

主要学术成就、科技成果及创新点：

申请人主要从事工业生物技术和生物化学工程领域的创新性研究，在植物源萜类化合物微生物制造、氧化还原辅因子工程和脂肪酸衍生物细胞工厂构建等方向取得了重要成果，为高效生产药用活性小分子化合物、生物燃料以及生物基化学品奠定了基础，对改善国民健康，实现经济可持续发展具有重要意义。已在 *J. Am. Chem. Soc.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *Nat. Comm.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, *Biotechnol. Bioeng.* 等期刊上发表 18 篇学术论文，论文总引用超过 320 次（Google scholar）。申请专利 3 项（中国专利 1 项，欧洲专利 2 项）。曾荣获《2013 年工业生物技术发展报告》青年人才荣誉称号（总共 5 名），2015 年药学会科学技术奖一等奖。依托在博士后阶段取得的研究成果，和合作导师 Jens Nielsen 教授合资创立了 Biopetrolia 生物技术公司，该公司成为法国 Total 石油公司的合作伙伴并得到其大力资助。主要科研成果如下：

1) 植物源萜类化合物微生物制造

植物产生的许多药物活性分子具有重要价值，但产量有限。改造微生物宿主合成这些药物活性分子，成为当前生物技术研究的科学前沿之一。但是，如何有效组装代谢途径，使外源代谢元件和内源代谢网络功能匹配，尚需要开展深入的基础研究。

申请人提出了“模块途径工程”策略，建立了在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中高效组装人工合成途径的方法，在萜类化合物人工合成途径中采取蛋白质融合策略提高途径效率。以构建二萜化合物次丹参酮二烯的 *S. cerevisiae* 工程菌株为例，通过模块途径工程，快速构建和优化生物合成途径，系统优化限速步骤、前体供给、底物传递、代谢流分配等因素，整体改善途径的生物合成效率。最优工程菌株次丹参酮二烯产量达到 365 mg/L 的先进水平，为解析丹参酮生物合成途径奠定了基础。研究结果全文发表在《美国化学会志》(*J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 3234–3241)。该系统可以快速整合新的模块，实现新基因功能鉴定及活性萜类产物生产，比如说我们在次丹参酮二烯合成途径基础上，整合细胞色素 CYP450 模块，实现了次丹参酮二烯下游产物铁锈醇的高效合成，为进一步阐述中药活性分子丹参酮奠定了基础。研究结果发表在《美国科学院院刊》(*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(29):12108–12113)。

该研究形成了以代谢酶为基本“模块”，强调全途径动态优化的人工合成途径组装新策略，对构建有效的外源代谢物生产基因工程菌株，提高生物合成效率具有科学指导意义。研究论文已被 *Nat. Biotechnol.*, *Nat. Chem. Biol.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *J. Am. Chem. Soc.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 等杂志论文引用，获得了很好的评价。其中，德克萨斯大学知名代谢工程学者 Hal S Alper 教授在《生物技术前沿观点》(*Curr. Opin. Biotechnol.* 2013, 24, 1023–1030) 上发表综述论文，将该论文选为特别关注论文 (Special interest)，指出模块途径工程可以快速构建代谢途径，并且二萜环化酶融合蛋白可以增加目标代谢产物产量 (The authors presented the modular pathway engineering (MOPE) strategy and its application for rapidly assembling a synthetic miltiradiene pathways in the *S. cerevisiae*. By engineering the enzyme active sites, the authors were able to enhance metabolic flux channeling to miltiradiene biosynthesis and achieved a high titer production)。随后，伦敦理工大学合成生物学知名学者 Mattheos AG Koffas 在 2014 年综述 (*Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 25, 86–94) 中将我们的论文选为杰出关注 (Outstanding interest)，指出高效新颖的模块途径工程策略的建立，大大加快了代谢途径的构建及优化 (An

innovative application for rapid assembling synthetic miltiradiene pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The strategy described facilitates a comprehensive evaluation of pathway variants involving multiple genes)。另外，MIT 著名代谢工程学者在 2015 年发表在《自然-生物技术》(*Nat. Biotechnol.*, 2015, 33, 377–383) 的研究论文，同时引用我们两篇论文，用于指导构建天然产物生产的共生生态系统。Schalk M 等人引用我们构建二萜环化酶融合蛋白的策略，用于设计生产香紫苏醇的 *E. coli* 工程菌株 (*J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 18900)。

