

序 言

朱敦明 研究员，博导，中国科学院“百人计划”、天津市“千人计划”入选者。现任中国科学院天津工业生物技术研究所副所长、工业酶国家工程实验室副主任、天津市生物催化技术工程中心主任。研究方向为新型生物催化剂的发现、改造及其绿色生物催化生产工艺的研发，承担了包括国家自然科学基金、973 计划等多项国家和院市科研项目的研究工作，与国内外企业开展广泛合作，并取得丰硕成果，包括处于中试产业化阶段的“天冬氨酸的绿色生产工艺”等。在 *JACS*, *ASC*, *Org Lett*, *AEM*, *ChemBioChem* 等刊物发表论文 70 多篇，邀请综述和专著章节 9 篇。1995 年获得中国科学院自然科学一等奖，1997 年获得国家科学技术委员会自然科学三等奖，2007 和 2008 年两次获得 Elsevier Ltd 出版公司颁发的 Tetrahedron: Asymmetry Most Cited Paper Award 奖项。担任国际生物催化期刊 *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 和《生物工程学报》编委，中国微生物学会酶工程专业委员会委员。



2014 工业生物技术专刊序言

朱敦明，田朝光

中国科学院天津工业生物技术研究所，天津 300308

摘要：工业生物技术是解决人类目前面临的资源、能源及环境危机的有效手段。本期专刊结合第七届中国工业生物技术发展高峰论坛，报道了我国工业生物技术领域专家学者在生物信息学、微生物细胞工厂的模拟设计与构建、工业发酵工程、工业酶的改造与应用、高通量筛选方法等领域取得的最新研究进展。

关键词：工业生物技术，生物信息学，微生物细胞工厂，工业发酵工程，工业酶，高通量筛选

Preface for special issue on industrial biotechnology (2014)

Dunming Zhu, and Chaoguang Tian

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

Abstract: Industrial biotechnology provides practical solutions to the challenges in the areas of resources, energy and environment. Based on the 7th China Summit Forum on Industrial Biotechnology Development, this special issue reports the latest advances in the fields of bioinformatics, microbial cell factories, fermentation engineering, industrial enzymes and high throughput screening methods.

Keywords: industrial biotechnology, bioinformatics, microbial cell factories, fermentation engineering, industrial enzymes, high throughput screening

工业生物技术是以微生物或酶为催化剂进行物质转化,大规模生产人类所需要的化学品、医药、能源、材料等的新兴学科,是解决人类目前面临的资源、能源及环境危机的有效手段。发展工业生物技术、推动生物制造产业,是我国实现社会经济可持续发展的重要战略途径。为了增强工业生物技术集成创新能力与成果转化能力,推进我国工业生物技术和生物产业的发展,继自2007年起在天津、湖州、青岛、成都等地已成功举办6届以后,由中国科学院生命科学与生物技术局、科技部中国生物技术的发展中心、国家发改委高技术产业司、中国生物工程学会联合天津市科学技术委员会主办,中国科学院天津工业生物技术研究所承办,以“促进学科交叉,推动产业成长”为主题的第七届中国工业生物技术发展高峰论坛于2013年5月10日至12日在天津召开。

本次论坛邀请了9位国际专家、国内管理部门、战略科学家及行业龙头企业的专家作大会主题报告。聚焦工业生物技术领域的关键技术和产品,在工业合成生物学、工业生物与计算科学、生物炼制与生物能源、生物基材料、生物催化工程、工业蛋白质科学、微生物资源与环境生物技术等方向,组织13个分会,近90个分会报告和110多个墙报展讲。这次论坛的参会人员达到400多人,为我国工业生物技术领域的专家、学者、金融界和企业界人士提供一个高水平的交流平台。《生物工程学报》曾多次与该论坛合作出版专刊,集中反映有关生物能源、发酵生物产品、生物基化学品、生物炼

制等方面的最新研究成果,得到了读者和同行专家的一致好评。为了传播本次论坛的成果,促进工业生物技术研究领域的交流和发展,《生物工程学报》与此次论坛组委会共同推出一期主题为“工业生物技术”的专刊。

随着基因组测序技术、组学技术及分析技术等快速发展,生物学已经进入了“大数据”时代,计算科学的介入,进行高效率、高精度的生物信息学分析以及生物生理过程的计算模拟逐渐成为生命科学和生物技术的一个核心部分。中国科学院青岛生物能源与过程研究所宁康等介绍了一个全新的在线元基因组分析系统—Meta-Mesh,它包括元基因组数据库和分析平台,可以对元基因组样本进行系统、有效的分析,实现样本的群落结构比较和精确搜索,准确有效地识别类似的群落结构的样本,开启了研究微生物群落功能多样性的新思路。中国科学院天津工业生物技术研究所马红武实验室基于以往发表的相关途径动力学模型和测量的酶动力学数据,开发了大肠杆菌苏氨酸合成途径的动力学模型。模型稳态分析的结果表明前体物质、能量和还原力是苏氨酸合成的主要限制因素,通过过表达这些反应的酶可以有效增加苏氨酸合成反应的通量,为高效细胞工厂的理性设计提供指导。

