

合成生物制造 2025

朱华伟¹, 李寅^{1,2*}

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 国家开发投资集团有限公司, 北京 100034

朱华伟, 李寅. 合成生物制造 2025[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 1-78.

ZHU Huawei, LI Yin. Biomanufacturing driven by engineered organisms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 1-78.

摘要: 本文对 2023–2024 年《生物工程学报》发表的合成生物制造相关的综述和学术论文进行了评述, 内容涉及底盘细胞, 基因(组)编辑, 设施、工具和方法, 生物传感器, 蛋白质设计与改造, 肽与蛋白质, 酶的筛选、表达、表征和改造, 生物催化, 生物活性物, 植物天然产物, 微生物天然产物, 微生物资源开发与生物农药, 甾体化合物, 氨基酸及衍生物, 维生素及衍生物, 核苷, 糖、糖醇、寡糖、多糖和糖脂, 有机酸和生物基材料单体, 高聚物材料生物降解与生物可降解材料, 肠道微生物、活菌药物与合成微生物组, 微生物抗逆工程, 木质纤维素的生物降解和转化利用, 一碳生物技术, 生物电子转移与生物氧化还原, 生物环保, 合成生物制造的风险和监管等 26 个方面的数百种技术和产品, 以为读者了解合成生物制造相关研发和产业化的最新进展情况提供参考。

关键词: 合成生物学; 生物制造; 工程生物

Biomanufacturing driven by engineered organisms

ZHU Huawei¹, LI Yin^{1,2*}

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

2 State Development and Investment Group Co., Ltd., Beijing 100034, China

Abstract: This article reviews the review articles and research papers related to biomanufacturing driven by engineered organisms published in the Chinese Journal of Biotechnology from 2023 to 2024. The content covers 26 aspects, including chassis cells; gene (genome) editing; facilities, tools and methods; biosensors; protein design and engineering; peptides and proteins; screening, expression, characterization and modification of enzymes; biocatalysis; bioactive substances; plant natural products; microbial natural products; development of microbial resources and biopesticides; steroidal compounds; amino acids and

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807485; E-mail: yli@im.ac.cn

Received: 2024-12-31

their derivatives; vitamins and their derivatives; nucleosides; sugars, sugar alcohols, oligosaccharides, polysaccharides and glycolipids; organic acids and monomers of bio-based materials; biodegradation of polymeric materials and biodegradable materials; intestinal microorganisms, live bacterial drugs and synthetic microbiomes; microbial stress resistance engineering; biodegradation and conversion utilization of lignocellulose; C1 biotechnology; bioelectron transfer and biooxidation-reduction; biotechnological environmental protection; risks and regulation of biomanufacturing driven by engineered organisms, with hundreds of technologies and products commented. It is expected to provide a reference for readers to understand the latest progress in research, development and commercialization related to biomanufacturing driven by engineered organisms.

Keywords: synthetic biology; biomanufacturing; engineered organisms

2022年4月,本刊发表了第一篇以“合成生物制造”为题的评述文章^[1],对2021年度本刊发表的所有与合成生物制造相关的综述和研究论文进行评述。这是“合成生物制造”一词的最早使用,主要目的是为了推动由合成生物驱动的生物制造产业发展,当时的表述是:“2021年被称为合成生物学投资元年,全年合成生物学领域融资超过了前10年,一批合成生物领域初创企业进入市场。同年,‘碳达峰、碳中和’正式成为国家战略目标,具有‘碳中和’属性的生物制造产业备受关注。‘合成生物学’加持‘生物制造’,使得‘合成生物制造’成为推动新一代生物技术在工业领域应用的主力军”^[1]。

随着社会各界对生物制造关注度的不断提升,“合成生物制造”也开始成为一个高频词,成为规划、会议和赛事主题。例如,2024年9月,北京出台了《北京市加快合成生物制造产业创新发展行动计划(2024–2026年)》并成立北京市合成生物制造技术创新中心,随后常德等地也发布了合成生物制造产业规划;2024年11–12月,北京举办合成生物制造技术创新发展论坛,深圳举办合成生物制造产业大会(原名为工程生物创新大会);2025年1月,常德举办合成生物制造创新创业大赛等。这反映出“合成生物制造”已经进入了从科技赛道向产业赛道转换的

时期。以“合成生物”的科技创新,促进“生物制造”的产业发展,这正是发展新质生产力的应有之义。合成生物制造,正在成为一个以科技创新促进产业创新、科技创新和产业创新融合发展的标志性产业。

继“合成生物制造”^[1]和“合成生物制造2022”^[2]两篇评述之后,在2025开年之际,本文对2023年和2024年《生物工程学报》发表的与合成生物制造相关的综述和研究论文进行评述,以帮助本刊读者了解合成生物制造相关研发和产业化的最新进展情况。

底盘细胞

酿酒酵母作为真核微生物,拥有完整的细胞内膜系统,演变出了多样化的细胞器,包括线粒体、过氧化物酶体、高尔基体、内质网、脂滴和液泡等^[3]。不同细胞器具有不同的功能,其内部环境的理化性质和代谢产物分布也有很大不同,恰好可为生产不同类型的化学品提供多样化的舞台。根据不同细胞器的特点,研究人员将酶、代谢途径等靶向定位到特定细胞器,从而提升对应化学品的合成效率。例如,线粒体中乙酰辅酶A、丙酮酸等前体物质充足,有利于合成萜类化合物和醇类化合物;过氧化物酶体中进行脂肪酸 β -氧化,产生大量乙酰辅酶

A, 可为合成萜类化合物、黄酮类化合物和脂肪酸衍生物提供充足底物, 过氧化物酶体较强的鲁棒性, 也可为生产和隔离对细胞有毒性的化合物提供适宜的环境; 内质网中适合异源表达细胞色素 P450 酶, 用于催化羟化、环氧化、脱烷基化、碳-碳偶联、氧化裂解等多种反应; 高尔基体的蛋白分泌途径优化后, 有利于提高重组蛋白的生产; 脂滴环境适合亲脂性化合物的合成和积累; 液泡内酸性环境可为 pH 敏感的化学品提供理想的合成场所。

酿酒酵母是异源合成天然产物的最常用微生物底盘。近年来, 如解脂耶氏酵母、巴斯德毕赤酵母、马克斯克鲁维酵母、圆红冬孢酵母、多形汉逊酵母等非常规酵母也逐步被开发用于生产特定的天然产物^[4]。如用解脂耶氏酵母来生产油脂和脂肪酸, 用毕赤酵母来生产聚酮和萜类等。相比于酿酒酵母, 非常规酵母底物利用谱更广、环境耐受性更强, 且可以利用廉价的废弃资源, 从而降低生产成本。研究人员也逐步建立了非常规酵母的遗传操作方法, 为代谢工程改造提供了遗传工具。其代谢改造策略主要有途径酶的筛选、代谢途径的调控、合成前体与辅因子的供给等。此外, 诱变育种和适应性进化也是效果较好的改造策略。

毕赤酵母能够以甲醇为唯一碳源, 且具有丰富的翻译后修饰机制, 同时是美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 认定的安全菌株。因此, 毕赤酵母在抗原、工业酶等重组蛋白生产方面具有显著优势, 同时在利用一碳原料生产化学品方面具有较大潜力。目前针对毕赤酵母的工程化改造技术主要有基于线性化质粒载体的同源重组、基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑和基于 CRISPR/Cas12a 的基因编辑^[5]。研究人员也初步开发了针对毕赤酵母启动子 P_{AOX1} 的 CRISPRi 和 CRISPRa 技

术, 用于调控基因表达。但是, 相比于大肠杆菌和酿酒酵母等模式底盘, 毕赤酵母基因编辑效率低, 缺乏多样的启动子和筛选标记, 这限制了对毕赤酵母的复杂代谢工程改造。未来需进一步提高同源重组效率, 挖掘丰富的合成生物学元件; 通过对代谢通路的改造和优化, 不断提高甲醇同化率, 推动毕赤酵母细胞工厂的开发和应用。

圆红冬孢酵母 (*Rhodotorula toruloides*) 是最先在我国分离获得的一种非模式酵母, 其野生型菌株能合成类胡萝卜素等一系列高附加值化合物和酶^[6]。该菌株能够进行高细胞密度培养, 可耐受渗透胁迫、氧化胁迫和低 pH 胁迫, 还能直接利用木质纤维素水解液, 是一种极具潜力的微生物底盘。为提升对圆红冬孢酵母的工程改造能力, 近年来陆续开发了多种基因工程使能工具, 如启动子、终止子、筛选标记等基因表达元件, 表达外源基因的整合型质粒, 根瘤农杆菌介导的遗传转化技术, CRISPR/Cas 介导的基因组编辑技术, 用于表达调控的 RNA 干扰技术等。经改造的圆红冬孢酵母能够合成不饱和脂肪酸、脂肪醇、生物柴油等油脂衍生物, 以及红酵母红素、 β -胡萝卜素、 γ -胡萝卜素等萜类化合物。此外, 圆红冬孢酵母还可用于生产苯丙氨酸解氨酶、D-氨基酸氧化酶、头孢菌素酯酶和环氧化物水解酶等多种具有工业应用价值的酶。

丝状真菌作为高效细胞工厂常用于生产酶制剂、重组蛋白、有机酸和天然产物等。研究发现, 丝状真菌的菌体形态对发酵产品的产量及发酵过程控制有显著影响^[7], 如里氏木霉菌丝分枝后总蛋白分泌量显著提高。总的来说, 菌体形态对菌种发酵性能有 3 方面的影响, 包括影响发酵产品产量、影响发酵过程控制以及影响代谢产物种类。通过基因工程诱导菌丝分枝, 可以显著提高丝状真菌生产酶制剂的产量。

菌体形态对发酵过程的影响体现在传质效率上,菌丝在搅拌式发酵中会缠绕搅拌浆和控制电极,对发酵控制产生负面影响,而菌丝分枝后,发酵液黏度降低,有利于发酵控制。研究还发现,分散的菌丝体有利于丝状真菌呼吸,适用于生产酶制剂和抗生素等产品,而规则、大小适宜的球状真菌则有利于生产有机酸等产品。顶体、G 蛋白偶联系统、细胞周期蛋白依赖性激酶、肌球蛋白等内在因素,以及活性氧、营养物质、金属离子等外在因素都会影响菌丝形态变化。研究菌丝形态发育机制,开发相应的调控策略,对提升丝状真菌细胞工厂性能具有重要意义。

热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 (*Geobacillus thermoglucosidasius*) 属于革兰氏阳性、兼性厌氧菌。该菌在 42–70 °C 之间均能生长,最适生长温度为 60 °C,且生长速度与大肠杆菌相当。该特征使其在工业生产中有利于节能降耗、降低染菌风险,因此是一种极具应用潜力的嗜热微生物底盘。但是,该菌的遗传改造工具还很缺乏,特别是缺乏高效的遗传转化技术,限制了该菌的开发和应用。卜瑞红等^[8]通过敲除限制性内切酶基因,组合添加细胞壁弱化剂甘氨酸、DL-苏氨酸和细胞膜抑制剂吐温 80,建立了一种针对热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌的高效电转化技术,转化效率达到 6×10^6 CFU/(μg DNA),比野生型菌株提高了 3 个数量级。这为代谢工程改造热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌,推动其潜在应用奠定了重要基础。

嗜热蓝细菌是能够在 45 °C 以上高温环境中正常生长和代谢的蓝细菌,是研究光合生物高温适应机制的模式生物^[9]。嗜热蓝细菌主要分布于全球范围内的温泉和热泉环境中。相比于普通蓝细菌,嗜热蓝细菌具有特殊的胶质鞘及胞外被膜结构,有时可以产生特殊的聚集形态或形成生物结皮,这种特殊结构是其在高温下能够生存的原因之一。目前,只有个别嗜热蓝细菌完成了基因

组测序,转录组学和蛋白质组学研究非常有限。嗜热蓝细菌对高温环境的适应能力,可能与其光合系统修复能力、光合色素稳定性、抗氧化能力、细胞相容性溶质等相关,这些能力提示其在生物固碳、生物燃料生产、生物修复、生物活性物发现等方面具有较大的应用价值。

小球藻属于单细胞绿藻,既可进行光合自养生长,也可进行高密度异养发酵。小球藻是国际公认的安全藻株,其胞内蛋白含量占细胞干重的 50%–65%,因此成为生产替代蛋白的重要微生物底盘。但是,野生型小球藻因富含叶绿素而具有较浓的藻腥味,导致其干粉产品感观和气味欠佳。通过萃取、浸提等化学方法可以一定程度除腥除味,但成本高、污染大。为此,陈霄等^[10]利用常压室温等离子体 (atmospheric pressure room temperature plasma, ARTP) 诱变技术对凯式小球藻进行随机突变,筛选获得 4 株叶绿素合成缺陷的突变株;最优突变株中细胞蛋白含量达 39%,叶绿素 a 含量基本下降到零,且不含叶绿素 b,含有少量叶黄素使藻体呈金黄色。这表明该突变株成功实现了脱色降腥,成为生产替代蛋白的重要藻种。

基因(组)编辑

基于 CRISPR/Cas 系统的单基因编辑与调控工具已经在合成生物学领域得到广泛应用。这些工具主要有碱基编辑器、先导编辑器、基于 CRISPR/Cas 系统的基因抑制或基因激活等^[11]。对应地,基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因编辑与调控技术也在不断发展。在基于双链断裂的多重基因编辑技术方面,开发了基于 CRISPR/Cas 系统的单细胞多位点编辑技术、基于 CRISPR/Cas 系统的可追踪基因编辑技术。在基于单链断裂的多重基因编辑技术方面,开发了基于碱基编辑器的多重基因编辑技术、基于先导编辑器的多重基因编辑

技术。在多重基因调控技术方面,发展了基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因抑制技术、基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因激活技术,以及基于碱基编辑器的多重基因调控技术。相比于单一位点,多重基因编辑与调控技术效率还比较低,脱靶效应严重。与计算机辅助设计及深度学习的结合,是未来发展基因编辑调控技术的重要方向。

CRISPR/Cas9 系统介导的基因编辑技术已被广泛应用于动物、植物和微生物基因工程领域。借助外源双链 DNA 供体为模板的同源重组,可以实现对基因组目标位点的精准编辑和基因敲入。高等真核细胞中的同源重组效率较低,限制了该基因编辑策略的应用。为此,马宝霞等^[12]利用大肠杆菌乳糖操纵子阻遏蛋白 LacI 与操纵序列 LacO 能够特异性结合的特点,以 LacI 蛋白作为适配器与 Cas9 蛋白融合表达,以 LacO 序列作为适配子和双链 DNA 供体序列进行嵌合,开发了一种新型的双链 DNA 供体适配基因编辑系统。借助 LacI 与 LacO 的特异性识别和结合能力,供体 DNA 模板与 DNA 双链断裂的时空共定位效率得以进一步提高。研究人员利用该系统,在 HEK293T 细胞中实现了对 VEGFA 位点的精确编辑,30%的编辑效率显著高于野生型系统,为提高对高等真核生物基因编辑效率提供了强有力的工具。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术因其高效、简便和精确的特性,已成为食用菌分子育种的重要工具,并在双孢蘑菇、灰盖鬼伞等多种食用菌育种中广泛应用^[13]。该技术通过高效表达 sgRNA 和 Cas9 蛋白,实现基因的精确修饰。启动子选择和递送策略是关键,常用的有 U6 启动子和 Pol II 启动子。此外,Cas9-RNP 复合物递送方式,可以提高编辑效率且无外源基因插入。遗传转化方法主要为 PEG 介导法,筛选标记常使用抗药性和营养缺陷型标记。靶点修复策略包括非同源末

端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homology directed repair, HDR)修复机制,通过抑制 NHEJ 提高 HDR 效率,实现基因定向编辑。目前,CRISPR/Cas9 技术在食用菌育种中的应用还面临着编辑效率低、脱靶效应、突变体筛选困难和生物安全问题等挑战。优化策略包括改进遗传转化体系、提高 Cas9 和 sgRNA 表达水平、优化 sgRNA 靶向效率、降低脱靶风险、开发新的筛选标记和确保生物安全性。通过提高基因编辑效率和特异性,建立科学监管体系,来确保食用菌育种的安全性和有效性,推动食用菌产业的现代化发展。

基于 CRISPR/Cas 系统开发的碱基编辑器近年来取得了快速发展^[14]。第一代碱基编辑器将 Cas9 蛋白与一种作用于长单链 DNA 的脱氨酶融合,在不产生 DNA 双链断裂的情况下实现精确的点突变。胞嘧啶碱基编辑器和腺嘌呤碱基编辑器是两类主要的单碱基编辑器,前者编辑 C•G→T•A 碱基转换,后者编辑 A•T→G•C 的碱基转换。这两种编辑器可以引入 4 种突变,占目前已注释的人类致病遗传变异位点的 30%。除了单碱基转换器,单碱基颠换器也得到了不同程度开发,用于嘧啶与嘌呤之间的碱基颠换。针对碱基编辑器的优化主要聚焦于 Cas 蛋白、脱氨酶和其他小元件,目的是提高编辑效率、扩大基因组靶向范围、改变编辑活性窗口等。利用单碱基编辑器,可以构建多种疾病模型用于疾病治疗,在农业领域进行家畜繁殖性能改良、异体器官移植、农作物经济性状改良等研究,未来应用值得期待。

脱靶效应是 CRISPR/Cas 基因编辑过程中面临的主要问题之一。运用深度学习算法预测 CRISPR/Cas9 脱靶效应有助于实现更高效的基因编辑,近年来受到广泛关注。现有预测模型使用的脱靶数据集大多存在数据不平衡的问题,在

预测准确性上有待提高。谢焕增等^[15]通过重采样法整合不同平台的数据集,构建脱靶基准数据集,然后运用不同的编码方式对 DNA 与 sgRNA 序列对进行独热编码;最后运用多尺度卷积神经网络构建脱靶预测模型。实验结果表明,新模型的性能优于现有的深度学习脱靶预测模型。

基因组大尺度遗传操纵,通过对基因组进行大片段敲除、整合、易位等遗传改造,可实现更多遗传信息的同步改造,为揭示基因型与表型之间的关系和基因调控机制提供了强有力工具^[16]。酿酒酵母作为真核模式菌株,其基因组大尺度遗传操纵工具已得到充分开发。根据工作原理的不同,分为重组酶介导、核酸酶介导、从头合成大片段 DNA 介导的大尺度遗传操纵,以及其他大尺度遗传操纵工具。位点特异性重组酶通过识别并结合到特定的 DNA 序列,并诱导发生 DNA 链切割和交换,从而实现基因组 DNA 的敲除、重组、倒置和置换等操作;核酸内切酶通过对目标基因序列造成双链断裂,进而对其进行定点基因组编辑,使用最多的核酸酶系统是 CRISPR-Cas 系统。重组酶和核酸酶介导的大尺度遗传操纵工具主要针对原有基因组进行大尺度改造。随着 DNA 合成技术和大片段组装技术的发展,从头合成大片段 DNA 技术日趋成熟,促成了人工合成酵母染色体这一重大科学突破。借助大尺度遗传操纵工具,有望推动酵母底盘生物制造产业的迭代升级。

大片段 DNA 染色体整合是构建微生物底盘细胞的重要使能技术。相比于质粒表达系统,染色体整合工程菌株遗传稳定,不需要额外添加抗生素,不受限于 DNA 片段长度。质粒系统和大片段 DNA 染色体整合技术互为补充,是两种相辅相成的遗传改造技术。目前,大片段 DNA 染色体整合技术主要有 5 种,包括基于同源重组介导的染色体基因整合技术、整合酶介

导的染色体基因定点整合技术、转座子介导的染色体基因随机整合技术、II 类内含子介导的染色体基因整合技术、结合 CRISPR/Cas 系统的染色体基因定向整合技术^[17]。其中,CRISPR/Cas 与转座系统的结合是一种新的技术,在效率、精准度以及便利性方面整体优于其他技术。应用时,应具体结合不同底盘细胞的特点,选择可用的、高效的染色体整合技术。

多片段组装可以将启动子、编码序列和终止子等元件按顺序组装到载体上构成特定的表达模块,以及用于引入点突变、片段缺失突变或插入突变等。目前常用的多片段组装方法有重叠延伸 PCR、Golden Gate 组装、Gibson 组装和酵母体内组装等。当片段数量增加时,Gibson 组装的重组效率会显著降低。Golden Gate 多片段组装虽然准确度高,但对载体有一定的限制。饶欣悦等^[18]结合 Golden Gate 组装和 Gibson 组装技术,开发了一种多片段载体组装技术,即片段间的组装采用 Golden Gate 法,片段与载体的连接采用 Gibson 组装法。相较于用 Gibson 法一步组装多个片段,该方法的组装成功率大幅提高。与 Golden Gate 一步组装相比,该策略不受载体酶切位点的限制。因此该方法兼具 Gibson 载体兼容性强和 Golden Gate 组装准确度高特点,具有很好的应用潜力。

设施、工具和方法

重大科技基础设施是由国家层面统筹建设的大型复杂科学研究系统,对突破重大科学前沿、解决经济社会发展和国家安全等重大科技问题具有重要意义^[19]。生命科学领域的重大科技基础设施大致可以分为 2 种类型。第一类是以研究对象聚类的设施,如种质资源库、蛋白质设施、海洋生命设施和转化医学设施等;第二类是以研究手段聚类的设施,如大型电镜中

心、核磁中心、生物成像设施和生物信息设施等。在资金投入、设施寿命、数字化程度、组织形式、项目风险和发展效应等方面，生命领域设施与传统的物理、天文等领域设施有较大的不同。我国生命科学领域重大科技基础设施发展相对滞后。缺乏对大科学问题的凝练、投入水平不足、管理机制不健全、设备国产化率较低，是我国生命科学领域建设重大科技基础设施面临的主要问题。针对这些问题，未来需强化对生命科学领域重大科技基础设施的部署、投入和管理创新，推进以重大科技基础设施为支撑的现代大生命科学研究。

自下而上构建人工细胞是合成生物学领域一个非常宏伟的目标，对理解生命起源和细胞功能，开发人工细胞底盘、组织模型和药物递送系统等生物技术具有重要意义。人工细胞的一大特征是区室化，通过构建囊泡结构等细胞膜类似物，将胞内环境与胞外环境分隔起来。微流控芯片是制备囊泡结构的一种有效工具，它不仅可制备人工细胞膜，还能构建胞内区室化间隔、装载细胞非膜组分，甚至形成细胞骨架这样的胞内复杂微结构^[20]。在操作方面，微流控芯片可以实现囊泡的分选、捕获、移动、局部注射，满足对人工细胞的分析和功能研究。基于囊泡结构，可以研究细胞生长、细胞分裂、跨膜转运、物质代谢、能量代谢和细胞间通讯等单细胞行为，甚至构建由人工细胞为结构单元的多细胞结构和组织，在创建人工细胞的研究方面能够发挥非常重要的作用。

脂质体是一种由磷脂双分子层构成的囊泡，具有良好的生物相容性和低毒性，广泛用于药物递送和食品工业，也可以用于制备人工细胞的研究。其制备方法多样，包括薄膜分散法、逆相蒸发法、溶剂注入法和冷冻干燥法，每种方法都会影响脂质体的结构和特性，各有

优劣。刺激响应型脂质体是一种通过外部刺激调控结构和性能的特殊脂质体，广泛应用于生物医学领域，如药物递送、基因治疗和生物成像。其优势在于能够减少药物在非靶部位的释放，提高靶部位药物浓度，降低不良反应^[21]。

随着合成生物学发展，涉及细胞器、外泌体、纳米脂质体等纳米颗粒的研究越来越广泛，这些纳米颗粒的大小在几十纳米到几百纳米不等。由于光学显微镜的极限分辨率在 200 nm 左右，因此无法满足这些纳米颗粒的检测和分析。目前，已有很多不同的纳米分析技术和仪器被逐渐开发出来，并应用于生物纳米颗粒的研究中。基于光学原理的分析技术有纳米流式细胞术、动态光散射技术、纳米颗粒示踪和表面反射光干涉成像等^[22]。纳米流式灵敏度、准确性高，可以检测 100 nm 以下的颗粒，缺点是选择性差、对样品纯度要求高，且样品浓度需严格控制。动态光散射技术基于布朗运动原理开发，通过干涉光进行颗粒大小和浓度的测量，依赖于较高的颗粒浓度。在非光学检测技术方面，电子显微镜和原子力显微镜因分辨率高，在生物纳米颗粒分析中发挥着不可替代的作用。电子显微镜分辨率可以达到亚埃米级(10^{-10} m)，原子力显微镜的横向分辨率和纵向分辨率分别可达到 1.0 nm 和 0.2 nm。这些技术各有优劣，在实际应用过程中应根据情况灵活选择。

无细胞转录翻译系统(cell-free transcription and translation, TXTL)能够利用活细胞提取物组分，在体外实现蛋白质的表达^[23]。TXTL 系统主要包含 3 种组分：细胞提取物；氨基酸、辅因子、ATP 等补充成分；质粒或线性 DNA 模板。相比于细胞系统，TXTL 系统省去了细胞转化、克隆筛选和细胞裂解等过程，可以更便捷地控制底物浓度，灵活度高。近年来，TXTL 系统被广泛用于 CRISPR 技术研究中，包括表

征 PAM 序列、快速筛选 gRNA、表达多种 Cas 蛋白和筛选抗 CRISPR 相关蛋白等。基于 TXTL 系统开发的 CRISPR 生物传感器已用于检测病原体核酸标志物。与生物医学工程材料如纸质、可穿戴柔性材料结合,可以制备便携式冻干试剂,加入水即可激活,便于运输和携带,有助于在偏远地区提供快速便捷的检测。

裂解基因盒子是合成生物学中的常见功能模块,通常由穿孔素、内容素、跨膜蛋白组成。当穿孔素累积到一定浓度时,在细胞膜上形成较大孔洞,释放内容素至周质空间,破坏肽聚糖层,引起细菌裂解。裂解模块常用于诱导宿主裂解促进功能蛋白的释放。相比于分泌释放,裂解释放不受限于蛋白体积和蛋白质性质,还可以限制环境中活细菌的数量,增强系统的安全性和可控性。例如,一株具有群体感应系统的大肠杆菌工程菌,当周围铜绿假单胞菌密度达到一定密度时,就可以启动裂解模块并释放铜绿假单胞菌毒素,杀死铜绿假单胞菌。裂解模块可用于构建靶向载药工程菌、制造减毒活疫苗、生产高分子化合物等。付生伟等^[24]对若干裂解基因进行表征,发现 5 种裂解基因盒子(*S105*, *A52G*, *C51S*, *S76C*, *LKD*, *LUZ*)在大肠杆菌和铜绿假单胞菌内都能引起宿主裂解,但裂解能力具有较大差异,整体上 *LUZ* 具有较强的裂解能力。研究人员进一步将裂解基因盒子与光遗传学工具结合,开发了一种光遗传学调控的铜绿假单胞菌裂解系统,拓展了合成生物学底层工具箱。

酵母表面展示技术是生物技术和生物医学领域的蛋白质工程工具,主要用于展示各种真核蛋白,包括抗体、受体、酶和抗原肽等。目前研究人员已经开发了酿酒酵母、毕赤酵母、解脂耶氏酵母和多形汉逊酵母的表面展示系统^[25]。酵母表面展示系统的构建主要采用凝集素系统和絮凝素系统,将目的蛋白与锚定蛋白融合表达。这

一表面展示技术在酶的定向进化、全细胞催化系统开发和多酶级联体系构建方面具有独特优势。

米曲霉是一种用于传统食品酿造的丝状真菌。随着基因组学和基因编辑技术的发展,米曲霉也成为代谢工程生产高附加值化学品的重要底盘,用于生产麦角甾醇、神经酰胺和曲酸等物质。米曲霉具有复杂的生物膜结构,发展适用于米曲霉的蛋白质亚细胞定位技术对研究代谢途径和外源基因表达具有重要意义。尚怡彤等^[26]将荧光蛋白与不同的亚细胞定位信号融合后转入米曲霉中,分别构建了定位于细胞核、线粒体、内质网、液泡、脂滴、过氧化物酶体和高尔基体的荧光报告菌株。通过与细胞器特异性小分子荧光染料共定位,进一步证明该定位技术的适用性,为研究米曲霉的生长代谢提供了重要工具。

乳酸菌作为食品级微生物,广泛应用于发酵食品、保健产品、饲料工业以及化妆品等领域。基因工程改造是改良乳酸菌性能的关键技术,而高效稳定的表达载体是实现乳酸菌基因工程改造的基础。肖路遥等^[27]对分离自西藏灵菇的副干酪乳酪杆菌 ZY-1 进行基因组测序,发现存在 4 个内源性质粒;分别利用内源质粒 pLPZ3 和 pLPZ4 的复制子 *rep*,结合大肠杆菌复制子 *ori*、氯霉素筛选标记、启动子和荧光蛋白报告基因,构建了 2 个大肠杆菌-乳酸菌穿梭载体;2 个穿梭载体可成功转化至副干酪乳酪杆菌中,并观察到了荧光蛋白的表达,为副干酪乳酪杆菌基因工程菌株的开发提供了重要工具。

铜绿假单胞菌是研究致病和生物被膜的重要模式菌株。传统的基因敲除方法一般要进行两次筛选,进而获得无痕敲除菌株,缺点是比较耗时。李飞旋等^[28]为了简化基因操作流程,构建了一个只有 1 800 bp 的整合型质粒 pln2,只需将目标基因内部一段 200 bp 的同源序列克隆到该质粒并导入铜绿假单胞菌,通过单次等

位基因交换将质粒 DNA 片段整合到基因组上，就可以切断目的基因使其失去活性。基于该原理，研究人员构建了一整套质粒用于融合荧光蛋白的构建、基因元件的替换以及原位转录型荧光报告系统的构建。利用该工具还实现了一次性敲除 270 kb 的大片段，这对于研究铜绿假单胞菌最小化基因组具有重要意义。

蛋白质组是指一个细胞和组织所表达的所有蛋白质，通常利用质谱技术进行研究。首先，通过特异性蛋白酶对提取的蛋白质进行酶切，产生肽段混合物。然后，利用液相色谱-质谱联用技术对混合肽段进行分离，进入质谱仪电离后，经质荷比检测获得一级谱图^[29]。一级谱图中的母离子经质量分析器选择并碎裂为碎片离子，经质荷比检测后获得二级谱图。数据采集和分析是研究蛋白质组学的关键一环。通过数据非依赖采集(data-independent acquisition, DIA)的质谱数据理论上包含所有母离子的碎片，具有准确性高、重复性好的特点，可用于分析低丰度蛋白质。但 DIA 数据复杂，特别是二级图谱的解析较为困难。对 DIA 数据的分析可以分为两类，即以肽为中心和以谱图为中心的分析。其中，以肽为中心的分析方法理论上更灵敏，定量更准确，但目前还缺乏精准高效的 DIA 数据分析算法及软件。

毕赤酵母兼具原核生物与真核生物的优点，是广泛使用的蛋白表达系统。信号肽影响毕赤酵母异源蛋白分泌效率，其中酿酒酵母的 α 交配因子信号肽常用，但并非适用于所有外源蛋白。近年来越来越多研究尝试利用毕赤酵母内源信号肽表达外源蛋白且效果较好，但还没有系统分析 GS115 菌株的内源信号肽。朱凌宣等^[30]对该菌株进行生物信息学分析，筛选可能高效表达外源蛋白的内源信号肽序列；作者分析了毕赤酵母 GS115 菌株的信号肽特征，发现该菌株中约 5% 的蛋白具有潜在信号肽，且这

些信号肽的长度和氨基酸组成具有一定规律；该研究还筛选出 162 个无跨膜区且含有信号肽的蛋白序列，并通过转录组测序技术验证了部分蛋白的高表达水平；实验数据验证显示，在预测得到的信号肽中，有 10 个信号肽所表达的蛋白与实际胞外含量最高的蛋白相一致，表明这些信号肽可能适用于高效表达外源蛋白，为高效表达外源蛋白提供了候选内源信号肽。

细胞培养过程中，对细胞增殖与活力分析通常采用细胞计数法、荧光染色法、酶联免疫吸附法等检测手段。这些传统方法耗时耗力，无法满足高通量检测的需求，并且属于有损检测技术，影响后续实验研究。近年来，结合微流控技术和细胞阻抗传感器，集成了一种可以实时监控细胞状态的微流控阻抗传感器^[31]，其工作原理是将正弦电压施加到特定频率，并经由交流电测量细胞与电极之间的电容和电阻变化，以研究细胞的生理响应。例如，在接种细胞后，细胞逐渐附着在电极层上，细胞的绝缘特性会影响细胞-电极界面的局部环境。随着细胞更多地黏附到电极表面，通过细胞的电流将受到阻碍，阻抗也随之逐渐增加；而当环境中存在有毒药物时，细胞会发生凋亡或从电极表面迁移，阻抗则随之逐渐下降。利用该技术可以研究细胞的生长、增殖、迁移等生命活动，也可以用于药物筛选。

生物传感器

氨基酸生物传感器是选育高产菌株、加快氨基酸工业菌株迭代升级的新型手段。根据工作原理，氨基酸生物传感器可分为基于转录调控因子、核糖体开关、蛋白质相互作用，以及蛋白质翻译元件这 4 种类型^[32]。应用较多的一类是基于转录调控因子构建的生物传感器，其可响应的氨基酸种类最多，但特异性较差。基于核糖体开关和蛋白质相互作用开发的生物传感器特异性

高, 但响应范围窄, 可响应的氨基酸种类较少。基于蛋白质翻译元件如稀有密码子、氨酰 tRNA 合成酶和 tRNA 开发的新型氨基酸生物传感器, 兼具特异性和通用性, 开发潜力较大, 有望填补部分氨基酸传感器空白。氨基酸生物传感器还可用于高附加值氨基酸衍生物工程菌株的高通量筛选。提高大宗氨基酸衍生物的生产水平, 有助于延长氨基酸产业链, 促进产业健康发展。

生物传感器在检测脂联素等生物标志物方面具有重要应用。脂联素是一种大小约 30 kDa 的单体糖蛋白, 仅存在于脂肪细胞中, 是一种新定义的脂肪细胞因子, 参与胰岛素、葡萄糖和脂肪细胞代谢过程。血浆脂联素水平与 2 型糖尿病和代谢综合征直接相关, 因此, 准确测定人血浆中的脂联素浓度有助于实现 2 型糖尿病和代谢综合征的早期筛查和干预。尽管通过 ELISA、免疫比浊法、胶金试纸条等方法可以进行脂联素检测, 但操作复杂、检测时间长、灵敏度不高。近年来, 以电化学原理为主的生物传感器被开发用于检测脂联素。安家莹等^[33]对脂联素生物传感器的原理和研究进展进行了系统总结, 为脂联素生物传感器的进一步开发和应用提供了参考。

全细胞生物传感器是检测环境污染物的的重要手段, 主要由可特异性应答目标污染物浓度变化的基因调控元件和报告基因组成。现有调控元件不能满足环境中所有潜在污染物的检测需求, 这是开发全细胞生物传感器的主要限制。在有机磷农药检测方面, 目前还没有可以直接响应有机磷的调控元件。因此, 有机磷生物传感器主要基于有机磷水解酶和降解产物基因调控元件进行构建。甲基对硫磷可被水解酶降解为对硝基酚, 马钊等^[34]前期鉴定了一个可灵敏响应对硝基酚的基因元件 *pobR*, 进一步筛选了甲基对硫磷水解酶基因 *mpd*, 将两者联合在一起, 构建了全细胞生物传感器。该生物传感器不仅可以分析土壤

提取样品, 还可用于田间土壤样品的实地检测, 具有方法简单、成本低、检测速度较快等特点。

生物发光是自然界中广泛存在的生物学现象, 近年来发现了真菌来源的新生物发光途径。真菌发光途径(fungal bioluminescence pathway, FBP)以咖啡酸为底物, 最终产生波长约为 520 nm 绿色荧光^[35]。FBP 途径需要 4 种酶, 包括牛奶树碱合酶 HispS、牛奶树碱-3-羟化酶 H3H、荧光素酶 Luz 和咖啡丙酮酸水解酶 CPH。首先, 咖啡酸在 HispS 催化下生成牛奶树碱; 牛奶树碱在 H3H 催化下发生羟基化反应, 生成 3-羟基牛奶树碱; 3-羟基牛奶树碱在 Luz 催化下, 氧化形成单线电子激发态的高能中间体, 随即发出荧光, 同时产生咖啡丙酮酸。在 CPH 催化下, 咖啡丙酮酸水解形成丙酮酸和咖啡酸, 咖啡酸作为 FBP 底物继续参与新一轮发光反应。整个发光过程净消耗丙二酰辅酶 A、NADPH、ATP 和 O₂。FBP 途径中的基因以基因簇形式存在, 在进化上具有保守性。提高前体物咖啡酸供给或增强 FBP 途径, 可以提高发光亮度和时长, 在生物检测、生物传感器、发光园艺植物培育和绿色照明等领域具有广阔的应用前景。

蛋白质设计和改造

蛋白质结构研究在生命科学和医学领域具有举足轻重的地位, AlphaFold2 (AF2)的问世代表人类在蛋白质结构预测方面取得了重大突破, 具有里程碑意义。传统蛋白质结构预测采用同源建模和从头建模两种算法。同源建模基于同源蛋白质结构相似的原理, 以已知同源蛋白质结构为模板预测目的蛋白结构, 该技术简单快速, 但不能预测尚未确定同源的蛋白质结构^[36]。从头建模基于第一性原理和自由能全局最小这一事实, 不依赖于数据库信息, 通过能量函数模拟构象来预测目的蛋白结构, 对算力

需求大,目前只适用于预测氨基酸残基数在10–80之间的小蛋白。而AF2采用深度学习算法,根据给定的氨基酸序列,通过多序列比对,与目的蛋白质具有共进化关系的蛋白质序列中获取保守性和协变性信息,并结合氨基酸残基空间结构约束信息特征,通过使用神经网络架构模型Evoformer预测目的蛋白质结构,有效提高了预测准确性。AF2利用了自注意力机制、自蒸馏的训练方式,结合高效的搜索算法,从大量的蛋白质序列和结构数据中深度学习蛋白质的特征和规律,高效地预测未知蛋白质结构,为生物学和医学发展提供了强大工具。当然,AF2也有局限性,比如对蛋白质精细结构预测能力不足,预测结构与结构域的相对位置存在不确定性,因此需要实验数据来辅助蛋白结构预测结果。

蛋白质功能预测对生物学和医学领域研究具有重要指导意义。目前开发的蛋白质功能预测方法可划分为3个方向:基于蛋白质序列进行功能预测、基于蛋白质结构进行功能预测,以及基于蛋白质相互作用网络进行功能预测^[37]。基于蛋白质序列的功能预测方法通过分析蛋白质的氨基酸序列,利用序列之间的相似性和特征来推测蛋白质的可能功能。基于蛋白质结构的功能预测方法主要关注蛋白质的三维结构,通过模拟和预测蛋白质结构来推测其功能。基于蛋白质相互作用网络的功能预测,侧重于分析蛋白质与其他生物分子之间的相互作用,以揭示其在生物系统中的功能和作用。未来可以探索综合利用蛋白质序列、结构和相互作用等多方面数据,对蛋白质结构进行更精准的预测。

机器学习在蛋白质功能预测领域具有重要应用潜力^[38]。UniProt数据库所收录的蛋白质序列已达2亿多条,而通过实验进行功能注释的蛋白质序列仅有近1%。在目前已获得结构解析的蛋白质中,仍未获得功能注释的蛋白质还有

30%以上。传统蛋白质功能预测主要有基于序列和基于结构两种方法,前者利用序列相似性对应于蛋白质同源性,是广泛应用的蛋白质功能注释手段。基于结构的方法以“结构决定功能”为理论基础,空间结构相似的蛋白质通常具有相同的功能。基于机器学习的蛋白质功能预测可以极大提高预测能力,但机器学习的准确性需要依赖于大量可信的数据作为训练数据集。机器学习可以关注更多的参数,如等电点、分子量、表面张力、极性、疏水性、电荷数以及蛋白质相互作用等。在机器学习方面,深度学习比传统机器学习能够更高效地处理复杂且高度非线性的大数据,预测结果更加准确。

天然酶在活性、稳定性和底物选择性等方面常常难以满足工业生产需求,因此需要对酶分子进行改造以提高其催化特性。酶分子改造技术主要有定向进化、理性设计、半理性设计和人工智能辅助设计等^[39]。定向进化模拟自然选择过程,利用易错PCR等技术对目标基因进行随机突变,利用高通量筛选方法积累有益突变,循环往复,直至筛选到优良的突变体。该技术依赖于成熟的高通量筛选方法,工作量较大。理性设计基于蛋白质空间结构及功能信息,在计算机的辅助下,运用分子对接、分子动力学模拟、第一性原理计算等方法,选择较少的关键氨基酸位点进行突变,构建小而精的突变文库。相比于定向进化,该技术工作量大幅减小,不依赖高通量筛选技术,但依赖于对酶分子空间结构和催化机理的理性认知。半理性设计介于定向进化和理性设计之间,通过对几个关键靶点进行组合突变,构建突变文库,降低了对已有知识的依赖和筛选规模。人工智能辅助的酶分子改造,是通过数据驱动方式构建序列/结构-酶性能的预测模型,依据预测模型挑选优良突变体,从而大幅提高酶分子改造效率。该技

术目前主要受限于可供机器学习的数据有限。

蛋白半理性改造是在获得酶的序列、结构、催化机理等信息的基础上,找出具有改造潜力的氨基酸位点,以定点突变、组合突变等策略构建相对较小的突变文库,从而提高蛋白改造的针对性。脂肪酶水解油脂可制备甘油二酯(diacylglycerol, DAG)。DAG 具有 1,2-DAG 和 1,3-DAG 两种异构体,其中 1,3-DAG 具有较高的营养价值,可以促进脂肪代谢、抑制脂肪堆积。因此,脂肪酶的催化特异性对制备 1,3-DAG 十分重要。马亚迪等^[40]首先利用超临界流体色谱与蒸发光散射检测器,开发了一种可以区分检测 1,2-DAG 和 1,3-DAG 的方法;然后将疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶与三油酸甘油酯进行分子对接,找到了 5 个与底物特异性结合相关的氨基酸残基;通过定点饱和突变,利用上述开发的检测方法进行突变体筛选,最终获得了一个特异性提高 11.7%的脂肪酶突变体,为进一步改造脂肪酶的特异性奠定了基础。

生长激素释放肽(ghrelin)有两种形式——辛酰基化 ghrelin (AG)和去辛酰基化 ghrelin (DAG),这两种形式在体内比例的变化对糖脂代谢有重大影响,而人丁酰胆碱酯酶(hBChE)是催化 AG 去辛酰基化生成 DAG 的关键酶。蔡应婷等^[41]通过计算机辅助设计和实验结合的方法,在已有原核表达 hBChE 突变体 BChE-M47 的基础上,进一步优化其催化 AG 去辛酰基化的活性,为相关代谢性疾病的治疗提供新的候选分子;作者通过计算机辅助设计选择了 10 个突变位点,构建并纯化了重组 BChE 突变体,其中 E197D 和 A199S 两个突变显著提高了 AG 催化活性;催化动力学和热稳定性测试显示, E197D 和 A199S 在 AG 水解中表现出更高的 k_{cat}/K_m 值和热稳定性,分子动力学模拟进一步揭示了这些突变提高了酶与底物的结合稳定性。

除蛋白质功能预测和酶分子改造外,人工智能在生物学领域的应用还包括预测蛋白质-配体结合亲和力、蛋白质从头设计等。预测蛋白质-配体结合亲和力有助于了解蛋白质功能、辅助药物发现和指导酶的改造^[42]。在辅助药物发现方面,研究人员利用蛋白质-配体亲和力预测模型从 400 多万化合物中发现了一种非小细胞肺癌的潜在抑制剂^[43];通过对 SARS-CoV-2 病毒蛋白靶点与配体药物相互作用的预测,成功筛选出 20 种潜在抑制剂^[44];另外从 FDA 批准药物库中筛选到针对不同 SARS-CoV-2 病毒蛋白的 49 种药物,促进了相关药物的再利用^[45]。蛋白质从头设计可以设计出具有特定功能的全新蛋白质,在疾病治疗、生物制造、纳米技术等方面将产生重大影响。随着人工智能技术的发展,蛋白质从头设计已由基于第一性原理的传统方式转变成了运用深度学习的现代方法。基于深度学习的蛋白质从头设计主要分为两类,包括基于骨架结构的蛋白设计和不依赖于结构的直接序列生成^[46]。前者包括固定主链和可变骨架的序列优化,后者用于探索序列空间和蛋白质生成。

