

## 工业生物技术专刊序言

蔡真, 李寅

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

**摘要:** 以生物催化和生物转化为核心的工业生物技术是实现社会和经济可持续发展的有效手段。本期专刊分别从基因工程、代谢工程与合成生物学、生理工程、发酵工程与生化工程、生物催化与生物转化、生物技术与方法等方面, 介绍了我国在工业生物技术领域的最新研究进展。

**关键词:** 工业生物技术, 基因工程, 代谢工程, 合成生物学, 生理工程, 生物催化与生物转化

## Preface for special issue on industrial biotechnology

Zhen Cai, and Yin Li

*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*

**Abstract:** Industrial biotechnology, which employs microorganisms or enzymes to produce industrial useful products, has been considered as a promising solution for the sustainable development of society and economy. This special issue collects some recent research progresses on industrial biotechnology in China, including reviews and research articles in the field of genetic engineering, metabolic engineering and synthetic biology, physiological engineering, fermentation engineering and biochemical engineering, biocatalysis and biotransformation, as well as new biotechniques and methods.

**Keywords:** industrial biotechnology, genetic engineering, metabolic engineering, synthetic biology, physiological engineering, biocatalysis and biotransformation

进入 21 世纪以来, 矿石资源和能源的不断减少、环境污染的日益严重, 给传统的化石经济带来了巨大冲击, 各国均在探索新的社会和经济的可持续发展模式。在此背景下, 工业生物技术因其资源可再生、环境友好、过程简单且高效专一等特点, 一经提出便备受关注, 被普遍认为是可以解决人类目前面临的资源、能源及环境危机的有效手段。为此, 美国、日本和欧洲的一些发达国家已制定

了在今后几十年中用生物过程逐步取代化学过程的战略计划。针对我国经济高速发展、人均资源严重短缺、环境污染非常严重的具体国情, 大力发展工业生物技术, 更是实现我国社会可持续发展的重要途径之一。

工业生物技术从提出至今不过十多年的时间, 但发展却非常迅速。就全球而言, 现代生物技术已经渗透到包括医药、农业、能源、化工、环保等几

乎所有的工业领域,并扮演着极为重要的角色。生物技术在环境、材料、信息等领域的应用也在不断扩大和加强。我国工业生物技术科技和产业发展迅速,部分产业的规模在世界上已占有举足轻重的地位。然而技术水平低、市场竞争力弱仍是制约我国工业生物技术产业发展的瓶颈问题。在这样的背景下,《生物工程学报》策划并组织出版本期“工业生物技术”专刊,集中介绍国内该领域专家学者在基因工程、代谢工程与合成生物学、生理工程、发酵工程与生化工程、生物催化与生物转化等方面的最新研究成果。

在基因工程研究领域中,开发新功能的酶/活性多肽、提高蛋白质的异源表达量、酶编码基因的鉴定及酶活性的快速检测等依然是研究热点和重点。江南大学陈卫等<sup>[1]</sup>通过基因搜索工具筛选出一种新的 IIa 类细菌素,并通过融合表达实现了该细菌素在大肠杆菌中的高效可溶表达。为了实现目标蛋白在毕赤酵母中的规模化制备,江南大学许正宏等<sup>[2]</sup>用双质粒共表达体系将一种潜在的糖尿病治疗药物——人胰高血糖素样肽-1-人血清白蛋白融合蛋白在毕赤酵母中的表达量提高了 50%。值得一提的是,研究者还开发了利用硝酸纤维素膜固定菌落分泌的蛋白,再利用将滤膜与抗体杂交显色的免疫斑点法,可以同时筛选几百个转化子中目标蛋白的表达量,提高了筛选的效率和准确度,为其他类似研究提供了借鉴。河北大学张利平等<sup>[3]</sup>用重叠延伸 PCR 的方法获得三孢布拉霉 CarRA 蛋白的编码基因,并在大肠杆菌体内构建了该酶的活性检测方法,可以通过颜色互补,方便快速地检测出该酶的番茄红素环化酶功能活性和八氢番茄红素合成酶功能活性。

发酵工业是工业生物技术的核心产业。目前,已有超过 500 种产品(覆盖 50 个行业)是通过大规模的微生物发酵生产的<sup>[4]</sup>。目前我国发酵工业正以每年 20% 的速度快速发展,预计到 2015 年,我国发酵工业产值将超过 1 万亿人民币。针对不同发酵产品,许多研究者分别从代谢工程、合成生物学、生