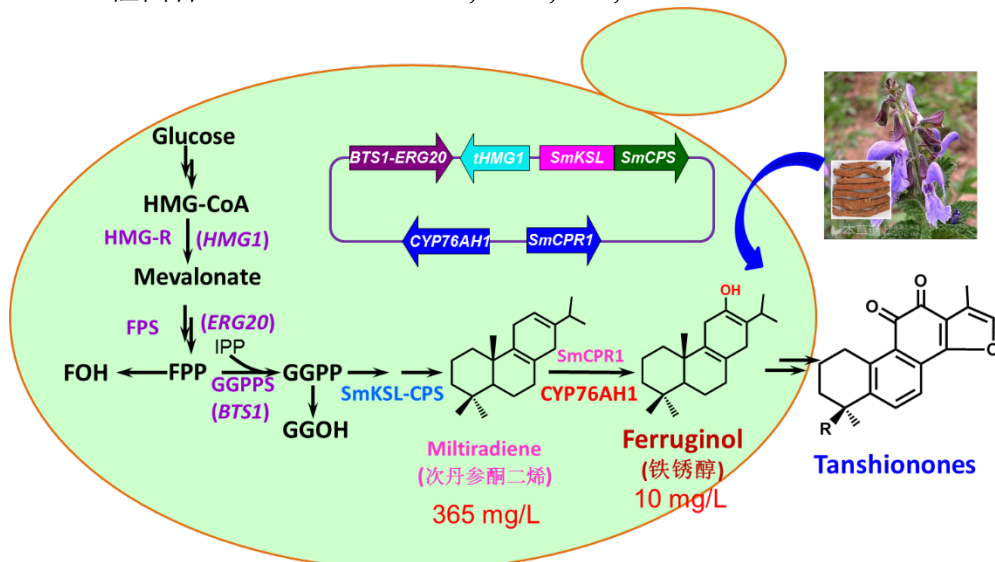


图 1：模块途径工程策略改造酵母合成植物源萜类化合物丹参酮前体

2) 氧化还原辅因子工程

为了实现对胞内 NAD(H)水平的直接、理性调控，首次构建了 NAD(H)营养缺陷原核微生物，实现胞外 NAD(H) 跨膜转运进入胞内。在大肠杆菌 *E. coli* 胞内表达转运蛋白 NTT4，进一步敲除 NAD 合成关键基因 *nadE*，获得了 NAD(H)营养缺陷表型工程菌株。利用该菌株，发现 *E. coli* 胞内 NAD 浓度可在正常值 4.4%-960% 的范围内变化，研究结果发表在《应用与环境微生物》(*Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77, 6133 – 6140)。随后，利用该策略构建了其他可转运 NAD 及其类似物的基因工程菌株，并成功用于调控胞内辅酶水平，增加全细胞氧化还原催化效率。部分研究结果发表于《微生物细胞工厂》(*Microb. Cell Fact.*, 2013, 12,103)，并申请了发明专利（申请号：201110227540.x）。该研究突破了 NAD(H)跨膜转运进入胞内的技术瓶颈，为构建其他可利用胞外 NAD(H)的生物学材料奠定了科学基础，为调控胞内氧化还原辅酶水平提供了新工具和新思路。美国 Sanford-Burnham Medical Research Institute 的 Andrei Osterman 教授在 E-mail 中称该工作具有“突破性”，在 NAD 代谢研究领域具有“很多用途”（I was really impressed by this ground-breaking work and its numerous implications in the field of NAD metabolism）。

3) 脂肪酸衍生物细胞工厂构建

长链脂肪酸及其衍生物（烷烃、脂肪醇）是生产生物燃料和精细化工产品的基础原料，但其传统供给方式与日益增长的需求存在突出矛盾。利用微生物生产脂肪酸类化合物，对高效利用生物质资源、减少温室气体和细微颗粒物排放具有重要战略意义，已成为合成生物技术研究的热点和前沿之一。申请人博士后阶段研究致力于利用合成生物学策略改造酿酒酵母，使其 高效合成生产脂肪酸衍生物。申请人首次在酵母中实现了长链烷烃的生物合成，并发现了制约烷烃生物合成的关键副反应，为将来实现航空燃料替代品的生物合成打好了基础。相关研究发表

