

## • 核心技术创新 •

**宋诒** 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员、博士生导师。主要从事工业酶制剂的开发与应用,重点进行新酶基因挖掘、分子改造,原核表达系统的底盘细胞改造,及绿色工艺开发等研究。先后承担国家级、省部级科研项目 10 余项,发表论文 20 余篇,获授权专利 10 余项,参编 2 部英文专著。2019 年度“渤海英才·杰出贡献专家”。



**柏文琴** 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员、博士生导师。主要研究方向是利用合成生物学和代谢工程技术,围绕生物材料和活性聚合物的细胞工厂构建、过程优化及应用开发开展研究。设计构建蛋白纳米支架,组装多酶反应器,实现高附加值化合物的体内外合成。在 *Nat Commun*、*Carbohydr Polym*、*Metab Eng* 等期刊发表研究论文 20 余篇,申请专利 10 项。承担国家级、省部级科研项目 5 项。



# 工业酶与绿色生物工艺的核心技术进展

郑宏臣<sup>1,2</sup>, 徐健勇<sup>1,2</sup>, 杨建花<sup>1,2</sup>, 郑迎迎<sup>1,2</sup>, 涂然<sup>1,2</sup>, 石婷<sup>1,2</sup>, 付刚<sup>1,2</sup>, 刘倩<sup>1,2</sup>, 王兴彪<sup>1,2</sup>, 韩旭<sup>1,2</sup>, 张以恒<sup>1,2</sup>, 柏文琴<sup>1,2</sup>, 宋诒<sup>1,2</sup>

1 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程研究中心, 天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

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, 宋诒. 工业酶与绿色生物工艺的核心技术进展. 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. Chin J Biotech, 2022, 38(11): 4219-4239.

**摘要:** 绿色生物工艺是国家战略性新兴产业, 具备高效、安全、节能、环保等特点, 市场前景

**Received:** July 20, 2022; **Accepted:** September 5, 2022

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100201, 2021YFC2100405, 2021YFC2100403); Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-009-0202)

**Corresponding authors:** BAI Wenqin. E-mail: baiwq@tib.cas.cn

SONG Hui. Tel/Fax: +86-22-84861934; E-mail: song\_h@tib.cas.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2021YFC2100201, 2021YFC2100405, 2021YFC2100403); 天津市合成生物技术创新能力提升行动 (TSBICIP-KJGG-009-0202)

广阔。工业酶是绿色生物工艺的“芯片”，新型高效工业酶的开发与应用相关技术是绿色生物工艺的核心。文章综述了工业酶制剂产业现状、以中国科学院天津工业生物技术研究所为代表的研发机构在工业酶及绿色生物工艺开发应用方面产生的一系列关键技术突破与研发进展，展示了通过酶与生物技术的进步提升传统加工产业发展的典型案例，随着这些核心技术的发展将推动越来越多的传统制造业走向绿色可持续发展路线。

**关键词：**工业酶；基因挖掘；高通量筛选；蛋白理性设计；定向进化；表达系统；绿色生物加工

## Developments of core technologies in industrial enzymes and green bioprocessing

ZHENG Hongchen<sup>1,2</sup>, XU Jianyong<sup>1,2</sup>, YANG Jianhua<sup>1,2</sup>, ZHENG Yingying<sup>1,2</sup>, TU Ran<sup>1,2</sup>, SHI Ting<sup>1,2</sup>, FU Gang<sup>1,2</sup>, LIU Qian<sup>1,2</sup>, WANG Xingbiao<sup>1,2</sup>, HAN Xu<sup>1,2</sup>, ZHANG Yiheng<sup>1,2</sup>, BAI Wenqin<sup>1,2</sup>, SONG Hui<sup>1,2</sup>

1 National Engineering Research Center for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

**Abstract:** The green bio-manufacturing industry, characterized with high efficiency, safety, energy-saving, and environmental-friendliness, is a national strategic emerging industry with broad market prospect. Industrial enzyme is the “chip” of green biological process. The exploitation and application of new industrial enzymes is one of the core enabling technologies of green bio-manufacturing. This review introduces the current situation of industrial enzyme industry, followed by summarizing a series of key technical breakthroughs and research progress in industrial enzymes as well as green biological technologies and processes, which were developed by Tianjin institute of industrial biotechnology, Chinese Academy of Sciences in the past 10 years. Typical cases where traditional processing industry was promoted by the development and application of enzyme and green biological technologies were also presented. It is envisioned that development of these core technologies will enable more traditional processing industries transform into green and sustainable bio-based industry.

**Keywords:** industrial enzyme; gene mining; high-throughput screening; protein rational design; directed evolution; expression system; green bio-manufacturing

绿色生物工艺指将现代生物科技与传统化学化工等技术的优势相结合，以生物催化为核心内容的现代工业生物工艺技术。酶作为高特异性的生物催化剂，是生物催化的核心。从动物、植物或微生物中产生，经过提取、加工获

得的具有不同纯度和剂型的工业化制剂称为酶制剂<sup>[1]</sup>。酶制剂产业经历了起步和半个多世纪的迅速成长之后，现已形成一个富有活力的高新技术产业，保持持续高速发展。酶制剂产业应用覆盖洗涤、纺织、制革、饲料、造纸和食

品等诸多绿色生物加工领域,每年创造工业附加值达数千亿元<sup>[2]</sup>。

在我国,酶制剂助力的绿色加工行业目前正处于成长阶段,市场前景广阔。国家发展和改革委员会(2022年5月10日)发布了《“十四五”生物经济发展规划》,明确将生物制造作为生物经济战略性新兴产业发展方向,提出“依托生物制造技术,实现化工原料和过程的生物技术替代,发展高性能生物环保材料和生物制剂,推动化工、医药、材料、轻工等重要工业产品制造与生物技术深度融合,向绿色低碳、无毒低毒、可持续发展模式转型”。在绿色发展方面,生物制造可以降低工业过程的能耗、物耗,减少废物排放,大幅度降低生产成本,提升产业竞争力。可从根本上改变化工、医药、能源、轻工等传统制造业高度依赖化石原料和“高污染、高排放”的不可持续加工模式,减少工业经济对生态环境的影响,推动物质财富的绿色增长和经济社会可持续发展<sup>[3]</sup>。

## 1 工业酶制剂在绿色生物工艺中的产业现状

### 1.1 工业酶制剂的产业现状

目前全球工业酶制剂产业市场呈现寡头垄断局面。市场资源高度集中,诺维信和杜邦合计占据约70%的市场份额,德国AB和帝斯曼也拥有较强的市场竞争力。即使受新冠肺炎疫情的影响,全球酶制剂市场仍保持高速增长态势,2021年全球酶制剂市场规模为61.0亿美元,同比增长7.0%<sup>[4]</sup>。

我国酶制剂工业始于1965年无锡酶制剂厂成立,经过近60年的发展,已逐步发展成为一个独立的产业,进入世界酶制剂生产的大国行列,目前已实现规模化生产的酶制剂达到30种

左右。酶制剂在绿色生物工艺各细分领域达到国际先进水平。近年来,酶制剂在我国食品工业、轻工业和环境能源等绿色加工重点领域发挥着重要作用,带动了诸多下游产业的快速发展。提高酶表达产量,降低酶制剂生产成本,开发新酶品种适应绿色生物工艺新用途是酶制剂工业的主要发展方向<sup>[5]</sup>。

### 1.2 酶制剂在绿色生物工艺中的应用

当前全球酶制剂在绿色生物工艺与制造领域所产生的工业产值已超过千亿美元,其环保效益和社会效益则更为可观。

酶制剂在食品绿色生物工艺中的应用包括淀粉制糖、啤酒发酵、功能糖制备、发酵食品、食品原料加工、生产过程以及保鲜等。在淀粉制糖工业中,以酶法代替酸水解法可减少设备投资及维护费用,提高糖化率及糖化液纯度,可节约粮食、减少污染物的排放量。蛋白酶、果胶酶、纤维素酶等在果酒、果汁、调味品、烘焙、肉制品、中药有效成分提取以及多肽保健品生产中的应用也取得了较大的进展。未来,酶制剂在食品行业的研究将以食品安全为主要方向<sup>[6]</sup>。

在饲料工业中,饲用酶制剂可提高饲料转化率5%–25%,减少饲用粮食用量。植酸酶是饲料工业中最大的酶制剂部分,在饲料中添加植酸酶能够增加植酸磷的利用率,降低饲料中无机磷的添加。同时,添加复合酶更贴近饲料的成分复杂性,效果会更为显著<sup>[7]</sup>。

在洗涤行业,酶制剂因其特有的高效性、专一性和生物可降解性可以有效地降低洗涤剂的用量,提升洗涤效果。洗涤剂中的水解酶能有效地将衣物表面污染的脂肪、蛋白质和多糖等分解,从而清除附着在衣服表面的固体污垢和带有汗渍、血渍、淀粉和脂肪等特殊污垢<sup>[8]</sup>。

酶制剂在实现皮革的清洁化生产以及生物

质的综合利用等方面担当着重要的角色。在清洁制革中,酶可以有效地解决传统制革中硫化物、石灰、生化需氧量 (biochemical oxygen demand, BOD)、化学需氧量 (chemical oxygen demand, COD)、固体总溶解量 (total dissolved solids, TDS) 等超标污染物的问题,并改善皮革的品质。我国在世界上率先发展了蛋白酶脱毛技术,酶脱毛废水中含有蛋白质和脂肪,不含有毒物质,可作为动物饲料加以利用<sup>[9]</sup>。

纺织行业的能源和水资源消耗以及造成的环境污染,使该行业面临相当大的能源环保压力。淀粉酶、纤维素酶、果胶酶等酶制剂应用于纺织品前处理的退浆、精炼、脱胶等过程,以及纺织品染整后等多个加工过程,可有效改善棉织物表面的外观和手感、增强织物的染色性、抗皱性,改善毛织物毡缩等,同时可极大降低污水排放对环境的破坏<sup>[10]</sup>。

此外,研究者们近年来在用酶法进行纸浆漂白、废纸脱墨等方面也取得了一系列重大技术突破,应用效果显著<sup>[5]</sup>。在废纸制浆预处理过程中酶可以软化木质素或半纤维素的结构,使纤维素顺利脱落,提高废纸制浆质量,提高回收率;加入酶制剂,可使油墨溶解,达到脱墨目的。酶制剂无毒,可在环境中降解,对造纸废水的生物处理可节约能源和降低碱液用量,减少环境污染<sup>[11]</sup>。

目前酶催化应用最有前途的领域是化学品合成,利用酶制剂合成化学品的进程在逐年加快,且产品类型逐年增加。酶对手性化合物具有较好的立体选择性,在药品和农药的制造中,生产高纯度的单一对映体产物,展现出极大的优势。该领域将成为未来绿色生物工艺核心发展方向<sup>[12-13]</sup>。

