

天然产物的生物合成及酶工程研究进展

谭彩玲, 张 剑, 余伯阳*

中国药科大学 江苏南京

【摘要】天然产物是动物、植物、微生物来源的特殊代谢产物, 为药物研发提供了重要来源。因其绿色、可持续的特点, 天然产物的生物合成具有广阔的应用前景, 其主要程序包括底盘细胞的确认, 代谢途径的设计, 发酵工艺的放大。酶作为天然产物生物合成的催化剂, 通常不完全具备目标产物合成的所需特性, 需对其进行酶工程改造。这些酶工程策略包括定向进化、理性设计、半理性设计, 以提升酶特性从而适应于天然产物的生物合成应用。

【关键词】天然产物; 生物合成; 酶工程

【收稿日期】2024 年 5 月 12 日

【出刊日期】2024 年 6 月 27 日

【DOI】10.12208/j.imrf.20240005

Progress in biosynthesis and enzyme engineering of natural products

*Cailing Tan, Jian Zhang, Boyang Yu**

China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu

【Abstract】 Natural products are special metabolites from animals, plants and microorganisms, which provide an important source for drug research and development. Because of its green and sustainable characteristics, the biosynthesis of natural products has broad application prospects. The main procedures include the identification of chassis cells, the design of metabolic pathways, and the amplification of fermentation processes. As catalysts for natural product biosynthesis, enzymes usually do not have the required properties of target product synthesis, so they need to be modified by enzyme engineering. These enzyme engineering strategies include directed evolution, rational design, and semi-rational design to improve enzyme properties for biosynthetic applications of natural products.

【Keywords】 Natural products; Biosynthesis; Enzyme engineering

1 天然产物生物合成研究

天然产物是来源于动物、植物和微生物的特殊代谢产物, 广泛参与生物体生长、发育、繁殖等多过程的新陈代谢。酚类、萜类、生物碱类等结构多样的天然产物, 表现出抗氧化、抗菌、抗炎等广泛的药理活性, 为药学领域研究提供了宝贵资源^[1]。天然产物的传统发现策略是生物活性引导分离, 通过对收集的自然资源进行提取、萃取、柱层析分离等而获得活性化合物^[2]。但这面临着活性成分含量低、提取工艺复杂、自然资源过度开发等问题, 因此研究人员开发了一系列新的发现策略, 包括生物合成^[3]、半合成和化学合成、研究尚未开发的资源等。其中, 天然产物的生物合成通过设计和改造生物系统, 以满足天然产物的高效、绿色和可持续生产需求。

1.1 底盘细胞的确认

在天然产物的生物合成过程中, 首要步骤是确定合适的底盘细胞, 为合成系统提供代谢环境、能量来源, 确保转录、翻译功能的正常运作。其中, 微生物以其低成本、高效率和高产品纯度等优势, 结合成熟的代谢工程技术和完善的工业放大技术, 在天然产物的生物合成研究中占据重要地位^[4]。

大肠杆菌作为重要的底盘细胞之一, 其生长迅速、培养技术成熟、遗传背景清晰且具备多样的遗传操作工具, 因此成为紫杉醇、白藜芦醇等天然产物生物合成的优选平台。例如将白藜芦醇合成途径基因整合入大肠杆菌并进一步通过代谢工程策略提高了大肠杆菌生产白藜芦醇滴度至 188.1 mg/L, 实现了简单碳源到白藜芦醇的生物合成^[5]。

*通讯作者: 余伯阳

酿酒酵母作为一种公认安全的 (GRAS) 生物, 除了具备原核微生物的优点外, 还具备高渗透耐受性、低 pH 耐受性和同源重组可操作性等特性, 因此在药学领域具有广泛应用。例如研究人员利用酿酒酵母构建了高效生产青蒿酸的菌株, 并通过代谢工程策略将青蒿素的发酵滴度提高至 25 g/L^[6]。

