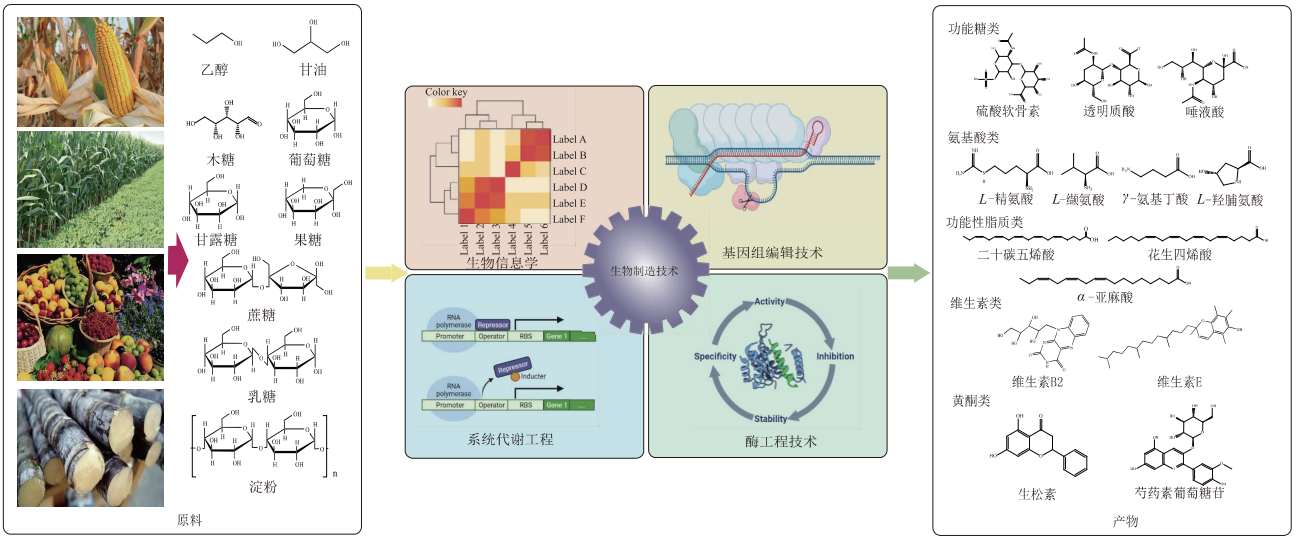


图 1　营养化学品的生物制造

Fig. 1　Biomanufacturing process of nutritional chemicals

1　营养化学品制造的发展态势

1.1　全球营养化学品的发展态势

营养化学品一词是由功能性食品演变而来的，最早起源于 19 世纪 90 年代的日本，当时在许多国家营养化学品饱受争议，并且只是将其规范化而没有合法化[2]。随着生命科学的发展，在营养化学品的类、质和量这三个维度上，人们逐步有着更深入的认识。目前各国的食品管理局，如美国的食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）、欧盟的欧盟食品安全局（European Food Safety Authority，EFSA）、中国的国家食品药品监督管理总局等都对营养化学品的研发、生产、宣传和销售进行严格的管控。

自 2019 年底的新冠疫情发生以来，各国的隔离政策使得人们的消费方式和健康观念发生了较大转变，大部分人会选择网购营养化学品，如维生素类、氨基酸类、功能糖类、植物营养素等，以期提升机体免疫、增加对新冠病毒的抵抗力，这就导致了营养化学品类的产品需求急剧增加。

1.2　我国营养化学品的发展态势

营养化学品在我国的研究发展已经从成分推断型、临床表象型进化到了机理研究型。此类产品主要是在 21 世纪初在我国出现，是研究有效分子的功能结构、含量和药理学机制，并保持其有效成分在产品中的稳定性[3]。

我国的营养化学品发展较发达国家落后，主要是由于我国的消费和生活观念与发达国家不同，而

且营养化学品的研发生产费时费力费钱,从而导致该行业的发展较为缓慢。随着生活水平的不断提高,人们越来越重视生命健康,导致国内的营养化学品类的产品供不应求,这也引起了国内营养化学品从业者和企业的重视,推动了产业发展。

1.3 传统营养化学品制造工艺的发展现状

目前大部分营养化学品的传统生产方式主要是天然提取或化学合成,但都有不足之处。由于天然动植物中的营养成分含量都较低,且提取成本较高,因此难以进行规模化工业生产;化学法合成容易进行放大,但反应步骤中涉及较多的强酸强碱或有毒试剂,对环境极不友好,而且需采用高温高压的反应条件。