理工程、发酵工程、生化工程等角度,开展了创新的研究工作。

在代谢工程方面,宿主中目标产物代谢途径中还原力 NAD(H) 或 NADP(H) 的不平衡问题,严重制约了目标产物的大量生产。为了解决此问题,中国科学院微生物研究所李寅和周杰等<sup>[5]</sup>阻断了蓝藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中聚羟基丁酸酯 PHB 合酶编码基因,在不影响细胞生长的情况下,减少了副产物 PHB 的合成,提高了细胞内 NADPH 的水平,构建了一个改变碳流向并具有充足还原力的工程蓝藻,为蓝藻产化学品奠定了基础。南京工业大学姜岷等<sup>[6]</sup>则针对大肠杆菌利用葡萄糖生产丁二酸时 NADH 的供给问题,在宿主中过量表达依赖 NAD<sup>+</sup> 的苹果酸脱氢酶,使重组菌恢复了厌氧条件下代谢葡萄糖的能力。同时为了减少副产物形成,研究者还敲除了大肠杆菌中乳酸脱氢酶和丙酮酸-甲酸裂解酶的编码基因,阻断了丁二酸合成的代谢支路。最终采取两阶段发酵时,丁二酸浓度和得率分别达到 15 g/L 和 1 g/g 葡萄糖,生产强度为 1 g/(L·h)。

除了改变代谢途径中还原力不平衡的问题以外,提高代谢途径中限速酶的表达量也是加强整个代谢途径、提高目标产量的有力方法。在这一方面,江南大学饶志明和许正宏等<sup>[7]</sup>,在研究来源于钝齿棒杆菌的 N-乙酰鸟氨酸转氨酶的酶学性质的基础上,在钝齿棒杆菌中过表达该基因,将其精氨酸产量提高了 15%。另外,在非天然宿主中构建目标产物代谢途径以及加强天然宿主利用非天然底物的能力这两个方面也取得了一定的进展。江南大学石贵阳和张梁等<sup>[8]</sup>从自然样品中筛选分离得到一株能在 pH 2.5 (乳酸调节) 的培养基中生长且不利用乳酸的酵母,通过在其中表达来源于米根霉 *As3.819* 的乳酸脱氢酶编码基因并初步优化其培养条件,可使乳酸产量达到 40 g/L 以上。大连理工大学袁文杰和白凤武等<sup>[9]</sup>,从马克斯克鲁维酵母中扩增出菊粉酶编码基因,并导入酿酒酵母工业菌株中,以 200 g/L 粗菊芋粉生料进行乙醇发酵时,重组菌株的发酵

终点乙醇浓度可达 55 g/L, 糖醇转化率分别为 0.495, 达到理论值的 96.9%, 为非粮作物菊芋生产燃料乙醇奠定了良好基础。

始于 21 世纪初的合成生物学的核心是通过设计和构建自然界中不存在的人工生物系统, 来解决能源、材料、健康和环保等问题。主要技术包括 DNA 的合成, 来自多种微生物中基因及代谢途径的组装, 多基因的精密调控等。为了构建抗疟疾药青蒿素前体——紫穗槐-4,11-二烯的人工合成途径, 军事医学科学院方宏清等<sup>[10]</sup>在大肠杆菌中引入人工合成的紫穗槐-4,11-二烯合酶基因, 利用大肠杆菌内源的法尼基焦磷酸, 成功获得了紫穗槐-4,11-二烯。另外, 还通过引入粪肠球菌的甲羟戊酸途径来增加前体供给, 并过表达代谢途径中 3 个限速酶, 最终使摇瓶中紫穗槐-4,11-二烯产量达到 235 mg/L, 为高效合成紫穗槐-4,11-二烯奠定了基础。

以上代谢工程和合成生物学均是以提高目标产物产量为主要目标。但是要想实现实际的工业应用, 除了提高目标产物的合成能力外, 菌株的工业适应性 (包括抵抗生产过程中 pH、温度、渗透压等环境条件的波动, 对产物或底物抑制不敏感, 菌株在发酵过程中的稳定性等) 也同样非常重要, 生理工程的概念应运而生<sup>[11]</sup>。为了提高工业酿酒酵母在乙醇发酵中抗温度胁迫的能力, 中国科学院微生物研究所何秀萍和张博润等<sup>[12]</sup>先用传统的化学诱变剂 (硫酸二乙酯) 处理酵母细胞, 再提取优势突变株的 DNA, 经上述诱变剂处理后重新导入亲本细胞, 最终获得重组菌株的最高生长温度比原始菌株提高了 3 °C, 在 30 °C~40 °C 范围内具有良好的糖醇转化率和乙醇产量, 发酵 200 g/L 葡萄糖能够产生 83.8~91.2 g/L 乙醇。这一结合了化学诱变和基因组 DNA 诱变的方法, 也可为改造其他宿主的其他生理功能提供借鉴思路。

