

# 生物炼制细胞工厂：生物制造的技术核心

马延和

中国科学院微生物研究所，北京 100101

**摘要：**对生物炼制细胞工厂的发展进行了简要回顾，从微生物糖代谢的分子机制、细胞工厂的代谢网络及调控、细胞工厂的构建技术及细胞工厂的优化 4 个方面介绍了本期专刊发表的 17 篇生物炼制细胞工厂方面的论文。

**关键词：**生物炼制，细胞工厂，专刊

## Cell factories for biorefinery: core of the technology for biomanufacture

Yanhe Ma

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

**Abstract:** The background of developing cell factories for biorefinery was reviewed. Seventeen papers published in this special issue, covering the molecular mechanism of sugar utilization, genome-scale metabolic and regulative networks, the construction technologies, and the optimization of cell factories for biorefinery, were introduced.

**Keywords:** biorefinery, cell factories, special issue

上个世纪，以化石资源为经济基础的近代工业文明创造了空前的社会繁荣。近年来，能源资源短缺、生态环境恶化等一系列问题日渐突出，现代化经济进程与化石资源日渐枯竭的现实形成了剧烈冲突。为了实现人类社会、经济的可持续发展，迫切需要以可再生生物资源替代不可再生化石资源，以清洁高效的生物加工方式替代污染低效的传统物质加工方式。

生物炼制是以生物可再生资源为原料生产能源与化工产品的新型工业模式，被认为是创造新的生

物基工业的最有发展前景的道路。生物炼制主要有两种途径：一是热化学加工，即通过热化学方法首先将生物原料加工为中间产物或者直接获得最终的产品；二是生物化学转化，即利用生物技术手段来完成从生物质到产品的生物加工过程，细胞工厂是实现生物化学转化的基础。然而，自然界中任何一种微生物的酶系种类有限，转化效率与能力有限，不能满足工业生产的需要。要将微生物改造成用于生物炼制的细胞工厂，必须借助基因组学、系统生物学和高速计算技术的最新发展，解析微生物的基

**Received:** October 8, 2010

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707800).

**Corresponding author:** Yanhe Ma. Tel: +86-10-64807590; Fax: +86-10-64807616; E-mail: mayanhe@im.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB707800) 资助。

因、蛋白、网络与代谢过程的本质,在分子、细胞和生态系统尺度上,多水平、多层次地认识和改造微生物,经过人工控制的重组和优化,重新分配微生物细胞代谢的物质流和能量流,从而充分利用微生物广泛的物质分解转化与卓越的化学合成能力,高效地制备生物能源和替代石油化工原料的平台化合物。构建高效细胞工厂是生物炼制的核心技术,它的发展将推动生物炼制逐步取代传统石油炼制,解决人类面临的日趋严峻的能源、资源和环境问题。

生物炼制技术已成为当今科技发展的最重要前沿之一,是世界知识产权争夺的战略制高点,各发达国家已作为重要的战略方向予以资金支持与政策扶持。为了尽快提升我国生物炼制技术水平,973计划在2007年设置了“生物炼制细胞工厂的科学基础”项目。该项目的思想是利用生物学、化学、计算科学、生化工程等交叉学科手段,研究解决全糖底物利用、代谢调控、细胞工厂构建与性能优化等方面的关键科学问题,揭示生物基产品典型代谢途径的优化调控机制,实质性地提高构建生物炼制细胞工厂的创新能力和提高大宗工业原料的生物合成能力,形成先进生物炼制技术的基础,为我国新型工业化道路作出积极的贡献。

为了推动我国生物炼制技术的进步和发展,《生物工程学报》出版“生物炼制细胞工厂”专刊,邀请“生物炼制细胞工厂的科学基础”973项目的核心研究人员,系统介绍该领域国内外的最新研究进展,并报道近年来取得的创新研究成果。