生物产业作为国家战略新兴产业,有助于推进营养化学品的生产制造。利用微生物以生物基原料发酵生产目标化学品,具有产量高、成本低、安全性高、绿色环保、节能减排等特点,且目标产品被视为"天然的",是目前最具竞争力的生产方式。同时,合成生物学、人工智能等新技术的引入将推动营养化学品的蓬勃发展[4]。

2 生物技术在营养化学品工业化中的机遇

2.1 生物信息学

生物信息技术是一种综合技术,包括了生物信息的广泛获取、处理加工、分类存储、利用分配、分析解释等,并利用数学、计算机科学和生物学等来解释所得数据的生物学意义。随着基因工程、多组学和信息技术的迅猛发展,大量生物信息被公开,对构建环保高效的营养化学品生物制造体系具有重要推动作用。

目前生物信息学技术更注重的方向是生物基因数据整合、组学分析比较(如转录组学、蛋白质组学、代谢组学、通量组学、空间组学等)、微生物代谢网络模型分析、基因表达谱网络分析等,这些都在营养化学品生物制造方面有着广泛的运用[5]。这些技术的基础就是数据,获取这些数据的网站有很多,比较典型的如 NCBI (National Center for Biotechnology Information)、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、SIB (Swiss Institute of Bioinformatics)等。科研工作者一般会选择利用这些公共数据库来获取所需数据,根据这些数据进行分析,设计下一步的实验,如可以通过 NCBI 找到合成某些营养化学品的关键酶的信息,或利用 KEGG 找到合成某些营养化学品的代谢途径等,对于营养化学品的早期开发起着关键的作用。

2.2 基因组编辑技术

随着基因组测序和合成生物学技术的迅猛发展,基因组编辑技术已得到广泛应用,并有望成为营养化学品生物制造领域的主流技术之一。基因组编辑是一种重构微生物代谢网络的策略,通过生物信息学得到目标细菌或细胞的代谢网络,分析其代谢网络,找到关键目标基因或缺失基因,进行敲除或敲入操作。根据基因编辑机制的不同,可分为以下 3 种方法:1)锌指核酸酶编辑系统(Zinc-Finger Nucleases,ZFNs),这是一种能与特定 DNA 序列结合,并含有 FokI 非限制性内切酶结构域的融合蛋白质[6];2)类转录因子核酸酶编辑系统(Transcription Activator-Like Effector Nucleases,TALENs)是将能识别特定 DNA 序列并结合的类转录因子与 FokI 非限制性内切酶结构域融合,这种系统具有高效性、高度精确性和可控性,但操作复杂,是较为常用的基因编辑系统[7];3)成簇规律间隔短回文重复序列编辑系统 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats,CRISPR)是由 Cas 核酸内切酶和向导 RNA 组成,由向导 RNA 与 Cas 蛋白质配对并识别 DNA 上的 PAM 序列,然后进行基因编辑工作,该方法操作简单,但脱靶效率较高,是目前广泛运用的基因编辑手段[8]。

2.3 系统代谢工程策略

系统代谢工程是通过改造微生物菌株来高效合成化学品或材料的手段,它将传统发酵与系统生物学的工具和策略、合成生物学和进化工程进行融合。自 1991 年以来,利用系统代谢工程技术开发的微生物生产的营养化学品已达数百种,而且其中部分品种已可以达到工业水平[9]。虽然人们在系统代谢工程领域已经取得了巨大进展,但系统代谢工程项目在其初始研发阶段往往没有考虑工业规模生产中出现的实际问题,因此仍有必要通过提升菌株各方面的性能使生物制造工艺在与传统制造工艺的竞争中能脱颖而出。

系统代谢工程的策略主要为宿主筛选、代谢途径重构、代谢流优化、提高宿主的目标耐受性等。目前工业上最常用的模式菌株主要是大肠杆菌和酿

酒酵母,有关这两种菌株的代谢和生理研究较为深入。利用野生菌自身优势生产营养化学品,如兽疫链球菌可生产透明质酸,棒杆菌适用于氨基酸的生产,暗红球菌可生产脂质、脂肪酸及其衍生物等。选择合适的宿主是生产营养化学品的第一个关键要素。在利用微生物进行生物制造的过程中,常常会生产一些非菌株代谢的化学品,所以需要在菌株里构建一条新的代谢通路以达到生产目标化学品的目的。但是成功构建异源表达的代谢通路障碍较多,如酶的挖掘和表达、竞争途径的资源争夺、反馈抑制的影响和转运系统的识别等等。随着合成生物学和计算生物学的兴起,使得设计新的和特异性的代谢途径更为容易。代谢流优化是在代谢途径重构的基础上对底盘细胞和异源代谢途径进行改造以合理分配固定的资源,使目标产物的产量能达到峰值,其主要策略有表达元件工程、辅因子工程、转录因子工程、模块化工程、转运系统工程、支架结构工程等[10-15]。此外还可以通过适应性进化提高菌株的目标耐受性,使菌株更容易在特定的情况下生长以维持菌株的生产能力。