构建高效的微生物细胞工厂是工业生物技术的核心之一,生物质在细胞工厂内可以被转化为生物能源、大宗化学品和高价值精细化学品,从而取代基于石油的化工制造。7-脱氢胆甾醇(7-DHC)是胆甾相液晶材料的重要前体物,

利用合成生物技术生产 7-脱氢胆甾醇的挑战性在于获得合成功能模块与底盘细胞的适配关系。天津大学元英进实验室从更换不同调控强度的启动子和不同改造的酵母底盘两方面,对二者的适配性进行研究,发现 *TDH3p* 调控的功能模块与底盘细胞 SyBE_000956 具备较好的适配性,使 7-脱氢胆甾醇的产量得到提高,为后续的适配性研究提供了理性设计的依据。虽然甲烷作为天然气和沼气的主要成分不但是高价值燃料资源,也是一碳化工的重要原料,但是目前基于甲烷的生物催化转化合成高附加值产品的成功研究还没有报道过。青岛农业大学杨松等利用 RNA-seq、LC-MS 技术并结合 ^{13}C 标记策略,深入探讨了甲烷氧化菌 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 细胞的转录物和代谢物两个层次特征,阐明 EMP 途径才是 *M. alcaliphilum* 20Z 进行甲烷同化的关键通路,这不但改变对 Gammaproteobacteria 甲烷氧化菌甲烷同化模式的传统认知,而且为甲烷高效生物催化转化提供了重要的理论基础。

随着微生物细胞广泛地应用于生产各种代谢产物、生物活性物质和工业酶等产品,如何通过工程菌的遗传改造、实施针对性的发酵控制策略来提高发酵生产效率,是现代工业发酵研究的热点与难点。丝状真菌被广泛应用于包括纤维素酶在内的工业酶的生产,在液体深层发酵中,丝状真菌菌丝形态直接影响发酵液的流变特性,进而与目标酶蛋白产量存在着重要的关联。中国科学院天津工业生物技术研究所田朝光实验室为了挖掘深层发酵中对丝状真菌发酵产酶性能具有重要影响的形态发育相关基因,以粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 单基因突

变体库中的 95 株形态突变株为研究对象,在结晶纤维素为碳源的条件下进行筛选,对这些突变株的内切-1,4- β -葡聚糖酶酶活、 β -葡萄糖苷酶酶活、发酵液粘度和菌丝干重进行测定,并观察发酵液中突变株的菌丝形态。结果表明,与野生型菌株相比,突变株 SZY11、SZY63、SZY69 和 SZY87 发酵液中蛋白浓度显著性提高。突变株 SZY11 和 SZY43 发酵液菌丝体主要形态为菌球状,其发酵液粘度分别降低 75%和 50%,突变株 SZY87 在发酵液中呈长丝状,发酵液粘度显著升高至少 2 倍。这些与产酶水平相关的形态、粘度基因的获得将有助于丝状真菌纤维素酶等工业酶高产工程菌株的理性构建。青蒿素作为最有效的抗疟疾药物,构建高效微生物细胞工厂合成其前体紫槐二烯及青蒿酸受到了广泛的关注。华东理工大学张嗣良等和中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所王勇等从引入异源 MEP 途径基因构建紫槐二烯异源合成工程菌株和菌株高密度发酵过程的糖流加控制策略两个方面入手,尝试最大限度地释放 *Escherichia coli* 内源 MEP 途径合成青蒿素前体—紫槐二烯的潜力,使紫槐二烯的产量达到 6.1 g/L,为开发基于 MEP 途径的萜类异源合成工程菌株及其发酵工艺奠定了基础。氧化葡萄糖杆菌 *Gluconobacter oxydans* 可以将葡萄糖氧化成葡萄糖酸,并进一步氧化成 2-酮基-葡萄糖酸 (2KGA) 和 5-酮基-葡萄糖酸 (5KGA),其中 5KGA 在催化剂的作用下能够转化为 L(+)-酒石酸。天津科技大学贾士儒课题组以仅生成 5KGA 的氧化葡萄糖杆菌 *Gluconobacter oxydans* HGI-1 为出发菌株,研究不同碳源(蔗糖、乳糖、麦芽糖、淀粉、葡萄糖)和有机氮源

(酵母浸粉、鱼粉、玉米浆、黄豆饼粉、棉籽饼粉)对5KGA产量的影响。选择玉米浆作有机氮源,在5L发酵罐中进行分批发酵放大试验时,5KGA的产量为93.80 g/L,转化率与文献水平相当,但以玉米浆作氮源降低了生产成本,更有利于工业化生产。