## 1 微生物纤维质糖代谢的分子机制

从可持续发展的角度,生物炼制的原料应来源于植物纤维资源。木质纤维素复杂的结构组成,是制约高效利用这一资源、发展生物炼制的瓶颈。主要存在于厌氧细菌中的纤维小体是有序、高效的协同降解纤维素的复合体系。梁朝宁、马延和等作者<sup>[1]</sup>概述了现有微生物降解利用木质纤维素体系的研究进展,论述了纤维小体和经过理性设计的人工纤维小体在木质纤维素降解的前景。探讨了人工设计构

建的多酶体系(人工纤维小体)、多菌体系(共培养)以及将酶和菌株有机结合的体系(工程菌代谢网络改造)在木质纤维素高效利用中的潜力,以期实现天然生物质木质纤维素到目的产品的高效转化,提高生物炼制的产率、降低生产成本。

真菌是最主要的纤维素酶生产菌株,但现在对其纤维素酶表达分泌及其调控机理的了解还很有限。要提高纤维生物质降解酶系的效率,须在生物质降解的分子基础上找突破。各类组学技术的出现,为揭示生物质降解的分子机理提供了技术可能。田朝光等作者<sup>[2]</sup>综述了真菌降解木质纤维素的功能基因组学研究进展。通过对白腐菌、褐腐菌、木霉、脉孢菌、青霉菌等典型纤维素高效降解真菌的功能基因组学和比较基因组学的分析,发现了很多参与降解过程的新基因,为木质纤维素降解机理的研究提供了新的目标靶点和思路。

木质纤维素作为植物界抵抗微生物侵扰的天然屏障,结构复杂,组成多样。单一功能的酶往往无法胜任木质纤维素的降解。为真正实现生物质的全面利用,需要深入研究纤维素酶系之间的协同作用机制,理解蛋白质分子如何结合木质纤维素并将之降解的分子机理和调控机制,在此基础上,结合代谢工程来重构木质纤维素降解酶系、菌系,开发出一套经济、高效的木质纤维素酶解体系。

## 2 细胞工厂的代谢网络及调控

微生物中的代谢途径并不是相互独立的,而是存在于复杂的代谢网络中,并受到各种调控网络的制约与控制。要构建用于生物炼制的高效细胞工厂,还应当理解生物代谢机制的基础上,认识细胞的调控机制,合理设计代谢途径和合成系统,重构基因的表达调控网络,从而重新分配细胞代谢的物质流和能量流,提高化学品的合成效率。

微生物基因组学的迅速发展为全面理解与认识微生物的代谢与调控过程提供了丰富的背景信息。基于基因组序列进行代谢网络重构,有助于发现新的代谢功能基因、调控元件、甚至新的代谢途径,从而指导代谢工程改造。基因组尺度代谢网络是以

基因组序列和注释信息为基础, 通过基因-蛋白质-反应相互关系重构模拟生物体的代谢过程。王晖、赵学明等作者<sup>[3]</sup>结合实际研究经验, 从代谢数据库建立、数学模型的建立到模拟验证, 对基因组尺度代谢网络进行了详细的阐述。作者同时指出, 虽然基因组尺度的代谢网络模型发展迅速, 很多模式菌株的基因组尺度的代谢网络模型已经构建完毕, 但是基因组尺度的代谢网络也存在一些缺陷。例如, 与其他生物过程结合较少; 现在的模型还是基于稳态模拟, 不能反映细胞真正的动态情况; 构建网络所需的数据不完善, 很多生物信息数据库存在错误和冗余, 导致构建的基因组尺度代谢网络还不够完善等方面的问题。