肽与蛋白质

环二肽,也称为二酮哌嗪类化合物,由 2 个 α -氨基酸缩合而成,是一类重要的活性天然产物。它具有稳定的二酮哌嗪环状骨架结构,含 2 个氢键供体与氢键受体,具有良好的蛋白结合与功能调节活性^[47]。环二肽骨架及氨基酸侧链基团具有良好的可修饰性,可通过酶催化衍生出更多结构新颖、活性多样的环二肽类药用先导化合物。放线菌是环二肽类化合物的生产菌,具有非核糖体肽合成酶和环二肽合酶,负责催化合成二酮哌嗪骨架。除此之外,放线菌中还发现了一系列骨架结构修饰酶,这为从自然界放线菌中挖掘更多新型环二肽分子提供了

理论支撑。未来要构建生产环二肽的细胞工厂，需要设计新型的非核糖体肽合成酶和环二肽合酶，人工设计开发新型环二肽化合物。

丙谷二肽，即 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺，是一种特殊的生物活性肽。丙谷二肽的生产主要依赖传统的化学合成，近年来酶法合成丙谷二肽也成为研究热点。目前发现 3 种酶可以将非保护的氨基酸底物催化合成丙谷二肽，包括非核糖体肽合成酶、L-氨基酸连接酶和 α -氨基酸酯酰基转移酶。前两种酶催化效率低，难以实现丙谷二肽高效合成。 α -氨基酸酯酰基转移酶属于丝氨酸蛋白酶家族，能够以丙氨酸甲酯盐和 L-谷氨酰胺为底物，高效催化合成丙谷二肽，但该酶的催化稳定性还不能满足工业生产要求。为提高酶的催化稳定性，张营康等^[48]选择金属有机骨架材料(metal organic frameworks, MOFs)对表达 α -氨基酸酯酰基转移酶的全细胞催化剂进行固定化。具体地，选择金属有机沸石咪唑骨架结构即 ZIF-8 作为固定材料，采用一锅法将 ZIF-8 与全细胞催化剂直接混合，获得全细胞催化剂包裹在骨架内部的纳米颗粒；重复使用 7 次后，固定化细胞仍能保持 67%左右的初始酶活，室温下放置 4 d，还保留 50%的初始酶活，表明 MOF 固定化提高了酶的稳定性，为利用全细胞催化剂稳定高效制备丙谷二肽提供了解决方案。

多肽自组装是多肽链在多种非共价作用力驱动下自发组装形成特定结构的过程，如纳米纤维、纳米层状结构、胶束、囊泡、纳米管、微球、水凝胶等不同形貌。多肽自组装借助的非共价作用力有氢键、亲水/疏水相互作用、静电作用、 π - π 堆积等。氨基酸序列是决定多肽自组装的内在因素，通过调整氨基酸组成，改变非共价作用力可以调控自组装行为。此外，pH、温度、离子强度、多肽浓度、酶等外在因素也会影响分子间非

共价作用力，从而影响自组装过程。多肽自组装在生物医学领域用途广泛，如肽类药物设计、靶向载药、创伤修复、组织工程支架、医学成像等^[49]，为疾病诊断和治疗带来了新的机遇。

蛋白质在生产、运输和储存的过程中，容易受内外多种因素的影响发生蛋白质聚集。蛋白质聚集导致生产效率降低，严重影响产品稳定性，尤其是在生物医药领域。蛋白质聚集过程十分复杂，目前公认的有 3 种途径，包括：3D 结构域交换诱导聚集、链内/链间盐桥破坏诱导聚集、氧化应激诱导聚集^[50]。控制蛋白质聚集主要有内因控制和外因控制两种。内因方面，通过改变蛋白质结构以控制蛋白表面电荷，或对蛋白质进行糖基化修饰减少蛋白疏水区域的暴露。外因方面，主要是在生产、运输和存储过程中控制温度、pH、离子强度、光照等溶液环境参数稳定，或添加一定量的表面活性剂、糖苷酶抑制剂、甜菜碱、甘油、聚山梨酯 80 等抗聚集保护剂。未来可应用人工智能预测蛋白质聚集趋向，指导蛋白质改造以减少聚集。

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类存在于生物体内的富含半胱氨酸的低分子量蛋白，半胱氨酸中的硫醇基团对多种重金属如镉、铜和锌具有高度亲和性。MT 参与体内多种重要生理活动，如解毒重金属、清除自由基、调节体内微量元素浓度等。相比于组织提取法，微生物异源表达是生产 MT 的理想方式。在大肠杆菌中表达 MT 时通常需要融合一些促溶标签或纯化标签，但标签会影响 MT 的金属结合能力。类弹性蛋白(elastin-like polypeptides, ELPs)是一种人工设计的由五肽重复序列串联而成的多肽，具有相转变特性，即达到一定温度时，ELP 蛋白能发生从溶液到凝聚态的可逆转变。利用这一特性，ELP 可与目标蛋白融合表达，用于离心分离重组蛋白。刘龙英等^[51]将 MT 与 ELP 蛋白融合表达，

显著促进了 MT 的可溶性表达,采用多次可逆相变循环纯化工艺,获得了纯度达 97%的重组 ELP-MT 蛋白。纯化蛋白具有较强的自由基清除效率,说明 ELP 融合表达不影响 MT 的活性。

乳铁蛋白是一种非血红素铁结合糖蛋白,主要由哺乳动物的乳腺上皮细胞生产。乳铁蛋白具有抗菌、消炎及提高婴幼儿免疫力等功能,主要用作食品营养强化剂添加到婴幼儿配方食品和含乳饮料中。目前乳铁蛋白的生产主要从牛奶中分离提取,成本非常高,而且牛源乳铁蛋白与人乳铁蛋白在结构和翻译后修饰上存在差异。目前,微生物生产人乳铁蛋白产量非常低,并且很难实现全长分泌表达。张予婷等^[52]选择一株胞外蛋白酶失活的枯草芽孢杆菌 G601 作为人乳铁蛋白表达宿主,通过启动子筛选、RBS 和信号肽优化等策略,实现了全长人乳铁蛋白的分泌表达,总表达量达到 1.1 mg/L,胞外分泌量约 0.6 mg/L。

大肠杆菌等异源表达体系也为植物生物学研究提供了重要工具。硝酸转运蛋白(nitrate transporter, NRT)与铵转运蛋白(ammonium transporter, AMT)是小麦无机氮素吸收、转运、分配的一类重要跨膜蛋白。阐明 NRT 和 AMT 在小麦中的组织定位,对于研究小麦的无机氮利用至关重要。组织定位研究的常用方法是利用特异性抗体开展免疫组化实验,但目前缺乏有效的小麦 NRT、AMT 抗体。为此,韦一昊等^[53]从前期在小麦基因组中鉴定到的数百个 NRT 和 AMT 基因中筛选并克隆了 4 个表达量较高的基因;通过对跨膜转运蛋白进行跨膜结构域预测,确定非跨膜表达区段;进一步在大肠杆菌中对非跨膜区段进行了表达,其中 1 个为可溶性表达,3 个不可溶表达;蛋白纯化后进行抗体制备,其中 3 个成功制备了抗体,为后续研究 NRT 和 AMT 的定位和功能奠定了基础。

植物脱落酸不敏感蛋白 5 (abscisic

acidinsensitive 5, ABI5)是介导种子萌发的关键调控因子,主要介导脱落酸在细胞内的一系列信号转导反应。研究发现,小麦 *TaABI5* 基因与小麦穗发芽密切相关。为研究 *TaABI5* 蛋白在小麦籽粒中的功能,韩洋等^[54]将编码完整 *TaABI5* 蛋白的基因 *TaABI5-D3* 在大肠杆菌中进行了异源表达,经包涵体纯化获得 His-*TaABI5-D3* 重组蛋白;进一步使用重组蛋白免疫 Balb/c 小鼠制备了多克隆抗体,该多克隆抗体可用于 Western blotting 检测分析,为进一步研究该基因的功能奠定了基础。

胶原蛋白是由多个原胶原组装形成的纤维状蛋白质。原胶原是胶原蛋白的基本单位,由 3 条多肽链通过链间氢键彼此盘绕形成稳定的三螺旋结构^[55]。胶原蛋白生物合成分为细胞内和细胞外两个阶段。在细胞内,经核糖体翻译形成的肽链在内质网中完成羟基化和糖基化修饰,羟基化修饰能够提高三股肽链螺旋的坚固性,糖基化修饰有利于纤维的定向排列。分泌至细胞外后,经核酸内切酶作用形成原胶原蛋白,进一步发生非共价聚合与共价交联,最终形成具有韧性的不溶性胶原纤维。传统胶原蛋白生产主要从陆生动物和水生生物组织中提取,纯化工艺复杂,存在病毒感染风险。目前,通过合成生物学技术已经实现了重组胶原蛋白的规模化生产和应用,主要用于创面愈合与组织修复、化妆品与医学美容、食品包装材料、生物医学材料等领域。重组胶原蛋白的产量、羟脯氨酸羟化率、三螺旋结构特性及纯度,还有待进一步提升。

蛛丝蛋白是一类高分子蛋白纤维,具有优越的机械性能和生物相容性,作为医用材料和药物递送载体被广泛应用于医疗领域,在军工、芯片制造、环境等领域也具有极高应用价值。由于蜘蛛是肉食性节肢动物,无法大规模饲养,因此异源宿主表达是实现蛛丝蛋白大量生产的

唯一方式。研究人员已尝试在家蚕细胞、植物细胞、哺乳动物细胞、酵母、沙门氏菌和大肠杆菌中表达蛛丝蛋白^[56]。其中,大肠杆菌表达系统获得了目前最高产量即 14.5 g/L,最有潜力成为重组蛛丝蛋白异源表达平台^[57]。在大肠杆菌中表达蛛丝蛋白采取的策略主要有:提升蛛丝蛋白基因稳定性、提升蛛丝蛋白溶解性、上调大肠杆菌细胞中甘氨酸-tRNA 含量,以及与内含肽融合表达等,这些策略一定程度上提高了蛛丝蛋白的表达量和表达质量。目前,重组蛛丝蛋白还难以复刻天然蛛丝的力学性能,其表达量的进一步提升也有很大挑战,对蛛丝蛋白序列进行重新设计可能是一种解决思路。

在细菌表达系统规模化生产重组蛋白过程中,内毒素是必须要去除的一种物质。内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁中的脂多糖组分,具有诱导促炎反应和引发严重生理反应的能力,通常表现为高烧、低血压和感染性休克^[58]。内毒素的基本结构由 3 个单元组成,即 O-抗原、核心多糖和脂质 A。核心多糖是内毒素的核心成分,由一系列保守的低聚糖组成。脂质 A 由疏水性脂肪酸组成,与核心多糖共价连接并嵌入外壁,主要决定内毒素毒性;O-抗原与亲水性核心多糖共价连接,位于细胞外侧,产生抵抗力物质,使细菌能够逃逸宿主免疫系统。重组蛋白产品有严格的内毒素限值要求。内毒素的检测分为鲎试剂检测法与非鲎试剂检测法,后者又分为直接检测法与间接检测法。直接检测法采用气相色谱质谱联用仪或酶联免疫吸附试验,间接检测法是通过检测在内毒素影响下不同免疫细胞产生促炎细胞因子的生物活性,进而推断内毒素水平。破坏内毒素结构需要 180 °C 以上高温或酸碱处理,目前主要采用离子交换色谱、凝胶过滤色谱、超滤等分离手段从蛋白质制品中去除内毒素。

酶的筛选、表达、表征和改造

多聚磷酸激酶(poly phosphate kinase, PPK)能够以多聚磷酸盐作为磷酸基供体,催化 AMP 或 ADP 生成 ATP。由于底物廉价,利用 PPK 构建 ATP 再生体系是生物催化反应的重要选择。PPK 主要有 PPK1 和 PPK2 两大家族。程峰等^[59]介绍了两种 PPK 的结构特征和催化机理,以及不同来源 PPK 在催化效率、稳定性和底物偏好性等方面的差异,总结了针对提高 PPK 催化效率、稳定性和底物偏好性的分子改造方法,为在生物催化体系中应用 PPK 构建高效 ATP 再生体系提供了重要参考。高惠等^[60]选择哈氏噬纤维菌来源的 ChPPK,通过分子对接和定点突变,扩大了多聚磷酸盐激酶的多聚磷酸盐和 ADP 双底物通道腔,提高了底物利用范围和底物耐受性。相比于野生型 ChPPK,突变体酶活提高了 3.2 倍,酶的耐热性与耐碱性也得到了提升;将该 ATP 再生系统与生产谷胱甘肽的无细胞催化体系结合,谷胱甘肽产量提高了 41.9%,同时降低了反应成本。

儿茶酚是一种重要的化工和医药中间体,主要用于显影剂、偶氮染料、橡胶防老剂、食品稳定剂、涂料抗氧化剂、石油抗凝剂等,我国每年市场需求超过 2 万 t。化学法生产儿茶酚采用苯酚羟基化法,以苯酚、过氧化氢等为原料,存在化石资源依赖和污染大等问题。生物法合成儿茶酚分为发酵法和全细胞催化法。由于儿茶酚具有细胞毒性,会抑制细胞生长,因此发酵法产率较低。全细胞催化法以原儿茶酸作为底物,通过原儿茶酸脱羧酶催化合成儿茶酚,目前主要受限于原儿茶酸脱羧酶的活性较低。田立岩等^[61]从 21 个不同来源的原儿茶酸脱羧酶中筛选获得一个催化活性较好的酶,全细胞催化合成了 13.54 g/L 儿茶酚;对该酶的稳定性相关位点进行突变改造,产量提高了 12%;进一步表达 3-脱

氢莽草酸脱水酶和原儿茶酸脱羧酶, 实现以 3-脱氢莽草酸发酵液为底物, 催化合成了 29.55 g/L 儿茶酚, 为目前报道的最高水平。

酪氨酸酶是一种含铜多酚氧化酶, 具有单酚酶活性和二酚酶活性, 在黑色素、酚类、木质素等物质的生物合成中具有关键作用。酪氨酸酶可应用于食品、环境、医药、组织工程、生物传感器等领域, 其中一个特别应用是使用酪氨酸酶进行生物染发。区别于化学染发, 酶法生物染发更加温和、环保。实现酪氨酸酶的应用需要满足高酶活、低成本两个先决条件。目前酪氨酸酶的生产主要从蘑菇中提取, 成本非常高。郑依琳等^[62]将 5 种不同来源的酪氨酸酶在大肠杆菌中异源表达, 获得了一个酶活高、稳定性好、底物专一性强的细菌来源的酪氨酸酶。进一步利用纯化后的酪氨酸酶, 建立了酶法生物染发体系, 实现了原位催化染发, 且水洗色牢度较好, 为开发基于酪氨酸酶的生物染发剂奠定了基础。

L-天冬酰胺酶(L-asparaginase, L-ASN)在医药和食品领域具有重要的应用价值。L-ASN 可催化 L-天冬酰胺水解生成 L-天冬氨酸, 一方面可用于降解血液中的天冬酰胺, 抑制肿瘤细胞生长; 另一方面, 可降低天冬酰胺到丙烯酰胺的副反应风险, 用于生产低丙烯酰胺食品。已用于异源表达 L-ASN 的宿主有大肠杆菌、毕赤酵母和枯草芽孢杆菌, 但生产性能均未达到产业化水平。杨新愿等^[63]通过筛选用于酶分泌表达的信号肽、测试多个强启动子、对比不同芽孢杆菌作为宿主, 最终在地衣芽孢杆菌 BL10 中构建了工程菌株, 使 L-ASN 的酶活提高了约 80%, 达到目前报道的摇瓶最高水平。

小牛胰凝乳酶是一种来自于小牛皱胃的酸性蛋白酶, 属于天冬氨酸蛋白酶家族。小牛胰凝乳酶常被用于奶酪的生产制备, 其功能是水解牛乳中 κ 酪蛋白的 Phe105-Met106 肽键, 从

而导致酪蛋白不稳定生成絮凝状固体。小牛胰凝乳酶的加工修饰相对复杂, 其高效生产依赖于酶的高效表达。宋悦辰等^[64]对小牛胰凝乳酶原基因进行密码子优化, 整合至乳酸克鲁维酵母基因组中, 实现了异源表达; 进一步构建了多拷贝菌株, 并利用紫外诱变技术获得一株高产小牛胰凝乳酶的重组酵母; 其摇瓶中小牛胰凝乳酶发酵酶活力达到 270 U/mL; 5 L 罐中酶活力达到最高值 600 U/mL。

氨肽酶是一类外肽酶, 可以从蛋白质或肽链的 N 端选择性水解氨基酸残基。氨肽酶的水解产物为短肽和游离氨基酸, 是食品中重要的营养风味物质, 因此氨肽酶在食品工业中具有重要应用价值。氨肽酶 A 是一种金属蛋白酶, 能够专一性地水解 N 末端为谷氨酸或天冬氨酸的多肽, 应用于富含谷氨酸/天冬氨酸的食物蛋白的水解, 如面筋和酪蛋白等。田鑫等^[65]将乳酸乳球菌来源的氨肽酶 A 在毕赤酵母中进行了异源分泌表达; 结果显示, 该酶具有较强的底物特异性, 对谷氨酸对硝基苯胺和天冬氨酸对硝基苯胺均具有催化活性; 其最适反应温度为 60 °C, 最适 pH 为 8.0, 并具有宽泛的热稳定性和 pH 稳定性。该酶对常规蛋白酶抑制剂不敏感, 但能被金属蛋白酶抑制剂、EDTA 等抑制, 表明该酶确实是一种金属蛋白酶, 并具有较高的应用价值。

疯草是一类草原毒草, 其主要毒性成分为苦马豆素, 对马、牛、羊等大型家畜具有较大毒害作用。但同时疯草中含有多种优质营养物质, 因此降低疯草中的苦马豆素含量, 对草原畜牧业益处很大。研究发现, 节杆菌 HW08 对苦马豆素具有高效的降解能力, 其中依赖 NADP 的乙醇脱氢酶、谷胱甘肽合酶、酯酶/酰基水解酶、糖基转移酶在其中发挥了重要作用^[66]。滕君洋等^[67]在食品级微生物乳酸乳球菌中表达了上述 4 个关键降解酶, 发现单独表达

的乙醇脱氢酶对苦马豆素具有降解能力,联合使用谷胱甘肽合酶、酯酶/酰基水解酶和糖基转移酶对苦马豆素也有一定降解作用,为疯草脱毒利用提供了新的思路。

需钠弧菌是一种新型的蛋白表达宿主,其生长速度比大肠杆菌快 2 倍,对环境耐受性也更强。目前已有 150 余种蛋白在需钠弧菌中实现了异源表达,且其可溶性表达优于大肠杆菌。普鲁兰酶是一种淀粉脱支酶,可以水解普鲁兰多糖和较低分子量的分支糊精,主要用于生产淀粉糖、抗性淀粉、环糊精等。由于分子量较大,普鲁兰酶的胞外分泌表达较为困难。张玉华等^[68]首次尝试使用需钠弧菌异源表达普鲁兰酶,分析了信号肽、发酵温度、诱导剂浓度等条件对胞外产酶的影响,在需钠弧菌中实现了普鲁兰酶的胞外分泌表达。

多磷酸肌醇-5-磷酸酶(inositol polyphosphate 5-phosphatases, 5PTases)广泛存在于真核生物中,主要介导磷脂酰肌醇信号传导和 IP₃ 信号通路等,调节多种生命活动过程。明确肌醇磷酸水解酶的作用底物有助于解析该类酶的分子作用机制。研究人员分析大豆耐盐转录组,发掘出一个受盐胁迫诱导的多磷酸肌醇-5-磷酸酶基因,命名为 *Gs5PTase8*,功能鉴定表明其为大豆耐盐正调节基因。为了从生物化学层面解析 *Gs5PTase8* 的水解底物特性,陈媛等^[69]在大肠杆菌中采用 His-tag 和 GST-tag 标签融合表达 *Gs5PTase8*,成功诱导表达了 GST-*Gs5PTase8* 重组蛋白。体外分析表明,*Gs5PTase8* 可以水解水溶性肌醇多磷酸和脂溶性肌醇多磷酸等多种肌醇多磷酸底物,为进一步研究大豆耐盐分子机制奠定了基础。

内质网是真核细胞中蛋白质折叠和质量控制的主要场所,其内部驻留的分子伴侣通过特异性识别葡萄糖基化的 *N*-寡糖结构与糖肽结合,进而促进相应蛋白的折叠。多萜醇磷酸葡萄糖(dolichol phosphate glucose, Dol-P-Glc)或其类似

物是内质网腔内葡萄糖基化反应的糖基供体,对解析 *N*-寡糖生物合成途径具有重要意义。栗瑞杰等^[70]在大肠杆菌表达阴道毛滴虫来源的多萜醇磷酸 β-葡萄糖基转移酶,以化学合成的一系列多萜醇类似物(phytanol)作为底物,合成了结构简单、水溶性好的 Phy-P-Glc,为多萜醇寡糖合成途径中葡萄糖基转移酶的研究奠定了基础。

己糖激酶是血糖检测中的重要试剂,己糖激酶法也是国际上公认的血糖检测标准方法。己糖激酶将葡萄糖磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸,后者经葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化可将 NAD⁺还原为 NADH,通过在 340 nm 处检测 NADH 的吸光值变化,可以对葡萄糖含量进行定量。目前,国内己糖激酶主要依赖进口,价格昂贵且稳定性差。李倩妮等^[71]在大肠杆菌中对一种来源于嗜热细菌的己糖激酶进行了异源表达、纯化和酶学性质研究;发现该酶对葡萄糖具有较好的底物特异性,最适 pH 和最适温度分别为 8.5 和 80 °C,在 30–37 °C 下保存 1 周后,酶活损失不超过 10%,表明该酶具有较好的热稳定性。

具核梭杆菌是结直肠癌发生和发展过程的致病因子,被称为“肿瘤细菌”。其外膜上的黏附素能够促进肿瘤细胞的增殖与转移,协助肿瘤细胞抵御抗生素,保护肿瘤细胞不被免疫细胞杀死。具核梭杆菌的双组分系统 ModRS 负责调控氧化应激防御途径中关键酶的表达,保护该菌在免疫细胞中免受氧胁迫损伤,并通过附着和侵袭多个靶组织获得毒力。李竺婷等^[72]对 CarRS 系统中组氨酸激酶蛋白 CarS 进行了重组表达和性质研究,截取 CarS 蛋白的胞内域片段,与麦芽糖结合蛋白 MBP 标签融合,成功实现了异源表达。纯化蛋白同时具有激酶活性和磷酸转移酶活性,能够发生自身磷酸化,并将磷酸基团传递到应答调节蛋白 CarR 上。这为进一步理解 CarRS 双组分系统的工作原理和发现

具核梭杆菌致病性关键靶点奠定了基础。

人溶菌酶是人体内天然存在的能够降解微生物细胞壁的碱性蛋白,主要作用于革兰氏阳性菌细胞壁肽聚糖中 *N*-乙酰氨基葡萄糖与 *N*-乙酰氨基甲酸之间的 β -1,4 糖苷键,从而导致革兰氏阳性菌破裂死亡^[73],在抗菌、抗病毒、抗炎、抗癌和调节免疫活性方面具有广泛应用。重组人溶菌酶的生产主要通过转基因动物、转基因植物和微生物细胞工厂进行。目前开发的转基因动物有转基因小鼠、转基因牛、转基因猪、转基因山羊等,最高产量为 35 mg/mL^[74]。转基因水稻所制备的面粉中人溶菌酶含量为 5.4 g/kg^[75],转基因胡萝卜中人溶菌酶蛋白含量占总可溶蛋白的 0.5%^[76]。微生物生产人溶菌酶主要利用大肠杆菌、毕赤酵母、酿酒酵母和乳酸双歧杆菌,例如乳酸双歧杆菌中产量可以达到 187 U/mL^[77]。下一步还需从基因工程、生产工艺等方面提高重组人溶菌酶的产量和批次稳定性。

桔黄赛多孢霉是一种侵袭性和致病力较强的条件致病真菌,比其他赛多孢霉更具耐药性、高温和高盐耐受性。小鼠实验表明,桔黄赛多孢霉是毒性最强的赛多孢霉。研究发现,弹性蛋白酶和胰蛋白酶是桔黄赛多孢霉关键的毒力因子^[78]。由于弹性蛋白酶分泌量很小,限制了对该酶的酶学特性和毒性机制研究。彭元怀等^[79]通过底物诱导表达提高了弹性蛋白酶的分泌量,测定了纯酶的蛋白质序列,进一步考察了其酶学特性,发现该菌分泌的弹性蛋白酶对肺组织中的弹性蛋白具有降解作用,为研究桔黄赛多孢霉的侵袭性和毒性奠定了基础。

Taq DNA 聚合酶是分子生物学中进行 PCR 扩增的重要工具酶,对实验研究、DNA 测序、医学诊断都十分重要。为提高 *Taq* DNA 聚合酶的扩增效率,常对 *Taq* DNA 聚合酶的 5'→3'核酸外切酶结构域进行缺失,但会导致扩增片段

长度受到限制。王亚平等^[80]将前期基于大肠杆菌素失活改造获得的核酸结合蛋白标签 dCE 与 *Taq* DNA 聚合酶融合,利用 dCE 的核酸结合能力提高 *Taq* DNA 聚合酶的扩增能力;结果表明,融合 dCE8 标签能够在 1 min 内扩增 8 kb 的 DNA 片段,展示出融合改造策略的有效性。

莨菪碱 6 β -羟化酶(hyoscyamine 6 β -hydroxylase, H6H)属于 2-酮戊二酸/ Fe^{2+} 依赖双加氧酶,能够催化 L-莨菪碱的 6 位羟化生成山莨菪碱,随后催化山莨菪碱形成具有环氧结构的东莨菪碱。H6H 是托品烷类生物碱合成途径中的最后一个酶,也是关键限速酶。相比于其他 2-酮戊二酸/亚铁离子依赖的羟化酶和卤化酶, H6H 的底物谱较为宽泛。如将 H6H 天然底物 L-莨菪碱的羟甲基基团去除后, H6H 还有 81% 的催化活力。H6H 对 6 β -OH 莨菪碱、7 β -OH 莨菪碱和 6,7-脱氢莨菪碱都具有催化活性,且产物均为东莨菪碱。除了莨菪碱的结构,当底物结构拓展到八元环时, H6H 同样具有催化转化能力,产物为 6 位、7 位和 8 位的单羟基或双羟基化产物。H6H 均为植物来源,在大肠杆菌中表达存在一定困难,通过融合表达可以提高可溶表达量。关于 H6H 的蛋白质改造研究较少,仅有 1 例采用随机突变构建突变文库,筛选获得比活力提高 4.4 倍的双突变体^[81]。

右旋糖酐酶催化右旋糖酐中的 α -1,6 糖苷键,生成小分子量的右旋糖酐。分子量在 10–70 kDa 的右旋糖酐是国际公认的代血浆首选药物,小于 10 kDa 的右旋糖酐可与铁络合用于治疗缺铁性贫血。在制糖工业中,右旋糖酐酶被用于去除蔗糖生产过程中产生的右旋糖酐。因此,右旋糖酐酶在食品和医药中具有重要用途。夏冰冰等^[82]对海洋氧化节杆菌 KQ11 来源的右旋糖酐酶进行定点突变研究,获得一个催化效率显著提升的突变体 W507Y,其 k_{cat} 相比野生型提

高了 3.6 倍, K_m 下降了 54%, 催化效率 k_{cat}/K_m 提高了近 9 倍, 具有较好的应用潜力。

玉米赤霉烯酮是一种镰刀菌毒素, 常发现于饲料和食品行业, 严重危害牲畜和人类健康。物理法和化学法脱毒容易破坏饲料营养成分, 生物法脱毒条件温和, 更具应用价值。来源于粉红螺旋聚孢霉的玉米赤霉烯酮水解酶(zearalenone hydrolase, ZHD)能有效降解饲料中的玉米赤霉烯酮, 是生物法脱毒的潜在催化剂。但是, 该酶热稳定性差, 饲料加工中的高温环境限制了该酶的实际应用。官媛林等^[83]采用理性设计对该酶实施热稳定性改造; 首先通过多蛋白质结构比对筛选出结构灵活区, 基于序列保守性打分以及构象自由能计算, 确定了针对 2 个氨基酸残基位点的 9 种突变选择; 发现突变体 S220R 和 S220W 热稳定性最好, T_m 分别提高了 5.6 °C 和 4.0 °C, 45 °C 下的热半失活时间分别延长了 15.4 倍和 3.1 倍, 有效增强了 ZHD 的热稳定性。

骨化二醇和骨化三醇是维生素 D₃ 的主要活性形式, 用于预防和治疗骨质疏松, 在抗肿瘤、调节炎症因子、抑制氧化应激等方面也有功效。目前主要采用化学合成法生产骨化二醇和骨化三醇, 路线复杂、成本高、环境污染大。生物催化采用细胞色素 P450 酶, 包括 P450 单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenases, CYPs)和 P450 过加氧酶(unspecific peroxygenases, UPOs), 以维生素 D₃ 为底物催化生成骨化二醇和骨化三醇^[84]。天然 P450 单加氧酶活性低、稳定性差、底物特异性不强, 通过理性设计和定向改造, 一定程度上提高了酶的催化效率、稳定性和底物特异性。其次, P450 单加氧酶催化过程中存在辅因子 NADPH 供应不足、氧化还原伴侣与 CYPs 比例不匹配等问题。通过在宿主细胞内构建辅因子再生系统以提供充足 NADPH, 是解决限速步骤的关键。相比于 CYPs, UPOs 不需要

辅因子, 也不需要氧化还原伴侣, 具有更高区域选择性。但目前可用的 UPOs 很少, 且 UPOs 的异源表达非常困难, 这些问题需要在进一步的研究中予以解决。

生物催化

谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)可将谷氨酸一步转化为 γ -氨基丁酸, 因此 γ -氨基丁酸的生产主要采用含 GAD 的全细胞催化剂进行。绝大多数 GAD 催化反应在偏酸性条件下进行, 且反应 pH 范围较窄。但是, 在 GAD 催化的生物转化过程中, 随着 γ -氨基丁酸的生成, 溶液 pH 会逐渐上升, 不利于 GAD 酶的持续催化。肖杰文等^[85]基于蛋白表面电荷的理性设计, 将经 ARTP 诱变的植物乳杆菌来源的谷氨酸脱羧酶 LpGAD 进行定点突变和组合突变, 获得一个三突变体 S24R/D88R/Y309K; 该突变体在 pH 6.0 条件下的酶活是野生型的 1.68 倍, 且在 pH 6.5 时仍具有一定的酶活力, 而野生型在该条件下完全无催化活性; 将该突变体置于谷氨酸棒杆菌中表达, 在不调节 pH 情况下, 5 L 发酵罐全细胞催化反应中 γ -氨基丁酸产量达到 400 g/L, 相比对照菌株提高了 1.63 倍, 表明了该突变体的潜力。

磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)是维生素 B₆ 的活性形式, 是多种酶促反应中的辅因子。PLP 依赖型酶能够催化消旋、脱羧、 β -加成、 β -消除、反羟醛裂解、转氨和 α -消除等多种化学反应, 是生物法合成多种天然氨基酸、非天然氨基酸的重要催化剂^[86]。PLP 依赖型酶可分为五种类型, 包括 ω -转氨酶、赖氨酸脱羧酶、苏氨酸醛缩酶等 I 型酶; L-酪氨酸裂解酶等 II 型酶; α -氨基 ϵ -己内酰胺消旋酶等 III 型酶; 胱硫醚 β -裂解酶等 IV 型酶, 以及糖原磷酸化酶等 V 型酶。天然 PLP 依赖型酶催化效率低、立体选择性差、底物耐受性低、热稳定差, 研究

人员通过随机突变和理性改造等策略,不同程度地提高了 PLP 依赖型酶的催化效率、稳定性、底物特异性和产物选择性,使其能够适应工业生产需求。由于 PLP 辅因子的生产成本相对较高,且在生产过程中会被消耗,需要开发 PLP 辅因子的再生系统,但目前这方面的研究较少。

胞磷胆碱是一种重要的神经保护药物和膳食补充剂,市场需求随老龄化加剧而增长。因生物合成法具有高转化效率和环保优势,故成为胞磷胆碱的主要生产方式。胞磷胆碱的生物合成法主要包括生物催化法和发酵法^[87],目前生物催化法高效、环保且成本效益较高。生物催化法的关键在于筛选和改造催化酶——磷酸胆碱胞苷酰转移酶(choline phosphate cytidyltransferase, CCT),以及优化底物组成和反应条件。研究者通过比较不同来源的 CCT 酶活性,发现某些微生物来源的 CCT 具有更高的催化效率。CCT 的耐盐性和催化活性可通过分子改造和酶固定化技术进一步提高,从而提升胞磷胆碱的合成效率和产量。在大肠杆菌和毕赤酵母中优化关键酶表达和代谢途径,如过表达胆碱转运蛋白和阻断降解途径,发酵法生产胞磷胆碱的产量最高可达 32.2 g/L^[88]。新式灌流系统的应用能够进一步提升产量和生产率,但成本控制和分离提纯等方面仍需进一步优化。

最近风靡于市场,有“长生不老药”之称的 NMN,学名为烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide)。NMN 是 NAD⁺的关键前体之一,而 NAD⁺参与线粒体功能、能量代谢、细胞衰老和死亡等关键细胞代谢过程。由于胞内 NAD⁺水平随着年龄增长而降低,人体内主要通过以 NMN 来补充 85%的 NAD⁺,其中 β -NMN 是其主要活性形式。NMN 的主要功能基团是核糖基与烟酰胺基。在生物催化法合成 NMN 的过程中,这两个基团可以由不同的物质来提供。

第一种是以磷酸核糖焦磷酸(5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate, PRPP)和烟酰胺(NAM)为核心底物,以烟酰胺磷酸核糖转移酶为关键酶;第二种是以烟酰胺核糖为核心底物,以烟酰胺核糖激酶为关键酶。NMN 的生物合成,主要是通过增强磷酸核糖焦磷酸、烟酰胺核糖的前体供应,以及对单一酶的优化、多酶催化系统的优化、辅因子循环体系的优化,来提升 NMN 的生物合成效率。这些生物合成途径也存在于微生物中,通过代谢工程改造,也可以实现以葡萄糖和烟酰胺为原料,发酵法生产 NMN。在陈宇娴等^[89]的综述中,发酵法生产 NMN 的最高滴度达 16.2 g/L,底物转化率为 97%。

ω -转氨酶(ω -TA),是合成手性胺类化合物的重要催化剂,可立体选择性地催化氨基酸、烷胺、芳香胺等氨基供体到醛、酮、酮酸等氨基受体的氨基转移。近 10 年来,我国在基于 ω -TA 的手性胺生物合成研究方面取得了较大进展,主要聚焦在 ω -TA 新酶资源挖掘、 ω -TA 蛋白工程改造、手性胺合成应用以及催化转化工艺等方面^[90]。比如从公开数据库中挖掘了多个立体特异性 R 型 ω -TA,经改造后用于降糖药西他列汀的催化合成;利用芽孢杆菌来源的 S 型 ω -TA 高酶活突变体,实现了除草剂农药中间体(S)-1-甲氧基-2-丙胺的生物合成。除了合成手性胺, ω -TA 还通过与其他酶偶联催化,用于合成氨基醇、氨基酸、羟基酪醇等物质。针对 ω -TA 的蛋白工程改造主要有非理性和半理性策略。半理性策略借助分子对接、分子动力学模拟等计算生物学技术,可以提高蛋白工程改造的有效性。针对天然 ω -转氨酶热稳定性差、催化效率低等问题,蔡婷婷等^[91]对来自土曲霉属的 ω -转氨酶(AtTA)进行了不同温度下的分子动力学模拟,预测影响其热稳定性的关键氨基酸区域;随后采取随机突变与组合突变相结合的策略,对

ω -转氨酶进行半理性分子改造,获得了一个最佳突变体 M3,其热稳定性提高了近 5 倍,催化效率提高了约 50%。分子改造后的 ω -转氨酶 M3 对多种芳香酮类化合物的催化效率全面提升,提示其在手性胺类合成方面具有很好的潜力。

手性胺类化合物(S)-1-(2-氟苯基)乙胺作为关键手性砌块,可用于多种药物合成。尽管新型 ω -TA 不断被发现,但其工业应用仍受限于热稳定性和底物谱。蛋白质工程改造可提高酶活性和稳定性,而解决不利反应平衡的策略包括氨基供体过量法和多酶偶联法。于双嵘等^[92]通过半理性设计改造 ω -转氨酶 *PfTA*,以提升其对 2-氟苯乙酮的催化活性;作者通过同源建模和分子对接技术,对 *PfTA* 酶进行半理性设计,筛选出 Y168R/R416Q 突变体,其催化活性较野生型(WT)得到了显著提升。Y168R/R416Q 在高温和碱性条件下表现出更强的耐受性,且催化效率大幅提高。实验结果显示,该突变体在催化 2-氟苯乙酮合成(S)-1-(2-氟苯基)乙胺时,产率显著高于 WT,且在较高底物浓度下仍能有效催化,表明其在工业应用中的潜力。结构模拟分析进一步揭示了突变位点对酶活性提升的机制,主要通过优化底物结合和减少空间位阻实现,揭示了酶活性提升机制与活性口袋拓宽和空间位阻减少相关。

多酶级联催化反应是近年来合成精细化学品的重要路线,根据酶反应环境不同,可分为体内级联反应、体外级联反应和混合级联反应,最普遍的是体外级联反应^[93]。从路线设计上又可分为线性级联、平行级联、正交级联和循环级联。构建级联反应的通用流程是“设计路线-招募酶元件-系统测试-重构优化”。辅酶再生是构建多酶级联催化反应体系的关键环节。涉及最多的辅酶是 ATP 和烟酰胺类辅酶即 NAD^+/NADH 、 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 。多酶级联反应在双官能团功能化学品的生物合成中应用广

泛,包括 ω -氨基脂肪酸、烷基内酰胺、 α,ω -二元羧酸、 α,ω -二胺、 α,ω -二醇、 ω -氨基醇等化学品。郑棚等^[94]构建了一个由两个大肠杆菌工程菌联合的体内三酶级联反应,用于催化葡萄糖和蔗糖合成纤维寡糖,产量可达 97 g/L,纯度约为 97%,证明了多级酶联法可以将廉价底物高效转化为高纯度的纤维寡糖。对益生菌进行生长测试发现,所生产的纤维寡糖可以促进肠道益生菌的增殖。

生物活性物

生物活性物是对生物体生理或细胞功能具有重要影响的活性成分的总称。研究和应用较多的活性成分主要有:动物来源的功能糖、活性氨基酸、蛋白质、肽类和脂类,植物来源的萜类、黄酮类、酚类和生物碱,微生物来源的酶和维生素等。生物活性物在医药健康、食品保健、个人护理领域被广泛应用^[95]。随着合成生物技术的发展,生物活性物的生产方式已基本实现从传统的天然提取、化学合成完全过渡到以工业菌种为核心的生物制造模式,越来越多的生物活性物实现了从产量提升到产业升级的变革。

在功能糖领域,糖胺聚糖(如透明质酸和硫酸软骨素)受到极大关注。其中,透明质酸产业化已达到国际较高水平,预计未来 5 年国内透明质酸市场规模将突破 50 亿元。硫酸软骨素生产菌株目前还存在产量低、磺酸化水平低等问题。

在活性氨基酸领域, γ -氨基丁酸、麦角硫因、5-氨基乙酰丙酸的研究和产业化较为集中。 γ -氨基丁酸具有安神、助眠、中枢神经系统抑制性神经递质等功能,被用于开发抗焦虑的精神类药物和具有抗皱、抗衰老、美白等功效的化妆品。目前生物发酵法生产 γ -氨基丁酸产量已非常高,最高达到 500 g/L,国际市场竞争激烈。麦角硫因作为一种稀有的天然手性氨基酸,

具有清除自由基、细胞免疫、抗辐射、美白及抗衰老等生理活性。目前,生物发酵法生产麦角硫因主要以大肠杆菌、酿酒酵母作为底盘细胞,报道的发酵罐最高产量为 7.2 g/L,还有较大的提升空间^[96]。5-氨基乙酰丙酸是生物体合成血红素、叶绿素、维生素 B₁₂ 等四吡咯化合物的前体,具有提高基础代谢水平、缓解疲劳、提高运动机能、增强免疫力、抵抗光老化和色素沉着等生理活性,作为第二代光敏剂用于光动力学治疗。5-氨基乙酰丙酸的全球市场规模已超过 7.7 亿元,其微生物发酵技术也日趋成熟。

在活性蛋白质方面,胶原蛋白、弹性蛋白、免疫球蛋白和乳铁蛋白研究较多。胶原蛋白具有保湿美白、紧致祛皱、保湿抗衰和屏障修复等功能;弹性蛋白可促进伤口愈合,刺激皮肤微循环;免疫球蛋白包括注射用人免疫球蛋白、狂犬病人免疫球蛋白等;乳铁蛋白具有结合并转运铁的能力,用于促进铁的吸收。活性蛋白的微生物发酵法在不断发展中,如重组胶原蛋白技术还需攻克如何进行修饰实现胶原的三螺旋结构。其他类别的生物活性物合成技术也在不断开发中。

近年来,医美产业发展迅猛。全球医美行业 2022 年市场规模约 926 亿美元,化妆品行业市场规模达 8 000 亿美元,并且还在以较高的增长率持续攀升^[97]。医美产品功效主要包括保湿、修复、补水、舒缓、美白和抗衰等,涉及的功能性护肤原料主要包括蛋白质和肽类、多糖类、酚酸类、萜烯类、维生素类和氨基酸类。随着合成生物技术的发展,大部分医美活性成分都实现了微生物合成,部分成分如重组胶原蛋白、透明质酸、泛酸、红景天苷、角鲨烯等已实现工业化生产。当然,大部分医美原料的生物合成技术有待提高,更多天然活性成分有待挖掘。从关键酶到工程菌株,从发酵工艺到分离纯化,都还有巨大的发展空间。

生物活材料具有可编程、能够自我调节等特点,被用于生物催化、皮肤修复、污染治理、仿生器官以及疾病诊疗等方面^[98]。目前,基于生物被膜的活材料主要使用单一菌株,应用到体内时,容易发生逃逸,滞留时间短。为此,研究人员在大肠杆菌表面分别展示 SpyTag 和 SpyCatcher,通过 SpyTag 与 SpyCatcher 形成共价连接系统,构建了一种锁扣型生物活材料系统。体外实验发现两菌株混合后发生明显沉降,在微流控流动系统中依然保持黏附效果,体内实验表明,相比于非结合菌株,锁扣双菌系统可以在小鼠肠道滞留更长时间^[98]。这为开发体内应用生物活材料提供了新的思路。

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)是一类含锌金属酶,参与调节机体环境 pH、电解质平衡等生理过程^[99]。目前,哺乳动物中累计分离出 16 种 CA 亚型,其中碳酸酐酶 CAIX 在肿瘤演变过程中发挥着重要的作用。CAIX 在多种缺氧肿瘤细胞膜表面特异性高表达,因此以 CAIX 作为靶点开发造影剂有望获得高灵敏度和高分辨率的肿瘤成像效果。此外,CAIX 通过调节肿瘤细胞内外酸碱度,酸化细胞外基质,从而促进肿瘤的生长、侵袭和转移,并抵抗外来干预治疗。因此,CAIX 也成为肿瘤治疗的重要靶点。基于 CAIX 开发的肿瘤成像技术主要有放射性核素成像、超声成像、光学成像,以及综合多种成像技术的多模态成像。在基于 CAIX 的肿瘤治疗方面,目前已开发小分子药物、单克隆抗体、shRNA 等靶向抑制剂来降低 CAIX 的表达和活性。同时,上述靶向抑制剂可以结合免疫疗法、放射疗法、化学疗法、PTT 及 PDT 疗法,开展肿瘤联合治疗。将基于 CAIX 肿瘤成像和肿瘤治疗结合起来,开发靶向 CAIX 的诊疗一体化制剂,可以减少用药次数,降低毒副作用,并通过肿瘤成像实时评估治疗效果,这