酶制剂是绿色生物工艺的“芯片”,酶制剂研发的核心技术涉及新酶基因的挖掘、性能的

优化改造,高效表达生产、发酵过程优化控制等策略。同时,酶制剂后处理技术也是提高产品质量降低生产成本的关键,需要进一步加强酶蛋白分离、纯化、存储等制备技术及发酵废液后处理技术的研发。此外,为适应不同的应用场景,在酶制剂复配、挖掘新型酶助剂方面,需要深入研究酶与底物的作用机理,采用基于酶促反应作用机理的酶复配及应用评价技术,结合应用数学模型模拟获得最佳复配方案,提高酶制剂的性能和应用效率。持续加强以上酶制剂相关核心技术的研发将不断推动工业酶在绿色生物加工产业的发展和应用。

## 2 工业酶的新基因挖掘与筛选技术

### 2.1 新基因挖掘

从基因组数据挖掘新基因是新酶资源开发的一种快捷有效的手段。隐马尔科夫模型 (hidden Markov model, HMM) 在 20 世纪 60 年代末被引入基因挖掘,1980 年以来,被广泛应用于序列分析、基因发现和结构预测等生物信息学领域。隐马尔科夫模型是使用具有隐藏状态的马尔科夫过程设计出的统计模型。一个 HMM 可以由五元组参数  $\lambda=(\pi, A, B, S, O)$  来描述,即 2 个状态集合和 3 个概率矩阵。由于 S 和 O 这两个状态集合隐含于另外 3 个概率矩阵中,故可以用  $\lambda=(\pi, A, B)$  三元组参数来简洁地表示一个隐马尔科夫模型<sup>[14-15]</sup>。

中国科学院天津工业生物技术研究所 (以下简称“天津工业生物所”) 宋诒团队应用隐马尔科夫模型先后成功挖掘了淀粉裂解多糖单加氧酶、酸性耐高温淀粉酶、蛋白酶等若干新酶基因,并通过表达和酶学性质表征,开辟了各类新酶在酶法纺织、淀粉制糖等绿色生物工艺中的应用。

### 2.2 高通量筛选

高通量筛选技术是获得高性能工程菌株的

关键技术,主要包括微孔板、流式细胞和液滴微流控筛选技术<sup>[16-17]</sup>。其中,微孔板筛选技术是最早使用、最常用的一种检测方法,通过显色、荧光、偏振等光信号对微孔内物质进行检测定量,但无法适合大容量突变库的筛选<sup>[18]</sup>。流式细胞筛选技术是一种基于荧光激活细胞的单细胞高效分选技术,每天检测数达上亿个样本<sup>[19]</sup>,该方法主要用来检测细胞内的物质含量。为了解决针对细胞分泌表达的高通量筛选问题,研究人员开发了基于液滴微流控的筛选技术。液滴微流控技术利用微芯片生成相互独立、大小均一的微液滴,并将细胞包裹在这些微液滴内,实现单细胞分泌产物的高通量检测与分选。该技术具有检测通量高、成本低的特点,在工业酶的挖掘和改造中得到了广泛应用<sup>[20-22]</sup>。

天津工业生物所高通量编辑与筛选平台实验室是国内率先建立液滴微流控筛选改造平台的机构之一<sup>[23]</sup>。主持研制的基于激光诱导荧光检测的液滴微流控细胞分选实验样机单液滴检测通量达  $7 \times 10^6/\text{h}$ ,单细胞液滴分选通量达  $2 \times 10^6/\text{h}$ ,分选阳性准确率可达 99%以上。依托研制的液滴微流控装置,研究所在国内率先开展了液滴微流控筛选应用研究,建立了大肠杆菌、枯草芽胞杆菌、酵母菌、放线菌、丝状真菌等 6 类常用宿主的检测和筛选平台<sup>[24-28]</sup>,测试了针对纤维素酶、脂肪酶、抗生素、抗体等数 10 种目标产物的筛选案例<sup>[29-32]</sup>。首次在模拟链霉菌真实发酵环境下实现超高通量筛选,通量达每小时 2 万个菌株,阳性率提高 330 倍,检测筛选速度从每天数十个提高到每秒钟数十个。经优化研究提升毕赤酵母筛选效率上千倍,丝状真菌筛选效率近万倍。此外,高通量编辑与筛选平台实验室也建立了多种重要工业酶/代谢物的流式细胞仪或者微孔板高通量筛选体系,在菌株高通量筛选领域取得了诸多成果<sup>[33-34]</sup>。

### 3 分子酶工程的核心技术发展

#### 3.1 酶结构与功能解析及理性设计改造

蛋白晶体结构解析是研究酶功能、作用机制的重要技术。在结构解析的基础上,对酶的关键位点进行理性改造是提高酶活性的有效手段。

天津工业生物所刘卫东团队对聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET) 塑料降解酶 *IsPETase* 底物/产物的复合体晶体结构进行了解析<sup>[35]</sup>,研究发现 233 位天冬酰胺可能是影响酶活性的关键氨基酸残基,并解析了 N233A 突变体的晶体结构,揭示了突变体高活性的分子机理<sup>[36]</sup>,研究发现 S185 和 I189 独特地存在于 *IsPETase* 中以减少 W156 的空间位阻,在同源聚酯水解酶中引入相应的双残基取代提高了 PET 水解活性<sup>[37]</sup>。该团队和中国科学院微生物研究所吴边团队合作,基于贪婪积累策略,发现了提升酶活力的关键位点,获得了具有较高的 PET 水解性能的突变体<sup>[38]</sup>。2022 年德克萨斯大学团队使用模型设计改进 *IsPETase*,获得的突变体对多种不同的未经处理的晶态和非晶态 PET 均能高效降解<sup>[39]</sup>。刘卫东等和湖北大学郭瑞庭等合作对来源于树枝叶堆肥的 PET 水解酶进行了复合体结构解析,并进一步改造,获得了活力更强、热稳定性更好的酶<sup>[40]</sup>。

天津工业生物所 Zheng 等<sup>[41]</sup>首次解析了对饲料生产有重要影响的霉菌毒素——玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN) 的水解酶 ZHD101 的分子结构。解析了其催化核心三联体 Ser102-His242-Glu126 的结构、酶和底物的相互作用方式。同时还解析了新挖掘的玉米赤霉烯酮水解酶 RmZHD 及其结合底物的复合体结构。进一步基于晶体结构的分子改造,大大提高了 ZHD101 对玉米赤霉烯酮高毒性衍生物  $\alpha$ -ZOL 的活力,

同时保留了其对主要污染物 ZEN 的活力。该结果对 ZHD 在饲料工业的应用, 实现玉米赤霉烯酮脱毒, 具有重要的意义。

宋诙等对无氧芽胞杆菌 LM 18-11 (*Anoxybacillus* sp. LM 18-11) 中挖掘的高比活耐热普鲁兰酶 PulA 进行 X-衍射晶体结构解析, 发现了一个全新的碳水化合物底物结合结构域家族 68 (carbohydrate binding module 68, CBM68), 并首次揭示了 CBM68 结构域的关键结合位点<sup>[42-46]</sup>。在普鲁兰酶 PulA 和酸性普鲁兰酶晶体结构分析基础上, 理性设计了系列融合重组普鲁兰酶, 酶学性质各异, 从中获得了比活力较野生型提高了 70% 的融合体, 还获得了耐酸性和耐热性提高的融合体<sup>[47]</sup>; 此外, 通过生物信息学分析, 对 PulA 进行了耐热性的半理性改造, 得到了耐热性显著提高的突变酶 M18 和 M17<sup>[48]</sup>。

### 3.2 酶蛋白分子进化

定向进化是在实验室条件下模拟达尔文进化过程, 通过随机突变和重组, 人为引入大量的突变, 构建目的蛋白基因突变库; 按照特定的需要和目的设置合适的筛选策略, 快速从突变库中筛选出具有期望特征的蛋白质, 实现分子水平的模拟进化<sup>[49]</sup>。定向进化可在未知目标蛋白质结构信息和作用机制的情况下对蛋白质进行改造, 是改善蛋白质性能的有效方法。近 30 年来, 定向进化在突变体文库构建和筛选方法上取得快速发展, 包括利用易错 PCR、DNA 重组、点饱和突变等技术产生多样性随机突变体文库的构建方法, 以及流式细胞仪、高效液相色谱、质谱等高通量、自动化的筛选方法, 使定向进化成为酶工程领域的有效研究方法, 并已经广泛应用到工业酶的改造中<sup>[19,50]</sup>。

天津工业生物所朱蕾蕾研究员带领的蛋白质定向进化团队一直致力于定向进化方法的开发和功能性蛋白的定向进化研究。近年来, 开

发了一系列基于定向进化技术的酶设计改造方法<sup>[18,21]</sup>, 包括: 通过优化酶表面氨基酸位点提高酶稳定性的方法和次层 loop 区重新设计提高底物亲和性的半理性设计方法<sup>[51-52]</sup>; 通过全序列饱和突变揭示了氨基酸位点影响酶的非水相溶剂稳定性的分子机制, 为改造获得良好操作鲁棒性的酶催化剂提供重要思路, 并对多个重要功能性蛋白进行了性能提升, 如脂肪酶、多糖裂解单加氧酶、谷氨酸通道蛋白等通过定向进化获得了性能提高的突变体<sup>[53-56]</sup>。

## 4 工业酶高效表达系统

### 4.1 大肠杆菌表达系统

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 具有生长速率高、操作简便、可高密度发酵、拥有众多成熟分子操作技术等优势, 成为目前最常用的模式微生物。

外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达一直是一个难以解决的问题, 很多重要的蛋白质家族包括磷酸酶、激酶、膜相关蛋白等都难以在大肠杆菌实现可溶性表达。目前普遍认为重组蛋白表达形成包涵体与翻译和折叠速率有关。在大肠杆菌中的上述两步的速率几乎比真核系统中高出一个数量级, 出现翻译后折叠错误的概率会很高。为了解决蛋白质可溶性表达问题已开展了很多研究, 通过降低培养温度来减缓蛋白质的表达速度, 应用不同的启动子控制转录速率、共表达分子伴侣等手段提高折叠的正确率等。

随着代谢工程和合成生物学技术的快速发展, 对宿主细胞进行改造提高宿主的物质、能量代谢水平, 减小细胞代谢负担和优化代谢通路, 成为提高外源蛋白表达水平的新方法。宋诙团队发现了两个关键调控基因 *prpD* 和 *malK*, 高表达这两个关键基因可以提高不同外源蛋白的表达水平<sup>[57-59]</sup>, 针对该高效表达系统作用机

制的研究显示,上调 *malk* 基因可提高 *prpD* 基因及其通路中 5 个关键基因连续上调,而 *prpD* 基因的上调可使细胞内以丙酮酸为核心的物质能量代谢在有外源蛋白表达时整体上调从而平衡细胞应激压力,该系统还有利于缓解大肠杆菌发酵后期的乙酸抑制<sup>[60-61]</sup>。同时,宋该团队通过对培养基及发酵条件的优化也实现了诸多外源蛋白在大肠杆菌中的高效表达,其中碱性过氧化氢酶 (80 000 U/mL) 和碱性果胶酶 (10 000 U/mL) 分别达到了目前报道的最高水平<sup>[58,62-63]</sup>。此外,构建融合表达标签的载体库,通过筛选实现了植物来源的糖基转移酶 UGT76G1 等复杂蛋白的可溶性表达<sup>[57]</sup>。朱蕾蕾等利用定向进化对信号肽序列进行了优化,提高了大肠杆菌分泌目标酶蛋白的能力,为优化提高酶蛋白在大肠杆菌中分泌表达提供了有效的方法<sup>[64]</sup>。