在生物工程著名期刊《生物技术与生物工程》(*Biotechnol. Bioeng.* 2015, 112(6):1275-1279), 随后, 申请人构建了脂肪酸平台酵母菌株, 实现了长链脂肪酸, 脂肪醇, 烯烃的高效生物合成 (图 2), 长链脂肪酸和脂肪醇产量分别达到了 10.4 和 1.5 g/L, 是酿酒酵母的最高产量, 为将来实现从生物质到生物化学品打好了基础。该论文已经被 *Nature Communications* 接收。审稿人给予了极高的评价, 审稿人 1 评价该论文设计合理, 逻辑严密, 提供了足够的新颖有趣的结果, 该论文将会得到代谢工程界的赞誉。(The study is well-planned, logically presented, and provides sufficiently novel and interesting results. The manuscript should be appreciated among the metabolic engineering community.) 审稿人 2 评价该工作是过去五年中脂肪酸代谢工程里程碑式的研究, 论文数据和表达上乘。(This is a significant milestone and breakthrough in fatty acid overproduction works in last five years. The quality of data and presentation is very high in this manuscript)。

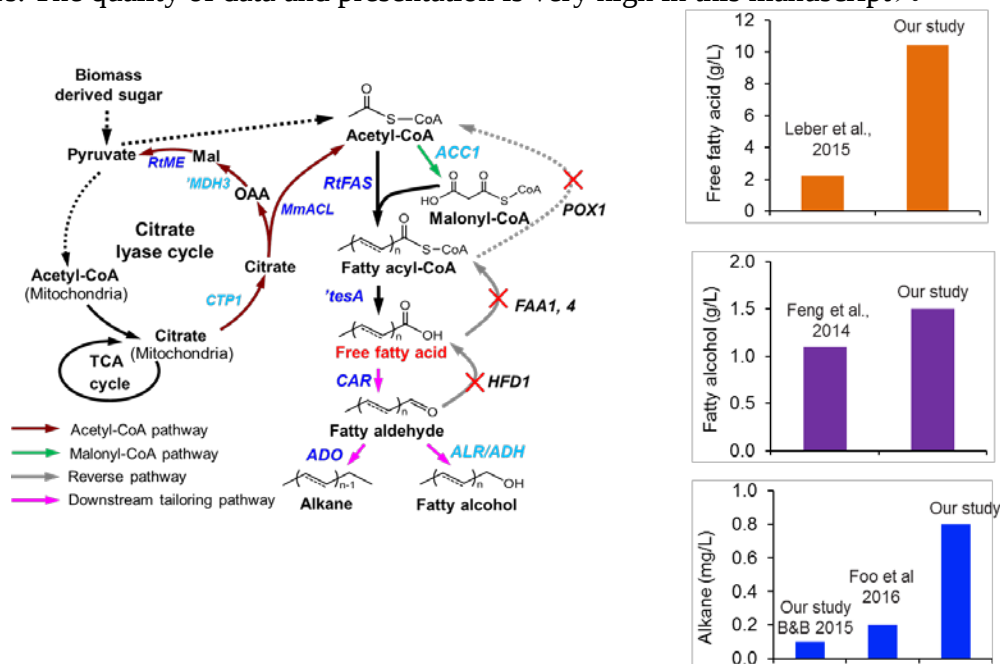
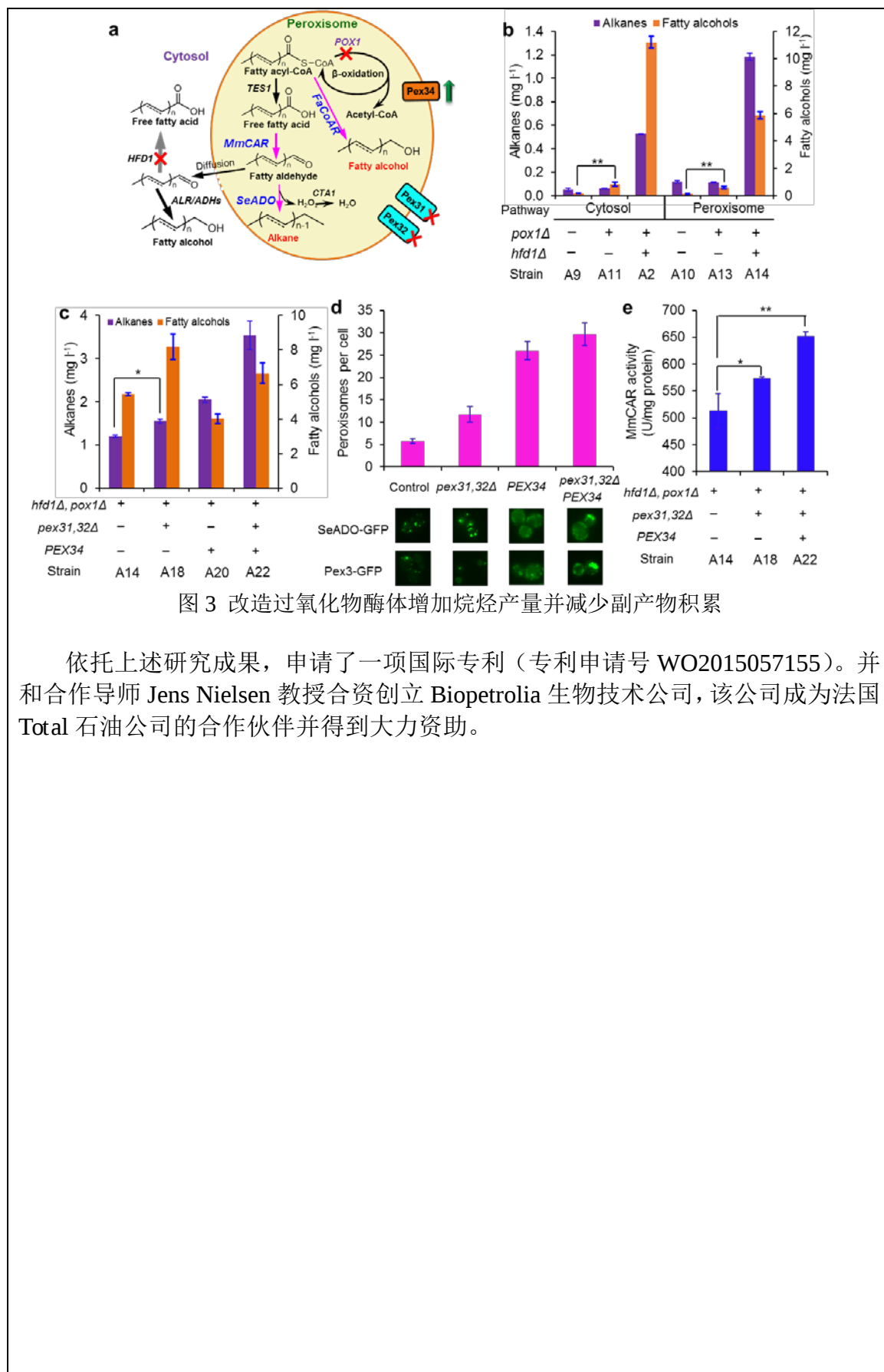


图 2 构建酿酒酵母细胞工厂高效合成脂肪酸, 烷烃和脂肪醇

申请人在构建烯烃途径时, 发现烯烃生物合成效率很低, 并且副产物脂肪醇产量很高。申请人推测烷烃最后一步脱羰基反应速率很低, 而前体脂肪醛会被胞浆的还原酶竞争向脂肪醇合成。申请人通过把烷烃合成途径靶向到过氧化物酶体, 避免了胞浆中高效醛还原酶的竞争。随后通过调控过氧化物酶体的数量和膜通透性, 进一步增加烷烃产量。在改造过氧化物酶体过程中, 发现了过氧化物酶体通透性发生了改变, 从而影响了烷烃和脂肪醇的比例。申请人在该课题中的实验设计得到了合作导师 Jens Nielsen 教授的赞誉, 因此和其一起承担了通讯作者, 该论文正在 *Nature Communications* 修回。