是基于 CAIX 的抗肿瘤研究的发展趋势。

光动力学治疗(photodynamic therapy, PDT)是一种新型的肿瘤治疗方法。目前光动力治疗一般使用光动力治疗仪从人体外部给予光照,因组织吸收和散射,光照到达肿瘤位置时发生了较大衰减,导致光动力疗法的使用范围只能限定在浅表肿瘤,限制了对组织深处肿瘤治疗的应用。微针是一种高效的药物递送技术,它以非侵入性方式将靶向药物输送到皮肤和其他组织,其中可溶性微针以生物相容性较好的水溶性材料为基质制备而成。刘俸溢等^[100]将微针技术应用于光动力学治疗中,设计了一种基于壳聚糖的可溶性微针;在微针尖端搭载药物,在微针基底搭载 LED 光源,制备出搭载高能光子的可溶性缓释微针贴片用于光动力治疗。在使用过程中,利用电磁感应原理通过无线供电技术给 LED 光源供电,从而可以将微针贴片植入皮下肿瘤甚至更深位置的器官上。该技术具有可控缓释特性和长效光辅助治疗效果,为肿瘤光动力学治疗提供了一种新的途径。

重组腺病毒载体(adenoviral vector, Adv)因具有高效的入核机制和较低的致病性,被广泛应用于疫苗开发和免疫治疗^[101]。生产重组腺病毒载体的主要宿主细胞系是 HEK 293 细胞。相比传统的分批和补料-分批培养,灌流培养单位体积产量较高,是 HEK 293 细胞生产 Adv 的主要工艺。原因是灌流培养可以稳定维持较高的营养物质水平,同时保持较低的代谢副产物水平,有效克服细胞密度效应。在传统培养方式下,发现高渗胁迫可以将 Adv 产量提高 2-3 倍。研究人员进而将高渗胁迫工艺与灌流培养相结合,即在细胞生长阶段使用高渗透压培养基,在病毒生产阶段使用等渗透压培养基。将该工艺应用到生物反应器中,Adv 产量相比单独的灌流培养工艺提高了 3 倍^[101]。这为利用 HEK 293 细胞生产其

他类型 Adv 的工艺优化提供了参考。

植物天然化合物

萜类化合物,又称类异戊二烯类化合物,是一类以异戊二烯五碳单元为碳骨架连接起来的碳氢化合物。萜类化合物是目前种类最丰富的一类天然化合物,生物活性多样,在医药、食品和化工等领域具有重要应用价值。根据异戊二烯单元数量,萜类化合物又分为单萜(C10)、倍半萜(C15)、二萜(C20)、三萜(C30)、四萜(C40)、多萜等。酿酒酵母因具有真核表达修饰系统,利于细胞色素 P450 酶表达,因此是生产萜类化合物的优势底盘细胞^[102]。萜类化合物的生物合成途径较长,从乙酰辅酶 A 出发,经过 MVA 途径的转化为异戊烯焦磷酸酯(isopentenyl pyrophosphate, IPP)和二甲基丙烯焦磷酸酯(dimethylallyl diphosphate, DMAPP),随后进入麦角甾醇合成途径,合成萜类化合物前体物质,最后由外源萜类合成酶催化产生萜类化合物。代谢工程改造酿酒酵母的主要目标有增加乙酰辅酶 A 供应、强化 MVA 途径、调控麦角甾醇合成途径、筛选或改造萜类合成酶^[103]、优化 P450 酶的表达和提高对萜类化合物的耐受性等。酿酒酵母在合成香叶醇、法尼烯、紫杉二烯、甘草次酸、番茄红素等多种萜类化合物方面已取得很大进展,接近或具备工业化生产水平。

柠檬烯及其衍生物紫苏酸,属单萜类天然产物的一种,以异戊二烯为骨架进行生物合成。其香味宜人、活性独特、理化性质优良,广泛应用于食品、药品、护肤品等领域。近年来全球柠檬烯产量大幅增长,2024 年市场规模预计超过 19 亿美元。由于植物提取和化学合成受到不同因素的限制,微生物合成柠檬烯具有较大发展潜力。酿酒酵母已成功用于生物合成 β -法尼烯(130 g/L)、青蒿酸(25 g/L)等类异戊二烯化

学品,是合成异戊二烯的优良底盘细胞。近期,研究人员在酿酒酵母过氧化物酶体内区室化表达柠檬烯合酶,利用模块化工程鉴定了参与柠檬烯合成的关键基因,并采用高拷贝质粒表达这些关键基因^[104];最终,柠檬烯产量达到 86.74 mg/L,进一步引入细胞色素 P450 酶将柠檬烯转化为紫苏酸。

二萜类化合物(diterpenoids)是一类由 4 个异戊二烯单元构成,含 20 个碳原子的化合物。植物源二萜类化合物结构多样,具有抗癌、抗炎和抗菌等药理活性,在药品、化妆品和食品添加剂方面具有广泛应用。植物源二萜类化合物具有较高的药用价值,许多二萜类药物已应用于临床治疗,比如用于治疗冠心病、中风和关节炎的含丹参酮 IIA,用于治疗肿瘤疾病的紫杉醇,用于治疗缺血性脑卒中的银杏内酯,用于治疗类风湿性关节炎的雷公藤甲素^[105]。目前,二萜类天然产物的生产还依赖于植物提取和化学合成。植物提取资源稀缺、含量极低、分离难度大,而复杂的化学结构也限制了化学合成的得率。因此,研究人员探索利用微生物合成法生产二萜类化合物。

二萜类化合物的生物合成途径被人工分为上游、中游和下游 3 个模块。在上游模块,葡萄糖经 4-磷酸甲基赤藓糖醇(methylerythritol 4-phosphate, MEP)途径或甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径生成 IPP 和 DMAPP。随后,IPP 和 DMAPP 缩合形成二萜类化合物前体香叶基香叶基二磷酸酯[(E,E,E)-geranylgeranyl diphosphate, GGPP]。在中游途径,GGPP 在二萜合酶催化下生成结构多样的二萜化合物骨架,如次丹参酮二烯、左旋海松二烯和紫杉二烯。在下游途径,二萜化合物骨架经多种结构修饰酶修饰后形成结构多样的二萜类化合物。结构修饰酶主要有:细胞色素 P450 酶、糖基转移酶、2-酮戊二

酸依赖性双加氧酶和酰基转移酶等。

在合成途径改造方面,研究人员针对上游、中游和下游途径存在的问题,分别采取不同的改造策略。针对上游途径,通过强化上游途径基因或抑制竞争途径基因,用于提高 GGPP 产量;通过阻断乙酰辅酶 A 旁路或增强 CoA 供给,用于提升乙酰辅酶 A 代谢通量。针对中游途径,通过密码子优化和增加拷贝数,用于提高二萜合酶的表达水平;通过对 N 端信号肽进行截短或构建融合蛋白,用于改善二萜合酶的可溶性表达和催化效率。针对下游途径,由于植物来源的结构修饰酶具有独特的跨膜结构域、信号肽和辅因子依赖,在微生物底盘中的活性表达受到了限制。为此,主要采用增加拷贝数、截短信号肽、构建融合蛋白、提升辅因子供给和蛋白定向进化等策略进行改造,以提高修饰酶在微生物底盘中的可溶性表达和催化效率。由于二萜类化合物生物合成途径较长,近年来还发展了微生物共培养技术,将生物合成模块构建在不同宿主中,以减轻宿主代谢负担。该策略还处于前期研究阶段,但有望成为二萜类化合物生产的重要方式。

橘烯(valencene)是一种存在于柑橘属植物中的倍半萜类化合物,具有独特的柑橘类香气,被广泛应用于食品、化妆品等行业。目前已实现橘烯在集胞藻、谷氨酸棒杆菌、球状红杆菌等微生物中的异源合成,但产量较低。为了构建遗传稳定的产橘烯工程酵母,陈东莹等^[106]首先在酿酒酵母基因组中鉴定到了 16 个基因组整合位点,全部位于基因间区,其中 14 个位点可以成功整合外源基因并且对细胞生长无影响;进一步将橘烯合成酶基因迭代整合至酵母染色体中,结合启动子和终止子元件优化,发酵罐中橘烯产量达到 9.5 g/L,较出发菌株提高了 100 倍,展现了利用稳定整合位点构建酵母工程菌株的优势。

红没药烯是一种单环倍半萜类化合物,具

有木香和果香味。红没药烯具有抗疟疾、抗肿瘤、抑制溃疡、抑菌和调节神经活动等功效,被应用于香料、化妆品和洗涤剂中。红没药烯的生物合成以乙酰辅酶 A 作为关键前体,而甘油作为辅助底物可以增加乙酰辅酶 A 的供给。臧瑜等^[107]以产红没药烯的酿酒酵母工程菌为出发菌株,通过异源表达甘油转运通道和甘油脱氢酶基因,强化了甘油代谢能力;进一步敲除葡萄糖抑制转录因子 *MIG1*,减弱葡萄糖对甘油利用的抑制作用;红没药烯摇瓶发酵产量达到 866 mg/L,比出发菌株提高了 82%,表明增强甘油代谢可以提高红没药烯产量,为酵母合成其他萜类物质提供了新策略。

脱落酸是一种具有倍半萜结构的植物激素,因其能促使叶子脱落而得名,是植物五大天然生长调节剂之一。脱落酸在农业上具有增强作物抗旱、耐盐以及减少果实褐变等作用,在医药领域对免疫系统、心血管细胞、干细胞和糖尿病有广泛的调节功能。植物提取含量低、成本高,化学合成一直是脱落酸工业生产的主要方式。但化学合成无法区分两种异构体,导致效价较低。随着脱落酸生物合成途径的解析,研究人员开始使用微生物发酵法进行生产^[108]。由于生物合成比较复杂,脱落酸的异源微生物合成研究还较少,主要集中在酿酒酵母、解脂耶氏酵母这 2 种微生物底盘,最高产量为 263.5 mg/L,还未达到可商业化生产水平。

灵芝三萜是具有重要药用价值的灵芝活性物质,具有抗肿瘤、抗氧化等药理活性。目前灵芝三萜主要从野生子实体、人工栽培子实体、孢子粉和液态发酵菌丝体中提取。其中,野生子实体比较稀少、较难获取;人工栽培技术不稳定、生产周期较长;孢子粉产量低、需要破壁浸提;液态发酵周期短、条件可控、稳定性较好。目前液态发酵主要有液态深层发酵和振荡-静置两阶

段发酵两种工艺。在两阶段发酵工艺中,振荡阶段有利于菌丝体生长,静置阶段有利于代谢物积累,通过收取上层菌皮获得灵芝三萜。但是,该工艺菌皮得率低。姜幸怡等^[109]采用振荡-静置循环培养方式,可以获得更多的上层菌皮,兼顾生物量与灵芝三萜的含量,有效提高了液态发酵中灵芝三萜的得率,同时缩短了培养周期。

人参皂苷 Compound K (CK)是一种具有抗癌、抗炎、抗氧化等药理活性的三萜糖苷类化合物。人参皂苷 CK 是原人参二醇型皂苷去糖基化的主要产物,酶催化法是生产人参皂苷的主要方式。原人参二醇型皂苷中的糖基主要位于 C-3 和 C-20 位置,糖基类型主要有 β -D-吡喃葡萄糖基、 β -D-吡喃木糖基、 α -L-阿拉伯呋喃糖基和 α -L-阿拉伯吡喃糖基。原人参二醇型皂苷水解酶,是一类可以水解原人参二醇型皂苷的糖苷水解酶。根据作用糖基位置的不同,杨文华等^[110]将原人参二醇型皂苷水解酶分为 I、II、III 三个类型,其中 I 型水解酶仅能水解 C-3 上的糖基,II 型水解酶仅能水解 C-20 上的糖基,III 型水解酶可以同时水解 C-3 和 C-20 上的糖基。酶催化合成人参皂苷可以采用天然酶,也可以采用重组酶,后者更便于大规模制备。为降低成本,提高酶的重复利用率,研究人员制备了固定化酶。由于底物原人参二醇型皂苷具有一定的疏水性,通过溶剂工程改善底物溶解性可以提高酶的催化转化效率。下一步还需通过筛选或蛋白质改造获得耐高温、耐高浓度底物、底物谱更广泛、催化效率更高、易于异源表达的酶催化剂。

岩藻黄素是一种类胡萝卜素(四萜),主要存在于大型褐藻和单细胞硅藻等藻类中,具有抗炎、抗肥胖、预防癌症、抗糖尿病、脂肪肝等功效。当前主要从大型褐藻中提取,存在原料含量低(0.02–1.01 mg/g)、提取纯化困难、成本高等问题。单细胞硅藻胞内岩藻黄素含量远高

于大型褐藻。其中,三角褐指藻最高含量可达 59.2 mg/g。研究表明,富氮条件更有利于三角褐指藻积累岩藻黄素,光照条件对三角褐指藻的生长和岩藻黄素积累也有重要影响^[111]。杨泽雄等^[112]优化了补氮策略和光照模式,促进了光发酵条件下岩藻黄素的积累。诸德斐等^[113]优化了对三角褐指藻光发酵过程中的初始光强、氮源种类、氮源浓度以及光质等条件,生物量浓度、岩藻黄素含量比优化前分别提高了 1.41 倍和 1.33 倍。这些研究为培养三角褐指藻生产岩藻黄素提供了技术支持。

黄酮是一类植物来源的以 2-苯基色原酮为核心衍生的一系列次级代谢产物,一般以糖苷的形式存在,具有极高的药用价值。糖基化修饰通常赋予骨架分子更好的生物活性、溶解性以及生物利用度。新橙皮苷是一种黄酮糖苷,在糖尿病和人乳腺癌的治疗中发挥重要作用。新橙皮苷还是合成新橙皮苷二氢查尔酮的前体,后者是一种低热量甜味剂,其甜度是蔗糖的 1 500 倍,但热量只有蔗糖的 1/2 000。因此,新橙皮苷在医药和食品行业具有重要用途。新橙皮苷的生物合成以橙皮素为底物,在 7-O-葡萄糖转移酶催化下,利用 UDP-葡萄糖作为糖基供体,形成橙皮素-7-O 葡萄糖苷;橙皮素-7-O 葡萄糖苷在 1,2-鼠李糖转移酶的催化下,以 UDP-鼠李糖作为糖基供体,糖基化形成新橙皮苷。张萱等^[114]以强化 UDP-葡萄糖的工程菌株 EG11 为出发菌株,通过筛选糖基转移酶和鼠李糖基转移酶,构建了新橙皮苷的生物合成路径;重组菌株在发酵罐中合成新橙皮苷产量达到 4.64 g/L,为目前微生物异源合成新橙皮苷的最高产量。

黄酮类化合物灯盏乙素及前体野黄芹素已被临床应用于治疗心脑血管疾病。尽管在酿酒酵母和解脂耶氏酵母中已实现野黄芹素的发酵全合成,但由于发酵产物存在比例较高的副产

物芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷,使得产物无法直接满足灯盏花素口服药物的国家标准。该副产物是由于黄酮 7 位糖基化酶和黄酮 6 位羟基化酶竞争底物芹菜素所产生的。白杰等^[115]对 2 种黄酮 6 位羟基化酶 CYP82D4 与 CYP706X 进行分子动力学模拟与量子化学计算,发现底物进出通道是影响这两个酶催化效率产生差异的主要因素;为此,将 CYP82D4 的 L540A 进行突变,其催化效率提高了 1.37 倍,并用于提高灯盏乙素发酵生产效率。

III型聚酮合酶属于查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)家族,主要存在于植物中。CHS 主要催化丙二酰辅酶 A 和 4-香豆酰辅酶 A 缩合生成柚皮素查尔酮,进而生成类黄酮化合物。虎杖来源的 III 型聚酮合酶 PcPKS1 不仅具有查尔酮合酶活性,还具有苯亚甲基丙酮合酶(benzylidene acetone synthase, BAS)催化活性,能够催化生成苯亚甲基丙酮,进而合成覆盆子酮等活性天然产物。因此, PcPKS1 对研究 III 型聚酮合酶催化机理具有重要价值。贺志敏等^[116]通过分析虎杖 PcPKS1 和其他不同种属来源的 CHS、BAS 序列,确定了 3 个可能决定催化活性的氨基酸位点: Thr133、Ser134、Ser339;对上述关键氨基酸进行定点突变,发现突变体 T133L S134A 和 S339V 能维持 BAS 和 CHS 双重活性,但 BAS 活性显著高于野生型 PcPKS1。这为利用 PcPKS1 选择性合成黄酮类或覆盆子酮化合物提供了相关依据。

熊果苷是一种糖苷类化合物,由葡萄糖和对苯二酚通过糖苷键连接而成。熊果苷通过抑制酪氨酸酶活性,阻断多巴及多巴醌的合成,进而抑制黑色素的合成。鉴于熊果苷具有美白效果,被广泛应用于化妆品和医药领域。植物提取和化学合成熊果苷存在产率低、分离难度大等问题,因此生物法合成熊果苷成为了重点

研究方向。熊果苷的生物合成有植物转化法、酶催化法、全细胞催化法和微生物发酵法 4 条路线^[117]。植物转化法是利用植物细胞进行体外培养,如植物细胞悬浮培养法和植物组织转化法。全细胞催化法和微生物发酵法产量高、成本低廉、易于规模扩大,较适用于熊果苷的工业化生产。酶催化法利用糖基转移酶的催化作用,将底物氢醌转化为熊果苷,具有催化条件简单、耗时短等优势。目前共有 7 类酶可用于熊果苷的合成,包括蔗糖磷酸化酶、 α -淀粉酶、环糊精糖基转移酶、 α -葡萄糖苷酶、葡聚糖蔗糖酶、淀粉蔗糖酶和蔗糖异构酶。环糊精糖基转移酶能够特异性地以麦芽糊精和对苯二酚作为底物,催化转糖基反应合成 α -熊果苷。应用环糊精糖基转移酶催化生产 α -熊果苷的主要问题是产酶水平低,酶的催化活性和热稳定性差。刘嘉琦等^[118]通过同源建模、分子对接等技术,对戈特沙尔克厌氧分枝杆菌来源的环糊精糖基转移酶进行分子改造;其中,突变体 F235G-N166H 的催化活力相比野生型提高了 2.48 倍,在最适反应条件下,催化合成 α -熊果苷 15.4 g/L,对苯二酚转化率达到 63%,表明该突变体在合成 α -熊果苷方面具有较大潜力。

苯丙氨酸解氨酶催化氨从 L-苯丙氨酸中非氧化消除生成反式肉桂酸,是植物苯丙烷类生物合成途径的分支关键酶。反式肉桂酸进一步转化为多酚类天然产物,包括苯醌、黄酮/花青素、香豆素、羟基肉桂酸酯、木脂素、单木酚及其聚合物木质素等。同时,苯丙氨酸解氨酶对于抗肿瘤木脂素即鬼臼毒素的生物合成具有重要影响。胡迪等^[119]克隆了桃儿七来源的苯丙氨酸解氨酶基因,在大肠杆菌重组表达后进行酶学性质表征;该酶最适温度为 41 °C,最适 pH 为 9.0, pH 稳定性较好,但热稳定性差;此外,还发现第 130 位的苯丙氨酸是影响苯丙氨

酸解氨酶底物特异性的关键残基,为后续对酶分子改造奠定了基础。

植物天然产物在多个领域应用广泛,但天然合成存在含量低和提取困难的问题。合成生物学技术提供了低成本、短周期和可持续的解决方案,选择合适的底盘细胞尤为重要。高等植物如烟草在基因改造和产物生产方面具有独特优势,但操作周期长和改造难度大限制了其应用。张方晴等^[120]通过开发本氏烟草悬浮细胞底盘系统 NBS-1,并比较其与烟草细胞系 BY-2 在多个方面的差异,系统描述生理代谢特征并分析次级代谢产物合成差异;结果显示,NBS-1 在分散度和生物量上显著优于 BY-2,且瞬时转化效率更高;转录组学分析进一步揭示 NBS-1 在黄酮类化合物合成通路中基因表达显著高于 BY-2,而在生物碱合成通路中显著低于 BY-2,表明 NBS-1 更适合作为黄酮类化合物合成的底盘。

东莨菪素又称东莨菪内酯,属香豆素类天然化合物,具有抗肿瘤、抗炎镇痛、降血压血脂、保肝、增强记忆等药理活性,还具有杀虫、杀螨等农药活性。东莨菪素主要存在于丁公藤、拟南芥、茯苓等植物组织中。东莨菪素的生产主要依赖植物提取法,但目前提取效率较低。研究发现,植物组织中同时存在东莨菪苷和东莨菪素两种结构类似物,且东莨菪苷含量大于东莨菪素的含量。因此,通过酶水解或酸水解将东莨菪苷的末端葡萄糖基去除,有可能提高东莨菪素的提取得率。于坤朋等^[121]测定了 16 个黑曲霉来源的 β -葡萄糖苷酶水解性能,发掘了 1 个可以水解东莨菪苷的 β -葡萄糖苷酶;对其进行异源表达和酶学分析,发现该酶对东莨菪苷亲和力较好;利用该酶对丁公藤粗提物进行处理,东莨菪素含量提高了近 50%,表明该酶对东莨菪苷具有较好的特异性,将东莨菪苷水解为东莨菪素具有较大的可行性。

水杨酸葡萄糖苷是植物中水杨酸主要存在形式之一,具有水杨酸类化合物的消炎止痛效果。与水杨酸和阿司匹林相比,水杨酸葡萄糖苷对受体细胞的刺激性更小,表现为更低的一氧化氮浓度,因此是一种极具潜力的消炎药物。微生物生产水杨酸从莽草酸途径分支酸出发,经过变位得到异分支酸,之后在异分支酸裂解酶的催化下裂解产生水杨酸和丙酮酸。由于水杨酸的抑菌作用,其微生物生产受到了限制。引入水杨酸糖基转移酶,将水杨酸转化为水杨酸葡萄糖苷,可以减弱产物对细胞生长的抑制。李若松等^[122]以一株高产 3-脱氢莽草酸的大肠杆菌工程菌作为出发菌株,引入铜绿假单胞菌的异分支酸裂解酶基因,进一步调控下游芳香族氨基酸代谢途径关键基因表达,并引入植物来源水杨酸糖基转移酶,构建了水杨酸葡萄糖苷生产菌株;该菌株摇瓶发酵生产水杨酸葡萄糖苷达到 5.7 g/L,在 5 L 发酵罐中产量达到 36.5 g/L,是目前报道的最高水平。

四乙酰基植物鞘氨醇是一种天然化合物,具有保湿、抗氧化、美白祛斑等功效^[123]。四乙酰基植物鞘氨醇是合成有“植物软黄金”之称的植物鞘氨醇的关键前体,后者主要用于合成保湿护肤品神经酰胺。四乙酰基植物鞘氨醇脱乙酰化已成为植物鞘氨醇合成的主流路线。目前,四乙酰基植物鞘氨醇的合成主要采用微生物发酵法。自然界目前发现的唯一可分泌四乙酰基植物鞘氨醇的微生物是威克汉姆西弗酵母 (*Wickerhamomyces ciferrii*),该酵母也自然成为科学研究和工业生产的底盘菌株。经过几十年的努力,经历单倍体筛选、诱变育种和代谢工程改造,四乙酰基植物鞘氨醇的产量从最开始的 0.23 g/L 提升到 22.1 g/L。该菌株还有较大的提升空间,特别是要开发高效的遗传改造工具,挖掘新的合成生物学元件,从而更系统地进行菌株改造。

酪醇是一种多酚类天然产物,是合成羟基酪醇、红景天苷和橄榄苦苷等天然产物的重要前体,在医药领域用于合成倍他洛尔、美托洛尔等心血管药物,具有抗氧化、抗炎症等多种生物活性。微生物发酵法生产酪醇是一条成本低廉的绿色合成路线,主要使用大肠杆菌和酿酒酵母作为底盘。刘英杰等^[124]解析了酪醇的生物合成路径,总结了酪醇从头合成途径中的调控节点,讨论了大肠杆菌和酿酒酵母合成酪醇的研究进展,并介绍了羟基酪醇和红景天苷的代谢工程研究进展;以葡萄糖为原料,大肠杆菌最高产量为 3.9 g/L,酿酒酵母最高产量为 9.9 g/L。在酪醇发酵过程中,普遍存在菌体密度低的问题,这可能是限制其产量提升的重要因素。为此,研究人员应用群体感应系统动态减轻酪醇对底盘细胞的毒性,以实现酪醇的高效合成;最终,群体感应动态调控工程菌的酪醇产量达到 4.22 g/L,为大肠杆菌中的最高水平;相比静态诱导表达工程菌,产量和菌体密度分别提高了 38%和 43%,表明菌体感应动态调控可以有效缓解生长抑制^[125]。

红景天苷是从高寒植物红景天中提取的一种功能性成分,具有刺激神经系统、消除疲劳、防治高原反应、保护心脑血管以及抗肿瘤抗辐射等功能。植物提取法生产红景天苷受到资源稀缺的限制,化学合成法存在过程复杂、成本高等问题。生物合成法以酪醇为底物,以尿苷二磷酸葡萄糖为糖基供体,在尿苷二磷酸-葡萄糖糖基转移酶的催化下发生糖基化反应生成红景天苷。魏晨昱等^[126]从不同来源的糖基转移酶中筛选出具有较强催化活性的 UGT33,进一步引入蔗糖合酶,构建尿苷二磷酸葡萄糖循环再生系统;通过优化全细胞催化条件,在 5 L 发酵罐中红景天苷最高产量达到 8.17 g/L;由于底物酪醇价格较高,未来可开展利用更廉价底物生产酪醇,以降低红景天苷的生产成本。

微生物天然产物

很多微生物天然产物具有抗生素、抗真菌药物、抗病毒药物等抗感染作用,直接杀伤肿瘤细胞和调节肿瘤微环境等抗肿瘤作用,以及免疫抑制和免疫增强等免疫调节作用,在医药工业中用途广泛。抗生素是治疗细菌感染的主要手段。替加环素作为第三代四环素类药物,抗菌谱广,是应对多重耐药菌的重要抗生素。药物修饰酶 Tet(X)能对四环素类药物分子 C11a 位点进行羟基化修饰,导致该类药失活,使细菌产生耐药性。最令人担忧的是,大肠杆菌的接合型质粒上携带 *tet(X)*基因变异体 *tet(X4)*,可通过水平基因转移在不同细菌种属间进行传播,加速 *tet(X4)*基因的蔓延。前期研究发现,抗生素佐剂如齐多夫定、雪兰醌等能够与 *tet(X4)*活性中心结合,抑制其催化活性,进而降低细菌对替加环素的耐药性,但均未进入临床阶段。张慕琛等^[127]通过对天然化合物库进行高通量筛选,发现 β -桉木醇联合替加环素对携带 *tet(X4)*基因的大肠杆菌具有协同抗菌效果;研究发现, β -桉木醇的抗菌作用主要是通过干扰细胞铁稳态,增大细菌细胞膜通透性实现的。 β -桉木醇作为单萜类天然化合物,生物安全性较好,未来可进一步研究其联合替加环素治疗体内感染的效果。

阿维拉霉素是一种由绿色产色链霉菌分泌的抗生素,通过抑制细菌蛋白质合成来抑制革兰氏阳性细菌生长。吴江雪等^[128]利用代谢组学技术分析阿维拉霉素突变菌株和出发菌株的代谢差异,旨在揭示高产阿维拉霉素的机制,为优化其发酵工艺提供新思路;作者通过核糖体工程选育出高产阿维拉霉素的突变菌株绿色产色链霉菌(*Streptomyces viridoehrongenes*) gs77-54,利用 GC-MS 代谢组学技术分析了突变菌株与出发菌株的胞内代谢产物差异。结果显示,突

变菌株在发酵过程中 pH 变化较小,糖消耗和生物量增长更快,阿维拉霉素产量显著提高。通过 GC-MS 和多元统计分析,发现突变菌株通过优化三羧酸循环、氨基酸和脂肪酸代谢途径,显著提高了阿维拉霉素的产量。该研究还确定了 6 种关键差异代谢物,这些代谢物作为阿维拉霉素合成的前体物质,为后续工艺优化和工业化生产提供了基础。

Xanthocillin 是一种含有异腈基即碳氮三键 ($-N\equiv C$)的天然化合物,具有广谱抗菌活性,而且对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌以及多重耐药的鲍曼不动杆菌也展现出抑菌活性,具有很高的应用价值。目前发现的 Xanthocillin 的生物合成途径有两条。第一条途径基于 Type I 型异腈合酶,以核酮糖-5-磷酸作为异腈基中碳原子的供体;第二条途径基于 Type II 型异腈合酶,依赖铁和 2-酮戊二酸,通过激活甘氨酸的氮原子引发脱水、脱羧形成异腈基。王雯静等^[129]通过对前期分离的蛇足石杉内生真菌产黄青霉菌 MT-40 进行基因组分析,发现该菌株存在一个潜在的 Xanthocillin 类似物的生物合成基因簇,进一步利用米曲霉异源表达系统对该基因簇中的关键基因进行鉴定。结果表明, *forB* 编码的异腈基合成酶和 *forG* 编码的 P450 酶可以催化合成一种 Xanthocillin 类似物,这为解析 Xanthocillin 生物合成途径提供了参考。

他克莫司是一种二十三元大环内酯类化合物,作为免疫抑制剂主要用于肾脏、肝脏和心脏等器官移植的术后治疗,防止免疫排斥反应^[130]。他克莫司的免疫抑制活性很强,是传统免疫抑制剂环孢素的 10–100 倍,目前其全球销售额已达到 30 亿美元。他克莫司分子量大、结构复杂,化学合成效率低,目前主要采用生物发酵法生产。经过几十年研究,他克莫司的生物合成从最初的几毫克每升提高到目前最高的

约 1.5 g/L。生物合成研究主要围绕菌株选育和发酵工艺优化两方面展开。其中,菌种选育多采用传统的适应性驯化和诱变育种等手段。由于生物合成途径复杂,代谢工程改造主要在天然菌株中进行。通过过表达部分合成途径基因或敲除旁路途径基因,他克莫司的产量得到一定幅度提升。代谢工程改造主要面临以下问题,一是对他克莫司生物合成的调控机制认识有限,二是在非模式底盘下代谢改造工具有限,三是关键酶的催化活性和特异性受限,四是产物外排效率受限。

Gadusol 是一种天然紫外吸收剂,主要分布于海洋生物如斑马鱼、鲑鱼、鲟鱼的鱼卵以及珊瑚礁中。Gadusol 是环己烯酮类化合物,具有显著的紫外吸收和抗氧化能力。天然提取 gadusol 受到资源短缺的限制,且含量非常低,因此微生物合成法受到关注。易崇华等^[131]在毕赤酵母中引入斑马鱼来源的 gadusol 合成途径,主要包括糖磷酸环化酶和甲基转移-氧化还原酶;进一步强化了木糖同化途径,以提高关键底物景天庚酮糖-7-磷酸的含量;重组菌株在纯木糖培养基中的产量达到 141.8 mg/L,并首次在酵母细胞外检测到目标产物。合成产物具有明显的抗氧化能力,表明利用毕赤酵母底盘生产 gadusol 具有可行性。

微生物资源开发与微生物农药

植物内生菌是一类在植物体内度过部分或全部生命周期且不会对植物产生病害的微生物,包括细菌、真菌和古菌。比较经典的植物内生菌有:豆科植物分离出来的根瘤菌,起固氮作用;从短叶红豆杉分离的内生菌,可以产生抗癌活性成分紫杉醇。植物内生菌是重要的微生物资源,其挖掘利用具有重要意义。植物内生菌的早期研究主要采用 Sanger 测序技术。

随着测序技术不断发展,二代和三代高通量测序技术逐步应用到植物内生菌的研究过程中。相比 Sanger 测序,高通量测序可以获取到更多的植物内生菌信息,如时空多样性、群落功能特性和生物活性物质等^[132]。三代测序技术如单分子实时测序技术具有读长长、准确性高的特点,有助于解析植物内生菌基因组的复杂性,构建植物内生菌基因组库,还可以研究 DNA 甲基化等表观遗传调控机制。未来可以扩展到非培养植物内生菌基因组解析和植物内生菌相互作用网络等领域。

极端环境微生物是对在极端环境生存的微生物的总称。极端环境如高温、高压、高盐、高酸、高碱、寡营养和高重金属等,通常分布在深海、极地、冰川、盐湖、酸性采矿废水、深海热液口、温泉、油田和沙漠等区域。极端环境微生物地球上重要的微生物资源,对发掘独特代谢途径、极端耐受性酶和结构独特次级代谢产物具有重要作用。在活性代谢物方面,已从极端环境微生物中挖掘了具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化、抗炎和抗虫等活性的新型结构化合物,为创新药物研究提供了宝贵资源^[133]。极端微生物资源挖掘目前面临两大困难,一是极端环境采样工作困难,二是极端微生物培养困难。遥感技术、机器人、特殊培养技术等的发展,有望对极端微生物资源的挖掘和应用作出新的贡献。

大曲含有细菌、酵母和丝状真菌等酿造微生物,是白酒酿造中的糖化发酵剂和生香剂。大曲生产分为粉碎、混合、成型、自然发酵和成熟 5 个阶段,其中成熟过程是生产高品质大曲的关键步骤。已有研究分析了大曲成熟前后微生物群落组成的变化,但对大曲成熟过程中微生物群落功能变化的探索不足。刘文虎等^[134]以成熟前后的中温大曲为研究对象,采用宏基因组学解析微生物组成和功能的差异。结果表

明,大曲成熟前毛霉菌目和散囊菌目等真菌丰度较高,进而提高了 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、乙醇脱氢酶的基因丰度,使其具有较高的液化力、糖化力、发酵力,以及更高的芳香醇类物质。大曲成熟后,酵母菌目、乳杆菌目和芽孢杆菌目等微生物丰度升高,乙酰基转移酶、羧酸酯酶、乙酰乳酸脱羧酶、R-乙偶姻脱氢酶和S-乙偶姻脱氢酶的基因丰度相应提高,使其酯化力和吡嗪类物质含量显著提高。这为解析大曲成熟的作用和机理,理性调控大曲生产提供了参考。

昆虫致病性真菌是一种新型微生物农药,但对家蚕业也会造成重大影响。许多昆虫致病性真菌都会分泌类枯草杆菌蛋白酶,而家蚕内很多富含半胱氨酸的结构域的一类蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor-like cysteine-rich domain, TIL)会在家蚕感染真菌后上调表达,提示TIL类蛋白酶抑制剂可能参与家蚕的免疫过程,因此重组表达TIL类蛋白酶抑制剂,有可能提高家蚕抗真菌感染的能力。李游山等^[135]在前期研究中发现,家蚕蛋白酶抑制剂BmSPI38易自发多聚化,形成二聚体、三聚体和四聚体。该研究设计了BmSPI38的串联多聚体,发现基于接头的串联三聚体化和四聚体化能提高BmSPI38对微生物蛋白酶的抑制能力,以及对酿酒酵母和白色念珠菌的抑制能力。这不仅可为培育抗真菌转基因家蚕提供依据,也可用于发展BmSPI38在医疗领域的应用。

核盘菌是一种可侵染600多种植物的植物病原菌,有菌核和菌丝两种生活形态,菌核在病原菌抵抗外界胁迫中占据核心位置。研究表明,热休克蛋白在生物体对抗外界不良环境方面发挥重要作用^[136],而核盘菌中的热休克蛋白功能尚未见报道。基于前期发现的热休克蛋白Hsp70在核盘菌菌核形成过程中大量表达这一现象,吕蕊花等^[137]研究了核盘菌Hsp70基因在

不同生长阶段和胁迫条件下的表达特征,发现Hsp70在核盘菌菌核形成及对抗不良环境中发挥了重要作用。这为以Hsp70为靶点的新型杀菌剂开发和核盘菌病害防控提供了参考。

甾体化合物

甾体化合物又名类固醇,是一类以环戊烷多氢菲式为母核结构的多元环萜类化合物。甾体药物具有抗炎、抗过敏、抗病毒、抗感染、抗肿瘤和抗休克等药理活性,全球已上市的甾体药物超过300种,年销售额超100亿美元,是仅次于抗生素以外的第二大药物^[138]。甾药中间体的生产主要采用微生物转化法,以廉价的植物甾醇为原料,通过微生物分解代谢,产生关键甾药中间体如4-雄烯二酮、1,4-雄烯二酮。甾药中间体再经过化学修饰或酶修饰,产生具有药理活性的甾体药物。

甾醇是一类含有环戊烷骈多氢菲母核结构的化合物,几乎所有生物体都能自身合成,令人熟知的胆固醇就属于甾醇化合物。天然甾醇通过不同基团修饰,可获得抗炎、抗感染、抗过敏、抗病毒和抗休克等不同药理活性的甾体激素类药物,比如氢化可的松、地塞米松等常见药物。在代谢工程中,通常使用酿酒酵母作为底盘生产甾醇类化合物。甾醇是疏水性大分子,容易积累在酵母细胞膜结构中而引发细胞毒性,一定程度上限制了甾醇产量的进一步提升。王钰等^[139]系统总结了酵母中甾醇转运蛋白的研究进展,对下一步改造甾醇转运途径,提高酵母细胞中甾醇合成能力提供了重要参考。

分枝杆菌天然具有甾醇降解关键酶,是工业上生产甾药中间体的主流菌株。随着对分枝杆菌甾醇分解代谢途径的解析,研究人员开始对分枝杆菌底盘进行代谢工程改造,如阻断副产物代谢途径、表达其他微生物来源的高活性

酶、基因改造提高细胞膜和细胞壁通透性等,对底盘进行改造以生产不同的甾药中间体。如通过敲除羟酰基辅酶 A 脱氢酶 *Hsd4A* 或酰基辅酶 A 硫解酶 *FadA5* 基因,使新金分枝杆菌生产 22-羟基-23,24-双降甾-4-烯-3-酮。何建新等^[140]发现将新金分枝杆菌 *FadA5* 基因敲除后,发酵产物中出现了一种未知的代谢产物。经结构鉴定、蛋白同源序列比对和系统发育树分析,确定该代谢产物为 24-norchol-4-ene-3,22-dione (简称为 3-OPD),可能是由硫酯酶催化产生的。该发现揭示了分枝杆菌中一条新的甾醇代谢支路途径,对开发新的甾类中间体提供了线索。

17 α 羟化酶属细胞色素 P450 单加氧酶,能够催化孕酮进行 17 α 羟化反应,将孕酮制备成各种孕激素药物中间体。研究较多的 17 α 羟化酶是来自芽孢杆菌的 CYP106A2 和来自纤维素黏性细菌的 CYP260A1,它们表现出对孕酮不同位置的羟基化能力。P450 酶催化反应需要氧化还原伴侣蛋白的参与,氧化还原伴侣负责将电子从辅因子传递到 P450 酶活性中心。因此,氧化还原伴侣蛋白与 P450 酶的适配性是影响催化特异性的关键因素。王蓝蓝等^[141]选择可以在大肠杆菌可溶性高表达的 CYP260A1,通过选择性突变获得 17 α 羟化酶活性显著提高的突变体 S276I;在突变体 S276I 基础上,引入来自大肠杆菌和牛肾上腺的氧化还原伴侣蛋白 Fpr 和 Adx₄₋₁₀₈T69E,组建了一条新的电子传递系统,增强了羟化酶对孕酮 C17 位的特异性,17 α -OH 孕酮的产率最终提高到 74%,为进一步开发孕激素类药物生物转化体系提供了参考。

氨基酸及衍生物

近年来,氨基酸代谢工程技术进展很快。郭亮等^[142]综述了以大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌为底盘微生物,通过合成生物学与系统代谢工

程技术创制氨基酸高产菌株的关键技术,旨在为高性能微生物细胞工厂的创制提供参考,并展望了氨基酸高产菌株的研究方向。在创制支链氨基酸高产菌株方面,研究者通过系统代谢工程和合成生物学技术,采用平衡辅因子供给、解除反馈抑制和强化合成路径等策略,如使用 NADH 依赖型酶替换 NADPH 依赖型酶以优化辅因子利用,将大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌改造为缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的高产菌株,缬氨酸产量达到 172 g/L,亮氨酸产量为 63.3 g/L,异亮氨酸产量为 32.4 g/L,支链氨基酸的生产效率显著提高。通过优化代谢路径、解除反馈抑制、强化关键酶表达和动态调控代谢流,创制了苏氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸和高丝氨酸等天冬氨酸族氨基酸的高产菌株,如通过敲除特定基因、替换启动子和过表达关键酶,高丝氨酸产量可达到 111 g/L。通过解决氨甲酰磷酸和 NADPH 的供给问题,并通过基因敲除、替换和表达调控等手段优化了各氨基酸的合成路径和代谢流,创制了高产精氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸和脯氨酸等谷氨酸族氨基酸的菌株。如大肠杆菌 ARG28 菌株通过多重基因改造,精氨酸产量提高到 132 g/L,转化率为 0.510 g/g,生产强度为 2.75 g/(L·h)^[143]。通过强化前体物质供给,解除反馈调节,并通过基因敲除、过表达和启动子工程等手段,创制了高产色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等芳香族氨基酸的菌株。如通过多重基因改造,色氨酸产量从 23.2 g/L 提高到 52.1 g/L^[144],苯丙氨酸和酪氨酸的产量也分别达到了 72.6 g/L 和 92.5 g/L^[145-146]。下一步的工作可考虑扩展底物谱、开发新型捕碳模块、提高氨基酸衍生物合成效率以及增强菌株鲁棒性,进一步降低生产成本。

L-谷氨酸是世界第一大氨基酸产品,每年全球产量超过 400 万 t^[147]。L-谷氨酸广泛应用于制药、食品、畜牧等领域,也是合成焦谷氨酸钠、聚谷氨酸等高值化学品的前体。尽管

L-谷氨酸已经是一个百万吨级的氨基酸产品，但 L-谷氨酸高产菌株的迭代升级也非常重要。刘佳峰等^[147]以实验室前期选育的氨基酸高产菌株谷氨酸棒杆菌 G01 作为出发菌株，综合运用多种代谢工程策略，包括降低副产物丙氨酸的生成，优化 α -酮戊二酸脱氢酶活性以强化谷氨酸支路代谢流，筛选谷氨酸脱氢酶强化 α -酮戊二酸到谷氨酸的转化，以及对谷氨酸转运蛋白进行理性设计提高产物外排能力；最终，工程菌株在 5 L 发酵罐中的产量达到 136 g/L，比出发菌株 G01 提高了约 40%，同时转化率提高了 11%，达到 55%，为谷氨酸高产菌株的代谢改造提供了参考。

赖氨酸是一种重要的饲料氨基酸。许雪晨等^[148]通过一系列代谢工程策略，包括强化 L-赖氨酸合成路径基因、增强前体合成基因、关键酶蛋白质工程改造和辅因子工程，显著提高了大肠杆菌中 L-赖氨酸的产量和转化率；随后，通过改造氮代谢路径和引入硝酸盐同化路径，进一步优化了菌株对底物的利用效率，最终使 L-赖氨酸产量达到 204.00 g/L，转化率达到 72.32%，生产强度达到 5.67 g/(L·h)，对 L-赖氨酸生产企业具有一定价值。

支链氨基酸，包括 L-缬氨酸、L-亮氨酸与 L-异亮氨酸，属于人体必需氨基酸。全球支链氨基酸市场在 2020 年达到了 2.33 亿美元，预计到 2026 年突破 3 亿美元，市场前景广阔。支链氨基酸的生产主要通过谷氨酸棒杆菌发酵进行。相比于其他氨基酸，支链氨基酸在谷氨酸棒杆菌中的生产水平还有较大差距。如支链氨基酸产量普遍低于 120 g/L，而 L-赖氨酸产量已超过 200 g/L^[149]。乙酰羟酸合酶(acetohydroxyacid synthase, AHAS)是支链氨基酸合成的关键限速酶，研究表明增强 AHAS 表达可以提高支链氨基酸产量。乔倩倩等^[150]利用实验室前期构建的靶基因表达调控报告系统，筛选获得一个表达强度提高近 23

倍的强启动子，以及 36 个不同强度的核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)。利用筛选获得的启动子和 RBS 调控 AHAS 的表达，发现 L-缬氨酸产量随着元件增强逐步提高，为进一步改造谷氨酸棒杆菌生产支链氨基酸提供了丰富的表达调控元件。

L-缬氨酸属于支链氨基酸，也是人体必需氨基酸之一，广泛应用于食品、医药和饲料等领域。微生物生产 L-缬氨酸的底盘微生物主要有大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌。文献报道的大肠杆菌最高产量为 92 g/L，谷氨酸棒杆菌最高产量为 227 g/L^[151]。赵阔等^[152]利用多种代谢工程策略，在谷氨酸棒杆菌中构建了一个新的 L-缬氨酸细胞工厂；所使用的代谢工程策略主要有：增强糖酵解途径、减弱副产物途径、强化前体丙酮酸供给、关键酶定点突变提高抗反馈抑制能力、启动子工程优化基因表达水平、辅因子工程改变关键酶的辅因子偏好等；最终，在 5 L 发酵罐中进行两阶段发酵，L-缬氨酸产量达到 110 g/L，得率为 0.51 g/g，是目前报道的微生物法一步发酵生产 L-缬氨酸的最高水平。