## 4.2 芽胞杆菌表达系统

芽胞杆菌在工业蛋白质生产中具有十分广泛的应用,利用芽胞杆菌宿主细胞实现了多种工业酶制剂及高附加值工业蛋白的表达。近年来,多种类型的枯草芽胞杆菌表达系统被开发并应用于异源蛋白质表达。目前常用的系统包括基于  $P_{grac}$  启动子的 IPTG 诱导表达系统,基于  $P_{spas}$  启动子的枯草菌素诱导表达系统,基于  $P_{xyIA}$  启动子的木糖诱导表达系统,基于  $P_{manA}$  启动子的甘露糖诱导表达系统,基于  $P_{srfA}$  启动子的自诱导表达系统,基于  $P_{lial}$  启动子的抗生素诱导表达系统 LIKE,基于  $P_{des}$  和  $P_{cspB}$  启动子的低温诱导表达系统,以及基于 T7 启动子的 IPTG 诱导表达系统等<sup>[65-73]</sup>。然而,上述开发的枯草芽胞杆菌表达系统多是聚焦于单一性能因素进行优化开发,表达强度、严谨性、兼容性等因素往往不能同时满足。

天津工业生物所张大伟团队针对枯草芽胞

杆菌中的启动子元件、信号肽元件、分子伴侣、蛋白质转运途径等多重因素进行挖掘和优化,建立了从转录、翻译、折叠、分泌等角度进行蛋白质分泌表达优化的系统性平台技术,构建了具有自主知识产权的麦芽糖高效表达调控系统 (maltose-inducible expression system, MATE),实现了目标基因的高强度、高严谨表达与调控<sup>[74]</sup>。该系统可进行诱导激活或抑制,解除了葡萄糖对系统的分解代谢物阻遏 (carbon catabolite repression, CCR) 效应。通过加入激活型核糖开关整合转录-翻译调控元件,在保持表达强度的条件下实现 790 倍的诱导倍数。利用 MATE 系统实现了人成纤维生长因子 12、几丁质酶、阿洛酮糖异构酶、低聚半乳糖苷酶、甘露聚糖酶等 9 个异源蛋白质的高效分泌表达,胞内目标蛋白平均占比近 60%,胞外目标蛋白平均占比近 80%。

张大伟团队基于转录组学数据<sup>[75]</sup>,挑选了不同类型的启动子序列,以绿色荧光蛋白为报告基因, $P_{43}$  启动子作为参比,获得了相比  $P_{43}$  启动子强度范围在 0.002 3–4.530 0 倍的 84 个启动子元件。利用筛选到的强启动子  $P_{lmQ}$ ,实现了  $\alpha$ -淀粉酶的高效分泌表达,其表达水平比用  $P_{43}$  启动子提高了 2 倍<sup>[76]</sup>。针对异源蛋白表达易形成包涵体的问题,该团队设计构建了过表达分子伴侣和转运蛋白组分的工程菌株,利用该工程菌株使淀粉酶的表达水平提高了 2.2 倍<sup>[77-78]</sup>。此外,天津工业生物所张以恒团队开发出一套具有普遍适用性的枯草芽胞杆菌 T7 表达系统,为异源蛋白质的胞内高效表达提供了新策略和工具。该系统遗传操作简单、蛋白表达高效、适宜高密度发酵。在 5 L 发酵罐中进行补料分批发酵,肌醇单磷酸酶产量高达 4.78 g/L<sup>[79]</sup>。

信号肽直接影响蛋白的分泌效率,张大伟团队对枯草芽胞杆菌 Sec 和 Tat 途径 (图 1) 的

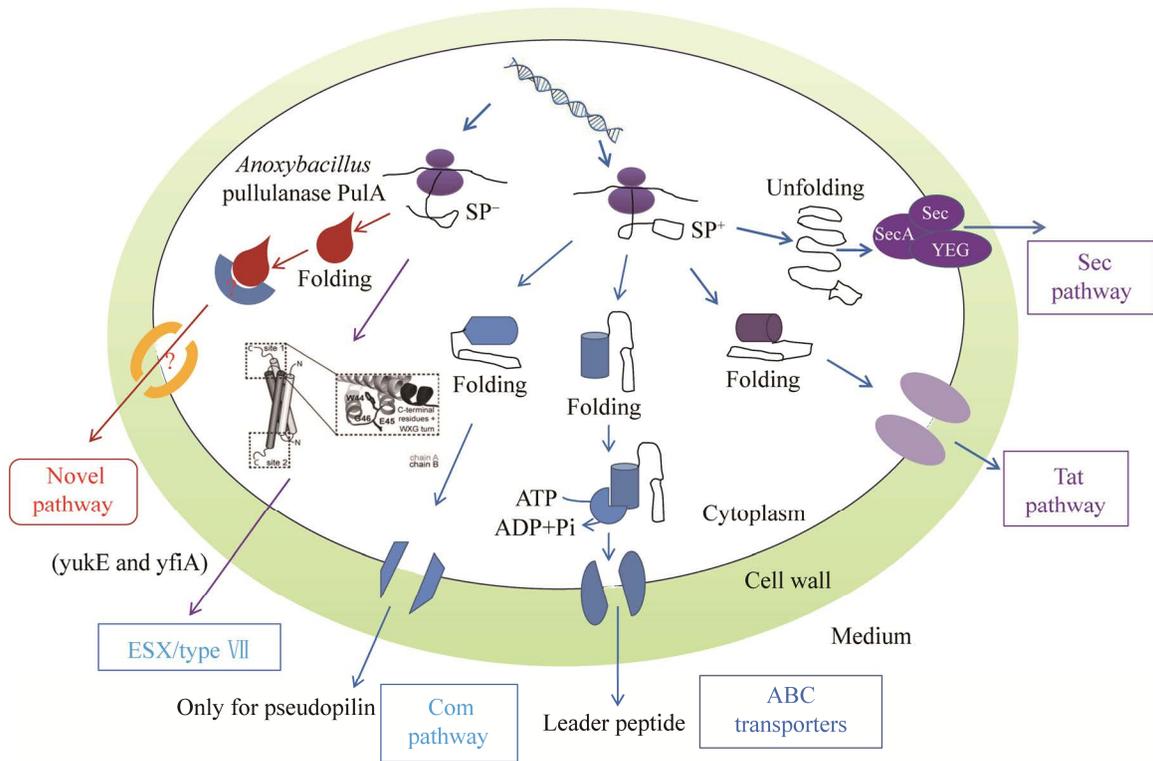


图 1 枯草芽胞杆菌蛋白分泌系统示意图

Figure 1 Schematic diagram of protein secretion system of *Bacillus subtilis*.

信号肽序列进行了筛选。结果表明,  $SP_{pel}$ 、 $SP_{ywmC}$ 、 $SP_{dacB}$  等 5 个信号肽序列的分泌人成纤维生长因子 12 的效率优于大肠杆菌来源的信号肽  $pelB$ , 其中  $SP_{dacB}$  的分泌效率提升了 30%<sup>[77]</sup>。此外, 张大伟团队建立了针对来源于嗜热芽胞杆菌的高温淀粉酶  $AmyS$  的高库容信号肽文库, 获得了 15 个与野生型信号肽相比明显提高的信号肽序列。利用筛选的高分泌信号肽实现了淀粉酶  $AmyS$  的高效分泌表达, 酶活水平达到了 5 086 U/mL<sup>[80]</sup>。

非典型蛋白分泌途径是一种不依赖已知的或可预测的信号肽进行介导的分泌途径 (图 1), 目前, 对非典型蛋白分泌途径的研究越来越受重视。研究发现瘤胃球菌属 (*Ruminococcus* sp.) 来源的 D-阿洛酮糖-3-异构酶 (*Ruminococcus* sp. D-psicose 3-epimerase, RDPE) 具有非典型分泌

效应, 应用 RDPE 作为分泌介导蛋白, 实现了蛋白的大量表达和分泌<sup>[81]</sup>。分析发现, RDPE 在胞内形成完整的四聚体才可引导绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 分泌。对枯草芽胞杆菌中的 12 种内源非典型分泌蛋白的结构进行研究, 发现其中 10 种蛋白在胞内外以多聚体形式存在, 且聚集在细胞的两极及隔膜区域<sup>[82]</sup>。宋诒等也发现了来源于 *Anoxybacillus* sp. LM18-11 的普鲁兰酶  $PulA$  在枯草芽胞杆菌中的分泌是通过不依赖信号肽的非典型分泌途径实现, 其在枯草芽胞杆菌中最高分泌率可达 98%。分析该蛋白的非典型分泌机制, 发现了关键调控氨基酸位点, 通过对关键氨基酸的组合突变使该酶的胞外表达量提高了 1.71 倍, 胞外分泌率提高了 34.72%<sup>[83]</sup>。利用  $PulA$  的 N 端结构域 CBM68, 创建了新型外源蛋白分泌表达

分子工具,实现了多种酶蛋白在枯草芽胞杆菌中的高效分泌表达<sup>[84]</sup>。

与枯草芽胞杆菌模式菌株相比,地衣芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌显示了更强的蛋白分泌和生产能力,且细胞生长速率快,生物发酵密度高,是理想的工业生产菌株,已广泛用于蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等重要工业酶制剂的生产。然而,这两种菌普遍存在遗传操作困难,分子工具严重匮乏的技术瓶颈。宋诒团队构建了芽胞杆菌质粒种间转移系统,利用内切核酸酶基因 *mazF* 作为负筛选标记,成功将松弛型质粒 pBE980 和严谨型质粒 pHT43 从枯草芽胞杆菌 168 中转移到地衣芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌和巨大芽胞杆菌中。该转化方法操作简便,为难以进行常规分子操作的野生型芽胞杆菌菌株提供了较理想的转化方案<sup>[85]</sup>。同时,该团队构建了一套高拷贝数、高稳定性的 pUC980 系列穿梭质粒,以及基于规律间隔成簇短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 的基因表达调控系统,通过敲除菌株自身产芽胞基因,利用高稳定性高拷贝质粒表达,再结合 dCas9- $\omega$  因子融合蛋白加强基因的转录水平,将中温  $\alpha$ -淀粉酶表达量提高到初始菌株的 5.9 倍<sup>[86-87]</sup>。

### 4.3 酵母表达系统

酵母表达系统是近年来发展最快的高效异源蛋白表达系统,已有 5 000 多种重组蛋白、70 种商业产品和治疗药物在各种酵母中实现了表达。以毕赤酵母和克鲁维酵母为代表的表达系统拥有高效的分泌机制和翻译后修饰能力。尤其是毕赤酵母,可在廉价的培养条件下高密度生长,表达蛋白能高效分泌到培养基中,还可进行高等真核生物典型的蛋白质加工和翻译后修饰,如糖基化和二硫键形成等,且没有细菌系统中常见的包涵体和内毒素问题<sup>[88-90]</sup>,特