2.4 酶工程技术

酶是一种具有生物催化功能的生物大分子,是催化反应的天然解决方法。但是天然的酶通常存在一些性能不足,难以满足特定营养化学品的工业化生产要求[16]。近年来,酶工程技术也在不断发展,改造酶的方法层出不穷,如定向进化、半理性设计和理性设计,使酶工程成为满足目标产物代谢途径要求的有力工具。

酶工程应用于营养化学品生产的主要研究内容为:1)提高酶的催化效率[17],以避免酶活过低需要过量表达导致占用较多资源、对细胞产生一定的毒性和产生包涵体等问题;2)改变酶的底物谱和产物谱[18],酶的底物或产物特异性会限制酶在生产中的运用,同时底物或产物的多样性会增加下游纯化的成本;3)提升酶的抗反馈抑制能力[19],当代谢途径中的中间体或产物不断积累时,可能会造成其中一些酶的反馈抑制,致使产量达到瓶颈;4)改造酶的稳定性[20],工业生产往往需要稳定性较好的酶产品,根据不同产品线的需求,可改造酶对温度、有机溶剂、底物浓度、pH 等的稳定性,以达到产量最大化。这些特性是生物催化生产营养化学品的核心。

3 生物制造技术在各类营养化学品生产中的应用

3.1 功能糖类

功能糖化合物是一类生物大分子,在自然界中广泛存在。随着生命科学的不断发展,发现不同寡糖类分子在临床上显示出了多种的生理活性,如抗氧化、抗炎症、免疫调节等,因此有了功能糖的概念[21]。由于功能糖对人体健康具有一定促进作用,所以在营养化学品领域受到特别关注。

目前国内外也有很多团队将生物制造技术运用于功能糖的生产,包括透明质酸、硫代软骨素、唾液酸等,这些都是具有代表性的功能糖类营养化学品,而他们的原生产工艺基本都是采用动物提取或传统的化学合成,这些方法成本高、效率低,不适用于批量生产,生物制造方法已表现出一定的市场竞争力,但工业规模的复杂性、步骤繁多以及产物纯化成本高仍是目前的限制性因素。

3.1.1 透明质酸 透明质酸是一种由 N-乙酰氨基葡萄糖和葡萄糖醛酸组成的高分子多聚糖,根据透明质酸的相对分子质量的不同而具有不同的功效,一般相对分子质量小于 10 000 的透明质酸可用于抗炎症、抑制肿瘤和促进纤维组织细胞的生成等。清华大学于慧敏教授团队[22]识别了透明质酸生物合成通路中的 5 个合成透明质酸的关键酶(HasA、HasB、HasC、HasD 和 HasE),在谷氨酸棒杆菌中对这 5 个酶进行组合并过表达,从 8 种组合中筛选出分别过表达 HasA-HasB 和 HasA-HasB-HasC 可有效提高透明质酸的产量;为了进一步提高产量,他们将宿主的乳酸脱氢酶基因(*ldhA*)进行敲除,最后发现敲除后的宿主过表达 HasA-HasB 获得的透明质酸滴度最高(21.6 g/L)。该团队利用了生物信息学、系统代谢工程和基因工程等手段大幅提高了透明质酸的产量,比传统利用兽疫链球菌的发酵产量增加约 3 倍。

3.1.2 硫酸软骨素 硫酸软骨素是典型的一种硫酸化糖胺聚糖,广泛存在于哺乳动物的骨骼、皮肤、软骨和神经等组织中,可用于辅助治疗关节炎类的疾病。江南大学康振教授团队[23]开发了一种有效的硫酸化修饰系统用于制备硫酸软骨素(CSA),先利用分子伴侣将软骨素 4-氧硫酸转移酶(C4ST)的可溶性表达量提高了约 30 倍;并在催化过程中加入

甘油以提高芳基磺基转移酶(AST)的稳定性来生产前体3-磷酸腺苷-5-磷酰硫酸(PAPS);用连接肽和蛋白质支架将 C4ST 和 AST 组装成复合酶的形式与 PAPS 在空间上更接近,提升了催化效率;最终滴度为 15 g/L,转化率高达 98%,这项研究将合成生物学与生物催化相结合提升硫酸软骨素产量,拓宽了新型生物制造技术在营养化学品工业化生产中的应用。