L-色氨酸是人体必需氨基酸之一，在食品、饲料和医药等领域具有广泛用途，市场规模已经超过 2.8 万 t/年，因此开发高效生产 L-色氨酸的工程菌株具有重要意义。L-色氨酸的生物合成途径可以分为 3 部分，包括前体代谢途径、芳香族氨基酸共有途径和 L-色氨酸分支途径。在前体代谢途径中，底物葡萄糖经糖酵解途径和磷酸戊糖途径，分别生成磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)和赤藓糖-4-磷酸(erythrositis-4-phosphate, E4P)。PEP 和 E4P 催化生成 3-脱氧- α -阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸(3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate, DAHP)。在芳香族氨基酸途径中，DAHP 经一系列酶反应分别形成 3-脱氢莽草酸、莽草酸和 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸，最终形成分支酸

进入 L-色氨酸、L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸分支途径, 经过各自代谢途径生成相应的芳香族氨基酸。L-色氨酸的生物合成过程受到严谨的反馈调节, 代谢去路较多。改造策略一是增强代谢途径, 包括增强前体物质 PEP、E4P 和 DAHP 合成、提高共有代谢途径通量、强化 L-色氨酸分支途径; 策略二是阻断 L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸分支途径; 策略三是改造 L-色氨酸转运系统; 策略四是通过适应性进化提高菌株生产性能。以 L-色氨酸为前体还可以合成一系列高附加值衍生物, 如 5-羟色胺、褪黑素、靛红和靛蓝等^[153]。微生物发酵法已成为生产 L-色氨酸的主要方式, 研究较多的底盘菌株有大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌和酿酒酵母。其中, 酿酒酵母主要用于研究 L-色氨酸的生产机制, 谷氨酸棒杆菌生产 L-色氨酸产量高, 但生产周期较长, 约是大肠杆菌的两倍。因此, 大肠杆菌是工业上生产 L-色氨酸的主要菌株。大肠杆菌生产 L-色氨酸主要存在转化率较低的问题。丁爽等^[154]在实验室前期构建的 L-色氨酸生产菌株基础上, 运用多种代谢工程策略, 有效降低了副产物如乙酸、乳酸、3-脱氢莽草酸和莽草酸的生成, 进一步通过强化 L-色氨酸操纵子的表达以及提高前体物质的供给, 获得高产菌株; 工程菌株在 5 L 发酵罐中产量和糖酸转化率分别达到 36 g/L 和 18.55%, 转化率比出发菌株提高了 30%。叶慧敏等^[155]在大肠杆菌中建立了一种能够特异性响应 L-色氨酸的拟荧光蛋白传感器, 能够实现对胞质 L-色氨酸的实时监测; 通过常压室温等离子体诱变技术构建了随机突变文库, 利用上述拟荧光蛋白传感器进行高通量筛选, 获得一株 L-色氨酸高产菌株, 其摇瓶产量为 1.99 g/L, 较出发菌株提高了约 40%, 表明基于拟荧光蛋白传感器的高通量筛选技术在筛选高产 L-色氨酸菌株方面具有较大潜力。

L-甲硫氨酸又名 L-蛋氨酸, 是八大必需氨

基酸中唯一的含硫氨基酸, L-甲硫氨酸不仅参与细胞内转甲基反应, 也是合成谷胱甘肽、S-腺苷蛋氨酸和肾上腺素的前体, 在人体免疫、抗氧化和脂质代谢等方面发挥重要作用, 广泛用于饲料、医药、食品等领域, 其中 90% 以上的 L-甲硫氨酸应用于饲料行业, 对稳定全球禽肉市场具有重要意义。工业生产 L-甲硫氨酸主要以化学法为主, 尚未发现可工业化生产的 L-甲硫氨酸工程菌株。L-甲硫氨酸的生物合成是一个典型的多模块途径, 可分为碳骨架模块、一碳供给模块和硫源供给模块。其中, 一碳模块负责提供甲基供体 $\text{CH}_3\text{-THF}$, 一碳途径通量大小直接影响 L-甲硫氨酸的生物合成。张博等^[156]利用模块化代谢工程策略改造了大肠杆菌一碳模块, 构建了一株 L-甲硫氨酸高产菌株; 首先, 过表达亚甲基四氢叶酸还原酶, 外源引入酶活较高的丝氨酸羟甲基转移酶, 增强了一碳模块甲基供体的生成; 其次, 过表达胱醚裂解酶和半胱氨酸转运蛋白, 提高了 L-高半胱氨酸和 L-半胱氨酸的供应; 最终, 工程菌株摇瓶发酵 L-甲硫氨酸的产量从 2.80 g/L 提高到 4.05 g/L, 5 L 发酵罐产量达到 18.26 g/L。牛坤等^[157]使用前期构建的 L-甲硫氨酸高产大肠杆菌进行发酵优化, 研究了 pH 反馈补料、溶氧反馈补料、恒定残糖浓度补料和恒速补料策略的发酵情况, 确定了发酵前期采用溶氧反馈补料、发酵中后期采用不同恒速补料的组合策略, 使 L-甲硫氨酸产量从优化前的 18.2 g/L 提升到 31.7 g/L, 发酵时间缩短到 68 h, 为目前报道的最高产量。

S-腺苷-L-甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)是生物体内一种重要的代谢中间体, 参与细胞内转甲基、转硫和转氨丙基等生物过程。SAM 相关药品在肝病、抑郁症和癌症等疾病的治疗中具有良好的疗效, 市场规模已达 100 亿元, 生产需求巨大。目前生产 SAM 主要采用微

生物发酵法, 通过 SAM 合成酶将底物 L-甲硫氨酸转化为 SAM, 相比酶法成本更低。针对 SAM 生产菌株的改良主要采用传统育种和代谢工程两种手段^[158]。传统育种包括紫外辐照、ARTP 和 γ -射线辐照等物理诱变, 以及亚硝基胍、硫酸二乙酯、甲磺酸乙酯等化学诱变。随着代谢工程技术的发展, 更多研究聚焦于在酵母菌或大肠杆菌中通过代谢工程策略对 SAM 生产菌株进行改造, 如过表达 SAM 合成酶等相关基因, 调控支路代谢途径, 增加 ATP 生成。下一步还需加强相关菌株的代谢工程改造, 开发可响应 SAM 的生物传感器用于菌株高通量筛选和发酵过程控制。SAM 不仅是绝大多数生物甲基化反应中的甲基供体, 也是生命体内除 ATP 之外的第二大辅因子。SAM 依赖型甲基转移酶(methyltransferases, MTase)通过将甲基从 SAM 分子特异性转移到底物, 从而改变底物分子的结构和理化性质。在药物开发过程中, 往往需要引入甲基基团来改善药物分子的亲脂性、代谢稳定性和靶向性。近年来, SAM 依赖的甲基转移酶成为甲基化修饰底物分子的重要工具。通过设计合成具有替代 S-甲基取代基的 SAM 类似物, 可以在底物分子上引入不同官能团或者新的烷基修饰^[159]。目前, 利用 SAM 甲基类似物进行 MTase 催化反应主要有 3 方面应用, 包括: 作为生物正交探针工具研究核酸和蛋白质的甲基化表观遗传修饰; 对天然产物进行甲基化修饰以调节其理化性质和生物活性; 基于 SAM 甲基类似物开发特异性的甲基转移酶抑制剂。其中, 对天然产物的多样性甲基化修饰将有助于开发新型的活性天然产物, 同时可以实现更多天然产物的生物催化合成。

L-高苯丙氨酸(L-homophenylalanine, L-HPA) 属非天然氨基酸。作为重要的医药中间体, L-HPA 主要用于合成普利类降压药用于治疗高

血压, 合成 β -内酰胺类抗生素用于治疗细菌感染, 合成中性内肽酶抑制剂用于治疗心血管疾病, 合成乙酰胆碱酯酶抑制剂用于治疗阿尔茨海默病和路易体痴呆症^[160]。L-HPA 的合成有化学法和生物酶法。根据催化机理的不同, 生物酶法分为 4 条路线, 包括转氨酶法、海因酶法、脱羧酶法和脱氢酶法。转氨酶法以 2-氧代-4-苯基丁酸(2-oxo-4-phenylbutanoic acid, OPBA)为底物, 通过转氨反应合成 L-HPA, 目前最高产量 141.2 g/L, 转化率为 94%, 但底物成本非常高。海因酶法将 L-海因酶与 L-氨甲酰水解酶级联, 以苯乙基海因作为底物合成 L-HPA, 目前最高产量 17.9 g/L, 存在底物合成复杂、涉及有毒试剂等问题。脱羧酶法利用 L-天冬氨酸 β -脱羧酶, 以 3(R)-3-苄基-L-天冬氨酸为底物, 进行 β -脱羧反应合成 L-HPA, 目前最高产量只有 1.31 g/L。脱氢酶法以 OPBA 为底物, 利用氨基酸脱氢酶如苯丙氨酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶等将 OPBA 通过还原氨化反应合成 L-HPA, 该过程需要消耗辅因子 NADH。脱氢酶法最高产量达 174.0 g/L, 转化率为 90.2%, 但也面临底物成本高的问题。为降低底物 OPBA 成本, 刘立明课题组通过逆合成分析得到一条级联路线, 实现以苯甲醛和丙酮酸为原料合成 OPBA, 原料成本下降了近 90%, L-HPA 产量达到 100.9 g/L, 转化率为 94%。该技术在大幅降低底物成本的同时保持了较高产量, 具有较大的应用潜力。

由 L-谷氨酸脱羧产生的 γ -氨基丁酸(GABA, 或称 4-氨基丁酸)是一种重要的中枢神经系统抑制性神经递质, 其衍生物因能穿过血脑屏障, 被广泛用于治疗癫痫、焦虑等疾病, 具有重要的临床价值。詹侃等^[161]总结了几种典型 GABA 衍生物(加巴喷丁、普瑞巴林和布瓦西坦)的化学-酶法合成进展。化学-酶法合成加巴喷丁, 通过区域选择性腈水解酶在温和条件下进行水解反应, 避

免了传统化学合成中的高毒性和高污染步骤,操作简便且相对环保,但收率不高,尚未实现工业化放大生产。化学-酶法合成普瑞巴林,通过使用脂肪酶或胍水解酶进行手性选择性转化,避免了传统化学合成中的复杂步骤和高成本,实现了高产率和高纯度的普瑞巴林制备,同时减少了废物排放,符合绿色化学理念。化学-酶法合成布瓦西坦,通过使用酶催化剂如醇脱氢酶和定向改造的胍水解酶,实现了关键中间体的高效合成,避免了传统复杂和高成本的贵金属催化剂,降低了环境影响。总的来说,化学-酶法合成 GABA 衍生物因其反应条件温和、选择性好和环保特性,正逐渐成为工业合成的重要选择,尽管存在收率低的问题,但通过异构体循环利用正逐步提高总体效率,并应用于工业化生产。

靛蓝是一种水溶性非偶氮类着色剂,广泛应用于纺织品染色、食品、制药、化学传感器和半导体材料等领域。全球每年靛蓝生产规模超过 8 万 t, 市场需求巨大。化学合成法存在严重环境污染,植物提取法受限于植物资源短缺。靛蓝的生物合成以 L-色氨酸为底物,色氨酸酶将 L-色氨酸催化产生吲哚,吲哚被黄素依赖性单加氧酶氧化生成 3-羟基吲哚,3-羟基吲哚经自发的烯醇酮式互变异构和氧化缩合生成靛蓝。罗诗琪等^[162]将大肠杆菌来源的色氨酸酶和嗜甲基菌来源的黄素依赖性单加氧酶组合,在大肠杆菌中构建了靛蓝生产途径;进一步对单加氧酶进行蛋白质改造,获得催化效率提升的突变体;最后获得的重组菌株在发酵罐中可生产约 1.2 g/L 靛蓝,底物转化率为 0.86 g/g。

四氢嘧啶是一种亲水性环状氨基酸衍生物,是由微生物在高渗、高盐 and 高温等极端环境胁迫下分泌的一种细胞保护剂。由于四氢嘧啶具有优良的渗透保护和大分子稳定作用,广泛应用于化妆品、生物制剂、酶制剂和医疗等领域。四氢嘧

啶市场价格约 1000 美元/kg,全球每年市场需求量达 1.5 万 t。四氢嘧啶的生产主要采用微生物发酵法,嗜盐菌是生产四氢嘧啶的天然宿主,但高盐发酵条件对设备腐蚀非常大^[163]。四氢嘧啶的生物合成起始于 L-天冬氨酸,经天冬氨酸激酶和天冬氨酸半醛脱氢酶催化合成 L-天冬氨酸- β -半醛,后者在 L-2,4-二氨基丁酸转氨酶(EctB)、L-2,4-二氨基丁酸乙酰转移酶(EctA)和四氢嘧啶合成酶(EctC)的顺序催化下合成四氢嘧啶。除了嗜盐菌,大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌是代谢工程生产四氢嘧啶的主要底盘。除了外源引入四氢嘧啶合成基因簇 *ectBAC*,其他代谢工程策略的主要目标是提高前体物质如草酰乙酸、天冬氨酸、天冬氨酸- β -半醛和 L-2,4-二氨基丁酸的供给。目前,大肠杆菌产四氢嘧啶的最高产量为 131.8 g/L,产率为 1.37 g/(L·h),谷氨酸棒杆菌的最高产量为 65.3 g/L,具有工业生产潜力。

胍基乙酸(guanidoacetic acid, GAA)是人体内源性物质肌酸的直接前体,由甘氨酸和 L-精氨酸通过 N-脒基衍生化反应生成。GAA 在治疗关节炎、急性和慢性脊髓灰质、运动神经元疾病和神经肌肉等疾病方面具有效果。GAA 主要作为膳食补充剂和动物营养添加剂,用于促进机体生长,补充慢性肾功能衰竭患者的 GAA 缺乏,恢复肌酸代谢障碍相关疾病中的细胞生物能。化学法生产 GAA 需要在高温高压下进行,产品纯度低,近年来研究人员开始转向利用微生物转化法制备 GAA,目前还未实现规模化生产。廖雅芯等^[164]筛选获得一个酶活较高的 L-精氨酸:甘氨酸脒基转移酶,利用枯草芽孢杆菌实现了高表达,进一步引入鸟氨酸循环途径,缓解 L-鸟氨酸对酶的反馈抑制,并敲除 L-精氨酸降解途径,强化底物再生;最后通过改善膜通透性和发酵条件优化,胍基乙酸产量达到 13.1 g/L,底物甘氨酸的转化率达到 92.7%,

有效提高了胍基乙酸的生产效率。

血红素是一种含铁的卟啉化合物，具有氧气运输、电子传递等多种生理功能。微生物合成血红素主要利用大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌等工业常用底盘为宿主，但目前血红素产量还较低。解淀粉芽胞杆菌是一种革兰氏阳性细菌，被 FDA 认定为安全菌株。在解淀粉芽胞杆菌中，除了革兰氏阴性菌的原卟啉依赖性途径外，还存在一条特有的血红素合成途径，即粪卟啉依赖性途径^[165]。这两条合成途径的相关基因仅位于 4 个基因簇上，而大肠杆菌单一途径相关基因位于 8 个基因簇，谷氨酸棒杆菌相关基因位于 5 个基因簇上。这使得解淀粉芽胞杆菌更易于进行模块元件优化。在血红素合成基因簇上，*hemX* 基因编码的蛋白 HemX 是一种细胞色素组装蛋白，该蛋白对 HemA 即谷氨酰-tRNA 还原酶的表达具有负调控作用，可能会影响血红素合成前体即 5-氨基乙酰丙酸的供给。研究人员以一株产血红素的解淀粉芽胞杆菌工程菌作为研究对象，发现敲除 *hemX* 基因对细胞生长没有影响，但血红素产量得到了显著提高，表明 *hemX* 基因是提高血红素产量的重要靶点。

2-苯乙醇是一种广泛应用于化工、医药和食品行业的重要香料，具有多种生物学功能，包括作为植物保鲜剂和天然杀菌剂，且可通过生物合成方法提高其产量和环保性^[166]。2-苯乙醇主要存在于玫瑰、番茄等植物中，但天然提取量低且成本高，促使研究人员探索其合成路径。在番茄中，通过芳香族氨基酸脱羧酶和苯乙醛还原酶的催化，将苯丙氨酸转化为 2-苯乙醇；在玫瑰中主要通过艾氏途径合成，涉及芳香族氨基酸脱羧酶和苯乙醛还原酶。此外，葡萄和甜瓜中也有相关合成路径的研究，结果显示不同植物中 2-苯乙醇的合成机制存在差异。微生物合成 2-苯乙醇具有绿色环保、成本低廉

等优势，主要通过艾氏途径和莽草酸途径进行。为提高产量，研究人员采用基因工程和代谢工程调控合成路径，优化发酵培养基和条件，并通过原位产品分离技术控制发酵液中 2-苯乙醇浓度。此外，提高菌株对 2-苯乙醇的耐受性也很关键。通过基因突变和多组学分析，发现抗氧化系统和膜转运蛋白的调控对耐受性至关重要。微生物合成 2-苯乙醇的研究已取得显著进展，通过基因工程手段优化大肠杆菌、地衣芽胞杆菌、酿酒酵母等微生物的代谢途径，显著提高了 2-苯乙醇的产量。例如，大肠杆菌通过基因敲除和异源表达，产量达到 2.15 g/L^[167]；地衣芽胞杆菌通过多基因改造，产量提升至 6.52 g/L^[168]；酿酒酵母通过基因过表达和敲除，产量达到 1.59 g/L^[169]。这些研究不仅展示了微生物合成 2-苯乙醇的潜力，也为未来开发更高产菌株提供了新方向。

尸胺(1,5-戊二胺)是一种多领域应用的生物胺，其生物合成主要通过生物转化和发酵两种方法实现。生物转化法利用 L-赖氨酸和赖氨酸脱羧酶进行单步酶促反应，而发酵法通过代谢工程改造大肠杆菌或谷氨酸棒杆菌，实现低成本碳源的尸胺合成。尽管现有方法各有成果，但辅酶 5'-磷酸吡哆醛的供应和复杂培养基的使用限制了其生产效率提升。刘存萍等^[170]通过引入双路径协同优化的辅酶合成系统和优化发酵工艺，在 5 L 发酵罐中实现了尸胺的高效发酵生产，产量达到 54.43 g/L，生产强度为 1.13 g/(L·h)，为解决辅酶供应问题提供了新思路。

维生素及衍生物

维生素是维持人体正常生理功能所必需的一种微量有机化合物。根据其溶解性分为水溶性维生素和脂溶性维生素两大类。水溶性维生素包括 B 族维生素与维生素 C，脂溶性维生素

包括维生素 A、维生素 D、维生素 E 和维生素 K。水溶性维生素因其易溶于水，在体内储存少、易排出，摄入需求较大。

水溶性维生素占据了全球维生素市场份额的一半以上^[171]。其合成方法可分为化学合成法与生物合成法两大类。目前，发酵法生产维生素 B₂ 技术相对成熟，2023 年全球产能突破 1 万 t，主要生产企业有中国的广济药业、荷兰的 DSM、德国的巴斯夫。维生素 B₅、维生素 B₁₂ 也实现了发酵法生产，但还有较大提升空间。而维生素 B₁、维生素 B₆、维生素 B₇ 和维生素 B₉ 的生物合成技术仍处于研究阶段。维生素 C 的生物合成目前采用“三菌两步”法，但第二步的混菌发酵对发酵控制有较高要求，“一菌一步”发酵法的生产效率还不能满足工业生产需求。脂溶性维生素易溶于有机溶剂而不溶于水，能被脂肪吸收并储存在体内。脂溶性维生素的生产目前基本依赖化学合成法，生物合成法产量普遍非常低^[172]。维生素 A 和维生素 E 占据了脂溶性维生素市场的 45%。维生素 A 细胞工厂虽然实现了规模化生产工艺，但由于自身细胞生长对维生素的需求，还不能实现高产。维生素 E 在酿酒酵母中实现了完整的从头合成，但产量非常低，约 320 mg/L。由于维生素生物合成途径复杂多样，对合成途径相关酶的了解不够深入，制约了维生素生产效率的提升。蒲春香等^[173]系统介绍了不同维生素合成途径酶的研究现状，包括代谢特性和动力学性质等方面，总结了维生素合成途径中催化效率和底物亲和力的特点，为维生素的高效生物合成提供参考。

七烯甲萘醌(menaquinone-7, MK-7)是脂溶性维生素 K₂ 的重要亚型，在生物体中参与骨骼维持和心脑血管健康，在功能食品领域有广泛应用前景。枯草芽孢杆菌中存在完整的 MK-7

生物合成途径，分为糖酵解-磷酸戊糖模块、分支酸模块、甲基-4-磷酸赤藓糖醇模块和甲萘醌合成模块^[174]。由于整个合成途径涉及的酶较多，区室化可以提高底物和酶浓度，加快整体反应速率。细菌中的常见的膜区室化是功能膜微域(functional membrane microdomains, FMMs)。研究人员发现，MK-7 是形成 FMMs 的聚戊二烯类关键组分，明确了 MK-7 与 FMMs 的相关性。进一步将 MK-7 合成过程中的胞内游离关键酶定位至 FMMs 中，实现 MK-7 合成途径的膜区室化。改造获得的 MK-7 生产菌株摇瓶产量达 300 mg/L，相比对照菌株提高了 73.4%，表明利用功能膜微域构建区室化细胞工厂具有重要作用。

核苷

胸苷作为抗艾滋病药物的关键前体物，现有生产工艺存在产量低、环境污染和成本高等问题。基于微生物发酵的胸苷生产工艺通过优化从头合成和补救途径，阻断降解途径等策略，显著提升了胸苷产量。姚卓越等^[175]通过系统代谢工程策略，通过阻断胸苷分解和回补途径、增强前体物 UMP 供应以及优化关键酶表达，优化了大肠杆菌的胸苷合成途径，最终在发酵罐中实现了胸苷产量、转化率和生产强度的显著提升，使其分别达到 11.10 g/L、0.04 g/g 葡萄糖和 0.23 g/(L·h)。

假尿苷是 RNA 上最丰富的修饰核苷，是尿苷的 5 位核糖异构体。通过将假尿苷替换尿苷加入 mRNA，可以解决 mRNA 药物容易被免疫系统识别清除、产生免疫副反应的问题。组织中假尿苷含量非常低，直接提取法不适用。化学合成法收率低，而且存在 α 和 β 两种异构体。王倩倩等^[176]在大肠杆菌中设计了一条新的酶

级联反应路线, 实现全细胞催化尿苷制备假尿苷; 具体地, 使用质粒过表达大肠杆菌内源的假尿苷-5-磷酸糖苷酶基因 *yeiN*、核糖激酶基因 *rbsK* 以及核糖核苷水解酶基因 *rihA*, 构建出尿苷到假尿苷的高效转化途径; 进一步整合内源核苷渗透酶基因 *nupC*, 并敲除假尿苷转运蛋白编码基因 *psuT*, 强化了底物向胞内的转运, 减少了产物向胞内的转运; 以工程菌株作为全细胞催化剂, 在 24 h 内将 30 g/L 尿苷转化为 27.2 g/L 假尿苷, 转化率达到 90%, 达到目前报道的最高水平。

糖、糖醇、寡糖、多糖和糖脂

稀少糖是一类在自然界中存在但含量极少的单糖及其衍生物, 常见的有 D-阿洛酮糖、D-塔格糖、D-甘露糖、海藻糖、L-阿拉伯糖等。D-阿洛糖是一种结构类似于 D-葡萄糖和 D-阿洛酮糖稀有糖, 它是一种低卡路里甜味剂, 具有食用糖 80% 的甜度, 还可以发生美拉德反应用于提升食物香气和色泽, 大剂量、长期服用 D-阿洛糖未见毒副作用, 在食品领域具有广泛应用^[177]。此外, D-阿洛糖具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、免疫抑制和冷冻保护作用, 因此作为药物制剂在临床治疗中也有很好的应用潜力。目前生物法生产 D-阿洛糖还停留在研究阶段, 存在底物成本高、酶的催化活性和特异性不足等问题。

D-塔格糖是一种稀有己糖, 热量较低, 是优良的低热量代糖。生物合成 D-塔格糖的通常以乳糖为原料, 经 β -半乳糖苷酶水解得到 D-半乳糖, 再经 L-阿拉伯糖异构酶(L-arabinose isomerase, L-AI)异构化生成塔格糖。L-AI 的天然底物是 L-阿拉伯糖, 当 D-半乳糖作为底物时, C6 位存在空间位阻, 导致底物亲和力差, 催化

转化效率低。为提高 L-AI 对 D-半乳糖的亲和力, 李娟等^[178]针对底物结合口袋中与 D-半乳糖 C6 位可能存在空间位阻的氨基酸残基进行突变, 发现 F279I、F279V、M185A 突变体可以减小空间位阻, 提高对 D-半乳糖的转化率; 双突变体 M185A/F279I 底物亲和力显著提高, 催化效率是野生型的 8.2 倍; 以乳糖为底物, 偶联 β -半乳糖苷酶进行级联催化, 转化率达 22.8% (理论 50%), 为进一步改造 L-AI 高效生产塔格糖提供了参考。

N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, NeuAc)是一种带负电荷的功能性单糖, 是人体唾液酸的主要存在形式, 主要应用于营养化学品和药物中间体。微生物发酵法可以实现葡萄糖到 NeuAc 的从头合成, 成本上优于酶法和全细胞催化。在构建高效细胞工厂过程中, 生物传感器可用于筛选高活性酶突变体和高产菌株, 是重要的合成生物学工具。孙佳琦等^[179]以枯草芽孢杆菌为底盘, 将 NeuAc 转运蛋白基因和不同强度启动子结合, 获得 4 株 NeuAc 转运能力不同的枯草芽孢杆菌; 选择响应 NeuAc 的转录因子 Bbr_NanR, 与不同组成型启动子结合, 获得多个有活性的杂合启动子, 在上述枯草芽孢杆菌中测试其响应性能; 最终获得响应倍数比文献报道高 2 倍的 NeuAc 生物传感器, 具有较广的动态范围。后续可用于枯草芽孢杆菌中 NeuAc 合成途径的优化、高活性酶突变体的筛选以及代谢调控, 为构建更高效 NeuAc 细胞工厂奠定了基础。

D-甘露糖是一种低甜度、低热量的单糖, 其甜度是蔗糖的 60%, 主要用于减轻炎症性疾病、治疗类风湿性关节炎、预防哮喘性气道炎症、治疗癌症、治疗先天性糖基化障碍等, 可作为蔗糖替代品、糖质营养素应用于食品、医药领域。生物转化法合成 D-甘露糖有不同的路

线,如利用 D-甘露糖异构酶或 D-来苏糖异构酶将 D-果糖转化成 D-甘露糖;利用纤维二糖 2-差向异构酶将 D-葡萄糖转化成 D-甘露糖;或通过双酶催化将 D-葡萄糖首先转化为 D-果糖,再进一步转化成 D-甘露糖。由于异构酶催化的可逆反应,上述路线的转化率普遍在 10%–20%之间,难以满足工业生产需求。刘祖怡等^[180]以食品安全级菌株枯草芽孢杆菌为底盘细胞,选择最优来源甘露糖异构酶,构建获得了全细胞催化菌株;在最适全细胞催化条件下,分别以 500 g/L 果糖和 600 g/L 果糖为底物,转化生成 D-甘露糖浓度分别为 138 g/L 和 163 g/L,转化率均达到 27%以上,为目前利用食品级菌株中产 D-甘露糖的最高水平。此外,以 D-甘露醇为底物,利用 D-甘露醇氧化酶催化合成 D-甘露糖是一个不可逆反应。李冉等^[181]从类芽孢杆菌 HGF5 中发现了一个具有 D-甘露醇氧化活性的氧化酶 PsOX;酶活分析发现,PsOX 比先前报道的来源于天蓝链霉菌的 D-甘露醇氧化酶 AldO 的底物亲和性和催化效率更高;由 PsOX 构成的全细胞催化体系对甘露醇的转化率达到 95%以上,而 AldO 的底物转化率约为 30%,表明 PsOX 相较于 AldO 更具应用潜力。由于 D-甘露醇成本较高,下一步可考虑利用廉价底物合成 D-甘露醇,再偶联 D-甘露醇氧化酶合成 D-甘露糖。

D-甘露醇是一种六碳糖醇,是 D-山梨醇的同分异构体。D-甘露醇作为功能性糖醇和低热量甜味剂,应用于食品、化工和医疗领域。D-甘露醇的全球市场规模约为 15 万 t,占多元醇总量的 11%。化学法合成 D-甘露醇会伴随 D-山梨醇副产物的大量积累,产率低。生物法合成 D-甘露醇主要包括微生物发酵法、体外酶催化法和全细胞催化法^[182]。微生物发酵法使用人工选育的菌株,以葡萄糖、果糖、蔗糖、甘油等廉价底物直接发酵为 D-甘露醇。使用较多的

菌株有乳酸菌、酵母和丝状真菌,其中异型发酵型乳酸菌和木兰假丝酵母发酵工艺较为成熟。体外酶催化法和全细胞催化法以 D-果糖为底物,通过甘露醇脱氢酶催化生成 D-甘露醇。由于甘露醇脱氢酶需要辅因子 NADH 或 NADPH 的参与,因此生物催化法需要构建辅酶再生系统。三种生物合成方法各有优缺点,在实际应用中需要根据情况选择合适工艺。

半乳糖醇是一种稀少糖醇,具有热值低、不被人体胰岛素识别利用等特点,可作为新型甜味剂应用于糖果、面包等食品中。化学法生产半乳糖醇存在生产条件苛刻、成本高、污染大等问题。木糖还原酶可以催化半乳糖转化为半乳糖醇。邓连妹等^[183]对丝状真菌和酵母来源的 8 种木糖还原酶进行筛选,确定来源于黑曲霉的木糖还原酶 AnXR 具有最高的催化活性;进一步研究了其酶学性质发现最适 pH 和最适温度分别为 8.0 和 25 °C;将 AnXR 在酿酒酵母中表达,同时敲除半乳糖激酶阻断半乳糖分解途径,在全细胞催化条件下,半乳糖醇最高产量达到 12.1 g/L。由于木糖还原酶依赖 NADPH 作为辅因子,后续构建 NADPH 再生系统有望进一步提高半乳糖醇生产效率。

赤藓糖醇是一种新型天然无热量甜味剂,具有零热量、不被人体代谢吸收的特点,广泛应用于食品和添加剂领域,目前国内产能已达数十万吨。目前主要通过微生物发酵法进行工业化生产,特别是利用解脂耶氏酵母进行生产。随着合成生物技术的发展,赤藓糖醇的生产正从传统方法转向定向设计重构,以提高生产效率和产量。解脂耶氏酵母通过复杂的代谢途径合成赤藓糖醇,主要利用葡萄糖和甘油作为碳源,通过戊糖磷酸途径和糖酵解途径生成赤藓糖醇的前体,最终在赤藓糖还原酶的作用下合成赤藓糖醇。解脂耶氏酵母还具有利用包括甘

油在内多种碳源的能力。目前研究人员从碳摄取和同化模块、副产物模块、PPP 氧化模块与非氧化模块和合成模块对解脂耶氏酵母合成赤藓糖醇进行改造^[184]。通过多模块组合强化策略,显著提升了赤藓糖醇的产量和生产效率。赤藓糖醇产量可以达到 180 g/L,得率在 0.6 g/g 左右,生产强度超过 2 g/(L·h)。此外,通过高通量筛选、氮源饥饿响应改造、耐热性提升和形态工程等辅助策略,进一步优化了菌株的工业属性,使其适应不同发酵条件,提高了赤藓糖醇的生产性能和稳定性,为大规模工业生产提供了有力支持。

人乳寡糖(human milk oligosaccharides, HMOs)是母乳中天然存在的复合碳水化合物,在婴幼儿肠道健康和免疫系统发育中具有重要作用,重组 HMO 已被批准用于婴幼儿奶粉和功能性食品中,市场需求巨大,预计 2028 年全球 HMO 市场规模将突破 18 亿美元,国内市场规规模将突破 2.2 亿美元。其中唾液酸型 HMO,如 3'-唾液酸乳糖(3'-sialactose, 3'-SL)和 6'-唾液酸乳糖(6'-sialactose, 6'-SL)具有免疫调节、肠道保护、促进大脑发育、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性^[185]。生物合成是 3'-SL 和 6'-SL 的主要生产方式,其中利用微生物发酵法从廉价底物发酵直接生产 3'-SL 和 6'-SL 最具前景。从内源代谢途径产生的 UDP-GlcNAc 开始,引入外源 NeuC、NeuB、NeuA 和唾液酸转移酶进行级联催化,同时敲除竞争性途径,从而实现 3'-SL 和 6'-SL 的积累,3'-SL 和 6'-SL 的最高产量分别为 31.4 g/L 和 34 g/L,未来应寻找新酶或改进现有酶提高催化效率,使用染色体整合技术增强菌株的遗传稳定性。唾液酸乳糖合成过程中需要消耗三磷酸胞苷(cytidine triphosphate, CTP)和 N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac)。由于 CTP 和 Neu5Ac 价格十分

昂贵,直接以 CTP 和 Neu5Ac 为原料生产唾液酸乳糖没有经济价值。已有研究开发了 CTP 再生体系解决了 CTP 成本问题,但仍依赖 Neu5Ac 作为原料。为此,周文等^[186]提出以 N-乙酰基葡萄糖胺(N-acetyl-glucosamine, GlcNAc)和乳糖为底物合成唾液酸乳糖,建立了一种五菌株两步法生物合成唾液酸乳糖的新工艺;第一步采用两株大肠杆菌进行全细胞催化,将 GlcNAc 转化为 Neu5Ac。第二步以 Neu5Ac 为底物,引入再生 CTP 的面包酵母,通过另外两株大肠杆菌耦合发酵生产出唾液酸乳糖;发酵条件优化后,最高产量达到 55.04 g/L,开辟了一条低成本生产唾液酸乳糖的技术路线。

细菌纤维素是由 β -D-吡喃葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键聚合形成的胞外聚合物。相比植物纤维素,细菌纤维素具有持水性强、比表面积大、纯度和结晶度高、生物相容性和柔韧性好等优异性能,广泛应用于医疗、食品、化妆品、功能膜等领域。细菌纤维素合成过程主要包括 β -葡聚糖链形成、聚合以及胞外分泌。细菌纤维素合成酶(bacterial cellulose synthase, BCS)是一个多亚基复合体,是细菌纤维素合成过程的关键酶。目前关于细菌纤维素合成途径的研究已较为透彻,但是 BCS 对细菌纤维素合成的调控研究不够深入。聂雯霞等^[187]总结了不同菌株中 BCS 各亚基之间的相互作用,分析了其对高度有序纤维结构的形成的影响,为 BCS 的强化表达和理性改造提供了参考。木葡糖酸醋杆菌是研究细菌纤维素的模式菌株,也是工业生产细菌纤维素的主要底盘。早期研究发现,细胞运动与细菌纤维素合成有关,但木葡糖酸醋杆菌中这两者的关系尚不清楚。刘嘉恒等^[188]将木葡糖酸醋杆菌 CGMCC 2955 中与细胞运动相关的 3 个基因进行敲除,发现 *motA* 和 *motB* 双敲菌株细胞运动性降低,但细菌纤维素含量却提高

了 24%，力学性能即杨氏模量提升了 31%。这表明细胞运动与细菌纤维素合成之间具有相关性，但具体机制有待进一步研究。

骆驼刺泛菌 NX-11 胞外多糖 (*Pantoea alhagi* NX-11 exopolysaccharide, PAPS) 在农业中具有广泛应用前景，但其高黏度发酵过程限制了产量和质量的提升。李全飞等^[189]通过研究不同氧载体对发酵过程的影响，旨在提高 PAPS 的生产效率和质量；在骆驼刺泛菌 NX-11 发酵过程中，添加 Tween 20 作为氧载体显著提高了 PAPS 的产量和质量；最佳添加浓度为 0.5%，最佳添加时间为发酵初期，发酵罐实验表明 PAPS 产量提高了 17%；微观形貌和流变特性分析显示，Tween 20 处理后的 PAPS 具有更高的黏度和更光滑的表面，且未改变其化学结构，为高耗氧发酵体系提供了一种优化策略。

纤细裸藻是一类介于动物和植物之间的单细胞真核生物，没有细胞壁，可进行光合作用，具有光合自养、异养和兼性营养 3 种营养方式^[190]。纤细裸藻是一种极具经济价值的微藻，能合成一系列重要产物，比如特有的裸藻多糖、胡萝卜素和维生素等抗氧化物质。裸藻多糖具有多种医疗功效，包括降低尿酸水平、抗流感病毒与 HIV 病毒、增强免疫力、抗炎、抗肿瘤、抗氧化、降血糖血脂、抑制肝损伤和益生元等活性。此外，纤细裸藻在食品、饲料、化妆品等领域有重要应用，比如裸藻多糖作为抗氧化剂与保湿剂用于化妆品中。目前，纤细裸藻的开发和应用主要存在培养工艺不成熟、裸藻多糖提取效率低和消费者对相关功能产品认知度低等问题。

鼠李糖脂是一类低毒、易降解的生物表面活性剂，具有抗肿瘤、抑制生物被膜和免疫调节等活性，应用于医药、环境修复和农业等领域。研究发现，单、双鼠李糖脂比例不同，其

物理化学性质具有较大差异。在生物体内，鼠李糖基转移酶催化单鼠李糖脂与另 1 分子的 dTDP-L-鼠李糖缩合成为双鼠李糖脂。赵敏等^[191]将铜绿假单胞菌 PAO1 中编码鼠李糖基转移酶的基因进行敲除，然后使用阿拉伯糖诱导启动子进行回补，从而获得可控生产不同比例单、双鼠李糖脂的菌株。随着诱导剂浓度的增加，菌株中单鼠李糖脂所占比例逐渐降低，表面张力和临界胶束浓度逐渐升高，乳化能力逐渐减弱。相反，未诱导的菌株合成的鼠李糖脂表面活性性能更优。这为鼠李糖脂的生产和组成调控提供了参考。

有机酸和生物基材料单体

有机酸是一类应用广泛的生物基化学品。目前，通过微生物发酵法已实现柠檬酸、丁二酸、葡萄糖酸、苹果酸、衣康酸、富马酸、丙酮酸和丙酸等 20 多种有机酸的规模化生产。微生物生产有机酸主要采用大肠杆菌、霉菌等底盘。近年来，利用酵母作为底盘生产有机酸也受到关注。相比其他底盘，酵母具有较强的低 pH 耐受性，并且不存在噬菌体污染。目前研究较多的酵母底盘有酿酒酵母、解脂耶氏酵母、毕赤酵母、鲁氏酵母、假丝酵母、接合酵母、乳酸克鲁维酵母等，生产的有机酸主要有丁二酸、苹果酸、富马酸、乳酸、己二酸、乙醇酸、3-羟基丙酸、衣康酸等^[192]。相比大肠杆菌等底盘，酵母生产有机酸还存在产量低、副产物多等问题，还未有规模化生产的实例，但采用耐酸酵母生产丁二酸、苹果酸等有机酸已经成为一个重要的技术方向。

乙醇酸是一种重要的化学品和有机合成中间体。预计未来 5 年，全球乙醇酸市场规模将突破 16 万 t/年，70%乙醇酸水溶液的价格为 2 万元/t，晶体级的价格更高。尽管在多种微生

物如乳酸克鲁维酵母、莱茵衣藻、大肠杆菌及谷氨酸棒杆菌中实现了乙醇酸的发酵生产,但存在产率低、成本高的问题。全细胞催化法生产效率高,但需要添加价格相对昂贵的山梨醇。为此,鲍青青等^[193]从实验室保藏菌株中筛选了一株产乙醇酸的红酵母,通过紫外诱变和生物传感器筛选,获得一个突变株其乙醇酸产量比原始菌株提高了10倍;通过发酵罐补料发酵,该菌株可生产61.1 g/L乙醇酸;尽管该产量低于全细胞催化法合成乙醇酸的最高产量即113.8 g/L,但该菌株生产过程不需要添加山梨醇,更有利于工业化生产。后续结合定向进化、代谢工程改造和发酵工艺优化等策略,有望进一步提高乙醇酸产量。

丙酸可用作面包防霉剂,传统通过化学合成生产,但微生物生产的丙酸因被视作天然来源而受到重视。丙酸杆菌发酵法可以生产丙酸,但存在发酵抑制、生长缓慢和副产物问题。代谢工程改造丙酸杆菌提高发酵生产效率和经济性的方法包括利用廉价底物、增强合成能力、提高酸胁迫抗性及减少副产物。经基因工程和生物工艺优化,丙酸产量、转化率提升,成本和副产物生成降低,以甘油为碳源时丙酸产量可达106 g/L、转化率0.53 g/g,但其生长速率和发酵周期待优化^[194]。在改造大肠杆菌、酿酒酵母等非天然宿主生产丙酸方面,大肠杆菌引入异源途径、活化操纵子,酿酒酵母强化L-苏氨酸合成及整合途径后,丙酸产量均有提升,但生产效率和耐酸性仍需优化。

光学纯乳酸是合成可降解塑料聚乳酸的前体。在乳酸发酵过程中,乳酸积累导致发酵液pH降低,对微生物细胞生长造成了严重抑制。为应对酸性环境胁迫,微生物通过生成碱性物质、改变细胞膜组分或启动应激蛋白等机制来调节胞内pH,保护胞内生物大分子。近期,李

静等^[195]对产乳酸的凝结芽孢杆菌DSM1进行比较转录组分析,发现了一批可能与酸耐受相关的转运蛋白。在pH 4.6的酸性条件下,过表达转运蛋白RS10595后乳酸产量比对照组显著提高,表明该转运蛋白与菌株的酸耐受性直接相关。这为后续探究凝结芽孢杆菌酸耐受机制提供了参考。微生物发酵法生产D-乳酸存在菌株耐受性差、生产成本高等问题。利用固定化细胞进行连续发酵已被证明可以改善菌株耐受性,提高D-乳酸产量,而且催化剂的循环使用可以降低成本。郭勇鑫等^[196]首次以结冷胶作为细胞固定化材料,对保加利亚乳酸杆菌T15进行固定化,建立了菌株循环连续发酵工艺;相比于常用的固定化材料如海藻酸钠,结冷胶固定工艺使D-乳酸产量提高了33%,比游离工艺提高了37%,经过10次循环发酵后凝胶磨损低于5%,表明结冷胶是一种良好的细胞固定化载体。

二元羧酸是合成生物可降解塑料的重要单体,分为直链二元羧酸和环状二元羧酸。常见的直链二元羧酸有丁二酸、己二酸和十二烷二元羧酸,环状二元羧酸有2-吡喃酮-4,6-二元羧酸和呋喃-2,5-二元羧酸^[197]。二元羧酸不仅可以合成生物塑料,二元羧酸的合成也可以通过生物法实现。丁二酸是一种重要的C4平台化合物,是生产1,4-丁二醇、四氢呋喃和聚丁二酸丁二醇酯的主要原料,也是美国能源部认定的12种最具潜力大宗生物基化学品之一。2022年,全球对丁二酸的需求量为7万t,预计到2032年需求量将翻一番。丁二酸的生物合成主要有还原TCA途径、乙醛酸支路途径和3-羟基丙酸循环途径。其中,还原TCA途径可以羧化固定1分子CO₂,其理论碳转化率更高。目前绝大多数高产丁二酸菌株均采用还原TCA途径,使丁二酸产量和转化率达到较高水平。大肠杆菌生