别适合真核生物体来源的重组蛋白的大规模工业化生产,是最有发展前景和商业价值的表达系统之一。

毕赤酵母在基于乙醛氧化酶 1 (aldehyde oxidase 1, AOX1) 启动子表达外源蛋白的过程中,通常利用甲醇作为唯一的碳源和诱导物进行生长和蛋白表达。然而,使用甲醇的主要缺陷是分解代谢产生有毒代谢物<sup>[91]</sup>,需要高耗氧量<sup>[92]</sup>,以及甲醇高度易燃带来的安全隐患等。使用山梨糖醇替代甲醇作为生物质和能量来源,相比 100%甲醇, $\beta$ -半乳糖苷酶活性提高了 10.3%<sup>[93]</sup>。利用甘油做共培养物,在 5 L 生物反应器中开发了组合  $\mu$ -stat (恒定指数进料速率) 和 m-stat (恒定甲醇浓度) 发酵策略,表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶的产量达到 403 mg/L,分别比  $\mu$ -stat 和 m-stat 模式下的表达高 2.6 倍和 4.4 倍<sup>[94]</sup>。

蛋白质 Hac1 是参与未折叠蛋白质应答 (unfolded protein response, UPR) 的转录调节因子,研究发现 Hac1 可促进蛋白质折叠所需的内质网驻留蛋白以及分泌途径组分的合成,进而促进异源蛋白的表达<sup>[95-101]</sup>。Huang 等在插入 6 个  $P_{AOX1}$  驱动的 *Hac1* 拷贝后,淀粉酶表达量从 305 U/mL 提高到 2 200 U/mL;使用  $P_{GAP}$  组成型启动子调节 *Hac1* 的表达,淀粉酶活性增加到 3 700 U/mL<sup>[101]</sup>。

密码子优化是提高外源基因在毕赤酵母中表达的重要手段。经过密码子优化及启动子替换,将黑曲霉来源的内聚半乳糖醛酸酶在毕赤酵母中的表达水平提高了 4 倍<sup>[102]</sup>。宋诒团队将编码稀有密码子 CCG 的 tRNA 基因转入毕赤酵母,带有稀有密码子的外源基因表达量提高了 21.3%<sup>[103]</sup>。另外,改善蛋白质折叠和分泌是提高外源蛋白表达量的重要环节,通过共表达内质网二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase 1, Pdi1) 及分子伴侣 Kar2 等,可显著提高异源

蛋白表达水平。Sellada 等通过共表达 Kar2, 使疏水蛋白 (Hfbi) 的表达量提高了 22 倍<sup>[104-105]</sup>。宋诒团队研究发现伴侣蛋白 Rpl10 可使 Lip605 表达量提高 46.8%, 在 10 L 发酵罐上, 胞外脂肪酶活力达到 680 U/mL, 蛋白浓度达 15.89 g/L<sup>[106]</sup>。

#### 4.4 丝状真菌表达系统

天津工业生物所田朝光团队多年来一直致力于丝状真菌高效表达系统的研究, 建立了独具风格的关键技术体系, 团队以嗜热丝状真菌-嗜热毁丝霉为宿主菌株, 应用来源于口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 的 2A 肽系统, 构建了 FMDV 2A 肽介导的多顺反子共表达技术系统<sup>[107-108]</sup>。研究结果表明 2A 肽在嗜热毁丝霉中表现出了良好的切割效率, 高效共表达来源于异宗毁丝霉和埃默森篮状菌的糖化酶和绿色荧光蛋白, 糖化酶基因的拷贝数高达 12 个拷贝。通过嗜热毁丝霉 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术体系<sup>[109]</sup>, 结合在嗜热毁丝霉中对淀粉响应转录组的系统分析<sup>[110]</sup>, 对糖化酶分泌途径进行遗传重构, 获得了五基因突变菌株 M5 和六基因突变菌株 MtYM6, 其中六基因突变的重组菌株 MtYM6, 其蛋白产量比野生型高约 17.3 倍, 其糖化酶活力比野生型提高约 25.1 倍, 发酵液对可溶性淀粉的水解效果显著优于野生型发酵液, 成功构建了嗜热毁丝霉糖化酶高效生产的表达体系<sup>[111]</sup>。同时, 田朝光团队从现有糖化酶工业生产菌——黑曲霉菌种入手, 结合组学分析和计算模型, 表征了糖化酶工业菌种酶系关键组分的酶学性质, 系统解析了淀粉糖化过程中核心组分及酶系组分间的协同关系<sup>[112]</sup>。该团队以现有工业菌种为出发体系, 建立了工业菌种高效的遗传操作体系、CRISPR-Cas9 介导的工业菌种基因组编辑技术<sup>[113]</sup>和免平板操作的菌株工程改造方法<sup>[114]</sup>, 系统筛选了工业菌种蛋白合成分泌途径的 30 个关键元件, 鉴定出了

显著调控糖化酶高效合成分泌的 4 个核心元件<sup>[115-116]</sup>, 在基因组水平改造重构了糖化酶合成分泌途径, 成功创建了发酵水平显著提升的新一代糖化酶工业菌种, 其糖化酶活力达到 21 万单位, 比出发菌种显著提升了 32%。

## 5 绿色生物工艺典型案例

### 5.1 基于多酶协同反应的绿色酶法体外合成

体外多酶分子机器是一个全新生物制造平台, 不依赖于微生物细胞工厂, 突破传统生物发酵生产方式的局限, 具有简单、快速、可控性强、生物安全、绿色制造等特点<sup>[117]</sup>。肌醇 (维生素 B8) 是人、动物和植物生长的必需维生素, 广泛应用于医药、食品、饲料和化妆品等行业。为了解决传统肌醇生产方法中能耗高、污染大、原料来源有限等问题, 越来越多的科学家开始探索多酶催化体系合成肌醇的研究。天津工业生物所体外合成生物学中心首创多酶体系催化淀粉生产肌醇的绿色生产工艺, 实现了从 0-1 和 1-100 的全过程技术突破, 是全球唯一体外合生物学生产大宗生化产品的工业化范例<sup>[118]</sup>。同时, 该团队建立了低成本胞内重组酶生产平台和低成本酶固定化技术平台。随后, 日本京都大学 Haruyuki Atomi 教授构建了相似的多酶体系生产肌醇, 通过添加辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>) 循环利用可以实现较高转化率合成肌醇<sup>[119]</sup>。除此之外, 中国科学院微生物研究所陶勇研究组构建了一个包含多聚磷酸葡萄糖激酶、1-磷酸肌醇合成酶和肌醇单磷酸化酶的三酶级联反应体系, 实现了由葡萄糖和多聚磷酸合成肌醇<sup>[120]</sup>。截至目前, 天津工业生物所多酶催化合成肌醇的工业化生产与传统生产路线相比, 可降低能耗 98%, 减少磷污染 99%, 降低生产成本 75%, 扩大肌醇生产原料来源 10 000 倍。同时, 低成本肌醇的

生产又将大大扩展其应用场景,从现有主流维生素和动物饲料添加应用扩展到更多新应用,如锂电池电解液组分、高爆炸药前体、植物叶面肥等等。该肌醇技术合作方四川博浩达生物技术有限公司已建成万吨级绿色生物制造生产线,现在该公司成为全球最大的肌醇生产企业,实现新增利税超过5亿元。

## 5.2 基于菌株改造的多糖绿色生物合成

普鲁兰多糖是出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 产生的胞外水溶性黏质多糖<sup>[121]</sup>。其具有高黏性、水溶性、安全性、保水性、成型性及低消化性等特点,是重要的食品品质改良剂、增稠剂和低热量食品添加剂<sup>[122]</sup>。同时,基于普鲁兰多糖良好的成膜性和阻氧性,可作为药物胶囊材料,其性质优于常用胶囊材料;再结合其生物相容性、无免疫原性、降解产物无毒、降解速度可控、可成型等特性,也可开发为药物载体、组织工程支架以及3D打印生物墨水等;其作为化妆品保湿增稠剂应用,价格远低于类似效果的透明质酸。

普鲁兰多糖作为直链高分子聚合物,其分子量及分布是影响多糖性质的重要参数。高分子量普鲁兰多糖在材料应用方面,特别是高附加值医用材料应用开发方面具有显著的优势<sup>[123]</sup>。此外,高分子量普鲁兰多糖可以显著提高溶液黏度,较低的添加量即可达到需求。因此,生产高分子量的普鲁兰多糖可以提升产品的品质或者降低使用的成本。天津工业生物所柏文琴团队通过菌株筛选和改造,获得可以高效合成高分子量普鲁兰多糖的出芽短梗霉 BL80,多糖平均分子量高达 3.3 MDa,其多糖产量、产率及底物转化率都优于现有菌株,且该菌株发酵过程不产黑色素,有利于简化后期的纯化工艺,降低生产成本<sup>[124]</sup>。在食品添加方面,使用量为现有商品化普鲁兰多糖的 1/10 时,可达到相同的黏

度及稳定性,节约生产及应用成本。基于该菌株生产的高分子量普鲁兰多糖,柏文琴团队开发了一种新型高度形变的形状记忆材料,并实现了普鲁兰多糖的4D打印<sup>[125]</sup>。这项工作基于绿色低碳低成本合成的微生物多糖,制备了可编程为复杂结构的形状记忆材料,在微创植入、药物缓释和可穿戴设备等医用材料方面具有巨大的应用前景。中低分子量普鲁兰多糖可用于胶囊制备、食品保鲜及3D打印生物墨水方面。柏文琴团队通过菌株改造获得高产中分子量普鲁兰多糖菌株,多糖产量高达 129 g/L。该中分子量普鲁兰多糖在食品保鲜和胶囊制备方面展现出极大的应用优势。此外,基于中分子量普鲁兰多糖制备的生物墨水可以通过数字光处理技术进行3D打印,具有良好的打印能力和形状保持效果。

目前的研究尚未完全解析普鲁兰多糖的合成途径,缺乏分子量的精确控制机制。通过组分分析发现,脂质中间体在合成途径中发挥重要作用<sup>[126]</sup>。研究发现  $\alpha$ -葡聚糖合成酶 2 ( $\alpha$ -glucan synthetase 2, AGS2) 是普鲁兰多糖合成途径中的关键酶<sup>[127]</sup>。氨基酸保守序列分析显示 AGS2 包含 3 个保守结构域:糖原合酶结构域 (structural domain)、胞外多糖转运结构域 (EPST\_D) 和  $\alpha$ -淀粉酶结构域 (Amy\_D)。推测 Gys\_D 负责催化  $\alpha$ -1,4-葡萄糖链形成;EPST\_D 负责普鲁兰多糖前体转运;Amy\_D 负责前体  $\alpha$ -1,4-糖苷键的水解,释放麦芽三糖重复单元,并将其转移到糖脂分子 Lph-G 上形成  $\alpha$ -1,6-糖苷键。此外,研究发现尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶 1 (uridine diphosphate glucosyltransferase 1, UGT1) 对于普鲁兰多糖的合成也起重要作用<sup>[128]</sup>。目前,柏文琴团队基于组学分析和实验验证,发现参与普鲁兰多糖合成途径中的新型糖苷水解酶与糖基转移酶,对于普鲁兰多糖分子量有重要的影响。