3.1.3 唾液酸 唾液酸是一种氨基九糖类化合物,其主要形式 N-乙酰神经氨酸被广泛用于促进婴儿大脑发育、抗流感、抗菌、抗肿瘤等,不仅是一种重要的营养化学品、也是抗病毒药物的前体。山东大学王倩教授团队[24]以葡萄糖为碳源,通过代谢工程和基因工程的方法有效解决了前体——磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)供应低的问题。首先他们比较了不同来源的唾液酸途径酶,成功在大肠杆菌中构建了唾液酸的生物合成途径;该团队过表达了唾液酸合成酶(NeuB)、乙酰葡萄糖胺异构酶(AGE)、六磷酸葡萄糖胺合成酶(GlmS)和磷酸葡萄糖胺 N-乙酰基转移酶(GNA1),并且为了解决 NeuB 和 AGE 酶活低的问题,他们还考察了唾液酸合成酶基因(*neuB*)和乙酰葡萄糖胺异构酶基因(*AGE*)的核糖体结合位点 RBS 以提高转录效率;最后敲除了代谢 PEP 的柠檬酸合酶基因(*gltA*)和丙酮酸激酶Ⅱ(*pykA*),以提高前体 PEP 的供应,使得摇瓶发酵的滴度达到 16.7 g/L。

3.2 氨基酸类

氨基酸是含有氨基和羧基的有机化合物,迄今为止自然界中发现的氨基酸已经超过 700 多种,主要以其中 20 种为前体构成人体和动物蛋白质[25]。氨基酸对人类健康有着不可或缺的作用,在营养化学品市场广受欢迎。利用微生物发酵方法制造氨基酸类产品已经有 50 多年历史,是工业生物技术的重要支柱之一,氨基酸市场规模每年都在攀升,并且产品类型更多元化。目前生物制造的氨基酸类产品不仅仅局限于天然氨基酸,利用生物信息学、基因工程、生物传感器技术和人工智能等生物新技术还可以用来生产特殊氨基酸,如蛋白氨基酸、环状氨基酸、ε-氨基酸和被羟基、卤素、甲基修饰的功能性氨基酸等。

3.2.1 天然氨基酸 天然氨基酸主要是指 20 种基本氨基酸,是人体四大营养素之一,在营养补充、增强体质、改善发育等方面有着重要的影响。其中精氨酸作为非必需氨基酸参与人体的鸟氨酸循环,直接影响人体的生命代谢,为了提高精氨酸的生物合成能力,作者所在团队[10]利用系统代谢工程的方法提升了谷氨酸棒杆菌生产精氨酸的能力。对谷氨酸棒杆菌 17 个核心启动子和 29 个 RBSs 进行了表征,通过比较多个 RBS 调节的 2 个报告基因的表达,发现表达强度不仅与 RBS 的序列有关,还明显依赖于基因环境。将双顺势元件改性的 RBS(简称 bc-RBS)应用于谷氨酸棒杆菌,提高了 RBS 的可靠性。通过将一系列启动子与 RBSs/bc-RBSs 耦合,与单一元件相比,其调控范围更广,且对基因表达的贡献大于启动子。最后,利用启动子和 RBSs 作为内建元素,对谷氨酰胺、精氨酸合成途径中的基因簇进行微调。与原菌株相比,合理构建基因表达调控系统的菌株在 7 L 生物反应器中积累了更多的精氨酸(1.61 倍)和瓜氨酸(2.35 倍)。实验结果证明,通过结合特征良好的基因元件,综合考虑转录和翻译,可以有效平衡生物合成途径,从而进一步提高目标代谢物的产量。缬氨酸也是一种重要的天然氨基酸类营养补充剂,韩国科学技术院李相烨教授团队[26]为了提升缬氨酸在大肠杆菌中的产量,首先获取并分析了大肠杆菌的代谢网络数据,发现并敲除了分解缬氨酸前体的苏氨酸脱氨酶基因(*ilvA*)、泛酸酯合成酶基因(*panB*)、2-异丙基苹果酸酯酶基因(*leuA*),用于增强其前体 2-酮异戊酸的供应;随后又通过分析转录组学的数据,发现了全局转录因子基因(*Lrp*)和 L-缬氨酸的转运蛋白基因(*ygaZH*)有所下调,通过过表达 *Lrp* 和 *ygaZH* 基因,使得缬氨酸的产量较阳性对照提高了 113%;最后利用现有的组学数据进行基因敲除模拟分析,识别并敲除了丙酮酸脱氢酶 E2 基因(*aceF*)、苹果酸脱氢酶基因(*mdh*)和 6-磷酸果糖激酶基因(*pfkA*)等,最终产量提升了 126%,达到 7.55 g/L。