依托上述研究成果，申请了一项国际专利（专利申请号 WO2015057155）。并和合作导师 Jens Nielsen 教授合资创立 Biopetrolia 生物技术公司，该公司成为法国 Total 石油公司的合作伙伴并得到大力资助。

主要论著目录:

(1. 论文作者、题目、期刊名称、年份、卷期、页、总引次数、他引次数、期刊影响因子; 2. 著作: 著者、书名、出版社、年份)

目录列表最后请注明论文总引次数、他引次数、期刊影响因子的查询截止时间和查询数据库。

1. **Zhou Y.J.***, Buijs N.A., Zhu Z., Gómez D.O., Boonsombuti A., Siewers V., Nielsen J*. Harnessing peroxisomes for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals in yeast. **Nat. Commun.** 2016, in revision. IF **11.47** (*Corresponding author)
2. **Zhou Y.J.**, Buijs N.A., Zhu Z., Qin J., Siewers V., Nielsen J. Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories. **Nat. Commun.** **2016**, 7:11709 IF **11.47**
3. Guo J.†, **Zhou Y.J.†**, Hillwig M.L., Shen Y., Yang L., Wang Y., Zhang X., Liu W., Peters R.J., Chen X., Zhao Z.K., Huang L.Q., "CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts" **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **2013**, 110(29):12108–12113. (†equal contribution) IF **9.67** 引用**77**次
4. **Zhou Y.J.**, Gao W., Rong Q., Jin G., Chu H., Liu W., Yang W., Zhu Z., Li G., Zhu G., Huang L.Q., Zhao Z.K., "Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production" **J. Am. Chem. Soc.** **2012**, 134(6): 3234–3241 IF **12.11** 引用**119**次
5. **Zhou Y.J.**, Yang W., Wang L., Zhu Z., Zhang S. and Zhao Z.K., Engineering NAD⁺ availability for *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis: a case study for dihydroxyacetone production. **Microb. Cell Fact.**, **2013**, 12:103. IF **4.22** 引用**16**次
6. Buijs N.A.†, **Zhou Y.J.†**, Siewers V., Nielsen J. Long-chain alkane production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.** **2015**, 112(6):1275-1279. (†equal contribution). IF **4.13** 引用**7**次
7. **Zhou Y.J.**, Wang L., Yang F., Lin X., Zhang S., Zhao Z.K. "Determining the extremes of the cellular NAD(H) level by using an *Escherichia coli* NAD⁺ auxotrophic mutant" **Appl. Environ. Microbiol.** **2011**, 77(17):6133–6140. IF **3.67** 引用**12**次
8. Wang K. †, **Zhou Y.J.†**, Liu H. †, Cheng K., Mao J., Wang F., Liu W., Ye M., Zhao Z. K., Proteomic analysis of protein methylation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Proteomics**, **2015**, 114:226-233. (†equal contribution) IF **3.89** 引用**4**次
9. **Zhou Y.J.**, Buijs N.A., Siewers V., Nielsen J. Fatty acid-derived biofuels and chemicals production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, **2014**, 2: 32 引用**13**次
10. **Zhou Y.J.**, Yang F., Zhang S., Tan H., Zhao Z.K. "Efficient gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* using marker cassettes with long homologous arms prepared by the restriction-free cloning strategy" **World J Microbiol Biotechnol.** **2011**, 27(12):2999–3003. IF **1.78** 引用**10**次
11. **Zhou Y.J.**, Zhao Z.K. "Advanced biofuel-oriented engineering of fatty acid pathway: a review" **Chin. J. Biotech.** **2011**, 27(9): 1261–1267
12. Zhu Z., Zhang, S., Liu H., Shen H., Lin X., Yang F., **Zhou Y.J.**, Jin G., Ye, M., Zou H., Zhao Z.K., A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Nat. Commun.** **2012**, 3,1112. IF **11.47** 引用 **69** 次
13. Qin J., **Zhou Y.J.**, Krivoruchko A., Huang M., Liu L., Khoomrung S., Siewers V., Jiang B., Nielsen J. Modular pathway rewiring of *Saccharomyces cerevisiae* enables

high-level production of L-ornithine. **Nat. Commun.**, **2015**, 6:8224 IF **11.47** 引用3次