产丁二酸需要辅因子 ATP 和 NADH 参与。已有不少研究通过增加 NADH 或 ATP 供给,平衡 NADH/NAD⁺或 ATP/ADP 水平,提高了丁二酸产量。但这些研究仅单独提高辅因子供给或调节辅因子平衡,没有将两种策略组合考虑,导致丁二酸发酵过程中大量积累乙酸、乳酸和丙酮酸等副产物。王学明等^[198]对大肠杆菌丁二酸生产过程进行化学计量学分析,借助代谢工程策略组合调控胞内 ATP 与 NADH 水平;工程菌株经发酵条件优化,5 L 发酵罐中丁二酸产量为 139.52 g/L,比出发菌株提高了 17.81%,副产物乙酸浓度为 1.40 g/L,降低了 67.59%,表明组合调控胞内 ATP 和 NADH 水平可以有效降低副产物生成,提高丁二酸产量。尽管大肠杆菌等细菌宿主已经实现了丁二酸的工业化生产,但酵母细胞因为较强的耐酸能力,有望成为丁二酸产量进一步突破的重要底盘。此外,酵母的耐酸性还使得丁二酸发酵过程无须进行 pH 调节,减少了中和剂如氨水的使用。丁二酸以游离酸的形式存在,有利于后续的提取纯化。目前研究较多的产丁二酸酵母有酿酒酵母、东方伊萨酵母和解脂耶氏酵母,其最高产量目前分别达到 45 g/L、89 g/L 和 198 g/L,极具发展潜力^[199]。另外,酵母底盘在利用非粮原料方面也具有优势,研究人员已探索利用纤维素木糖、甘油、乙酸、甲醇等更廉价碳源生产丁二酸,以降低生产成本。

衣康酸(亚甲基丁二酸)是 12 种高附加值平台化合物之一,主要用于生产纤维、树脂和橡胶。微生物发酵法是工业生产衣康酸的主要方式,使用丝状真菌如土曲霉和玉米黑粉菌等天然生产宿主,最高产量分别可达 160 g/L 和 220 g/L。但是,丝状真菌生长速度慢、生产效率低、需氧量高,近年来研究人员更多关注异源生产宿主如大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌和盐单胞菌等。

张静等^[200]基于前期构建的产衣康酸的工程化盐单胞菌,通过排查阻碍因素、优化碳氮源、诱导条件等工艺优化,建立了一锅法催化柠檬酸合成衣康酸的新工艺;在 5 L 发酵罐中利用开放式一锅法工艺,最高产生了 40.5 g/L 衣康酸。与两步细胞催化法相比,一锅法工艺无须细胞收集、浓缩和洗涤操作,工艺流程更加简单。相比其他微生物底盘,盐单胞菌的开放式工艺无须灭菌操作,成本更加低廉。

己二酸是一种具有重要工业应用价值的二元羧酸,被美国能源部列为 12 种最具市场价值生物基化学品。己二酸在医药、化工和材料等领域有广泛应用,特别是作为合成尼龙-66 的关键前体。全球年产量达 285 万 t,产值约 47 亿美元。生物合成己二酸主要有酶催化和微生物发酵两种途径,酶催化产量极低,生物发酵法更具工业应用潜力。生物发酵法主要有 3 条代谢路径,包括逆向 β 氧化途径、碳链衍生途径和逆己二酸降解(reverse adipate-degradation pathway, RADP)途径。刘洁等^[201]以一株高产丁二酸的野生型大肠杆菌 FMME N-2 为底盘,引入 RADP 途径实现己二酸的生物合成;通过优化合成路径中限速酶的表达和平衡己二酸合成前体供应两种策略,提高了己二酸的产量;工程菌株经 72 h 分批补料发酵,己二酸产量达 22.3 g/L,转化率为 0.25 g/g。下一步还需提高限速酶的活力、强化己二酸的合成路径和外运能力,以进一步提高己二酸的产量和转化率。

除了二元羧酸外,5-氨基戊酸(5-aminovalanoic acid, 5AVA)也是一种重要的生物基塑料单体,主要用于合成聚酰胺材料如尼龙 5 和尼龙 56。5AVA 可以通过二氧化铈负载纳米金催化哌啶氧化物进行化学合成,但生产过程在高温下进行,产率低且污染大。因此,绿色生物法合成 5AVA 受到关注。康雅琦等^[202]

在大肠杆菌中组合表达 L-赖氨酸 α -氧化酶、 α -酮酸脱羧酶和醛脱氢酶，建立了一条以 L-赖氨酸为原料合成 5AVA 的途径；补料分批发酵表明，5AVA 产量达到 57.52 g/L，摩尔得率为 0.62 mol/mol，且该途径无需使用乙醇和双氧水，优于其他已报道的 5AVA 生产工艺。

1,3-丙二醇(1,3-PDO)是合成聚酯和聚氨酯的重要单体，在化工和医药行业应用广泛。其生产经历了从化学合成到微生物发酵的转变，尤其是从粮食原料葡萄糖到非粮原料甘油和甲醇的转变，以实现更可持续和环保的生产^[203]。葡萄糖作为广泛使用的生物质原料，因其供应量大且价格稳定，成为多种工业发酵过程的首选底物。然而，自然界中没有微生物能直接利用葡萄糖合成 1,3-PDO，因此研究者通过工程化菌株来实现这一目标。代表性的工程化策略包括整合葡萄糖至甘油和甘油至 1,3-PDO 的生物合成模块，以及通过敲除和上调特定基因来优化代谢路径。如杜邦公司研发的大肠杆菌工程菌株能够高效生产 1,3-PDO，转化率高达 0.51 g/g 葡萄糖^[204]。尽管如此，由于葡萄糖的碳还原度低于 1,3-PDO，导致理论得率不够高。甘油作为生物柴油生产的主要副产物，可转化为包括 1,3-PDO 在内的多种化学品，从而提高生物柴油产业的经济效益。自然界中多种微生物能够在厌氧或微耗氧条件下通过歧化途径将甘油转化为 1,3-PDO，但通常伴随大量副产物。研究者通过敲除副产物合成途径和增强 1,3-PDO 合成通量来提高转化率，同时采用辅因子工程策略来维持氧化还原平衡。在甘油发酵生产 1,3-PDO 的过程中，产物积累所造成的高渗透压会严重抑制菌体生长及产物合成。为此，张少伦等^[205]以实验室分离的天然产 1,3-PDO 的克雷伯氏菌作为出发菌株，采用 ARTP 诱变技术，成功获得一株能耐受 100 g/L

浓度 1,3-PDO 的突变株；进一步强化合成途径并阻断支路途径，工程菌在 5 L 发酵罐中的 1,3-PDO 产量达到 118 g/L，较出发菌株提高了 57%，具有较强的应用潜力。尽管甘油比葡萄糖具有更高的碳还原度，但其价格受生物柴油产业影响波动较大。随着生物制造产业和“双碳”目标的发展，甲醇、甲烷和 CO₂ 等非粮 C1 原料因其可持续性和低成本特性受到关注。甲醇作为高能量密度原料，已被用于生产 1,3-PDO，但当前产量和转化率仍需提高。CO₂ 通过光合作用和工程菌株也可用于 1,3-PDO 的生产，但产量还比较低。开发高效利用甲醇和 CO₂ 等 C1 原料的工程菌种，以实现 1,3-PDO 等生物基材料单体的高效生产，是下一步研究的重点。

1,4-丁二醇是一种重要的化工原料，其市场前景广阔，但传统生产方法依赖于不可再生资源。姜君逸等^[206]提出了一种新的生物合成路径，以葡萄糖为底物经三羧酸循环先合成 α -酮戊二酸，再通过 α -酮酸脱羧酶生成丁二酸半醛，然后通过乙醇脱氢酶生成 4-羟基丁酸，再经羧酸还原酶作用生成 4-羟基丁醛，最后再由乙醇脱氢酶作用生成 1,4-丁二醇；作者通过构建和优化 1,4-丁二醇的生物合成路径，成功实现了大肠杆菌以葡萄糖为底物从头合成 1,4-丁二醇；通过酶法转化验证了新路径的可行性，并将其导入大肠杆菌中进行发酵实验，最终在 5 L 发酵罐中产生了 4.22 g/L 的 1,4-丁二醇。尽管实际得率低于理论值，但该路径无需额外的乙酰辅酶 A 参与，且避免了副产物乙酸的积累，为 1,4-丁二醇的生产提供了新的思路和方法。

1,4-环己烷二甲胺是一种重要的生物基材料单体，主要应用于有机合成、医药、化工和材料等领域。目前其工业生产主要采用化学合成法，包括苯二甲腈法和环己烷二甲醇氨化法，

存在反应条件苛刻、分离成本高和存在一定安全风险等问题。生物催化法是化学合成法的潜在替代方案,但目前还没有相关研究报道。韩业挺等^[207]以大肠杆菌来源的转氨酶作为生物催化剂,以 1,4-环己烷二甲醛为底物,以谷氨酸为氨基供体合成 1,4-环己烷二甲胺;为了促进谷氨酸再生,作者引入酿酒酵母来源的谷氨酸脱氢酶,将 α -酮戊二酸还原为谷氨酸;进而引入博伊丁假丝酵母来源的甲酸脱氢酶,用于再生 NADH;将三酶级联体系在两株大肠杆菌中表达,通过蛋白质改造提高了转氨酶催化效率;最终重组菌株可催化 40 g/L 底物生成 27 g/L 产物,摩尔转化率 27%,实现了 1,4-环己烷二甲胺的生物催化合成。

聚合物材料的生物降解与生物可降解材料

当前,全球塑料年产量超过 80 亿 t,所消耗的石油总量占据全球石油总消耗量的 8%^[208]。这不仅带来巨大的碳排放量,大量的塑料废弃物已成为环境污染的主要源头。近 10 年来,在循环生物经济背景下,美国、欧盟、日本、中国等世界主要经济体先后出台支持塑料污染治理的相关政策,推动了塑料回收降解和生物塑料的研究和发展。

聚烯烃类塑料是全球使用最广泛的塑料聚合物,占据了全球塑料制品的 77%^[209]。聚烯烃类塑料主要包括聚乙烯(polyethylene, PE)、聚苯乙烯(polystyrene, PS)、聚丙烯(polypropylene, PP)和聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)。其中,PE 是全球产量最高的塑料聚合物,占据全球塑料产量的近三成^[210]。PE 塑料相对分子质量大、分子链长、链段结晶度高,疏水性较强,是最难降解的塑料之一。相比于传统的塑料处理方法,如填埋、焚烧、机械回收和化学回收,生

物降解是一种生态友好的处理方式。目前已从环境中分离到多种微生物具有 PE 降解能力,包括假单胞菌、罗尔斯通氏菌、寡养单胞菌属、克雷伯氏菌属等超过 20 个属的细菌,以及曲霉属、青霉菌属和根霉菌属等真菌。特别地,从一些昆虫肠道中也分离到能够降解 PE 的菌株,这可能是昆虫食用了塑料外包装后驯化产生的。目前发现的参与 PE 塑料降解的酶主要有木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶等木质素降解酶,以及烷烃羟化酶、细胞色素 P450 酶等。PE 塑料的生物降解过程包括定殖、解聚、同化和矿化,经历长链断裂、低聚物降解、胞内代谢、完全氧化等阶段。下一步还需加强 PE 降解微生物的高通量筛,深入挖掘 PE 降解酶并进行分子改造,建立级联酶降解体系和合成菌群体系,提高 PE 塑料的生物降解效率。

聚氨酯(polyurethane, PUR)塑料是一类由多异氰酸酯和多元醇缩合而成的聚合物材料。我国每年生产和消费的 PUR 塑料超过 1 000 万 t,如何降解废弃 PUR 成为了一道难题。目前, PUR 废弃物的主要处理方法是填埋、焚烧、机械回收和化学回收。利用微生物或酶进行降解是处理 PUR 废弃物的最理想方案,但目前还未挖掘到具有应用潜力的生物催化剂。江志通等^[211]从垃圾填埋场成功分离到一株拟无枝杆菌属微生物 G-11,该菌能够降解 PUR 类似物 Impranil DLN。使用商业聚酯型 PUR 泡沫塑料测试发现, G-11 处理后的 PUR 表现出结构被破坏、亲水性增、热稳定性下降,表明 G-11 具有一定的商业 PUR 降解能力。曾彩婷等^[212]同样从垃圾填埋场聚氨酯废弃物表面成功分离到一株可降解 PUR 的高地芽孢杆菌 YX8-1;该菌株不仅能降解自行合成的 PUR 寡聚物 PBA-PU,还能在 1 个月内将商品化 PUR 降解失重 32%,具有较大的应用潜力。PUR 塑料降解产物如己二酸、1,4-丁二醇、

乙二醇,可以被一些微生物如假单胞菌利用,用于生产可降解生物塑料如 PHA。这种塑料内循环的方式被称为“降塑再造”^[213]。

聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET) 是一种石油基高分子热塑性材料,由对苯二甲酸和乙二醇在催化剂的作用下酯化反应制得。PET 具有透明度高、重量轻、抗冲击性强、耐化学腐蚀和可加工等特性,是目前使用最广泛的塑料之一,主要应用于容器包装、纺织业和工程塑料等领域^[214]。废弃 PET 对环境造成了巨大污染,同时废弃 PET 也是潜在的资源。因此,实现 PET 塑料的完全降解对减轻环境污染,实现塑料单体的循环利用具有重要意义。降解 PET 塑料的方法包括物理法、化学法和生物法,其中生物法是降解 PET 的最绿色环保手段。

目前已从自然环境中分离到多株可以降解 PET 塑料的微生物,包括细菌和真菌。直接利用 PET 水解酶降解 PET 理论上比全细胞催化剂更高效,但也存在稳定性差、降解性能不足等问题。能够降解 PET 的酶主要是羧酸酯酶、脂肪酶和角质酶等水解酶类^[215]。研究较多的 PET 水解酶来自大阪伊德氏杆菌、嗜热放线菌、真菌以及宏基因组。近年来,通过分子改造,扩大底物结合口袋、改善表面亲水性、减少中间产物抑制作用,有效提高了 PET 降解酶的降解能力,增强了其热稳定性。在分子改造过程中,对突变体的筛选通常涉及复杂的蛋白纯化和产物色谱分析步骤,因此,酶活检测技术对 PET 水解酶的高效改造非常关键。张晗笑等^[216]总结了目前 PET 水解酶的检测方法,主要有高效液相色谱法、琼脂板培养快速筛选法、比色法、吸光度法、浊度法、荧光法,以及更高通量的生物传感器法。这些检测方法原理不尽相同,都存在一定的局限性,可以根据不同需求选择

最合适的检测方法,或者将不同检测方法联合使用。赵夷培等^[217]对从海洋宏基因组中发现的塑料降解酶 Ple629 进行热稳定性改造;基于已解析的 Ple629 蛋白结构及底物复合体结构,确定了潜在影响蛋白热稳定性的氨基酸残基位点,引入二硫键,突变体 D226C/S281C 的熔点温度提升了 6.9 °C,催化活性也随之提高了 1.5 倍。碳水化合物结合结构域(carbohydrate binding module, CBM)是一类非催化活性的折叠蛋白,分为表面结合型(type A)、链式结合型(type B)和寡糖结合型(type C)3 类。研究发现,在 PET 降解酶中引入 CBM 模块可以增加酶与底物之间的亲和力,提高酶的降解能力^[218]。姚佳鑫等^[219]系统研究了 3 种类型 CBM 模块与 PET 降解酶融合后对 PET 降解性能的影响。结果表明,引入 A 型和 C 型 CBM 可以提高 PET 降解酶对膜状 PET 塑料的降解率和热稳定性,而 B 型 CBM 反而降低了 PET 的降解速率,这为 PET 降解酶的改造提供了新的思路。

在 PET 降解酶作用过程中,其中间产物即对苯二甲酸单羟乙酯 MHET 和对苯二甲酸双羟乙酯 BHET 的积累会抑制 PET 降解酶的活性。研究人员发现 MHET 降解酶可以特异性降解 MHET,生成乙二醇和对苯二甲酸。因此,PET 降解酶和 MHET 降解酶的联合使用有望实现 PET 的完全降解。相比 PET 降解酶,针对 MHET 降解酶的研究稍显滞后。杨媚媛等^[220]对 MHET 降解酶的三维结构、底物结合模式、催化反应机理和蛋白改造进行了系统总结,为 MHET 降解酶的下一步研究提供了理论参考。MHET 和 BHET 是 PET 水解酶的竞争性抑制剂。动力学研究表明,MHET 的进一步水解可极大推动 PET 塑料的降解过程。目前唯一发现的能高效降解 MHET 的酶是来源于大阪伊德氏杆的 *IsMHETase*,对 MHET 表现出高度的底物特异

性。发掘更多 MHET 降解酶对研究其降解机理、定向改造、构建高效 PET 降解酶体系至关重要。刘欣悦等^[221]利用 *IsMHETase* 的序列和结构分析来挖掘新的 MHET 降解酶, 成功发现了一种来自伯克霍尔德菌科细菌的 MHET 降解酶, 该酶具有高效的 MHET 降解活性, 最适 pH 和最适温度分别为 7.5 和 40 °C, 在低温下有较好活性。这为 MHET 降解酶类增加了一个新成员, 有助于开展酶的进化、结构、功能及应用研究。BHET 的累积会抑制 PET 水解酶的催化效率, 因此对 BHET 水解酶的挖掘和改造也非常重要。陈阳阳等^[222]发现嗜热氢化杆菌来源的双烯内酯酶可以水解 BHET, 大肠杆菌重组表达后, 该酶对短链酯类如对硝基苯酚乙酸酯具有较高的催化活性, 80 °C 下处理 1 h 仍能保持 80% 活性, 展现出较好的热稳定性。张洁等^[223]发现来源于浅黄糖丝菌中的 PET 水解酶 *Sle* 对 BHET 也有降解活性, 降解产物为单(2-羟乙基)对苯二甲酸酯和对苯二甲酸, 属于典型的 BHET 水解酶。下一步, 将 BHET 水解酶和 PET 水解酶联合使用, 有望进一步提升 PET 的降解效率。

聚酰胺是一类线型高分子材料, 其聚合物主链含有重复的酰胺基团(-CO-NH-)。常见的聚酰胺材料有尼龙 6 和尼龙 66, 具有强度高、刚性好、耐热、耐化学物质等特点, 广泛应用于服装、医疗、汽车和建筑等行业。相比 PET、PU 等塑料的生物降解研究, 聚酰胺的生物降解研究比较少。郑芷然等^[224]以 4-硝基丙酰苯胺为聚酰胺模式底物, 从实验室前期构建的塑料解聚酶库中筛选到一种来源于嗜热菌 (*Meiothermus ruber*) 的 α/β 水解酶 *MrABH*。该酶具有酰胺酶活性, 作用于聚酰胺中的酰胺键, 将尼龙 6 和尼龙 66 解聚成单体和寡聚物, 具有潜在应用价值。

聚乳酸(poly(lactic acid, PLA)是一种以乳酸

作为单体, 通过酯键连接的新型聚酯材料。PLA 是典型的生物基塑料和生物可降解塑料。PLA 具有良好的机械和物理性能, 但抗冲击能力差、脆性高。2020 年, 我国 PLA 产能约 18.5 万 t, 预计到 2025 年达到 100 万 t 以上, 占据全球 PLA 产能的 2/3^[225]。乳酸单体主要通过微生物发酵法生产, 乳酸的聚合过程分为化学法聚合和生物法聚合。生物法聚合存在聚合物含量低、聚合物分子量低等问题, 目前工业化生产主要采用化学聚合法。聚乳酸虽然是一种生物可降解塑料, 但只有在温度高于 58 °C 和高湿度的密闭工业堆肥环境中才可以降解, 在自然条件下同传统塑料一样难以降解。针对废弃聚乳酸塑料, 谢彬等^[225]提出 2 种处理方式。对于易于回收的 PLA 塑料, 采取集中生物降解再聚合的方式, 循环利用乳酸; 对于难以回收的 PLA 塑料, 进行生物原位降解。

聚羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)是一种具有优良物理、机械和免疫学性能的热塑性生物塑料, 是聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)的代表。随着 PHB 的应用越来越广泛, PHB 的高效降解也非常重要。虽然 PHB 在特定条件下可以被降解, 但降解条件苛刻、降解速率慢、能耗大。PHA 解聚酶可用于 PHA 的降解回收, 但存在高温下酶活低、稳定性差等问题。李志刚等^[226]在大肠杆菌中表达来自短须嗜热单孢菌的 PHA 解聚酶 *TumPHAD*, 并通过二硫键理性设计获得了热稳定性提升的突变体 A190C/V240C; 该突变体表现出耐高温、热稳定性好、PHB 降解能力强等特点, 其最适温度为 60 °C, 比野生型提高了 20 °C, 同时在 50 °C 下稳定性提高了 21 倍, 对 PHB 的降解率提高了约 2-4 倍。这为开发高效稳定的 PHB 降解工艺提供了重要催化剂。

聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯(poly(butylene

adipate-co-terephthalate), PBAT)是一种优异的热塑性生物降解塑料。由于其具有较好的延展性、断裂伸长率、耐热性和抗冲击性能,特别适合应用于食品包装和农业薄膜。目前, PBAT产量占据了全球生物可降解塑料产量的30%,远高于其他生物可降解塑料。虽然是具有生物可降解性,但PBAT的生物降解条件比较苛刻,比如要在湿度70%、温度55℃的堆肥中,才具有相对快的降解速率。在海水中的降解速率更是非常缓慢,由此带来的环境威胁巨大。角质酶是一类可降解多种人工聚酯的多功能酶,王慧等^[227]经过筛选,发现来源于枝叶堆肥的角质酶突变体ICCG对PBAT具有较好的降解效果;在最优条件下,ICCG在2d内对PBAT的降解率达到了77.5%,表明该酶具有较强的塑料降解能力。

肠道微生物、活菌药物与合成微生物组

人体肠道微生物影响宿主代谢、免疫及情绪行为,其组成和功能紊乱与疾病的发生和发展密切相关。建立肠道微生物资源库有助于研究微生物与宿主互作的分子机制,挖掘新型抗菌肽与活性酶,加快活体药物的开发。国内外研究团队运用传统的分离培养技术,分为前处理、梯度稀释、固体分离培养、液体增菌培养和分子鉴定技术,已构建10余个肠道微生物资源库,包含1000多个种,分属于12个门、22个纲、39个目、96个科和358个属。其中,厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门及放线菌门物种数较多^[228]。随着分离培养技术和组学技术的发展,肠道微生物资源库将在可培养菌株、基因组信息、生理生化特征和功能等方面日趋完善,并覆盖更多地域和不同健康状态人群,为人体健康研究提供资源和信息支撑。

肠道微生物对维持宿主肠道平衡和健康起着重要作用。研究发现,肠道菌群和中枢神经系统之间存在相互作用关系。比如,一些肠道微生物可直接作用于肠神经系统并激活其支配的迷走神经,也可以通过调节免疫功能来影响中枢神经系统,或通过内分泌系统与大脑相互调节^[229]。神经系统疾病如抑郁症、阿尔茨海默病、帕金森病和孤独症谱系障碍等的发生通常伴随肠道菌群的失调。基于神经系统疾病和肠道菌群间的相互作用,研究人员开始尝试以粪菌移植作为神经疾病的治疗手段。粪菌移植通过将健康供体的粪便移植到患者胃肠道内,重建肠道生态系统,在肠易激综合征的治疗中已得到广泛应用。通过大量动物实验和初步临床试验表明,粪菌移植对治疗神经系统疾病如抑郁症、阿尔茨海默病和帕金森病等具有非常显著的效果,粪菌移植有望成为临床神经系统疾病的新型治疗手段。

肠芯片技术通过微工程和细胞结合,模拟体内三维结构、机械应变、氧气梯度等生理条件来模拟人体肠道微生理系统,为体外研究肠道与微生物互作提供了高仿生平台^[230]。该技术能够评估单一及多重微环境因素对肠道功能的影响,通过形态和功能特征的评估,验证其高仿生和高集成的优势,显著提升了对宿主-微生物相互作用的理解以及肠道微生理系统的体外研究的仿真度和应用价值,且成功应用于肠道疾病模拟和药物评价,为肠道疾病模拟和药物评价提供了新途径,促进了宿主-微生物互作的研究,揭示了宿主-微生物互作在肠道健康中的重要性。然而,肠芯片仍需在仿生度和评价体系上进一步改进,以提升其真实性和应用价值。

活体生物药是一类含有活的生物体(如细菌)且具有预防、治疗人类疾病或适应症功能的生物制剂^[231],因其具有疗效好、成本低、应

用范围广等优势, 极具开发潜力和应用价值。目前, 与活体生物药研发相关的疾病有癌症、炎症性肠病、艾滋病、糖尿病、焦虑症、苯丙酮尿症等。活体生物药可分为 3 类: 单菌药物、复合菌药物、工程菌药物。单菌药物即利用单一天然微生物制成, 成分单一, 药效明确; 复合菌药物是由两种或多种天然微生物复配而得, 药效更好, 但药效模型更为复杂, 稳定性是关键; 工程菌药物是人工设计改造后的微生物制剂, 药物靶向性、针对性更好。通过合成生物学改造, 赋予其智能响应、高效表达、靶向明确、功能多样等优势。单菌药物研究集中在肿瘤和消化道疾病领域, 复合菌药物在免疫疾病方面研究较多, 而工程菌药物在治疗代谢疾病、抗感染、炎症性肠病等方面具有优势。稳定性、安全性是未来开发活体生物药需关心的两大问题。

药物递送是肿瘤治疗中的关键步骤。活细菌因具有肿瘤靶向性和良好的生物相容性, 是肿瘤药物递送的优良载体。此外, 专性和兼性厌氧菌可以选择性地在肿瘤组织中定殖, 通过竞争营养物质、诱导细胞凋亡和免疫激活等多种机制进一步发挥抗肿瘤作用。用于药物递送的细菌须满足毒性低、肿瘤靶向性强的要求。一方面可通过突变毒力基因等手段获得减毒细菌, 另一方面可利用基因工程活化学修饰提高细菌肿瘤靶向性^[232]。药物在细菌上的负载有 3 种方式, 包括基因工程改造细菌使其原位生产抗肿瘤药物, 通过物理或化学手段在细胞表面负载药物, 或者通过细菌内化作用, 使药物进入细胞内, 这样可以提高负载量和负载稳定性。比如将光敏剂内化到蓝藻细胞中, 用于肿瘤光动力学治疗。细菌作为药物递送载体的局限在于其免疫原性会引起机体的不良反应, 其临床安全性受到挑战。

合成功能菌群, 亦称合成微生物组, 是将两种或两种以上微生物在特定环境条件下组成共培养体系。菌群成员通过分工、通讯等相互作用, 共同执行单一菌株无法实现的复杂功能。在自然生态系统中, 物种间共有 6 种相互作用模式, 包括偏利共生、偏害共生、互利共生、捕食、竞争和无利害共栖, 这些相互作用模式也是构建人工菌群的理论基础^[233]。在构建功能菌群过程中, 为减少种群成员间资源竞争, 研究者开发了许多空间分隔技术, 比如微流控装置、生物打印、模具/封装等。合成功能菌群在生物合成、生物降解、生物计算、生物能源和肠道健康等领域具有广泛应用前景。在生物合成方面, 合成菌群可以减轻宿主代谢负担、拓宽底物利用谱、具有更高的稳定性和鲁棒性, 并且可以合成单菌体系无法合成的化学品。比较典型的合成功能菌群例子有: 木质纤维素生产化学品、多环芳烃污染物降解、微生物组生物光伏等。

在微生物合成 PHA 工艺中, 生产原料占据了近一半的成本, 因此利用低成本原料实现 PHA 的高效合成是持续推动 PHA 产业化的关键。通过构建合成微生物组, 研究人员已分别实现从一代原料、二代原料和三代原料生产 PHA^[234]。比如将枯草芽孢杆菌与真养产碱杆菌共培养, 实现以蔗糖为原料生产 PHA; 通过构建大肠杆菌和恶臭假单胞菌合成菌群, 实现以玉米秸秆水解液生产 PHA; 通过构建由蓝藻与高效合成 PHA 的细菌组成的合成微生物组, 实现了 CO₂ 到 PHA 的合成。

微生物抗逆工程

工业环境下微生物细胞面临高渗透压、高底物/产物浓度以及高酸碱物质等胁迫, 表现出抗逆性差、工程放大效率低等问题^[235]。适应性

进化是提高微生物细胞工厂环境耐受性和生产效率的重要手段。通过人为施加定向选择压力,使微生物经过短期或长期驯化,累积有益突变应对选择压力,获得适应特定环境的生理性能。相比针对单一基因或单一途径的传统定向进化,微生物适应性进化是基因组全局进化,通常发生多基因突变,以应对多重选择压力。当前,适应性进化依托微流控、生物传感器、多组学分析等技术,实现了突变库的快分离、快筛选、快解析,同时摆脱了传统复杂的操作过程,降低了过程污染风险。通过适应性进化,微生物细胞可以获得更快的生长速率,更高的底物/产物耐受性,更好地平衡生长和生产过程,更强的环境压力适应性。

酵母自溶是一种发生在酵母生长后期的生理现象。当生长环境恶化或受到环境压力胁迫时,胞内能量代谢发生紊乱,最终导致细胞膜、细胞壁破裂,胞内蛋白质、核酸等大分子释放到胞外。酵母自溶现象在工业啤酒酿造中经常发生,给啤酒的风味和品质带来不同程度的影响。柠檬酸循环是细胞代谢产生 NADH、NADPH 以及 ATP 的主要途径。研究发现,柠檬酸循环与酵母细胞活力有密切关系。异柠檬酸脱氢酶是柠檬酸循环的关键限速酶,其活力直接影响 NADH 和 NADPH 的供应。叶可嘉等^[236]研究了拉格啤酒酵母中异柠檬酸脱氢酶 *IDP1* 和 *IDP2* 基因对酵母自溶的影响;发现破坏 *IDP1* 基因提高了胞内 NADPH 和 ATP 水平, NADPH/NADP⁺ 比例上调,活性氧水平下降,细胞抗自溶指数提高了 1.5 倍;相比 *IDP1*, *IDP2* 基因的缺失导致 NADPH 和 ATP 水平下降, NADPH/NADP⁺ 比例下调,活性氧水平升高,酵母发生快速自溶。这表明柠檬酸循环相关基因对酵母自溶具有调控作用,为构建抗自溶能力酵母细胞提供了理论基础。

在真核细胞如酿酒酵母中,线粒体通过氧化磷酸化为细胞提供能量。同时,线粒体也是胞内产生 ROS 的主要场所,ROS 的积累会导致线粒体损伤,损伤的线粒体会产生更多的 ROS,如此恶性循环破坏了胞内氧化还原平衡。为维持细胞正常状态,细胞会选择性清除受损线粒体,该过程称为线粒体自噬。研究表明,线粒体自噬相关基因与氧化应激相关,但关联机制尚不清楚。程万琪等^[237]在酿酒酵母中分别缺失或过表达自噬相关基因 *ATG8*、*ATG11*、*ATG32*。在过氧化氢诱导的氧化胁迫下,过表达 *ATG8* 和 *ATG11* 显著降低了胞内活性氧,并且 ATP 水平得到了显著提高,表明抗氧化性能更强。对应地,*ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因缺失导致胞内活性氧水平显著上升,细胞抗氧化能力减弱。因此,自噬相关基因 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 可能是调控酵母抗氧化能力的潜在靶点。

蓝细菌是地球上唯一进行放氧光合作用的原核微生物。作为光合自养微生物,蓝细菌在合成生物学领域可用于构建光合固碳系统,实现二氧化碳到燃料或化学品的直接合成。当前,以蓝细菌为底盘可生产近百种燃料和化学品,包括乙醇、丙酮、丁醇、异丙醇、乳酸、法尼烯、虾青素等。蓝细菌在自然条件下面临高光、高温、高盐 and 重金属离子等胁迫,在工业生产中存在耐受性差、产量不稳定问题。近年来,实验室适应性进化技术被应用到蓝藻底盘菌株中,成功获得了耐受高光、重金属离子、高盐和高浓度有机溶剂胁迫的进化藻株,有效提高了藻株生产性能^[238]。未来需构建更大的突变文库,筛选获得耐多重胁迫的工程藻株,研究藻株耐受性分子机制,助力高产、高鲁棒性藻株的理性设计与改造,推动光合细胞工厂的规模化应用。

细菌耐酸机制在许多生物技术过程中发挥着重要作用,如酸性化学品的生产、酸性污染物的处理以及耐酸致病菌的防治^[239]。在酸性胁迫下,细菌通过酸信号转导系统调控胞内耐酸机制,如氨基酸脱羧反应和脲酶代谢,产生碱性物质提高细胞内外 pH。酸信号转导系统主要有 EvgS/EvgA、PhoQ/PhoP 和 ArsS/ArsR 等双组分系统,以及 CadC 单组分系统。细胞膜上的感应蛋白感知到外界低 pH 胁迫时,通过自磷酸化作用,将酸胁迫信号转导至胞内调节蛋白,激活调节蛋白进而调控耐酸相关基因的转录,从而抵抗酸性胁迫。双组分转导系统 EvgS/A 和 PhoQ/PhoP 主要激活谷氨酸脱羧系统以及伴侣蛋白的修复功能,双组分转导系统 ArsS/R 主要调控脲酶代谢途径,单组分转导系统 CadC 可以激活赖氨酸脱羧系统。细菌内有 4 种基于氨基酸脱羧的耐酸系统,包括谷氨酸依赖耐酸系统、赖氨酸依赖耐酸系统、精氨酸依赖耐酸系统和鸟氨酸依赖耐酸系统。氨基酸脱羧后生成的碱性产物消耗胞内 pH,同时一部分碱性产物转运到细胞外中和胞外 H⁺。周质伴侣蛋白 HdeA 和 HdeB 在中性 pH 时处于二聚体非活性状态,当 pH<3.0 时解离为活性单体,与酸变性的蛋白结合发挥蛋白伴侣功能,防止变性蛋白聚集并促进蛋白活性恢复。应用方面,在耐酸生产菌株如产乳酸菌、产丁酸菌或产丙酸菌中增强耐酸系统的表达,可以显著提高菌株的酸耐受能力,提高酸性产物的积累量。在生物修复领域,将耐酸基因元件引入中性污染物降解细菌中,可以提高细菌对酸性污染物的修复效率。在疾病预防方面,通过抑制致病菌的耐酸系统,可以防治肠道致病菌的感染。利用细菌耐酸机制作为作用靶点开发新药是未来重要的研究方向。

木质纤维素水解液中常含有糖、盐、酚、

醛等抑制性化合物,因此以木质纤维素为原料的生物转化需要微生物具有较强的耐受性。吴娜莎等^[240]研究了克鲁斯假丝酵母对底物、盐、高温冲击的耐受性,发现适应性驯化获得的克鲁斯假丝酵母可以耐受 200 g/L 的葡萄糖,其在水中的发酵能力显著优于淡水发酵,通过热冲击和亚硫酸钠的诱导,甘油产量得到了提高;使用巨菌草酶解液进行发酵,葡萄糖生成甘油及乙醇的总转化率可达 0.45 g/g,表明该菌具有直接利用复杂的木质纤维素酶解液的能力,并具有较强的耐受性。

植物蛋白激酶是参与逆境胁迫应答的重要调控蛋白。蛋白激酶分子上的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸通过磷酸化和去磷酸化,调控下游信号传递,进而介导胁迫响应。植物蛋白激酶参与的逆境胁迫主要有高光、高盐、干旱、低温、营养匮乏等。李旺宁等^[241]研究了莱茵衣藻中丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在蓝光胁迫下的应答机制。发现在蓝光胁迫下,莱茵衣藻中失活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶导致光合作用、碳代谢和色素合成相关基因显著上调,表明该蛋白激酶的缺失加快了光合电子传递,增强了光合作用和碳代谢水平。这不仅揭示了藻类光胁迫应答机制,也为提高微藻细胞工厂生产能力提供了新的调控元件。

超低温保存法通过使用适宜的冻存保护剂和冷冻程序将细胞降至极低温度以保持其活性和功能,但冰晶形成和再结晶是主要挑战;近年来,微纳米材料和生物技术工具的发展为抑制冰晶提供了新方法。许森等^[242]通过制备不同尺寸和形貌的微纳米粒子,评估了它们对细胞生物相容性和冷冻保存性能的影响。结果表明,碳复合体微粒和金纳米粒子在低浓度下具有良好的生物相容性,且能显著提高细胞冷冻复苏后的存活率。相比于球形结构的碳复合体微粒,

不对称纳米粒子和纳米花材料展现出更优异的细胞冻存保护效果，并能与商用冷冻保护剂联合使用，进一步提升细胞冻存效果，显示出较好的应用潜力。

木质纤维素的生物降解和转化利用

来自反刍动物瘤胃的厌氧真菌是降解植物纤维的重要菌种资源。瘤胃厌氧真菌主要分泌碳水化合物活性酶，如纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶和酯酶，用于植物细胞壁的降解。分离的厌氧真菌可以用于体外发酵提高粗饲料利用率，或作为青贮饲料添加剂帮助动物改善对摄入饲料的干物质消失率。研究发现，在葡萄糖诱导条件下，牦牛瘤胃源厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 的羧甲基纤维素酶、微晶纤维素酶、滤纸酶和木聚糖酶等活性升高，同时乙酸比例显著升高^[243]。这表明通过一定的底物诱导，厌氧真菌的底物降解能力可以得到提高，其代谢产物如乙酸的变化更有利于奶牛乳脂率的提升。

在木质纤维素降解过程中，木聚糖酶和 β -木糖苷酶负责水解半纤维素。木聚糖酶将木聚糖水解为木寡糖、木二糖等低聚木糖， β -木糖苷酶进一步将低聚木糖水解为木糖。但是，目前发现的 β -木糖苷酶与木糖的亲合力较高，容易受到产物木糖的反馈抑制，严重限制了其催化效率。因此，挖掘具有高木糖耐受性的 β -木糖苷酶对木质纤维素生物转化应用具有重要价值。李乐等^[244]从茶梗培养的黑曲霉胞外酶液中发现了一个高活性的 β -木糖苷酶。通过分子对接发现该酶与木糖的亲合力较低，预示其木糖耐受性较好。酶学表征证明该酶较其他同为 GH3 家族的 β -木糖苷酶木糖耐受性更高。同时，该酶具有很好的温度稳定性和 pH 稳定性，是

一个非常有应用潜力的 β -木糖苷酶资源。

β -葡萄糖苷酶属纤维素分解酶系中的一类酶，能够水解 β -葡萄糖苷键并释放出葡萄糖，应用于生物燃料、制药、食品、饲料和纺织等领域。 β -葡萄糖苷酶的应用环境比较复杂，常面临溶剂胁迫、盐胁迫、高温胁迫和产物抑制等情况，因此挖掘耐受性强、酶活稳定的 β -葡萄糖苷酶资源非常关键。何金见等^[245]对嗜酸古菌来源 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶进行了异源表达和酶学性质研究；发现该酶的最适温度为 55 °C，最适 pH 为 5.5，在 pH 5.5–11.0 范围内具有较好的稳定性。同时，该酶对金属离子、乙醇等有机溶剂、NaCl 和葡萄糖均具有很好的耐受性，表明其具有较强的工业应用潜力。

木糖是木质纤维素中含量仅次于葡萄糖的第 2 大可发酵糖，构建高效代谢木糖的微生物细胞工厂对木质纤维素的充分利用具有重要意义。与葡萄糖相比，微生物对木糖的代谢能力较弱，加之存在葡萄糖对木糖的碳分解代谢物抑制效应(carbon catabolite repression, CCR)，限制了木质纤维素原料的利用。目前，大多数针对木糖利用的研究聚焦于如何实现木糖和葡萄糖的共利用，主要有 3 种改造策略^[246-247]。策略一是改造糖转运系统，提高木糖利用能力。一方面，通过阻断葡萄糖磷酸转移酶系统，进而削弱 CCR，解除葡萄糖对木糖转运和代谢过程的阻遏。其次，通过提高木糖转运和代谢相关基因的表达水平，进一步提高木糖的摄取和利用效率。策略二是开发共培养体系，利用代谢途径区室化缓解 CCR 抑制。通过构建专一利用葡萄糖和专一利用木糖的工程菌株，进行共培养，葡萄糖和木糖代谢互不干扰，还能将复杂的代谢模块划分到两种菌株中，减轻代谢负担。策略三是构建平行代谢途径，解耦代谢通

路。将一种碳源如葡萄糖专门用于目标产物的生产,而另一种碳源如木糖专门用于细胞生长,避免了两种底物的代谢交叉。虽然工程菌株已实现木糖和葡萄糖的共利用,但在利用木质纤维素原料过程中还会面临一个问题,即木质纤维素水解液中存在大量有毒物质,严重抑制细胞生长代谢。为此,部分研究探索了外源添加解毒剂或构建内源解毒系统来提高微生物对水解液的耐受性。下一步可结合适应性实验室进化,进一步提高木糖-葡萄糖共利用菌株的代谢速率,以及提高对木质纤维素水解液的耐受性^[247]。

一碳生物技术

地质层为二氧化碳封存提供了巨大空间和反应环境。在地质层中,部分微生物可以通过生物甲烷化、生物液化、生物矿化等生物活动过程,将 CO₂ 转化为甲烷、有机酸和碳酸盐,从而实现 CO₂ 的资源化利用和长久固定^[248]。因此,微生物地质封存二氧化碳是一条重要的生物减碳和负碳途径。生物甲烷化在产甲烷菌的作用下,通过 CO₂ 还原型产甲烷途径,将 CO₂ 转化为甲烷。目前,能量供应不足限制了生物甲烷化的效率,研究人员提出可利用地质层中低价态天然铁化物或生物电化学系统作为电子来源。CO₂ 生物液化由同型产乙酸菌主导,经生物固碳反应,将 CO₂ 转化为乙酸、丙酮酸等有机物质,这些有机酸物质可作为地质微生物生长代谢的底物。CO₂ 生物矿化是在微生物作用下,环境 pH 升高,CO₂ 溶解形成 CO₃²⁻,与金属离子形成碳酸盐固体的过程。在此过程中,微生物细胞表面的负电官能团能够吸引金属离子富集,从而以细胞作为成核点,促进碳酸盐矿物的生成。CO₂ 生物矿化已用于去除超标重

金属、修补混凝土裂缝、修复破损文物等实际场景。微生物 CO₂ 地质封存目前还处于起步探索阶段,在转化机理、转化效率、转化成本、转化工艺上还需要深入研究和长期探索。

光能是自然界固定二氧化碳的主要能量形式。构建人工光能固碳系统,对二氧化碳资源化利用具有重要价值。人工光能固碳系统主要将捕光纳米材料与固碳酶或固碳微生物相结合,可分为酶杂合系统和生物杂合系统^[249]。在酶杂合系统中,光生电子通过直接电子传递或辅因子介导转移到酶活性中心。直接电子传递理论效率更高,但目前可以将光生电子直接转移到反应中心的固碳酶较少。为了增强酶杂合系统中酶的稳定性,可以采用不同的固定化方法对酶形成保护作用,如多孔涂层固定化、仿生微囊膜固定化。生物杂合系统相比酶杂合系统具有更高的稳定性,但代谢网络复杂、还原力和能量供应不足。杂合系统目前主要应用于转化二氧化碳生产一碳化合物、生物燃料以及食品等高附加值化学品,但产率非常低。要进一步增强杂合系统的光能捕获效率,提高界面电子传递效率,改善杂合系统的生物相容性和鲁棒性。

一碳气体(包括 CO、CO₂ 和 CH₄)的微生物转化是温室气体减排的重要途径。天然能够利用一碳气体的微生物主要有甲烷营养菌、合成气发酵微生物、氢营养菌等^[250]。甲烷营养菌以 CH₄ 作为唯一的碳源和能量进行生长,可分为好氧甲烷营养菌和厌氧甲烷营养菌,代谢产物有甲醇、乙醇、乙酸和乳酸等。合成气发酵微生物以 CO₂、CO 或 H₂ 作为碳源和能量,代谢产物以乙酸、乙醇、丁酸为主。氢营养菌是一类化能兼性自养微生物,既可以在有机碳源上生长,还可以使用 H₂ 作为能源,CO₂ 作为碳源,通过氢气的快速氧化获得同化所需的能量。近

年来, 研究人员开发了一系列基因工程改造技术用于基因失活、DNA 大片段插入, 实现了对相关微生物的代谢工程改造, 提高了转化通量, 扩大了产物谱。虽然针对一碳气体利用微生物的研究取得了一定进展, 但依然存在底物利用速率慢、产物得率低、产物单一等不足。

利用一碳气体合成油脂类化学品在生物制造领域备受关注。天然可以利用一碳气体合成油脂的微生物主要有好氧性嗜甲烷菌、微藻和产乙酸菌^[251]。其中, 好氧性嗜甲烷菌以 CH_4 为碳源合成丙二酰辅酶 A, 随后通过脂肪酸合酶复合体催化, 合成长链脂酰酰基载体蛋白即 ACP。脂酰 ACP 在磷脂酶的水解作用下释放游离脂肪酸。嗜甲烷菌内膜与核心代谢相关联, 但其合成的磷脂是功能性脂质, 积累有限。微藻以 CO_2 为底物, 经肯尼迪途径或 PDAT 途径合成甘油三酯。微藻油脂类化学品种类丰富, 包括游离脂肪酸、脂肪醇、烷烃、甘油二酯、甘油三酯等。微藻具有光合效率高的优势, 但在大规模培养中面临生产成高等问题。产乙酸菌以 CO 为底物, 通过 WL 途径合成乙酰辅酶 A, 进而生产脂肪酸和脂肪醇等化合物。将光能或电能与产乙酸菌耦合, 可以促进 CO 的转化和产物形成。

