

· 导 读 ·

本期主要围绕 DNA 重组技术, 生物活材料, 可控裂解系统, 酶的快速检测、理性设计和高效表达, 酶的金属有机框架固定化技术, 血红素、胶原蛋白和甾体化合物, 电活性微生物和金属生物浸出进行导读。

DNA 重组技术

微生物中一些代谢产物的生物合成, 往往由一个长度为几 kb 到几十 kb 的基因簇负责完成。若希望实现这些代谢产物的异源生物合成, 除了通过质粒进行重组 DNA 操作, 研究者更希望能够将大片段 DNA 整合到染色体中, 以获得具有稳定表型的工程菌株。吴雨薇等^[1]总结了近年来微生物大片段 DNA 染色体整合技术取得的进展, 详细介绍了基于同源重组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、转座子介导的染色体基因随机整合、II 类内含子介导的染色体基因整合以及结合 CRISPR-Cas 系统的染色体基因定向整合。作者还比较了这些大片段 DNA 染色体整合技术的效率、整合位点和操作容易程度, 对构建需要进行大片段 DNA 操作的细胞工厂具有参考意义。

生物活材料

基于生物被膜的形成机制, 可以开发出不同的功能活性材料。为了开发能够将微生物菌株持久滞留在肠道的活性材料, 张明慧等^[2]将一个稳定共价连接系统中的 SpyTag 和 SpyCatcher 分别展示在两个不同菌株表面, 两菌株之间通过

SpyTag 和 SpyCatcher 的结合发生原位交联, 可以形成大的网格状聚集体, 从而构建出一种双菌“锁扣”型生物活材料生产系统。作者利用共聚焦成像和微流控平台证实了体外聚集效果, 并通过小鼠实验证明该双菌体系在肠道内的滞留效果优于单一菌株, 为生物活材料的体内应用提供了一种新的思路。

可控裂解系统

许多由微生物宿主合成的功能蛋白需要释放至胞外以发挥作用。除了分泌表达, 诱导宿主裂解也是释放功能蛋白的一种方式。这种方式没有宿主的限制, 而且可以限制环境中宿主微生物的数量, 在疾病治疗等特定场景下具有应用价值。裂解基因盒子通常由穿孔素、内容素和跨膜蛋白组成, 表达裂解基因的理想诱导系统需要足够低的背景表达量和足够高的诱导表达量, 因此诱导系统的系统表征, 对在不同的宿主内构建裂解系统十分重要。付生伟和金帆^[3]深入分析了阿拉伯糖和鼠李糖两类诱导系统 5 个裂解基因盒子引发的细菌裂解行为, 在此基础上, 利用可在近红外光照射下合成第二信使分子 c-di-GMP 的光遗传学工具和一个裂解基因盒子, 展示了如何通过光遗传学技术控制一种可裂解的工程化铜绿假单胞菌进行表面

修饰, 研究结果增加了对裂解基因盒子在不同条件下引发宿主裂解行为的认识。

酶的快速检测、理性设计和高效表达

α -淀粉酶是最重要的工业酶之一, 人类胰腺和唾液产生 α -淀粉酶也常被用作医学诊断和治疗的生物标志物。很多应用场景下需要对 α -淀粉酶活性进行快速准确的检测, 但常用的 α -淀粉酶检测方法都是基于分光光度法测定淀粉含量的降低或还原糖含量的增加, 这些方法通量比较低, 也无法实现实时监测。张娜英和杨广宇^[4]总结了近年来高通量、高精度 α -淀粉酶检测方法的进展。这些方法包括基于葡萄糖氧化酶/过氧化物酶的紫外光谱法-级联酶法, 基于荧光底物氟硼二吡咯染料-淀粉之间关系、基于饱和碘-淀粉络合物与荧光素钠之间关系的荧光光谱法以及基于四苯乙烯与麦芽三糖共价连接的荧光探针, 以及在线毛细管电泳法、高效液相色谱-光二极管阵列检测器-质谱法、等温量热法、电化学分析法、免疫传感法、纸基传感法、基于液滴的一次性传感器贴片等。其中, 荧光信号偶联液滴微流控筛选技术的 BODIPY-淀粉荧光法, 可以用于高通量筛选 α -淀粉酶突变菌株; 四苯乙烯与麦芽三糖共价连接的荧光探针检测限低, 线性范围宽, 只需要 3 min 即可完成检测, 已用于临床检测。 α -淀粉酶在不同领域的广泛应用, 带动了对快速灵敏检测方法的需求, 研发更加灵敏的底物和更加通用的方法, 不仅对 α -淀粉酶的检测十分重要, 对其他酶活性的检测也具有参考价值。