14. Wang L., **Zhou Y.J.**, Ji D., Lin X., Liu Y., Zhang Y., Liu W., Zhao Z.K. Identification of UshA as a major enzyme for NAD degradation in *Escherichia coli*. **Enzyme Microb. Technol.**, **2014**, 58-59:75-79.
15. Chen Y., **Zhou Y.J.**, Nielsen J. Enabling Technologies to Advance Microbial Isoprenoid Production. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, **2015**, 148:143-60.
16. Lin X., Wang Y., Zhang S., Zhu Z., **Zhou Y.J.**, Yang F., Sun W., Wang X. and Zhao Z.K. Functional integration of multiple genes into the genome of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. **FEMS Yeast Res.**, **2014**, 14(4): 547-555.
17. Wang L, **Zhou Y.J.**, Ji D.B., Zhao ZK. "An accurate method for estimation of the intracellular aqueous volume of *Escherichia coli* cells". **J. Microbiol. Methods**, **2013**, 93(2): 73-76
18. Lin X.P., Yang F., **Zhou Y.J.**, Zhu Z.W., Jin G.J., Zhang S.F., Zhao Z.K. High-efficient colony PCR method for red yeast and its applicability in identification of two leucine auxotroph mutants. **Yeast**. **2012**, 29(11), 467–474
19. Ji D.B., Wang L., **Zhou Y.J.**, Yang W., Wang Q., Zhao Z.K., "Oxidative Decarboxylation of L-malate by using a synthetic bioredox system". **Chin. J. Catal**, **2012**, 33(3): 530–535
20. Yang F., Zhang S.F., **Zhou Y.J.**, Zhu Z.W., Lin X.P., Zhao Z.K., "Characterization of the NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*" **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **2012**, 94(4):1095–1105
21. Yang, F., Tan H., **Zhou Y.J.**, Lin X., Zhang, S.* "High-Quality RNA Preparation from *Rhodospiridium toruloides* and cDNA Library Construction Therewith" **Mol. Biotechnol.** **2010**, 47(2):144–151.
22. Zhao G.R., Luo T., **Zhou Y.J.**, Jiang X., Qiao B., Yu F.M., Yuan, Y.J., "fabC of *Streptomyces lydicus* involvement in the biosynthesis of streptolydigin" **Appl Microbiol Biotechnol.** **2009**, 83(2):305–313.

发表论文情况统计

	收录情况		
	SCI	IF>4	IF>9.5
第一作者论文	11	5	4
通讯作者*	1	1	1
非第一作者	13	5	2
总计	24	10	6

注*: 既为通讯作者又是第一作者

主持(参与)科研项目及申请专利:

(项目来源、项目名称、经费、个人在其中的作用)

- 2012-2016 瑞典研究基金委Formas项目: Excellence Center for Metabolic Engineering, Jens Nielsen教授主持, 2500万瑞典克朗。申请人作为主要项目成员从事酿酒酵母合成生物燃料。
- 2012-2015 瑞典研究基金委Vetenskapsrådet项目: Engineering of Acetyl-CoA Metabolism in Yeast, Jens Nielsen教授主持, 640万瑞典克朗。申请人作为主要项目成员从事乙酰辅酶A (Acetyl-CoA) 代谢途径的构建。
- 2013-2016 瑞典研究基金委Vetenskapsrådet项目 Biobased production of diesel and jetfuel, Jens Nielsen教授主持, 1700万瑞典克朗。申请人作为主要项目成员从事酿酒酵母合成生物燃料(航空燃料)。

获科技奖情况：

（项目名称、奖项、获奖时间、本人在其中的作用及排名、获奖总人数）

2015 年药学会科学技术奖一等奖 （主要参与人构建了中药丹参酮前体细胞工厂的构建以及阐述了相关合成途径。第六完成人，总人数 15）

获各类荣誉奖情况：

2015 代谢工程峰会优秀海报奖 (2015)

2013 年工业生物技术进展报告青年人才 (2013)

辽宁省优秀学术论文一等奖 (2012)

中科院优秀毕业生 (2012)

地奥-中科院奖学金 (2012)

中科院研究生院三好学生 (2011)

中科院优秀学生干部 (2010)

益海嘉里粮油奖学金 (2008)