3.2.2 特殊氨基酸 γ 氨基丁酸(GABA)是一种可调节心血管疾病的非蛋白类氨基酸,而且在减轻镇痛和舒缓情绪方面具有积极作用。浙江科技大学肖功年教授团队[27]利用酿酒酵母构建了一种高产 GABA 的生产菌株。他们筛选获得了来源于 *Streptomyces* sp. MJ654-NF4 的谷氨酸脱羧酶用于生产 GABA,通过发酵优化获得了滴度为 62.6 g/L 的 GABA。反式-4-羟基-*L*-脯氨酸也是一种特殊氨

基酸类营养化学品,传统工艺是以脯氨酸为底物进行生产,但脯氨酸价格较高(市场价约 20 美元/kg)。为了降低成本,江南大学饶志明教授团队[28]以廉价的葡萄糖为底物发酵获得 *L*-脯氨酸,再经反式-4-羟化酶获得反式-4-羟基-*L*-脯氨酸。他们首先通过稀有密码子选择性进化获得了一株 *L*-脯氨酸滴度高达 18.2 g/L 的大肠杆菌 M1,随后通过基因编辑手段敲除了 *L*-脯氨酸竞争通路的基因并释放了反馈抑制,使得反式-4-羟基-*L*-脯氨酸和 *L*-脯氨酸的滴度分别为 15.7 g/L 和 10 g/L;进一步利用群体响应技术动态抑制 α-酮戊二酸脱氢酶以增强目标产物的前体——α-酮戊二酸的供应,并通过理性设计提高了关键酶反式-4-羟化酶的酶学性质,最终反式-4-羟基-*L*-脯氨酸的滴度提高到了 54.8 g/L。该团队通过稀有密码子选择性进化、前体动态调控和从头代谢改造碳通量等策略为高效合成羟基氨基酸提供了良好的技术平台。

3.3 功能性脂质类

脂质是影响生命健康的重要营养成分之一,根据生理学功能可分为 3 类,分别是贮存脂质、结构脂质和活性脂质。活性脂质又称功能性脂质,虽然在细胞成分中占比较小,但具有非常重要的生理学功能。其中不饱和脂肪酸就是比较典型的功能性脂质,它是由多个不饱和的双键组成的,是一种调节大脑发育和认知以及许多疾病(如心血管疾病、癌症和糖尿病)的关键营养素[29]。营养类的不饱和脂肪酸有二十碳烯酸、花生四烯酸、亚油酸、亚麻酸、DHA 等等。

3.3.1 二十碳五烯酸和花生四烯酸 二十碳五烯酸和花生四烯酸是长链的多聚不饱和脂肪酸,它们与人体生长发育过程中的一些代谢疾病相关。由于这些不饱和的多聚脂肪酸的来源有限,迫切需要开发新的生产方式。马杜赖卡玛拉大学的 Kathiresan 教授团队[30]通过生信分析识别了 *Isochrysis* sp.中的 *Δ5Des-Iso* 基因并在大肠杆菌中异源表达用于合成新型二十碳五烯酸和花生四烯酸。他们还研究了温度、时间、和前体浓度对发酵的影响,最终发现该菌株在 37 ℃下额外加入 25 μmol/L 的前体,发酵 24 h 得到二十碳五烯酸和花生四烯酸的产量分别为 4.1 mg/g 和 8.3 mg/g,为二十碳五烯酸和花生四烯酸的工业化生产打下了基础。

3.3.2 α-亚麻酸(ALA) ALA 是一种对人体有益的 ω-3 脂肪酸,在降低患心血管疾病和致命的缺血性心脏病的方面有着显著的作用。ALA 普遍存在于亚麻籽、油菜籽、黑加仑等一些植物中,所以只靠天然提取的方式会严重限制其产量。德州大学奥斯汀分校的 Alper 教授团队[31]筛选出了一种产 ALA 的酵母 *Yarrowia lipolytica*,通过异源表达双功能的 Δ12/Δ15 去饱和酶提升了 *Yarrowia lipolytica* 的 ALA 产量,最后在 2 L 的发酵罐上利用低温发酵使 ALA 含量达到 30%以上,其滴度达到 1.4 g/L。这项研究开发了一个高产 ALA 的菌株,对 ALA 的工业化生产搭建了一个基本框架。

