

• 主编导读 •

本期主要围绕生物航煤、生物质和一碳原料利用，胆绿素、硫酸软骨素、纳他霉素、D-甘露醇、L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷、丙二酸等产品的生物合成，替代蛋白质以及相关工具技术进行导读。

生物航煤、生物质和一碳原料利用

航空业产生的碳排放量占全球人为碳排放的 2%，改变航空煤油的生产方式对减少航空业生命周期中的碳排放具有重要意义。航空煤油一般由 C_7 – C_{17} 的碳氢化合物的混合物组成，除了可从传统的化石能源制备得到，也可从生物质通过脱氧、改质两道工序制备得到。王圣等^[1]总结了生物航煤的 4 种转化路径，即醇制航煤、油制航煤、气制航煤及糖制航煤。醇制航煤，即将 C_2 – C_4 的脂肪醇脱水成烯烃，低聚延长碳链，加氢制成烷烃后蒸馏。油制航煤，即将不同油脂转变为饱和脂肪酸，然后加氢、脱氧和脱羧基形成直链烷烃，再进行异构化生成不同结构的烷烃。气制航煤，主要指将 H_2 和 CO 通过费托合成形成长链烷烃，或将含有一氧化碳的废气发酵制成乙醇，再通过醇制航煤路线制备烷烃。糖制航煤，包括先将糖发酵生产法呢烯，然后加氢制成烷烃；或将糖先转变为醇、酮、醛、酸、呋喃等中间体，再通过酸缩合、碱缩合和脱水/低聚转化为航煤。目前，油制航煤中的酯和脂肪酸加氢路线已实现商业化，但整体上，生物航煤在经济上还难以与传统航煤竞争，需要可持续发展的政策支持。

温室气体的大量排放是导致气候变化的重

要原因之一。在温室气体中，除了有富含能量的甲烷 (CH_4)，更多的是完全没有能量的二氧化碳 (CO_2)。在“碳达峰、碳中和”的背景下，温室气体的生物转化利用得到高度关注。根据原料气体是否含有能量，进行生物利用的策略也不相同。 CH_4 是强还原性底物，其利用过程可以释放出大量 $NADH$ ，如果只是简单氧化，对能量利用来说是一种浪费。 CO_2 的利用需要外界输入能量，能量的来源可以是来自有机物的电子，也可以是光子转变而来的电子，还可以是通过电极输入的电子。焦子悦等^[2]总结了人工电子供给方面近年来取得的进展，特别是生物-无机材料杂化系统和生物电化学系统方面取得的进展。电子转移的化学本质是氧化还原反应，电子的高效产生、转运和利用是 CO_2 生物还原需要解决的关键问题。

木质素的结构中含有脂肪羟基、酚羟基和羧基等官能团，其芳香区的 C_3 和 C_5 位还是化学反应的活性位点。利用木质素的这些特性，可进行化学改性和接枝共聚来制备木质素复合水凝胶。木质素可以帮助复合水凝胶形成多孔结构，容纳更多的水分子。木质素的酚羟基和羧基等基团，可以帮助复合水凝胶吸附离子。由于木质素的疏水性，制备成复合水凝胶后，还可通过氢键和亲水/疏水平衡来调节水凝胶

的临界溶解性能。木质素复合水凝胶的粘附性、导电性、传感性和染料吸附性等多种功能,使其在水处理工业、农业保水等领域具有应用潜力。李鹏辉等^[3]综述了这一领域的进展,同时指出,由于木质素大分子结构组成复杂、分子活性低、不易接枝、与基体的相容性差,木质素复合水凝胶材料制备方面还存在不少困难,需要通过进一步的研究予以解决。

生物合成

胆绿素是一种四吡咯色素,为血红素分解代谢的产物,可以保护脂质免受活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的伤害,在医药领域具有重要的用途。闫思翰等^[4]以谷氨酸作为辅助底物,利用谷氨酸脱氢酶提供 NADPH,催化血红素转化为胆绿素,在 5 L 发酵罐中进行全细胞转化,产量达到 76 mg/L 以上。硫酸软骨素是一种由葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基半乳糖胺交替组成的糖胺聚糖,具有重要的生理活性。盛靖雨等^[5]在毕赤酵母中利用组成型启动子表达软骨素聚合酶、UDP-氨基葡萄糖异构酶、UDP-葡萄糖脱氢酶和软骨素-4-O-磺基转移酶,构建了无需甲醇诱导的毕赤酵母工程菌株,软骨素分批补料发酵水平达到 2.6 g/L;作者进而通过构建体外磺酸化修饰体系,实现了 0–40% 不同磺酸化水平硫酸软骨素 A 的可控合成。纳他霉素是一种具有还原性的多烯大环内酯类抗真菌剂,可由多种链霉菌合成。由于纳他霉素的还原性,如合成后不能及时运出胞外,在好氧发酵过程中就会用于在胞内清除 ROS,导致产量下降。为提高链霉菌生物合成纳他霉素的水平,宗工理等^[6]分析了纳他霉素合成基因簇,发现 *sgnA* 和