江南大学优秀毕业生 (2006)

江苏省优秀本科毕业论文 (2006)

无锡市三好学生 (2005)

国民淀粉奖学金 (2005)

国家奖学金 (2003, 2005)

江南大学优秀学生党员 (2005)

江南大学三好学生 (2003, 2005)

全国大学生数学建模竞赛全国一等奖 (2004)

江南大学一等奖学金 (2004, 2005)

江南大学二等奖学金 (2003, 2006)

受聘后拟开展研究工作的计划和思路（包括研究方向、内容和目标）：

如前所述，资源短缺，环境恶化是制约着全球可持续健康发展的两大难题。另外，我国还面临人口老龄化的新形势和不断增长的物质健康新需求。所以，立足国家能源与健康需求，结合我所学科优势与国际生物化工发展新潜力，开展先进生物制造领域的创新性研究和技术开发，为经济可持续发展，国民健康提供科技保证。申请人将从以下四个方面开展研究。

1、化学与生物交叉的生物制造

充分发挥我所催化学科优势，寻找与生物催化互补的研究课题。比如说，我们所在甲醇制烯烃方面的研究可以拓展到生物催化。利用甲醇为底物，以甲醇酵母为催化剂，改造细胞内代谢途径，是的能将甲醇转化成能源化学品（如脂肪酸衍生物）、精细化学品（如尼龙前体 1,4-丁二醇）以及生物医药（紫杉醇）（图 3A）。从而将酶制烯烃拓展到煤制高附加值化学品。再如，我们可以开展绿色化学方法，将生物质高效转化为糖类，然后利用微生物细胞合成一系列化学品，特别是脂肪酸。本人已经构建了一株能高产脂肪酸的酵母菌株，如果能够开发出高效的光催化剂，以太阳能为能量，催化烷烃或者是脂肪酸的合成，真正实现生物质到高密度生物燃料的高效合成（图 3B）。

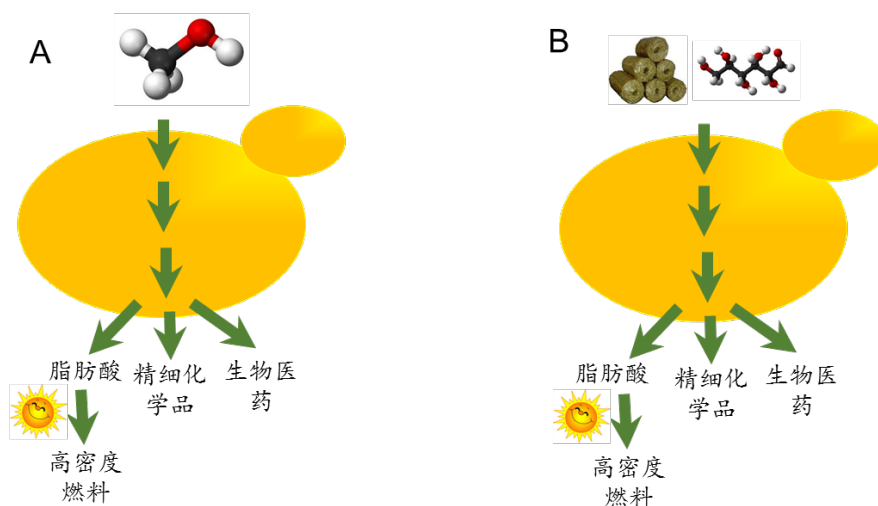


图 4、化学与生物交叉的生物制造示意图

2、生物化学品

我国正处于资源短缺和环境污染双重压力下，实现资源可持续利用，生物化学品洁净生产是解决这一难题的有效策略。目前，各国都重视利用合成生物学策略生产大宗化学品，比如欧盟在“Horizon 2020”框架内推出了预算为 38 亿欧元的“Bio-based Industries Initiatives”行动计划。所以，利用合成生物学高效洁净合成生物基化学品不仅是实现“中国制造”到“中国创造”的重要途径，还是提高我国在化学化工行业国际竞争力的保障。