3.4 维生素类

维生素在生物体中主要作为代谢反应的辅酶发挥作用。已报道的维生素主要分为两类,一类是脂溶性维生素(维生素 A、D、E 和 K),还有一类是水溶性维生素(维生素 C 和 B 族维生素)。由于人类因病理状况、营养不良、不良饮食、高运动量、怀孕、压力和药物滥用等因素需要补充大量的维生素,天然来源维生素往往无法满足需求。目前生产维生素的方法主要是化学合成和生物制造,传统化学法合成存在容易产生废气废液、底物不可再生等问题,因此生物制造成了维生素生产的重要方式[32]。

3.4.1 水溶性维生素 B 族维生素中的维生素 B2 是具有代表性的水溶性维生素,它可以利用 *A. gossypii* 和 *B. subtilis* 进行发酵生产,天津大学的陈涛教授团队[33]通过在 *B. subtilis* 中分别过表达了 *D*-赤藓糖-4-磷酸脱氢酶基因(*gapB*)和果糖 1,6-二磷酸酶基因(*fbp*),使维生素 B2 较原工艺产量提升了 18%和 14%。在摇瓶水平上,同时过表达这两个基因在摇瓶和发酵水平上产量分别提升了 21.9%和 27.8%。

3.4.2 脂溶性维生素 维生素 E 又称生育酚,是目前市场上热销的维生素类营养化学品之一,其市场需求每年都保持稳定增长。常规的天然提取和化学合成法成本高、效率低,不适用于工业化生产。浙江大学于洪巍教授团队[34]开发了一种冷激触发温控系统,提高了酿酒酵母合成生育三烯酚的能力。该团队在酿酒酵母中异源表达光合生物的基因,并与自身的莽草酸途径和甲羟戊酸途径相结合,构建了产生生育三烯醇的酿酒酵母。为了进一步解决细胞生长与生育三烯醇积累之间的矛盾,实现高密度发

酵,设计了冷激触发温度控制系统,有效控制两阶段发酵,得到滴度为 320 mg/L 的生育三烯酚,较原工艺提高了 500 多倍。该研究成功揭示了基因工程酵母菌高密度发酵合成生育三烯酚的工业化潜力。

3.5 黄酮类

黄酮类化合物是广泛存在于植物中的重要营养化学品,是一类常见的三环化学结构(C_6–C_3–C_6)的植物次生代谢产物。目前已知的黄酮类化合物已经超过约 4 000 多种,包括花青素、黄酮醇、黄烷醇、原花青素和凝缩单宁等[35]。这些化合物具有多种生理功能,如心血管保护、冠心病防治、降血脂血压、保护肝脏、预防动脉硬化、防止肝硬化和肝损伤、炎症治疗、胃溃疡治疗、延缓更年期、骨质疏松症的防治、抗病毒、抗菌、止咳化痰等[3]。它们大多结构复杂,含有较多的手性基团和活性基团,化学合成过程会引入较多的保护、去保护和手性拆分策略,其合成相当困难,因此利用生物合成的方法生产黄酮类的营养化学品势在必行。

黄酮类化合物的代谢通路已在拟南芥、玉米和葡萄中被识别,其通路主要分为两部分,一部分是合成黄酮类化合物的母核,另外一部分就是对母核进行修饰,可根据需求不同,用相应的酶对黄酮化合物主骨架进行修饰[36]。

3.5.1 生松素 生松素是合成其他黄酮类化合物的母核,可通过羟基化、还原、烷基化、氧化和糖基化其苯基丙烷核心结构来合成如高良姜黄素、二氢黄酮醇、白杨素等高价值的黄酮类化合物。然而,合成生松素需要昂贵的苯丙氨酸或肉桂酸作为前体,所以直接影响了其他黄酮类化合物的开发与生产。江南大学周景文教授团队[37]开发了一种在大肠杆菌中以葡萄糖为底物并结合模块化手段合成生松素的方法,他们将生松素的代谢通路分割成了 4 个模块,并通过优化异源表达的拷贝数和密码子优化来平衡生松素的代谢途径,减少中间体产物的积累,最终滴度达到了 40 mg/L。该研究改善了生松素生产的经济性,为微生物利用葡萄糖生产黄酮类化合物开辟了新的道路。

3.5.2 甲基化花青素类产品 对黄酮类化合物甲基化,能提升其本身的生物利用度和生物活性,如抗癌、免疫调节、抗氧化等活性。伦斯勒理工学院的 Koffas 教授团队[38]首次报道了在大肠杆菌中构建了从儿茶素到甲基化花青素的代谢途径,通过调节质粒的拷贝数、关键酶的表达条件和沉默转录抑制蛋白质基因等手段,将甲基化花青素类产品——芍药素葡萄糖苷的产量提高了 21 倍,达到 51 mg/L。