除了前述基因工程、代谢工程、合成生物学、生理工程这些工业生物技术的上游研究以外, 针对发酵产品的发酵工程以及针对酶的生化工程这类

中、下游研究同样重要。在发酵工程方面, 江南大学吴敬等<sup>[13]</sup>优化了大肠杆菌表达嗜热子囊菌角质酶的发酵条件, 最终使 3 L 发酵罐中角质酶酶活达到 506 U/mL, 是迄今国内外报道细菌来源角质酶的最高水平。集美大学蔡慧农等<sup>[14]</sup>优化了 7 L 罐中法夫酵母产虾青素的 pH 值调控方式及补料培养基成分对发酵的影响, 最终在 1 m<sup>3</sup> 罐中试补料发酵时, 虾青素和总类胡萝卜素的体积产率分别达到 279.96 mg/L 和 618.01 mg/L。而在生化工程方面, 四川大学廖学品等<sup>[15]</sup>用三价铁改性胶原纤维, 在固定过氧化氢酶时表现出了优良的固定化载体性能。

生物催化与生物转化是用具有催化能力的全细胞或酶将原料转化为目标产品, 被经济合作与发展组织 (OECD) 定位为构建和环境协调的产业体系的关键技术。在这一方面, 江南大学石贵阳等<sup>[16]</sup>在枯草芽胞杆菌中表达羰基还原酶, 实现了用全细胞催化底物 1-苯基-2-甲氨基丙酮生成 *d*-伪麻黄碱。由于该酶促反应需要 NADH, 所以研究者把该反应置于枯草芽胞杆菌中进行, 并利用细胞内源的葡萄糖脱氢酶完成辅酶再生。最终在葡萄糖存在的情况下, 该重组枯草芽胞杆菌生成 *d*-伪麻黄碱的产量为 97.5 mg/L, 底物摩尔转化率为 24.1%。为了研究温度在  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶分解酵母  $\beta$ -葡聚糖时的作用, 山东大学卢雪梅等<sup>[17]</sup>采用分体模块设计, 研制了一种新型的温度梯度产生装置, 可以快速、精准、连续地实现多个温度的控制。研究结果不但能为寡糖生产提供精确的温度控制参数, 也为其他需要精确连续控温的实验提供了方便。通过分子定向进化, 改善和提高酶的性能, 一直是这一领域的研究热点。暨南大学姚冬生等<sup>[18]</sup>采用易错 PCR 的方法, 获得了耐高温和在酸、碱条件下均稳定的黄曲霉毒素解毒酶突变体, 为提高体外直接降解黄曲霉毒素的效率奠定了基础。

最后, 在生物技术与方法方面, 卫生部抗生素生物工程重点实验室武临专等<sup>[19]</sup>开发了一种快速检测抗生素洋橄榄叶素的化学方法, 主要包括 TLC 硅

胶板分离、NaOH 溶液显色、HPLC 和 LC-MS 分析。同时, 还可以利用该抗生素生物合成基因簇中的 *tgd* 基因的 PCR 检测与序列分析, 对该抗生素的生产菌进行快速检测。