D-塔格糖甜度略低于蔗糖, 但其热量还不

到蔗糖的 40%, 因而是一种低热量的甜味剂, 可在 L-阿拉伯糖异构酶催化下, 由 D-半乳糖异构得到。由于 L-阿拉伯糖异构酶的天然底物是 L-阿拉伯糖(5 碳), 当 L-阿拉伯糖催化非天然底物 D-半乳糖(6 碳)异构反应时, 酶和底物的结合存在空间位阻, 导致亲和性差、催化效率和转化率低。李娟等^[5]对来自发酵乳杆菌的 L-阿拉伯糖异构酶的底物结合口袋进行理性设计, 将与底物结合的氨基酸残基进行定点突变, 发现将 279 和 185 位点突变为侧链较小氨基酸, 其对 D-半乳糖转化率均有不同程度的提高, 但改变相互作用力的突变都无法提高对 D-半乳糖的转化率。185 位点突变为丙氨酸且 279 位点突变为异亮氨酸的突变株对 D-半乳糖的活性最高, 催化效率达到野生型的 8 倍。作者采用枯草芽孢杆菌表达重组酶, M185A/F279I 突变体对 D-半乳糖的转化率可接近 23%, 比野生型的转化率(不到 20%)提高了 3 个百分点。异构化效率是制约 D-塔格糖等功能糖生产的关键瓶颈, 进一步提高糖异构转化率需要有新的思路和策略。

L-天冬酰胺酶可降解血液中的 L-天冬酰胺从而抑制肿瘤细胞生长, 或减少丙烯酰胺的合成, 因此在医药和食品安全方面具有重要应用价值。目前 L-天冬酰胺酶较低的酶活水平限制了其应用。大肠杆菌、毕赤酵母、枯草芽孢杆菌是 L-天冬酰胺酶的常用异源表达宿主, 摇瓶酶活超过 100 U/mL。杨新愿等^[6]采用食品级的地衣芽孢杆菌为表达宿主, 通过测试 5 种信号肽、4 种强启动子与 3 种不同的地衣芽孢杆菌宿主, 发现枯草芽孢杆菌 168 中果聚糖酶 SacC 的信号肽 SPSacC 更适宜于分泌表达, 采用地

衣芽胞杆菌 BL10 和串联启动子 $P_{ykdA-P43}$ 时, 摇瓶酶活接近 500 U/mL, 为 L-天冬酰胺酶的工业生产奠定了基础。

酶的金属有机框架固定化技术

酶的固定化技术是提高酶的催化稳定性和使用寿命的重要手段。采用传统固定化方法制备的固定化酶, 仍存在浸出、变性、传质与传热效率受限等问题。金属-有机框架(MOFs)是由金属离子或金属簇与有机配体通过配位键等作用自组装形成的一种多孔结晶骨架, 具有活性部位多、比表面积大、孔隙率高、热稳定性好等特点, 越来越多地用于酶的固定化研究。大多数 MOFs 只有小于 2 nm 的微孔结构, 近年来出现的具有微孔(<2 nm)、介孔(2–50 nm)、大孔(>50 nm)中任意两级或三级孔结构的多级孔 MOFs, 其中的介孔和大孔结构更有利于酶的固定化。陈雅维等^[7]总结了多级孔 MOFs 固定化酶的策略以及多级孔 MOFs 固定化酶在生物催化、生物传感和生物医药等方面的最新应用进展。可用于固定化酶的多级孔 MOFs 的材料仍十分有限, 多级孔 MOFs 大规模制备的高成本是限制工业应用的最主要瓶颈, 较有可能在高值的生物医药领域先取得突破。

丙谷二肽是一种特殊的生物活性肽, 已被多国批准上市作为注射液的主要营养成分, 用于术后患者的康复。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这 3 种蛋白酶能够以非保护的氨基酸作为底物催化合成丙谷二肽。其中, 非核糖体肽合成酶的肽生物合成机制认识还不清楚, L-氨基酸连接酶的催化效率低且底物特异性较差。 α -氨基酸酯酰基

转移酶催化合成丙谷二肽的效率较高, 但催化过程稳定性较差。为解决这一问题, 张营康等^[8]利用类沸石咪唑酯骨架材料兼具传统沸石和金属有机框架材料的优点, 在比表面积、孔体积、孔道结构、稳定性等方面都具有很好的优势, 将含有 α -氨基酸酯酰基转移酶的大肠杆菌细胞与形成类沸石咪唑酯骨架材料的原料液直接混合, 获得了具有 α -氨基酸酯酰基转移酶的纳米颗粒, 重复使用 7 次后, 其相对活性仍能保持 67%左右; 储存 4 d 后, 仍能保留有初始酶活的 50%左右, 为提高生物催化和生物转化过程中酶的稳定性提供了一种新方法。