为进一步提升天然产物的生产效率, 研究人员常对底盘细胞进行基因层面的改造, 如过表达和敲除关键基因等。这些方法有助于解决反馈抑制等问题, 提高前体中心代谢产物的滴度, 进而促进天然产物的下游生产。例如通过调节大肠杆菌甲基赤藓糖醇磷酸途径中的限速酶表达、密码子优化和质体转运肽的缺失等手段, 成功提高了紫杉二烯的生物合成滴度^[7]。

1.2 代谢途径的设计

确定底盘细胞后, 在其中重建并优化来自天然生产者的代谢途径便可实现目标产物的高效生产。例如在工程酿酒酵母菌株中表达不同来源的酶, 构建了一条利用糖从头生产蒂巴因和氢可酮的生物合成途径, 实现了二者的合成滴度分别为 6.4 $\mu\text{g/L}$ 和 0.3 $\mu\text{g/L}$ ^[8]。

然而, 许多天然产物的代谢途径不明确或不可用, 需要通过途径设计、酶的选择以及途径测试来获得可行的代谢途径。首先, 基于科研人员的知识和经验以设计目标产物合成途径, 或是通过人工智能预测代谢途径。其次, 酶的选择可以从文献、酶库等渠道搜索, 或通过基因组/转录组发掘, 还可以通过酶的改造策略来获得所需活性, 以更好地适应合成途径的要求。最后, 通过执行设计-构建-测试-学习 (DBTL) 迭代在宿主细胞进行途径测试, 结合全局基因表达调节、辅因子工程等代谢工程策略优化合成途径, 提高目标产物的生产效率和产量^[9]。

1.3 发酵工艺的放大

为实现生产周期的缩短、竞争优势的获取以及成本的节约, 必须将天然产物的生物合成从实验室规模转移至大规模商业生产, 其中需要综合考虑物流、财力、时间、目标等多维因素。其中, 发酵工艺的放大尤为关键, 比如放大过程导致混合质量的下降可能改变发酵环境, 进而引发应激反应, 产生不必要的副产物或导致合成途径的改变^[10]。

发酵过程的多参数相关分析结合计算流体力学 (CFD) 技术, 成为了一种有效的放大与优化手段。

通过生物传感器实时读取发酵罐中的溶解氧等直接参数, 并结合数据采集软件包计算摄氧率等间接参数, 并借助 CFD 技术可以对发酵罐内复杂的流场特性进行模拟分析, 为工艺调整提供有力支持, 已成功应用于头孢菌素 C、红霉素等工业发酵中^[11]。此外, 机器学习技术也在发酵工艺放大中发挥着越来越重要的作用, 有望通过大数据分析和模式识别, 实现更高效、更精准的工艺放大与优化^[12]。

2 酶的改造策略

生物合成具有绿色、可持续的特性, 带来显著的经济和环境效益, 使其在医药、食品、环境等多个领域得到了广泛应用。主要是相较于传统的有机合成方法, 酶促反应在条件上更为温和, 无需进行官能团的活化、保护和脱保护步骤, 且无需使用昂贵的金属催化剂, 且酶促反应也更方便于级联反应整合^[13]。

但野生型酶通常难以直接应用于天然产物的工业生产, 因为在某些关键特性上存在不足, 例如热稳定性、有机溶剂耐受性、对映选择性、底物特异性、催化活性等^[14]。研究人员可借助酶工程技术, 对酶的特性质进行了优化和改造, 包括如定向进化、理性设计和半理性设计等, 为获得更多具有优异性能的酶, 从而推动生物催化技术在工业生产中的广泛应用和持续发展起到了积极作用。

2.1 定向进化

定向进化核心理念在于模拟自然界的进化机制对酶进行改造。定向进化使得众多化学合成与化工生产中的棘手问题得以解决, 因此 2018 年诺贝尔化学奖的一半殊荣被授予了在酶定向进化领域作出杰出贡献的美国科学家 Frances H. Arnold^[15]。定向进化的流程通常涵盖突变、表达、筛选与扩增等关键环节。其中, 突变的遗传多样性、高通量筛选或选择方法, 是确保定向进化实验成功的两大关键因素^[16]。