希望本期专刊能为国内从事相关领域的研究者提供借鉴和参考, 促进我国工业生物技术进一步发展。

## REFERENCES

- [1] Xie Y, Chen HQ, Zhang QX, et al. Expression and characterization of a new class IIa bacteriocin. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 976–982.  
谢燕, 陈海琴, 张秋香, 等. 一种新型 IIa 类细菌素的克隆表达和活性鉴定. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 976–982.
- [2] Wang H, Dou WF, Zhang XM, et al. High-level expression of fusion protein GGH in *Pichia pastoris* GS115 by constructing a double plasmid co-expression system. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 983–989.  
王慧, 窦文芳, 张晓梅, 等. 应用双质粒共表达体系提高融合蛋白 GGH 在毕赤酵母 GS115 中的表达量. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 983–989.
- [3] Tang H, Shi N, Yu M, et al. Cloning of *Blakeslea trispora* carRA gene by PCR-driven overlap extension and construction of an activity detection system. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 990–997.  
汤晖, 石楠, 于森, 等. 重叠延伸 PCR 克隆三孢布拉霉 carRA 基因及其功能活性检测系统的构建. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 990–997.
- [4] Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14: 438–443
- [5] Xie J, Zhou J, Zhang HF, et al. Increasing reductant NADPH content via metabolic engineering of PHB synthesis pathway in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 998–1004.  
解鹃, 周杰, 张海峰, 等. 阻断集胞藻 6803 PHB 合成途径提高胞内 NADPH 含量. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 998–1004.
- [6] Liang LY, Ma JF, Liu RM, et al. Effect of overexpression of malate dehydrogenase on succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 1005–1012.  
梁丽亚, 马江锋, 刘嵘明, 等. 过量表达苹果酸脱氢酶对大肠杆菌 NZN111 产丁二酸的影响. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1005–1012.
- [7] Xu MJ, Zhang X, Rao ZM, et al. Cloning, expression and characterization of N-Acetylornithine aminotransferase from *Corynebacterium crenatum* and its effects on L-arginine fermentation. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 1013–1023.  
徐美娟, 张显, 饶志明, 等. 钝齿棒杆菌 N-乙酰鸟氨酸转氨酶的克隆表达分析及其重组菌的精氨酸发酵. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1013–1023.
- [8] Zhang Q, Zhang L, Ding ZY, et al. Metabolic engineering of wild acid-resistant yeast for L-lactic acid production. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 1024–1031.  
张勤, 张梁, 丁重阳, 等. 代谢工程改造野生耐酸酵母生产 L-乳酸. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1024–1031.
- [9] Li NN, Yuan WJ, Wang N, et al. Ethanol fermentation from *Jerusalem artichoke* tubers by a genetically-modified *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of secreting inulinase. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 1032–1039.  
李楠楠, 袁文杰, 王娜, 等. 菊粉酶基因在酿酒酵母中的表达及乙醇发酵. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1032–1039.
- [10] Wu T, Wu SM, Yin Q, et al. Biosynthesis of amorpho-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli* through introducing mevalonate pathway. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 1040–1048.  
吴涛, 吴胜明, 殷晴, 等. 在大肠杆菌内引入甲羟戊酸途径高效合成抗疟药青蒿素前体——紫穗槐-4,11-二烯. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1040–1048.
- [11] Zhang YP, Zhu Y, Zhu Y, et al. The importance of engineering physiological functionalities into microbes. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(12): 664–672.
- [12] Liu XY, He XP, Lu Y, et al. Improvement of thermal adaptability and fermentation of industrial ethanologenic yeast by genomic DNA mutagenesis-based genetic recombination. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 1049–1056.  
刘秀颖, 何秀萍, 卢莹, 等. 基于基因组 DNA 诱变的遗传重组改造乙醇工业酵母的耐热性及发酵性能. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1049–1056.
- [13] Zhang Y, Chen S, Wu D, et al. Preparation of recombinant cutinase and its application in surface modification of poly(ethylene terephthalate). *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 1057–1064.

- 1057-1064.  
张瑶, 陈晟, 吴丹, 等. 重组角质酶的发酵制备及其对涤纶纤维的表面改性. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1057-1064.
- [14] Ni H, Hong QL, Xiao AF, et al. Characterization and evaluation of an astaxanthin over-producing *Phaffia rhodozyma*. Chin J Biotech, 2011, 27(7): 1065-1075.  
倪辉, 洪清林, 肖安凤, 等. 一株法夫酵母虾青素高产菌株的生产性能. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1065-1075.
- [15] Chen S, Song N, Liao XP, et al. Immobilization of catalase on Fe (III) modified collagen fiber. Chin J Biotech, 2011, 27(7): 1076-1081.  
陈爽, 宋娜, 廖学品, 等. 以 Fe(III) 改性胶原纤维为载体固定过氧化氢酶. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1076-1081.
- [16] Peng YH, Zhang L, Ding ZY, et al. Asymmetric biosynthesis of d-pseudoephedrine by recombinant *Bacillus subtilis*. Chin J Biotech, 2011, 27(7): 1082-1091.  
彭艳红, 张梁, 丁重阳, 等. 重组枯草芽胞杆菌不对称还原产 d-伪麻黄碱. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1082-1091.
- [17] Duan F, Lu XM, Duan YC, et al. Effect of continuous temperature change on hydrolytic products of yeast  $\beta$ -glucan by endo- $\beta$ -1,3-glucanase. Chin J Biotech, 2011, 27(7): 1092-1099.  
段峰, 卢雪梅, 段永成, 等. 连续温度变化对  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶解酵母  $\beta$ -葡聚糖的影响. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1092-1099.
- [18] Zhang S, Xing KK, Hu YD, et al. Directed evolution of aflatoxin detoxifzyme in vitro by error-prone PCR. Chin J Biotech, 2011, 27(7): 1100-1108.  
张赛, 邢克克, 胡亚冬, 等. 基于易错 PCR 的黄曲霉素解毒酶体外分子定向进化. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1100-1108.
- [19] Li SF, Wu LZ, Chen FF, et al. Rapid identification of elaiophylin from *Streptomyces hygroscopicus* 17997, a geldanamycin producer. Chin J Biotech, 2011, 27(7): 1109-1114.  
李书芬, 武临专, 陈菲菲, 等. 快速鉴定格尔德霉素产生菌——吸水链霉菌 17997 中的洋橄榄叶素. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1109-1114.