sgnB 编码的 ABC 转运蛋白 SgnA 和 SgnB 的预测功能是参与抗生素及其合成前体向胞外的转运;作者在高产纳他霉素的褐黄孢链霉菌基础上,引入了 *sgnA* 和 *sgnB* 基因,证实了 SgnA 和 SgnB 的转运功能,提高了纳他霉素的胞外/胞内浓度比,并使纳他霉素的产量提升了 12.5%。

D-甘露醇在食品、医疗和化工行业中具有广泛用途。潘珊等^[7]构建了一个以 NADH/NAD⁺ 循环为核心的葡萄糖脱氢酶和甘露醇脱氢酶耦合系统,以葡萄糖氧化为葡萄糖酸提供 NADH,将 D-果糖还原为 D-甘露醇。基于这一原理,作者构建了一个单菌全细胞催化系统,经过一系列优化,5 L 发酵罐中转化 24 h, D-甘露醇的最高产量为 81.9 g/L,摩尔转化率为 81.9%。副产的葡萄糖酸应当在工艺中考虑如何分离出来,以降低 D-甘露醇的生产成本。

维生素 C (又称 L-抗坏血酸) 是一种人们熟知的抗氧化剂,其 2 号位碳上的羟基非常容易被氧化。 α -葡萄糖苷酶可以水解麦芽糖非还原端的糖苷键,释放一个离子化的葡萄糖,然后游离的葡萄糖以 α -1,6-糖苷键转移到 L-抗坏血酸 2 号位碳的羟基上,形成糖苷化合物 L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷。该化合物对热、氧化剂、金属离子的抗性都较 L-抗坏血酸显著提高,但仍然保留 L-抗坏血酸的生物学活性,因此可广泛应用于化妆品、食品、医疗保健、畜牧业、水产养殖等行业。鉴于 α -葡萄糖苷酶既可以催化转糖苷反应生成 L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷,又可以催化 L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷的水解反应,在实际应用中, L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷的生产效率不高,需要提高 α -葡萄糖苷酶的转糖苷反应活性,降低其水解活性。丁伟秋等^[8]对来自黑曲霉、粳稻以及大

鼠来源的 α -葡糖苷酶进行了评价,发现梗稻来源的转糖苷活性最高,为 7.6%;大鼠来源的次之,黑曲霉来源的转糖苷活性只有 0.5%。进一步的研究,可以选择梗稻来源的 α -葡糖苷酶进行分子改造,但对更多来源的 α -葡糖苷酶进行转糖苷和水解活性的评价,也是非常必要的。

丙二酸是一种重要的中间体,其衍生产物在医药、农业、化工、食品加工领域具有重要的用途,可以在大肠杆菌中通过 β -丙氨酸途径实现生物合成,产量为 3.6 g/L。付雯宣等^[9]沿着磷酸烯醇式丙酮酸/丙酮酸 \rightarrow 草酰乙酸 \rightarrow 天冬氨酸 $\rightarrow\beta$ -丙氨酸 \rightarrow 丙二酸半醛 \rightarrow 丙二酸的途径,进行了一系列代谢工程改造,在 5 L 罐中的丙二酸产量为 5.6 g/L,对葡萄糖得率为 0.08 g/g (理论得率为 0.88 g/g)。发酵过程中乙酸产量超过 20 g/L, β -丙氨酸也积累了 18 g/L,这是导致丙二酸得率较低的主要原因。 β -丙氨酸积累的原因主要有两方面,一是利用 β -丙氨酸丙酮酸转氨酶将 β -丙氨酸转化为丙二酸半醛,伴随的反应是将丙酮酸转化为 L-丙氨酸,如果不能将 L-丙氨酸循环为丙酮酸,会造成对丙酮酸的竞争;二是用丁二酸半醛脱氢酶来催化丙二酸半醛转化为丙二酸,效率不高。此外,乙酸的大量积累,说明途径整体的能量供应不太通畅;NAD(P)H 的有效循环也应当在途径的设计中予以考虑。

