

本期重点聚焦3个方面：新型酶挖掘与人工设计、底盘细胞改造升级、生物催化及生物合成工艺创新。在新型酶研究方面，通过异源比对、基因组鉴定技术，挖掘出BA-CSN、BhLS39等性能优良的新型酶；同时，运用酶定向进化和高通量筛选深度优化现有酶，并展示构建新型人工酶的方法。在底盘细胞改造方面，非常规酵母遗传操作系统建立、L-瓜氨酸等天然产物合成强化、转录调控以及生物传感器开发等领域均取得显著突破。同时，在生物催化及生物合成工艺创新方面，虎杖苷等复杂化合物合成和生物制造技术等领域均有新成果。

周景文 《生物工程学报》编委

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

## 新型酶挖掘与人工设计

生物酶元件在生物制造产业中发挥着极为关键的作用。通过挖掘新型酶、优化现有酶的性能，以及开展人工酶设计等手段，开发具有多样性和新功能的酶元件，能够为合成生物学系统打造更为丰富的工具箱，有力推动生物工程领域的发展。其中，酶的异源比对与基因组鉴定已成为新酶挖掘的利器。杜文娟等<sup>[1]</sup>从源于贫瘠盐碱土壤的高产蛋白酶萎缩芽孢杆菌中克隆了壳聚糖酶基因并在大肠杆菌中表达，获得的萎缩芽孢杆菌壳聚糖酶(BA-CSN)对酸碱有较强的耐受性，在温度低于45℃、pH 4-9时稳定性良好，且水解胶体壳聚糖相对酶活最高，具有广阔的工业应用前景。汪斌等<sup>[2]</sup>从耐盐芽孢杆菌中挖掘出新型果聚糖蔗糖酶BhLS39，并实现了其在枯草芽孢杆菌中的重组胞外表达。通过共表达伴侣蛋白，该酶的重组胞外活性得以提高，这对于大豆低聚糖的提质增效具

有积极意义。余尚霖等<sup>[3]</sup>以热稳定性良好的葡萄糖氧化酶AtGOD为源序列，经过筛选、基因合成及功能验证，获得的异形曲霉葡萄糖氧化酶AhGODB突变体T72R/A153P在催化活性和热稳定性方面均有所提升，展现出一定的应用潜力。郝梦瑶等<sup>[4]</sup>基于Phi29DNA聚合酶，从植物宿主微生物宏基因组中鉴定出Phi29DNA聚合酶；该酶具有较高的链置换活性，与噬菌体Φ29的相似度达59.5%，同时具备3'→5'核酸外切酶活性，其扩增产物可用于后续催化反应，为等温扩增酶的工业化应用指明了新方向。

在酶性能优化领域，酶定向进化技术与基于荧光显色原理的高通量筛选方法，为获取高效性能的酶制剂提供了切实可行的解决方案。其中，倪红等<sup>[5]</sup>通过定向进化改造短小芽孢杆菌属来源漆酶，筛选得到突变体F282L/F306L、Q275P，比酶活分别为野生型的1.42倍、2.29倍；其中，突变体Q275P温度稳定性提升，对多种金属离子和有机溶剂耐受性增强，应用于纸浆

处理时,卡伯值降低,白度、抗张指数和裂断长均得到提高。叶鸿博等<sup>[6]</sup>基于对甲氧基-2-氨基苄胺肟(para-methoxy-2-amino benzamidoxime, PMA)与酮类化合物的荧光显色反应建立了转氨酶高通量筛选方法,优化后筛选体系高效、灵敏、精确;以4-羟基-2-丁酮为底物筛选到活性提升的突变体 As-TA-N237M,其催化合成(R)-3-氨基丁醇的效率提高,为手性胺合成提供了新的酶资源。魏亚等<sup>[7]</sup>报道了一种构建新型人工酶的方法,通过非天然氨基酸结合点击化学策略,将4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP)辅因子引入优选蛋白骨架,构建的人工酶能够实现环状烯酮与对硝基苯甲醛之间的非天然不对称 Morita-Baylis-Hillman (MBH)反应,转化率高达90%,对映选择性(*ee*)为38%,为新型人工酶设计和非天然 MBH 反应研究开辟了新路径。

## 底盘细胞改造与升级

本期论文在微生物遗传操作系统建立、产物合成的优化、转运系统和转录调控的探索以及生物传感器的开发等方面,都为进一步挖掘微生物的潜力、实现更高效的生物制造和更深入的微生物研究提供了有力的支持和保障。其中,刘浏等<sup>[8]</sup>成功建立了威克汉姆西弗酵母遗传操作系统;一方面,他们通过选取自主复制元件和挖掘内源启动子元件,发现过量表达鞘脂代谢内部途径的 *Syr2* 和 *Lcb2* 可显著提高四乙酰基植物鞘氨醇(tetraacetyl phytosphingosine, TAPS)的产量;另一方面,他们建立了单倍体交配型鉴定方法并筛选到高产 TAPS 的单倍体菌株,利用诱变和遗传操作技术获得的菌株, TAPS 产量相比出发株大幅提高,为后续在该酵母中开展更多遗传工程研究奠定了基础。