普鲁兰多糖优异的性质使其在食品、医药、轻工、化工和石油等领域具有重要的应用前景,然而由于产量低造成生产成本高的问题,以及分子量不可控的问题是限制普鲁兰多糖广泛应用的关键因素。因此阐明整个普鲁兰多糖合成途径以及分子量调控的具体机制,对于通过代谢工程改造提高产量及精确控制分子量具有重要的指导意义,对于推动普鲁兰多糖的广泛应用具有重要意义。

### 5.3 基于新型菌/酶筛选的霉菌毒素绿色生物降解

霉菌毒素是霉菌或其他真菌分泌的有毒有害的次级代谢产物。食用被霉菌毒素污染的饲料会影响动物免疫机能,降低生产能力,甚至造成严重的公共卫生问题。全球每年约有 25% 的农作物受到不同程度霉菌毒素污染,霉菌毒素污染已成为限制饲料业和养殖业发展的重要因素之一。以美国和加拿大为例,霉菌毒素的污染使家畜业和饲料业每年损失约 50 亿美元。我国每年因饲料霉变导致的直接经济损失也高达 100 亿元,特别是长江以南地区,由于气候较为潮湿,饲料霉变情况更为严重。

为防止霉菌毒素对畜牧业的损害,人们陆续开发出多种物理和化学手段来吸附或降解饲料中的霉菌毒素。目前市场上广泛使用吸附法来去除饲料中的霉菌毒素,但吸附剂往往不能选择性地吸附毒素,同时会导致其他营养物质的流失。此外,排出体外的毒素也会造成二次污染。相对而言,生物脱毒法利用菌或酶在温和条件下特异性地降解霉菌毒素,不使用有害的化学试剂,无营养物质的流失,被认为是最佳的脱毒方法。开发高效的霉菌毒素降解酶,是解决霉菌毒素污染问题、挽回饲料业和畜牧业巨大损失的重要手段。

目前,威胁人和动物体的健康安全的霉菌

代谢物多达 300 余种,其中,黄曲霉毒素(aflatoxin, AFT)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)、呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)、伏马毒素(fumonisin, FB)以及赭曲霉毒素(ochratoxins, OT)等是对人和动物危害最大的几种霉菌毒素。ZEN 和 DON 作为污染范围最大的霉菌毒素,广泛存在于包括玉米、小麦、大麦、高粱、燕麦等多种粮食作物中,且在霉变谷物中的污染现象尤为严重,对世界范围内的粮食及谷物副产品生产造成严重影响。

郑迎迎等开发的新型 ZEN 水解酶 RmZHD 具有相对 ZHD101 更高的应用潜力。同时,经过分子改造的 RmZHD 大大提高了对 ZEN 高毒性衍生物  $\alpha$ -ZOL 的降解活性,对 RmZHD 在饲料工业的应用,实现玉米赤霉烯酮及其衍生物的完全脱毒具有重要的意义<sup>[41]</sup>。同时,宋谈团队从自然界中分离出一株芽胞杆菌 Y816,在 2 h 内对 ZEN 的降解效率达到 100%,转化为一种新的无毒或低毒产物 ZEN-14-phosphate。并成功从该芽胞杆菌中挖掘出一种具有 ZEN 磷酸化作用的新型磷酸转移酶(zearalenone phosphotransferase, ZPH)。这是一种新的 ZEN 转化模式,也是首次精准揭示了芽胞杆菌属对 ZEN 的解毒机制<sup>[129]</sup>。

DON 的环氧基团被认为是最主要的毒性基团,去环氧生成 DOM-1 也被认为是最有效的降解方式。虽然已经发现一些微生物具有催化 DON 为 DOM-1 的能力,但是并未挖掘到其中的关键酶。因此,挖掘具有 DON 环氧键水解能力的环氧水解酶对于 DON 脱毒研究具有重要意义。环氧水解酶类广泛存在于自然界中,具有将环氧键水解成二醇的能力,环氧键的开环可以大大降低 DON 的毒性,满足脱毒降毒的目的。因此,无需辅酶、性质良好、应用范围广泛的新型环氧水解酶的挖掘和研究在 DON 脱

毒研究领域中具有重要意义。

#### 5.4 酶法绿色生物工艺替代传统化学污染工艺

纺织工业是我国传统型支柱产业,在我国轻工业中具有重要的经济地位和雄厚的产业基础,但也是污染重、能耗高、耗水量大的产业。由于在退浆、煮炼、氧漂和丝光等染前处理过程中应用大量烧碱和助剂等化学制剂,传统纺织行业耗费了大量水和能源,并严重污染了环境。目前,我国单位织物能耗为世界平均水平的 2.4 倍。如生产 10 000 m 棉织物需耗水 300 t;处理过程温度为 95–100 °C,能耗占全工艺的 45%;其产生的废水碱性强、化学需氧量高、可生化性低。这些问题严重制约了我国传统纺织工业的发展,甚至导致部分大型传统纺织企业停产。推动纺织产业转型升级,实现节能减排、绿色发展刻不容缓。在此背景上,宋诤研究员带领团队开展了新酶制剂与绿色生物纺织工艺研发工作,历时 3 年的科技攻关,从基因挖掘筛选、蛋白定向分子改造以及表达载体构建等上游的基础研究开始,累积获得了大量性质优良的纺织酶资源和高效表达系统,成功开发出催化效率高、专一性好、性质优良的系列纺织酶制剂,包括淀粉酶、碱性果胶酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶和过氧化氢酶等,重点解决了生物酶在纺织工业应用中性质不稳定、工艺兼容性不好、效率低、应用成本高等难题<sup>[58,64-65]</sup>。在此基础上,团队通过酶-酶、酶-助剂复配技术,开发出专门适用于纺织染前处理的复合酶制剂新产品<sup>[130-131]</sup>,并开发了配套的环保酶法纺织染前处理工艺<sup>[131-132]</sup>。随着纺织染前处理复合酶制剂产品的不断升级换代,技术指标也得到了逐级提升,据企业实测,与传统工艺对比,可为企业节能 20%–30%,废水 COD 值降低 50%以上,产品性能提高了 20%,降低成本 10%–15%。

每年可为企业增加百万元的效益,并且对印染污水的有效处理起到积极作用,为企业乃至纺织领域的新旧动能转换起到了极大的推动作用<sup>[131]</sup>。

明胶是胶原的水解产物,广泛用于医药、食品、纺织、化工、电子、造纸和印刷等 30 多个行业,化学制备法一直是明胶生产的传统工艺。传统上,国内骨明胶企业多建于中西部地区,这些地区原材料、水资源等相对能够满足明胶企业的需求。但随着国家经济发展和对环境保护的重视,明胶企业被认定为耗水、耗能和污染大户,企业生存压力巨大。宋诤团队开发了酶法明胶专用蛋白酶,通过构建毕赤酵母表达系统实现了该酶的高效表达,发酵酶活达到 10 000 U/mL 以上,大大降低了应用成本,在此基础上开发了酶法明胶制备工艺,将传统工艺 60–90 d 周期缩短为 5–7 d,减少了 90%以上的淡水消耗量,降低能源和酸碱用量 30%以上,冻力达到国家药用明胶一级品标准,总得率达到 15% (骨重) 左右,高于传统碱法工艺 (12%–14%),技术经济指标达到国际领先水平。

#### 5.5 生物菌剂处理高浓度油泥及资源回收的绿色新工艺

随着经济的发展,石油需求量逐年增加,开采力度逐年加大,石油造成的污染问题也日益严重。研究表明,石油开采、贮藏和炼制过程中产生的油泥和废水是石油污染的主要来源之一。我国石油行业年产含油污泥 600 万 t 以上,加上往年的存量污泥,总量在 1 000 万 t 以上<sup>[133]</sup>,影响到周边农田耕种和空气、水体质量,而本源微生物修复能力弱,随着时间的推移,污染物质不断累积,土壤自我修复能力会进一步下降和丧失,如果不采取及时有效的治理和修复手段,会造成重度石油污染。

现有的物理化学修复技术很难完全达到修复要求,石油回收工艺又具有效率慢,二次污

染严重等问题。与化学、物理方法相比,生物方法绿色环保、操作简便,投入产出比高,对人和环境造成的影响很小,无二次污染<sup>[134]</sup>。目前国内外对土壤石油烃类回收的生物工艺往往在实验室中具有很好的效果,一旦应用在现场情况复杂、生物生存条件恶劣的环境中则效果较差。其原因主要有以下几点:一是环境条件恶劣,污染土壤和废水呈盐碱性,严重超出生物生长范围;二是修复和治理工艺不够成熟,效果不明显;三是采用的微生物菌剂环境适应性差。如何提高修复微生物的生存竞争能力,提高处理效率和菌剂定植能力是回收石油烃能否成功的关键。

国内进行含油污泥处理技术研发和工程应用的企业很多,工艺涵盖了热洗、热解、萃取、焚烧、固化填埋、机械和化学分离、生物乳化和生物降解等。张玮等利用一种离子液体、生物基活性物质组成的碱性分离剂处理油泥,分离后泥沙含油率降低至 0.32%<sup>[135]</sup>,刘关平等利用解脂假丝酵母 Y-57 和恶臭假单胞菌 P-101 协同处理含油污泥,经曝气生物反应后,干污泥含油量低于 2%,残留污泥中含油量低于 0.3%<sup>[136]</sup>,王永亮通过外援菌与土著菌联合处理的工艺技术,通过室内小试及现场中试,实现油泥无害化并达到国家标准的排放要求<sup>[137]</sup>。使用生物法处理含油污泥企业主要有胜利油田、辽河油田、长庆油田和新疆油田<sup>[138]</sup>,目前技术瓶颈主要包括菌剂定殖效率低,修复周期长,同时高浓度含油土壤和油泥中的石油烃回收效率低,主要是因为菌剂对石油的乳化效果差或乳化稳定性不好。

天津工业生物所黄志勇团队从环境中筛选到一株高产生物乳化剂菌-地芽胞杆菌 XS2,通过诱变育种提高了菌株活性,得到一株乳化活性更高,乳化效率更稳定的突变株 XS2-450。该菌株

所产乳化剂具备极强的环境适应能力(温度范围:30–100 °C, pH 2.0–12.0, 盐度:0–25%)<sup>[139]</sup>,对原油乳化效率( $E_{24}$ )达到 68%,对液体石蜡、甲苯等乳化效果达到 100%。同时,该团队构建了 1 000 株以上胶质沥青质降解菌、稠油降黏菌和石油烃降解菌等活性菌株的小型菌种资源库,可以根据不同污染类型、不同处理目的和不同石油组分比例复配针对性脱油菌剂。