替代蛋白质

乳铁蛋白是一种铁结合蛋白,可以促进对铁的吸收,同时具有多种重要的生物学活性,在食品、饲料、医药和化妆品行业中具有广泛的应用前景。牛乳铁蛋白包含两个叶状结构,

其中 N 叶包括发挥杀菌作用和肝素结合的结构域,而 C 叶包含执行肝细胞结合和内化功能的结构域。金亮等^[10]对前期构建的能够重组表达牛乳铁蛋白 N 叶的枯草芽孢杆菌进行了工艺优化,采用两段式温度和 pH 控制工艺,牛乳铁蛋白 N 叶的生产水平在 10 L 的发酵罐中达到 23.5 mg/L,高于大肠杆菌和昆虫细胞,也高于文献中枯草芽孢杆菌的水平。

替代蛋白质 (alternative proteins) 是未来食品的一个重要方向。植物来源的蛋白质需要经过蛋白质加工,才能达到和动物蛋白质类似的口感。采用酶法进行蛋白质加工,成为当前的一个研究重点。龙梦飞等^[11]对蛋白质交联用酶的作用机制进行了总结。催化蛋白质交联最重要的酶之一是谷氨酰胺转氨酶,该酶催化蛋白质中谷氨酰胺残基的 γ -羟胺基团与伯胺化合物之间发生酰基转移反应,从而使蛋白质发生共价交联。酪氨酸酶、漆酶、过氧化物酶和硫基氧化酶等氧化酶也可催化蛋白质的交联。它们催化交联的机制各有不同,但基本模式都是将两个距离较近的羟基氧化脱水形成交联,或将巯基氧化为二硫键形成交联。通过蛋白质交联酶实现对蛋白质的改性,在食品、医药行业都具有广泛的用途,具有较大的发展潜力。

工具技术

在 CRISPR-Cas 基因编辑系统中,得到广泛应用的 Cas9 蛋白是来源于酿脓链球菌的 SpyCas9,但该蛋白在乳酸菌中的应用效率不高。乳酸菌基因组中也有丰富的 CRISPR-Cas 资源,例如约 40%已经测序的乳杆菌中有完整的 CRISPR-Cas 系统。如能将乳酸菌内源的

CRISPR-Cas 系统开发成基因编辑工具,对提高乳酸菌的基因操作效率具有很大的意义。目前嗜热链球菌、清酒乳杆菌、加氏乳杆菌、双歧杆菌、卷曲乳杆菌、乳酸片球菌等乳酸菌中 CRISPR-Cas 系统已经得到表征,朱青等^[12]对这些 CRISPR-Cas 系统的特征进行了总结,介绍了如何对菌种基因组上的 CRISPR 系统进行表征、如何解析 Cas 蛋白识别的原型间隔区相邻基序 (protospacer-adjacent motif, PAM)、如何利用这些信息针对靶标基因构建打靶质粒的详细步骤,对乳酸菌基因工程很有帮助。筛选更多特异性的 PAM,对提高乳酸菌的自我靶向基因编辑技术的应用效率十分关键。

小 RNA 是一种广泛存在于细菌中的非编码 RNA,长度一般在 50–300 bp 之间,主要作用是调控基因表达。通过改变小 RNA 的不同的序列和结构,可以使人工小 RNA 产生不同的二级结构和功能,这就为人工设计小 RNA 并发挥特定功能提供了可能。基于人工设计的小 RNA,可以开发出基因抑制系统和基因激活系统,用于在合成生物学研究中进行代谢通路调控、环境胁迫适应、生物传感与核酸检测、构建基因线路等。张芬芳等^[13]对此小 RNA 调控的原理和实际应用案例进行了总结。

枯草芽孢杆菌由于其一般认为安全 (generally regarded as safe, GRAS) 的特征,被广泛用于酶与化学品的工业生产,然而其可用的诱导表达系统还不够完善。枯草芽孢杆菌中麦芽糖的代谢主要由麦芽糖操纵子控制,其中 *glvR* 编码的调控蛋白 GlvR,与 6-磷酸麦芽糖结合后被激活,可以特异性识别麦芽糖诱导启动子 Pglv 的结合区域,启动基因表达。张国强等^[14]对

麦芽糖诱导型启动子进行随机突变获得启动子突变体库,获得突变体的响应范围由原来的 0–3 g/L 扩大至 0–15 g/L,最高诱导强度较出发菌株增强了 3.15 倍,为进一步的合成生物学与代谢工程研究提供了新的可用元件。

REFERENCES

- [1] 王圣,杨鹤,闫瑞,等. 生物航煤生产技术的发展现状. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2477-2488.
Wang S, Yang H, Yan R, et al. Development of bio-jet fuel production technology: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2477-2488 (in Chinese).
- [2] 焦子悦,黄小涵,郭树奇,等. 微生物固碳的电子供给策略研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2396-2409.
Jiao ZY, Huang XH, Guo SQ, et al. Electron supply strategies for microbial carbon fixation: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2396-2409 (in Chinese).
- [3] 李鹏辉,吴彩文,刘宸,等. 木质素复合水凝胶性能及应用的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2489-2498.
Li PH, Wu CW, Liu C, et al. The performance and applications of lignin based hydrogels: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2489-2498 (in Chinese).
- [4] 闫思翰,邵明龙,徐美娟,等. 重组大肠杆菌全细胞催化高效合成胆绿素. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2581-2593.
Yan SH, Shao ML, Xu MJ, et al. Efficient production of biliverdin through whole-cell biocatalysis using recombinant *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2581-2593.
- [5] 盛靖雨,金学荣,胥睿睿,等. 基于工程化毕赤酵母一锅法合成硫酸软骨素 A. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2594-2605.
Sheng JY, Jin XR, Xu RR, et al. One-pot synthesis of chondroitin sulfate A by engineered *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2594-2605 (in Chinese).
- [6] 宗工理,陈曦,张振,等. ABC 转运蛋白 SgnA/B 促进纳他霉素胞外转运与高产. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2534-2548.
Zong GL, Chen X, Zhang Z, et al. ABC transporter SgnA/B promotes extracellular transport and efficient production of natamycin. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2534-2548 (in Chinese).

- [7] 潘珊, 胡孟凯, 潘学玮, 等. 基于双酶级联协调表达策略高效催化合成 D-甘露醇. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2549-2565.
Pan S, Hu MK, Pan XW, et al. Efficient biosynthesis of D-mannitol by coordinated expression of a two-enzyme cascade. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2549-2565 (in Chinese).
- [8] 丁伟秋, 周伟杰, 谢春芳, 等. 三种不同来源的 α -葡萄糖苷酶合成 L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷的比较. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2523-2533.
Ding WQ, Zhou WJ, Xie CF, et al. Comparison of three α -glucosidases from different sources in the synthesis of L-ascorbic acid 2-glucoside. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2523-2533 (in Chinese).
- [9] 付雯宣, 李诗韵, 赵运英, 等. 代谢工程改造大肠杆菌合成丙二酸. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2566-2580.
Fu WX, Li SY, Zhao YY, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of malonic acid. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2566-2580 (in Chinese).
- [10] 金亮, 李利宏, 张荣珍, 等. 重组枯草芽孢杆菌发酵生产乳铁蛋白 N 叶工艺优化. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2628-2638.
Jin L, Li LH, Zhang RZ, et al. Fermentation optimization for production of lactoferrin N-lobe by recombinant *Bacillus subtilis*. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2628-2638 (in Chinese).
- [11] 龙梦飞, 郑楠, 张泽华, 等. 蛋白质交联用酶的作用机制及研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2499-2512.
Long MF, Zheng N, Zhang ZH, et al. Mechanisms and applications of enzyme-catalyzed protein cross-linking. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2499-2512 (in Chinese).
- [12] 朱青, 徐琛, 张书文, 等. 利用内源 CRISPR-Cas 系统开展乳酸菌基因编辑的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2447-2458.
Zhu Q, Xu C, Zhang SW, et al. Advances in utilizing the endogenous CRISPR-Cas system for genome editing of lactic acid bacteria. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2447-2458 (in Chinese).
- [13] 张芬芳, 孙韬, 陈磊, 等. 人工小 RNA 调控元件在合成生物学中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2459-2476.
Zhang FF, Sun T, Chen L, et al. Application of synthetic small regulatory RNAs in synthetic biology. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2459-2476 (in Chinese).
- [14] 张国强, 滕茂放, 刘松, 等. 麦芽糖诱导梯度强度启动子的定向进化改造. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2606-2617.
Zhang GQ, Teng MF, Liu S, et al. Directed evolution of maltose induced promoters with expanded gradient intensity. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2606-2617.

(本文责编 陈宏宇)