发展工业生物技术不仅能够以可再生碳资源替代化石资源,而且也是以清洁生物加工方式替代传统化学加工方式的有效途径。近年来生物技术的高度发展,生物酶制剂的生产水平不断提高,促进了工业酶在化工、纺织、造纸、食品、制药、环境等领域中的应用,从而以生物技术改造传统工业过程,降低资源、能源消耗与污染物排放,实现节能减排与产业提升。华南理工大学林影重点介绍在生物制浆、生物漂白、废纸生物脱墨、酶法纸浆改善性能及树脂生物控制等工艺中酶的选用、复配和应用技术及原理,以及酶制剂的应用效率及其对制浆造纸中节能减排和绿色环保的意义。中国科学院天津工业生物技术研究所孙媛霞实验室报道了利用D-阿洛酮糖3-差向异构酶(D-psicose 3-epimerase, DPE)和L-鼠李糖异构酶(L-rhamnose isomerase, L-RhI)双酶偶联反应,催化D-果糖生成D-阿洛酮糖和D-阿洛糖等功能性稀少糖的生物转化技术。

野生型生物催化剂对于其天然底物通常具有较好的反应活性和选择性,但在实际应用时多数情况下是非天然底物,这就要求对野生型生物催化剂进行改造,以提高其对非天然底物的反应活性、稳定性和选择性。江南大学陈坚等对来源于软化类芽胞杆菌*Paenibacillus maceras*的环糊精糖基转移酶(Cyclodextrin

glycosyltransferase, CGT 酶)的+1亚位点附近的3个氨基酸残基Leu194、Ala230和His233分别进行定点饱和和突变和复合突变,得到突变体L194N/A230D/H233E以麦芽糊精为糖基供体催化合成2-O-D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸(AA-2G)的效率比野生型CGT酶提高了62.5%。杭州师范大学陈振明实验室通过对来源于黑曲霉的单胺氧化酶MAO的一个突变酶进行CASTing的半理性定向进化,获得了一个对消旋美西律有一定活性的突变体A-1(F210V/L213C)。以此突变体为出发点,进行随机突变和筛选,获得一个新的突变体(T162A),其酶活提高了89%,表征对映体选择性的E值也有较大幅度的提高。分子对接和分子动力学研究表明T162A突变在保持活性中心残基构象的基础上,使得底物通道氨基酸的二级结构由A-1的loop-helix结构转变为完全的高柔性loop结构,从而为底物的高效结合与催化创造了条件。

中国科学院天津工业生物技术研究所宋斌实验室从我国云南腾冲地区轮马热泉的淤泥中筛选分离获得了一株产生耐热普鲁兰酶的厌氧芽胞杆菌*Anoxybacillus*,并从中克隆获得了耐热普鲁兰酶的编码基因,该酶是目前文献报道中比活力最高的耐热普鲁兰酶。晶体结构分析显示该酶具有 α -淀粉酶家族中典型的结构,在N端具有一个特殊的底物结合域,该结构域的缺失导致比活力和底物结合力都有相应降低。该普鲁兰酶编码基因在枯草芽胞杆菌中高效表达,胞外酶活可达42 U/mL,与野生菌种相比,表达活力提高40倍以上,表明该普鲁兰酶具有很好的应用前景。浙江工业大学郑裕国实验室经过前期大量筛选,获得了能够高效立体选择

性水解 2-羧乙基-3-氰基-5-甲基-己酸乙酯 (CNDE) 的摩氏摩根菌 *Morgarella morganii* ZJB-09203, 他们在此专刊中报道了对 *M. morganii* ZJB-09203 产生的酯水解酶进行分离纯化和酶学性质研究, 为该酶催化合成普瑞巴林手性中间体的工业化应用奠定了基础。

在生物催化剂的发现和改造过程中, 成功的关键常常在于合适的高效筛选方法。基于液滴微流控芯片的检测和筛选系统, 是近几年发展起来的具有通量高、成本低等显著特点的高通量筛选系统。中国科学院天津工业生物技术研究所王钦宏实验室自行安装建立了液滴微流控芯片系统, 对重要氨基酸 (谷氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸) 分别进行了微液滴包埋实验, 研究了包埋

微液滴的重要特性参数 (如稳定性、扩散性等), 探索了包埋微液滴对氨基酸检测分选的应用。该系统可以稳定、均一地生成微液滴, 微液滴大小可根据需要控制在 20–50 μm 之间, 微液滴间无交叉污染, 包埋氨基酸的微液滴的检测筛选速度大约为每分钟 600 个, 为高通量分析和筛选产氨基酸的微生物奠定了基础。江南大学许正宏和史劲松研究组结合酮康唑抗性筛选法, 采用亚硝基胍和低能氮离子注入复合诱变方法筛选得到一株催化去氢表雄酮 (DHEA) 双羟化生成 3 β ,7 α ,15 α -三羟基雄甾-5-烯-17-酮的菌株亚麻刺盘孢 *Colletotrichum lini* 突变株, 在底物 DHEA 投料浓度为 10 g/L 时产物摩尔得率达到 34.2%, 较出发菌株提高了 46.2%。

(本文责编 陈宏宇)