突变的遗传多样性越高, 发现有益突变的可能性也就越大。体外诱变是构建突变文库的一种常见策略, 包括易错 PCR、序列饱和和突变等随机诱变技术, 以及位点饱和诱变、盒式诱变等定点诱变技术, 还有 DNA 洗牌、交错延伸等重组诱变方法。随着基因编辑工具不断发展, 体内诱变也变得日益流行, 可以避免体内诱变重复的克隆和转染步骤, 并且可以同时突变多个靶残基, 而常见的体内诱变技术有基于重组的诱变技术如多重自动化基因组工程、基

因组洗牌等, 基于 CRISPR 的诱导技术等^[17]。

上述诱变方法通常能成功引入突变的遗传多样性, 因而定向进化的核心挑战在于如何从庞大的突变库中精准识别出所需的突变体。为此, 高通量筛选和选择方法作为两大核心分析手段, 在突变体识别过程中发挥着至关重要的作用。多种高通量筛选技术已被开发, 包括琼脂板筛选、微量滴定板筛选、数字成像、荧光激活细胞分选、 μ SCALE 等, 这些筛选方法通过精确评估每个样本的特定属性, 有效降低了错失潜在有益突变体的风险^[18]。此外, 也已经开发出多种高通量选择方法, 包括基于展示的选择方法(如噬菌体展示、核糖体展示)、体内区室化方法(如遗传互补、化学互补等)、生物淘洗、指数富集的配体系统进化技术(SELEX)等, 这些选择方法通过施加特定选择压力剔除不符合要求的突变体, 从而筛选出阳性候选者进行后续的定向进化^[17]。

2.2 理性设计

在酶工程领域, 理性设计通常依赖于对序列或结构的深入理解。多序列比对技术被广泛用于识别保守残基或序列, 进而改善酶的性质。而通过 X 射线衍射、核磁共振和冷冻电子显微镜等技术, 可以获取蛋白质的大分子结构, 若是结构测定仍存在局限时, 结构预测、对接模拟和分子动力学模拟等就显得尤为重要^[19]。当已知蛋白与目的蛋白具有高度相似性时, 可以从 PDB 数据库获取其 3D 结构, 并利用软件进行同源建模, 结合分子对接技术可以预测配体与酶的可能结合模式, 结合分子动力学模拟则能够预测酶的系综结构和酶-配体的相互作用, 为蛋白质构象动力学研究提供重要信息。

通过基于序列和结构的方法获取蛋白质信息后, 合理的突变位点设计策略同样至关重要。酶的活性位点是催化反应的核心, 涉及底物结合、过渡态形成及产物释放等多个步骤, 而底物与活性位点间的氢键、疏水作用和盐桥等相互作用, 对底物的锚定和催化反应的准备起到关键作用^[20]。因此, 通过改造这些相互作用网络, 可以有效地改善酶的性质。

2.3 半理性设计

半理性设计策略在酶工程中展现出其独特的优势, 它结合了定向进化和理性设计的精髓, 旨在提高酶的特性而不必深入了解其结构功能关系, 同样无需高通量筛选也能获得目标突变体。该方法基于理性设计的序列或结构信息获取方法, 利用计算机

辅助技术识别活性位点、底物结合口袋等关键区域, 结合定向进化的丙氨酸扫描和定点饱和突变等方法, 构建全面覆盖的突变文库, 从而显著提升酶工程的效率^[21]。

在实际应用中, 半理性设计已成功应用于多种酶的改造, 如提高催化效率、增强热稳定性、改善区域选择性和立体选择性等。此外, FRISM 等先进技术也进一步推动了半理性设计在酶工程领域的应用, 例如应用 FRISM 策略构建了 16 β 类固醇羟化酶 CYP109B4 超小型文库并结合有限的 ISM 筛选, 获得突变体 B4-M7 的区域选择性从 16 β 完全切换到 15 β ^[22], 为酶的功能优化提供了更加高效和精准的方法。