该团队通过高效乳化剂-生物表面活性剂产生菌配伍组合,获得了针对不同石油烃含量、不同黏度和胶质沥青质含量的油泥乳化降解处理复合菌群,通过高密度发酵制备高活性复合功能菌剂,用于处理黏度为 10 000–45 000 MPa·s 的重度稠油污染土壤。复合菌剂可生长繁殖循环利用,具有成本低、无溶剂残留、无废弃物、无废气污染等优势,油泥在处理过程中的乳化、降黏、脱油、石油烃降解采用温和条件培养的复合菌剂,环境耐受温度为 20–100 °C, pH 为 5.0–12.0, 盐度为 0–20%,同时结合耐热菌剂,使得该工艺段在处理高黏度油泥时达到了热洗和生物乳化双重效果,绿色环保,不产生其他难降解物质,也无常规煅烧法生成的烟尘污染和溶剂洗涤产生的溶剂二次污染,同时菌剂活性代谢产物与细胞繁殖代谢共同作用,稠油乳化分散效果好,乳化油可回收利用,污泥种类、泥沙含量及采油助剂对处理效果影响小。该工艺分别应用于天津大港油田高盐碱石油污染土壤和蓬莱中海油钻井废弃泥浆的修复处理,修复后的土地基本恢复了植物生长和土壤耕作能力<sup>[139]</sup>。

## 6 总结与展望

随着高通量筛选、蛋白结构解析、生物信息学以及基因组编辑等先进生物技术的不断发展,不断缩短新型酶制剂研发周期,高性能低成本的酶制剂产品的迭代升级有可能从根本上

重塑传统加工工艺流程。从酶的设计和改造,到酶的高效表达,再到酶的应用领域拓展,基于工业酶的绿色生物制造能力将得到极大的提升。我们有理由相信随着工业酶与绿色生物制造领域优秀人才的不断增加和努力,绿色生物制造领域的原创成果将会不断涌现,以工业酶颠覆性关键技术突破,支撑绿色生物工艺产业的快速成长,助力传统加工产业的绿色发展。

## REFERENCES

- [1] Al-Ghanayem AA, Joseph B. Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. *Appl Microbiol Biot*, 2020, 104(7): 2871-2882.
- [2] 赵琳, 宋瑞瑞, 吴希, 等. 工业酶制剂的发展与应用研究. *应用化工*, 2021, 50(5): 1403-1408, 1413. Zhao L, Song RR, Wu X, et al. Study on development and application of industrial enzyme preparation. *Appl Chem Ind*, 2021, 50(5): 1403-1408, 1413 (in Chinese).
- [3] 周银华. 食品工业中酶制剂的应用探讨. *中外食品工业*, 2021(5): 3-4. Zhou YH. Application of enzyme preparation in food industry. *Global food industry*, 2021(5): 3-4 (in Chinese).
- [4] Choi JM, Han SS, Kim HS. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(7): 1443-1454.
- [5] Victorino Da Silva Amatto I, Gonsales Da Rosa-Garzon N, Antônio De Oliveira Simões F, et al. Enzyme engineering and its industrial applications. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(2): 389-409.
- [6] Deckers M, Vanneste K, Winand R, et al. Screening strategy targeting the presence of food enzyme-producing fungi in food enzyme preparations. *Food Control*, 2020, 117: 107295.
- [7] Ton Nu MA, Blaabjerg K, Poulsen HD. Effects of high moisture airtight storage of barley with exogenous enzymes on phosphorus digestibility of barley fed to pigs alone or in combination with soybean meal. *Anim Feed Sci Tech*, 2020, 266: 114530.
- [8] Jujjavarapu SE, Dhagat S. Evolutionary trends in industrial production of  $\alpha$ -amylase. *Recent Pat Biotechnol*, 2019, 13(1): 4-18.
- [9] Biškauskaitė R, Valeikienė V, Valeika V. Enzymes for leather processing: effect on pickling and chroming. *Materials (Basel)*, 2021, 14(6): 1480.
- [10] Rahman M, Hack-Polay D, Billah MM, et al. Bio-based textile processing through the application of enzymes for environmental sustainability. *Int J Technol Manag Sustain Dev*, 2020, 19(1): 87-106.
- [11] Singh G, Arya SK. Utility of laccase in pulp and paper industry: a progressive step towards the green technology. *Int J Biol Macromol*, 2019, 134: 1070-1084.
- [12] Nazor J, Liu J, Huisman G. Enzyme evolution for industrial biocatalytic cascades. *Curr Opin Biotechnol*, 2021, 69: 182-190.
- [13] Fernández-Lucas J. New trends in industrial biocatalysis. *Biotechnol Adv*, 2021, 51: 107782.
- [14] Mor B, Garhwal S, Kumar A. A systematic review of hidden Markov models and their applications. *Arch Comput Method E*, 2021, 28(3): 1429-1448.
- [15] Raichstein E, Lavi O, Azulai O. Computerized method for automatic cloning of python conda environment into docker image and for deployment of docker image, involves starting conda container from docker image and conda container is configured to function same as python conda environment: US, 2021208862-A1, US, 11157257-B2.
- [16] Bowman EK, Alper HS. Microdroplet-assisted screening of biomolecule production for metabolic engineering applications. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(7): 701-714.
- [17] Sarnaik A, Liu A, Nielsen D, et al. High-throughput screening for efficient microbial biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 64: 141-150.
- [18] 杨建花, 苏晓岚, 朱蕾蕾. 高通量筛选系统在定向改造中的新进展. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2197-2210. Yang JH, Su XL, Zhu LL. Advances of high-throughput screening system in reengineering of biological entities. *Chin J Biotech*, 2021, 37(7): 2197-2210 (in Chinese).
- [19] Packer MS, Liu DR. Methods for the directed evolution of proteins. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(7): 379-394.
- [20] Zeng WZ, Guo LK, Xu S, et al. High-throughput screening technology in industrial biotechnology. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(8): 888-906.
- [21] Yang JH, Tu R, Yuan HL, et al. Recent advances in droplet microfluidics for enzyme and cell factory engineering. *Crit Rev Biotechnol*, 2021, 41(7): 1023-1045.

- [22] Bouzetos E, Ganar KA, Mastrobattista E, et al. (R)evolution-on-a-chip. *Trends Biotechnol*, 2022, 40(1): 60-76.
- [23] 涂然, 李世新, 李昊霓, 等. 液滴微流控技术在微生物工程菌株选育中的应用进展. *合成生物学*, 2022, 3: 1-21.  
Tu R, Li SX, Li HN, et al. Advances and applications of droplet-based microfluidics in evolution and screening of engineered microbial strains. *Synth Biol J*, 2022, 3: 1-21 (in Chinese).
- [24] Tu R, Li LP, Yuan HL, et al. Biosensor-enabled droplet microfluidic system for the rapid screening of 3-dehydroshikimic acid produced in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biot*, 2020, 47(12): 1155-1160.
- [25] Yuan HL, Tu R, Tong XW, et al. Ultrahigh-throughput screening of industrial enzyme-producing strains by droplet-based microfluidic system. *J Ind Microbiol Biot*, 2022, 49(3): kuac007.
- [26] 吕彤, 涂然, 袁会领, 等. 毕赤酵母液滴微流控高通量筛选方法的建立与应用. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1317-1325.  
Lv T, Tu R, Yuan HL, et al. Development and application of a droplet-based microfluidic high-throughput screening of *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2019, 35(7): 1317-1325 (in Chinese).
- [27] Tu R, Zhang Y, Hua EB, et al. Droplet-based microfluidic platform for high-throughput screening of *Streptomyces*. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 647.
- [28] He RL, Ding RH, Heyman JA, et al. Ultra-high-throughput picoliter-droplet microfluidics screening of the industrial cellulase-producing filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Ind Microbiol Biot*, 2019, 46(11): 1603-1610.
- [29] Yuan HL, Zhou Y, Lin YP, et al. Microfluidic screening and genomic mutation identification for enhancing cellulase production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Biofuels Bioprod*, 2022, 15(1): 50.
- [30] Qiao YX, Zhao XY, Zhu J, et al. Fluorescence-activated droplet sorting of lipolytic microorganisms using a compact optical system. *Lab Chip*, 2018, 18(1): 190-196.
- [31] Hua EB, Zhang Y, Yun KY, et al. Whole-cell biosensor and producer co-cultivation-based microfluidic platform for screening *Saccharopolyspora erythraea* with hyper erythromycin production. *ACS Synth Biol*, 2022, 11(8): 2697-2708.
- [32] Ding RH, Hung KC, Mitra A, et al. Rapid isolation of antigen-specific B-cells using droplet microfluidics. *RSC Adv*, 2020, 10(45): 27006-27013.
- [33] Li LP, Tu R, Song GT, et al. Development of a synthetic 3-dehydroshikimate biosensor in *Escherichia coli* for metabolite monitoring and genetic screening. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(2): 297-306.
- [34] Mei ZL, Zhang K, Qu G, et al. High-throughput fluorescence assay for ketone detection and its applications in enzyme mining and protein engineering. *ACS Omega*, 2020, 5(23): 13588-13594.
- [35] Han X, Liu W, Huang JW, et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nat Commun*, 2017, 8: 2106.
- [36] 陈纯琪, 韩旭, 刘卫东, 等. 基于结构改造来源于大阪伊德氏杆菌 201-F6 的 PET 水解酶. *生物工程学报*, 2021, 37(9): 3268-3275.  
Chen CQ, Han X, Liu WD, et al. Structure-based engineering of PET hydrolase from *Ideonella sakaiensis*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(9): 3268-3275 (in Chinese).
- [37] Chen CC, Han X, Li X, et al. General features to enhance enzymatic activity of poly(ethylene terephthalate) hydrolysis. *Nat Catal*, 2021, 4(5): 425-430.
- [38] Cui YL, Chen YC, Liu XY, et al. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy. *ACS Catal*, 2021, 11(3): 1340-1350.
- [39] Lu HY, Diaz DJ, Czarnecki NJ, et al. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature*, 2022, 604(7907): 662-667.
- [40] Zeng W, Li XQ, Yang YY, et al. Substrate-binding mode of a thermophilic PET hydrolase and engineering the enzyme to enhance the hydrolytic efficacy. *ACS Catal*, 2022, 12(5): 3033-3040.
- [41] Zheng YY, Liu WT, Chen CC, et al. Crystal structure of a mycoestrogen-detoxifying lactonase from *Rhinochadiella mackenziei*: molecular insight into ZHD substrate selectivity. *ACS Catal*, 2018, 8: 4294-4298.
- [42] Xu JY, Ren FF, Huang CH, et al. Functional and structural studies of pullulanase from *Anoxybacillus* sp. LM18-11. *Proteins Struct Funct Bioinform*, 2014, 82(9): 1685-1693.
- [43] 甄杰, 胡政, 李树芳, 等. 一个新型耐热普鲁兰酶的结构与功能. *生物工程学报*, 2014, 30(1): 119-128.  
Zhen J, Hu Z, Li SF, et al. Structure and function of a novel thermostable pullulanase. *Chin J Biotech*, 2014, 30(1): 119-128 (in Chinese).
- [44] Zeng Y, Zheng HC, Shen YY, et al. Identification and