血红素、胶原蛋白和甾体化合物

关于替代蛋白肉中呈色剂的需求催生了对血红素的关注。血红素是一种含铁的卟啉化合物, 生物合成途径比较复杂。刘佳萌等^[9]采用食品级的解淀粉芽胞杆菌生产血红素。与通过改造已经能够合成血红素的大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌不同, 在解淀粉芽胞杆菌中, 血红素生物合成基因分布在 4 个基因簇上, 少于大肠杆菌的 8 个和谷氨酸棒杆菌的 5 个。在 *hemAXCDBL* 基因簇上, 谷氨酰-tRNA 还原酶 HemA 的表达水平和血红素合成的关键前体 5-氨基乙酰丙酸呈正相关, 而细胞色素组装蛋白 HemX 则对 HemA 的浓度具有负调节作用。作者敲除 *hemX* 基因, 发现 *hemACDBL* 以及 *hemQ* 基因的转录水平上调, 且血红素产量有所提高; 添加 5-氨基乙酰丙酸可以进一步提高血红素产量。

胶原蛋白是由多个原胶原组装形成的纤维状蛋白质, 占机体总蛋白含量的 30%。原胶

原由 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,其肽链一级结构具有(甘氨酸-X-Y) n 重复单位,其中 X 和 Y 常为脯氨酸和羟脯氨酸,有些时候为赖氨酸和羟赖氨酸。已经发现 29 种不同类型的胶原蛋白,可分为四大类:纤维型胶原、三螺旋纤维型胶原、网状型胶原和间断螺旋型胶原。细胞的核糖体合成 1 000 多个氨基酸残基的胶原蛋白肽链后,转入内质网中通过羟基化和糖基化修饰形成溶胶原蛋白,然后形成三股螺旋的前胶原分泌至细胞外。经内切酶作用后,形成原胶原蛋白并自动聚合成胶原纤维,经过一系列生化反应,最终形成不溶性的胶原纤维。传统的胶原蛋白主要从动物源中提取,通过基因工程的方法可以生产重组人源化胶原蛋白,或重组类胶原蛋白,这些胶原蛋白作为Ⅱ类或Ⅲ类医疗器械均有重要应用价值。叶滔等^[10]总结了近年来胶原蛋白的研发和应用进展。胶原蛋白领域发展非常快,目前有巨子生物、华熙生物等头部企业在生产销售不同类型的胶原蛋白,但是真正的重组人胶原蛋白,即制备人胶原蛋白特定型别基因编码的全长氨基酸序列,且有三螺旋结构,在技术上还存在相当大的挑战。

甾体化合物是一类广泛存在于自然界中重要的特殊多元环萜类化合物,经过 C1,2 双键、酮基、羟基、烷基或卤素原子等系统修饰后形成的甾体药物,具有显著的抗炎、抗过敏、抗病毒、抗感染、抗肿瘤以及抗休克等药理活性作用,是仅次于抗生素的第二大类化学药。传统上,甾体药物通过“薯蓣皂素-双烯醇酮”的化学半合成路线生产,污染较大。近年来,已经可以用廉价的植物甾醇为原料,通过微生物降

解代谢生产所需要的关键甾药中间体,如 4-雄烯二酮,“植物甾醇-雄烯二酮-甾体药物”的生物合成新路线正在逐渐形成。植物甾醇在微生物体内的代谢途径可简化甾体侧链降解途径Ⅰ和甾体母核降解途径Ⅱ。分枝杆菌和红球菌是两类能够对植物甾醇进行特异性降解获得目标甾体药物中间体的主要微生物,这类微生物自身具有完善的甾醇降解基因簇以及丰富的 β -氧化酶系,细胞壁特殊的亲脂性结构也有利于对甾醇分子的摄取与转化。宋士奎等^[11]对分枝杆菌底盘细胞和代谢途径改造进行了总结,可为甾体药物的绿色生物制造提供参考。

电活性微生物和金属生物浸出

电活性微生物能够通过双向电子传递介导化学能与电能的相互转化,以电活性微生物为催化核心已经发展了多种生物电化学系统。电活性微生物主要包括产电菌和噬电菌。产电菌的功能主要是实现化学能(光能)向电能的转变,噬电菌主要是实现电能向化学能的转变。电活性微生物菌群界面电子传递和种间电子传递机制是其中最核心的科学问题,理解这一科学问题的核心目标是希望实现人工电活性微生物的设计构建。具有天然电活性的微生物已经被应用于转化廉价生物质产电、生物光伏固碳产电,以及光驱噬电生物菌群固氮的研究中,张保财等^[12]对人工电活性微生物菌群的设计与应用进行了总结。电能的生物利用是一个重要的方向,可以解决多数生物合成过程中还原力不足的问题,包括驱动人工生物固碳,电极与生物反应体系兼容以及如何放大,是需要解决的核心问题。

奥奈达希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis* MR-1)

是一种具有代表性的产电微生物,该菌通过在阳极表面堆积形成多层致密的生物被膜,从不同的能源中获得能量产生电能和较高的导电特性,其电活性生物被膜是实现电子传递的优良载体。姜森和李艳冉^[13]总结了奥奈达希瓦氏菌电活性生物被膜的研究进展,包括“粘附-微生物落-生物被膜-消解”这 4 步电活性生物被膜从形成到分离的动态过程,电极材料、混菌体系、环二鸟苷酸、外源电子介质、环境信号等影响电活性生物被膜形成的主要因素,并介绍了奥奈达希瓦氏菌在生物能源、重金属污染场地生物修复和生物传感器方面的应用。

电活性微生物的应用场景之一就是用于金属污染场地的生物修复。有很多自养微生物也可以用于从固体废物中浸出金属,如嗜酸氧化硫杆菌、嗜酸氧化亚铁硫杆菌以及多种硫化叶菌,主要通过接触浸出和非接触浸出机制来实现金属的浸出。也有很多异养微生物可以从固体废物中浸出金属,包括曲霉、青霉、酵母、芽孢杆菌、假单胞菌等,通过产生有机酸,进而通过酸解、络合、氧化还原、生物积累和形成螯合物等方式浸出金属。另外一类独特的氰化细菌,通过有机酸氧化脱羧形成氰化物,促进金属溶解。贾瑞雪等^[14]总结了典型固体废物中冶金微生物及其浸出机理。目前微生物浸出金属效率还不高,需要加强浸出机制、环境条件影响方面的研究。由于固体废物种类繁多,需要考虑微生物浸出的应用场景并开展研究。

REFERENCES

- [1] 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.
 - [2] 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.
 - [3] 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.
 - [4] 张娜英,杨广宇. α -淀粉酶检测方法及其应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 898-911.
 - [5] 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.
 - [6] 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孢杆菌高效表达 L-天冬酰胺酶[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1096-1106.
 - [7] 陈雅维,郑慧杰,曹倚婷,杨佳佳,周惠云. 多级孔金属-有机框架固定化酶的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 930-941.
- WU YW, JIANG WH, GU Y. Chromosomal integration of large DNA fragments in microorganisms: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 842-857 (in Chinese).
- ZHANG MH, ZHANG YY, ZHAO PC, WANG HJ. 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).
- FU SW, JIN F. Characterization and application of several lysis cassettes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1142-1162 (in Chinese).
- ZHANG NY, YANG GY. α -amylase detection methods and applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 898-911 (in Chinese).
- LI J, WU J, CHEN S, XIA W. 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).
- YANG XY, RAO Y, ZHANG MX, WANG JQ, LIU WY, CAI DB, CHEN SW. 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).
- CHEN YW, ZHENG HJ, CAO YT, YANG JJ, ZHOU HY. Advances in enzyme immobilization based on hierarchical porous metal-organic frameworks[J].

- Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 930-941 (in Chinese).
- [8] 张莹康, 程婷, 赵飞扬, 易炎琴, 李青清, 卢振华, 吴绵斌, 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 YK, CHENG T, ZHAO FY, YI YQ, LI QQ, LU ZH, WU MB, WANG T, LIU XH. 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).
- [9] 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 JM, LIU YX, ZHAO CX, WANG WH, LI QG, LU FP, LI Y. Effect of *hemX* gene deletion on heme synthesis in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1119-1130 (in Chinese).
- [10] 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 T, XIANG Q, YANG Y, HUANG YD. Research, development and application of collagen: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 942-960 (in Chinese).
- [11] 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): 1105-1118.
SONG SK, HE JX, HUANG YQ, SU ZD. Biosynthesis of steroidal intermediates using *Mycobacteria*: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1105-1118 (in Chinese).
- [12] 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 BC, WANG YY, SHI SC, LI F, SONG H. Design and applications of synthetic electroactive microbial consortia[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 858-880 (in Chinese).
- [13] 姜森, 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 M, LI YR. Advances in electrochemically active biofilm of *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 881-897 (in Chinese).
- [14] 贾瑞雪, 顾卫华, 赵静, 白建峰. 典型固体废物中冶金微生物及其浸出机理研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1040-1055.
JIA RX, GU WH, ZHAO J, BAI JF. Microorganisms used for bioleaching of metals from typical solid wastes and their leaching mechanism: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1040-1055 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)