4 展 望

目前,传统的天然提取和化学合成的营养化学品中已有 7 万多种实现了工业化生产。截至 2020 年,全球传统工业化学品产业规模已达到了 5 万亿美元[39]。考虑到传统工艺的诸多限制,绿色、环保的生物制造方法用于营养化学品生产是解决资源可持续化发展的重要途径之一,随着生物技术和工艺的不断发展,针对目前很多营养化学品的工业化生产水平低下的问题,未来构建高效的营养化学品生物制造策略需在以下方面进一步探索:

1)生物制造技术的可行性 与营养化学品制造相关的生物新技术在持续更新,但许多新技术还不够成熟,暂时无法实现工业化应用。如蛋白质的从头设计及计算,虽然这种方法在理论上可以设计任何合成营养化学品所需的关键酶及蛋白质,包括一些自然界不存在的酶,但是由于蛋白质结构的多样性,现有技术水平仍难以满足一种蛋白质的所有可能结构的计算。因此加快推动相关领域新技术的进展有助于提升生物制造技术的成功率和可行性,也有利于加快营养化学品生物制造技术的发展。

2)生物制造装备的先进性 生物制造装备是生产营养化学品的必备条件,先进的装备和软件能直接提升营养化学品生产的产量、质量和效率,并能降低人工成本。目前生物制造装备也逐步与人工智能、物联网、大数据等技术和学科相融合,为开启营养化学品智能化生物制造时代开辟了道路。

3)生物制造过程的经济性 在营养化学品生产过程中,原料和人工是主要成本来源,因此降低原料成本是提高工艺经济性的重要方式,如能采用相对廉价的原料如葡萄糖、乳糖、木糖、烟酰胺等来生物合成透明质酸、唾液酸、黄酮类化合物、烟酰胺单核苷酸等高附加值的营养化学品,将有利于提升营养化学品的经济性并为传统营养化学品制造业的技术升级奠定坚实基础。

参考文献:

[1] 罗正山,徐峥,李莎,等. 生物工程在食品领域的研究与应用进展[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(9):1-5.

[2] DANIEL G,FRANCISCO J B,DANIJELA B K,et al. Functional foods:product development,technological trends,efficacy testing,and safety[J]. **Annual Review of Food Science and Technology**,2020,11:93-118.

[3] 陈坚. 功能性营养化学品的研究现状及发展趋势[J]. 中国食品学报,2013,13(1):5-10.

[4] 毕心宇,吕雪芹,刘龙,等. 我国微生物制造产业的发展现状与展望[J]. 中国工程科学,2021,23(5):59-68.

[5] 陈涛,崔真真,户文亚,等. 代谢工程发展 30 年[J]. 生物工程学报,2021,37(5):1477-1493.

[6] FYODOR D U,EDWARD J R,MICHAEL C H,et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases[J]. **Nature Review Genetics**,2010,11(9):636-646.

[7] LI T,HUANG S,JIANG W Z,et al. TAL nucleases (TALNs):hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain[J]. **Nucleic Acids Research**,2011,39(1):359-372.

[8] JENNIFER A D,EMMANUELLE C. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. **Science**,2014,346(6213):1258096.

[9] BAILEY J E. Toward a science of metabolic engineering[J]. **Science**, 1991,252(5013):1668-1675.

[10] DUAN Y T,ZHAI W J,LIU W J,et al. Fine-tuning multi-gene clusters via well-characterized gene expression regulatory elements:case study of the arginine synthesis pathway in *C. glutamicum*[J]. **ACS Synthetic Biology**,2021,10(1):38-48.

[11] TANJA K,CAROLINE E P,COLIN W L,et al. Better than nature:nicotinamide biomimetics that outperform natural coenzymes [J]. **Journal of the American Chemical Society**,2016 138(3):1033-1039.

[12] XU X H,LI X L,LIU Y F,et al. Pyruvate-responsive genetic circuits for dynamic control of central metabolism[J]. **Nature Chemical Biology**,2020,16(11):1261-1268.

[13] MOON T S,DUEBER J E,SHIUE E,et al. Use of modular,synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*[J]. **Metabolic Engineering**,2010,12(3):298-305.

[14] GEORGIA L I,NICOLAS C,MARK R M,et al. Structure of LetB reveals a tunnel for lipid transport across the bacterial envelope [J]. **Cell**,2020,181(3):653-664.

[15] ROBERT J C,WU G C,JASON T B,et al. DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency[J]. **Nucleic Acids Researchs**,2012,40(4):1879-1889.