- analysis of binding residues in the CBM68 of pullulanase PulaA from *Anoxybacillus* sp. LM18-11. *J Biosci Bioeng*, 2019, 127(1): 8-15.
- [45] 曾艳, 郑宏臣, 付晓平, 等. 普鲁兰酶 N 端结构域 CBM68 对酶学性质的影响. *南开大学学报(自然科学版)*, 2018, 51(4): 93-99.  
Zeng Y, Zheng HC, Fu XP, et al. Effect of the N-terminal domain CBM68 on the enzymatic properties of pullulanase. *Acta Sci Nat Univ Nankaiensis*, 2018, 51(4): 93-99 (in Chinese).
- [46] 申莹莹, 郑宏臣, 李树芳, 等. 耐热普鲁兰酶 CBM68 结构域中关键位点对其酶学性质的影响. *食品与发酵工业*, 2016, 42(3): 12-17.  
Shen YY, Zheng HC, Li SF, et al. Key amino acid sites in the CBM68 structure of thermostable pullulanase and their effects on the enzymatic properties. *Food Ferment Ind*, 2016, 42(3): 12-17 (in Chinese).
- [47] Zeng Y, Xu JY, Fu XP, et al. Effects of different carbohydrate-binding modules on the enzymatic properties of pullulanase. *Int J Biol Macromol*, 2019, 137: 973-981.
- [48] Li SF, Xu JY, Bao YJ, et al. Structure and sequence analysis-based engineering of pullulanase from *Anoxybacillus* sp. LM18-11 for improved thermostability. *J Biotechnol*, 2015, 210: 8-14.
- [49] Zeymer C, Hilvert D. Directed evolution of protein catalysts. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 131-157.
- [50] Wang YJ, Xue P, Cao MF, et al. Directed evolution: methodologies and applications. *Chem Rev*, 2021, 121(20): 12384-12444.
- [51] Cheng F, Yang JH, Bocola M, et al. Loop engineering reveals the importance of active-site-decorating loops and gating residue in substrate affinity modulation of arginine deiminase (an anti-tumor enzyme). *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 499(2): 233-238.
- [52] Cheng F, Yang JH, Schwaneberg U, et al. Rational surface engineering of an arginine deiminase (an antitumor enzyme) for increased PEGylation efficiency. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(9): 2156-2166.
- [53] Frauenkron-Machedjou VJ, Fulton A, Zhao J, et al. Exploring the full natural diversity of single amino acid exchange reveals that 40–60% of BSLA positions improve organic solvents resistance. *Bioresour Bioprocess*, 2018, 5(1): 1-12.
- [54] Markel U, Zhu LL, Frauenkron-Machedjou V, et al. Are directed evolution approaches efficient in exploring nature's potential to stabilize a lipase in organic cosolvents? *Catalysts*, 2017, 7(5): 142.
- [55] Nie ZH, Liu P, Wang Y, et al. Directed evolution and rational design of mechanosensitive channel MscCG2 for improved glutamate excretion efficiency. *J Agr Food Chem*, 2021, 69(51): 15660-15669.
- [56] Cheng C, Haider J, Liu P, et al. Engineered LPMO significantly boosting cellulase-catalyzed depolymerization of cellulose. *J Agr Food Chem*, 2020, 68(51):15257-15266.
- [57] Shu WJ, Zheng HC, Fu XP, et al. Enhanced heterologous production of glycosyltransferase UGT76G1 by co-expression of endogenous *pppD* and *malK* in *Escherichia coli* and its transglycosylation application in production of rebaudioside. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5752.
- [58] Yu ZX, Zheng HC, Zhao XY, et al. High level extracellular production of a recombinant alkaline catalase in *E. coli* BL21 under ethanol stress and its application in hydrogen peroxide removal after cotton fabrics bleaching. *Bioresource Technol*, 2016, 214: 303-310.
- [59] Zheng HC, Yu ZX, Shu WJ, et al. Ethanol effects on the overexpression of heterologous catalase in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Appl Microbiol Biot*, 2019, 103(3): 1441-1453.
- [60] Zheng HC, Shu WJ, Fu XP, et al. A pyruvate-centered metabolic regulation mechanism for the enhanced expression of exogenous genes in *Escherichia coli*. *Int J Biol Macromol*, 2022, 203: 58-66.
- [61] 付晓平, 郑宏臣, 宋诒, 等. 一种生物鲁棒性提高的大肠杆菌底盘细胞及其构建方法与应用: 中国专利, 202010661070.7, 2020-07-10.  
Fu XP, Zheng HC, Song H, et al. An *Escherichia coli* chassis cell with improved biological robustness and its construction method and application: China patent, 202010661070.7, 2020-07-10 (in Chinese).
- [62] Zheng HC, Yu ZX, Fu XP, et al. High level extracellular production of a truncated alkaline  $\beta$ -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Escherichia coli* by the optimization of induction condition and fed-batch fermentation. *J Ind Microbiol Biot*, 2016, 43(7): 977-987.
- [63] Zhen J, Tan M, Fu XP, et al. High-level extracellular production of an alkaline pectate lyase in *E. coli* BL21(DE3) and its application in bioscouring of cotton fabric. *3 Biotech*, 2020, 10(2): 49.
- [64] Shi LX, Liu HF, Gao SF, et al. Enhanced extracellular production of *IsPETase* in *Escherichia coli* via engineering of the *pelB* signal peptide. *J Agr Food*

- Chem, 2021, 69(7): 2245-2252.
- [65] Phan TTP, Tran LT, Schumann W, et al. Development of Pgrac100-based expression vectors allowing high protein production levels in *Bacillus subtilis* and relatively low basal expression in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 72.
- [66] Bongers RS, Veening JW, van Wieringen M, et al. Development and characterization of a subtilin-regulated expression system in *Bacillus subtilis*: strict control of gene expression by addition of subtilin. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(12): 8818-8824.
- [67] Chen JQ, Zhu YM, Fu G, et al. High-level intra- and extra-cellular production of D-psicose 3-epimerase via a modified xylose-inducible expression system in *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biot*, 2016, 43(11): 1577-1591.
- [68] Wenzel M, Müller A, Siemann-Herzberg M, et al. Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(18): 6419-6425.
- [69] Guan CR, Cui WJ, Cheng JT, et al. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact*, 2015, 14(1): 150.
- [70] Toymentseva AA, Schrecke K, Sharipova MR, et al. The LIKE system, a novel protein expression toolbox for *Bacillus subtilis* based on the *lial* promoter. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 143.
- [71] Thuy le AT, Schumann W. A novel cold-inducible expression system for *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif*, 2007, 53(2): 264-269.
- [72] Welsch N, Homuth G, Schweder T. Stepwise optimization of a low-temperature *Bacillus subtilis* expression system for “difficult to express” proteins. *Appl Microbiol Biot*, 2015, 99(15): 6363-6376.
- [73] Castillo-Hair SM, Fujita M, Igoshin OA, et al. An engineered *B. subtilis* inducible promoter system with over 10 000-fold dynamic range. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(7): 1673-1678.
- [74] Fu G, Yue J, Li DD, et al. An operator-based expression toolkit for *Bacillus subtilis* enables fine-tuning of gene expression and biosynthetic pathway regulation. *PNAS*, 2022, 119(11): e2119980119.
- [75] Nicolas P, Mäder U, Dervyn E, et al. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science*, 2012, 335(6072): 1103-1106.
- [76] Song YF, Nikoloff JM, Fu G, et al. Promoter screening from *Bacillus subtilis* in various conditions hunting for synthetic biology and industrial applications. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158447.
- [77] Li DD, Fu G, Tu R, et al. High-efficiency expression and secretion of human FGF21 in *Bacillus subtilis* by intercalation of a mini-cistron cassette and combinatorial optimization of cell regulatory components. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 17.
- [78] Chen JQ, Fu G, Gai YM, et al. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 92.
- [79] Ye J, Li YJ, Bai YQ, et al. A facile and robust T7-promoter-based high-expression of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Bioresour Bioprocess*, 2022, 9(1): 1-12.
- [80] Fu G, Liu JL, Li JS, et al. Systematic screening of optimal signal peptides for secretory production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *J Agr Food Chem*, 2018, 66(50): 13141-13151.
- [81] Chen JQ, Zhao LQ, Fu G, et al. A novel strategy for protein production using non-classical secretion pathway in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 69.
- [82] Zhao L, Chen J, Sun J, et al. Multimer recognition and secretion by the non-classical secretion pathway in *Bacillus subtilis*. *Sci Reports*, 2017, 7: 44023.
- [83] Zhen J, Zheng HC, Zhao XY, et al. Regulate the hydrophobic motif to enhance the non-classical secretory expression of pullulanase PulaA in *Bacillus subtilis*. *Int J Biol Macromol*, 2021, 193(Pt A): 238-246.
- [84] 付晓平, 郑宏臣, 宋诙, 等. 碳水化合物结合结构域 CBM68 及其应用: 中国专利, 202110923682.3, 2021-08-12.  
Fu XP, Zheng HC, Song H, et al. Carbohydrate binding domain CBM68 and application thereof: China patent, 202110923682.3, 2021-08-12 (in Chinese).
- [85] Zhao XY, Xu JY, Tan M, et al. Construction of a plasmid interspecific transfer system in *Bacillus* species with the counter-selectable marker *mazF*. *J Ind Microbiol Biot*, 2018, 45(6): 417-428.
- [86] Zhao XY, Xu JY, Tan M, et al. High copy number and highly stable *Escherichia coli*-*Bacillus subtilis* shuttle plasmids based on pWB980. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 25.