针对目前公共数据库平台中代谢途径基因的功能注释存在许多错误或信息不完整的问题, 杨琛<sup>[4]</sup>以丙酮丁醇梭菌中木糖代谢途径的重构为例, 介绍了代谢途径和调控网络重构的一些新型比较基因组学技术。利用基因组上下文分析方法(Genome context analysis), 结合基因簇、结构域融合、基因系统发育谱以及调节位点共享等多种基因组信息, 推断有关基因的功能关联性, 进而准确预测基因的功能, 有效地解决缺失基因问题、填补途径缺口, 重构出完整的代谢途径。作者通过实验验证, 成功重构了丙酮丁醇梭菌中木糖和木寡糖代谢途径及调控单元。该工作也说明, 运用新型的比较基因组学技术, 能够有效地解决网络重构中关键基因缺失的问题, 准确地预测基因的功能, 为实验分析提供指导, 从而大大减轻实验工作量、提高工作效率。

丙酮丁醇梭菌是一个重要的工业溶剂生产菌株。现在人们对其有机溶剂生成通路的调控机制仍不甚了解。从全局角度来分析丙酮丁醇梭菌的代谢通路, 了解参与通路的各种蛋白质的变化, 对丙酮丁醇梭菌的基因改造将会起到重要的指导作用。白雪、王全会等作者<sup>[5]</sup>采用双向电泳和质谱联用的技术, 对丙酮丁醇梭菌的磷酸化蛋白质组进行了初步的分析, 证实了丙酮丁醇梭菌的蛋白磷酸化过程可能在有机溶剂合成通路中起着调节功能, 这也为丙酮丁醇梭菌代谢工程改造提供了新思路。

谷氨酸棒杆菌是氨基酸的主要生产菌株, 也是重要的可改造为细胞工厂的微生物。张晓梅、许正宏等作者<sup>[6]</sup>对一株发酵生产 L-色氨酸的谷氨酸棒杆菌进行了部分代谢流量分析, 发现氨基酸发酵中的扰动因子叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 影响磷酸戊糖途径(HMP) 碳流, 造成流向目的产物 L-丝氨酸的碳流减少。维生素 B<sub>12</sub> 还可造成三羧酸循环的流量不足, 从而限制了产物合成速率的进一步提高, 研究结果也为谷氨酸棒杆菌的代谢网络调控优化提供了参考。

### 3 细胞工厂的构建技术

发现和认识微生物代谢的分子基础、互作关系及调控机制, 为微生物细胞工厂的构建奠定理论基础。更重要的是要进一步了解、掌握生物合成系统的构建原理, 开发出不同途径的组装策略以及遗传改造方法。转基因是生物合成能力重构的重要手段, 外源基因可以赋予细胞新的能力、形成新产物的合成、增强细胞的抗逆性等, 是细胞工厂构建的有力工具。同时, 为了优化特定产品的合成途径, 需要去除一些不必要的支路途径, 将细胞的物质流与能量流引向目的代谢物途径。为了实现这些目标, 必须解决外源基因的导入、基因的敲除、大片段基因的重组和目的基因的表达等一系列技术问题。

董红军、李寅等作者<sup>[7]</sup>介绍了丙酮丁醇梭菌的遗传操作系统研发方面的所取得的新进展。作者通过二型内含子的方法失活丙酮丁醇梭菌的限制修饰系统, 实现了非甲基化质粒在丙酮丁醇梭菌中的转化。作者进而分析了基于非复制型质粒的同源重组、基于复制性质粒的同源重组、反义 RNA 技术和二型内含子基因失活技术目前存在的缺陷, 指出提高转化效率是丙酮丁醇梭菌遗传操作系统改造的关键突破口, 并对如何发展丙酮丁醇梭菌的高效遗传操作系统提出了建议。

微生物的 DNA 转化方法是导入外源基因的工具, 目前对微生物转化主要有化学法和电转化法。这些方法存在感受态细胞准备时间长、处理过程容易导致细胞活性降低、处理后要有温育等缺点。谭

海东、赵宗保等作者<sup>[8]</sup>开发了一种基于海泡石的微生物 DNA 转化的方法。海泡石是一种矿石纳米材料,价格便宜、来源丰富,且对人体无害。这种转化方法无需感受态制备和处理后的温育过程,可得到比钙转更高的转化率。该方法也可用于探索其他用钙转和电转未成功的微生物,从而拓宽了生物炼制细胞工厂的来源。