在产物合成强化方面,研究人员利用系统代谢工程在氨基酸生物合成领域取得了众多突破。胥琳峰等<sup>[9]</sup>以大肠杆菌 BL21(DE3)为出发菌株,通过阻断降解途径、解除反馈抑制、强化合成及转运系统等策略,构建了高效合成 L-瓜氨酸的菌株;通过摇瓶和3 L 发酵罐发酵, L-瓜氨酸产量逐步提升,最终达到44.9 g/L,为 L-瓜氨酸的工业化生产提供了有效方案。黄良刚等<sup>[10]</sup>以前期构建的 L-高丝氨酸宿主 HS33 为底盘,采用系统代谢工程策略,强化相关途径、整合辅因子供应基因、优化乙酰辅酶 A 供应并筛选多源 *MetX* 表达,构建的工程菌株 OAH28 在5 L 发酵罐中 O-乙酰-L-高丝氨酸(O-acetyl-L-homoserine, OAH)产量达47.12 g/L,为 OAH 的工业化生产提供了理论与实践参考。此外,产物的高效合成同步依赖于转运系统的协同作用。左兴涛等<sup>[11]</sup>在谷氨酸棒杆菌中验证了 *CmpLs* 转运系统对 L-谷氨酸合成及转运的影响,敲除 *CmpL1* 和 *CmpL4* 可显著提高菌株的 L-谷氨酸生产性能, *CmpL1* 敲除菌株产量和糖酸转化率分别比对照菌株提高了69.2%和55.3%。

转录调控与生物传感器开发研究中,冯镁琳等<sup>[12]</sup>选取蒺藜苜蓿源转录调控元件,构建诱导型转录调控工具并应用于酿酒酵母  $\beta$ -胡萝卜素合成途径;经对元件改造优化,该工具使  $\beta$ -胡萝卜素产量相比出发菌株提高7.31倍,证明植物源转录调控元件可有效调节酵母基因表达,为微生物细胞工厂调控提供了新策略。另外,刘俊杰等<sup>[13]</sup>开发了以转录调节因子 *PuuR* 为基础的1,4-丁二胺生物传感器,将其同源操作子 *puuO* 安装在大肠杆菌组成型启动子 *P<sub>gapA</sub>* 中,控制下游 sfGFP 表达,并采用不同强度启动子改造传感器,为筛选高产1,4-丁二胺工程菌株奠定了基础。

## 生物催化及生物合成工艺创新

生物催化在复杂化合物合成领域取得了重要突破,同时生物合成工艺也不断创新,为有机合成提供了绿色、高效的新方法。刘亚辉等<sup>[14]</sup>致力于筛选具有催化还原复杂羰基化合物能力的羰基还原酶,这对于 *R* 型托伐普坦(*R*-tolvaptan, *R*-TVP)的生物合成具有重要意义;他们从兔肝脏中分离纯化并鉴定出羰基还原酶 RLSR5,其编码基因 *rlsr5* 的长度为 972 bp,编码蛋白分子量为 40 kDa,属于二聚体蛋白;该酶能够不对称还原前手性酮合成 *R*-TVP,比活为 36.64 U/mg,产物光学纯度高达 99%,为光学纯托伐普坦的生物催化合成奠定了坚实基础。杨敏等<sup>[15]</sup>通过生物酶挖掘获得蒙氏假单胞菌 ZMU-T06,该菌株能够催化 2-取代-1,2,3,4-四氢喹啉类化合物脱氢芳构化合成 2-取代喹啉类化合物,对 8 个底物的催化产率为 45.7%–48.4%,并推测了可能的催化机理,为绿色合成此类化合物提供了新途径。连蒙卡等<sup>[16]</sup>将栗酒裂殖酵母来源的黄素单加氧酶基因通过大肠杆菌进行异源表达,该酶可催化 *S*-甲基-L-半胱氨酸合成 *S*-甲基-L-半胱氨酸亚砷,为酶法合成此类物质提供了参考。戴景莉等<sup>[17]</sup>采用双酶偶联一锅法高效合成虎杖苷,在已有的糖基转移酶 UGTBS 三联突变体 IGW 基础上,以白藜芦醇为底物,实现了尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate-glucose, UDPG)的循环再生;通过优化反应条件,1 h 内 2 mmol/L 白藜芦醇转化率可达 80.6%,虎杖苷产物占比 90%以上,24 h 虎杖苷产量达 6.28 g/L,为虎杖苷的绿色高效制备提供了新策略。