[16] 郭勇. 酶工程[M]. 北京:科学出版社,2009.

[17] AMARA A A,STEINBUCHEL A,REHM B H A. In vivo evolution of the aeromonas punctata polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase:isolation and characterization of modified PHA synthases with enhanced activity[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2002,59(4-5):477-482.

[18] FOO J J,CHING C B,CHANG M W,et al. The imminent role of protein engineering in synthetic biology[J]. **Biotechnology Advances**,2012,30(3):541-549.

[19] DENG M-D,ALAN D G,SARAH L W,et al. Directed evolution and characterization of *Escherichia coli* glucosamine synthase [J]. **Biochimie**,2006,88(5):419-429.

[20] ZHU C H,CHEN Y Y,MICHAIL N I,et al. Structural insights into a novel esterase from the east pacific rise and its improved thermostability by a semirational design[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2021,69(3):1079-1090.

[21] 刘洪涛,原旭冰,王倬,等. 功能糖在生命健康领域的研究进展及产业发展现状[J]. 生物技术,2018,6(11):15-22.

[22] CHENG F Y,LOUZHOU S J,GUO Z G,et al. Enhanced biosynthesis of hyaluronic acid using engineered *Corynebacterium glutamicum* via metabolic pathway regulation[J]. **Biotechnology Journal**,2017,12(10):1700191.

[23] JIN X R,LI Q,WANG Y,et al. Optimizing the sulfation-modification system for scale preparation of chondroitin sulfate A[J]. **Carbohydrate Polymers**,2020,246:116570

[24] ZHANG X L,WANG C Y,LV X Q,et al. Engineering of synthetic multiplexed pathways for high-level N-acetylneuraminic acid bioproduction[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2021,69(49):14868-14877.

[25] WU G Y. Amino acids in nutrition,health,and disease[J]. **Frontiers in Bioscience**,2021,26(12):1386-1392.

[26] PARK J H LEE K H,KIM T Y,et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of l-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2007,104(19):7797-7802.

[27] YUAN H N,ZHANG W,XIAO G N,et al. Efficient production of gamma-aminobutyric acid by engineered *Saccharomyces cerevisiae* with glutamate decarboxylases from *Streptomyces*[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**,2020,67(2):240-248.

[28] LONG M F,XU M J,MA Z F,et al. Significantly enhancing production oftrans-4-hydroxyl-proline by integrated system engineering in *Escherichia coli*[J]. **Science Advances**,2020,6(21):eaba2383.

[29] ARTEMIS P S. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids:their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk[J]. **Experimental Biology and Medicine**,2010,235(7):785-795.

[30] THIYAGARAJAN S,KHANDELWAL P,SENTHIL N,et al. Heterologous production of polyunsaturated fatty acids in *E. coli* using Δ5-desaturase gene from *Microalga Isochrysis* Sp[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2021,193(3):869-883.

[31] CORDOVA L T,ALPER H S. Production of α-linolenic acid in *Yarrowia lipolytica* using low-temperature fermentation[J]. **Biotechnology Products and Process Engineering**,2018,102(20):8809-8816.

[32] MANFRED E,DIETMAR L,ULLA L,et al. One hundred years of vitamins—a success story of the natural sciences[J]. **Angewandte Chemie**,2012,51(52):12960-12990.

[33] WANG G L,BAI L,WANG Z W,et al. Enhancement of riboflavin production by deregulating gluconeogenesis in *Bacillus subtilis*[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**,2014,30(6):1893-1900.

[34] SHEN B,ZHOU P P,JIAO X. et al. Fermentative production of vitamin E tocotrienols in *Saccharomyces cerevisiae* under cold-shock-triggered temperature control[J]. **Nature Communication**,2020,11(1):5155.

[35] SIMONE D C,GABRIELE D G. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines[J]. **BMC Plant Biology**,2007,7(1):46-55.

[36] WEN L R,JIANG Y M,YANG J L,et al. Structure,bioactivity,and synthesis of methylated flavonoids[J]. **Annals of the New York Academy of Science**,2017,1398(1):120-129.

[37] WU J J,DU G C,ZHOU J W,et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for(2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy[J]. **Metabolic Engineering**,2013,16:48-55.

[38] BRADY F C,QUENTIN D L,DANIEL C K,et al. CRISPRi-mediated metabolic engineering of *E.coli* for O-methylated anthocyanin production[J]. **Microbial Cell Factories**,2017 16(1):10-23.

[39] JAMES M C,ANNA M C,RAMON G. Industrial biomanufacturing:the future of chemical production[J]. **Science**,2017,355(6320):aag0804.