基因组混组是一种新的细胞工厂改造方法。通过循环原生质体融合等手段,使得不同菌株来源的基因组能够得到充分重组,增加将正向突变整合到同一重组子中的机会。杨俊杰、杨晟等作者<sup>[9]</sup>考察了枯草芽胞杆菌多轮融合过程中基因组混组程度改变的影响。通过比较天蓝色链霉菌、乳杆菌基因组混组的结果,并结合计算机模拟循环融合过程,作者指出,要达到较充分的枯草芽胞杆菌基因组混组效果,需要以突破微生物细胞间高频重组操作技术为基础。

细菌启动子是细菌中基因表达的必需调控元件,决定了细菌基因表达的强度和时机。启动子的识别和应用研究,对于实现异源基因的可控表达、有效获得目的产物、促进生物催化和代谢工程研究具有重要的意义。徐友强、马翠卿等作者<sup>[10]</sup>综述了细菌启动子识别及应用研究进展。细菌启动子在基因转录水平的调控上起着重要作用,直接决定蛋白的表达水平,这使得细菌启动子在全细胞催化和酶催化领域具有巨大的应用价值。

表面展示 (Surface display) 是一种有价值的基因操作技术,它使表达的外源肽以融合蛋白形式展现在细胞表面。芽胞表面展示技术作为微生物表面展示技术的一种,因所表达的异源蛋白无需经过跨膜过程及芽胞的抗逆性等独特优势而备受研究者的关注。徐小曼、马翠卿等作者<sup>[11]</sup>介绍了芽胞的生理结构和形成过程、芽胞表面展示系统构建原则及目前所构建的芽胞表面展示系统种类。由于枯草芽胞杆菌是安全的益生菌,因此枯草芽胞杆菌表面展示技术在生物催化和细胞工厂研究领域将越来越受重视,也为高附加值化合物的工业生产提供了重要参考。

## 4 细胞工厂的优化

实现大宗化学品的高效生物炼制,需要提高产物的产率、终浓度和生产速率,提高其工业适应能力。郭艳梅、孙际宾等作者<sup>[12]</sup>以黑曲霉为模式菌株,详细论述了如何根据菌株的基因组信息,解析蛋白分泌机制和重构代谢调控网络,进而指导细胞工厂的构建和优化。黑曲霉基因组学技术方法的进步,将黑曲霉从传统的“黑箱”变为“灰箱”甚至“白箱”,使我们对黑曲霉生产琥珀酸、苹果酸和柠檬酸过程的理解显著增加,再辅之以黑曲霉遗传操作工具的发展,将黑曲霉这样一种重要的工业微生物改造为细胞工厂是完全可以实现的。

微生物细胞工厂是人工设计的能够进行物质生产的微生物代谢体系。由于在细胞中引入多个基因或整条代谢途径,可能导致代谢失衡、部分代谢中间产物积累等问题,需要使用一定的调控策略加以控制和优化。姜天翼、马翠卿等作者<sup>[13]</sup>从转录、翻译以及使用人工合成的支架蛋白质对代谢途径中的各个组件进行模块化控制三个层次阐述了协调优化多基因表达策略。通过添加人工支架蛋白优化各个组件是最近发展的细胞工厂优化新技术,该技术可以精密控制并优化代谢途径中多个酶的化学计量数比,平衡途径中各个环节的流量,还可以缩短各个酶之间的空间距离,形成底物通道,从而极大地提高细胞工厂的生物合成效率。

聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 是一类由微生物合成的、生物可再生、生物可降解、具有多种材料学性能的高分子聚合物,在很多领域有着广泛的应用前景。李正军、陈国强等作者<sup>[14]</sup>从辅酶工程、代谢工程、微氧生产等方面综述了微生物法生产 PHA 的优化策略。PHA 的合成又与细菌的抗逆性之间存在着密切的联系,微生物积累 PHA 能够增加其在多变环境中的竞争能力。因此,PHA 可以作为细胞工厂优化的一个调节因子,增强菌株的抗逆性。

利用丰富、廉价的木质纤维素糖,尤其是同等利用己糖/戊糖发酵生产乙醇是乙醇工业发展的趋势。张颖、陆伟等作者<sup>[15]</sup>综述了对运动发酵单胞菌、大肠杆菌和酵母菌株的代谢工程改造,以及优化木糖发酵

能力的研究。通过代谢工程手段改造的菌株可以利用木糖发酵产乙醇, 有些工程菌株对木糖的利用速率甚至都高于利用葡萄糖, 显示了广阔的前景。

氢能作为一种清洁能源受到人们的普遍关注, 生物制氢是生物炼制的一个重要内容。从工业化角度来看, 混合菌群发酵比纯菌种发酵培养条件简单, 操作方便, 且可以利用不同菌群的协同效应扩大底物范围、提高产氢效率。马茜岚、姚善泾等作者<sup>[16]</sup>通过微胶囊固定化混合菌群发酵产氢, 通过菌群优化预处理和微胶囊固定化实现菌群协同作用, 氢气产量比游离细胞增产了 30% 以上。发酵产物中也含有较高比例的丁酸和乙酸, 从而使该虚拟“细胞工厂”成为一个多产物联产体系。

耐辐射奇球菌以对电离辐射、UV 辐射、干燥等各种 DNA 损伤试剂具有超强的抗性而著称, 类胡萝卜素 Deinoxanthin 是其非酶类抗氧化系统中的一种特殊天然化合物, 能有效地清除过氧化氢等活性氧自由基。孙宗涛、华跃进等作者<sup>[17]</sup>探讨了耐辐射奇球菌体内类胡萝卜素 Deinoxanthin 的部分合成机制, 对构建工程菌株合成具有高效自由基清除能力的类胡萝卜素、提高菌株的工业适应性具有重要意义。

生物炼制细胞工厂的设计是精细而复杂的, 微生物糖代谢转化、细胞代谢网络及调控网络的认识与重构、细胞工厂的构建和细胞工厂的优化是生物炼制细胞工厂的四要素。系统生物学、合成生物学等新学科、新技术的快速发展, 为构建高效生物炼制细胞工厂奠定了理论和技术基础。相信在不久的将来, 将有越来越多设计精密、含有更多更复杂的基因而控制又更加方便的细胞工厂系统, 能够为人类社会作出巨大的贡献。感谢《生物工程学报》出版“生物炼制细胞工厂”专刊, 也感谢“生物炼制细胞工厂的科学基础”973 项目组的研究人员为专刊撰写论文。这些生物炼制细胞工厂领域创新成果的集中展示, 将推动该领域国内外同行的学术交流, 并推动我国工业生物技术的发展。

## REFERENCES

[1] Liang CN, Xue YF, Ma YH. Synergistic systems for

biodegradations of lignocellulose in microorganisms: a review. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1327–1332.

梁朝宁, 薛燕芬, 马延和. 微生物降解利用木质纤维素的协同作用. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1327–1332.

[2] Tian CG, Ma YH. Progress in lignocellulose deconstruction by fungi. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1333–1339.

田朝光, 马延和. 真菌降解木质纤维素的功能基因组学研究进展. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1333–1339.

[3] Wang H, Ma HW, Zhao XM. Progress in genome-scale metabolic network: a review. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1340–1348.

王晖, 马红武, 赵学明. 基因组尺度代谢网络研究进展. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1340–1348.

[4] Yang C. Comparative genomic reconstruction of regulatory and metabolic networks in bacteria. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1349–1356.