参考文献

- [1] Elshafie H S, Camele I, Mohamed A A. A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin[J]. Int J Mol Sci,2023,24(4).
- [2] Atanasov A G, Zotchev S B, Dirsch V M, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities[J]. Nat Rev Drug Discov,2021,20(3):200-216.
- [3] Li G, Lou H X. Strategies to diversify natural products for drug discovery[J]. Med Res Rev,2018,38(4):1255-1294.
- [4] Kelwick R, Macdonald J T, Webb A J, et al. Developments in the tools and methodologies of synthetic biology[J]. Front Bioeng Biotechnol,2014,2:60.
- [5] Yang D, Park S Y, Park Y S, et al. Metabolic Engineering of Escherichia coli for Natural Product Biosynthesis[J]. Trends Biotechnol,2020,38(7):745-765.
- [6] Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. Nature,2013,496(7446):528.
- [7] Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in Escherichia coli[J]. Science,2010,330(6000):70-74.
- [8] Galanie S, Thodey K, Trenchard I J, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast[J]. Science,2015,349(6252):1095-1100.

- [9] Tan Z, Li J, Hou J, et al. Designing artificial pathways for improving chemical production[J]. *Biotechnol Adv*,2023,64: 108119.
- [10] Ganeshan S, Kim S H, Vujanovic V. Scaling-up production of plant endophytes in bioreactors: concepts, challenges and perspectives[J]. *Bioresour Bioprocess*,2021,8(1):63.
- [11] Xia J, Wang G, Lin J, et al. Advances and Practices of Bioprocess Scale-up[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*,2016, 152: 137-151.
- [12] 夏建业, 刘晶, 庄英萍. 人工智能时代发酵优化与放大技术的机遇与挑战[J]. *生物工程学报*,2022,38(11):4180-4199.
- [13] Shoda S, Uyama H, Kadokawa J, et al. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis[J]. *Chem Rev*,2016,116(4):2307-2413.
- [14] Victorino D S A I, Gonsales D R N, Antonio D O S F, et al. Enzyme engineering and its industrial applications[J]. *Biotechnol Appl Biochem*,2022,69(2):389-409.
- [15] Arnold F H. Innovation by Evolution: Bringing New Chemistry to Life (Nobel Lecture)[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019,58(41):14420-14426.
- [16] Zeymer C, Hilvert D. Directed Evolution of Protein Catalysts[J]. *Annu Rev Biochem*,2018,87:131-157.
- [17] Wang Y, Xue P, Cao M, et al. Directed Evolution: Methodologies and Applications[J]. *Chem Rev*,2021,121(20): 12384-12444.
- [18] Markel U, Essani K D, Besirlioglu V, et al. Advances in ultrahigh-throughput screening for directed enzyme evolution [J]. *Chem Soc Rev*,2020,49(1):233-262.
- [19] Xu S Y, Zhou L, Xu Y, et al. Recent advances in structure-based enzyme engineering for functional reconstruction[J]. *Biotechnol Bioeng*,2023,120(12):3427-3445.
- [20] Ding Y, Perez-Ortiz G, Peate J, et al. Redesigning Enzymes for Biocatalysis: Exploiting Structural Understanding for Improved Selectivity[J]. *Front Mol Biosci*,2022,9:908285.
- [21] Chica R A, Doucet N, Pelletier J N. Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2005,16(4):378-384.
- [22] Phintha A, Chaiyen P. Rational and mechanistic approaches for improving biocatalyst performance,[J]. *Chem Catal*,2022, 2(10):2614-2643.

版权声明: ©2024 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS