

合成生物制造 2022

李寅*

中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

李寅. 合成生物制造 2022[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 807-841.

LI Yin. Biomufacturing driven by engineered organisms (2022)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 807-841.

摘要: 本文对 2022 年《生物工程学报》发表的与合成生物制造相关的综述和学术论文进行了评述, 重点讨论了 DNA 测序、DNA 合成、DNA 编辑、基因表达调控和数学细胞模型等底层技术, 酶的设计、改造和应用技术, 化学品生物催化、氨基酸及其衍生物、有机酸、天然化合物、抗生素与活性肽、功能多糖、功能蛋白质等重要产品的生物制造技术, 一碳化合物和生物质原料利用技术以及合成微生物组技术, 以帮助读者从一个侧面了解合成生物制造相关技术和产业的发展情况。

关键词: 合成生物学; 生物制造; 工程生物; 底层技术; 酶的设计改造; 生物基产品; 一碳化合物; 生物质利用; 合成微生物组

Biomufacturing driven by engineered organisms (2022)

LI Yin*

CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: This article summarizes the reviews and original research papers published in Chinese Journal of Biotechnology in the area of biomufacturing driven by engineered organisms in the year of 2022. The enabling technologies including DNA sequencing, DNA synthesis, and DNA editing as well as regulation of gene expression and *in silico* cell modeling were highlighted. This was followed by discussing the biomufacturing of biocatalytics products, amino acids and its derivatives, organic acids, natural products, antibiotics and active peptides, functional polysaccharides, and functional proteins. Lastly, the technologies for utilizing C1 compounds and biomass as well as synthetic microbial consortia were discussed. The aim of this article was to help the readers to gain insights into this rapidly

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

Received: 2023-02-10

developing field from the journal point of view.

Keywords: Synthetic biology; biomanufacturing; engineered organisms; enabling technologies; design and modification of enzymes; bio-based products; C1 compounds; biomass utilization; synthetic microbial consortia

在“碳达峰、碳中和”的背景下，加强未来绿色产业布局，逐步摆脱以石化资源为原料的传统能源和工业体系，培育发展低碳产业技术体系，是推动社会经济可持续发展的必由之路。相对于石油基产品，生物制造的生物基产品因其明显的低碳属性，在“双碳”背景下得到高度关注，相关技术研发和商业活动高度活跃，被认为是生物经济时代的产业标志^[1]。

生物制造是指利用生物系统，生产出具有商业价值的产品，用于健康、营养、农业、工业和环境保护等广泛的产业经济领域。生物制造所使用的生物系统，包括植物、多物种微生物群体、单一物种微生物以及由酶或多酶组成的无细胞系统。狭义的生物制造是以光合作用吸收二氧化碳产生的生物质为原料制造产品，生物制造产品使用分解后产生的二氧化碳，又能再通过光合作用生成生物质，从而形成一个不需要通过传统石化资源提供碳基物质来源的“净零”碳足迹产品生命周期。广义的生物制造还包括用于替代传统化学加工方式的生物催化与生物转化等生物加工方式。由于其在常温、常压下进行，能耗低且产生污染少，因而能够显著削减生产过程的碳排放，被视为解决资源、能源及环境危机的有效手段^[2]。因此，无论是以生物质为原料的生物制造过程，还是以生物加工为技术特征的生物制造过程，由于其低碳甚至“净零”碳排放特征，大规模产业发展的实现有助于显著降低传统产品制造行业的二氧化碳排放，可以作为面向“碳中和”目标下的重要新技术手段，打开新的产业发展空间，实现财

富绿色增长，为推动生物经济发展、助力实现“双碳”目标和促进社会经济可持续发展提供重大科技支撑^[3]。

在国家和产业对“碳中和”的社会需求拉动以及合成生物学创新技术推动的双重加持下，具有天然“碳中和”属性的生物制造产业，正呈现加速发展的态势。中国科学院所属研究所^[4]和高等院校的一大批研究人员，以“设计-构建-筛选-测试-工艺放大-学习 (D-B-S-T-P-L)”循环新范式^[5]，推动工业生物学从“格物致知”到“造物致用”并实现产业化^[6]。《生物工程学报》把握国家重大需求与合成生物学前沿科技发展，充分依靠学报编委和领域专家，加强合成生物学与生物制造领域创新科研成果的组织与发表，加速报道我国科研工作者在这一领域的原始研究工作，系统总结国内外在生物制造相关领域的最新进展，务求为我国生物制造领域广大研发和管理人员持续、快速提供富有新意和系统性的科研动态进展。

从 2022 年开始，《生物工程学报》发表文章，对学报上一年度在生物技术与方法、合成生物技术、工业生物技术、医药生物技术、食品生物技术、生物育种与工艺优化等栏目发表的与合成生物制造相关的综述和研究论文进行评述^[7]，总结《生物工程学报》在推动合成生物制造发展方面做出的努力，受到学报读者的欢迎。本文对 2022 年《生物工程学报》所发表的与合成生物制造相关的研究论文和综述作一评述，以期帮助读者从一个侧面了解合成生物制造相关研发和产业化工作在过去一年中取得的进展。

1 底层技术的发展和應用

合成生物制造的简单本质是以工程化的理念,通过对 DNA 的精准操控,在中心法则的框架下,获得可预测、可定量的生物学性状,实现高效生物制造产品或开发高效生物工艺的目标。近年来合成生物学的飞速发展,直接原因是 DNA 测序、DNA 合成、DNA 编辑和基因表达调控等关键底层技术的快速进步和成本不断降低,显著提升了对 DNA、RNA、蛋白质和细胞表型的设计和改造能力。

1.1 DNA 测序

低成本、高通量的 DNA 测序技术,作为“读”的核心,为揭示自然界生物多样性的遗传基础、提供合成生物制造的元件来源奠定了大数据基础。50 多年来, DNA 测序技术已经从基于双脱氧链终止法为原理的第一代测序技术,发展到高通量、低成本的第二代测序技术,再发展到读长较长、可实现单分子测序与实时测序的第三代测序技术。二代测序技术的主要问题是读长短、操作复杂、耗时长。三代测序技术主要包括 HeliScope 单分子测序技术、实时单分子测序技术、纳米孔测序技术及 Geno Care 单分子测序技术等^[8],其技术核心是利用现代光学、纳米技术等手段捕获序列碱基信息,碱基读长能达到 1 Mb,且对 GC 富集区、大量串联重复区这些传统难测序区域的测序能力显著提升,适用于对未知基因组的测序组装,但还存在碱基识别错误率高和成本相对较高的问题。为了满足未来 DNA 存储技术发展的需求,还需要进一步降低 DNA 测序技术的成本,提高测序精准性和操作简便性。

1.2 DNA 合成

大于 100 bp 的双链 DNA 合成技术最早可追溯到 1970 年。20 世纪 90 年代,基于亚磷酸

胺三酯固相合成法发展出 DNA 合成仪并提供商业化服务,人工合成基因的价格为每碱基对>10 美元,合成一条长度为 1 kb 的常规基因需要花费上万美元^[9]。目前,基因合成的平均成本已经下降到最初成本的 1%甚至更低,在很多实验室已经替代了 PCR 扩增基因,显著提高了分子克隆的效率。长片段 DNA 的精确合成是目前的一个主要技术挑战。基于亚磷酸三酯化学合成法的寡核苷酸单步合成效率虽然已超过 99%,但若寡核苷酸长度超过 200 个碱基,得率就会显著下降^[9]。利用酶促反应的高选择性和高催化活性,开发不依赖模板的酶促 DNA 从头合成技术,有望进一步提高单步合成效率。酶促 DNA 从头合成技术目前还处于起步阶段。酶对非天然底物的特异性不强、催化效率不高、合成长片段 DNA 较为困难,这些问题还都需要逐步克服。如何以高通量和高精度的方式,以更低的成本、在更短的时间内获得更长的高质量 DNA 产品,需要开发自动化、微型化、生物酶法合成、组装与纠错等新技术和新工具的应用,不断提升和拓展 DNA 合成能力,建设低成本、可持续的工业 DNA 生产系统^[9]。

1.3 DNA 编辑

目前广泛应用的 3 大基因组编辑技术(ZFN、TALEN、CRISPR-Cas),其基本原理均是利用非特异性的核酸内切酶在“向导”引导下切割 DNA 靶位点,造成 DNA 双链断裂,从而激发 DNA 的修复机制,然后利用非同源末端连接或同源定向修复,实现基因编辑的目标。对于 CRISPR-Cas 系统来说,前间隔序列邻近基序(protospacer-adjacent motif, PAM)识别范围有限、Cas 蛋白的宿主细胞毒性、以及较低的同源重组或非同源末端连接效率,是限制其应用的主要因素。Red 同源重组是一种比较传统的基因编辑技术,应用广泛,但编辑效率受整合片段大

小的限制,基因编辑过程比较烦琐,且重组后基因组会有 FRT 位点残留。CRISPR/Cas9 技术应用广泛,可靶向基因组特定位置进行编辑,但需要根据编辑位点设计特定的 DNA 打靶片段。根据这两类技术的不同特点,近年来衍生出了如 Red 同源重组和归巢核酸内切酶 I-Sce I 的联合运用,Red 同源重组和 CRISPR/Cas9 的联合运用等多种复合基因编辑技术^[10]。

基于 CRISPR-Cas 系统及衍生的基因组编辑和碱基编辑技术已经在大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌、链霉菌、罗氏真养杆菌、酿酒酵母、嗜热毁丝霉、黑曲霉等重要底盘微生物中得到广泛应用^[11]。

基于双链断裂的 CRISPR 技术已经用于在谷氨酸棒杆菌中进行基因敲除、插入以及单碱基编辑等,但由于其对细胞的毒性较大,多位点编辑效率较低。结合使用 CRISPR/Cas9 与单链 DNA 重组技术,可以同时双基因进行编辑,但效率仅为 40%^[12]。采用一种多元自动化的碱基编辑方法 MACBETH,融合只有一条链切割活性的 nCas9 (D10A)蛋白与胞嘧啶脱氨酶,基于多个单引导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 的转录,目前在谷氨酸棒杆菌中已经可以实现三基因的同时编辑,但是还存在着多重 sgRNA 结构烦琐、重复序列干扰、更换靶点困难等不足。研究人员通过优化或开发新的多重 sgRNA 表达框,简化表达框的结构,为谷氨酸棒杆菌中进行多位点基因编辑提供了可选的新方法^[12]。

黑曲霉是一种重要工业菌种,广泛用于生产酶制剂和有机酸^[13]。黑曲霉基因组的高效编辑技术,对提高黑曲霉的改造效率十分重要。基于黑曲霉中具有复制起始功能的 AMA1 (autonomously maintained in *Aspergillus*) 片段,研究人员发展了一种基于 CRISPR/Cas9 技术的高效无选择标记的基因编辑方法,采用同源臂

长度仅为 20 bp 的无选择标记供体 DNA,基因编辑效率达到 100%^[13],为黑曲霉基因改造提供了高效的工具。

嗜热厌氧杆菌具有底物利用范围广、代谢速度快等特点,具有作为生产燃料和化学品细胞工厂的潜力。由于嗜热菌一般在高温环境中培养,筛选标记较少、质粒稳定性差、转化效率低,嗜热菌的遗传改造效率一般都比较低。耐热 Cas9 核酸酶的发现,使得研究人员能够在嗜热厌氧杆菌中建立 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,为嗜热厌氧杆菌的高效遗传操作提供了解决方案^[14]。

在 CRISPR-Cas 基因编辑系统中,得到广泛应用的 SpyCas9 蛋白来源于酿脓链球菌,但该蛋白在乳酸菌中的应用效率不高。乳酸菌基因组中也有丰富的 CRISPR-Cas 资源^[15],可以将这些内源的 CRISPR-Cas 系统开发成基因编辑工具。目前多种乳酸菌中的 CRISPR-Cas 系统已经得到表征^[15]。根据这些系统的特征,可以对 Cas 蛋白识别的原型间隔区相邻基序 (protospacer-adjacent motif, PAM) 进行解析,并利用这些信息构建打靶质粒^[15]。筛选更多特异性的 PAM,对提高乳酸菌的自我靶向基因编辑效率十分关键。

与 CRISPR-Cas 系统相比,移动遗传元件 (mobile genetic elements, MGE) 在转座酶的调控下,不需要依赖同源重组即可将指定 DNA 片段定向插入到细胞染色体中。与 CRISPR 系统相关的转座元件能够将 10 kb 以上的大片段插入基因组。目前发现与 CRISPR 系统相关转座元件包括 Casposon、TnpB、IscB 和 CAST 四种。其中最具优势的是 CAST 系统,它可以直接通过 RNA 引导的转座酶实现 DNA 的插入,不需要利用基因组 DNA 双链断裂和 DNA 损伤修复机制^[16]。转座酶和 dCas9 的人工融合,有

望开发出新的基因编辑工具。进一步揭示 CRISPR-Cas 系统和转座子之间的生物多样性和遗传进化关系, 阐明微生物基因组防御工具与移动元件之间的相互作用关系, 有助于拓展基因编辑工具包, 扩展基因编辑功能的边界。

II型内含子是一类由内含子 RNA 和内含子编码蛋白组成的具有自我剪接功能的核酶, 能够通过自我催化实现在染色体上的切离, 并通过对靶位点的识别、切割和反转录插入到染色体上的特定位点。II型内含子通过内含子 RNA 与靶位点的碱基互补配对来识别 DNA 靶位点, 且在靶位点的插入具有高度专一性。根据II型内含子的这一特性, 通过修饰内含子 RNA 的碱基识别序列, 即可开发出基因打靶工具, 如基于乳酸乳球菌的 L1.LtrB 内含子的 Targetron, 基于嗜热蓝细菌的 Tel3c/4c 内含子的 Thermotargetron, 可分别用于中温菌和高温菌的基因操作, 包括大片段基因的删除、插入与重定位等。II型内含子的功能依赖于高浓度的 Mg^{2+} , 因此其在 Mg^{2+} 较低的真核生物中应用受限。此外, 由于II型内含子主要作用是插入靶位点失活基因, 这一方法不能实现任意基因编辑。但如果内含子编码蛋白的反转录酶失活, 内含子 RNA 在切割 DNA 靶位点后, 不能通过反转录插入到 DNA 靶位点, 由此在靶位点造成的 DNA 损伤, 就为开发新的基因组编辑工具提供了可能^[17]。

1.4 基因表达调控

启动子是调控基因表达的重要元件, 可被 RNA 聚合酶特异性识别和结合。谷氨酸棒杆菌作为 GRAS 菌株, 近年来在合成生物制造食品组分领域得到广泛重视。该菌中使用最多的强诱导型启动子是 IPTG 诱导的 P_{trc} 和 P_{tac} 启动子, 天然的强组成型启动子则主要有 P_{eftu} 、 P_{sod} 和 P_{cspB} 等。为了扩大谷氨酸棒杆菌可选择的组成型启动子范围, 研究人员以 α -酮戊二酸脱氢酶

复合体 E1 亚基基因的天然启动子 P_{odhA} 的-10 区及附近序列进行随机突变构建启动子文库, 通过筛选红色荧光强度增强的突变体, 构建了 1 个含有 57 个启动子的文库, 相对强度为 2.4–16.7 倍, 最高强度可达诱导性 P_{trc} 的 2.3 倍^[18]。用不同强度的启动子对 L-脯氨酸合成途径关键酶 γ -谷氨酰激酶的表达进行调控, 发现随着启动子强度增加, L-脯氨酸产量也不断提高。当采用相对强度为 9.8 倍的启动子时, L-脯氨酸产量最高^[18]。

枯草芽孢杆菌中常用的诱导型启动子包括 IPTG 诱导的 P_{spac} 、木糖诱导的 P_{xyl} 、蔗糖诱导的 P_{sacB} 以及麦芽糖诱导的 P_{glv} 等。诱导型启动子在实际应用中普遍存在诱导表达强度低、诱导响应范围窄、响应阈值过高或过低等问题。为筛选不同诱导表达强度的启动子元件, 研究人员以麦芽糖诱导强度为 P_{glv} 1.8 倍的 P_{glvc} 为对象, 采用易错 PCR 构建启动子突变体库, 然后基于四环素筛选的细胞生长偶联方法进行高效筛选, 获得了不同响应范围和强度的启动子突变体, 最终得到的诱导型启动子突变体对麦芽糖的响应范围从 0–3 g/L 扩展至 0–15 g/L, 其中采用最高诱导表达强度启动子的菌株, 其绿色荧光蛋白表达水平较原始启动子菌株提高约 3.15 倍^[19], 有利于拓展梯度强度启动子在枯草芽孢杆菌代谢工程和合成生物学中的应用。

小 RNA 是一种长度为 50–300 bp 的非编码 RNA, 主要作用是调控基因表达。改变小 RNA 的序列和结构, 就可以产生不同的二级结构和功能。研究人员通过对小 RNA 进行人工设计, 已经开发出了基因抑制系统和基因激活系统, 构建基因线路、进行代谢通路调控、生物传感与核酸检测, 以及理解环境胁迫适应机制等^[20]。

在维生素 C 的二步法发酵工艺中, 氧化葡萄糖酸杆菌催化由 D-山梨醇到 L-山梨糖的第一步反应。为了提高对氧化葡萄糖酸杆菌的遗传

改造效率,研究人员构建了一个由 CRISPR/dCpf1 介导的基因转录抑制系统,可应用于在氧化葡萄糖酸杆菌中抑制多个基因^[21]。利用这个 CRISPR 干扰系统,研究人员鉴定出了氧化葡萄糖酸杆菌途径中的关键酶,为氧化葡萄糖酸杆菌的遗传改造和生理功能研究提供了新的工具。

解脂耶氏酵母由于其胞内乙酰辅酶 A 的高含量、高效蛋白生产和分泌能力以及对多种胁迫环境的高耐受性而成为一个有吸引力的真菌宿主。近年来,研究人员一系列用于解脂耶氏酵母的遗传标记、表达载体、基因编辑工具和代谢调控元件,并发展了蛋白质工程、脂质工程等改造策略,进一步提高了解脂耶氏酵母中乙酰辅酶 A 的供应效率及合成各种重要产物的能力。提高异源蛋白的表达量、突破对固有代谢途径的调控、强化内源途径和异源途径的适配,有望进一步提升解脂耶氏酵母合成天然产物的能力^[22]。营养缺陷型标记乳清苷-5'-磷酸脱羧酶基因 *URA3* 会影响工程酵母在乙醇补料的发酵中对乙醇的利用,青蒿酸产量也显著下降。*URA3* 基因编码的酶催化酵母 RNA 嘧啶核苷酸合成中的关键反应,缺失 *URA3* 基因会表现出尿苷或尿嘧啶的营养缺陷型。研究人员在工程酵母中敲除半乳糖代谢负调控基因 *GAL80* 并回补 *URA3* 基因,在不添加半乳糖的情况下,可在 50 L 罐上生产超过 20 g/L 的青蒿酸^[23]。

采用不断迭代的基因编辑、基因表达调控、高通量筛选等技术,通过设计重构代谢途径、筛选发掘关键元件、提升底盘细胞生产性能等研究,谷氨酸、赖氨酸、苏氨酸等大宗氨基酸、核黄素、钴胺素等 B 族维生素、柠檬酸、苹果酸等重要有机酸的生产菌种不断迭代,工业生产水平不断提高^[24]。基因自动克隆、基因组自动编辑、编辑序列自动设计等自动化操作的实现,以及液滴微流控和流式细胞分选、单细胞

基因组测序等高通量筛选技术的发展和应^[25],必将进一步提升工业菌种的迭代创制效率。

1.5 数字细胞模型

基因组尺度代谢网络模型(genome-scale metabolic model, GSMM)可以使我们在计算机上描述和模拟生命代谢过程。GSMM 本质上是一组利用代谢反应网络的计量关系式形成的线性方程组,受到代谢反应速率约束,能够在一定程度上反映细胞内的代谢反应特征^[26]。随着更多组学数据、胞内蛋白质和代谢物浓度、酶的催化特性及反应的标准吉布斯自由能等参数的大量积累,通过整合多组学信息可以构建多约束代谢网络模型,实现约束层次的升级。引入系统水平的酶 k_{cat} 和蛋白质组学数据可以得到酶约束模型,整合标准吉布斯自由能、代谢组学数据和酶的平衡常数 K_{eq} 等参数可以得到热力学原理约束模型,将热力学约束与酶约束整合在一起则可以得到多约束模型^[27]。这些多约束模型可以用于模拟基因敲除的影响、预测可行的代谢途径、找出代谢关键瓶颈信息,提高途径设计和靶点预测的精准性。

基于约束的计量学和基于图论的拓扑学是用于建立基因组尺度代谢网络模型的两种常用方法。采用基于图论的途径设计和基于约束优化的途径设计,利用包含丰富代谢反应信息的数据库,通过图论搜索策略或约束算法,可以计算出多条产品合成途径,包括“从无到有”和“从有到优”两类,进而筛选出最优途径,指导菌株改造^[28]。代谢网络的质量对基于约束方法的计算结果准确性有很大的影响。基于图论的途径搜索方法可以更快地搜索出从一个代谢物到另一个代谢物的最短途径。图论方法应用于代谢途径预测的主要问题是需要对流通代谢物进行处理。最常用的处理方法是直接从网络中去除流通代谢物,但结果会导致有流通代谢物

参与的代谢途径也一并被去除,从而影响代谢途径的准确性。为了合理处理流通代谢物,研究人员根据流通代谢物在具体反应中的特性,从保证每个反应都有对应的代谢物连接的角度,提出了根据流通代谢物在功能基团转移中发挥作用的优先顺序,对流通代谢物进行成对处理^[29]。采用这种流通代谢物成对排序处理的新方法,可以排除掉生物学不可行的途径,从而提高途径搜索的准确性,预测结果更具有生物学意义。

组学分析技术的发展大大提高了对生物学数据的获取能力,推动生物学逐渐成为一门以数据分析为中心的学科。依托海量生物数据,在细胞整体系统水平建立数字细胞模型,有助于理解细胞系统的组织原理和生命产生的进化规律,进而预测各种环境条件变化、基因扰动对细胞功能的影响,并指导人工生命的设计。与传统生物网络模型不同,数字细胞模型涵盖了更多生命过程和细胞动态行为,其设计、构建和模拟已成为合成生物学的核心研究与底层支撑技术^[30]。数字细胞模型的核心是要在常规计量学约束基础上引入热力学、酶等其他水平的约束,以便能够采用动力学方程对细胞动态行为进行定量描述,但挑战在于目前很多生物过程还难以得到准确的动力学定量数据。建构基于生命机制的细胞模型,或基于数据和机器学习的细胞模型,都有助于加深人们对复杂生命现象的理解,提高人工细胞设计、合成与改造的效率。

2 酶的设计、改造和应用

2.1 酶的设计和改造

酶不仅参与生物制造过程,本身也是生物制造的重要产品。2021年全世界酶制剂产值约70亿美元,其下游产业产值可达数十倍甚至数

百倍^[31]。对酶蛋白进行分子设计和改造,是创造高性能工业酶、降低生产成本、提升产业竞争力的关键。以定点突变为起点的蛋白质工程技术目前已发展成为两个分支。一是根据蛋白质一维的氨基酸序列,进行随机突变、定向筛选,获得性能提高的突变体。二是根据蛋白质三维结构和催化机制,以理性的方式选取拟改造活性位点并构建突变体来提高酶的性能。随着计算和人工智能技术的发展,目前这两个分支正在呈现合二为一的趋势,开发从DNA序列到蛋白质功能的新酶设计策略和人工智能新算法,在先进算法指导下进行计算机虚拟筛选及从头设计,显著提高了蛋白质改造的效率^[31]。同时,X-射线晶体学的不断发展,为快速、准确、深入了解相关工业蛋白质的构效关系,重塑重要催化反应和创建优化合成路径提供了重要的结构生物学知识。通过生物学与化学、结构生物学、数据科学、计算科学和工程学等学科的交叉与融合,精简密码子设计与精准定位拟突变位点技术体系、理性聚焦迭代突变技术、镜像设计策略、脯氨酸诱导设计策略等理性设计技术体系得以不断建立和发展,正在解决生物催化剂活性低、工业环境下应用性能差等问题^[32]。随着大肠杆菌、芽孢杆菌、酵母、丝状真菌等蛋白表达系统的快速发展,酶的生产成本正在不断降低。多样化、高性能、低成本酶的生物制造实现,促进了酶在能源、化工、材料、医药、食品、饲料、纺织、造纸、印染等重要工业领域中的应用和绿色生物工艺的建立,显著缩短了工艺流程,降低物耗、能耗与水耗,助力传统加工产业的绿色发展^[33]。

脂肪酶是一种重要的工业用酶。来自奇异变形杆菌的脂肪酶具有较高的酶活、较好的有机溶剂耐受性,但其热稳定性仍有待提高。研究人员为减少单一算法中的采样偏差、降低假

阳性结果的概率, 基于多种计算方法, 将 3 种正向筛选和两种负向筛选结合起来, 从 18 个单点突变设计中获得了 7 个热稳定性提高的突变体, 正向突变效率接近 40%, 且大部分突变体酶活损失较小^[34]。研究人员最终获得了一个热稳定性比野生型高出 10 °C 的五点组合突变体, 同时其酶活比野生型还提高了 40%^[34], 为提高天然酶热稳定性提供一种高效精巧的计算设计方案。

血液和尿液中的肌酐水平是肾脏等问题的重要临床指标, 目前常用肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶这 3 种酶组成的多级酶联检测体系进行检测, 其中肌酸酶是限速酶。针对肌酸酶热稳定性的改造较多, 但对活性的改造较少。研究人员对来自产碱杆菌的肌酸酶进行活性改造, 结合同源建模结构分析和 HotSpot Wizard 辅助设计共挑选出 18 个突变热点进行饱和突变筛选及有序重组, 其中五点突变酶 I304L/F395V/K351V/Y63S/Q88A 的比活力和催化效率 k_{cat}/K_m 比野生型分别提高了 2.2 倍和 1.4 倍^[35]。

L-(+)-酒石酸是一种羟基羧酸类螯合剂, 一般由顺式环氧琥珀酸水解酶水解环氧琥珀酸二钠盐制备。L-(+)-酒石酸的生物合成途径在天然微生物中并不存在, 如果要以糖质资源生产 L-(+)-酒石酸, 关键是要实现 5-酮基-D-葡萄糖酸到 L-(+)-酒石酸的转化。转酮醇酶和琥珀酸半醛脱氢酶有可能将 5-酮基-D-葡萄糖酸转化为 L-(+)-酒石酸。转酮醇酶是一种焦磷酸硫胺素和二价阳离子依赖性酶, 可催化二碳单位的转移可逆形成 C-C 键, 但 5-酮基-D-葡萄糖酸并非转酮醇酶的天然底物。研究人员克隆表达了 *E. coli* K12 来源的转酮醇酶, 在结构和序列比对分析的基础上, 选取磷酸基团结合位点进行饱和突变与组合突变, 获得了对 D-甘油醛的比酶

活为野生酶 9.25 倍的突变体, 能够以 55% 的摩尔转化率催化 50 mmol/L 的 5-KGA5-酮基-D-葡萄糖酸生成酒石酸半醛^[36], 为转变 L-(+)-酒石酸的原料来源奠定了基础。

染料木素(4,5,7-三羟基异黄酮)是一种重要的大豆异黄酮, 在医药和食品领域具有广泛用途。染料木素及其单苷衍生物的水溶性较差, 糖基化可以显著提高其水溶性, 如二糖苷和三糖苷的水溶性可比单糖苷分别高 700 倍和近万倍。软化芽孢杆菌的环糊精葡萄糖基转移酶可以用于催化染料木素的糖基化反应, 但是效率比较低。研究人员以染料木素单苷衍生物槐角苷为糖基受体, 以可溶性淀粉为糖基供体, 对该酶的 D182 位点进行饱和突变, 发现 D182C 突变体的转化率提高了 13.42%, 槐角苷单糖苷、二糖苷、三糖苷等主要糖基化产物分别提高了 39%、56%和 65%, 且环化、水解、歧化活力均有所提高^[37]。动力学数据显示 D182C 突变体对糖基供体和受体的 K_m 均有所降低, 催化效率 k_{cat}/K_m 则明显提高, 提示催化中心和底物的作用力增强。

1,5-戊二胺是生物基聚酰胺 PA5X 和生物基聚氨酯的重要前体, 可由赖氨酸脱羧酶催化赖氨酸转化获得。赖氨酸脱羧酶是一种折叠型 I 型磷酸吡哆醛依赖酶, 其活性不高且易受环境因素影响, 结构也不稳定。将辅酶磷酸吡哆醛和酶分子共固定, 有助于使辅酶实现循环, 提高转化效率。了解赖氨酸脱羧酶的作用机理、分子改造技术及固定化方面的进展, 有助于高性能赖氨酸脱羧酶的挖掘、设计、改造和应用^[38]。采用共固定化酶, 可实现 L-赖氨酸连续催化转化为 1,5-戊二胺, 生产强度超过 14 g/(L·h)。若实现葡萄糖发酵法生产 1,5-戊二胺, 有望进一步降低 1,5-戊二胺的生产成本。

铁、铜、锌、镁等金属离子是一些金属酶

的催化活性中心,不仅稳定“酶-金属-底物”复合体构象,也进行电子转移。天然金属酶的催化性能往往不能满足应用需要,可通过定向进化,改变其使用的金属元素类型,实现催化非天然反应;也可在天然酶结构中导入新的金属复合物实现催化新反应。在这些研究中,金属离子和配合物的结合位点都是关键。依赖锌离子的醇脱氢酶所介导的不对称催化还原在手性醇生物制造中具有重要作用,研究人员以嗜热厌氧杆菌 *Thermoanaerobacter brockii* 来源的中链醇脱氢酶 TbSADH 为对象,研究该酶的锌离子结合位点是否可被替换。结果发现,结合锌离子的 3 个氨基酸残基突变后,仅有 1% 的突变株其催化性能与野生型基本一致^[39],说明高度固化的锌离子结合位点仍具有一定的可置换性,为置换金属离子催化新反应奠定了基础。

天然淀粉是由葡萄糖单元通过 α -1,4-葡萄糖苷键和 α -1,6-葡萄糖苷键连接而成。I 型普鲁兰酶能够高效水解淀粉分子中的 α -1,6-葡萄糖苷键,与其他的淀粉加工酶复合使用,能够有效提高淀粉的利用率。野生型普鲁兰酶主要存在稳定性差、发酵酶活低与应用性能不佳等问题。近年来,普鲁兰酶产酶菌株的筛选、编码基因克隆表达和产酶优化已取得很多进展,酶分子改造技术已经广泛用于普鲁兰酶耐热性、耐酸性及催化活力等方面的改造^[40]。普鲁兰酶的结构域、活性中心及关键催化残基对其异源表达水平都会有影响。目前枯草芽孢杆菌最高可生产 8 000 U/mL 的重组普鲁兰酶。后续研究要关注获得具有独特性能的天然普鲁兰酶,利用基于人工智能的蛋白质改造新技术改善普鲁兰酶的耐热性、耐酸性,提高普鲁兰酶的可溶性水平,进一步提高普鲁兰酶的发酵水平。

2.2 酶的表达应用

β -葡萄糖苷酶是纤维素降解酶系的重要组

成部分,广泛存在于微生物中,在食品工业中具有广泛用途。研究人员发现,一个源于嗜热古菌 GH3 家族的重组 β -葡萄糖苷酶,其活性 80 °C 下可以保持数小时,水解底物活性高,工业应用前景良好^[41]。此外,从海洋细菌 *Bacillus* sp. D1 中重组表达的 β -葡萄糖苷酶 BglD2,能够水解含 β (1 \rightarrow 3)、 β (1 \rightarrow 4)、 β (1 \rightarrow 6)等键型的多种底物,具有较好的乙醇促活及耐受特性,35 °C 条件下反应 2 h,能够以 86% 的水解率将虎杖苷制备为白藜芦醇^[42]。褐藻胶是一种天然多糖醛酸,可从褐藻细胞壁中提取,具有重要的免疫刺激、抗凝血、抗病毒和抗癌活性,但由于其分子量和黏性大,应用受限。利用褐藻胶裂解酶通过 β -消除作用于褐藻胶 β -1,4-糖苷键,可以制备出一系列不同分子量的褐藻寡糖^[43]。一些微生物也能够直接降解褐藻胶。褐藻寡糖具有较强的生理活性,如抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、抗炎症、益生元功效及抑菌活性,以及降血压、抗哮喘、抗肥胖和神经保护活性等。由于褐藻寡糖多以混合物存在,进一步揭示褐藻寡糖的结构与生物活性之间关系,对促进褐藻寡糖的开发利用十分必要。

维生素 C (又称 L-抗坏血酸)具有重要的抗氧化作用。 α -葡萄糖苷酶可以催化形成糖苷化合物 L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷,能够显著提高 L-抗坏血酸对热、氧和金属离子的抗性,扩大 L-抗坏血酸的用途。为寻找具有较高转糖苷反应活性的 α -葡萄糖苷酶,研究人员分析评价了来自黑曲霉、粳稻以及大鼠来源的 α -葡萄糖苷酶,发现这三种酶的转糖苷活性顺序为:粳稻来源>大鼠来源>黑曲霉来源^[44]。但总体来看,这些 α -葡萄糖苷酶的转糖苷活性都不高。

海藻糖酶可以将海藻糖水解释为葡萄糖,用于工业发酵中降低残糖,提高经济性。研究人员从杓兰果胶杆菌中克隆、表达、纯化了其海

藻糖酶基因 *PCTre*, 发现该酶能够较好地耐受弱酸环境以及 20% (体积分数) 的乙醇浓度^[45]。由于工业发酵多在弱酸性环境进行, 高活性的酸性海藻糖酶具有一定的工业应用潜力。

角质酶是一种丝氨酸酯酶, 可以水解不溶性多聚体角质的酯键, 甚至对聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)也具有较好的降解作用, 在生物纺织前处理和塑料降解中具有应用价值。特异腐质霉、镰刀菌、桃褐腐病菌等许多植物病原真菌都会产生角质酶, 其生理功能是帮助这些真菌侵染植物。来源于特异腐质霉的角质酶经原核重组表达后, 酶活超过 2 200 U/mL。研究人员从具有较强侵染能力的核盘菌克隆了 8 个角质酶基因, 其中一个比酶活为 3.45 U/mg 的角质酶, 其活性 pH 6.0 时最高, 当 pH 在 4.0–5.0 或者 7.0–10.0 时也具有 60% 的残余活性^[46], 对在弱酸或弱碱条件下的应用具有一定意义。PET 是一种分子结构致密的石油基塑料, 由于其难降解性而对环境造成污染。角质酶、脂肪酶、羧酸酯酶、木瓜蛋白酶等可以降解 PET。研究人员通过大引物 PCR 技术, 将炭疽杆菌来源的碳水化合物结合模块与嗜热子囊菌的角质酶构建融合蛋白, 发现融合蛋白在 60 °C 条件下降解 PET 膜的效率是对照的 2.8 倍^[47], 表明通过添加碳水化合物结合模块和锚定肽等外源疏水结合模块, 可以有效增强 PET 降解酶对 PET 表面的结合能力, 提高底物的可及性, 从而提高降解速率。废纸回收利用过程中产生的胶黏物会影响再生纸的质量, 角质酶对酯键的水解能力可用于控制胶黏物的含量。锚定肽 tachystatin A2 (TA2) 具有结合聚氨酯的能力, 将锚定肽 TA2 与特异腐质霉角质酶融合表达后, 融合蛋白对胶黏物模式底物聚丙烯酸乙酯的降解能力是对照的 1.5 倍, 聚丙烯酸乙酯的粒径减小是对照的 6.8 倍^[48],

提示锚定肽有利于提升角质酶降解胶黏物的效果。

DNA 聚合酶一般具有 DNA 聚合酶活性和核酸外切酶活性。常用的 *Taq* DNA 聚合酶因缺失 3'→5'核酸外切酶活性导致扩增错误率相对较高。嗜嗜热古菌(*Thermococcus eurythermalis*) 来源的 B 家族 DNA 聚合酶基因具有显著的热稳定性和 3'→5'核酸外切酶活性。研究人员对 *T. eurythermalis* A501 来源的 B 家族 DNA 聚合酶基因进行了克隆、表达、纯化和表征, 发现该酶能在 2 kb/min 条件下成功扩增 4 kb 的目的片段, 与 *Pfu* DNA 聚合酶相比, 扩增速率、保真度和扩增产品均更优, 并可耐受 120 mmol/L 的 NaCl^[49], 为 PCR 提供了一种新型的高忠实性 DNA 聚合酶。

微生物的脲酶可以将尿素分解成为 NH₃ 和二氧化碳。碳酸酐酶能将二氧化碳的水合速率提高 1 亿倍, 在碱性环境和 Ca²⁺ 存在的条件下, 显著提高 Ca²⁺ 的矿化速率。即, 脲酶和碳酸酐酶共同作用, 可产生“微生物水泥”, 其本质是“微生物诱导碳酸钙沉积”, 在修复建筑裂缝等方面具有潜力^[50]。

解淀粉芽孢杆菌在工业中常用于酶的生产。该菌的一个特点是容易自溶, 一旦自溶, 其产酶能力迅速下降。敲除枯草芽孢杆菌的部分肽聚糖水解酶基因, 可以减缓自溶、提高产酶能力。解淀粉芽孢杆菌基因组中也编码很多肽聚糖水解酶。研究人员发现, 敲除其酰胺酶 *LytC* 和肽链内切酶 *LytE*, 也可以减少菌体自溶、提高产酶水平^[51]。

在酶的生产过程中, 如果能将酶聚集成为一个超分子结构并保持其催化性能, 有利于酶的分离纯化和循环使用, 对降低酶的生产和使用成本有重要意义。铁蛋白是一类能够储存铁的蛋白聚集体, 在高离子强度下可组装成二十

四聚体。研究人员将铁蛋白与地衣多糖酶融合后,经低速离心就可以获得高纯度的地衣多糖酶活性聚集体,其活性在常温下可保持一个月左右,且可以多次重复使用^[52],为提高酶的分离纯化效率和催化性能提供了一种新方法。

过氧化氢酶在食品、医疗、纺织等领域具有广泛应用,但若采用游离的方式则会显著增加应用成本。生物酶、金属阳离子与磷酸根阴离子可以自组装形成纳米化结构复合体。研究人员在大肠杆菌中表达源自枯草芽孢杆菌的过氧化氢酶 KatA,以 Ca^{2+} 为自组装诱导剂,将分离纯化得到的纯酶以酶-无机杂化纳米花形式制备成固定化酶。KatA/ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 杂化纳米花在 4 °C 储存 14 d 后仍保留 82% 的酶活力^[53],而游离酶仅保留了 50% 的酶活力。此外,纳米花在进行 5 次催化反应后仍具有 55% 的酶活力^[53]。与游离酶 KatA 相比, KatA/ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 杂化纳米花对底物过氧化氢的亲和力下降,同时其催化效率也有所降低。

3 生物制造产品

3.1 化学品的生物催化

手性医药化学品是医药化学品中的重要组成部分。2021 年全球药品销售额 TOP200 的小分子药品中,手性小分子药物占比达 60% 以上,其中有 40 种药物分子具有手性胺结构,如镇咳药右美沙芬关键手性胺中间体(S)-1-(4-甲氧基苄基)-1,2,3,4,5,6,7,8-八氢异喹啉、治疗失眠的药物苏沃雷生关键手性胺中间体的关键结构单元手性 1,4-二氮萘环、烟草戒断剂关键手性胺中间体(S)-去甲烟碱,通过转氨酶、亚胺还原酶、氨脱氢酶和水解酶实现生物合成。有 52 种药物分子具有手性醇结构,如妇女生殖健康药物左炔诺孕酮、依托孕烯关键手性醇中间体(13*R*,17*S*)-ethyl secol ((13*R*,17*S*)-4)、抗血小板减

少症药物芦曲泊帕手性醇中间体(S)-1-(2-甲氧基-3-溴苯基)乙醇((S)-5)、Janus 激酶抑制剂鲁索利替尼关键手性醇中间体(S)-3-环戊基-3-羟基丙腈((S)-6)、保肝胆原料药熊去氧胆酸、重要香料二氢香芹醇、抗癫痫药物左乙拉西坦和布里瓦拉西坦关键手性醇中间体(R)-和(S)-2-羟基丁酸,多通过羰基还原酶实现生物合成。有 38 种药物分子具有手性 α/β 或 γ -氨基酸结构,如天然 α -氨基酸, D-氨基酸、 β -羟基- α -氨基酸等非天然 α -氨基酸、非天然 β -氨基酸以及 γ -氨基丁酸等非天然氨基酸,以及甾体药物的关键中间体等,也通过生物催化实现了生物合成^[54]。

很多手性化学品的生物催化过程都需要 NAD(P)H 作为辅因子,需要利用能够产生 NAD(P)H 的氧化还原酶来构建辅因子再生系统,如葡萄糖脱氢酶、醇脱氢酶和甲酸脱氢酶。其中甲酸脱氢酶通过氧化甲酸生成二氧化碳来提供 NAD(P)H,其底物甲酸价格低廉且容易进入细胞,反应产物是气态的二氧化碳,反应推动力大,因而被广泛用于构建生物催化反应的辅因子再生系统。目前大部分甲酸脱氢酶还存在活力较低(≤ 10 U/mg)、热稳定性较差的问题。根据是否含有金属离子可将甲酸脱氢酶分为两类,其中不含金属离子的甲酸脱氢酶主要依赖于 NAD^+ 为辅因子。近年来有关甲酸脱氢酶的结构特征、催化机制以及不同来源 FDH 在酶活、催化效率、稳定性及辅酶偏好性改造方面取得很多研究进展,FDH 作为辅酶再生系统也应用于手性氨基酸、手性羧酸、手性醇、手性胺等手性化合物的绿色生物制造^[55]。

D-甘露醇是一种天然的六碳糖醇,甜度为蔗糖的 62%,热量值低于其他糖醇,在食品、医疗和化工行业中具有广泛用途。甘露醇脱氢酶可以将果糖转化为 D-甘露醇,降低成本的关键是要建立高效的 NAD(P)H 再生系统。研究人

员在大肠杆菌中共表达假肠膜明串珠菌来源的甘露醇脱氢酶和解淀粉芽孢杆菌来源的葡萄糖脱氢酶, D-果糖到 D-甘露醇的摩尔转化率为 60%。进一步增加葡萄糖脱氢酶的表达量以提高辅因子循环能力,以 30 OD_{600} 的细胞量和 1:1 摩尔当量的葡萄糖为辅助底物,可在 24 h 内将 100 g/L 的 D-果糖转化为 82 g/L 的 D-甘露醇^[56]。该催化反应在 12 h 时的转化率已经超过 70%,进一步的研究应找出影响后续转化能力的限制因素,进一步提高转化率,缩短反应时间。

很多体外生物合成反应需要 ATP,直接添加 ATP 会显著增加原料成本,因此需要考虑构建 ATP 再生系统。乙酸激酶、丙酮酸激酶和聚磷酸激酶常用于 ATP 再生系统的构建。乙酸激酶和丙酮酸激酶的磷酸供体分别是乙酰磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸,成本都比较高,且不稳定。聚磷酸激酶能利用廉价的无机聚磷酸盐提供磷酸基团,因而比较适合用于 ATP 再生。聚磷酸激酶主要有 PPK1 和 PPK2 两种。PPK1 由 600–700 个氨基酸组成,偏向催化 ATP 上的磷酸转移到聚磷酸上;PPK2 约由 230 个氨基酸组成,可以催化 AMP、ADP 的磷酸化。基于 PPK 的 ATP 再生系统已用于合成多种化合物,但多数使用的是 PPK1 酶,效率不高。此外,大多数 PPK 仅对超过 10 个磷酸残基的长链聚磷酸有活性,但少于 10 个磷酸残基的短链聚磷酸成本更低。来源于泗阳鞘氨醇杆菌的 PPK2 经过重组表达纯化后,可利用短链聚磷酸再生 ATP 并用于丙谷二肽的合成^[57],为依赖 ATP 的催化反应体系提供了新酶的来源。

3.2 氨基酸及其衍生物

氨基酸是一类大宗发酵产品,仅谷氨酸、赖氨酸和苏氨酸等氨基酸,全世界每年就生产数百万吨。2021 年全球 L-谷氨酸超过 400 万 t,我国占 75%;L-赖氨酸产量 420 万 t,我国占 60%。

占国内 L-谷氨酸总产量 40%的阜丰集团,在 780 m³ 发酵罐中,发酵 34 h, L-谷氨酸浓度 230 g/L,得率 73%,提取总收率超过 90%,已经达到很高的水平^[58]。氨基酸发酵基本都是在有氧状态下进行的。有氧状态下细胞生物量高,但是会降低目标产物得率(最高不超过 78%),同时带来染菌风险和高能耗。决定一个发酵过程是在有氧还是在无氧下状态下进行,核心是胞内还原力 NAD(P)H 的走向。如果合成某种氨基酸的过程存在 NAD(P)H 过剩,必须通过氧化才能再生 NAD(P)⁺,这样的发酵过程就必须有氧存在才能持续进行。反之,如果 NAD(P)H 的 H 可以传递给氧之外的电子受体,这样的发酵过程在无氧状态下也能进行,例如乙醇发酵和乳酸发酵。通过阻断乳酸乳球菌的乳酸脱氢酶,并引入丙氨酸脱氢酶,可以将同型乳酸发酵转为同型丙氨酸发酵。大肠杆菌在天然条件下主要通过依赖于 NADPH 的转氨酶/谷氨酸脱氢酶双酶体系产生 L-丙氨酸,无法和酵解途径产生的 NADH 形成平衡。研究人员通过阻断大肠杆菌丙酮酸往乳酸、乙酸等有机酸的支路途径,然后引入嗜热脂肪芽孢杆菌的 NADH 依赖型 L-丙氨酸脱氢酶,使 L-丙氨酸成为无氧条件下再生酵解途径 NADH 的唯一途径,并通过在无氧条件下连续进化提升细胞生长能力,工程菌株生产 L-丙氨酸的生产强度达到 3.9 g/(L·h),糖酸转化率高达 95%。这一技术在安徽华恒生物科技股份有限公司实现了产业化,并由于甲基甘氨酸二乙酸市场的拉动,将 L-丙氨酸从一个年产千吨级的产品提升为一个年产数万吨级的产品,迄今累计销售已超过 30 亿元,成为国际上第一个在无氧条件下低成本生产氨基酸的范例^[59]。

L-脯氨酸是 20 种常见氨基酸中唯一的亚氨基酸。反式-4-羟基-L-脯氨酸又称羟脯氨酸,

是 L-脯氨酸羟基化后最重要的一种产物。L-脯氨酸和羟脯氨酸主要存在于胶原蛋白中，在稳定胶原蛋白三螺旋结构中发挥重要作用。除了构成胶原蛋白外，L-脯氨酸和羟脯氨酸在医药、农业、化工、食品和美容等方面都具有重要的应用。从 L-谷氨酸生成 L-脯氨酸主要包括两条途径。一是以 L-谷氨酸为底物通过 3 步酶促反应和一步自发环化过程形成 L-脯氨酸，经过系统代谢工程改造的谷氨酸棒杆菌可在 50 h 内生产 140 g/L 的 L-脯氨酸，对糖转化率为 31%。二是以精氨酸合成中间产物 N-乙酰- γ -谷氨酸半醛或鸟氨酸为底物合成 L-脯氨酸，产量相对谷氨酸途径要低很多。L-脯氨酸在脯氨酸羟化酶的催化下即可转化为羟脯氨酸，这一转化需要偶联 α -酮戊二酸转化为琥珀酸的脱羧反应。经过工程改造的大肠杆菌，能够以葡萄糖为唯一碳源生产 54 g/L 的羟脯氨酸，转化率为 24%^[60]。添加 α -酮戊二酸或 L-脯氨酸作为共底物可以进一步提高羟脯氨酸的产量。

经过代谢工程改造的谷氨酸棒杆菌、大肠杆菌和菠萝泛菌都可以生产 L-半胱氨酸，但作为一种含硫氨基酸，高产 L-半胱氨酸仍有挑战。L-半胱氨酸的生物合成可分为碳代谢途径和硫同化途径。碳代谢途径中，丝氨酸转移酶催化 L-丝氨酸生成 O-乙酰-L-丝氨酸，后者是 L-半胱氨酸的前体。硫同化途径有两条，一是硫酸盐同化途径，O-乙酰-L-丝氨酸和硫化物(S^{2-})转化为 L-半胱氨酸；另一则是硫代硫酸盐同化途径，O-乙酰丝氨酸磺化酶 B 催化进入细胞的硫代硫酸盐与 O-乙酰-L-丝氨酸反应，生成 S-磺基半胱氨酸，然后在还原酶的催化下转化为 L-半胱氨酸。已报道的半胱氨酸合成改造研究，多对碳和硫代谢通量进行单独改造。研究人员对碳模块和硫模块进行协同输出控制，结合系统代谢工程与模块平衡策略，将 L-半胱氨酸的发酵水

平提高到 12 g/L^[61]，为目前报道最高。

非天然氨基酸主要指那些不参与蛋白质合成的氨基酸，如很多天然氨基酸的衍生物，在医药、农药领域具有重要的用途。近年来改造大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌生产非天然氨基酸进展很快^[62]。L-高丝氨酸(2-氨基-4-羟基丁酸)及其衍生物是合成多种 C4 化合物的前体，如 L-甲硫氨酸与 L-草铵膦，因此其生物合成备受关注。L-高丝氨酸生物合成的关键主要是 3 个方面。一是磷酸烯醇式丙酮酸-丙酮酸-草酰乙酸这个三角代谢区域碳流的分配，二是 L-高丝氨酸前体 L-天冬氨酸的供应，三是弱化竞争途径，减少从天冬氨酸- β -半醛转向 L-赖氨酸，以及从 L-高丝氨酸转向 L-苏氨酸和 L-甲硫氨酸的碳流^[63]。经过工程改造的大肠杆菌可以产生 84 g/L 的 L-高丝氨酸，对葡萄糖得率 0.5 g/g，是目前最高水平^[64]。如果通过固碳途径生产 L-高丝氨酸，其对糖的理论为 2 mol/mol，即 1.32 g/g。但该途径每产生 2 mol L-高丝氨酸需要消耗 6 mol NADPH，正常状态下微生物的糖代谢无法满足。通过外源光或电的方式输入还原力，有可能进一步提高 L-高丝氨酸的得率。

麦角硫因(L-ergothioneine, EGT)是一种由组氨酸衍生而来的硫醇化合物，是至今发现的唯一天然的 2-硫代咪唑氨基酸，具有很强的抗氧化活性，在化妆品、食品领域具有广泛用途。人体自身不能合成麦角硫因，只能通过其转运体从饮食中摄取，催生了对其生物制造的需求。麦角硫因的生物合成途径包括好氧和厌氧两类。好氧途径主要存在于原核生物和真核生物中，但是过程并不相同。厌氧途径则主要存在于原核生物中^[65]。原核生物耻垢分枝杆菌中含有 *egtABCDE* 的基因簇，分别编码 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶、单核非血红素铁酶、酰胺转移酶、S-腺苷蛋氨酸依赖型组氨酸甲基转移酶

和 PLP 结合型 C-S 裂解酶, 组成了原核生物中的麦角硫因好氧合成途径。真菌中麦角硫因合成则主要涉及 Egt1 和 Egt2 两个关键酶, 其中 Egt1 催化组氨酸三甲基内盐(hercynine, HER)和半胱氨酸合成 Cys-HER, 再由 Egt2 转化为麦角硫因。Egt1 能够以半胱氨酸而不是 γ -谷氨酰半胱氨酸为底物, 因此真菌中麦角硫因的生物合成途径比较简单。此外, 粗糙脉孢菌中 Egt1 编码基因 *NcEgt-1*, 其同源基因在霉菌、担子菌和子囊菌等能够天然合成麦角硫因的真菌中都存在, 蛋白结构域分析发现 *NcEgt-1* 可能是衍生于原核 *egtD* 和 *egtB* 的融合基因。金针菇与粗糙脉孢菌合成麦角硫因途径的主要不同之处在于参与 Cys-HER 脱硫反应的酶不同: 前者有两个半胱氨酸脱硫酶参与, 而后者仅有一个 C-S 裂解酶参与。厌氧的泥生绿菌中存在 EanA 编码的甲基转移酶和 EanB 编码的类似硫氰酸酶的硫转移酶。EanA 将组氨酸转化为 HER, EanB 则直接将硫原子加到 HER 上, 生成麦角硫因。厌氧生物合成途径显然更加简单, 但问题是 EanA 和 EanB 的活性很低, 其催化速率仅为好氧下 EgtD 和 EgtB 的十分之一到百分之一。目前已经构建了一系列能够生产麦角硫因的大肠杆菌和酿酒酵母等工程菌株。研究人员在大肠杆菌中引入耻垢分枝杆菌的 *egtABCDE* 以及粟酒裂殖酵母的 *Egt1*, 并强化组氨酸、甲硫氨酸以及半胱氨酸合成路径中关键酶的表达, 在丰富培养基中麦角硫因产量达到 0.7 g/L^[66]。若在一株组氨酸高产大肠杆菌中引入耻垢分枝杆菌来源的 *egtBCDE*, 并对麦角硫因合成支路依次进行优化, 用整合大肠杆菌的谷氨酰半胱氨酸连接酶、粗糙脉孢菌的 C-S 裂解酶、耻垢分枝杆菌的亚砷合酶和小球藻的组氨酸甲基转移酶, 以及过表达酰基水解酶的方式构建出高效的麦角硫因合成途径, 进而过表达大肠杆菌的

腺苷蛋氨酸合酶突变体 *metK*^{L303V} 以增强麦角硫因合成前体腺苷蛋氨酸的供应, 获得的重组菌株 EGT40 发酵 52 h 后可产生 2.9 g/L 的麦角硫因^[67]。

四吡咯化合物是通过不饱和次甲基将 4 个吡咯环连接成的大环化合物, 其前体是 5-氨基乙酰丙酸。5-氨基乙酰丙酸生成环状中间体尿卟啉原 III, 该物质甲基化后可合成西罗血红素、钴胺素及辅酶 F430; 脱羧后则可合成血红素、叶绿素及胆色素^[68]。研究人员利用谷氨酰脱氢酶提供 NADPH, 可催化催化血红素转化为 76 mg/L 的胆绿素^[69]。

嗜盐微生物的相关产物具有抗菌、抗炎、抗氧化等特性, 在生物医药和医学材料领域具有应用潜力。很多嗜盐菌产生的抗生素、多肽、胞外多糖、生物表面活性剂、生物色素等均具有不同程度的抗菌效果^[70]。如四氢嘧啶作为一种相容性溶质, 不仅在极端环境下能够协助嗜盐微生物平衡细胞渗透压, 还具有独特的抗炎作用。四氢嘧啶主要是通过草酰乙酸 \rightarrow 天冬氨酸 \rightarrow 天冬氨酸- $\delta\beta$ -半缩醛 \rightarrow 醛氨酸 \rightarrow 草酰乙二氨基丁酸 \rightarrow N- γ -乙酰二氨基丁酸的途径生物合成的。阻断四氢嘧啶的分解代谢, 以及阻断碳流流向丝氨酸、缬氨酸与异亮氨酸等氨基酸, 可以提高四氢嘧啶的产量^[71]。盐单胞菌 *Halomonas* sp. 可以在含盐培养基中合成高含量的聚-3-羟基丁酸酯 (poly-3-hydroxybutyrate, PHB), 这一特性使其能够进行开放式发酵, 节省灭菌所需能耗, 降低染菌风险。盐单胞菌对丁酸具有较好的耐受性和利用能力, 利用 20 g/L 丁酸能够合成近 10 g/L 的 PHB, 为利用酸化废水中的丁酸生产 PHB 提供了可能性^[72]。

3.3 有机酸

丙二酸是一种重要的有机合成中间体, 可用于合成巴比妥、维生素 B₁、维生素 B₂ 等, 但其天然生物合成途径尚未发现。以 β -丙氨酸为

前体可以生物合成丙二酸,产量为 3.6 g/L。研究人员在大肠杆菌中过表达大肠杆菌 BL21 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、天冬氨酸转氨酶、天冬氨酸- α -脱羧酶,同时引入铜绿假单胞菌来源的 β -丙氨酸丙酮酸转氨酶、大肠杆菌 K12 来源的琥珀酸半醛脱氢酶和谷氨酸棒杆菌来源的丙酮酸羧化酶,获得的工程菌株 62 h 可产生 3.3 g/L 丙二酸。通过分别将磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和天冬氨酸转氨酶, β -丙氨酸丙酮酸转氨酶和琥珀酸半醛脱氢酶融合表达, 54 h 可积累 5.6 g/L 丙二酸^[73]。最优条件下的丙二酸得率为 0.09 g/g 葡萄糖,距理论得率 0.88 g/g 还有较大距离,主要原因是乙酸(>20 g/L)和 β -丙氨酸(18 g/L)的积累量较高,提示需要进一步提高 β -丙氨酸丙酮酸转氨酶和琥珀酸半醛脱氢酶的活性。

D-葡萄糖二酸及其衍生物在食品、化工和医药等领域具有广泛用途。在酿酒酵母中表达肌醇加氧酶和葡萄糖醛酸脱氢酶,就可以将葡萄糖和肌醇转化为葡萄糖二酸。葡萄糖二酸合成途径和肌醇转运效率,都会影响葡萄糖二酸的生物合成效率。过量表达肌醇转运蛋白、融合表达肌醇加氧酶和葡萄糖醛酸脱氢酶,弱化表达葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因以促进肌醇前体葡萄糖-6-磷酸的产生这 3 种策略都可以不同程度地提高葡萄糖二酸的产量。其中,弱化表达葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因的效果最好,5 L 罐葡萄糖二酸产量达到 10.5 g/L^[74],是目前报道的最高水平。

与葡萄糖二酸结构类似、同属于己糖二酸的半乳糖二酸,俗称黏酸,其潜在应用领域也与葡萄糖二酸类似。相较于微生物中不存在完整的从葡萄糖到葡萄糖二酸的合成途径,糖醛酸脱氢酶一步催化果胶物质中的 D-半乳糖醛酸氧化即可得到黏酸,黏酸可以用来制备呋喃

二甲酸,后者可以替代对苯二甲酸用于制造聚酯、聚酰胺类材料^[75]。果胶是一种复杂酸性多糖分子,其中酸性糖半乳糖醛酸残基占果胶多糖的 60%以上。在原核生物中,醛酸脱氢酶可以将 D-半乳糖醛酸氧化为黏酸;或可通过糖醛酸异构酶将 D-半乳糖醛酸异构化为 D-塔格糖酮酸。目前醛酸脱氢酶对 D-半乳糖醛酸的催化活性还不够高,限制了黏酸生产效率的进一步提升。吡咯喹啉酮依赖型葡萄糖脱氢酶也能氧化 D-半乳糖醛酸生成黏酸,但该酶的催化需要有吡咯喹啉酮存在。采用全细胞催化进行转化时,提高菌株对 D-半乳糖醛酸的转运能力,也是增强黏酸生产效率的重要方面。

长链二元酸是重要的材料单体,可通过催化油脂法、化学合成法和生物发酵法制备。近年来生物发酵法生产长链二元酸发展很快,在生物合成途径、微生物菌株筛选和高产菌株创制方面都取得了很大进展^[76]。长链二元酸的产酸水平和分离提取工艺对在工业生产规模上控制其生产成本十分重要。利用可再生原料生产长链二元酸,是该系列产品的未来发展方向。

作为重要的化工原料,脂肪酸在生物能源、化妆品、个人护理产品和工业润滑剂等领域应用广泛。经过工程改造的大肠杆菌、解脂耶氏酵母和酿酒酵母可以合成脂肪酸,其中工程酵母在限氮补料批式发酵中脂肪酸产量已经超过 30 g/L。研究人员敲除了野生型多形汉逊酵母的敲除脂酰辅酶 A 以防止脂肪酸合成逆转,在碳氮比为 120 的限氮条件下,采用溶氧耦联的批式发酵,脂肪酸产量达到 18 g/L,显示出作为脂肪酸细胞工厂的潜力。但多形汉逊酵母的脂肪酸得率仅为 0.08 g/g 葡萄糖,低于工程改造的解脂耶氏酵母(0.14 g/g 葡萄糖)和酿酒酵母(0.1 g/g 葡萄糖)^[77]。总体上,酵母生产脂肪酸的得率都还处于比较低的水平。考虑到脂肪酸

对糖的理论得率仅为 0.3 g/g, 进一步的研究应考虑设计得率更高的脂肪酸生物合成路线。

解脂耶氏酵母因具有能耐受多种环境胁迫、可利用底物范围宽泛、胞内乙酰辅酶 A 供应充足、具有天然高产油脂、蛋白质和有机酸的能力, 近年来受到广泛关注。经过工程改造的解脂耶氏酵母不仅可以高产三羧酸循环中间产物——柠檬酸、异柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸, 也可以生产 TCA 循环中间体衍生物——衣康酸以及完全异源合成途径产物——巴豆酸^[78]。在解脂耶氏酵母中共表达三羧酸线粒体转运蛋白基因 *YHM2* 和磷酸脱氢酶基因 *AMPD*, 降低胞内 AMP 水平以弱化异柠檬酸脱氢酶活性, 工程菌株可产生 97 g/L 的柠檬酸, 得率 0.5 g/g (理论得率 1.07 g/g 葡萄糖)。而若敲除 *YHM2* 基因弱化柠檬酸的转运, 同时过表达 *AMPD* 基因与编码异柠檬酸转运蛋白的 *SFC1* 基因, 工程菌株可产生 136.7 g/L 的异柠檬酸, 得率 0.74 g/g (理论得率 2.04 g/g 橄榄油)。在解脂耶氏酵母中过表达其内源的 NADP^+ 依赖型异柠檬酸脱氢酶和丙酮酸羧化酶, α -酮戊二酸产量达到 186 g/L, 得率 0.36 g/g (理论得率 0.95 g/g 甘油)。在解脂耶氏酵母中敲除琥珀酸脱氢酶复合物的亚单位编码基因 *SDH5* 来阻断琥珀酸的代谢, 可以产生 160 g/L 的琥珀酸, 得率 0.4 g/g (理论得率 0.62 g/g 粗甘油)。由葡萄糖生产衣康酸的理论得率为 0.86 g/g, 目前经改造的解脂耶氏酵母可以产生 22 g/L 的衣康酸, 得率为 0.05 g/g, 与丝状真菌玉米黑粉菌 220 g/L 的衣康酸的产量相比差距还很大。

基于生物电化学系统的微生物电合成是一种新型发酵技术。通过利用外源电子, 达到促进微生物生长和提高碳利用效率的目的。利用生物电化学系统, 可开展二氧化碳固定和碳链延长等研究。运动发酵单胞菌的特点是以 ED 途

径生产乙醇, 该菌培养环境从无氧转变到有氧时, 其生物量不受影响。这意味着氧气不是运动发酵单胞菌必需的电子受体, 理论上电子能在胞内外进行迁移, 使运动发酵单胞菌具有潜在的电活性。研究人员在一个外接 3 V 电源的 H 型电化学发酵装置中测试了运动发酵单胞菌的发酵效能, 发现阳极甘油增加, 阴极乙醇和琥珀酸增加^[79]。在该菌中过表达与胞内氧化还原平衡、生物膜形成、电子传递相关的转录水平显著变化的基因, 发现胞内氧化还原平衡和电子传递相关基因的过表达均会进一步提高运动发酵单胞菌的电活性。

在有机酸、氨基酸、醇类等化学品生产过程中, 微生物细胞工厂一般会面临内源表达蛋白或外源酸、醇含量增加导致的胁迫。通过改造细胞壁、细胞膜脂质、细胞膜蛋白的胁迫防御工程, 改造转录因子、特异性调节蛋白和胁迫响应代谢物的损伤修复工程, 以及非理性和半理性的耐受进化工程^[80], 可以增强细胞胁迫抗性, 提高目标产品生产水平。

3.4 天然化合物

天然产物是药物及其先导化合物的重要来源, 近 40 年获批上市的药物中有 1/4 来源于天然产物及其衍生物。已知的植物天然产物超过 20 万种, 我国的药用植物在 1 万种以上。创制生产植物天然产物的微生物细胞工厂, 可以突破植物资源限制, 促使植物天然产物走出种植提取路线。目前, 研究人员已经实现青蒿素、紫杉醇、大麻素、莨菪碱等一批代表性天然化合物的微生物合成, 萜类香精、人参皂苷、三萜酸、类胡萝卜素等萜类化合物, 灯盏乙素、虎杖苷、根皮素、黄芩素等黄酮类化合物, 天麻素、红景天苷、络塞维、迷迭香酸、复杂苯乙醇苷等苯丙素类化合物, 以及生物碱类等典型的植物天然产物的生物合成取得了很大的

进展^[81]。以解脂耶氏酵母为例,该菌中用于油脂合成的胞质乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A,同时也是萜类、黄酮类等天然产物的合成前体;其较高的磷酸戊糖途径代谢通量能够提供大量 NADPH 供生物合成使用;其丰富的脂滴亚细胞结构,也可以为疏水性产物天然产物提供储存场所。近年来,经工程改造的解脂耶氏酵母被用于合成一系列萜类化合物,如环状单萜化合物柠檬烯,倍半萜类化合物 α -法呢烯、(+)-诺卡酮、紫穗槐二烯,三萜类化合物齐墩果酸、桦木酸、原人参二醇、羽扇豆酚,四萜类化合物番茄红素、 β -胡萝卜素、虾青素、 β -紫罗兰酮等。经过工程改造的解脂耶氏酵母还可以生产 0.1–1.0 g/L 的柚皮素、雌黄醇和黄衫素等黄酮类化合物,以及 2-苯基乙醇、对香豆酸、白藜芦醇、紫色杆菌素和脱氧紫色杆菌素等莽草酸途径衍生化合物^[22]。目前,多个高等院校和研究机构建立了从元件挖掘、酶设计改造、细胞工厂构建、发酵与分离纯化一体化的植物天然产物重组合成全链条研发平台,多个药物、营养品及香精香料正在实现工业化生产的过程中。目前,微生物合成的植物天然产物在市场准入方面还存在限制,急需监管部门解决。

萜类化合物的生物合成是当前合成生物制造领域的一个研究热点。去年的评述已经比较系统介绍了萜类化合物的生物合成途径^[7]。第一阶段是生成异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)。第二阶段,不同数目的 IPP 和 DMAPP 可生成 10 碳的牻牛儿基焦磷酸(geranyl diphosphate, GPP, 合成单萜)、或 15 碳的法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP, 合成倍半萜和三萜),或 20 碳的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP, 合成二萜和四萜)。第三阶

段,不同的萜类合酶及细胞色素 P450 单加氧酶可催化 GPP、FPP 和 GGPP 形成多种多样的萜类化合物。

单萜类化合物是指由两个异戊二烯单位构成、含 10 个碳原子的化合物,可以分为无环单萜、单环单萜、双环单萜及三环单萜。单萜类化合物普遍存在于天然植物中,一般具有挥发性和较强的香气,在精油、香料、药物、农业和燃料领域具有广泛的应用价值。研究表明,上游合成途径强化可以提供更多 IPP 和 DMAPP,中游合成途径优化可以生成更多 GPP 和各种单萜化合物,下游合成途径弱化可以减少单萜化合物向其他化合物的转化,上中下游途径改造结合起来,单萜化合物的合成生物制造效率也在不断提升。目前,大肠杆菌工程菌株可以生产 970 mg/L 的 α -蒎烯、2 g/L 的香叶醇、2.7 g/L 的柠檬烯;酿酒酵母工程菌株可以生产 1.68 g/L 的香叶醇、917 mg/L 的柠檬烯,是目前较高的单萜化合物产量^[82]。

三萜类化合物是萜类化合物中数量和种类最多的一类。环氧角鲨烯环化酶可催化以 FPP 为前体生成的 2,3-氧化鲨烯进入不同的代谢分支,形成多种甾醇和三萜类物质,如羊毛甾醇、环阿屯醇、葫芦二烯醇、 α -香树脂醇、 β -香树脂醇及羽扇醇等萜烯类衍生物,是甾醇和植物三萜类物质生物合成的重要调控位点。环氧角鲨烯环化酶的多样性是三萜生物合成多样性的基础。近年来,环氧角鲨烯环化酶的催化表征、基因与蛋白质的分子进化关系、酶的结构基础、蛋白质模拟与分子计算方面进展很快^[83]。目前已经从植物中鉴定出 80 多种合成三萜的环氧角鲨烯环化酶,可以生产出多种重要的三萜化合物。

环化三萜经氧化、糖基化后,可生成各种三萜皂苷,如具有抗炎、抗肿瘤等多种药理活

性的人参皂苷、大豆皂苷、罗汉果苷、柴胡皂苷等,其中依赖于尿苷二磷酸(UDP)的糖基转移酶(UGTs)是催化三萜皂苷生成的关键酶。很多植物中存在以达玛烷型四环三萜、葫芦烷型四环三萜、齐墩果烷型五环三萜和乌苏烷型五环三萜为底物的UGTs,UGTs也广泛存在于动物、真核微生物和原核生物中^[84]。目前在大肠杆菌和酿酒酵母中已经实现了齐墩果酸、甘草次酸、人参皂苷、三七皂苷、罗汉果苷等的异源生物合成。挖掘新型UGTs并对其进行工程改造,不仅可以扩展三萜皂苷的种类,也可以提高微生物合成三萜皂苷的产量,推动三萜皂苷生物合成的发展。

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,具有多种药理活性作用,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”的生物合成新路线已经形成^[85]。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。目前,研究人员正在创建从葡萄糖等简单原料到甾体关键中间体乃至甾体原料药的直接生物合成,将有望彻底颠覆甾体药物的生产模式。

对香豆酸是很多重要化合物的前体,由酪

氨酸解氨酶催化酪氨酸生成的路线比较简单。含有酪氨酸解氨酶的重组大肠杆菌对香豆酸的生产率已经达到2.88 g/(L·h),但催化30 mmol/L酪氨酸的转化率仅为58.6%,因此需要解决酪氨酸解氨酶底物特异性、活性和耐受性较低的问题。研究人员发现顺天黄杆菌的酪氨酸解氨酶(Fs-TAL)具有高活性、高特异性和高底物耐受性,能够催化10 g/L(55 mmol/L)酪氨酸生成6.2 g/L对香豆酸,转化率达到67.9%^[86],但是催化过程需要在36 h完成,生产率有待进一步提高。

4-羟基苯乙酸酯3-羟化酶可以催化对香豆酸转化为咖啡酸,后者具有抗癌、抗氧化等多种药理作用。该酶由4-羟基苯乙酸酯3-单加氧酶和NAD(P)H-黄素氧化还原酶两个部分组成,需要NAD(P)⁺/NAD(P)H和FADH₂/FAD的参与,全细胞催化是比较适合的转化方式。研究人员在大肠杆菌中表达4-羟基苯乙酸酯3-羟化酶,采用乳糖诱导培养至OD₆₀₀值为96的高细胞密度,6 h可催化生产19 g/L的咖啡酸,摩尔转化率为79%^[87]。

对香豆酸在4-香豆酸:辅酶A连接酶(4CL)和查尔酮合成酶的顺序催化下,可先后生成对香豆酰-CoA和柚皮素查耳酮,后者经查耳酮异构酶异构化后生成柚皮素。酵母异源合成柚皮素的最高产量已经达到1.2 g/L。提高柚皮素的产量,需要强化其生物合成途径中多种外源蛋白的表达。柚皮素生物合成关键酶是否存在泛素化修饰?如果存在,是否可以通过降低外源蛋白泛素化修饰程度来提高蛋白表达量,从而提升柚皮素产量?为了回答这些问题,研究人员利用荧光双分子互补法在酿酒酵母中建立了泛素化修饰的实时原位检测体系,获得了5个关键酶的潜在泛素化位点^[88]。将酪氨酸解氨酶的泛素化位点从赖氨酸突变为精氨酸,可将对

香豆酸的产量提高了 32.3%；若将查尔酮合成酶的泛素化位点从赖氨酸突变为精氨酸，也降低了泛素化程度，但对柚皮素产量没有明显影响^[88]。这一研究为可能存在蛋白质泛素化修饰的底盘细胞中提高外源蛋白的活性提供了一种新的思路。

异戊烯基转移酶可催化柚皮素生成 8-戊烯基柚皮素，这些植物来源的异戊烯基转移酶一般定位于叶绿体等不同细胞器上。在微生物中表达这些膜结合蛋白，需要识别并切除在植物中用于定位的信号肽。以来自苦参的异戊烯基转移酶为例，N 端 K62 截短的异戊烯基转移酶的效率最高。结合强化 DMAPP 供给，8-戊烯基柚皮素的产量达到 45 mg/L^[89]。

苯丙烷类代谢途径的限速酶——苯丙氨酸解氨酶可催化苯丙氨酸脱氨形成肉桂酸，后者再形成一系列有气味的挥发性化合物。云锦杜鹃花中的香气挥发物主要是苯甲酸甲酯，研究人员从云锦杜鹃中克隆了苯丙氨酸解氨酶基因的 cDNA^[90]，为理解杜鹃花苯丙氨酸解氨酶如何调控苯甲酸甲酯生物合成的机制奠定了基础。

木质素的主要单体为对-香豆醇、松柏醇和芥子醇，均可由苯丙烷代谢途径合成。咖啡酸-*O*-甲基转移酶可催化生成阿魏酸、芥子醛和芥子醇，在烟草、杨树、苜蓿等植物中改变咖啡酸-*O*-甲基转移酶的表达水平可以改变木质素含量和组分^[91]。植物咖啡酸-*O*-甲基转移酶既能催化苯丙素类化合物，又能催化黄酮、*N*-乙酰-5-羟色胺等，如果将其作为催化元件应用于特定苯丙素类成分时，需要提升其底物专一性，实现特定活性木脂素的定向生物合成。

3.5 抗生素与活性肽

放线菌的次级代谢产物是创新药物的重要源泉，临床中约 70% 的抗生素及其衍生物来源于放线菌^[92]。合成次级代谢产物的基因簇多数

情况下是沉默的，一旦启动也受到严谨调控，这是发掘新型抗生素的两个障碍。利用可作用于放线菌 RNA 聚合酶和核糖体的抗生素处理菌株，使其产生相应抗生素的抗性突变，有可能激活菌株合成相关活性次级代谢产物，即核糖体工程^[92]。该方法可用于定向挖掘新型放线菌次级代谢产物。核糖体工程的发展，经历了发现放线菌严谨反应激活自身次级代谢的现象(技术萌芽)、基于放线菌严谨反应机制的激活用抗生素筛选(技术发展)、抗生素抗性诱变机制的揭示及发掘新颖活性产物(技术成熟) 3 个阶段。Rifampicin 和 Streptomycin 是最常用于核糖体工程的抗生素，诱导机制与作用靶点也最为清晰。核糖体工程也可以和传统物理化学诱变技术、基因组重排技术和基因工程技术联用。基因组学技术的发展，使研究人员可以跳过依赖大规模的菌株发酵及产物分析等过程，通过高通量的基因表达分析技术，筛选出目标化合物激活生产或目标基因(簇)激活表达的突变菌株，加速抗生素高产菌株的筛选。

I 型聚酮合酶催化乙酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 及甲基丙二酰辅酶 A 合成的纳他霉素是一种多烯大环内酯类化合物。研究人员在褐黄孢链霉菌中分别加强乙酰辅酶 A 和甲基丙二酰辅酶 A 合成途径，重组菌株纳他霉素产量分别比野生型菌株提高了 44% 和 21%；共表达乙酰辅酶 A 合成酶和甲基丙二酰辅酶 A 变位酶时，重组菌株纳他霉素产量比野生型菌株提高了 66%^[93]。同时，纳他霉素具有还原性，胞内一定浓度的活性氧能够促进纳他霉素的合成。若胞内合成的纳他霉素没有及时排出胞外，会影响细胞的活性氧水平，进而影响纳他霉素的持续合成。纳他霉素合成基因簇中 *sgnA* 和 *sgnB* 编码的 ABC 转运蛋白 SgnA 和 SgnB 被预测为参与抗生素及其合成前体从胞内向胞外的转运。研究

人员在生产纳他霉素的褐黄孢链霉菌中过量表达 *sgnAB* 基因, 发现过表达菌株中纳他霉素的胞外/胞内比提高, 且纳他霉素的发酵总产量也提高了 12.5%, 达到 7.58 g/L^[94]。

阿卡波糖是一种假四糖类化合物, 因可抑制人小肠 α -糖苷酶活性, 被用于 2 型糖尿病治疗, 是我国口服降糖药中销量最大的品种。游动放线菌发酵生产阿卡波糖的一个问题是会产生与阿卡波糖结构类似的杂质组分。其中由阿卡维糖以 1,4-糖苷键与麦芽酮糖相连的组分 A, 以及阿卡维糖以 1,4-糖苷键与海藻糖相连的组分 C, 与阿卡波糖结构极为相近, 难以去除^[95]。实践中发现, 温度调控可以降低组分 A 含量, 菌种改良、添加糖苷酶抑制物质等措施可以降低组分 C 的含量。解析阿卡波糖结构类似杂质的合成及调控机制, 是优化阿卡波糖生产、降低杂质含量的基础。

与抗生素的杀菌机制不同, 抗菌肽一般以物理方式破坏细菌细胞膜, 快速杀死细菌, 因此抗菌肽一般不会诱导耐药性的产生。进行抗菌肽的人工设计, 保持或提高其生物学活性, 是当前的一个主要挑战。疏水性氨基酸亮氨酸和异亮氨酸在抗革兰氏阳性菌方面具有优势, 因此很多抗菌肽都具有共同残基亮氨酸和异亮氨酸。研究人员以(RXKY)₂(YRY)₂ (X 代表异亮氨酸, Y 代表亮氨酸)为模板, 设计了一个 RIKL 的新抗菌肽^[96]。RIKL 具有较高的抑菌活性, 且在不同条件下仍能保持其抑菌活性, 在检测范围内无溶血活性、细胞毒性较低, 具有成为高效抗菌药物的潜力。

枯草芽孢杆菌分泌的脂肽是一类天然的抗菌活性物质, 其中表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(subtilin)和芬原素(fengycin)这 3 个环脂肽具有抗真菌、抗细菌、抗病毒、抗肿瘤、抗炎等功能, 在多个领域具有较好的应用潜力^[97]。

筛选发掘新型脂肽, 提高脂肽生产效率, 降低脂肽生产成本, 进行安全性评估, 有望进一步推动脂肽的应用。

超短肽是指肽链长度不超过 7 个氨基酸的肽, 常用作化妆品的功能性成分。例如, 三肽 GHK (甘氨酸-L-组氨酸-L-赖氨酸)具有刺激胶原蛋白产生的特性, 而四肽 GQPR (甘氨酸-L-谷氨酸-L-脯氨酸-L-精氨酸)则具有抗炎以减缓胶原蛋白降解的特性。由于超短肽的分子量较小, 一般无法直接重组表达。研究人员以超短肽的串联重复基因为模板, 进行滚环扩增, 并用肠激酶和胰蛋白酶切割重组融合蛋白, 最后获得了超短肽混合物^[98]。随着基因串联重复数的增加, 重组融合蛋白的表达水平逐渐降低, 这是需要进一步解决的问题。

3.6 功能多糖

细菌纤维素具有生物相容性好、结晶度高、孔隙率高以及抗拉伸能力强的特点, 属于纳米级纤维, 是目前天然纤维中最细的, 一根典型的细菌纤维线宽度仅有 0.1 μm , 可应用于生物纺织物、生物医疗、纳米材料、电子器件、营养食品和军工等各个领域。2022 年 5 月, 墨西哥公司 Polybion 宣布完成由瑞士 Blue Horizon 领投的 440 万美元的 A 轮融资, 计划扩大其世界首个工业规模的细菌纤维素生物制造设施 FOAK I (First-Of-A-Kind), 每年生产 10.2 万 m^2 的专有生物织物 Celium^[99]。木葡糖酸醋杆菌可以将葡萄糖分子通过 β -1,4-糖苷键连接而合成细菌纤维素。BcsD 是细菌纤维素合酶中的一个亚基, 其编码基因位于纤维素合酶操纵子的末端。该亚基并不是细菌纤维素合成所必需的, 但参与了纤维素的结晶过程, 并为葡聚糖链的排出提供通道。研究人员利用 CRISPR/dCas9 系统获得了一系列 *bcsD* 基因表达量不同的木葡糖酸醋杆菌, 发现当 *bcsD* 的表达量低于 55%时,

细菌纤维素的孔隙率显著上升^[100]。因此,可以通过控制 *bcsD* 基因的表达量,来获得具有不同孔隙率和不同结晶度的细菌纤维素,以适应不同应用领域对不同结构特性细菌纤维素的需求。此外,在细菌纤维素和其他胞外多糖的产生过程中,环二鸟苷酸(c-di-GMP)也发挥着重要作用^[101]。c-di-GMP 作为纤维素合酶变构调节因子起作用,且纤维素合酶的活性依赖于 c-di-GMP。

鞘氨醇胶是由鞘氨醇单胞菌属分泌的胞外杂多糖,包括威兰胶、结冷胶和定优胶等,可作为增稠剂、保水剂应用于石油、混凝土、日化以及医药领域。为提高鞘氨醇胶的糖转化率,研究人员基于 *LguI/Eco8II* 的 LE 克隆系统原理,设计了一个基于 *LguI/BbvCI* 的 LB 克隆系统,将鞘氨醇单胞菌中两个糖基转移酶基因 *welB* 和 *welK* 逐步定向融合到 LB 克隆载体,转化鞘氨醇单胞菌并表达。工程菌的鞘氨醇胶产量没有变化,但是黏度增加了 25%^[102],提示鞘氨醇胶的分子量或结构组成发生了变化。

硫酸软骨素是一种由葡萄糖醛酸和 N-乙酰半乳糖胺交替组成的糖胺聚糖。硫酸软骨素的不同链长和不同磺化方式决定了其结构和功能的多样性。毕赤酵母胞内能够合成 UDP-葡萄糖以及 UDP-葡萄糖胺。这两个化合物分别在 UDP-葡萄糖脱氢酶和 UDP-葡萄糖胺异构酶的催化下生成 UDP-葡萄糖醛酸和 UDP-乙酰半乳糖胺,后两者在软骨素聚合酶催化下生成软骨素,进而在软骨素-4-O-磺基转移酶催化下发生磺酸转移反应,生成硫酸软骨素。研究人员首先构建了可生产 170 mg/L 软骨素的毕赤酵母工程菌株,然后通过途径强化和优化,将软骨素产量提高到 495 mg/L,补料分批发酵 144 h 可产 2.6 g/L 软骨素。作者进而在毕赤酵母细胞破碎也中添加软骨素-4-O-磺基转移酶和磺酸供

体,实现了 0–40%不同磺酸化水平硫酸软骨素的生物合成^[103]。

革兰氏阴性的沙门菌是大部分脊椎动物肠道疾病的重要诱因。外膜上的 O 抗原多糖是肠炎沙门菌的主要致病因子之一。多糖抗原与适当的载体蛋白发生共价连接形成的糖蛋白是 T 细胞依赖型抗原,能诱导产生特异性 IgG、IgA 等抗体,因此在预防沙门菌感染上具有潜在价值。传统的糖蛋白的多糖部分制备流程繁琐,难以规模化生产。通过寡糖转移酶、糖链供体和糖链受体(即载体蛋白)的协同,可以实现生物法合成糖蛋白。研究人员采用 CRISPR/Cas9 方法构建了肠炎沙门菌 *waaL* 基因缺失株,使其无法合成外膜脂多糖,在此基础上制备出含有肠炎沙门菌 O 抗原多糖的糖蛋白^[104],为进一步合成肠炎沙门菌糖蛋白疫苗奠定基础。

3.7 功能蛋白质

黏合材料尤其是水下黏合材料,在多个领域具有广泛应用。海洋生态系统中很多生物能分泌黏胶蛋白,如藤壶、贻贝等,这些黏胶蛋白最突出的特点是能在不同环境下保持稳定的黏结能力。以藤壶分泌的藤壶胶为例,其水下黏附机理对水下黏附剂的开发具有一定的参考价值^[105]。

细胞内有一些在生理条件下不具稳定高级结构的固有无序蛋白。固有无序蛋白在高等生物蛋白质组中的占比超过 40%^[106]。固有无序蛋白虽然不具有稳定高级结构,但能够阻止蛋白聚集、稳定蛋白构象和保护膜结构,能够帮助生物体抵抗和耐受各种理化因子胁迫。预测并深入研究固有无序蛋白的基序/结构-功能机制、将固有无序蛋白设计为人类疾病的药物靶点、对固有无序蛋白元件开展应用研究,是该领域的主要方向。

利用烟草等经济作物、谷类作物、豆科作

物和蔬菜作物生产具有药用价值的重组蛋白是“分子农业”的主要研究内容。与细胞培养系统相比,植物作为生物反应器,不易被病原体污染,规模上具有很强的可扩展性,生长要求简单且成本低廉,其翻译后修饰的能力对许多蛋白质的生物活性至关重要。分子农业最大的问题包括植物生产力低、下游加工成本高以及转化应用过程缓慢。目前植物细胞培养系统其重组蛋白的产量通常在 0.01–10.00 mg/L 之间,比较低,因此提高重组蛋白的产量是促进分子农业发展的关键^[107]。蛋白质表达场所(内质网、质外体、液泡和叶绿体)、载体的表达调控结构(启动子、终止子、非翻译区域、基因沉默抑制子、融合/亲和标签和重组蛋白密码子等)以及用于表达目标蛋白的底盘植物,都是进一步优化研究的目标对象。

人成纤维细胞生长因子 21 是改善血糖和脂质代谢的候选药物,但存在半衰期短和易被体内代谢等缺点,限制了其临床应用。人血清白蛋白是血浆中含量最多的可溶性蛋白,且半衰期长、无免疫原性以及组织分布广,融合人血清白蛋白可以显著地改善蛋白质药物的半衰期。研究人员构建了人血清白蛋白-人成纤维细胞生长因子 21 的融合蛋白,并在毕赤酵母中进行了重组表达和纯化。融合蛋白表现出更好的热稳定性和抗胰蛋白酶降解的能力,其血浆半衰期也延长了约 27.6 倍^[108],在 2 型糖尿病动物中融合蛋白表现出了更好的长效降糖效果。

细胞色素 c 是一类在生物体内广泛存在的血红素蛋白,已被用于多个领域。目前对于古菌来源的细胞色素 c 研究较少。研究人员表达了一个未培养厌氧甲烷氧化古菌的细胞色素 c^[109],为实现难培养微生物细胞色素 c 的大量表达提供了技术参数。

胶原蛋白因其生物相容性和生物可降解等

特性,成为生物材料和再生医学等领域最广泛使用的蛋白质材料之一。重组胶原蛋白目前可分为重组人胶原蛋白、重组类人胶原蛋白、重组类胶原蛋白三类。胶原蛋白重组表达的核心是要形成热稳定的三螺旋构象和超分子组装体。除了依赖于胶原蛋白的自组装,重组胶原表达体系中的胶原修饰酶也十分重要。目前微生物、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞等都被用于表达重组胶原蛋白^[110],但由于胶原蛋白大分子结构的复杂性,重组胶原蛋白的生长有着很高的技术门槛,目前巨子生物、华熙生物等企业走在产业化的前列。

乳铁蛋白是一种铁结合蛋白,可以促进对铁的吸收,具有广泛的应用前景。牛乳铁蛋白包含具有杀菌作用和与肝素结合结构域的 N 叶,以及执行肝细胞结合和内化功能结构域的 C 叶。研究人员优化了枯草芽孢杆菌生产牛乳铁蛋白 N 叶的工艺,牛乳铁蛋白 N 叶的生产水平达到 23.5 mg/L^[111],高于枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和昆虫细胞的水平。

食品品质显著影响食品稳定性和消费者感知。对蛋白类食品品质和功能特性改善的期待,催生了对蛋白质交联用酶的需求。蛋白质交联是指在蛋白质多肽链之间或蛋白质分子间形成共价键,常用的交联酶包括谷氨酰胺转氨酶、氧化酶、脂氧合酶和谷氨酰胺内肽酶等^[112]。催化蛋白质交联最重要的酶之一是谷氨酰胺转氨酶,已经广泛用于肉类、乳制品、鱼类和烘焙食品中。该酶催化蛋白质中谷氨酰胺残基的 γ -羟胺基团与伯胺化合物之间发生酰基转移反应,从而使蛋白质发生共价交联。酶的成本和添加量是制约应用的关键因素之一,酶法交联是否会产生有害人体的物质(如自由基)也需要进一步关注。

未来食品的生物制造是促进农业工业化发展的一个重要方向。人造肉、人工奶和人工脂

肪等产品的问世,正在改变传统的食品生产模式和场景^[113]。另一方面,合成生物技术飞速发展使高性能菌株的可获得性及获取效率显著提升,亟需将传统低效的发酵优化放大技术升级,以满足高通量菌种性能验证及工艺开发能力的需求,人工智能技术特别是数字孪生与知识图谱等技术的应用,将为传统发酵技术的颠覆性发展带来巨大推动力^[114]。

4 一碳化合物和生物质原料的利用

将二氧化碳转化为人类可以利用的有机物是利用二氧化碳的有效途径之一。基于天然固碳途径固定二氧化碳生产化学品、对天然固碳途径进行改造以提高固碳效率、或创建全新的人工生物固碳途径,是当前关于二氧化碳生物转化的3个主要方向。自然生物固碳元件是自然界亿万年进化的结果,早已适应了空气中低浓度二氧化碳、低密度太阳能的自然条件,所以效率比较低,因此高效固碳酶的选择和设计是创建高效人工固碳途径的关键。同时,由于二氧化碳是高度氧化的产物,二氧化碳人工生物转化的效率实际上取决于能量利用的效率。生物-化学相组合的技术体系,已经成为二氧化碳人工固定转化的一个新方向,最具有代表性的例子就是用氢将二氧化碳还原为甲醇,再通过人工设计的全新体外多酶催化途径将甲醇转化为淀粉^[115]。这种走出植物光合作用的淀粉合成新方式,实际上代表了人类对太阳能利用方式的一种突破。近年来,随着生物电化学的发展,用于生物固碳的未来生物电能利用系统,还有很大的想象和发展空间。例如糖与水反应制氢、糖完全氧化产电,以及氢或电能固定二氧化碳到糖的生物转化的“电-氢-糖循环的新能源理论

体系”^[116],以解决电储存和氢经济的“产储运”的难题。

糖原是一种支链 α -葡聚糖大分子,是最具代表性、也是最重要的蓝细菌天然碳汇物质,一般占细胞生物质干重的5%–20%,在某些特殊的种属或特殊的环境条件下甚至可达到50%。葡萄糖-1-磷酸腺苷转移酶被认为是调控糖原合成速率和糖原含量的关键限速步骤。近年来,在蓝细菌中弱化糖原合成重新分配碳流、阻断糖原合成驱动有机酸产生方面取得很多进展^[117]。调节糖原代谢虽然可以调控蓝细菌光合碳流分配,但也会对细胞生理功能造成影响,这可能也是蓝藻化学品产量难以提高的重要原因。

二氧化碳的人工生物转化是近期一个热点研究领域。将二氧化碳中的+4价碳还原至低价态,需要输入还原力。在光合固碳过程中,还原力主要由光电子产生,但由于光是低密度能源,因此光合自养生物固碳效率一般比较低。异养微生物虽然利用有机碳源生长,但基因组中也编码固碳效率很高的酶,如磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、丙酮酸羧化酶等。以糖为底物的发酵过程,由于底物水平磷酸化产生的还原力不足,可以通过丙酮酸氧化脱羧来获得额外的还原力,其代价是释放二氧化碳,降低目标产品对原料的得率^[118]。若能够通过外部输入电子解决还原力不足的问题,就有可能将一部分二氧化碳回收固定,从而提高目标产品的得率^[119]。在非光合细菌——热醋穆尔氏菌培养体系中添加硫化镉,可以利用光将二氧化碳还原为乙酸,提示半导体光生电子可以促进大肠杆菌的生长和代谢^[120]。

在温室气体中,除了完全没有能量的二氧化碳,还有富含能量的甲烷。自然界中存在多种甲烷氧化菌,能以甲烷为唯一碳源和能源,将厌氧环境产生的甲烷氧化,避免其逃逸到大

气,对全球甲烷消除的贡献率高达 10%–20%^[121]。甲烷氧化菌能够将甲烷氧化为甲醇-甲醛,一部分甲醛进入生物质合成,另一部分甲醛氧化为甲酸,并通过甲酸脱氢酶氧化为二氧化碳。利用甲烷氧化菌生产单细胞蛋白技术近年来发展很快,Calysta Inc.于 2020 年与 Adisseo 合资在重庆市建设第一家基于甲烷氧化菌的单细胞蛋白商业规模生产设施。利用甲烷生产单细胞蛋白还远远没有充分利用甲烷富含的能量。如果能将甲烷中的 H 释放出来用于固定二氧化碳,实现甲烷和二氧化碳的共利用,可能是降低温室气体排放更重要的路径。

生物质主要由 40%–50%的纤维素、20%–40%的半纤维素和 20%–30%的木质素组成。制约纤维素利用的技术瓶颈纤维素酶生产成本在经过多年研发后显著降低,目前每千克酶的成本已经降低到 10–20 美元,但纤维素酶活力的绝对值相对淀粉酶还有较大差距,导致生物质酶解的效率仍然远低于淀粉的酶解。相对于生物质原料预处理、纤维素酶发酵和生物质酶解糖化、糖化液发酵生产目标产品的三段式纤维素利用工艺,对能够直接降解纤维素的丝状真菌进行代谢工程改造,使其能够一步利用纤维素原料生产化工产品,是近年来的重要发展方向。目前,经过代谢工程改造的嗜热毁丝霉,以葡萄糖为原料,苹果酸产量达到 226 g/L,转化率为 0.88 g/g,发酵产率为 1.57 g/(L·h);直接以纤维素为原料可生产 180 g/L 苹果酸,转化率接近 1 g/g;以玉米芯水解液为碳源,也可生产超过 150 g/L 的苹果酸^[122]。秸秆制蛋白、秸秆制淀粉也是非常重要的发展方向,有效解决木质素的分离或利用问题是一个核心挑战。

全球航空业产生的碳排放量巨大,利用生物质资源生产航空煤油具有重要意义。航空煤油一般包括 C7–C17 的碳氢化合物,可通过生

物质的脱氧、改质制备。目前生物航煤主要有 4 种转化路径,即醇制航煤、油制航煤、气制航煤及糖制航煤^[123],其中,油制航煤距离商业化比较近,但整体竞争力还比较弱。

5 合成微生物组

高通量、低成本、自动化的工程改造技术,显著提高了研究人员改造单一菌株生产化学品的能力。越来越多研究者发现,当代谢途径过长造成代谢负担,或代谢产物对微生物产生毒性时,通过“劳力分工”的原则构建合成微生物组,能够获得改造单一菌株更好的效果。研究发现,可以采用模块化方式构建微生物组进行共培养以生产特定化学品^[124]。这样的模块化可以在不同的原核生物间进行,也可以在不同的真核生物间进行,甚至可以在原核生物-真核生物间进行,所生产的产物既可以是醇、酸等初级代谢产物,也可以是结构更为复杂的萜烯、黄酮和生物碱类天然化合物。

自然界广泛存在着微生物混菌系统。合成生物学的发展使我们能够在实验室条件下设计人工微生物混菌系统,用于废水处理、生物降解、生物发电、土壤改善、生物防治和生物合成方面的研究,其中光合自养-异养微生物共培养系统被研究得最为广泛。人工定制活性污泥也可用于污水中微塑料的降解^[125]。组学技术能够为改善菌株性能、提高人工混菌系统稳定性提供新的信息和知识^[126]。将人工微生物混菌作为一个系统,组学信息有助于指导研究者找出与物质运输、能量代谢、信号传递、胁迫响应相关的功能元件,并通过工程改造,创建性能更优的人工微生物混菌系统并进行应用。微藻与细菌、真菌、微藻的共培养也表现出比单独培养微藻在生产生物柴油、高价值天然产物等方面更强的应用潜力^[127]。

6 结束语

现代生物技术的核心是对 DNA 的操控。高通量、低成本的 DNA 测序、合成、编辑技术和基因表达调控技术,正在从根本上重塑现代生物技术的发展路径。从核酸元件、酶和蛋白质元件的设计和改造,到细胞工厂和生物体系的设计和改造,合成生物的生产能力不断提升,生物制造的产业化速度明显加快。随着国家和地方科技资源,产业及社会资本对合成生物学领域支持力度的不断加大,科研院所、大专院校、企业研发中心和初创公司成为合成生物制造研发的四驾马车,汇聚了一批全球合成生物学和生物制造领域的优秀人才,合成生物制造领域的重大原创成果正在加速涌现。《生物工程学报》将继续加强报道合成生物制造领域的创新成果,加强合成生物制造创新技术成果的推广,支撑合成生物制造产业快速成长壮大,助力经济社会的绿色可持续发展。

REFERENCES

- [1] 韩祺, 姜江, 汪琪琦, 龚巧琳, 李金山, 张瀚予. 我国工业生物技术和产业的现状、差距与任务[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4035-4042.
HAN Q, JIANG J, WANG QQ, GONG QL, LI JS, ZHANG HY. The current situation and developmental trends of industrial biotechnology and biomanufacturing in China[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4035-4042 (in Chinese).
- [2] 欧阳平凯. 我国工业生物技术发展回顾及展望[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 3991-4000.
OUYANG PK. The industrial biotechnology in China: development and outlook[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 3991-4000 (in Chinese).
- [3] 王钦宏, 马延和. 中国科学院天津工业生物技术研究所建所 10 周年专刊序言[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 3981-3990.
WANG QH, MA YH. Preface to the special issue on the 10th anniversary of Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 3981-3990 (in Chinese).
- [4] 杨明, 周桔. 中国科学院工业生物技术发展路径[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4027-4034.
YANG M, ZHOU J. Development path of industrial biotechnology in Chinese Academy of Sciences[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4027-4034 (in Chinese).
- [5] 褚鑫, 王力为, 许虹, 张燕飞. 工业生物技术的前沿科技[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4019-4026.
CHU X, WANG LW, XU H, ZHANG YF. Frontier science for industrial biotechnology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4019-4026 (in Chinese).
- [6] 赵国屏. 合成生物学: 从“造物致用”到产业转化[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4001-4011.
ZHAO GP. Synthetic biology: from “build-for-use” to commercialization[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4001-4011 (in Chinese).
- [7] 李寅. 合成生物制造[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1267-1294.
LI Y. Biomanufacturing driven by engineered microbes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1267-1294 (in Chinese).
- [8] 谭聃, 欧铜. 第三代测序技术的研究进展与临床应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3121-3130.
TAN D, OU T. Research progress and clinical application of the third-generation sequencing techniques[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(9): 3121-3130 (in Chinese).
- [9] 冯森, 王丽娜, 汪保卫, 田会娟, 白雪莲, 刘洋, 夏海容. 工业生物技术中 DNA 合成发展现状及展望[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4115-4131.
FENG M, WANG LN, WANG BW, TIAN HJ, BAI XL, LIU Y, XIA HR. Current status and prospect of DNA synthesis in industrial biotechnology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4115-4131 (in Chinese).
- [10] 晁双英, 胡学军. 基因编辑技术在大肠杆菌中的应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1446-1461.
CHAO SY, HU XJ. Application of gene editing technology in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1446-1461 (in Chinese).
- [11] 杨超, 董兴啸, 张学礼, 毕昌昊. 基因组编辑技术在工业生物领域中的应用现状及展望. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4132-4145.
YANG C, DONG XX, ZHANG XL, BI CH. Application of genome editing technology in industrial

- microorganisms: current status and perspectives[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4132-4145 (in Chinese).
- [12] 卢挥, 张启, 于思礼, 王钰, 康明, 韩双艳, 刘叶, 王猛. 谷氨酸棒杆菌中基于 CRISPR/Cas9 的多位点碱基编辑系统的优化[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 780-795.
LU H, ZHANG Q, YU SL, WANG Y, KANG M, HAN SY, LIU Y, WANG M. Optimization of CRISPR/Cas9-based multiplex base editing in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 780-795 (in Chinese).
- [13] 申玉玉, 陈忠秀, 陈杰, 赵宝顶, 吕佳, 桂玲, 路福平, 黎明. 一种高效无选择标记的黑曲霉基因组编辑方法[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4744-4755.
SHEN YY, CHEN ZX, CHEN J, ZHAO BD, LÜ J, GUI L, LU FP, LI M. An efficient marker-free genome editing method for *Aspergillus niger*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4744-4755 (in Chinese).
- [14] 乐易林, 何兴, 孙建中. 嗜热厌氧杆菌热稳定 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术及在细胞工厂构建中的应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1475-1489.
LE YL, HE X, SUN JZ. Thermostable CRISPR/Cas9 genome editing system and its application in construction of cell factories with thermophilic bacteria: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1475-1489 (in Chinese).
- [15] 朱青, 徐琛, 张书文, 谢宁, 逢晓阳, 吕加平. 利用内源 CRISPR-Cas 系统开展乳酸菌基因组编辑的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2447-2458.
ZHU Q, XU C, ZHANG SW, XIE N, PANG XY, LÜ JP. Advances in utilizing the endogenous CRISPR-Cas system for genome editing of lactic acid bacteria[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2447-2458 (in Chinese).
- [16] 宁书晴, 巫欣欣, 罗云孜. CRISPR 相关转座元件的研究及应用进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4371-4384.
NING SQ, WU XX, LUO YZ. Recent advances in CRISPR-related transposable elements[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4371-4384 (in Chinese).
- [17] 崔古贞, 花登雄, 谷俊莹, 陈峥宏. II型内含子及其生物技术应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 915-924.
CUI GZ, HUA DX, GU JY, CHEN ZH. Group II introns and the application in biotechnology: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(3): 915-924 (in Chinese).
- [18] 刘莫识, 刘娇, 孙冠男, 路福平, 王钰, 郑平, 孙际宾. 谷氨酸棒杆菌人工合成启动子文库的构建及应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 831-842.
LIU MS, LIU J, SUN GN, LU FP, WANG Y, ZHENG P, SUN JB. Construction and application of a synthetic promoter library for *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 831-842 (in Chinese).
- [19] 张国强, 滕茂放, 刘松, 周景文, 李江华, 堵国成. 麦芽糖诱导梯度强度启动子的定向进化改造[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2606-2617.
ZHANG GQ, TENG MF, LIU S, ZHOU JW, LI JH, DU GC. Directed evolution of maltose induced promoters with expanded gradient intensity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2606-2617 (in Chinese).
- [20] 张芬芳, 孙韬, 陈磊, 张卫文. 人工小 RNA 调控元件在合成生物学中的应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2459-2476.
ZHANG FF, SUN T, CHEN L, ZHANG WW. Application of synthetic small regulatory RNAs in synthetic biology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2459-2476 (in Chinese).
- [21] 杨宇彤, 李宁, 周景文, 陈坚. 基于 CRISPR/dCpf1 的氧化葡萄糖杆菌转录抑制系统的构建与应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 719-736.
YANG YT, LI N, ZHOU JW, CHEN J. A CRISPR/dCpf1-based transcriptional repression system for *Gluconobacter oxydans*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 719-736 (in Chinese).
- [22] 张金宏, 崔志勇, 祁庆生, 侯进. 解脂耶氏酵母表达调控工具的开发及天然产物合成的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 478-505.
ZHANG JH, CUI ZY, QI QS, HOU J. The recent advances in developing gene editing and expression tools and the synthesis of natural products in *Yarrowia lipolytica*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 478-505 (in Chinese).
- [23] 郭未蔚, 艾丽梅, 胡栋, 陈亚军, 耿梦馨, 郑玲辉, 白利平. *URA3* 基因影响青蒿酸酿酒酵母工程菌中试发酵产量[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 737-748.
GUO WW, AI LM, HU D, CHEN YJ, GENG MX, ZHENG LH, BAI LP. *URA3* affects artemisinic acid production by an engineered *Saccharomyces cerevisiae* in pilot-scale fermentation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 737-748 (in Chinese).

- [24] 周文娟, 付刚, 齐显尼, 郑小梅, 房欢, 夏苗苗, 张大伟, 王钦宏, 郑平, 王钰, 孙际宾. 发酵工业菌种的迭代创制[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4200-4218.
ZHOU WJ, FU G, QI XN, ZHENG XM, FANG H, XIA MM, ZHANG DW, WANG QH, ZHENG P, WANG Y, SUN JB. Upgrading microbial strains for fermentation industry[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4200-4218 (in Chinese).
- [25] 涂然, 毛雨丰, 刘叶, 程海娇, 袁伟, 于思礼, 潘文嘉, 安晶晶, 王猛. 工程菌种自动化高通量编辑与筛选研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4162-4179.
TU R, MAO YF, LIU Y, CHENG HJ, YUAN W, YU SL, PAN WJ, AN JJ, WANG M. Advances in automated high-throughput editing and screening of engineered strains[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4162-4179 (in Chinese).
- [26] 周静茹, 刘鹏, 夏建业, 庄英萍. 基于约束的基因组规模代谢网络模型构建方法研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1526-1540
ZHOU JR, LIU P, XIA JY, Zhuang YP. Advances in the development of constraint-based genome-scale metabolic network models[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1526-1540 (in Chinese).
- [27] 杨雪, 张培基, 毛志涛, 赵欣, 王若宇, 蔡敬一, 王智文, 马红武. 多约束代谢网络模型的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 531-545.
YANG X, ZHANG PJ, MAO ZT, ZHAO X, WANG RY, CAI JY, WANG ZW, MA HW. Development of metabolic models with multiple constraints: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 531-545 (in Chinese).
- [28] 余文童, 袁倩倩, 马红武, 王智文. 基于图论和约束优化的异源代谢途径设计方法及应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1390-1407.
YU WT, YUAN QQ, MA HW, WANG ZW. Graph-based and constraint-based heterologous metabolic pathway design methods and application[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1390-1407 (in Chinese).
- [29] 高雅杰, 袁倩倩, 杨雪, 毛志涛, 余文童, 刘浩, Igor Goryanin, 马红武. 基于图论的代谢网络中流通代谢物处理新方法[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1554-1564.
GAO YJ, YUAN QQ, YANG X, MAO ZT, YU WT, LIU H, Igor Goryanin, MA HW. A graph-theory-based method for processing of currency metabolites in metabolic networks[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1554-1564 (in Chinese).
- [30] 袁倩倩, 毛志涛, 杨雪, 廖小平, 马红武. 数字细胞模型的研究及应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4146-4161.
YUAN QQ, MAO ZT, YANG X, LIAO XP, MA HW. Digital cell models and their applications: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4146-4161 (in Chinese).
- [31] 韩旭, 李倩, 韦泓丽, 郑迎迎, 商娜, 陈纯琪, 郭瑞庭, 高健, 刘卫东. 工业应用导向的蛋白质结构与功能研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4050-4067.
HAN X, LI Q, WEI HL, ZHENG YY, SHANG N, CHEN CC, GUO RT, GAO J, LIU WD. Application-oriented structure and function study of proteins: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4050-4067 (in Chinese).
- [32] 曲戈, 袁波, 孙周通. 工业蛋白质理性设计与应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4068-4080.
QU G, YUAN B, SUN ZT. Rational design and applications of industrial proteins[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4068-4080 (in Chinese).
- [33] 郑宏臣, 徐健勇, 杨建花, 郑迎迎, 涂然, 石婷, 付刚, 刘倩, 王兴彪, 韩旭, 张以恒, 柏文琴, 宋诼. 工业酶与绿色生物工艺的核心技术进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4219-4239.
ZHENG HC, XU JY, YANG JH, ZHENG YY, TU R, SHI T, FU G, LIU Q, WANG XB, HAN X, ZHANG YH, BAI WQ, SONG H. Developments of core technologies in industrial enzymes and green bioprocessing[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4219-4239 (in Chinese).
- [34] 张碧飞, 吕成, 张萌, 许菲. 基于多重计算设计策略提高奇异变形杆菌脂肪酶的热稳定性[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1537-1553.
ZHANG BF, LÜ C, ZHANG M, XU F. Improving the thermal stability of *Proteus mirabilis* lipase based on multiple computational design strategies[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1537-1553 (in Chinese).
- [35] 卞佳豪, 郝俊尧, 杨广宇. 半理性设计提高产碱杆菌 KS-85 来源的肌酸酶催化活性[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4601-4614.
BIAN JH, HAO JY, YANG GY. Improving the activity of creatinase from *Alcaligenes* sp. KS-85 through semi-rational design[J]. Chinese Journal of

- Biotechnology, 2022, 38(12): 4601-4614 (in Chinese).
- [36] 王剑峰, 李文英, 辛振麒, 冯文娜, 孙晓明, 袁建锋. 大肠杆菌转酮醇酶分子改造及催化酒石酸半醛合成[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4615-4629.
WANG JF, LI WY, XIN ZQ, FENG WN, SUN XM, YUAN JF. Molecular engineering of transketolase from *Escherichia coli* and tartaric semialdehyde biosynthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4615-4629 (in Chinese).
- [37] 柴宝成, 姜钰琳, 倪晔, 韩瑞枝. 环糊精葡萄糖基转移酶 182 位点定点改造催化合成糖基化染料木素[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 749-759.
CHAI BC, JIANG YL, NI Y, HAN RZ. Engineering the 182 site of cyclodextrin glucosyltransferase for glycosylated genistein synthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 749-759 (in Chinese).
- [38] 刘思敏, 齐海山. 赖氨酸脱羧酶分子改造及固定化合成 1,5-戊二胺研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4403-4419.
LIU SM, QI HS. Molecular engineering and immobilization of lysine decarboxylase for synthesis of 1,5-diaminopentane: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4403-4419 (in Chinese).
- [39] 毕悦欣, 蒋迎迎, 覃宗敏, 曲戈, 孙周通. 醇脱氢酶金属离子结合位点的可替换性[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1518-1526.
BI YX, JIANG YY, QIN ZM, QU G, SUN ZT. Substitutability of metal-binding sites in an alcohol dehydrogenase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1518-1526 (in Chinese).
- [40] 黄婷婷, 张玉华, 段绪果. 普鲁兰酶的异源表达、结构解析及分子改造研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4432-4448.
HUANG TT, ZHANG YH, DUAN XG. Advances in heterologous expression, structural elucidation and molecular modification of pullulanase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4432-4448 (in Chinese).
- [41] 刘鑫涵, 沈风飞, 石鹏君, 刘慧芹. 嗜热古菌 *Infirmifilum uzonense* 来源的双功能高温 β -葡萄糖苷酶 IuBgl3 的原核表达及酶学性质分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4644-4657.
LIU XH, SHEN FF, SHI PJ, LIU HQ. Expression and characterization of a bifunctional thermal β -glucosidase IuBgl3 from thermophilic archaeon *Infirmifilum uzonense*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4644-4657 (in Chinese).
- [42] 何成, 吴言, 孟春雨, 肖亚中, 方泽民, 房伟. 新型 β -葡萄糖苷酶 BglD2 异源表达及水解虎杖苷能力[J]. 生物工程学报, 2021, 37(2): 580-592.
HE C, WU Y, MENG CY, XIAO YZ, FANG ZM, FANG W. Heterologous expression of a novel β -glucosidase BglD2 and its application in polydatin-hydrolyzing[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(2): 580-592 (in Chinese).
- [43] 阿拉腾珠拉, 胡永飞. 褐藻寡糖的制备方法及生物活性研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 104-118.
A La Teng Zhu La, HU YF. Advances in the preparation of alginate oligosaccharides and its biological functions[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 104-118 (in Chinese).
- [44] 丁伟秋, 周伟杰, 谢春芳, 刘大岭, 姚冬生. 三种不同来源的 α -葡萄糖苷酶合成 L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷的比较[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2523-2533.
DING WQ, ZHOU WJ, XIE CF, LIU DL, YAO DS. Comparison of three α -glucosidases from different sources in the synthesis of L-ascorbic acid 2-glucoside[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2523-2533 (in Chinese).
- [45] 高涵, 龚劲松, 汪子凯, 苏畅, 许正宏, 史劲松. 构兰果胶杆菌海藻糖酶的克隆表达及应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4658-4668.
GAO H, GONG JS, WANG ZK, SU C, XU ZH, SHI JS. Cloning, expression and properties of trehalase from *Pectobacterium cypripedii*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4658-4668 (in Chinese).
- [46] 吕蕊花, 史琳娜, 张喜荣, 冯昭. 核盘菌角质酶的克隆、表达及活性分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 386-395.
LÜ RH, SHI LN, ZHANG XR, FENG Z. Cloning, expression and activity analysis of cutinase from *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 386-395 (in Chinese).
- [47] 张颖, 刘展志, 李光耀, 付雪妮, 张钰成, 王志远, 田亚平, 吴敬. 碳水化合物结合模块-嗜热子囊菌角质酶融合蛋白在 PET 降解中的应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 217-225.
ZHANG Y, LIU ZZ, LI GY, FU XN, ZHANG YC, WANG ZY, TIAN YP, WU J. The application of carbohydrate binding module-*Thermobifida fusca* cutinase fusion protein in polyethylene terephthalate degradation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 217-225 (in Chinese).
- [48] 李光耀, 刘展志, 张颖, 吴敬. 特异腐质霉角质酶-锚定肽融合蛋白的特性及在处理再生纸胶黏物中的

- 应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 207-216.
- LI GY, LIU ZZ, ZHANG Y, WU J. Characterization of *Humicola insolens* cutinase-tachystatin A2 fusion protein and its application in treatment of recycled paper stickies[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 207-216 (in Chinese).
- [49] 翁妍, 刘喜朋. 超嗜热古菌 *Thermococcus eurythermalis* A501 编码 B 家族 DNA 聚合酶的生化特性及 PCR 应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 807-819.
- WENG Y, LIU XP. Characterization of a family B DNA polymerase from *Thermococcus eurythermalis* A501 and its application in PCR[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 807-819 (in Chinese).
- [50] 王磊, 王绪霞, 李斐, 崔明娟, 杨晓旭, 杨敏, 闫云君. 微生物水泥相关酶的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 506-517.
- WANG L, WANG XX, LI F, CUI MJ, YANG XX, YANG M, YAN YJ. Advances of enzymes related to microbial cement[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 506-517 (in Chinese).
- [51] 徐小健, 朱宝悦, 李昕悦, 张金方, 刘文龙, 路福平, 李玉. 肽聚糖水解酶基因缺失对解淀粉芽孢杆菌活菌数量及产碱性蛋白酶的影响[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1506-1517.
- XU XJ, ZHU BY, LI XY, ZHANG JF, LIU WL, LU FP, LI Y. Effects of deleting peptidoglycan hydrolase genes on the viable cell counts of *Bacillus amyloliquefaciens* and the yield of alkaline protease[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1506-1517 (in Chinese).
- [52] 葛慧华, 葛钟琪, 毛磊, 张光亚. 铁蛋白介导的地衣多糖酶胞内自发聚集及其高效制备[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1602-1611.
- GE HH, GE ZQ, MAO L, ZHANG GY. *In vivo* self-aggregation and efficient preparation of recombinant lichenase based on ferritin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1602-1611 (in Chinese).
- [53] 庞焦, 姜梦彤, 刘羽欣, 李明玉, 孙佳明, 王从纲, 李宪臻. 过氧化氢酶-无机杂化纳米花的制备及催化特性[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4705-4718.
- PANG J, JIANG MT, LIU YX, LI MY, SUN JM, WANG CG, LI XZ. Preparation and catalytic properties of catalase-inorganic hybrid nanoflowers[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4705-4718 (in Chinese).
- [54] 陈曦, 吴凤礼, 樊飞宇, 吴洽庆, 朱敦明. 手性医药化学品的绿色生物合成[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4240-4262.
- CHEN X, WU FL, FAN FY, WU QQ, ZHU DM. Green biosynthesis of chiral pharmaceutical chemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4240-4262 (in Chinese).
- [55] 程峰, 魏澜, 王成娇, 薛亚平, 郑裕国. 甲酸脱氢酶及其在手性生物制造中的应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 632-649.
- CHENG F, WEI L, WANG CJ, XUE YP, ZHENG YG. Formate dehydrogenase and its application in biomanufacturing of chiral chemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 632-649 (in Chinese).
- [56] 潘珊, 胡孟凯, 潘学玮, 吕青兰, 朱荣帅, 张显, 饶志明. 基于双酶级联协调表达策略高效催化合成 D-甘露醇[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2549-2565.
- PAN S, HU MK, PAN XW, LYU QL, ZHU RS, ZHANG X, RAO ZM. Efficient biosynthesis of D-mannitol by coordinated expression of a two-enzyme cascade[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2549-2565 (in Chinese).
- [57] 黄欣, 李益民, 杜聪, 袁文杰. 来源于泗阳鞘氨醇杆菌的聚磷酸激酶的克隆表达及在 ATP 再生系统中的应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4669-4680.
- HUANG X, LI YM, DU C, YUAN WJ. Expression of polyphosphate kinase from *Sphingobacterium siyangensis* and its application in ATP regeneration system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4669-4680 (in Chinese).
- [58] 李学朋, 陈久洲, 张东旭, 李树标, 王小平, 吕金东, 周敬, 许志颖, 郑平, 孙际宾. L-谷氨酸生产关键技术创新与产业化应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4343-4351.
- LI XP, CHEN JZ, ZHANG DX, LI SB, WANG XP, LÜ JD, ZHOU J, XU ZY, ZHENG P, SUN JB. Innovation of key technologies in fermentative production of L-glutamate and industrial application[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4343-4351 (in Chinese).
- [59] 刘萍萍, 郭恒华, 张冬竹, 樊义, 唐思青, 张学礼. L-丙氨酸厌氧发酵关键技术及产业化[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4329-4334.
- LIU PP, GUO HH, ZHANG DZ, FAN Y, TANG SQ, ZHANG XL. Key technology for anaerobic fermentation of L-alanine and its commercialization[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4329-4334 (in Chinese).
- [60] 胡小露, 崔树梅, 柯崇榕, 陶勇, 黄建忠, 杨欣伟.

- 微生物合成 L-脯氨酸和反式-4-羟基-L-脯氨酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4498-4519.
HU XL, CUI SM, KE CR, TAO Y, HUANG JZ, YANG XW. Advances on microbial synthesis of L-proline and trans-4-hydroxy-L-proline[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4498-4519 (in Chinese).
- [61] 张博, 陈开, 杨辉, 吴梓丹, 柳志强, 郑裕国. 基于碳硫模块平衡策略的大肠杆菌高产 L-半胱氨酸菌株构建[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4567-4586.
ZHANG B, CHEN K, YANG H, WU ZD, LIU ZQ, ZHENG YG. Construction of an L-cysteine hyper-producing strain of *Escherichia coli* based on a balanced carbon and sulfur module strategy[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4567-4586 (in Chinese).
- [62] 汤晓玲, 张慧敏, 柳志强, 郑裕国. 非天然氨基酸细胞工厂的构建与应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1295-1306.
TANG XL, ZHANG HM, LIU ZQ, ZHENG YG. Construction and application of microbial cell factories for unnatural amino acids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1295-1306 (in Chinese).
- [63] 牛坤, 高利平, 葛丽蓉, 柳志强, 郑裕国. 大肠杆菌代谢工程改造合成 L-高丝氨酸及其衍生物研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4385-4402.
NIU K, GAO LP, GE LR, LIU ZQ, ZHENG YG. Advances in the biosynthesis of L-homoserine and its derivatives by metabolic engineering of *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4385-4402 (in Chinese).
- [64] MU QX, ZHANG SS, MAO XJ, TAO Y, YU B. Highly efficient production of L-homoserine in *Escherichia coli* by engineering a redox balance route[J]. Metabolic Engineering, 2021, 67: 321-329.
- [65] 刘琦, 毛雨丰, 廖小平, 罗家豪, 马红武, 姜文侠. 麦角硫因生物合成研究的新进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1408-1420.
LIU Q, MAO YF, LIAO XP, LUO JH, MA HW, JIANG WX. Recent progress in ergothioneine biosynthesis: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1408-1420 (in Chinese).
- [66] 王丽, 王阳, 李江华, 堵国成, 康振. 产麦角硫因大肠杆菌工程菌株的构建与优化[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 796-806.
WANG L, WANG Y, LI JH, DU GC, KANG Z. Construction and optimization of ergothioneine-producing *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 796-806 (in Chinese).
- [67] 田道光. 代谢工程改造大肠杆菌生产麦角硫因[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 10.27359/d.cnki.gtqgu.2021.000717, 2021年6月.
TIAN DG. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for ergothioneine production[D]. Master thesis of Tianjin University of Science and Technology, 10.27359/d.cnki.gtqgu.2021.000717, June, 2021.
- [68] 潘斐, 严一凡, 朱逸凡, 胡毅, 续晓琪, 徐铮, 王瑞, 李莎, 徐虹, 罗正山. 四吡咯化合物生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1307-1321.
PAN F, YAN YF, ZHU YF, HU Y, XU XQ, XU Z, WANG R, LI S, XU H, LUO ZS. Advances in the biosynthesis of tetrapyrrole compounds[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1307-1321 (in Chinese).
- [69] 闫思翰, 邵明龙, 徐美娟, 张显, 杨套伟, 饶志明. 重组大肠杆菌全细胞催化高效合成胆绿素[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2581-2593.
YAN SH, SHAO ML, XU MJ, ZHANG X, YANG TW, RAO ZM. Efficient production of biliverdin through whole-cell biocatalysis using recombinant *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2581-2593 (in Chinese).
- [70] 刘妮娜, 崔甜琦, 高翔, 朱德锐, 邢江娃. 嗜盐微生物在生物医药领域的应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2153-2168.
LIU NN, CUI TQ, GAO X, ZHU DR, XING JW. Advances in the biomedical application research of halophilic microorganisms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(6): 2153-2168 (in Chinese).
- [71] 张鑫, 舒志万, 李永臻, 邢江娃, 王嵘, 沈国平, 朱德锐. 相容溶质四氢嘧啶的微生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 868-881.
ZHANG X, SHU ZW, LI YZ, XING JW, WANG R, SHEN GP, ZHU DR. Advances in the microbial production of the compatible solute ectoine: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(3): 868-881 (in Chinese).
- [72] 陈文广, 刘子鹤, 李正军. 盐单胞菌利用短链脂肪酸合成聚羟基脂肪酸酯[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1527-1536.
CHEN WG, LIU ZH, LI ZJ. *Halomonas* uses short-chain fatty acids to synthesize polyhydroxyalkanoates[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1527-1536 (in Chinese).
- [73] 付雯宣, 李诗韵, 赵运英, 邓禹. 代谢工程改造大肠杆菌合成丙二酸[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7):

- 2566-2580.
- FU WX, LI SY, ZHAO YY, DENG Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of malonic acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2566-2580 (in Chinese).
- [74] 李杰, 赵运英, 邓禹. 高效合成葡萄糖二酸酿酒酵母工程菌的构建[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 705-718.
- LI J, ZHAO YY, DENG Y. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of glucaric acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 705-718 (in Chinese).
- [75] 谭黄虹, 王静, 刘青, 郑兆娟, 欧阳嘉. 果胶 D-半乳糖醛酸生物转化制备黏酸研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 666-677.
- TAN HH, WANG J, LIU Q, ZHENG ZJ, OUYANG J. Production of mucic acid from pectin-derived D-galacturonic acid: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 666-677 (in Chinese).
- [76] 张全, 文志琼, 张霖, 樊亚超, 李福利. 长链二元酸发酵菌种创制和工艺研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4420-4431.
- ZHANG Q, WEN ZQ, ZHANG L, FAN YC, LI FL. Strain engineering and fermentation technology for production of long-chain dicarboxylic acid: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4420-4431.
- [77] 冯明, 高教琪, 龚志伟, 周雍进. 多形汉逊酵母代谢改造生产脂肪酸及发酵条件优化[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 760-771.
- FENG D, GAO JQ, GONG ZW, ZHOU YJ. Production of fatty acids by engineered *Ogataea polymorpha*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 760-771 (in Chinese).
- [78] 荣兰新, 刘士琦, 朱坤, 孔婧, 苗琳, 王淑慧, 肖冬光, 于爱群. 代谢工程改造解脂耶氏酵母合成羧酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1360-1372.
- RONG LX, LIU SQ, ZHU K, KONG J, MIAO L, WANG SH, XIAO DG, YU AQ. Production of carboxylic acids by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1360-1372 (in Chinese).
- [79] 张家威, 王亮, 爱赛姆克热尼, 吴双双, 刘晨光. 生物电化学系统对运动发酵单胞菌代谢的影响[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2513-2522.
- ZHANG JW, WANG L, KERENI A, WU SS, LIU CG. Effect of bio-electrochemical system on the metabolic changes of *Zymomonas mobilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2513-2522 (in Chinese).
- [80] 张丽, 高健, 刘长青, 邓丽娜. 耐受性工程调控微生物细胞工厂胁迫抗性[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1373-1389.
- ZHANG L, GAO J, LIU CQ, DENG LN. Tolerance engineering regulates stress resistance of microbial cell factory[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1373-1389 (in Chinese).
- [81] 毕慧萍, 刘晓楠, 李清艳, 程健, 庄以彬, 王冬, 戴住波, 江会锋, 刘涛, 张学礼. 植物天然产物微生物重组合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4263-4282.
- BI HP, LIU XN, LI QY, CHENG J, ZHUANG YB, WANG D, DAI ZB, JIANG HF, LIU T, ZHANG XL. Advances in microbial synthesis of plant natural products[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4263-4282 (in Chinese).
- [82] 张帆, 王颖, 李春. 单萜类化合物的微生物合成[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 427-442.
- ZHANG F, WANG Y, LI C. Microbial synthesis of monoterpene: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 427-442 (in Chinese).
- [83] 陈翠玉, 庞亚如, 陈泉冰, 李春, 吕波. 环氧角鲨烯环化酶在三萜化合物生物合成中的进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 443-459.
- CHEN CY, PANG YR, CHEN QB, LI C, LÜ B. Oxidosqualene cyclases in triterpenoids biosynthesis: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 443-459 (in Chinese).
- [84] 周宸, 巩婷, 陈晶晶, 陈天娇, 杨金玲, 朱平. 三萜皂苷生物合成相关糖基转移酶研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1004-1024.
- ZHOU C, GONG T, CHEN JJ, CHEN TJ, YANG JL, ZHU P. The glycosyltransferases involved in triterpenoid saponin biosynthesis: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(3): 1004-1024 (in Chinese).
- [85] 冯进辉, 张汝金, 张峥斌, 吴洽庆, 朱敦明. 系列甾体药物关键中间体转化菌种构建及智能化生产应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4335-4342.
- FENG JH, ZHANG RJ, ZHANG ZB, WU QQ, ZHU DM. Construction of strains for bioconversion of steroid key intermediates and intelligent industrial production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4335-4342 (in Chinese).
- [86] 黄雅文, 江小龙, 陈五九, 张桂敏, 王钦宏. 高活性酪氨酸解氨酶的特征及其在对香豆酸生物合成中应

- 用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4553-4566.
HUANG YW, JIANG XL, CHEN WJ, ZHANG GM, WANG QH. Characterization of highly active tyrosine ammonia lyase and its application in biosynthesis of *p*-coumaric acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4553-4566 (in Chinese).
- [87] 张红, 林金连, 胡定行, 刘贵友, 孙磊. 大肠杆菌高密度发酵表达 4-羟基苯乙酸酯 3-羟化酶及咖啡酸的高效生物合成[J]. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3466-3477.
ZHANG H, LIN JL, HU DH, LIU GY, SUN L. High-density fermentation of *Escherichia coli* to express 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase and efficient biosynthesis of caffeic acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(9): 3466-3477 (in Chinese).
- [88] 李明佳, 周景文, 李江华. 关键酶泛素化位点对柚皮素生物合成的影响[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 691-704.
LI MJ, ZHOU JW, LI JH. Effect of key enzymes ubiquitination sites on the biosynthesis of naringenin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 691-704 (in Chinese).
- [89] 郭超杰, 高松, 李宏彪, 吕云斌, 余世琴, 周景文. 异戊烯基转移酶N端截短强化异戊烯基柚皮素合成[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1565-1575.
GUO CJ, GAO S, LI HB, LV YB, YU SQ, ZHOU JW. N-terminal truncation of prenyltransferase enhances the biosynthesis of prenylnaringenin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1565-1575 (in Chinese).
- [90] 吕思佳, 吴月燕, 贾永红, 何凡, 蒋宝鑫, 杨国霞, 谢晓鸿. 云锦杜鹃苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及功能分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 374-385.
LÜ SJ, WU YY, JIA YH, HE F, JIANG BX, YANG GX, XIE XH. Cloning and functional analysis of the phenylalaninammonio-lyase gene from *Rhododendron fortunei*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 374-385 (in Chinese).
- [91] 李元玉, 陈万生, 肖莹. 植物咖啡酸-O-甲基转移酶的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2187-2200.
LI YY, CHEN WS, XIAO Y. Advances in plant caffeic acid-O-methyltransferase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(6): 2187-2200 (in Chinese).
- [92] 谢运昌, 姚仕杰, 李炜, 单润润, 吴贵贵, 童图强, 陈奇. 放线菌核糖体工程的发展与应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 546-564.
XIE YC, YAO SJ, LI W, SHAN RR, WU GG, TONG TQ, CHEN Q. Development and application of ribosomal engineering in actinomycetes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 546-564 (in Chinese).
- [93] 孔德真, 李浩, 李晓杰, 谢周杰, 刘浩. 基于前体供给途径遗传改造提高褐黄孢链霉菌纳他霉素的产量[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4630-4643.
KONG DZ, LI H, LI XJ, XIE ZJ, LIU H. Engineering the precursor supply pathway in *Streptomyces gilvosporeus* for overproduction of natamycin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4630-4643 (in Chinese).
- [94] 宗工理, 陈曦, 张振, 涂煜, 曹广祥, 张佩佩, 付加芳, 张荣珍. ABC转运蛋白 SgnA/B 促进纳他霉素胞外转运与高产[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2534-2548.
ZONG GL, CHEN X, ZHANG Z, TU Y, CAO GX, ZHANG PP, FU JF, ZHANG RZ. ABC transporter SgnA/B promotes extracellular transport and efficient production of natamycin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2534-2548 (in Chinese).
- [95] 王远山, 戴科磊, 谢卡茜, 翁春跃. 阿卡波糖及其结构类似杂质生物合成与调控的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 605-619.
WANG YS, DAI KL, XIE KX, WENG CY. Biosynthesis and regulatory mechanism of acarbose and its structural analogs: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 605-619 (in Chinese).
- [96] 方禹鑫, 李玲, 付文华, 董娜, 单安山. 抗菌肽 RIKL 的分子设计及生物学活性分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 174-184.
FANG YX, LI L, FU WH, DONG N, SHAN AS. Molecular design and biological activity analysis of antimicrobial peptide RIKL[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 174-184 (in Chinese).
- [97] 李道明, 王瑛, 陈超, 曾明白, 李倩如, 贾青云, 刘秀丽, 侯勇跃, 范成明, 陈宇红, 胡赞民. 芽孢杆菌几种重要抗菌脂肽研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1768-1783.
LI DM, WANG Y, CHEN C, ZENG MB, LI QR, JIA QY, LIU XL, HOU YY, FAN CM, CHEN YH, HU ZM. Advances in several important antimicrobial lipopeptides from *Bacillus* spp.[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(5): 1768-1783 (in Chinese).

- [98] 赵晨, 李端华, 李进军, 王轲. 分子串联重复策略用于制备超短肽[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4587-4600.
ZHAO C, LI DH, LI JJ, WANG L. Molecular tandem repeat strategy for production of ultrashort peptides[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4587-4600 (in Chinese).
- [99] Polybion completes development of world's first bacterial cellulose biomanufacturing facility[EB/OL]. [2023-01-10]. <https://www.prnewswire.com/news-releases/polybion-completes-development-of-worlds-first-bacterial-cellulose-biomanufacturing-facility-301501949.html>.
- [100] 黄龙辉, 李雪晶, 孙雪文, 王旭, 王祎彤, 贾士儒, 钟成. CRISPR/dCas9 干扰 *bcsD* 基因表达调控细菌纤维素结构[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 772-779.
HUANG LH, LI XJ, SUN XW, WANG X, WANG YT, JIA SR, ZHONG C. Regulating the structure of bacterial cellulose by altering the expression of *bcsD* using CRISPR/dCas9[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 772-779 (in Chinese).
- [101] 何云江, 贾伟娟, 郝珊珊, 孟庆磊, 陈云娇, 王学理. c-di-GMP 对大肠杆菌生物膜调控的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2811-2820.
HE YJ, JIA WJ, CHI SS, MENG QL, CHEN YJ, WANG XL. Research progress of c-di-GMP in the regulation of *Escherichia coli* biofilm[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(8): 2811-2820 (in Chinese).
- [102] 薛含, 李慧, 陈萌琦, 张再美, 郭中瑞, 朱虎, 王继乾, 孙亚伟. LB 克隆系统的构建及在鞘氨醇单胞菌基因融合表达中的应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1576-1588.
XUE H, LI H, CHEN MQ, ZHANG ZM, GUO ZR, ZHU H, WANG JQ, SUN YW. Development of an LB cloning system and its application in expression of fusion genes in *Sphingomonas* sp. WG[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1576-1588 (in Chinese).
- [103] 盛靖雨, 金学荣, 胥睿睿, 王阳, 康振. 基于工程化毕赤酵母—锅法合成硫酸软骨素 A[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2594-2605.
SHENG JY, JIN XR, XU RR, WANG Y, KANG Z. One-pot synthesis of chondroitin sulfate A by engineered *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2594-2605 (in Chinese).
- [104] 李梦如, 刘恩, 张文芊, 罗洪艳, 李沛. 生物法合成肠炎沙门菌糖蛋白[J]. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2377-2388.
LI MR, LIU E, ZHANG WY, LUO HY, LI P. Biosynthesis of *Salmonella enteritidis* O antigen-based glycoproteins[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(6): 2377-2388 (in Chinese).
- [105] 王绪霞, 张龙雨, 王磊, 闫云君. 藤壶附着机理及其粘胶蛋白的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4449-4461.
WANG XX, ZHANG LY, WANG L, YAN YJ. The adhesion mechanism of barnacle and its cement proteins: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4449-4461 (in Chinese).
- [106] 颜凝, 李洪兴, 吴龙昊, 杨硕, 郝鲁江, 鲍晓明. 固有无序蛋白研究进展及其对细胞胁迫耐受性的影响[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1490-1505.
YAN N, LI HX, WU LH, YANG S, HAO LJ, BAO XM. Intrinsically disordered proteins (IDPs) and the impact on cell stress resistance[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1490-1505 (in Chinese).
- [107] 武兆云, 张倩, 郭玉鸽, 杨惠娟, 杨铁钊. 基于植物重组蛋白产量提高的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2784-2797.
WU ZY, ZHANG Q, GUO YG, YANG HJ, YANG TZ. Improving the production of plant-based recombinant protein: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(8): 2784-2797 (in Chinese).
- [108] 黄甜甜, 齐剑英, 杨刚刚, 叶贤龙. 重组 rHSA-hFGF21 融合蛋白在毕赤酵母中的表达纯化及活性分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3419-3432.
HUANG TT, QI JY, YANG GG, YE XL. Expression, purification and bioactivity analysis of a recombinant fusion protein rHSA-hFGF21 in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(9): 3419-3432 (in Chinese).
- [109] 崔玲炜, 范晓军, 郑艳宁. 未培养厌氧甲烷氧化古菌来源细胞色素 c 的异源表达优化[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 226-237.
CUI LW, FAN XJ, ZHENG YN. Enhanced heterologous expression of the cytochrome c from uncultured anaerobic methanotrophic archaea[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 226-237 (in Chinese).
- [110] 傅容湛, 范代娣, 杨婉娟, 陈亮, 曲词, 杨树林, 徐丽明. 重组胶原蛋白的产业发展历程和生物医学应用前景展望[J]. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3228-3242.
FU RZ, FAN DD, YANG WJ, CHEN L, QU C, YANG SL, XU LM. Industrial development and biomedical

- application prospect of recombinant collagen[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(9): 3228-3242 (in Chinese).
- [111] 金亮, 李利宏, 张荣珍, 徐岩. 重组枯草芽孢杆菌发酵生产乳铁蛋白 N 叶工艺优化[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2628-2638.
JIN L, LI LH, ZHANG RZ, XU Y. Fermentation optimization for production of lactoferrin N-lobe by recombinant *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2628-2638 (in Chinese).
- [112] 龙梦飞, 郑楠, 张泽华, 高玲, 王颖妤, 夏小乐. 蛋白质交联用酶的作用机制及研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2499-2512.
LONG MF, ZHENG N, ZHANG ZH, GAO L, WANG YY, XIA XL. Mechanisms and applications of enzyme-catalyzed protein cross-linking[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2499-2512 (in Chinese).
- [113] 李德茂, 童胜, 曾艳, 杨建刚, 齐显尼, 王钦宏, 孙媛霞. 未来食品的低碳生物制造[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4311-4328.
LI DM, TONG S, ZENG Y, YANG JG, QI XN, WANG QH, SUN YX. Low carbon biomanufacturing for future food[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4311-4328 (in Chinese).
- [114] 夏建业, 刘晶, 庄英萍. 人工智能时代发酵优化与放大技术的机遇与挑战[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4180-4199.
XIA JY, LIU J, ZHUANG YP. Opportunities and challenges for fermentation optimization and scale-up technology in the artificial intelligence era[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4180-4199 (in Chinese).
- [115] 蔡韬, 刘玉万, 朱蕾蕾, 苏浩, 王钰, 王国坤, 张玲玲, 朱之光, 盛翔, 毕昌昊, 马红武, 田朝光, 张学礼, 吴洽庆, 孙媛霞, 江会锋, 马延和. 二氧化碳人工生物转化[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4101-4114.
CAI T, LIU YW, ZHU LL, SU H, WANG Y, WANG GK, ZHANG LL, ZHU ZG, SHENG X, BI CH, MA HW, TIAN CG, ZHANG XL, WU QQ, SUN YX, JIANG HF, MA YH. Artificial bioconversion of carbon dioxide[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4101-4114 (in Chinese).
- [116] 宋云洪, 吴冉冉, 魏欣蕾, 石婷, 李运杰, 游淳, 张玲玲, 朱之光, 张以恒. 电-氢-糖循环的新能源体系研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4081-4100.
SONG YH, WU RR, WEI XL, SHI T, LI YJ, YOU C, ZHANG LL, ZHU ZG, ZHANG YH. Advances in a new energy system based on electricity-hydrogen-carbohydrate cycle[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4081-4100 (in Chinese).
- [117] 郑思妮, 孙绘梨, 毛绍名, 栾国栋, 吕雪峰. 基于糖原代谢调控的蓝细菌光合细胞工厂优化研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 592-604.
ZHENG SN, SUN HL, MAO SM, LUAN GD, LÜ XF. Engineering the glycogen metabolism in cyanobacterial photosynthetic cell factories: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 592-604 (in Chinese).
- [118] 胡贵鹏, 宋伟, 高聪, 郭亮, 陈修来, 刘立明. 异养微生物固定二氧化碳的合成生物学研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1339-1350.
HU GP, SONG W, GAO C, GUO L, CHEN XL, LIU LM. Advances in synthetic biology of CO₂ fixation by heterotrophic microorganisms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1339-1350 (in Chinese).
- [119] 焦子悦, 黄小涵, 郭树奇, 王新宇, 钟超, 费强. 微生物固碳的电子供给策略研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2396-2409.
JIAO ZY, HUANG XH, GUO SQ, WANG XY, ZHONG C, FEI Q. Electron supply strategies for microbial carbon fixation: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2396-2409 (in Chinese).
- [120] 王杰, 杨悦, 崔岱宗, 赵敏. 外源 CdS 纳米粒子对大肠杆菌生长的影响[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4681-4691.
WANG J, YANG Y, CUI DZ, ZHAO M. Effect of exogenous CdS nanoparticle on the growth of *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4681-4691 (in Chinese).
- [121] 严程, 梅娟, 赵由才. 好氧甲烷氧化菌及其工程应用进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1322-1338.
YAN C, MEI J, ZHAO YC. Engineering application of aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs): a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1322-1338 (in Chinese).
- [122] 李金根, 刘倩, 刘德飞, 张永利, 郑小梅, 朱欣娜, 刘萍萍, 高乐, 王婧婷, 蔺玉萍, 张以恒, 张学礼, 田朝光. 秸秆真菌降解转化与可再生化工[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4283-4310.
LI JG, LIU Q, LIU DF, ZHANG YL, ZHENG XM, ZHU XN, LIU PP, GAO L, WANG JT, LIN YP, ZHANG YH, ZHANG XL, TIAN CG. Plant biomass degradation by filamentous fungi and production of

- renewable chemicals: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(11): 4283-4310 (in Chinese).
- [123] 王圣, 杨鹤, 闫瑞, 伏朝林, 赵杰, 陶志平. 生物航煤生产技术的发展现状[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(7): 2477-2488.
- WANG S, YANG H, YAN R, FU ZL, ZHAO J, TAO ZP. Development of bio-jet fuel production technology: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(7): 2477-2488 (in Chinese).
- [124] 庞庆霄, 韩昊, 祁庆生, 王倩. 微生物模块化共培养工程的应用及控制策略[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(4): 1421-1431.
- PANG QX, HAN H, QI QS, WANG Q. Application and population control strategy of microbial modular co-culture engineering[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(4): 1421-1431 (in Chinese).
- [125] 吴世磊, 徐安明, 周杰, 信丰学, 余子夷, 董维亮, 姜岷. 污水处理过程中微塑料去除的现状与发展趋势[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(7): 2410-2422.
- WU SL, XU AM, ZHOU J, XIN FX, YU ZY, DONG WL, JIANG M. Microplastics in wastewater treatment: current status and future trends[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(7): 2410-2422 (in Chinese).
- [126] 国陶红, 宋馨宇, 陈磊, 张卫文. 人工微生物混菌系统机制解析中的组学应用及进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(2): 460-477.
- GUO TH, SONG XY, CHEN L, ZHANG WW. Using OMICS technologies to analyze the mechanisms of synthetic microbial co-culture systems: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(2): 460-477 (in Chinese).
- [127] 李畅, 平文祥, 葛菁萍, 林宜萌. 微藻与其他微生物共培养的研究进展及应用[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(2): 518-530.
- LI C, PING WX, GE JP, LIN YM. Advances in the co-culture of microalgae with other microorganisms and applications[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(2): 518-530 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)