杨琛. 基于比较基因组学重构细菌的代谢途径和调控网络. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1349–1356.

[5] Bai X, Zhao JJ, Wang Q, et al. Phosphoproteomic investigation of *Clostridium acetobutylicum*. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1357–1362.

白雪, 赵晶晶, 王倩, 等. 丙酮丁醇梭菌磷酸化蛋白质组分析. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1357–1362.

[6] Zhang XM, Dou WF, Xu HY, et al. Metabolic flux analysis of L-serine synthesis by *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1363–1371.

张晓梅, 窦文芳, 许泓瑜, 等. 谷氨酸棒杆菌 SYPS-062 合成 L-丝氨酸的代谢通量分析. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1363–1371.

[7] Dong HJ, Zhang YP, Li Y. Genetic modification systems for *Clostridium acetobutylicum*. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1372–1378.

董红军, 张延平, 李寅. 丙酮丁醇梭菌的遗传操作系统. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1372–1378.

[8] Tan HD, Wang L, Lin JT, et al. Mechanism of DNA transformation based on mineral nanofibers and method improvement. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1379–1384.

谭海东, 王磊, 林金涛, 等. 基于矿石纳米材料的 DNA 转化的机理初探及方法改进. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1379–1384.

[9] Yang JJ, Fan WC, Xiao H, et al. Genome shuffling method of *Bacillus subtilis*. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1385–1392.

杨俊杰, 范文超, 肖晗, 等. 枯草芽孢杆菌基因组混组方法. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1385–1392.

[10] Xu YQ, Ma CQ, Tao F, et al. Bacterial promoter

- recognition and application. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1393–1403.
- 徐友强, 马翠卿, 陶飞, 等. 细菌启动子识别及应用研究进展. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1393–1403.
- [11] Xu XM, Wang XC, Ma CQ. Recent progress of the research on spore surface display. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1404–1409.
- 徐小曼, 王啸辰, 马翠卿. 芽孢表面展示技术研究进展. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1404–1409.
- [12] Guo YM, Zheng P, Sun JB. *Aspergillus niger* as a potential cellular factory: prior knowledge and key technology. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1410–1418.
- 郭艳梅, 郑平, 孙际宾. 黑曲霉作为细胞工厂: 知识准备与技术基础. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1410–1418.
- [13] Jiang TY, Li LX, Ma CQ, *et al.* Strategies for regulating multiple genes in microbial cell factories. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1419–1425.
- 姜天翼, 李理想, 马翠卿, 等. 微生物细胞工厂中多基因表达的控制策略. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1419–1425.
- [14] Li ZJ, Wei XX, Chen GQ. Microbial cell factories for production of polyhydroxyalkanoates. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1426–1435.
- 李正军, 魏晓星, 陈国强. 生产聚羟基脂肪酸酯的微生物细胞工厂. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1426–1435.
- [15] Zhang Y, Ma RQ, Hong HZ, *et al.* Metabolic engineering for microbial production of ethanol from xylose: a review. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1436–1443.
- 张颖, 马瑞强, 洪浩舟, 等. 微生物木糖发酵产乙醇的代谢工程. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1436–1443.
- [16] Ma QL, Lin DQ, Yao SJ. Immobilization of mixed bacteria by microcapsulation for hydrogen production—a trial of pseudo “Cell Factory”. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1444–1450.
- 马茜岚, 林东强, 姚善泾. 微胶囊固定化混合菌群发酵产氢——构建一种虚拟“细胞工厂”的尝试. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1444–1450.
- [17] Sun ZT, Tian B, Shen SC, *et al.* Substrate specificity of carotenoid 3',4'-desaturase from *Deinococcus radiodurans*. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(10): 1451–1455.
- 孙宗涛, 田兵, 沈绍传, 等. 耐辐射奇球菌类胡萝卜素 C3',4'-脱氢酶底物特异性. *生物工程学报*, 2010, **26**(10): 1451–1455.