目前, 通过热化学和电化学技术将 CO_2 转化为简单低碳(C_{1-3})化合物的研究已取得巨大进展。将 CO_2 衍生的 C_{1-3} 化合物作为发酵原料, 通过微生物细胞工厂生产碳水化合物、蛋白质等粮食类化合物, 是一条极具价值的 CO_2 资源化路线。近 5 年来, 该技术路线取得了多项重大突破性进展, 比如利用 CO_2 人工合成淀粉、利用 CO_2 直接合成葡萄糖与脂肪酸等, 体现了该技术路线在保障粮食安全、促进经济社会低碳发展方面的重要意义。除合成葡萄糖和淀粉外, 该技术路线在合成糖类衍生物和单细胞蛋

白等方面也取得了许多进展^[252]。糖类衍生物包括氨糖、肌醇、甘露糖、木糖醇等。未来还需进一步提高微生物对低碳原料的转化效率、转化率, 以期实现产业化应用。

酶催化 CO_2 合成甲酸、甲醇等一碳中间体是 CO_2 生物转化的重要途径。甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)、甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase, FADH)和醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)是 CO_2 生物法制备甲酸/甲醇的 3 个关键酶。通过酶的固定化, 可以提高酶的稳定性和重复利用率, 解决多酶级联反应体系中催化效率低的问题。目前应用于 CO_2 生物转化关键酶固定的载体主要有膜、无机材料、金属有机框架(MOF)和共价有机框架(COF)等^[253]。除了固定作用, 膜材料还可以降低气液传质阻力, 提高 CO_2 传质效率; 部分 MOF 材料可以促进底物 CO_2 的吸附, 从而推动反应的进行。此外, 将固定化酶与电化学系统或光敏剂结合, 构建酶-电耦联或酶-光耦联 CO_2 反应体系, 为反应过程直接提供电子或还原性辅酶, 可以提高酶的催化效率, 降低辅酶带来的高昂成本。

将 CO_2 转化为乙酸是 CO_2 资源化利用的重要途径。在自然界中, 产乙酸菌能够利用 H_2 和 CO_2/CO 进行自养生长, 主要产物为乙酸, 因此产乙酸菌是 CO_2 生物转化的重要微生物底盘。常用的产乙酸菌有永达尔梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)、自产醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)、食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)、拉格斯代尔梭菌(*Clostridium ragsdalei*)、克萨氏梭菌(*Clostridium coskatii*)和伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*)等^[254]。产乙酸菌通过 Wood-Ljungdahl 固碳途径将碳一气体转化为乙酸, 并通过电子歧化反应偶联氧化和还原反应, 最大限度减少能量损失。目前在

产乙酸菌中已开发出一系列遗传改造技术, 如外源 DNA 转化技术、穿梭载体技术、基因编辑技术, 并用于改造固碳途径、扩大产物谱等。其他方面, 通过优化反应器设计, 控制发酵工艺也可以显著提升产乙酸菌的气体发酵效率。考虑碳原子经济性, 将气体发酵与电化学系统或生物电化学系统耦合, 可以提高碳原子的转化率。

甲醇是重要的一碳原料, 来源丰富、价格低廉。强还原性使甲醇比葡萄糖、甘油以及其他一碳化合物具有更高的能量, 有利于细胞生长和生物合成。甲醇的生物利用可分为两个步骤: 一是甲醇氧化为甲醛, 二是甲醛同化为生物物质。甲醇氧化成甲醛由甲醇脱氢酶 MDH 或醇氧化酶 AOX 完成^[255]。根据辅酶不同, MDH 又分为 PQQ 依赖型和 NAD⁺依赖型, 而 AOX 为 O₂ 依赖型。甲醛同化为生物物质有 3 种代谢途径, 包括核酮糖单磷酸途径(RuMP)、丝氨酸途径和木酮糖单磷酸途径(XuMP), 前两条途径主要存在于原核生物中, XuMP 途径主要存在于酵母中。在天然甲基营养菌研究方面, 目前已开发了不同产物的细胞工厂, 主要有萜类化合物、聚羟基脂肪酸、有机酸、脂肪酸、氨基酸和醇类。受限于有限的基因编辑工具, 近年来甲醇生物利用研究更多聚焦到合成甲基营养菌方面。采用的代谢工程底盘有大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌和酿酒酵母。无论是天然甲基营养菌还是合成甲基营养菌, 甲醇生物转化都面临甲醇氧化速率不够快、甲醇异化比例高导致产物得率低等共性问题。线性化甲醛同化途径可能是提高甲醇同化率的重要方向, 但催化效率还有待大幅提高。

相比非天然甲醇细胞工厂, 天然甲醇营养菌在甲醇利用效率方面具有显著优势, 短期内更有可能实现产业化。天然甲醇营养菌主要有

甲醇芽孢杆菌、扭脱甲基杆菌等细菌, 以及巴斯德毕赤酵母和多形汉逊酵母等。通过这些微生物中引入化学品合成途径, 可以获得高效代谢甲醇的细胞工厂。然而, 天然甲醇细胞工厂存在甲醇同化率低这一根本问题, 限制了化学品生产得率。其次, 相比糖类原料, 甲醇利用效率还可以进一步提升。目前针对天然甲醇细胞工厂的研究主要有: 开发高效基因编辑技术、弱化甲醇异化途径、加强甲醇同化途径、与其他碳源共底物利用和适应性进化等^[256]。整体来看, 天然甲醇细胞工厂距离产业化还有一定距离。

生物电子转移与生物氧化还原

细菌表面有一些突出的纤维结构, 主要包括菌毛、淀粉样纤维和纳米线。其中, 菌毛是一种线状结构聚合物, 由共价或非共价相互作用的重叠菌毛亚基组成, 广泛存在于革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌及古细菌中。IV 型菌毛 (type IV pili, TFP) 可以通过 ATP 驱动其反复伸展、黏附和收缩, 参与细胞运动、细胞黏附、生物被膜形成、辅助摄取细胞外 DNA 和电子传递等不同的生理功能^[257]。作为一种分子机器, TFP 还可以跨越两层革兰氏阴性菌膜, 每秒完成约 1 000 个亚单位的伸展和收缩, 并以纳米级(6–9 nm)的亚细胞结构承受超过 100 pN 的力^[258-259]。DNA 摄取是 TFP 的保守功能, 但由于 TFP 的复杂结构, 目前还未能实现 TFP 对 DNA 摄取功能的异源重构。TFP 还能在细胞和细胞外电子受体间传递电子。最著名的例子是硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)。该菌的菌毛能够将电子从细胞表面转移到氧化物表面, 具有“金属样”导电性, 且这种导电性可能主要与 TFP 负载的细胞色素相关。若通过基因编辑改变 TFP 的结构和组成, 可以产生功能多

样的生物纳米线，用于纳米线传感装置，在细胞之间或细胞与传统电子设备之间建立电子连接，从而实现新的生物电子应用。

希瓦氏菌广泛存在于土壤、地下水、活性污泥、海洋沉积物等缺氧或还原环境中，参与了重要的生物地球化学循环过程，是研究微生物胞外电子传递、开发生物电催化系统的模式菌株。希瓦氏菌在固体表面可自发形成电活性生物被膜，其在细胞电子传递和物质交换中发挥着重要作用。电活性生物被膜的形成主要经历黏附和原位增殖过程，由浮游细胞逐步演化为细胞聚集体。影响希瓦氏菌生物被膜形成的因素主要有：电极材料、胞内代谢水平、外源电子介质、环境信号等^[260]。这些因素也成为人工调控生物被膜的重要参考。成熟的电活性生物被膜在微生物电池、微生物电合成、纳米材料合成、环境修复等领域有着广泛的应用。

电活性微生物通过双向跨膜电子传递实现化学能与电能之间的相互转化，在生物电池、环境修复、生物制造等领域具有应用潜力。然而，纯培养电活性微生物体系底物谱窄、电子传递效率低、稳定性差、功能单一，限制了其应用范围。近年来，人工电活性微生物菌群受到关注。人工电活性菌群由电活性微生物和非电活性微生物组成，基于劳动分工原则，通过物质、能量的级联代谢，可以有效拓宽电活性微生物的底物谱、提高整体电子传递效率、增强系统稳定性，并拓宽电活性微生物的应用边界。张保财等^[261]从设计原理、构建策略与应用实例方面系统总结了近年来人工电活性微生物菌群的研究进展，介绍了生物-非生物界面电子传递、微生物-微生物种间电子传递机制，重点阐述了菌群分工和级联设计、菌群生态位优化与控制策略。人工电活性微生物菌群在利用廉价生物质产电、生物光伏产电、光电驱动固碳/

固氮等方面展现了优势，具有较大的开发价值。未来可利用适应性共进化策略强化菌群内部协调，加强器件开发提高人工菌群性能。

微生物胞外电子传递催生了微生物电化学技术(microbial electrochemical technology, MET)的发展。MET的应用从污水处理拓展到生物脱盐、生物合成、生物产氢、生物传感和生物太阳能电池等多个领域。微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)是最早的微生物电化学系统，阴极和阳极之间的电子传递由电阻分隔。微生物电化学呼吸管(microbial electrochemical snorkels, MES)是一种短路的 MFC，阴极和阳极之间没有明确的物理界限^[262]。如早期的呼吸管大多使用石墨棒，阳极端插入活性污泥或沉积物中，阴极端暴露于废水或上覆水中。相比 MFC，MES结构简单、成本低。它既不产生电能也不消耗电能，但具有比 MFC 更小的电子传递阻力，电子传递效率高。MES 主要应用于环境污染治理方面，如有机污染物降解、氮硫元素转化、重金属回收。MES 也在实地应用中取得了一定效果，如西班牙 MES 系统可以处理 25 m³ 生活污水，出水可满足欧盟城市污水标准。MES 在生物电合成、温室气体减排等方面的潜力也有待开发。

生物环保

微生物脱氮是将氨氮化合物转换为氮气排放到空气中，涉及氮原子多种价态的互变，是一个十分复杂的过程。微生物脱氮路径主要有好氧反硝化、同步硝化反硝化、短程硝化反硝化、厌氧氨氧化和直接氨氧化^[263]。这些路径涉及到的氮转化反应包括硝化、反硝化、厌氧氨氧化、氨化、硝酸盐异化成铵和直接氨氧化等。参与上述反应的酶主要有氨单加氧酶、羟胺氧化还原酶、亚硝酸盐氧化还原酶、硝酸还原酶、

亚硝酸盐还原酶、一氧化氮还原酶、一氧化二氮还原酶、脒合成酶等。由于污染物种类和代谢反应复杂,单一微生物难以完成整个脱氮过程,采用人工多细胞体系进行脱氮更具优势。人工多细胞体系通过代谢协同、能量耦合和微环境协调,能够建立起相对稳定的共生体系。目前,脱氮人工多细胞体系多是基于自上而下方法建立的,通过富集培养、人工选择和定向进化,获得脱氮性能稳定的人工菌群。通过自下而上方法构建人工多细胞体系的例子还比较少,主要受限于纯培养物种较少、鲁棒性不足以及菌株间相互作用关系不明确。

厌氧氨氧化是一种无需外加碳源的低能耗脱氮工艺,但存在副产物硝酸盐积累的问题。将电化学系统与厌氧氨氧化工艺结合,可以利用充足的电极电子,驱动硝酸盐和亚硝酸盐的生物电化学还原,从而强化厌氧氨氧化过程。之前的研究同时在电化学系统中接种厌氧氨氧化污泥和反硝化污泥,启动 20 余天,可以获得较高的总氮去除率。谢莱等^[264]仅利用厌氧氨氧化菌接种电化学系统,发现外电压可以富集电化学活性微生物,富集的微生物主要有反硝化菌、氨氧化菌、亚硝化菌等脱氮功能菌群,共同构成了厌氧氨氧化菌-氨氧化产电菌-反硝化噬电菌微生物群落,总氮去除率达到 97%以上,具有快速启动和脱氮强化双重优势。

异养硝化-好氧反硝化(heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, HN-AD)菌是一类可以在低温低碳条件下脱氮的微生物,尤其在 2-15 °C 低温条件下保持较高的脱氮速率^[265]。HN-AD 菌通常需要固定化进行富集,以在水处理系统中成为优势菌种。为长期保持其优势菌种地位,可采用固体碳源作为固定化材料。常见的固体碳源有 3-羟基丁酸酯-co-3-羟基戊酸酯(PHBV)、聚己内酯(PCL)、聚丁二酸丁二醇酯

(PBS)和聚乳酸(PLA)。阐明 HN-AD 菌对固体碳源的代谢机制,有助于设计更合适的固定化材料,提高其富集水平。刘欢等^[265]研究了 HN-AD 菌不动杆菌 TAC-1 在基因水平上的碳水化合物代谢通路,证实 TAC-1 菌株存在糖酵解途径、磷酸戊糖途径、乙醛酸循环和三羧酸循环,揭示了 TAC-1 利用 PHBV 的代谢途径为:PHBV 通过磷酸戊糖转化为葡萄糖酸,后者通过糖酵解途径生成乙酰辅酶 A,并进入三羧酸循环氧化产生 CO₂。这将为开发基于 HN-AD 和固体碳源的脱氮新工艺提供依据。

厌氧颗粒污泥是由微生物、无机矿物及胞外多聚物聚集形成的固定化聚集体^[266]。由于具有良好的沉降性能和相对稳定的微生物代谢活性,厌氧颗粒污泥广泛应用于工业废水处理,尤其是高浓度有机废水的厌氧消化。厌氧颗粒污泥是一个复杂的小型生态系统,常见的微生物门类有绿弯菌门、变形菌门、拟杆菌门及厚壁菌门。其中,绿弯菌门作为网状结构被其他微生物包围,促进厌氧颗粒污泥的形成和稳定;变形菌门主要与小分子化合物的代谢有关;拟杆菌门中主要有产酸细菌、发酵细菌和蛋白质水解细菌,在有机物分解和酸化过程中起重要作用;厚壁菌门与复杂聚合物的降解有关,是厌氧消化过程前期的主要参与者。除细菌外,产甲烷古菌也是厌氧消化反应器中的常见微生物,在厌氧污泥颗粒化中发挥重要作用。微生物在厌氧颗粒污泥中的空间分布具有一定的异质性,比如中温条件下形成的厌氧颗粒污泥具有 3 层异质空间结构,外层主要由产酸菌和氢营养型产甲烷菌组成;中间层主要由产乙酸菌、氢营养型产甲烷菌以及乙酸营养型产甲烷菌组成;内层则以球状乙酸营养型产甲烷菌为主。整体看,空间分层呈现出一定的氧化还原梯度和溶质渗透梯度。当然,厌氧颗粒污泥的微生物

物组成和空间分布变化较大,主要受接种源、有机负荷、剪切力、温度等因素的影响。随着对厌氧颗粒污泥微生物群落结构和功能研究的深入,有望发展出人工调控技术,保障厌氧颗粒污泥反应器的高效稳定运行。

在南方离子型稀土开采过程中,需要向山体注入大量 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,闭矿后产生高浓度氨氮尾水。据统计,开采1 t 稀土将产生约2万 t 稀土尾水,造成严重的水体污染。微藻可以直接吸收太阳光、利用空气中 CO_2 进行生长。因此利用微藻进行生物修复无需补充有机碳源,成本低,但目前研究多处于实验室水平。郭旭等^[267]近期报道了利用微藻中试反应器户外处理稀土氨氮尾水的能力;使用的藻株为稀土氨氮尾水中分离到的衣藻,反应器分别为50 L 柱式光生物反应器和 5 m^3 开放式跑道池光生物反应器;结果表明,衣藻在柱式光生物反应器中具有更好的修复性能,氨氮去除率约25%。对藻粉成分分析发现,生物修复获得的藻粉富含蛋白质和油脂,必需氨基酸指数显著高于大豆蛋白。该中试处理工艺兼具污水处理、生物固碳和饲料开发价值。

芳香化合物如苯、甲苯、多环芳烃等污染物对人体健康和生态环境造成了严重威胁。灵敏监测和高效治理是污染物防控的主要目标。针对芳香化合物的传统检测方法如色谱法依赖于大型仪器设备,成本高、操作复杂,而微生物全细胞传感器可以实现原位检测,成本低、操作简单。因此,全细胞传感器是芳香化合物检测的重要方式。基于工作原理,芳香族化合物全细胞传感器可分为3种类型,包括电活性生物膜型、转录因子型和降解基因启动子依赖型^[268]。电活性生物膜型以电活性生物被膜为感应元件,芳香族化合物存在时,作为电子供体引起胞外电信号变化。转录因子型又分为正调

控型和负调控型,前者涉及的转录因子包括NtrC、AraC、LysR 和IcIR 等家族,后者涉及的转录因子包括MarR、TetR 和GntR 家族。这些转录因子能够被芳香族化合物诱导,进而调控下游报告基因的表达。为提高全细胞传感器性能,研究人员应用了表面展示技术、逻辑门基因线路构建、群体感应信号放大等策略。

多环芳烃等芳香族化合物是造成环境污染的重要源头。微生物修复通过将污染物吸附、转运到细胞内进行降解,是处理环境污染的重要方法。能降解芳香族化合物的微生物主要有不动杆菌属、产碱杆菌属、红球菌属、假单胞菌属、分枝杆菌属、棒状杆菌属和芽孢杆菌属等。由于芳香族化合物疏水性较强,吸附和转运是限制微生物修复的主要因素^[269]。为此,部分微生物通过分泌表面活性剂增强污染物与细胞表面的相互作用,也可以人工添加表面活性剂提高化合物的溶解度,从而促进吸附过程。另外,部分微生物通过形成生物被膜,降低难溶化合物的传质限制,进而扩大细菌与污染化合物的接触界面,提高生物利用度。在转运阶段,微生物通过FadL 家族、TonB 依赖性受体蛋白、OmpW 家族等外膜通道蛋白,以及MFS 超家族和ABC 转运蛋白超家族等内膜通道蛋白,共同将吸附至表面的化合物转运到细胞内,进入生物降解过程。

1,4-二噁烷是一种新型水体污染物,属于2B 类潜在致癌物质,在工业上主要用作稳定剂、溶剂、增塑剂和净化剂。由于高水溶性和低辛醇水分配系数,1,4-二噁烷在土壤中难以滞留,会迅速扩散至地下水中,世界卫生组织将其在饮用水中的指导限值定为 $50\text{ }\mu\text{g/L}$ 。微生物降解是去除1,4-二噁烷的关键技术,前提是发掘强环境适应性的高效降解菌株。张玥等^[270]从1,4-二噁烷污染的地下水中富集分离到一株

高效降解菌株，鉴定为解脲脲杆菌。该菌株能在 1 d 内完全降解 200 mg/L 的 1,4-二噁烷，在低温、低 pH 条件下仍能保持高效降解活性。基因组分析发掘了其关键降解基因是丙烷单加氧酶基因簇和醇脱氢酶基因。该菌株不仅扩充了 1,4-二噁烷降解的微生物资源库，也非常有潜力在实际污染水体中应用。

石油污染对全球生态环境造成了恶劣影响，如降低土壤肥力、减少生物多样性、污染海洋与地下水以及威胁人类健康等。微生物修复利用微生物的降解能力将石油污染物分解为无害或低毒性的物质，是一种减污降碳的绿色修复方式。分子生物学技术，如扩增子技术和多组学技术，在挖掘石油降解微生物资源、解析石油降解微生物菌群、研究微生物功能和相互作用关系等方面发挥了重要作用^[271]。微生物修复通常与其他技术相结合提高修复效率，比如使用生物表面活性剂提高石油烃的可利用性，利用生物刺激剂如电子受体激活微生物好氧或厌氧降解途径，利用固定化技术提高微生物的重复使用性，或将微生物与植物联合使用提高修复效率等。微生物修复技术的实际使用需综合考量污染物降解率、修复周期以及成本。

土壤镉污染对生态环境和人类健康造成巨大威胁，微生物在修复镉污染中的潜力也越来越受到重视。土壤镉污染的传统修复方法有翻耕、植物修复法和生物炭法，修复效果不佳。微生物通过吸附、矿化、沉淀等作用降低镉的生物有效性从而缓解镉污染，或通过促生、活化等作用促进超富集植物对 Cd^{2+} 的吸收从而达到去除土壤中 Cd^{2+} 的目的^[272]。在吸附作用方面，微生物主要是通过胞外聚合物中的负电性官能团与 Cd^{2+} 进行结合，或 Cd^{2+} 透过细胞膜运输到胞内进行积累。在矿化沉淀方面，微生物通过产生脲酶，分解土壤基质生成 CO_3^{2-} ，与

Cd^{2+} 结合产生 CdCO_3 沉淀，或者硫酸盐还原菌将 SO_4^{2-} 还原为 S^{2-} ，进而与 Cd^{2+} 结合产生 CdS 沉淀。在结合固定方面，微生物通过表达富含巯基的金属硫蛋白，可特异性结合 Cd^{2+} ，从而降低镉污染。在溶解与活化方面，微生物通过产生并释放有机酸如草酸、乳酸、乙酸到胞外，使土壤酸化，促进镉的溶解。溶解与活化作用通常与植物联合使用，活化后的 Cd^{2+} 通过超富集植物转移到植物体内，降低土壤镉含量。大多数镉污染修复微生物在土壤中的竞争力较弱，可通过添加具有多孔结构的生物炭为微生物提供生存空间，同时生物炭还可以提供营养物质促进微生物的生长。期待微生物与植物、生物炭的多重联合未来在实地污染修复中发挥作用。

天然具有镉污染修复能力的微生物多为细菌和真菌，如铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌和曲霉等^[273]。相比之下，利用光合自养藻类进行镉污染生物修复更具安全性和经济性。廖谭聪等^[274]在莱茵衣藻的细胞表面表达了镉结合蛋白 CADR，通过 CADR 对 Cd^{2+} 的特异性吸附，镉吸附量相比对照菌株提高了 33%；同时工程藻株具有更强的镉耐受性，在 200 $\mu\text{mol/L}$ 镉浓度下，工程藻株的生长速度是野生型的 3 倍。该研究为提高微藻重金属修复能力提供了思路，未来可利用其他金属特异性结合蛋白，开发出更多的微藻生物修复体系。

群集运动是细菌以群体方式在半固体表面迁移的过程，是细菌的群体行为^[275]。细菌群集运动主要由鞭毛和 IV 型菌毛介导，鞭毛通过质子或钠离子运输产生的跨膜势能驱动自身马达转动，鞭毛逆时针旋转成束，驱动细菌向前移动；IV 型菌毛是细菌表面的动态丝状附件，通过伸出和缩回影响细菌运动。细胞第二信使即环二鸟苷酸和群体感应对群集运动有重要影

响。群集运动与生物被膜、微生物扩散、病原体入侵等过程密切相关,因此群集运动在生物技术应用方面具有较大开发价值。如肠杆菌通过群集运动创造厌氧环境,有助于富集修复肠道炎症的厌氧益生菌;枯草芽孢杆菌通过群集运动在农作物根部更有效地定殖,用于刺激植物生长和预防植物病害;环境修复微生物通过趋化行为和群集运行向污染源方向移动,有助于土壤污染物的降解。

合成生物制造的风险和监管

合成生物学产品在食品制造、药物生产、基因治疗、农业增产、环境监测、新能源和新材料等不同领域落地,逐步渗透到人类生活的各个方面。合成生物学产品商业化可能对人类健康和环境安全带来新的风险,比如合成生物学组分如遗传物质可能进入人体,工程菌株扩散到环境中破坏生态平衡。针对合成生物学商品化,世界各国出台了相关监管政策,但还有待细化和完善。针对合成生物学产品商业化安全风险,曾小美等^[276]提出应进行多层次、全过程监管,包括入市前产品严格审批、分类标识、市场主体准入严格筛选审批,入市后加强安全监管,加强事故应急处理和责任追究。

光合微藻在二氧化碳封存、重金属污染处理、燃料和化学品生产等方面具有广泛应用,但同时基因工程藻株面临环境逃逸和扩散风险。特别地,工程微藻的大规模培养通常在开放环境中如池塘、海洋附近或海水中进行,加剧了扩散风险。为此,必须强化工程微藻的生物安全风险管控,并开发相应的生物风险防控技术。近年来,利用合成生物学技术开发了不同的微藻生物封存技术^[277]。在基因层面,构建了核苷酸合成酶缺陷型或必需营养缺陷型菌株;在转录层面,引入基因电路设计,通过条

件诱导启动子控制毒素/抗毒素含量;在翻译层面,引入非天然氨基酰-tRNA 合成酶,使蛋白质翻译必须依赖于人工添加的非天然氨基酸。这些防逃逸技术可以降低工程藻株的逃逸率,但可能会在菌株进化过程中失效,因此需不断开发新的生物遏制技术。

结语

本文对 2023–2024 年《生物工程学报》中合成生物制造相关的综述和学术论文进行了全面且深入的评述,内容涉及底盘细胞、基因(组)编辑等多达 26 个方面的数百种技术和产品。通过对这些论文的梳理和分析,为读者系统呈现了合成生物制造领域的研究成果和发展态势。合成生物制造作为一个新兴领域,正以科技创新为驱动力,促进生物制造产业的蓬勃发展,这无疑契合了发展新质生产力的要求,对推动新一代生物技术在工业领域的应用具有深远意义。希望本文能够助力广大读者把握合成生物制造领域的最新动态和发展趋势,激发更多科研人员在领域开展深入研究,推动相关技术的创新和突破,同时也为产业界提供有益的参考,促进合成生物制造产业的健康、快速发展,为实现经济可持续发展和社会进步贡献力量。

REFERENCES

- [1] 李寅. 合成生物制造. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1267-1294.
LI Yin. Biomanufacturing driven by engineered microbes. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1267-1294 (in Chinese).
- [2] 李寅. 合成生物制造 2022[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 807-841.
LI Yin. Biomanufacturing driven by engineered organisms (2022)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 807-841 (in Chinese).
- [3] 栾韬, 尹梦琦, 王明, 康秀龙, 赵建志, 鲍晓明. 酿酒酵母细胞器区室化合成化学品的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2334-2358.
LUAN Tao, YIN Mengqi, WANG Ming, KANG Xiulong, ZHAO Jianzhi, BAO Xiaoming. Advances in the production of chemicals by organelle

- compartmentalization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2334-2358 (in Chinese).
- [4] 钱芷兰, 宋丽丽, 刘启, 龚秀龙, 康艺嘉, 何子雨, 龙浩雨, 蔡孟浩. 非常规酵母天然产物合成[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2284-2312.
QIAN Zhilan, SONG Lili, LIU Qi, GONG Xiulong, KANG Yijia, HE Ziyu, LONG Haoyu, CAI Menghao. Biosynthesis of natural products by non-conventional yeasts[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2284-2312 (in Chinese).
- [5] 刘宇飞, 曹颖, 常立业, 单聪慧, 徐坤. 毕赤酵母细胞工厂工程化改造与应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4376-4396.
LIU Yufei, CAO Ying, CHANG Liye, SHAN Conghui, XU Kun. Engineering and application of *Komagataella phaffii* as a cell factory[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4376-4396 (in Chinese).
- [6] 高琦豆, 董亚琦, 黄颖, 刘懿娟, 杨晓兵. 圆红冬孢酵母基因编辑及天然产物合成的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2313-2333.
GAO Qidou, DONG Yaqi, HUANG Ying, LIU Yijuan, YANG Xiaobing. Advances in gene editing and natural product synthesis of *Rhodotorula toruloides*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2313-2333 (in Chinese).
- [7] 孔维华, 尤文晋, 江贤章, 黄建忠, 秦丽娜. 菌丝形态发育: 丝状真菌细胞工厂遗传改造的新切入点[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1776-1791.
KONG Weihua, YOU Wenjin, JIANG Xianzhang, HUANG Jianzhong, QIN Lina. Filamentous morphology: a new frontier for genetic modification of filamentous fungal cell factories[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1776-1791 (in Chinese).
- [8] 卜瑞红, 杨志恒, 李子龙, 张国建, 王为善. 热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 NCIMB 11955 高效电转感受态细胞电转体系的建立[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3508-3519.
BU Ruihong, YANG Zhiheng, LI Zilong, ZHANG Guojian, WANG Weishan. Development of highly efficient electrocompetent cells for electroporation of *Geobacillus thermoglucosidarius* NCIMB 11955[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3508-3519 (in Chinese).
- [9] 张婷, 孙绘梨, 齐凤霞, 毛绍名, 栾国栋, 吕雪峰. 嗜热蓝细菌高温适应机制及生物技术应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1752-1775.
ZHANG Ting, SUN Huili, QI Fengxia, MAO Shaoming, LUAN Guodong, LÜ Xuefeng. High-temperature adaptation mechanisms and biotechnological potentials of thermophilic cyanobacteria[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1752-1775 (in Chinese).
- [10] 陈霄, 王百龙, 魏东. 叶绿素合成缺陷型小球藻突变株的选育及其蛋白产能和品质评价[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1247-1259.
CHEN Xiao, WANG Bailong, WEI Dong. Breeding of *Chlorella* mutants deficient in chlorophyll synthesis and evaluation of its protein yield and quality[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1247-1259 (in Chinese).
- [11] 樊祥瑞, 王俊燕, 梁丽亚, 刘嵘明. 基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因编辑与调控技术[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2449-2464.
FAN Xiangrui, WANG Junyan, LIANG Liya, LIU Rongming. Multiplex gene editing and regulation techniques based on CRISPR/Cas system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2449-2464 (in Chinese).
- [12] 马宝霞, 崔婕妤, 钱泓润, 张潇筠, 杨森, 张骐镜, 韩艺帆, 张智英, 王建刚, 徐坤. 一种新型的 CRISPR/Cas9-hLacI 双链 DNA 供体适配基因编辑系统[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4204-4218.
MA Baoxia, CUI Jieyu, QIAN Hongrun, ZHANG Xiaojun, YANG Sen, ZHANG Qijing, HAN Yifan, ZHANG Zhiying, WANG Jiangan, XU Kun. A novel CRISPR/Cas9-hLacI donor adapting system for dsDNA-templated gene editing[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4204-4218 (in Chinese).
- [13] 李荣平, 李荣春. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在食用菌中的应用现状[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 988-1001.
LI Rongping, LI Rongchun. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in edible fungi: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 988-1001.
- [14] 钟静丽, 林健香, 周建奎, 乔云波. 碱基编辑系统的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1271-1292.
ZHONG Jingli, LIN Jianxiang, ZHOU Jiankui, QIAO Yunbo. Advances in base editing systems[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1271-1292 (in Chinese).
- [15] 谢焕增, 黄凌泽, 罗焯, 张桂珊. 基于多尺度卷积神经网络的 CRISPR/Cas9 脱靶预测方法[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 858-876.
XIE Huanzeng, HUANG Lingze, LUO Ye, ZHANG Guishan. Prediction of CRISPR/Cas9 off-target activity using multi-scale convolutional neural network[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 858-876 (in Chinese).
- [16] 李杰奕, 佟函泽, 吴毅. 酵母基因组大尺度遗传操纵工具研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2465-2484.
LI Jieyi, TONG Hanze, WU Yi. Tools for large-scale genetic manipulation of yeast genome[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2465-2484 (in Chinese).
- [17] 吴雨薇, 姜卫红, 顾阳. 微生物大片段 DNA 染色体整合技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 842-857.
WU Yuwei, JIANG Weihong, GU Yang. Chromosomal integration of large DNA fragments in microorganisms: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 842-857 (in Chinese).
- [18] 饶欣悦, 崇金阳, 贺诚, 毕莹莹, 唐刚敏, 吕育财, 龚大春, 杨潇. 多片段酶切/连接反应结合同源重组的 DNA 组装方法[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1559-1570.
RAO Xinyue, CHONG Jinyang, HE Cheng, BI Yingying, TANG Gangmin, LÜ Yucai, GONG Dachun, YANG Xiao. DNA assembly by multi-fragment digestion/ligation and homologous recombination[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1559-1570 (in Chinese).
- [19] 乔黎黎. 生命领域重大科技基础设施发展特征、问题与对策[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2968-2982.
QIAO Lili. Development characteristics, problems and countermeasures of major scientific and technological infrastructures in the field of life sciences[J]. Chinese

- Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2968-2982 (in Chinese).
- [20] 杨雁婷, 邓吉楠, 杨军. 基于微流控芯片的人工细胞研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2100-2119. YANG Yanting, DENG Jinan, YANG Jun. Advances in artificial cells based on microfluidic chips[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2100-2119 (in Chinese).
- [21] 高欣茹, 许文涛. 刺激响应型脂质体的构建策略及其生物学应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1742-1751. GAO Xinru, XU Wentao. Construction strategy of stimuli-responsive liposome and its biological application[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1742-1751 (in Chinese).
- [22] 丁翊捷, 李彩玉, 张师音, 葛胜祥. 单个生物纳米颗粒分析技术与应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1352-1364. DING Yijie, LI Caiyu, ZHANG Shiyin, GE Shengxiang. Detection and analysis technologies for single biological nanoparticles[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1352-1364 (in Chinese).
- [23] 姚夏, 胡潇予, 王晓祺, 葛璟燕. 无细胞系统在 CRISPR 技术和生物传感器中的应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 86-102. YAO Xia, HU Xiaoyu, WANG Xiaoqi, GE Jingyan. Application of cell-free transcription and translation system in CRISPR technologies and the associated biosensors[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 86-102 (in Chinese).
- [24] 付生伟, 金帆. 若干裂解基因盒子的表征及应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1142-1162. FU Shengwei, JIN Fan. Characterization and application of several lysis cassettes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1142-1162 (in Chinese).
- [25] 赵黎丽, 苏炳恺, 杜妹妹, 丁文婷, 刘熔增. 酵母表面展示技术应用的最新进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4358-4375. ZHAO Lili, SU Bingkai, DU Shushu, DING Wenting, LIU Rongzeng. Advances in the application of yeast surface display technology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4358-4375 (in Chinese).
- [26] 尚怡彤, 金奇, 黄慧, 秦坤海, 闫欢欢, 胡志宏. 荧光标记米曲霉细胞器菌株构建及细胞器形态观察[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2998-3010. SHANG Yitong, JIN Qi, HUANG Hui, QIN Kunhai, YAN Huanhuan, HU Zhihong. Construction of *Aspergillus oryzae* strains with organelles labeled with fluorescence and observation of organelle morphology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2998-3010 (in Chinese).
- [27] 肖路遥, 石婷婷, 王苏滢, 赵庆尧, 李伟. 副干酪乳酪杆菌 ZY-1 内源性质粒分析及其表达系统的构建与应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1217-1231. XIAO Luyao, SHI Tingting, WANG Suying, ZHAO Qingyao, LI Wei. Analysis of endogenous plasmids in *Lactocaseibacillus paracasei* ZY-1 and development of expression vectors[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1217-1231 (in Chinese).
- [28] 李飞旋, 倪磊, 金帆. 铜绿假单胞菌中快速基因操作工具的开发和应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1789-1803. LI Feixuan, NI Lei, JIN Fan. Development and application of a rapid gene manipulating toolbox for *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1789-1803 (in Chinese).
- [29] 张莹莹, 舒坤贤, 常乘. 基于数据非依赖采集的以肽为中心分析算法和软件的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3579-3593. ZHANG Yingying, SHU Kunxian, CHANG Cheng. Advances of peptide-centric data-independent acquisition analysis algorithms and software tools[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3579-3593 (in Chinese).
- [30] 朱凌宣, 崔鑫, 胡善桐, 王诗卉, 张桂敏. 毕赤酵母全蛋白质组信号肽及分泌蛋白分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 834-846. ZHU Lingxuan, CUI Xin, HU Shantong, WANG Shihui, ZHANG Guimin. Analysis of signal peptides and secreted proteins in the whole proteome of *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 834-846 (in Chinese).
- [31] 贡光杰, 王洁, 张腾汉, 李庆勇, 孙漩嵘. 基于微流控芯片集成电阻抗传感在细胞检测中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1792-1805. GONG Guangjie, WANG Jie, ZHANG Tenghan, LI Qingyong, SUN Xuanrong. Research progress of integrating electrical impedance sensors with microfluidic chips in cell detection[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1792-1805 (in Chinese).
- [32] 蒲伟, 陈久洲, 王钰, 郑平, 孙际宾. 氨基酸生物传感器的开发及应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2485-2501. PU Wei, CHEN Jiuzhou, WANG Yu, ZHENG Ping, SUN Jibin. Advances of development and application amino acid biosensors[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2485-2501 (in Chinese).
- [33] 安家莹, 霍明珠, 张庆祥, 张祐霖, 司雨欣, 张森, 房钰鑫. 脂联素生物传感器的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2052-2069. AN Jiaying, HUO Mingzhu, ZHANG Qingxiang, ZHANG Youlin, SI Yuxin, ZHANG Miao, FANG Yuxin. Research progress in biosensors for adiponectin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2052-2069 (in Chinese).
- [34] 马钊, 李猛. 构建全细胞生物传感器测定农田土壤中有有机磷农药甲基对硫磷含量[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2706-2718. MA Zhao, LI Meng. Development of a whole-cell biosensor for detecting organophosphorus pesticide methyl parathion in the farmland soil[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2706-2718 (in Chinese).
- [35] 吴予杰, 许嘉锐, 陈泓雨, 都浩. 真菌发光途径的研究与应用进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 1-14. WU Yujie, XU Jiarui, CHEN Hongyu, DU Hao. Fungal luminescence pathways: research and applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1): 1-14 (in Chinese).
- [36] 张弘, 王慧洁, 鲁睿捷, 兰家靖, 陈林洁, 何小柏. 蛋白质结构预测模型 AlphaFold2 的应用进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1406-1420. ZHANG Hong, WANG Huijie, LU Ruijie, LAN Jiaying, CHEN Linjie, HE Xiaobai. Advances in the application of AlphaFold2: a protein structure prediction model[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1406-1420 (in Chinese).