选取需求量大的生物基化学品如 1,6-己二酸、3-羟基丙酸，粘康酸（muconic acid）等，利用生物信息学，设计和构建不同的代谢途径，并在体内体外评估代谢途径效率。在构建细胞工厂过程中，着眼于整个细胞的协调平衡，凝练出生物基化学品生产的共性科学问题，实现生物基化学品生产的高产率，高产量以及高效率，充分利用中科院合成生物学实验室的产业化平台，构建完整的高端化工产品生产线。

3、药物活性分子生物制造

药用活性成分是很多药物特别是植物源中药的物质基础。许多药用植物生长受环境因素影响较大；有些珍稀药材生长缓慢，甚至难以人工种植；大多数药用活性成分在中药材中含量低微，结构复杂，性质不稳定，化学合成困难或产率较低，而直接提取

又面临成本高、资源少等。化学全合成虽然在天然产物合成中有很多成功的案例，但是其产率很低，大多处于实验室水平。实际上，绝大多数中药活性成分分子结构复杂，并且具有多个手性中心，其合成过程涉及到多步纯化过程，产率大大降低。近年来，代谢工程及合成生物技术的发展，构建高效微生物“细胞工厂”有望实现药物活性分子等天然产物可持续低成本生产。比如，加州大学学者利用合成生物技术，构建酿酒酵母微生物细胞工厂，实现了抗疟疾药物青蒿素的高效生产。目前，半合成青蒿素已经独家授权给赛诺菲（Sanofi）制药公司，2014 年生产 60 吨，稳定了青蒿素供应，降低了成本。值得一提的是，我国学者屠呦呦团队发现了青蒿素（2011 年获得拉斯克临床医学奖），却在现代生物技术落后于国际同行，无缘大规模生产。我国中药资源丰富，药用分子功能多样，比如说，近期哈弗医学院学者表明雷公藤活性成分雷公藤红素（celastrol）具有很强的减肥功效（Cell, 2015, 161, 999–1011），充分利用这些活性分子，稳定供给，将有利于保证国民健康。

借助于合成生物学技术，并结合我所在本草物质组的积累，解析中药活性分子的合成机制，并逐步将研究成果推广到实际应用，服务于国民健康。选取几类药物活性分子如丹参酮、紫杉醇、雷公藤等，构建前体底盘生物，解析其生物合成途径，发现下游代谢涉及的细胞色素 P450 氧化酶等。实现途径解析和物质生产的螺旋式结合，在此过程中，深入阐释生物合成机制，启发其他活性分子生物合成途径解析，以实现这些化合物的高效生物制造。

4、生物催化（合成生物学）机制研究

先进合成生物学策略是快速构建细胞工厂的保证，细胞工厂构建过程中，有一些共性技术难题，比如说途径快速组装，中间代谢产物(前体)毒性，前体供应，代谢途径协调表达。在解决这些难题的过程中，凝练出共性科学问题，并发展相应技术。申请人在前期发展的代谢途径快速组装基础上，研究细胞内代谢途径的时空协调，将细胞内代谢途径根据时空特性分成多个模块，分别协调调控模块之间的物质代谢和能量代谢，最大程度实现目标产物合成效率，并增加细胞在发酵条件下的活性。发展的新策略新方法将应用于以下两个研究方向：药物活性分子生物制造和生物化学品生物制造。

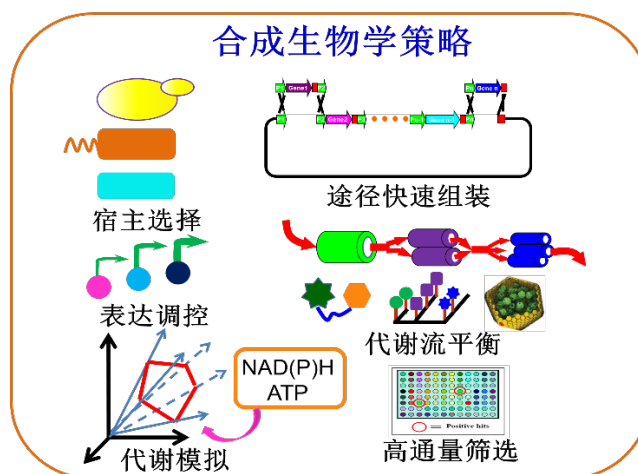


图 4：合成生物学新策略研究，以实现细胞工厂快速构建，优化