与此同时,生物制造技术在聚合物驱油领域研究进展显著。周俊平等<sup>[18]</sup>系统调研了聚合物驱技术,提出创新生物制造技术制备驱油聚合物及其单体或单体原料,实现复合驱低成本

生物基化学品原料绿色生物制造,研究微生物发酵产物与聚合物驱技术关联,为聚合物驱及驱后发展提供了参考。此外,多层复配微胶囊在混凝土裂缝自修复中的应用研究取得成果。徐建妙等<sup>[19]</sup>制备的多层复配微胶囊,优化配方和干燥方式后,包埋率达 95.3%,破裂力为 59.7 N,硬度为 150.8 N;该微胶囊能有效修复混凝土裂缝,掺量为 0.45%时,试件抗折强度提高 17.3%,抗压强度提高 12.3%,为混凝土裂缝修复提供了新思路。

## REFERENCES

- [1] 杜文娟,阿瓦古丽·图尔荪,董志琴,马惠娟,马正海. 萎缩芽孢杆菌酸碱耐受性壳聚糖酶的表达及酶学性质分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 352-362. DU WJ, TURSUN AWAGUL, DONG ZQ, MA HJ, MA ZH. Expression and enzymatic characterization of a chitinase with tolerance to a wide range of pH from *Bacillus atrophaeus*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 352-362 (in Chinese).
- [2] 汪斌,应静茹,陈媛媛,方泽民,肖亚中,房伟,姚动邦. 高效转化大豆低聚糖的果聚糖蔗糖酶的挖掘、表征及表达[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 333-351. WANG B, YING JR, CHEN YY, FANG ZM, XIAO YZ, FANG W, YAO DB. Mining, characterization, and expression of a fructan sucrose for efficient conversion of soybean oligosaccharides[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 333-351 (in Chinese).
- [3] 余尚霖,周乔,张宏海,柏映国,罗会颖,杨小军,姚斌. 来源于异形曲霉的葡萄糖氧化酶催化活性和热稳定性改良[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 296-307. YU SL, ZHOU Q, ZHANG HH, BAI YG, LUO HY, YANG XJ, YAO B. Improvement of catalytic activity and thermostability of glucose oxidase from *Aspergillus heteromorphus*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 296-307 (in Chinese).
- [4] 郝梦瑶,胡玲玲,韩明昊,李从雨,常宏,骆健美,江会锋. 基于 Phi29 DNA 聚合酶的新酶挖掘及表征[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 427-436. HAO MY, HU LL, HAN MH, LI CY, CHANG H, LUO JM, JIANG HF. Mining and characterization of new enzymes based on Phi29 DNA polymerase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 427-436 (in Chinese).
- [5] 倪红,杨凡,王磊,李变霞,李华南,刘家书,江正兵,程万里. 基于定向进化提高漆酶的催化活性及其在造纸制浆中的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 308-320. NI H, YANG F, WANG L, LI BX, LI HN, LIU JS, JIANG ZB, CHENG WL. Directed evolution improves the catalytic activity of laccase in papermaking[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 308-320 (in Chinese).
- [6] 叶鸿博,李清叶,汤晓玲,郑仁朝. 基于酮基荧光探针的转氨酶高通量筛选及应用[J]. 生物工程学报,