- [37] 何新媛, 刘杨, 曾祥荷, 高荣凤, 田真, 樊祥宇. 基于生物信息学的蛋白质功能预测方法研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2087-2099.
HE Xinyuan, LIU Yang, ZENG Xianghe, GAO Rongfeng, TIAN Zhen, FAN Xiangyu. Advances in bioinformatics-based protein function prediction[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2087-2099 (in Chinese).
- [38] 池燕飞, 李春, 冯旭东. 机器学习在蛋白质功能预测领域的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2141-2157.
CHI Yanfei, LI Chun, FENG Xudong. Advances in machine learning for predicting protein functions[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2141-2157 (in Chinese).
- [39] 徐沛, 汪卫华, 宁洪伟, 曹瑞芬, 刘胜, 范培锋, 宋小平. 人工智能辅助的酶分子改造应用进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1728-1741.
XU Pei, WANG Weihua, NING Hongwei, CAO Ruifen, LIU Sheng, FAN Peifeng, SONG Xiaoping. Progress in the application of artificial intelligence-assisted molecular modification of enzymes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1728-1741 (in Chinese).
- [40] 马亚迪, 尤翠萍, 张国强, 李江华, 堵国成. 基于半理性设计提高疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶催化特异性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3481-3493.
MA Yadi, YOU Cuiping, ZHANG Guoqiang, LI Jianghua, DU Guocheng. Improving the position specificity of *Thermomyces lanuginosus* lipase based on semi-rational design[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3481-3493 (in Chinese).
- [41] 蔡应婷, 张天竹, 林风云. 半理性设计提高丁酰胆碱酯酶催化生长激素释放肽活性[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4228-4241.
CAI Yingting, ZHANG Tianzhu, LIN Fengyun. Semi-rational design improves the catalytic activity of butyrylcholinesterase against ghrelin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4228-4241 (in Chinese).
- [42] 云轶楠, 刘诗梦, 代琦, 张瑾, 王筱. 人工智能在蛋白质-配体结合亲和力预测中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2070-2086.
YUN Yinan, LIU Shimeng, DAI Qi, ZHANG Jin, WANG Xiao. Advances in using artificial intelligence for predicting protein-ligand binding affinity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2070-2086 (in Chinese).
- [43] CHEN JF, BOLHUIS DL, LAGGNER C, KONG DY, YU L, WANG XD, EMANUELE MJ, BROWN NG, LIU PD. AtomNet-aided OTUD7B inhibitor discovery and validation[J]. *Cancers*, 2023, 15(2): 517.
- [44] CHOI Y, SHIN B, KANG K, PARK S, BECK BR. Target-centered drug repurposing predictions of human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and transmembrane protease serine subtype 2 (TMPRSS2) interacting approved drugs for coronavirus disease 2019 (COVID-19) treatment through a drug-target interaction deep learning model[J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 1325.
- [45] ÖZTÜRK H, ÖZGÜR A, OZKIRIMLI E. DeepDTA: deep drug-target binding affinity prediction[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i821-i829.
- [46] 刘南, 金小程, 杨崇周, 王梓洋, 闵小平, 葛胜祥. 人工智能时代下的蛋白质从头设计[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3912-3929.
LIU Nan, JIN Xiaocheng, YANG Chongzhou, WANG Ziyang, MIN Xiaoping, GE Shengxiang. De novo protein design in the age of artificial intelligence[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3912-3929 (in Chinese).
- [47] 黄运红, 黎金祖, 陈思敏, 刘文慧, 吴妙尔, 朱笃, 谢运昌. 放线菌环二肽类活性天然产物生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4497-4516.
HUANG Yunhong, LI Jinzu, CHEN Simin, LIU Wenhui, WU Miaoer, ZHU Du, XIE Yunchang. Advances in the biosynthesis of cyclodipeptide type natural products derived from actinomycetes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4497-4516 (in Chinese).
- [48] 张营康, 程婷, 赵飞扬, 易炎琴, 李青清, 卢振华, 吴锦斌, 王涛, 刘晓环. 基于金属有机沸石咪唑骨架的固定化细胞的制备及其在丙谷二肽制备中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1131-1141.
ZHANG Yingkang, CHENG Ting, ZHAO Feiyang, YI Yanqin, LI Qingqing, LU Zhenhua, WU Mianbin, WANG Tao, LIU Xiaohuan. Immobilizing engineered *Escherichia coli* cells into zeolitic imidazolate framework 8 for efficient biosynthesis of Ala-Gln[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1131-1141 (in Chinese).
- [49] 王越, 丁秀仿, 张泗达, 张瑞华, 陈东, 徐建富, 陈龙. 自组装在多肽药物中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 177-191.
WANG Yue, DING Xiufang, ZHANG Sida, ZHANG Ruihua, CHEN Dong, XU Jianfu, CHEN Long. Application of self-assembly in polypeptide drugs: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 177-191 (in Chinese).
- [50] 任自强, 张海灵, 林江, 朱希强, 林剑. 蛋白质聚集的三种途径和控制策略[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 103-115.
REN Ziqiang, ZHANG Hailing, LIN Jiang, ZHU Xiqiang, LIN Jian. Three ways for protein aggregation and the control strategies[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 103-115 (in Chinese).
- [51] 刘龙英, 汪婷婷, 于伟, 徐思梦, 叶贤龙. 基于类弹性蛋白融合金属硫蛋白的构建及其生物学活性评价[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4242-4253.
LIU Longying, WANG Tingting, YU Wei, XU Simeng, YE Xianlong. Construction and biological activity of metallothionein fused with ELP[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4242-4253 (in Chinese).
- [52] 张予婷, 李洋, 武耀康, 刘延峰, 李江华, 堵国成, 吕雪芹, 刘龙. 枯草芽孢杆菌中人乳铁蛋白的表达与分泌[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1895-1908.
ZHANG Yuting, LI Yang, WU Yaokang, LIU Yanfeng, LI Jianghua, DU Guocheng, LV Xueqin, LIU Long. The expression and secretion of human lactoferrin in *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1895-1908 (in Chinese).
- [53] 韦一昊, 王君君, 能芙蓉, 王露露, 焦浩, 肖福星, 王小纯. 小麦无机氮转运蛋白原核表达与纯化特点[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3795-3809.
WEI Yihao, WANG Junjun, NAI Furong, WANG Lulu, JIAO Hao, XIAO Fuxing, WANG Xiaochun. Prokaryotic expression and purification of inorganic

- nitrogen transporters in wheat[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3795-3809 (in Chinese).
- [54] 韩洋, 韩冰, 邢燕平, 杨燕. 小麦 TaABI5-D3 基因原核表达及多克隆抗体制备[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3619-3628.
HAN Yang, HAN Bing, XING Yanping, YANG Yan. Prokaryotic expression of wheat TaABI5-D3 gene and polyclonal antibody preparation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3619-3628 (in Chinese).
- [55] 叶滔, 项琪, 杨艳, 黄亚东. 胶原蛋白的开发与应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 942-960.
YE Tao, XIANG Qi, YANG Yan, HUANG Yadong. Research, development and application of collagen: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 942-960 (in Chinese).
- [56] 林宝杨, 熊永吉, 陈惠宇, 韦晟楠, 任芃芃, 成骋, 何冰芳. 多功能生物材料蛛丝蛋白的一级结构特征和生物合成进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 687-704.
LIN Baoyang, XIONG Yongji, CHEN Huiyu, WEI Shengnan, REN Pengpeng, CHENG Cheng, HE Bingfang. Primary structure characterization and biosynthesis of spider silk proteins for multifunctional biomaterials[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 687-704 (in Chinese).
- [57] SCHMUCK B, GRECO G, BARTH A, PUGNO NM, JOHANSSON J, RISING A. High-yield production of a super-soluble miniature spidroin for biomimetic high-performance materials[J]. Materials Today, 2021, 50: 16-23.
- [58] 刘书岩, 田文华, 李玲, 张蕻, 王建, 于玉凤. 重组蛋白产业化中内毒素的去除、检测及限值[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4006-4018.
LIU Shuyan, TIAN Wenhua, LI Ling, ZHANG Hong, WANG Jian, YU Yufeng. Removal, detection, and limits of endotoxin in the industry of recombinant proteins[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4006-4018 (in Chinese).
- [59] 程峰, 李欢, 李可欣, 刘海云, 沈其, 薛亚平, 郑裕国. 多聚磷酸激酶及其在 ATP 再生体系构建中的进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4413-4427.
CHENG Feng, LI Huan, LI Kexin, LIU Haiyun, SHEN Qi, XUE Yaping, ZHENG Yuguo. Recent advances in poly phosphate kinase (PPK) and the construction of PPK-mediated ATP regeneration system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4413-4427.
- [60] 高惠, 王晴, 刘婷婷, 徐美娟, 饶志明. 多聚磷酸盐激酶双底物通道腔的理性设计及其在无细胞催化生产谷胱甘肽中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3318-3335.
GAO Hui, WANG Qing, LIU Tingting, XU Meijuan, RAO Zhiming. Rational design of polyphosphate kinase dual-substrate channel cavity for efficient production of glutathione by cell free catalysis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3318-3335 (in Chinese).
- [61] 田立岩, 李静, 江小龙, 宋国田, 路福平, 戴宗杰, 李庆刚, 王钦宏. 原儿茶酸脱羧关键酶挖掘改造优化儿茶酚生物合成[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3057-3071.
TIAN Liyan, LI Jing, JIANG Xiaolong, SONG Guotian, LU Fuping, DAI Zongjie, LI Qinggang, WANG Qinrong. Screening and engineering of a protocatechuic acid decarboxylase for efficient biosynthesis of catechol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3057-3071 (in Chinese).
- [62] 郑依琳, 胥睿睿, 王阳, 方承格, 堵国成, 康振. 细菌酪氨酸酶高效异源表达及其在生物染发和丝素多肽多巴修饰中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3083-3102.
ZHENG Yilin, XU Ruirui, WANG Yang, FANG Chengge, DU Guocheng, KANG Zhen. Heterologous expression of bacterial tyrosinase and its applications in biological hair dyeing and DOPA modification of hydrolyzed silk fibroin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3083-3102 (in Chinese).
- [63] 杨新愿, 饶忆, 张梦茜, 王佳琪, 刘文渊, 蔡冬波, 陈守文. 基于表达元件和宿主优化促地衣芽胞杆菌高效表达 L-天冬酰胺酶[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1096-1106.
YANG Xinyuan, RAO Yi, ZHANG Mengxi, WANG Jiaqi, LIU Wenyuan, CAI Dongbo, CHEN Shouwen. Efficient production of L-asparaginase in *Bacillus licheniformis* by optimizing expression elements and host[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1096-1106 (in Chinese).
- [64] 宋悦辰, 周婕妤, 倪晔. 基于 CRISPR/Cas9 和紫外诱变构建高产小牛胰凝乳酶的多拷贝乳酸克鲁维酵母[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2983-2997.
SONG Yuechen, ZHOU Jieyu, NI Ye. Construction of a *Kluyveromyces lactis* strain with multi-copy integration for enhanced bovine chymosin production by CRISPR/Cas9 and UV mutagenesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2983-2997 (in Chinese).
- [65] 田鑫, 刘金洲, 何忠会, 陈琳方, 刘梦元. 一种来自乳酸乳球菌的新型氨肽酶 A 的制备及特性分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3494-3507.
TIAN Xin, LIU Jinzhou, HE Zhonghui, CHEN Linfang, LIU Mengyuan. Production and characterization of a novel aminopeptidase A from *Lactococcus lactis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3494-3507 (in Chinese).
- [66] WANG Y, ZHAI A, ZHANG Y, QIU K, WANG J, LI Q. Degradation of swainsonine by the NADP-dependent alcohol dehydrogenase A1R6C3 in *Arthrobacter* sp. HW08[J]. Toxins (Basel), 2016, 8(5): 145.
- [67] 滕君洋, 冯玉树, 李勤凡, 王妍. 节杆菌 HW08 降解苦马豆素关键基因在乳酸乳球菌中的表达及降解功能分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3666-3676.
TENG Junyang, FENG Yushu, LI Qinfan, WANG Yan. Expression and degradation function analysis of the key genes from *Arthrobacter nitroquajacolicus* HW08 in *Lactococcus lactis* for the degradation of swainsonine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3666-3676 (in Chinese).
- [68] 张玉华, 段绪果. 普鲁兰酶在需钠弧菌中的分泌表达与发酵优化[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3421-3435.
ZHANG Yuhua, DUAN Xuguo. Secretory expression and fermentation optimization for extracellular production of pullulanase in *Vibrio natriegens*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3421-3435 (in Chinese).
- [69] 陈媛, 范寒雨, 刘雨杭, 梁康迳, 林文雄, 贾琪. 野生大豆肌醇磷酸水解酶 Gs5PTase8 的原核表达纯化及活性鉴定[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3588-3602.
CHEN Yuan, FAN Hanyu, LIU Yuhang, LIANG Kangjing, LIN Wenxiong, JIA Qi. Prokaryotic

- expression, purification, and activity of the inositol polyphosphate 5-phosphatase Gs5PTase8 from wild soybean[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3588-3602 (in Chinese).
- [70] 栗瑞杰, 胡芸, 尚尔菲, 高晓冬, 王宁. 多萜醇磷酸 β -葡萄糖基转移酶的活性和底物特异性分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1833-1844.
LI Ruijie, HU Yun, SHANG Erfei, GAO Xiaodong, WANG Ning. Analysis of enzyme activity and substrate specificity of dolichyl-phosphate β -glucosyltransferase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1833-1844 (in Chinese).
- [71] 李倩妮, 舒泉先, 杨小雁, 赵运英, 周胜虎, 邓禹. 高热稳定性己糖激酶在大肠杆菌中的表征和表达优化[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3171-3188.
LI Qianni, SHU Quanxian, YANG Xiaoyan, ZHAO Yunying, ZHOU Shenghu, DENG Yu. Characterization and expression optimization of a highly thermostable hexokinase in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3171-3188 (in Chinese).
- [72] 李竺婷, 师旻, 范若辰, 王路路, 卜婷婷, 郑维, 张旭强, 权春善. 具核梭杆菌 CarRS 双组分系统组氨酸激酶 CarS 的表达、纯化及生化活性测定[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1596-1608.
LI Zhuting, SHI Xian, FAN Ruochen, WANG Lulu, BU Tingting, ZHENG Wei, ZHANG Xuqiang, QUAN Chunshan. Expression, purification, and characterization of the histidine kinase CarS from *Fusobacterium nucleatum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1596-1608 (in Chinese).
- [73] 刘汝薇, 孟庆勇, 戴蕴平, 张雅丽. 人源溶菌酶结构与功能的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4482-4496.
LIU Ruwei, MENG Qingyong, DAI Yunping, ZHANG Yali. Structure and function of human-derived lysozyme: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4482-4496 (in Chinese).
- [74] WU XJ, LIN YL, XI YY, SHAO ZL, ZHOU YR, LIU F, CHEN HX. The development of transgenic mice for the expression of large amounts of human lysozyme in milk[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(6): 1197-1202.
- [75] HUANG JM, WU LY, YALDA D, ADKINS Y, KELLEHER SL, CRANE M, LONNERDAL B, RODRIGUEZ RL, HUANG N. Expression of functional recombinant human lysozyme in transgenic rice cell culture[J]. Transgenic Research, 2002, 11(3): 229-239.
- [76] TAKAICHI M, OEDA K. Transgenic carrots with enhanced resistance against two major pathogens, *Erysiphe heraclei* and *Alternaria dauci*[J]. Plant Science, 2000, 153(2): 135-144.
- [77] ERCAN D, DEMIRCI A. Simultaneous online recovery of human lysozyme produced by *Kluyveromyces lactis* K7 in biofilm reactor[J]. American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting, 2014, 2: 1318-1330.
- [78] HAN ZP, KAUTTO L, NEVALAINEN H. Secretion of proteases by an opportunistic fungal pathogen *Scedosporium aurantiacum*[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169403.
- [79] 彭元怀, 葛歆, 叶剑芝, 金蓓, 韩志萍. 桔黄赛多孢霉外泌弹性蛋白酶的生化特性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3800-3813.
PENG Yuanhuai, GE Xin, YE Jianzhi, JIN Bei, HAN Zhiping. Biochemical properties of *Scedosporium aurantiacum* extracellular elastase-like protease[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3800-3813 (in Chinese).
- [80] 王亚平, 平啸寅, 赵艺, 刘阳, 吴林, 马立新. 融合大肠杆菌素 DNA 结合域的 Taq DNA 聚合酶的性质表征[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 812-820.
WANG Yaping, PING Xiaoyin, ZHAO Yi, LIU Yang, WU Lin, MA Lixin. Characterization of a Taq DNA polymerase fused with a DNA binding domain of *Escherichia coli* colicin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 812-820 (in Chinese).
- [81] 陈曦, 吴洽庆, 朱敦明. 多功能氧化酶苜蓿碱 6 β -羟化酶的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2786-2796.
CHEN Xi, WU Qiaqing, ZHU Dunming. Research progress of the multifunctional oxidase scopolamine 6 β -hydroxylase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2786-2796 (in Chinese).
- [82] 夏冰冰, 马岱, 叶子凡, 杨静文, 张洪斌, 胡雪芹. 定点突变提高海洋氧化节杆菌 KQ11 右旋糖酐酶的催化活性[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3072-3082.
XIA Bingbing, MA Dai, YE Zifan, YANG Jingwen, ZHANG Hongbin, HU Xueqin. Site-directed mutagenesis enhances the activity of dextranase from *Arthrobacter oxidans* KQ11[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3072-3082 (in Chinese).
- [83] 官媛林, 张萌, 许菲. 结构指导的玉米赤霉烯酮水解酶的热稳定性改造[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3336-3350.
GUAN Ailin, ZHANG Meng, XU Fei. Structure-guided engineering for improving the thermal stability of zearalenone hydrolase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3336-3350 (in Chinese).
- [84] 艾佳莹, 高吉凯, 殷子扬, 毛淑红. 骨化三醇生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1601-1619.
AI Jiaying, GAO Jikai, YIN Ziyang, MAO Shuhong. Biosynthesis of calcifediol and calcitriol: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1601-1619 (in Chinese).
- [85] 肖杰文, 韩瑾, 乔郅钠, 张国栋, 黄武军, 钱凯, 徐美娟, 张昱, 杨套伟, 饶志明. 植物乳杆菌谷氨酸脱羧酶催化 pH 范围的理性改造及高效转化生产 γ -氨基丁酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2108-2125.
XIAO Jiewen, HAN Jin, QIAO Zhina, ZHANG Guodong, HUANG Wujun, QIAN Kai, XU Meijuan, ZHANG Xian, YANG Taowei, RAO Zhiming. Efficient biosynthesis of γ -aminobutyric acid by rationally engineering the catalytic pH range of a glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2108-2125 (in Chinese).
- [86] 蔡雪, 孙晨阳, 翟增春, 施雪, 柳志强, 郑裕国. 磷酸吡哆醛依赖型酶的研究进展及其应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2771-2785.
CAI Xue, SUN Chenyang, ZHAI Zengchun, SHI Xue, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Recent advances in pyridoxal phosphate-dependent enzymes and their applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2771-2785 (in Chinese).

- [87] 唐雅倩, 林彩宝, 柯崇榕, 陶勇, 黄建忠, 杨欣伟. 胞磷胆碱的合成策略及研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1644-1660.
TANG Yaqian, LIN Caibao, KE Chongrong, TAO Yong, HUANG Jianzhong, YANG Xinwei. Advances in the synthesis of cytidine-5'-diphosphate choline[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1644-1660 (in Chinese).
- [88] 王硕, 刘玮赓, 李旭, 徐庆阳. 底物及底物处理方法对胞磷胆碱发酵的影响[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(16): 151-159.
WANG Shuo, LIU Weiwei, LI Xu, XU Qingyang. Effect of substrate and substrate treatment on fermentation of cytosolic choline[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(16): 151-159 (in Chinese).
- [89] 陈宇娴, 周楚然, 黄建忠, 陶勇, 柯崇榕, 杨欣伟. β -烟酰胺单核苷酸的生理活性与合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 516-536.
CHEN Yuxian, ZHOU Churan, HUANG Jianzhong, TAO Yong, KE Chongrong, YANG Xinwei. Advances in physiological activities and synthesis of β -nicotinamide mononucleotide[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 516-536 (in Chinese).
- [90] 李仲霞, 刘妍, 罗泉, 吕雪峰. 从专利角度分析 ω -转氨酶在我国手性胺生物合成应用中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3169-3187.
LI Zhongxia, LIU Yan, LUO Quan, LÜ Xuefeng. The advance of ω -transaminase in chiral amine biosynthesis in China from the perspective of patents[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3169-3187 (in Chinese).
- [91] 蔡婷婷, 曹佳仁, 邱帅, 吕常江, 樊芳芳, 胡升, 赵伟睿, 梅乐和, 黄俊. 半理性设计进化土曲霉来源的 ω -转氨酶 AtTA 热稳定性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2126-2140.
CAI Tingting, CAO Jiaren, QIU Shuai, LYU Changjiang, FAN Fangfang, HU Sheng, ZHAO Weirui, MEI Lehe, HUANG Jun. Semi-rational evolution of ω -transaminase from *Aspergillus terreus* for enhancing the thermostability[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2126-2140 (in Chinese).
- [92] 于双嵘, 钱峰, 章海敏, 孙新强, 王普. ω -转氨酶定点突变及生物催化制备(S)-1-(2-氟苯基)乙胺[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 821-833.
YU Shuangrong, QIAN Feng, ZHANG Haimin, SUN Xinqiang, WANG Pu. Site-specific mutation of ω -transaminase and the biocatalytic preparation of (S)-1-(2-fluorophenyl) ethylamine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 821-833 (in Chinese).
- [93] 李举谋, 石焜, 张志钧, 许建和, 郁惠蕾. 多酶级联反应的构建及其在双官能团功能化学品合成中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2158-2189.
LI Jumou, SHI Kun, ZHANG Zhijun, XU Jianhe, YU Huilei. Construction of multi-enzyme cascade reactions and its application in the synthesis of bifunctional chemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2158-2189 (in Chinese).
- [94] 郑棚, 王雷, 胡美荣, 魏华, 陶勇. 多酶级联反应合成能够促进肠道益生菌生长的纤维寡糖[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3406-3420.
ZHENG Peng, WANG Lei, HU Meirong, WEI Hua, TAO Yong. Synthesis of cello-oligosaccharides which promotes the growth of intestinal probiotics by multi-enzyme cascade reaction[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3406-3420 (in Chinese).
- [95] 杨婷婷, 曹丛丛, 刘毅, 陆震, 王瑞妍. 生物活性物的生物制造: 现状、挑战和发展趋势[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4335-4357.
YANG Tingting, CAO Congcong, LIU Yi, LU Zhen, WANG Ruiyan. Biomanufacturing of bioactive compounds: current situation, challenges, and future perspectives[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4335-4357 (in Chinese).
- [96] 吴鹤云, 刘万才, 谢希贤, 蒋帅, 马倩, 帅珍龙. 一种生产麦角硫因的基因工程菌及其构建方法与应用: CN116121161A[P]. 2023-05-16.
WU HY, LIU WC, XIE XX, JIANG S, MA Q, SHUAI ZL. Kind of genetic engineering bacteria producing ergothioneine and its construction method and application: CN116121161A[P]. 2023-05-16 (in Chinese).
- [97] 赵嫚, 池倬雨, 赖冬连, 刘科瑞, 柳志强, 郑裕国. 医美活性成分微生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2489-2512.
ZHAO Man, CHI Zhuoyu, LAI Donglian, LIU Kerui, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Advances in the microbial synthesis of active ingredients in cosmetics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2489-2512 (in Chinese).
- [98] 张明慧, 张英英, 赵鹏程, 王汉杰. 基于双工程菌的“锁扣”生物活材料构建及其体内肠道滞留应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1163-1174.
ZHANG Minghui, ZHANG Yingying, ZHAO Pengcheng, WANG Hanjie. Construction of “lock-key” biological living material based on double engineered bacteria and its application on intestinal retention *in vivo*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1163-1174 (in Chinese).
- [99] 林佳, 王佃余, 刘鉴峰, 杨丽军, 刘金剑. 基于碳酸酐酶 IX 的肿瘤成像和治疗研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 116-131.
LIN Jia, WANG Dianyue, LIU Jianfeng, YANG Lijun, LIU Jinjian. Carbonic anhydrase IX-based tumor imaging and therapy: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 116-131 (in Chinese).
- [100] 刘俸溢, 庄俭, 薛庆隆, 许红, 黄尧, 孙靖尧, 张笑宁, 李明. 基于壳聚糖的搭载光源可溶性微针的制备与评价[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 562-572.
LIU Fengyi, ZHUANG Jian, XUE Qinglong, XU Hong, HUANG Yao, SUN Jingyao, ZHANG Xiaoning, LI Ming. Preparation and evaluation of chitosan-based light source-loaded soluble microneedles[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 562-572 (in Chinese).
- [101] 张卓曦, 白仲虎, 刘光胤, 聂简琪, 杨艳坤. 高渗透胁迫和灌流培养策略提高 HEK 293 细胞生产重组腺病毒载体产量[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3364-3378.
ZHANG Zhuoxi, BAI Zhonghu, LIU Guangyin, NIE Jianqi, YANG Yankun. Hyperosmotic stress and perfusion culture strategies increase the yield of recombinant adenoviral vector produced by HEK 293 cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3364-3378 (in Chinese).
- [102] 邢敏钰, 冉淦侨, 谭丹. 酿酒酵母中萜类化合物的生物合成与代谢调控研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1661-1693.

- XING Minyu, RAN Ganqiao, TAN Dan. Advances in the biosynthesis and metabolic regulation of terpenoids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1661-1693 (in Chinese).
- [103] Amna Bibi, 苏立秋, 戴宗杰, 王钦宏. 萜类化合物微生物合成中酶工程的研究进展与展望[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2473-2488.
- Amna Bibi, SU Liqiu, DAI Zongjie, WANG Qinrong. Enzyme engineering in microbial biosynthesis of terpenoids: progress and perspectives[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2473-2488.
- [104] 黄瑶, 杨海泉, 沈微, 夏媛媛, 曹钰, 陈献忠. 代谢工程改造酿酒酵母合成柠檬烯及其衍生物[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4647-4662.
- HUANG Yao, YANG Haiquan, SHEN Wei, XIA Yuanyuan, CAO Yu, CHEN Xianzhong. Production of limonene and its derivative in *Saccharomyces cerevisiae* via metabolic engineering[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4647-4662 (in Chinese).
- [105] 程亚田, 汤皓, 孙丽丽, 胡雅婷, 马莹, 郭娟, 黄璐琦. 植物源二萜类化合物微生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2265-2283.
- CHENG Yatian, TANG Hao, SUN Lili, HU Yating, MA Ying, GUO Juan, HUANG Luqi. Advances on the microbial synthesis of plant-derived diterpenoids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2265-2283 (in Chinese).
- [106] 陈东莹, 朱晁谊, 陈和锋, 周靖涛, 李爽. 酿酒酵母稳定整合位点鉴定及其在橘烯生物合成中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1924-1934.
- CHEN Dongying, ZHU Chaoyi, CHEN Hefeng, ZHOU Jingtao, LI Shuang. Stable integration sites in *Saccharomyces cerevisiae*: identification and application in the biosynthesis of valencene[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1924-1934 (in Chinese).
- [107] 臧瑜, 李圳扬, 卢雨欣, 杭嘉炜, 袁围, 孙杰. 增强甘油代谢提高酵母工程菌的红没药烯产量[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 847-857.
- ZANG Yu, LI Zhenyang, LU Yuxin, HANG Jiawei, YUAN Wei, SUN Jie. Enhancing the glycerol utilization of engineered yeast increases its bisabolene production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 847-857 (in Chinese).
- [108] 李可心, 王颖, 姚明东, 肖文海. 脱落酸生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2190-2203.
- LI Kexin, WANG Ying, YAO Mingdong, XIAO Wenhai. Advances in abscisic acid biosynthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2190-2203 (in Chinese).
- [109] 姜幸怡, 韩伟, 郭嘉, 刘艳芳, 徐爱国, 唐传红, 冯杰, 张劲松. 振荡-静置循环培养新策略提升灵芝三萜合成与菌丝体活性[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3189-3200.
- JIANG Xingyi, HAN Wei, GUO Jia, LIU Yanfang, XU Aiguo, TANG Chuanhong, FENG Jie, ZHANG Jinsong. Oscillation-static cycle cultivation enhances the synthesis of triterpenes and mycelium activity in *Ganoderma lucidum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3189-3200 (in Chinese).
- [110] 杨文华, 顾秋亚, 余晓斌. 原人参二醇型皂苷水解酶及制备人参皂苷 Compound K 的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 978-992.
- YANG Wenhua, GU Qiuya, YU Xiaobin. Protopanaxadiol-type ginsenoside hydrolases and their application in the preparation of ginsenoside Compound K: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 978-992 (in Chinese).
- [111] MCCIURE DD, LUIZ A, GERBER B, BARTON GW. An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricornerutum*[J]. Algal Research, 2018, 29: 41-48.
- [112] 杨泽雄, 杨润青, 诸德斐, 魏东. 多次补氮和增强蓝光促进三角褐指藻积累岩藻黄素[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4580-4592.
- YANG Zexiong, YANG Runqing, ZHU Defei, WEI Dong. Promoting fucoxanthin accumulation in *Phaeodactylum tricornerutum* by multiple nitrogen supplementation and blue light enhancement[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4580-4592 (in Chinese).
- [113] 诸德斐, 杨润青, 魏东. 光发酵强化三角褐指藻生产岩藻黄素[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1070-1082.
- ZHU Defei, YANG Runqing, WEI Dong. Enhancing fucoxanthin production in *Phaeodactylum tricornerutum* by photofermentation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1070-1082 (in Chinese).
- [114] 张萱, 刘世柯, 曾伟主, 周景文, 侯颖. 重组大肠杆菌催化橙皮素合成新橙皮苷[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3011-3024.
- ZHANG Xuan, LIU Shike, ZENG Weizhu, ZHOU Jingwen, HOU Ying. Production of neohesperidin from hesperetin by an engineered strain of *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3011-3024 (in Chinese).
- [115] 白杰, 李从雨, 张鹤渐, 黄蓉, 王千, 刘晓楠, 骆健美, 江会锋. 黄酮 6 位羟基化酶催化机制的理论研究与应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4635-4646.
- BAI Jie, LI Congyu, ZHANG Hejian, HUANG Rong, ZHANG Lei, WANG Qian, LIU Xiaonan, LUO Jianmei, JIANG Huifeng. Theoretical analysis and practical applications of the catalytic mechanism of flavonoid 6-hydroxylase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4635-4646 (in Chinese).
- [116] 贺志敏, 马文瑞, 于雨平, 吕鹤书, 杨明峰. 定点突变提高虎杖聚酮合酶的苯亚甲基丙酮合酶活性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2806-2817.
- HE Zhimin, MA Wenrui, YU Liping, LÜ Heshu, YANG Mingfeng. Site-directed mutagenesis enhances the activity of benzylidene acetone synthase of polyketide synthase from *Polygonum cuspidatum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2806-2817 (in Chinese).
- [117] 张雨捷, 石瞳, 王佳, 孙新晓, 申晓林, 袁其朋. 熊果苷的生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2457-2472.
- ZHANG Yujie, SHI Tong, WANG Jia, SUN Xinxiao, SHEN Xiaolin, YUAN Qipeng. Research progress in biosynthesis of arbutin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2457-2472 (in Chinese).
- [118] 刘嘉琦, 谭明, 董钧, 刘以银, 刘珊珊, 吴洽庆. 环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及其在合成 α -熊果苷中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1845-1855.
- LIU Jiaqi, TAN Ming, DONG Jun, LIU Yiyin, LIU Shanna, WU Qiaqing. Molecular modification of cyclodextrin glucosyltransferase and its application in the synthesis of α -arbutin[J]. Chinese Journal of

- Biotechnology, 2024, 40(6): 1845-1855 (in Chinese).
- [119] 胡迪, 罗晓伟, 王宇贤, 龚明, 邹竹荣. 桃儿七苯丙氨酸解氨酶的基因克隆及其酶活分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2818-2838.
HU Di, LUO Xiaowei, WANG Yuxian, GONG Ming, ZOU Zhurong. Gene cloning and enzymatic activity analysis of phenylalanine ammonia-lyase from *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2818-2838 (in Chinese).
- [120] 张方晴, 史佳欣, 于静, 赵玥, 范荣, 王晓伟, 李志超. 本氏烟草悬浮细胞 NBS-1 的创建及底盘特征分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1935-1949.
ZHANG Fangqing, SHI Jiaxin, YU Jing, ZHAO Yue, FAN Rong, WANG Xiaowei, LI Zhichao. Development and characterization of tobacco suspension cell chassis NBS-1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1935-1949 (in Chinese).
- [121] 于坤朋, 彭程, 林燕玲, 李利君, 倪辉, 李清彪. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶 An-bgl3 的重组表达及东莨菪苷的转化[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1232-1246.
YU Kunpeng, PENG Cheng, LIN Yanling, LI Lijun, NI Hui, LI Qingbiao. Expression of β -glucosidase An-bgl3 from *Aspergillus niger* for conversion of scopolin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1232-1246 (in Chinese).
- [122] 李若松, 彭彦峰, 马龙, 王钦宏. 代谢工程改造大肠杆菌生产水杨酸葡萄糖苷[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3290-3301.
LI Ruosong, PENG Yanfeng, MA Long, WANG Qinrong. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salicylate 2-O- β -D-glucoside[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3290-3301 (in Chinese).
- [123] 崔柳伟, 王凯峰, 纪晓俊. 四乙酰基植物鞘氨醇生物合成的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2204-2214.
CUI Liuwei, WANG Kaifeng, JI Xiaojun. Fermentative production of tetraacetyl phytosphingosine: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2204-2214 (in Chinese).
- [124] 刘英杰, 符长春, 张学鹏, 谷碧璇, 胡海涛, 杨瑞金, 吕小妹. 酪醇及其衍生物的微生物代谢工程调控研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2604-2625.
LIU Yingjie, FU Changchun, ZHANG Xuepeng, GU Bixuan, HU Haitao, YANG Ruijin, LYU Xiaomei. Recent advances in metabolic engineering of microorganisms for production of tyrosol and its derivatives[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2604-2625 (in Chinese).
- [125] 沈玉平, 周紫微, 贺茜, 尹乐义, 何春兰, 张祖姣. 群体感应动态调控促进大肠杆菌合成酪醇[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3379-3393.
SHEN Yuping, ZHOU Ziwei, HE Xi, YIN Leyi, HE Chunlan, ZHANG Zujiao. Dynamic regulation using a quorum-sensing circuit enhances the production of tyrosol by *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3379-3393 (in Chinese).
- [126] 魏晨昱, 黄珠莹, 沈知行, 张显, 饶志明, 胡晓清, 徐美娟. 基于尿苷二磷酸葡萄糖循环再生系统高效转化酪醇合成红景天苷[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3127-3141.
WEI Chenyu, HUANG Zhuying, SHEN Zhixing, ZHANG Xian, RAO Zhiming, HU Xiaoqing, XU Meijuan. Efficient synthesis of salidroside from tyrosol based on UDPG recycling system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3127-3141 (in Chinese).
- [127] 张慕琛, 宋黄威, 邹之宇, 杨思源, 李会, 代重山, 刘德俊, 邵兵, 吴聪明, 沈建忠, 汪洋. β -桉木醇联合替加环素对 tet(X4)阳性大肠杆菌的体外协同抗菌作用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1621-1632.
ZHANG Muchen, SONG Huangwei, ZOU Zhiyu, YANG Siyuan, LI Hui, DAI Chongshan, LIU Dejun, SHAO Bing, WU Congming, SHEN Jianzhong, WANG Yang. Synergistic effect of β -thujaplicin and tigecycline against tet(X4)-positive *Escherichia coli* *in vitro*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1621-1632 (in Chinese).
- [128] 吴江雪, 刘华华, 陈敏, 徐俊辰, 季雯艳. 比较代谢组学分析阿维拉霉素高产突变株代谢途径[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1868-1881.
WU Jiangxue, LIU Huahua, CHEN Min, XU Junchen, JI Wenyan. Comparative metabolomics analysis of metabolic pathways in the high-yielding mutant strain of avilamycin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1868-1881 (in Chinese).
- [129] 王雯静, 张蓓蓓, 张明亮, 张泽坤, 王阳, 葛祥宇, 杜宇, 张晓雪, 刘晓, 王娟, 王晓晖, 史社坡. 蛇足石杉内生真菌产黄青霉素 MT-40 中 xanthocillin 类似物生物合成基因簇的挖掘及鉴定[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3814-3826.
WANG Wenjing, ZHANG Beibei, ZHANG Mingliang, ZHANG Zekun, WANG Yang, GE Xiangyu, DU Yu, ZHANG Xiaoxue, LIU Xiao, WANG Juan, WANG Xiaohui, SHI Shepo. Mining and identification of a biosynthetic gene cluster producing xanthocillin analogues from *Penicillium chrysogenum* MT-40, an endophytic fungus of *Huperzia serrata*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3814-3826 (in Chinese).
- [130] 金利群, 鲁笛, 邢明林, 汪贤文, 柳志强, 郑裕国. 免疫抑制剂他克莫司生物合成的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3095-3110.
JIN Liqun, LU Di, XING Minglin, WANG Xianwen, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Biosynthesis of immunosuppressant tacrolimus: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3095-3110 (in Chinese).
- [131] 易崇华, 钱思雨, 钮成拓, 郑飞云, 刘春风, 李崎, 王金晶. 天然紫外吸收剂 gadusol 在毕赤酵母中的生物合成及其性能分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3039-3056.
YI Chonghua, QIAN Siyu, NIU Chengtuo, ZHENG Feiyun, LIU Chunfeng, LI Qi, WANG Jinjing. Synthesis and properties of the natural ultraviolet absorber gadusol in *Komagataella phaffii*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3039-3056 (in Chinese).
- [132] 庞煜, 马达, 王波, 蔡燕雪, 王际辉, 肖珊. 高通量测序技术在植物内生菌领域研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3395-3406.
PANG Yu, MA Da, WANG Bo, CAI Yanxue, WANG Jihui, XIAO Shan. Application of high-throughput sequencing in research on plant endophytes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3395-3406 (in Chinese).
- [133] 赵肖肖, 白世博, 吕磊, 张新国. 极端环境微生物分

- 离策略及其活性物质研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3407-3426.
- ZHAO Xiaoxiao, BAI Shibo, LYU Lei, ZHANG Xinguo. Research progress in isolation strategies and bioactive substances of microorganisms in extreme environments[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3407-3426 (in Chinese).
- [134] 刘文虎, 刘光钱, 张芮, 郑蕾, 陆震鸣, 张晓娟, 王松涛, 沈才洪, 史劲松, 许正宏, 柴丽娟. 基于宏基因组解析中温大曲成熟前后的微生物群落功能差异[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 877-894.
- LIU Wenhui, LIU Guangqian, ZHANG Rui, ZHENG Lei, LU Zhenming, ZHANG Xiaojuan, WANG Songtao, SHEN Caihong, SHI Jinsong, XU Zhenghong, CHAI Lijuan. Metagenomics unveils the differences in the functions of microbial community of medium-temperature Daqu before and after maturation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 877-894 (in Chinese).
- [135] 李游山, 王圆, 朱瑞, 杨玺, 魏梦, 张照锋, 陈长清. BmSPI38 同型串联多聚体在大肠杆菌中的表达和抗真菌活性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4275-4294.
- LI Youshan, WANG Yuan, ZHU Rui, YANG Xi, WEI Meng, ZHANG Zhaofeng, CHEN Changqing. Expression of BmSPI38 tandem multimers in *Escherichia coli* and its antifungal activity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4275-4294 (in Chinese).
- [136] LIU J, LIU Y, LI Q, LU Y. Heat shock protein 70 and Cathepsin B genes are involved in the thermal tolerance of *Aphis gossypii*[J]. Pest Management Science, 2023, 79(6): 2075-2086.
- [137] 吕蕊花, 杨大群, 杜雨彤, 冯昭, 吕瑞华, 李依民, 张岗. 核盘菌热休克蛋白 *Hsp70* 基因的克隆及功能分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3677-3688.
- LÜ Ruihua, YANG Daqun, DU Yutong, FENG Zhao, LÜ Ruihua, LI Yimin, ZHANG Gang. Cloning and functional analysis of heat shock protein *Hsp70* from *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3677-3688 (in Chinese).
- [138] 宋士奎, 何建新, 黄永棋, 苏正定. 以分枝杆菌为底盘细胞生物合成甾药中间体的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1056-1069.
- SONG Shikui, HE Jianxin, HUANG Yongqi, SU Zhengding. Biosynthesis of steroidal intermediates using Mycobacteria: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1056-1069 (in Chinese).
- [139] 王钰, 武陶, 樊旭倩, 阮海华, 樊飞宇, 张学礼. 酵母甾醇转运蛋白研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3204-3218.
- WANG Yu, WU Tao, FAN Xuqian, RUAN Haihua, FAN Feiyu, ZHANG Xueli. Sterol transport proteins in yeast: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3204-3218 (in Chinese).
- [140] 何建新, 董新林, 黄永棋, 宋士奎, 苏正定. 分枝杆菌 HGMS2 甾醇降解中新 C-23 代谢产物的鉴定及其代谢途径分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4550-4562.
- HE Jianxin, DONG Xinlin, HUANG Yongqi, SONG Shikui, SU Zhengding. Identification of a new C-23 metabolite in sterol degradation of *Mycobacterium neoaurum* HGMS2 and analysis of its metabolic pathways[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4550-4562 (in Chinese).
- [141] 王蓝蓝, 赵昕, 李杰, 艾佳莹, 孙静, 毛淑红. 电子传递链的适配提高孕酮 17 α 羟基化生物催化效率[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4608-4620.
- WANG Lanlan, ZHAO Xin, LI Jie, AI Jiaying, SUN Jing, MAO Shuhong. Adaptation of the electron transport chain improves the biocatalytic efficiency of progesterone 17 α hydroxylation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4608-4620 (in Chinese).
- [142] 郭亮, 高熙, 张红霞. 氨基酸高产菌株创制的关键技术[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1711-1727.
- GUO Liang, GAO Xi, ZHANG Hongxia. Engineering of microorganisms for high production of amino acids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1711-1727 (in Chinese).
- [143] JIANG S, WANG RR, WANG DH, ZHAO CG, MA Q, WU HY, XIE XX. Metabolic reprogramming and biosensor-assisted mutagenesis screening for high-level production of L-arginine in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2023, 76: 146-157.
- [144] GUO L, DING S, LIU YD, GAO C, HU GP, SONG W, LIU J, CHEN XL, LIU LM. Enhancing tryptophan production by balancing precursors in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(3): 983-993.
- [145] LIU YF, XU YR, DING DQ, WEN JP, ZHU BW, ZHANG DW. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 5.
- [146] PING JR, WANG L, QIN ZJ, ZHOU ZM, ZHOU JW. Synergetic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of L-tyrosine[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2023, 8(4): 724-731.
- [147] 刘佳峰, 乔郅钠, 赵有玺, 徐美娟, 张显, 杨套伟, 饶志明. 理性代谢工程改造促进谷氨酸棒杆菌高效合成 L-谷氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3273-3289.
- LIU Jiafeng, QIAO Zhina, ZHAO Youxi, XU Meijuan, ZHANG Xian, YANG Taowei, RAO Zhiming. Rational metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient synthesis of L-glutamate[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3273-3289 (in Chinese).
- [148] 许雪晨, 王浩森, 陈修来, 吴静, 高聪, 宋伟, 魏婉清, 刘佳, 柳亚迪, 刘立明. 代谢工程改造大肠杆菌底物利用途径促进 L-赖氨酸生产[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2513-2527.
- XU Xuechen, WANG Haomiao, CHEN Xiulai, WU Jing, GAO Cong, SONG Wei, WEI Wanqing, LIU Jia, LIU Yadi, LIU Liming. Metabolic engineering of the substrate utilization pathway in *Escherichia coli* increases L-lysine production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2513-2527 (in Chinese).
- [149] XU JZ, RUAN HZ, YU HB, LIU LM, ZHANG WG. Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 39.
- [150] 乔倩倩, 宁舒展, 王瑞瑞, 郑宇, 路福平, 陈久洲, 刘娇, 郑平. 谷氨酸棒杆菌乙酰羟酸合酶的高效表达调控及应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3114-3126.
- QIAO Qianqian, NING Shuzhan, WANG Ruihui, ZHENG Yu, LU Fuping, CHEN Jiuzhou, LIU Jiao, ZHENG Ping. Efficient expression regulation of acetylhydroxyacid synthase for production of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology,

- 2024, 40(9): 3114-3126 (in Chinese).
- [151] HAO YN, PAN XW, XING RF, YOU JJ, HU MK, LIU ZF, LI XF, XU MJ, RAO ZM. High-level production of L-valine in *Escherichia coli* using multi-modular engineering[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 359: 127461.
- [152] 赵阔, 程金宇, 郭亮, 高聪, 宋伟, 吴静, 刘佳, 柳亚迪, 刘立明, 陈修来. 谷氨酸棒杆菌代谢工程高效生产 L-缬氨酸[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(8): 3253-3272. ZHAO Kuo, CHENG Jinyu, GUO Liang, GAO Cong, SONG Wei, WU Jing, LIU Jia, LIU Yadi, LIU Liming, CHEN Xiulai. Highly efficient production of L-valine by multiplex metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(8): 3253-3272 (in Chinese).
- [153] 沈冠同, 刘亚琦, 吉南希, 张媛媛, 王钦宏. 生物发酵法生产 L-色氨酸的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(3): 621-643 (in Chinese). SHEN Guantong, LIU Yaqi, JI Nanxi, ZHANG Yuanyuan, WANG Qinhong. Advances in fermentative production of L-tryptophan: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(3): 621-643.
- [154] 丁爽, 陈修来, 高聪, 宋伟, 吴静, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 模块化工程改造大肠杆菌生产 L-色氨酸[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(6): 2359-2374. DING Shuang, CHEN Xiulai, GAO Cong, SONG Wei, WU Jing, WEI Wanqing, LIU Jia, LIU Liming. Modular engineering of *Escherichia coli* for high-level production of L-tryptophan[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(6): 2359-2374 (in Chinese).
- [155] 叶慧敏, 杜军, 唐玉景, 袁鑫, 张铮, 李璐, 冀颀之. 基于常压室温等离子体诱变和高通量筛选选育 L-色氨酸高产菌株[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(9): 3201-3215. YE Huimin, DU Jun, TANG Yujing, YUAN Xin, ZHANG Zheng, LI Lu, JI Yizhi. Breeding of L-tryptophan high-yield strain by ARTP mutagenesis and high-throughput screening[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(9): 3201-3215 (in Chinese).
- [156] 张博, 王莹, 牛坤, 柳志强, 郑裕国. 代谢工程改造大肠杆菌一碳模块高效合成 L-甲硫氨酸[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(8): 3302-3317. ZHANG Bo, WANG Ying, NIU Kun, LIU Zhiqiang, ZHENG Yugu. Efficient synthesis of L-methionine by engineering the one carbon module of *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(8): 3302-3317 (in Chinese).
- [157] 牛坤, 梅子龙, 管安奇, 蔡文斌, 陈懋钦, 柳志强, 郑裕国. 重组大肠杆菌合成 L-甲硫氨酸的发酵过程优化[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(3): 895-907. NIU Kun, MEI Zilong, GUAN Anqi, CAI Wenbin, CHEN Maoqin, LIU Zhiqiang, ZHENG Yugu. Optimization of the fermentative production of L-methionine by engineered *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(3): 895-907 (in Chinese).
- [158] 李美京, 米哲言, 王金浩, 胡忠策, 秦海彬, 王远山, 郑裕国. 微生物发酵法生产 S-腺苷甲硫氨酸的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(6): 2248-2264. LI Meijing, MI Zheyang, WANG Jinhao, HU Zhongce, QIN Haibin, WANG Yuanshan, ZHENG Yugu. Microbial production of S-adenosyl-L-methionine: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(6): 2248-2264 (in Chinese).
- [159] 王文瑞, 董敏. 辅因子 S-腺苷-L-甲硫氨酸甲基类似物及其应用[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(11): 4428-4444. WANG Wenrui, DONG Min. Synthesis and application of the methyl analogues of S-adenosyl-L-methionine[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(11): 4428-4444 (in Chinese).
- [160] 高登科, 宋伟, 魏婉清, 黄康平, 吴静, 刘立明. 酶法生产 L-高苯丙氨酸的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(8): 3111-3124. GAO Dengke, SONG Wei, WEI Wanqing, HUANG Kangping, WU Jing, LIU Liming. Advances in enzymatic production of L-homophenylalanine[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(8): 3111-3124 (in Chinese).
- [161] 詹侃, 刘颖, 陈庆, 庄程翰, 郑仁朝. γ -氨基丁酸衍生物的化学-酶法合成研究进展[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(9): 2831-2845. ZHAN Kan, LIU Ying, CHEN Qing, ZHUANG Chenghan, ZHENG Renchao. Advances in the chemoenzymatic synthesis of gamma-aminobutyric acid derivatives[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(9): 2831-2845 (in Chinese).
- [162] 罗诗琪, 魏婉清, 吴静, 宋伟, 胡贵鹏, 刘立明. 双酶级联催化 L-色氨酸合成靛蓝[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(8): 2444-2456. LUO Shiqi, WEI Wanqing, WU Jing, SONG Wei, HU Guipeng, LIU Liming. A dual-enzyme cascade for production of indigo from L-tryptophan[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(8): 2444-2456 (in Chinese).
- [163] 许慧娴, 陈永涛, 黄建忠, 陶勇, 柯崇榕, 杨欣伟. 四氢嘧啶生物合成及其关键酶生化特性研究进展[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(6): 1620-1643. XU Huixian, CHEN Yongtao, HUANG Jianzhong, TAO Yong, KE Chongrong, YANG Xinwei. Advances in ectoine biosynthesis and biochemical characteristics of key enzymes[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(6): 1620-1643 (in Chinese).
- [164] 廖雅芯, 张杰, 张显, 饶志明, 徐美娟. 构建整合型重组枯草芽孢杆菌高效合成肌基乙酸[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(9): 3025-3038. LIAO Yaxin, ZHANG Jie, ZHANG Xian, RAO Zhiming, XU Meijuan. Efficient biosynthesis of guanidoacetic acid by a recombinant strain of *Bacillus subtilis*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(9): 3025-3038 (in Chinese).
- [165] 刘佳萌, 刘业学, 赵晨旭, 王稳航, 李庆刚, 路福平, 李玉. 解淀粉芽孢杆菌 hemX 基因缺失对血红素合成的影响[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(3): 1119-1130. LIU Jiameng, LIU Yexue, ZHAO Chenxu, WANG Wenhong, LI Qinggang, LU Fuping, LI Yu. Effect of hemX gene deletion on heme synthesis in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(3): 1119-1130 (in Chinese).
- [166] 李园子, 高靖怡, 王凤寰, 廖永红. 2-苯乙醇合成研究进展[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(6): 1694-1710. LI Yuanzi, GAO Jingyi, WANG Fenghuan, LIAO Yonghong. Advances in synthesis of 2-phenylethanol[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(6): 1694-1710.
- [167] WANG GL, WANG MY, YANG JC, LI Q, ZHU NQ, LIU LX, HU XM, YANG XP. De novo synthesis of 2-phenylethanol from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2023, 49(6): kuac026.