- 2025, 41(1): 416-426.  
YE HB, LI QY, TANG XL, ZHENG RC. Transaminases: high-throughput screening via a ketone-fluorescent probe and applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 416-426 (in Chinese).
- [7] 魏亚, 陈崇文, 董颖佳, 周志. 基于非天然叔胺辅因子的人工酶创制及应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 376-384.  
WEI Y, CHEN CW, TONG YJ, ZHOU Z. Enzymatic MBH reaction catalyzed by an artificial enzyme designed with the introduction of an unnatural tertiary amine cofactor[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 376-384 (in Chinese).
- [8] 刘浏, 尹正安, 潘力. 威克汉姆西弗酵母遗传操作系统的建立及其合成四乙酰基植物鞘氨醇的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 397-415  
LIU L, YIN ZA, PAN L. Establishment and application of a genetic operating system in *Wickerhamomyces ciferrii* for the synthesis of tetraacetyl phytosphingosine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 397-415 (in Chinese).
- [9] 胥琳峰, 于文文, 朱学文, 张权威, 武耀康, 李江华, 堵国成, 吕雪芹, 陈坚, 刘龙. 代谢工程改造大肠杆菌高效合成 L-瓜氨酸[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 242-255.  
XU LF, YU WW, ZHU XW, ZHANG QW, WU YK, LI JH, DU GC, LV XQ, CHEN J, LIU L. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient biosynthesis of L-citrulline[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 242-255 (in Chinese).
- [10] 黄良刚, 高峰, 许诺然, 周俊平, 牛坤, 张博, 柳志强, 郑裕国. 代谢工程改造大肠杆菌生产 O-乙酰-L-高丝氨酸[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 256-270.  
HUANG LG, GAO F, XU NR, ZHOU JP, NIU K, ZHANG B, LIU ZQ, ZHENG YG. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of O-acetyl-L-homoserine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 256-270 (in Chinese).
- [11] 左兴涛, 钟沙沙, 蔡柠匀, 石拓, 张志丹, 刘元涛, 刘娇, 王德培, 陈久洲, 郑平. 改造谷氨酸棒杆菌 CmpLs 转运系统促进 L-谷氨酸合成[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 271-287.  
ZUO XT, ZHONG SS, CAI NY, SHI T, ZHANG ZD, LYU Y, LIU J, WANG DP, CHEN JZ, ZHENG P. Engineering of CmpLs enhances L-glutamate production of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 271-287 (in Chinese).
- [12] 冯镁琳, 史彩芳, 王颖, 李春. 酿酒酵母中苜蓿源诱导型转录调控工具的构建与应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 363-375.  
FENG ML, SHI CF, WANG Y, LI C. Construction and application of an inducible transcriptional regulatory tool from *Medicago truncatula* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 363-375 (in Chinese).
- [13] 刘俊杰, 蒋敏敏, 孙彤, 孙祥祥, 赵咏灿, 顾明霞, 路福平, 黎明. 基于转录调节因子 PuuR 的 1,4-丁二胺生物传感器的构建与优化[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 437-447.  
LIU JJ, JIANG MM, SUN T, SUN XX, ZHAO YC, GU MX, LU FP, LI M. Construction and optimization of 1,4-butanediamine biosensor based on transcriptional regulator PuuR[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 437-447 (in Chinese).
- [14] 刘亚辉, 王旭明, 马硕, 刘柯雨, 李玮, 张路路, 杜洁, 张红蕾. 催化合成 R 型托伐普坦的新型羰基还原酶[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 321-332.  
LIU YH, WANG XM, MA S, LIU KY, LI W, ZHANG LL, DU J, ZHANG HL. A novel carbonyl reductase for the synthesis of (R)-tolvaptan[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 321-332 (in Chinese).
- [15] 杨敏, 邹岚, 冉会敏, 秦磊. 蒙氏假单胞菌 ZMU-T06 氧化脱氢芳构化合成 2-取代喹啉类化合物[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 288-295.  
YANG M, ZOU L, RAN HM, QIN L. *Pseudomonas monteilii* ZMU-T06 produces 2-substituted quinolines by oxidative dehydroaromatization[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 288-295 (in Chinese).
- [16] 连蒙卡, 宋兆霖, 高文静, 朱刚, 董孟君, 李玉, 刘逸寒, 王凤华, 路福平. 栗酒裂殖酵母来源黄素单加氧酶的性质及催化合成 S-甲基-L-半胱氨酸亚砷的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 474-485.  
LIAN MK, SONG ZL, GAO WJ, ZHU G, DONG MJ, LI Y, LIU YH, WANG FH, LU FP. A flavin-containing monooxygenase from *Schizosaccharomyces pombe*: characterization and application in the synthesis of S-methyl-L-cysteine sulfoxide[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 474-485 (in Chinese).
- [17] 戴景莉, 闫子旭, 赵科学, 李小利, 臧永军, 徐麒麟, 朱富成. 双酶偶联一锅法高效合成虎杖苷[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 461-473.  
DAI JL, YAN ZX, ZHAO KX, LI XL, ZANG YJ, XU QL, ZHU FC. Efficient synthesis of polydatin by a two-enzyme coupled with one-pot method[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 461-473 (in Chinese).
- [18] 周俊平, 潘琪露, 黄良刚, 詹侃, 汤恒, 金利群, 郑裕国. 生物制造技术在聚合物驱油应用中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 148-172.  
ZHOU JP, PAN QL, HUANG LG, ZHAN K, TANG H, JIN LQ, ZHENG YG. Application of biomanufacturing in polymer flooding[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 148-172 (in Chinese).
- [19] 徐建妙, 周源源, 程峰, 柳志强. 多层复配微胶囊的制备及其在混凝土裂缝自修复中的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 448-460.  
XU JM, ZHOU YY, CHENG F, LIU ZQ. Preparation of multi-layer compound microcapsules and their application in self-healing of concrete cracks[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 448-460 (in Chinese).