- [168] XU H, LI Z, LI LY, XIE XM, CAI DB, WANG Z, ZHAN YY, CHEN SW. Sustainable production of 2-phenylethanol from agro-industrial wastes by metabolically engineered *Bacillus licheniformis*[J]. LWT, 2023, 173: 114414.
- [169] HASSING EJ, de GROOT PA, MARQUENIE VR, PRONK JT, DARAN JM G. Connecting central carbon and aromatic amino acid metabolisms to improve de novo 2-phenylethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 56: 165-180.
- [170] 刘存萍, 高聪, 李晓敏, 陈修来, 吴静, 宋伟, 魏婉清, 刘立明. 代谢工程改造大肠杆菌生产尸胺[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2403-2417.
- LIU Cuning, GAO Cong, LI Xiaomin, CHEN Xiulai, WU Jing, SONG Wei, WEI Wanqing, LIU Liming. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2403-2417 (in Chinese).
- [171] 张博, 廖宇哲, 余浩楠, 王广豪, 柳志强, 郑裕国. 水溶性维生素的生物合成[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2528-2551.
- ZHANG Bo, LIAO Yuzhe, YU Haonan, WANG Guanghao, LIU Zhiqiang, ZHENG Yugu. Biosynthesis of water-soluble vitamins[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2528-2551 (in Chinese).
- [172] 张博, 余浩楠, 朱丽丹, 朱溢, 柳志强, 郑裕国. 脂溶性维生素的生物合成[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2552-2569.
- ZHANG Bo, YU Haonan, ZHU Lidan, ZHU Yi, LIU Zhiqiang, ZHENG Yugu. Biosynthesis of fat-soluble vitamins[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2552-2569 (in Chinese).
- [173] 蒲春香, 李金龙, 龚大春, 罗华军, 张大伟. 维生素生物合成途径中酶的代谢与功能的探索[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2570-2603.
- PU Chunxiang, LI Jinlong, GONG Dachun, LUO Huajun, ZHANG Dawei. Enzyme metabolism and functions in vitamin biosynthesis pathways[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2570-2603 (in Chinese).
- [174] 董雅君, 崔世修, 刘延峰, 李江华, 堵国成, 吕雪芹, 刘龙. 功能膜微域在七烯甲萘醌合成过程中的作用解析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2215-2230.
- DONG Yajun, CUI Shixiu, LIU Yanfeng, LI Jianghua, DU Guocheng, LÜ Xueqin, LIU Long. Functional analysis of functional membrane microdomains in the biosynthesis of menaquinone-7[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2215-2230 (in Chinese).
- [175] 姚卓越, 李然, 蒋帅, 吴鹤云, 马倩, 谢希贤. 代谢工程改造大肠杆菌生产胸苷[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2432-2443.
- YAO Zhuoyue, LI Ran, JIANG Shuai, WU Heyun, MA Qian, XIE Xixian. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for thymidine production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2432-2443 (in Chinese).
- [176] 王倩倩, 刘亚琦, 屈琰, 刘欢, 高歌, 徐庆阳, 陈宁, 范晓光. 重组大肠杆菌全细胞催化制备假尿苷[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 799-811.
- WANG Qianqian, LIU Yaqi, QU Yan, LIU Huan, GAO Ge, XU Qingyang, CHEN Ning, FAN Xiaoguang. Whole-cell catalytic production of pseudouridine by recombinant *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 799-811 (in Chinese).
- [177] 张敏, 杨舒雅, 高大宽. 稀有糖D-阿洛糖的生理功能研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2010-2021.
- ZHANG Min, YANG Shuya, GAO Dakuan. Research progress in physiological function of the rare sugar D-allose[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2010-2021 (in Chinese).
- [178] 李娟, 吴敬, 陈晟, 夏伟. 发酵乳杆菌来源 L-阿拉伯糖异构酶理性设计及在 D-塔格糖生产中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1107-1118.
- LI Juan, WU Jing, CHEN Sheng, XIA Wei. Rational design of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* and its application in D-tagatose production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1107-1118 (in Chinese).
- [179] 孙佳琦, 曹燕亭, 吕雪芹, 李江华, 刘龙, 堵国成, 陈坚, 刘延峰. 枯草芽孢杆菌中高效响应 N-乙酰神经氨酸生物传感器的构建[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2502-2516.
- SUN Jiaqi, CAO Yanting, LÜ Xueqin, LI Jianghua, LIU Long, DU Guocheng, CHEN Jian, LIU Yanfeng. Development of biosensors highly responsive to N-acetylneuraminic acid in *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2502-2516 (in Chinese).
- [180] 刘祖怡, 乔邠钠, 杜宇轩, 石选平, 尤甲甲, 饶志明, 王立. 重组枯草芽孢杆菌全细胞高效催化合成 D-甘露糖[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3158-3170.
- LIU Zuyi, QIAO Zhina, DU Yuxuan, SHI Xuanping, YOU Jiajia, RAO Zhiming, WANG Li. Efficient whole-cell biosynthesis of D-mannose by recombinant *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3158-3170 (in Chinese).
- [181] 李冉, 宋聪, 张翔, 贾振华. 类芽孢杆菌来源 D-甘露醇氧化酶的性质及制备 D-甘露糖的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4682-4693.
- LI Ran, SONG Cong, ZHANG Xiang, JIA Zhenhua. Characterization of a D-mannitol oxidase from *Paenibacillus* sp. and its application in the preparation of D-mannose[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4682-4693 (in Chinese).
- [182] 阎冬, 蔡雪, 薛海龙, 甄妮, 吴玉双, 柳志强, 李勉, 郑裕国. 生物法制备甘露醇研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2626-2643.
- YAN Dong, CAI Xue, XUE Hailong, ZHEN Ni, WU Yushuang, LIU Zhiqiang, LI Mian, ZHENG Yugu. Recent advances in the bioproduction of mannitol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2626-2643 (in Chinese).
- [183] 邓连妹, 李娇, 门燕, 孙媛霞, 贾士儒, 朱玥明. 酿酒酵母转化半乳糖醇的工程菌株构建及优化[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1909-1923.
- DENG Lianmei, LI Jiao, MEN Yan, SUN Yuanxia, JIA Shiru, ZHU Yueming. Construction and culture condition optimization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain for production of galactitol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1909-1923 (in Chinese).
- [184] 黄良刚, 肖博文, 王文佳, 李雯, 张为宏, 周俊平, 蔡雪, 张博, 柳志强, 郑裕国. 代谢工程改造解脂耶氏酵母高效合成赤藓糖醇研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 665-686.
- HUANG Lianggang, XIAO Bowen, WANG Wenjia, LI Wen, ZHANG Weihong, ZHOU Junping, CAI Xue,

- ZHANG Bo, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Advances in efficient biosynthesis of erythritol by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 665-686 (in Chinese).
- [185] 吕欣洋, 陈祥松, 姚建铭, 吴金勇, 袁丽霞. 利用大肠杆菌合成 3'-和 6'-唾液酸乳糖的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2846-2865.
LYU Xinyang, CHEN Xiangsong, YAO Jianming, WU Jinyong, YUAN Lixia. Research progress in the synthesis of 3'- and 6'-sialactose by *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2846-2865 (in Chinese).
- [186] 周文, 游星, 张洪涛, 李忠霞, 邓超明, 许淳, 黎玉. 多细胞耦合转化 N-乙酰氨基葡萄糖和乳糖生产唾液酸乳糖[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4621-4634.
ZHOU Wen, YOU Xing, ZHANG Hongtao, LI Zhongxia, DENG Chaoming, XU Chun, LI Yu. Multicellular coupling fermentation for 3'-sialyllactose conversion using N-acetyl-glucosamine and lactose[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4621-4634 (in Chinese).
- [187] 聂雯霞, 古梦洁, 钟卫鸿. 细菌纤维素合成酶亚基多样性和纤维结构形成研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2797-2811.
NIE Wenxia, GU Mengjie, ZHONG Weihong. Research progress in bacterial cellulose synthase subunit diversity and fiber structure formation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2797-2811 (in Chinese).
- [188] 刘嘉恒, 王旭, 彭昭君, 辛波, 钟成. 木葡糖酸醋杆菌运动相关基因的敲除及对细菌纤维素合成的影响[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1856-1867.
LIU Jiaheng, WANG Xu, PENG Zhaojun, XIN Bo, ZHONG Cheng. Knockdown of motility-related genes of *Komagataeibacter xylinus* and its effect on bacterial cellulose synthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1856-1867 (in Chinese).
- [189] 李全飞, 陈乾, 杨凯, 胡凯, 雷鹏, 谷益安, 孙良, 徐虹, 王瑞. Tween 20 对强化骆驼刺泛菌 NX-11 合成胞外多糖的影响[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 921-930.
LI Quanfei, CHEN Qian, YANG Kai, HU Kai, LEI Peng, GU Yi'an, SUN Liang, XU Hong, WANG Rui. Effect of Tween 20 on enhancing extracellular polysaccharide synthesis by *Pantoea alhagi* NX-11[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 921-930 (in Chinese).
- [190] 张凯凯, 万民熙, 章真, 张道敬, 王伟良, 樊飞, 谢静莉, 周焜鹏, 李元广. 纤维裸藻培养及其产物功能的研究与展望[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 705-721.
ZHANG Kaikai, WAN Minxi, ZHANG Zhen, ZHANG Daojing, WANG Weiliang, FAN Fei, XIE Jingli, ZHOU Kunpeng, LI Yuanguang. Advances of studies on culture and product functions of *Euglena gracilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 705-721 (in Chinese).
- [191] 赵敏, 郑雅倩, 于海英, 马旅雁. 鼠李糖脂组分可控生产菌的构建及其鼠李糖脂性能[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 786-798.
ZHAO Min, ZHENG Yaqian, YU Haiying, MA Lüyan. Construction of mono/di-rhamnolipid ratios-manipulable strains and characterization of their corresponding surfactants' activity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 786-798 (in Chinese).
- [192] 张瑞元, 朱翊凡, 曾杜文, 魏士昊, 樊亚超, 廖莎, 赵心清, 张凤丽, 张霖. 利用酵母菌生产有机酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2231-2247.
ZHANG Ruiyuan, ZHU Yifan, ZENG Duwen, WEI Shihao, FAN Yachao, LIAO Sha, ZHAO Xinqing, ZHANG Fengli, ZHANG Lin. Advances on the production of organic acids by yeast[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2231-2247 (in Chinese).
- [193] 鲍青青, 杨光, 陈菲菲, 李国辉, 邓禹. 乙醇酸高产菌株的筛选及发酵[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2418-2431.
BAO Qingqing, YANG Guang, CHEN Feifei, LI Guohui, DENG Yu. Screening and fermentation of high-yield glycolic acid strains[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2418-2431 (in Chinese).
- [194] 郑棚, 闫更轩, 王丽敏, 张云志, 陶勇, 于波. 丙酸的合成生物制造[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2678-2694.
ZHENG Peng, YAN Gengxuan, WANG Limin, ZHANG Yunzhi, TAO Yong, YU Bo. Biomanufacturing of propionic acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2678-2694 (in Chinese).
- [195] 李静, 王玉, 于波, 王丽敏, 鞠建松. 转运蛋白提高凝结芽孢杆菌酸耐受性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3394-3405.
LI Jing, WANG Yu, YU Bo, WANG Limin, JU Jiansong. Using transporter to enhance the acid tolerance of *Bacillus coagulans* DSM1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3394-3405 (in Chinese).
- [196] 郭勇鑫, 王刚, 李柯欣, 韩嘉祺, 陈欢, 张斯童, 李艳丽, 陈光. 结冷胶固定化保加利亚乳杆菌及在玉米秸秆连续发酵 D-乳酸中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1083-1095.
GUO Yongxin, WANG Gang, LI Kexin, HAN Jiaqi, CHEN Huan, ZHANG Sitong, LI Yanli, CHEN Guang. Immobilization of *Lactobacillus bulgaricus* with gellan gum and its application in continuous fermentation of D-lactic acid from corn straw[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1083-1095 (in Chinese).
- [197] 支睿, 卢艳波, 王敏, 李国辉, 邓禹. 生物可降解塑料单体二元羧酸的生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 2081-2094.
ZHI Rui, LU Yanbo, WANG Min, LI Guohui, DENG Yu. Recent progress in the biosynthesis of dicarboxylic acids, a monomer of biodegradable plastics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2081-2094 (in Chinese).
- [198] 王学明, 潘静宇, 吴静, 陈修来, 高聪, 宋伟, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 调控大肠杆菌胞内 ATP 和 NADH 水平促进丁二酸生产[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3236-3252.
WANG Xueming, PAN Jingyu, WU Jing, CHEN Xiulai, GAO Cong, SONG Wei, WEI Wanqing, LIU Jia, LIU Liming. Regulation of intracellular level of ATP and NADH in *Escherichia coli* to promote succinic acid production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3236-3252 (in Chinese).
- [199] 钟驭涛, 尚长宇, 王言东, 李建华, 刘成才, 崔志勇, 祁庆生. 利用酵母细胞工厂合成丁二酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2644-2665.
ZHONG Yutao, SHANG Changyu, WANG Yandong, LI Jianhua, LIU Chengcai, CUI Zhiyong, QI

- Qingsheng. Advances in synthesis of succinic acid using yeast cell factories[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2644-2665 (in Chinese).
- [200] 张静, 元跃, 王智文, 陈涛. 基于工程化盐单胞菌 TDZI-08 一锅法合成衣康酸[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2666-2677.
ZHANG Jing, YUAN Yue, WANG Zhiwen, CHEN Tao. One-pot synthesis of itaconic acid by engineered *Halomonas bluephagenesis* TDZI-08[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2666-2677 (in Chinese).
- [201] 刘洁, 高聪, 陈修来, 郭亮, 宋伟, 吴静, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 代谢工程改造大肠杆菌合成己二酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2375-2389.
LIU Jie, GAO Cong, CHEN Xiulai, GUO Liang, SONG Wei, WU Jing, WEI Wanqing, LIU Jia, LIU Liming. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for adipic acid production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2375-2389 (in Chinese).
- [202] 康雅琦, 罗若诗, 林凡祯, 程杰, 周桢, 王丹. 生物基塑料单体 5-氨基戊酸的生物合成新途径[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 2070-2080.
KANG Yaqi, LUO Ruoshi, LIN Fanzhen, CHENG Jie, ZHOU Zhen, WANG Dan. A new biosynthesis route for production of 5-aminovalanoic acid, a biobased plastic monomer[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2070-2080 (in Chinese).
- [203] 果士婷, 刘盼, 王钰. 1,3-丙二醇的微生物合成: C6-C3-C1 原料体系的转变[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2371-2385.
GUO Shiting, LIU Pan, WANG Yu. Microbial production of 1,3-propanediol: a transition of feedstocks from C6 to C3 and C1 carbon sources[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2371-2385 (in Chinese).
- [204] ZHU FH, LIU DH, CHEN Z. Recent advances in biological production of 1,3-propanediol: new routes and engineering strategies[J]. Green Chemistry, 2022, 24(4): 1390-1403.
- [205] 张少伦, 高聪, 李晓敏, 刘佳, 陈修来, 刘立明. 代谢工程改造克雷伯氏菌生产 1,3-丙二醇[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2386-2402.
ZHANG Shaolun, GAO Cong, LI Xiaomin, LIU Jia, CHEN Xiulai, LIU Liming. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* for 1,3-propanediol production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2386-2402 (in Chinese).
- [206] 姜君逸, 郭艺鸣, 杨套伟, 饶志明. 代谢工程改造大肠杆菌从头合成 1,4-丁二醇[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3142-3157.
JIANG Junyi, GUO Yiming, YANG Taowei, RAO Zhiming. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for de novo synthesis of 1,4-butanediol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3142-3157 (in Chinese).
- [207] 韩业挺, 何志震, 魏婉清, 宋伟, 刘立明, 朱萌, 吴静. 酶法生产 1,4-环己烷二甲胺[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1882-1894.
HAN Yeting, HE Zhizhen, WEI Wanqing, SONG Wei, LIU Liming, ZHU Meng, WU Jing. Enzymatic production of 1,4-cyclohexanedimethylamine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1882-1894 (in Chinese).
- [208] 许睿, 陈方, 丁陈君. 循环生物经济背景下我国塑料降解回收发展的机遇、挑战及建议[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1867-1882.
XU Rui, CHEN Fang, DING Chenjun. Opportunities, challenges and suggestions for the development of plastic degradation and recycling under the context of circular bioeconomy[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1867-1882 (in Chinese).
- [209] 张李婷, 张博, 许维东, 崔中利, 曹慧. 聚乙烯塑料生物降解研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1949-1962.
ZHANG Liting, ZHANG Bo, XU Weidong, CUI Zhongli, CAO Hui. Polyethylene biodegradation: current status and perspectives[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1949-1962 (in Chinese).
- [210] 袁英博, 周汶楷, 梁泉峰, 典龙阳, 苏田源, 祁庆生. 生物降解聚烯烃类塑料研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1930-1948.
YUAN Yingbo, ZHOU Wenkai, LIANG Quanfeng, DIAN Longyang, SU Tianyuan, QI Qingsheng. Advances in biodegradation of polyolefin plastics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1930-1948 (in Chinese).
- [211] 江志通, 陈雪, 雷金晖, 薛慧珍, 张博, 徐晓凡, 耿惠京, 李周坤, 闫新, 董维亮, 曹慧, 崔中利. 聚氨酯塑料降解菌 G-11 的筛选鉴定及其塑料降解特性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1963-1975.
JIANG Zhitong, CHEN Xue, LEI Jinhui, XUE Huizhen, ZHANG Bo, XU Xiaofan, GENG Huijing, LI Zhoukun, YAN Xin, DONG Weiliang, CAO Hui, CUI Zhongli. Screening and identification of a polyurethane-degrading bacterium G-11 and its plastic degradation characteristics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1963-1975 (in Chinese).
- [212] 曾彩婷, 纪俊宾, 丁方慧, 李周坤, 曹慧, 崔中利, 闫新. 一株聚酯型聚氨酯降解菌高地芽孢杆菌 YX8-1 的分离及鉴定[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1976-1986.
ZENG Caiting, JI Junbin, DING Fanghui, LI Zhoukun, CAO Hui, CUI Zhongli, YAN Xin. Isolation and identification of a polyester-polyurethane degrading bacterium *Bacillus altitudinis* YX8-1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1976-1986 (in Chinese).
- [213] 张宗豪, 何宏韬, 张旭, 郑爽, 郑陶然, 刘絮, 陈国强. 塑料的降解与可降解塑料: 聚羟基脂肪酸酯的合成[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 2053-2069.
ZHANG Zonghao, HE Hongtao, ZHANG Xu, ZHENG Shuang, ZHENG Taoran, LIU Xu, CHEN Guoqiang. The degradation of plastics and the production of polyhydroxyalkanoates (PHA)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2053-2069 (in Chinese).
- [214] 金玉凤, 邱佳容, 张良清, 朱梦磊. 聚对苯二甲酸乙二醇酯生物降解的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4445-4462.
JIN Yufeng, QIU Jiarong, ZHANG Liangqing, ZHU Menglei. Biodegradation of polyethylene terephthalate: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4445-4462 (in Chinese).
- [215] 赵之怡, 张国强, 刘琨, 李盛英. 聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1998-2014.
ZHAO Zhiyi, ZHANG Guoqiang, LIU Kun, LI Shengying. Advances in poly(ethylene terephthalate) hydrolases[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1998-2014 (in Chinese).

- [216] 张晗笑, 肖云杰, 杨海涛, 王泽方. 聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶检测方法的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3219-3235.
ZHANG Hanxiao, XIAO Yunjie, YANG Haitao, WANG Zefang. Detection methods for polyethylene terephthalate degrading enzymes: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3219-3235 (in Chinese).
- [217] 赵夷培, 王浩, 武攀, 李志帅, 刘夫锋, 顾群, 刘卫东, 高健, 韩旭. 来源于海洋宏基因组塑料降解酶 Ple629 的耐热性提升改造[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 2040-2052.
ZHAO Yipei, WANG Hao, WU Pan, LI Zhishuai, LIU Fufeng, GU Qun, LIU Weidong, GAO Jian, HAN Xu. Engineering the plastic degradation enzyme Ple629 from marine consortium to improve its thermal stability[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2040-2052 (in Chinese).
- [218] DAI LH D, QU YY, HUANG JW, HU YM, HU HB, LI SY, CHEN CC, GUO RT. Enhancing PET hydrolytic enzyme activity by fusion of the cellulose-binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 334: 47-50.
- [219] 姚佳鑫, 江雅儒, 郝梦瑶, 梁梦想, 顾正华, 张梁, 郭忠鹏. 通过碳水化合物结合模块增强 LCC-ICCG 的 PET 降解效率[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3705-3721.
YAO Jiaxin, JIANG Yaru, HAO Mengyao, LIANG Mengxiang, GU Zhenghua, ZHANG Liang, GUO Zhongpeng. Enhancing PET degradation efficiency through fusing carbohydrate-binding modules in LCC-ICCG[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3705-3721 (in Chinese).
- [220] 杨媚媛, 樊芳芳, 何灵娟, 陈杰, 王林泉, 邱帅, 吕常江, 黄俊. 对苯二甲酸单羟乙酯水解酶结构与功能的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2812-2830.
YANG Meiyuan, FAN Fangfang, HE Lingjuan, CHEN Jie, WANG Linquan, QIU Shuai, LYU Changjiang, HUANG Jun. Advances in the structure and function of MHETase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2812-2830 (in Chinese).
- [221] 刘欣悦, 耿文超, 孙璠原, 陈泽华, 崔颖璐, 吴边. 基于结构信息的 MHET 降解酶挖掘及温和温度下的酶级联塑料降解[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 773-785.
LIU Xinyue, GENG Wenchao, SUN Jinyuan, CHEN Zehua, CUI Yinglu, WU Bian. Structure motif guided mining of MHET hydrolase and development of a two-enzyme cascade for plastics depolymerization at mild temperature[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 773-785 (in Chinese).
- [222] 陈阳阳, 高健, 赵夷培, 王浩, 韩旭, 张洁, 顾群, 侯颖, 刘卫东. 来源于嗜热氢化杆菌的新型对苯二甲酸双(羟乙)酯水解酶的表达纯化与酶学性质[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 2015-2026.
CHEN Yangyang, GAO Jian, ZHAO Yipei, WANG Hao, HAN Xu, ZHANG Jie, GU Qun, HOU Ying, LIU Weidong. Expression, purification and characterization of a novel bis(hydroxyethyl) terephthalate hydrolase from *Hydrogenobacter thermophilus*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2015-2026 (in Chinese).
- [223] 张洁, 单瑞达, 李霞, 曾志雄, 孙登岳. 来源于糖丝菌双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯水解酶的酶学性质表征及降解特性分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 2027-2039.
ZHANG Jie, SHAN Ruida, LI Xia, ZENG Zhixiong, SUN Dengyue. Enzymatic properties and degradation characterization of a bis(2-hydroxyethyl) terephthalate hydrolase from *Saccharothrix* sp.[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 2027-2039 (in Chinese).
- [224] 郑芷然, 丛琳, 李志帅, 刘卫东, 游松, 韩旭. 一种新型聚酰胺水解酶的鉴定和性质分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3103-3113.
ZHENG Zhiran, CONG Lin, LI Zhishuai, LIU Weidong, YOU Song, HAN Xu. Identification and characterization of a novel polyamide hydrolase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3103-3113 (in Chinese).
- [225] 谢彬, 白茸茸, 孙华山, 周小力, 董维亮, 周杰, 姜岷. 聚乳酸塑料合成、生物降解及其废弃物处置的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1912-1929.
XIE Bin, BAI Rongrong, SUN Huashan, ZHOU Xiaoli, DONG Weiliang, ZHOU Jie, JIANG Min. Synthesis, biodegradation and waste disposal of polylactic acid plastics: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1912-1929 (in Chinese).
- [226] 李志刚, 陈世恒, 孔德民, 陈晟, 王蕾, 吴敬. 短须嗜热单孢菌聚羟基脂肪酸酯解聚酶的表达、热稳定性改造及在 PHB 降解中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3351-3363.
LI Zhigang, CHEN Shiheng, KONG Demin, CHEN Sheng, WANG Lei, WU Jing. Expression, thermal stability modification and application in PHB degradation of polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Thermomonospora umbrina*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3351-3363 (in Chinese).
- [227] 王慧, 吴敬, 陈晟, 夏伟. 角质酶在生物可降解聚酯聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯降解中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1987-1997.
WANG Hui, WU Jing, CHEN Sheng, XIA Wei. Application of cutinase in the degradation of biodegradable polyester poly(butylene adipate-co-terephthalate)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1987-1997 (in Chinese).
- [228] 冯赛赛, 柳利平, 张亮亮, 徐建国. 肠道微生物资源库的构建: 进展、方法和展望[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4463-4481.
FENG Saisai, LIU Liping, ZHANG Liangliang, XU Jianguo. Construction of gut microbial culture banks: advances, methods and perspectives[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4463-4481 (in Chinese).
- [229] 马湘宁, 张璐佳, 高健玮, 陈芳. 粪菌移植治疗神经系统疾病的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1293-1308.
MA Xiangning, ZHANG Lujia, GAO Jianwei, CHEN Fang. Advances in the application of fecal microbiota transplantation for the treatment of nervous system diseases[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1293-1308 (in Chinese).
- [230] 李向阳, 史鹏程, 张乐, 王慧, 尤晓颜, 赵国屏. 肠芯片在宿主-微生物互作中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2916-2933.
LI Xiangyang, SHI Pengcheng, ZHANG Le, WANG Hui, YOU Xiaoyan, ZHAO Guoping. Advances of gut-on-a-chip for exploring host-microbe interactions[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2916-2933 (in Chinese).

- [231] 邹丹阳, 董雨萌, 陈晶瑜. 活体生物药: 生物技术推动的创新药研发前沿[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1275-1289.
ZOU Danyang, DONG Yumeng, CHEN Jingyu. Live biotherapeutic products: the forefront of innovative drug development driven by biotechnology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1275-1289 (in Chinese).
- [232] 华婷婷, 郑斌, 白洋. 活细菌作为抗肿瘤药物递送载体的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3861-3871.
HUA Tingting, ZHENG Bin, BAI Yang. Advances in the application of live bacteria as vehicles for delivering antitumor drugs[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3861-3871 (in Chinese).
- [233] 张娇, 陈江峰, 陈奕璇, 戴磊, 戴卓君. 合成功能菌群的构建及其工程化应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2517-2545.
ZHANG Jiao, CHEN Jiangfeng, CHEN Yixuan, DAI Lei, DAI Zhuojun. Engineering microbial consortia through synthetic biology approach[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2517-2545 (in Chinese).
- [234] 白歆奕, 张梦君, 张广豹, 黄艺. 合成微生物群落构建及其在聚羟基脂肪酸酯生物合成中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 722-738.
BAI Xinyi, ZHANG Mengjun, ZHANG Guangbao, HUANG Yi. Construction of synthetic microbial community and its application in polyhydroxyalkanoate biosynthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 722-738 (in Chinese).
- [235] 汤晓玲, 陈静祥, 柳志强, 郑裕国. 基于工业环境扰动的微生物适应性进化[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 993-1008.
TANG Xiaoling, CHEN Jingxiang, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Adaptive evolution of microorganisms based on industrial environmental perturbations[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 993-1008 (in Chinese).
- [236] 叶可嘉, 吴豪博, 刘春风, 钮成拓, 郑飞云, 李崎, 王金晶. 异柠檬酸脱氢酶基因调控对拉格酵母抗自溶性能的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3451-3463.
YE Kejia, WU Haobo, LIU Chunfeng, NIU Chengtuo, ZHENG Feiyun, LI Qi, WANG Jinjing. Manipulation of isocitrate dehydrogenase genes affects the anti-autolytic ability of lager yeast[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3451-3463 (in Chinese).
- [237] 程万琪, 侯骞尧, 刘春风, 钮成拓, 郑飞云, 李崎, 王金晶. 线粒体自噬基因对酿酒酵母抗氧化性能的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3464-3480.
CHENG Wanqi, HOU Qianyao, LIU Chunfeng, NIU Chengtuo, ZHENG Feiyun, LI Qi, WANG Jinjing. Effect of mitophagy related genes on the antioxidant properties of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3464-3480 (in Chinese).
- [238] 高嘉玮, 朱晓飞, 孙韬, 陈磊, 张卫文. 实验室适应性进化技术在光合蓝细菌底盘工程中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3075-3094.
GAO Jiawei, ZHU Xiaofei, SUN Tao, CHEN Lei, ZHANG Weiwen. Advances in using adaptive laboratory evolution technology for engineering of photosynthetic cyanobacteria[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3075-3094 (in Chinese).
- [239] 胡彤, 李爽, 钟卫鸿. 基于酸信号转导系统的细菌耐酸机制及其应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 644-664.
HU Tong, LI Shuang, ZHONG Weihong. Bacterial acid tolerance mechanism based on acid signal transduction system and its applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 644-664 (in Chinese).
- [240] 吴娜莎, 孙亚琴, 修志龙. 耐高渗克鲁斯假丝酵母的耐受性[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 908-920.
WU Nasha, SUN Yaqin, XIU Zhilong. Tolerance of hyperosmolar *Candida krusei*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 908-920 (in Chinese).
- [241] 李旺宁, 梁梦静, 杨泽, 李亚男, 张春辉, 季春丽, 李润植, 秦松, 薛金爱, 崔红利. 莱茵衣藻丝/苏氨酸蛋白激酶突变株蓝光响应的表征[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4563-4579.
LI Wangning, LIANG Mengjing, YANG Ze, LI Yanan, ZHANG Chunhui, JI Chunli, LI Runzhi, QIN Song, XUE Jinai, CUI Hongli. Characterization of the response of *Chlamydomonas reinhardtii* serine/threonine protein kinase mutant to blue light[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4563-4579 (in Chinese).
- [242] 许森, 宋玉, 张静金秋, 赵叶瑜, 耿华曼, 翁晓刚, 刘忠华, 程金菊, 颜廷胜. 不同尺寸形貌抑冰微纳材料对细胞冷冻保护性能的影响[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2294-2307.
XU Miao, SONG Yu, ZHANG Jingjin, ZHAO Yeyu, GENG Huaman, WENG Xiaogang, LIU Zhonghua, CHENG Jinju, YAN Tingsheng. Cryoprotective effects of deicing micro/nanomaterials with different sizes and shapes on cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2294-2307 (in Chinese).
- [243] 杜雪儿, 周琳琳, 张帆, 李永, 赵聪聪, 王腊梅, 姚军虎, 曹阳春. 不同碳源诱导下牦牛瘤胃厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 的产酶机制[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4927-4938.
DU Xue'er, ZHOU Linlin, ZHANG Fan, LI Yong, ZHAO Congcong, WANG Lamei, YAO Junhu, CAO Yangchun. Enzyme production mechanism of anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. YF3 in yak rumen induced by different carbon source[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4927-4938 (in Chinese).
- [244] 李乐, 彭程, 于坤朋, 唐艺玲, 林燕玲, 李利君, 倪辉, 李清彪. 黑曲霉 β -木糖苷酶 An-xyl 的重组表达与木糖耐受性表征[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4593-4607.
LI Le, PENG Cheng, YU Kunpeng, TANG Yiling, LIN Yanling, LI Lijun, NI Hui, LI Qingbiao. Expression of β -xylosidase An-xyl from *Aspergillus niger* and characterization of its xylose tolerance[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4593-4607 (in Chinese).
- [245] 何金见, 沈风飞, 刘鑫涵, 杨天均, 李宝通, 石鹏君, 刘慧芹, 曾婉宁. 嗜酸古菌 *Cuniculiplasma divulgatum* 来源的 GH1 家族中温 β -葡萄糖苷酶 CdBglA 的原核表达及酶学性质分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4694-4707.
HE Jinjian, SHEN Fengfei, LIU Xinhuan, YANG Tianjun, LI Baotong, SHI Pengjun, LIU Huiqin, ZENG Wanning. Expression and characterization of mesophilic GH1 β -glucosidase CdBglA from acidophilic *Cuniculiplasma divulgatum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4694-4707 (in Chinese).

- [246] 王彤, 陆亮宇, 申晓林, 孙新晓, 王佳, 袁其朋. 构建微生物细胞工厂利用木糖合成高值化学品[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2695-2709.
WANG Tong, LU Liangyu, SHEN Xiaolin, SUN Xinxiao, WANG Jia, YUAN Qipeng. Construction of microbial cell factories for synthesizing value-added chemicals with xylose[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2695-2709 (in Chinese).
- [247] 王倩, 高教琪, 周雍进. 葡萄糖和木糖高效共利用代谢工程研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2710-2730.
WANG Qian, GAO Jiaoqi, ZHOU Yongjin. Metabolic engineering for the efficient co-utilization of glucose and xylose[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2710-2730 (in Chinese).
- [248] 冯骁, 邓泽, 郭红光, 公丽, 刘丁瑞, 冯玺阳. 地质封存二氧化碳微生物转化研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2884-2898.
FENG Xiao, DENG Ze, GUO Hongguang, GONG Li, LIU Dingrui, FENG Xiyang. Research advances of microbial transformation of CO₂ in geological sequestration[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2884-2898 (in Chinese).
- [249] 干雅梅, 郭亮, 高聪, 宋伟, 吴静, 刘立明, 陈修来. 光驱动二氧化碳转化系统的构建、优化与应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2390-2409.
GAN Yamei, GUO Liang, GAO Cong, SONG Wei, WU Jing, LIU Liming, CHEN Xiulai. Light-driven CO₂ conversion system: construction, optimization and application[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2390-2409 (in Chinese).
- [250] 周雨, 阮祚禧, 方崇, 陈小燕, 徐惠娟, 王忠铭, 袁振宏. 一碳气体利用微生物及其基因工程改造[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3125-3142.
ZHOU Yu, RUAN Zuoxi, FANG Chong, CHEN Xiaoyan, XU Huijuan, WANG Zhongming, YUAN Zhenhong. Bioconversion of C1 gases and genetic engineering modification of gas-utilizing microorganisms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3125-3142 (in Chinese).
- [251] 王薇廷, 焦子悦, 侯千姿, 郭树奇, 费强. 一碳气体生物转化合成油脂类化学品的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2866-2883.
WANG Weiting, JIAO Ziyue, HOU Qianzi, GUO Shuqi, FEI Qiang. Research progress in bioconversion of C1 gases into oleochemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2866-2883 (in Chinese).
- [252] 白振敏, 郭妹媛, 杨一群, 庄周康, 曹文兵, 杨研, 于涛, 汤红婷. 微生物利用 CO₂ 及其低碳衍生物为原料制备粮食类产物的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2731-2746.
BAI Zhenmin, GUO Shuyuan, YANG Yiqun, ZHUANG Zhoukang, CAO Wenbing, YANG Yan, YU Tao, TANG Hongting. Microbial production of food compounds with carbon dioxide and derived low-carbon molecules as substrates[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2731-2746 (in Chinese).
- [253] 宋少宇, 纪秀玲, 栾力焜, 张莹, 黄玉红. CO₂ 生物转化关键酶固定体系构筑研究进展与挑战[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3143-3168.
SONG Shaoyu, JI Xiuling, LUAN Likun, ZHANG Ying, HUANG Yuhong. Development of enzyme immobilization systems for CO₂ bioconversion: advances and challenges[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3143-3168 (in Chinese).
- [254] 万赛, 王皓明, 马小清, 谭扬, 刘立成, 李福利. 碳—气体生物转化中的产乙酸菌改造与发酵工艺优化[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2410-2429.
WAN Sai, WANG Haoming, MA Xiaoqing, TAN Yang, LIU Licheng, LI Fuli. Genetic modification of acetogens and optimization of fermentation process in C1-gas bioconversion[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2410-2429 (in Chinese).
- [255] 刘康, 乔杨怡, 张尚杰, 郭峰, 马江锋, 信丰学, 章文明, 姜岷. 甲醇生物转化合成化学品的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2430-2448.
LIU Kang, QIAO Yangyi, ZHANG Shangjie, GUO Feng, MA Jiangfeng, XIN Fengxue, ZHANG Wenming, JIANG Min. Advances in biotransformation of methanol into chemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2430-2448 (in Chinese).
- [256] 汪淑贤, 方嘉煜, 张延平, 李寅, 朱泰承. 天然甲醇化学品细胞工厂改造进展与展望[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2747-2760.
WANG Shuxian, FANG Jiayu, ZHANG Yanping, LI Yin, ZHU Taicheng. Progress and perspectives of natural cell factories for chemical production from methanol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2747-2760 (in Chinese).
- [257] 罗艳, 张静超. IV 型菌毛可视化方法及其在菌毛功能研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4534-4549.
LUO Yan, ZHANG Jingchao. Visualization method of type IV pili and its application in the study of pili function[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4534-4549 (in Chinese).
- [258] ELLISONCK, DALIA TN, VIDAL CEBALLOS A, WANG JCY, BIAIS N, BRUN YV, DALIA AB. Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in *Vibrio cholerae*[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(7): 773-780 (in Chinese).
- [259] MAIER B, POTTER L, SO M, SEIFERT HS, SHEETZ MP. Single pilus motor forces exceed 100 pN[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(25): 16012-16017 (in Chinese).
- [260] 姜淼, 李艳冉. 奥奈达希瓦氏菌电活性生物被膜的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 881-897.
JIANG Miao, LI Yanran. Advances in electrochemically active biofilm of *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 881-897 (in Chinese).
- [261] 张保财, 王忆芸, 石思程, 李锋, 宋浩. 人工电活性微生物菌群的设计与应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 858-880.
ZHANG Baocai, WANG Yiyun, SHI Sicheng, LI Feng, SONG Hao. Design and applications of synthetic electroactive microbial consortia[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 858-880 (in Chinese).
- [262] 连英丽, 余勇江, 陈胜锋, 李建军, 曹渭, UGO Marzocchi, 杨永刚. 微生物电化学呼吸管的原理、结构及其在污染环境治理中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3460-3470.

- LIAN Yingli, YU Yongjiang, CHEN Shengfeng, LI Jianjun, CAO Wei, UGO Marzocchi, YANG Yonggang. Microbial electrochemical snorkels: principle, structure, and applications in environmental amelioration[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3460-3470 (in Chinese).
- [263] 柯霞, 余欢, 李一鑫, 潘婉婷, 唐素琴, 薛亚平. 污水脱氮人工多细胞体系的设计与应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1806-1832.
KE Xia, YU Huan, LI Yixin, PAN Wanting, TANG Suqin, XUE Yaping. Design and application of artificial multicellular systems for nitrogen removal from wastewater[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1806-1832 (in Chinese).
- [264] 谢莱, 杨敏, 杨恩喆, 刘志华, 耿欣, 陈宏. 生物电化学耦合厌氧氨氧化强化脱氮及其微生物群落特征[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2719-2729 (in Chinese).
XIE Lai, YANG Min, YANG Enzhe, LIU Zhihua, GENG Xin, CHEN Hong. Enhanced nitrogen removal by bioelectrochemical coupling anammox and characteristics of microbial communities[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2719-2729.
- [265] 刘欢, 陈旺, 谭森文, 梁思雨, 杨晨曦, 张千. 不动杆菌 *Acinetobacter* sp. TAC-1 利用聚(3-羟基丁酸酯-co-3-羟基戊酸酯)的碳代谢机理[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4663-4681.
LIU Huan, CHEN Wang, TAN Senwen, LIANG Siyu, YANG Chenxi, ZHANG Qian. An examination of the carbon metabolic pathways in *Acinetobacter* sp. TAC-1 in the context of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) utilization[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4663-4681 (in Chinese).
- [266] 郭长捷, 王伟刚, 王亚宜. 厌氧颗粒污泥微生物群落结构与功能的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4517-4533.
GUO Changjie, WANG Weigang, WANG Yayi. Recent advances in the structure and function of microbial community in anaerobic granular sludge[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4517-4533.
- [267] 郭旭, 周有彩, 何勇锦, 陈必链, 王明兹. 衣藻中试修复稀土氨氮废水[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3781-3794.
GUO Xu, ZHOU Youcai, HE Yongjin, CHEN Bilian, WANG Mingzi. Pilot-scale bioremediation of rare earths wastewater by *Chlamydomonas* sp. YC[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3781-3794 (in Chinese).
- [268] 李赛月, 吕凤娇, 赵桂煜, 王恩毅, 音建华, 余志良, 孟秋. 微生物全细胞传感器在芳香族化合物检测中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2899-2915.
LI Saiyue, LYU Fengjiao, ZHAO Guiyu, WANG Enyi, YIN Jianhua, YU Zhiliang, MENG Qiu. Advances in microbial whole-cell sensors for the detection of aromatic compounds[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2899-2915 (in Chinese).
- [269] 许殷铭, 任慧平, 田凯, 余志良, 孟秋. 细菌吸附及转运芳香族化合物的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 961-977.
XU Yinming, REN Huiping, TIAN Kai, YU Zhiliang, MENG Qiu. Advances in bacterial adsorption and transport of aromatic compounds[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 961-977 (in Chinese).
- [270] 张玥, 赵联芳, 田坤, 江煜, 马瑞, 刘云. 一株 1,4-二噁烷降解菌的分离及其降解性能解析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3722-3749.
ZHANG Yue, ZHAO Lianfang, TIAN Kun, JIANG Yu, MA Rui, LIU Yun. Isolation and degradation characterization of a 1,4-dioxane-degrading bacterial strain[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3722-3749 (in Chinese).
- [271] 叶振城, 苏亦凡, 杨云锋. 基于分子生物学的微生物修复技术在石油污染环境中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 739-757.
YE Zhencheng, SU Yifan, YANG Yunfeng. The application of molecular biology-based microbial remediation technologies in petroleum polluted environments[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 739-757 (in Chinese).
- [272] 徐文婷, 陈国梁, 屈志慧, 梁碧心, 毛腾, 梁欢, 陈章, 李志贤. 微生物在镉污染土壤修复中的应用及其作用机理[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2612-2623.
XU Wenting, CHEN Guoliang, QU Zhihui, LIANG Bixin, MAO Teng, LIANG Huan, CHEN Zhang, LI Zhixian. Microbial remediation of cadmium-contaminated soils and its mechanisms: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2612-2623 (in Chinese).
- [273] 王梁燕, 戴商, 金妙仁, 洪奇华. 重金属污染水环境的微生物修复技术[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3427-3440.
WANG Liangyan, DAI Shang, JIN Miaoren, HONG Qihua. Microbial remediation of heavy metal-polluted water[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3427-3440 (in Chinese).
- [274] 廖谭聪, 叶莲, 林轶文, 龙欢, 张宝龙, 黄开耀. 镉结合蛋白 CADR 在莱茵衣藻细胞表面的展示及应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3689-3704.
LIAO Tancong, YE Lian, LIN Yiwen, LONG Huan, ZHANG Baolong, HUANG Kaiyao. Surface display and application of cadmium-binding protein CADR on the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3689-3704 (in Chinese).
- [275] 张晨曦, 刘鼎阔. 细菌群集运动特性的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3188-3203.
ZHANG Chenxi, LIU Dingkuo. Characterization of bacterial swarming motility: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3188-3203 (in Chinese).
- [276] 曾小美, 朱泽熙, 翁俊. 合成生物学产品商业化安全监管思考[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 758-772.
ZENG Xiaomei, ZHU Zexi, WENG Jun. Reflections on the safety regulation of commercialization of synthetic biology products[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 758-772 (in Chinese).
- [277] 王晋, 宋馨宇, 陈磊, 张卫文. 工程微藻的生物安全风险、管控及生物封存[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2948-2967.
WANG Jin, SONG Xinyu, CHEN Lei, ZHANG Weiwen. Biosafety risks, control, and biocontainment of engineered microalgae[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2948-2967 (in Chinese).