- [87] Zhao XY, Zheng HC, Zhen J, et al. Multiplex genetic engineering improves endogenous expression of mesophilic  $\alpha$ -amylase gene in a wild strain *Bacillus amyloliquefaciens* 205. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165(Pt A): 609-618.
- [88] Heisting L, Gasser B, Mattanovich D. Microbe profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*. *Microbiology (Reading)*, 2020, 166(7): 614-616.
- [89] Burgard J, Grünwald-Gruber C, Altmann F, et al. The secretome of *Pichia pastoris* in fed-batch cultivations is largely independent of the carbon source but changes quantitatively over cultivation time. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(2): 479-494.
- [90] Raschmanová H, Weninger A, Knejzlík Z, et al. Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: enhancing production of secreted recombinant proteins. *Appl Microbiol Biot*, 2021, 105(11): 4397-4414.
- [91] Wang YY, Li JW, Zhao FG, et al. Methanol oxidase from *Hansenula polymorpha* shows activity in peroxisome-deficient *Pichia pastoris*. *Biochem Eng J*, 2022, 180: 108369.
- [92] Carly F, Niu H, Delvigne F, et al. Influence of methanol/sorbitol co-feeding rate on pAOX1 induction in a *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> strain in bioreactor with limited oxygen transfer rate. *J Ind Microbiol Biot*, 2016, 43(4): 517-523.
- [93] Niu HX, Jost L, Pirlot N, et al. A quantitative study of methanol/sorbitol co-feeding process of a *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup>/pAOX1-lacZ strain. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 33.
- [94] Liu WC, Xiang HB, Zhang T, et al. Development of a new high-cell density fermentation strategy for enhanced production of a fungus  $\beta$ -glucosidase in *Pichia pastoris*. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1988.
- [95] Bankefa OE, Wang MY, Zhu TC, et al. Hac1p homologues from higher eukaryotes can improve the secretion of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(7): 1149-1156.
- [96] Guerfal M, Ryckaert S, Jacobs PP, et al. The *HAC1* gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 49.
- [97] Sun J, Jiang J, Zhai XY, et al. Coexpression of Kex2 endoprotease and Hac1 transcription factor to improve the secretory expression of bovine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2019, 24(6): 934-941.
- [98] De Waele S, Vandenberghe I, Laukens B, et al. Optimized expression of the *Starmerella bombicola* lactone esterase in *Pichia pastoris* through temperature adaptation, codon-optimization and co-expression with HAC1. *Protein Expr Purif*, 2018, 143: 62-70.
- [99] Han MH, Wang WX, Zhou JL, et al. Activation of the unfolded protein response via co-expression of the *HAC1i* gene enhances expression of recombinant elastase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2020, 25(2): 302-307.
- [100] Yu SJ, Miao LT, Huang H, et al. High-level production of glucose oxidase in *Pichia pastoris*: effects of *Hac1p* overexpression on cell physiology and enzyme expression. *Enzyme Microb Tech*, 2020, 141: 109671.
- [101] Huang MM, Gao YY, Zhou XS, et al. Regulating unfolded protein response activator HAC1p for production of thermostable raw-starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylase in *Pichia pastoris*. *Bioproc Biosyst Eng*, 2017, 40(3): 341-350.
- [102] Karaođlan M, Erden-Karaođlan F. Effect of codon optimization and promoter choice on recombinant endo-polygalacturonase production in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Tech*, 2020, 139: 109589.
- [103] 彭梦, 谭明, 曾艳, 等. 毕赤酵母中 tRNA<sub>CCG</sub><sup>Pro</sup> 基因的表达及其作用效果. *生物工程学报*, 2019, 35(1): 70-80.
- Peng M, Tan M, Zeng Y, et al. Expression of *Pichia pastoris* tRNA<sub>CCG</sub><sup>Pro</sup> and its function. *Chin J Biotech*, 2019, 35(1): 70-80 (in Chinese).
- [104] Yu Y, Liu ZM, Chen M, et al. Enhancing the expression of recombinant  $\kappa$ -carrageenase in *Pichia pastoris* using dual promoters, co-expressing chaperones and transcription factors. *Biocatal Biotransfor*, 2020, 38(2): 104-113.
- [105] Sallada ND, Harkins LE, Berger BW. Effect of gene copy number and chaperone coexpression on recombinant hydrophobin HFBI biosurfactant production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(8): 2029-2040.
- [106] 马红丽, 付晓平, 郑雯, 等. 费希尔曲霉脂肪酶在毕赤酵母中的优化表达及高密度发酵. *微生物学通报*, 2020, 47(7): 2140-2150.
- Ma HL, Fu XP, Zheng W, et al. Optimized expression and high-density fermentation of *Aspergillus fischeri* lipase in *Pichia pastoris*. *Microbiol China*, 2020, 47(7): 2140-2150 (in Chinese).

- [107] Li FY, Liu Q, Li XL, et al. Construction of a new thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* platform for enzyme production using a versatile 2A peptide strategy combined with efficient CRISPR-Cas9 system. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(7): 1181-1191.
- [108] 田朝光, 刘倩, 李芳雅, 等. 一种毁丝霉糖化酶 MhglaA 及其编码基因和在葡萄糖生产中的应用: 中国专利, CN111378674B, 2021-07-21.  
Tian CG, Liu Q, Li FY, et al. A *Trichoderma glycosylase* MhglaA, its encoding gene and application thereof in glucose production: China patent, CN111378674B, 2021-07-21 (in Chinese).
- [109] Liu Q, Gao RR, Li JG, et al. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 1.
- [110] Xu GB, Li JG, Liu Q, et al. Transcriptional analysis of *Myceliophthora thermophila* on soluble starch and role of regulator AmyR on polysaccharide degradation. *Bioresour Technol*, 2018, 265: 558-562.
- [111] Yang YJ, Liu Y, Liu DD, et al. Development of a flow cytometry-based plating-free system for strain engineering in industrial fungi. *Appl Microbiol Biot*, 2022, 106(2): 713-727.
- [112] Guo WZ, Yang JH, Huang TC, et al. Synergistic effects of multiple enzymes from industrial *Aspergillus niger* strain O1 on starch saccharification. *Biotechnol Biofuels*, 2021, 14(1): 225.
- [113] 田朝光, 李金根, 顾淑莹, 等. 一种调控 sgRNA 转录的启动子、表达载体, 及其基因组编辑系统和应用: CN110331146A, 2019-10-15.  
Tian CG, Li JG, Gu SY, et al. Promoter and expression vector for adjusting and controlling sgRNA transcription, genome editing system and application: CN110331146A, 2019-10-15 (in Chinese).
- [114] 田朝光, 王兴吉, 刘倩, 等. 一种基于流式细胞术的免平板操作的菌株工程改造的方法及应用: 中国专利, 202111352181.0, 2021-11-16.  
Tian CG, Wang XJ, Liu Q, et al. A method and application of strain engineering without plate manipulation based on flow cytometry: China patent, 202111352181.0, 2021-11-16 (in Chinese).
- [115] 马延和, 王兴吉, 田朝光, 等. 一种提高丝状真菌蛋白分泌水平的方法: CN114686509A, 2022-07-01.  
Ma YH, Wang XJ, Tian CG, et al. A method for increasing the secretion level of filamentous fungal proteins: CN114686509A, 2022-07-01 (in Chinese).
- [116] 马延和, 田朝光, 王兴吉, 等. 一种提升丝状真菌蛋白分泌能力的方法: 中国专利, 202111602844.X, 2021-12-25.  
Ma YH, Tian CG, Wang XJ, et al. A method for promoting the secretion level of filamentous fungal proteins: China patent, 202111602844.X, 2021-12-25 (in Chinese).
- [117] Zhang YHP, Sun JB, Ma YH. *Biomanufacturing: history and perspective*. *J Ind Microbiol Biot*, 2017, 44(4/5): 773-784.
- [118] You C, Shi T, Li YJ, et al. An *in vitro* synthetic biology platform for the industrial biomanufacturing of myo-inositol from starch. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(8): 1855-1864.
- [119] Fujisawa T, Fujinaga S, Atomi H. An *in vitro* enzyme system for the production of myo-inositol from starch. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(16): e00550-17.
- [120] Lu YP, Wang L, Teng F, et al. Production of myoinositol from glucose by a novel trienzymatic cascade of polyphosphate glucokinase, inositol 1-phosphate synthase and inositol monophosphatase. *Enzyme Microb Tech*, 2018, 112: 1-5.
- [121] Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. Downstream processing and characterization of pullulan from a novel colour variant strain of *Aureobasidium pullulans* FB-1. *Carbohydr Polym*, 2009, 78(1): 89-94.
- [122] Prajapati VD, Jani GK, Khanda SM. Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydr Polym*, 2013, 95(1): 540-549.
- [123] An JM, Shahriar SMS, Hasan MN, et al. Carboxymethyl cellulose, pluronic, and pullulan-based compositions efficiently enhance antiadhesion and tissue regeneration properties without using any drug molecules. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(14): 15992-16006.
- [124] 马延和, 柏文琴, 陈淑宇, 等. 一株高产高分子量普鲁兰多糖的出芽短梗霉及其应用: 中国专利, 202210480946.7, 2022-05-05.  
Ma YH, Bai WQ, Chen SY, et al. A production strain of pullulan with high molecular weight and high yield and application thereof: China patent, 202210480946.7, 2022-05-05.
- [125] Feng ZX, Chen SY, Ahmad A, et al. Ultra-high molecular weight pullulan-based material with high deformability and shape-memory properties. *Carbohydr Polym*, 2022, 295: 119836.
- [126] Catley BJ, McDowell W. Lipid-linked saccharides formed during pullulan biosynthesis in *Aureobasidium*

- pullulans*. Carbohydr Res, 1982, 103(1): 65-75.
- [127] Chen TJ, Liu GL, Wei X, et al. A multidomain  $\alpha$ -glucan synthetase 2 (AmAgs2) is the key enzyme for pullulan biosynthesis in *Aureobasidium melanogenum* P16. Int J Biol Macromol, 2020, 150: 1037-1045.
- [128] Chen X, Wang QQ, Liu NN, et al. A glycosyltransferase gene responsible for pullulan biosynthesis in *Aureobasidium melanogenum* P16. Int J Biol Macromol, 2017, 95: 539-549.
- [129] Yang SB, Zheng HC, Xu JY, et al. New biotransformation mode of zearalenone identified in *Bacillus subtilis* Y816 revealing a novel ZEN conjugate. J Agr Food Chem, 2021, 69(26): 7409-7419.
- [130] 郑宏臣, 谭明, 宋诤, 等. 一种纺织用生物复合酶制剂及其制备方法和应用: CN105970633B, 2018-07-03. Zheng HC, Tan M, Song H, et al. The invention relates to a biocomplex enzyme preparation for textile use, preparation method and application thereof: CN105970633B, 2018-07-03 (in Chinese).
- [131] 宋富佳. 生物酶前处理工艺助力印染行业绿色发展——天津工生所生物纺织酶技术成果发布会在河北宁纺集团召开. 纺织导报, 2016(8): 24. Song FJ. Biological enzyme pretreatment technology helps the green development of textile industry—technical achievements conference was held in Hebei Ningfang group company for enzymatic textile technology developed by Tianjin institute of industrial biotechnology, CAS. China Textile Leader, 2016(8): 24 (in Chinese).
- [132] 宋诤, 谭明, 郑宏臣, 等. 一种纺织品生物酶前处理方法: CN105970632B, 2018-09-07. Song H, Tan M, Zheng HC, et al. The invention relates to a textile bio-enzymatic pretreatment method: CN105970632B, 2018-09-07 (in Chinese).
- [133] 韩旭. 储运油泥水油渣界面作用特性与分离机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016. Han X. Study on interfacial property on oil recovery from petroleum sludge[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016 (in Chinese).
- [134] 薛广海, 李强, 刘庆, 等. 典型油泥物化性质分析及其处理工艺研究. 矿冶, 2020, 29(1): 94-100. Xue GH, Li Q, Liu Q, et al. Physicochemical properties analysis and treatment process study of typical oil contaminated soil. Min Metall, 2020, 29(1): 94-100 (in Chinese).
- [135] 张玮, 卜涛, 负军贤, 等. 一种碱性分离剂及在污油泥处理中的应用: CN201910571556.9, 2021-08-27. Zhang W, Bu T, Yun, JX, et al. The invention relates to an alkaline separating agent and its application in the treatment of oily sludge: CN201910571556.9, 2021-08-27 (in Chinese).
- [136] 刘关平, 王鹏, 杜郭君. 一种微生物处理油泥工艺: CN 20121080830, 2014-12-07. Liu GP, Wang P, Du GJ. The invention relates to a microbial sludge treatment process: CN 20121080830, 2014-12-07 (in Chinese).
- [137] 张峰. 长庆油田: 微生物处理油泥技术规模化应用见成效. 石油知识, 2017(6): 23-24. Zhang F. Changqing oilfield: the large-scale application of microbial sludge treatment technology has achieved results. Petroleum Knowl, 2017(6): 23-24 (in Chinese).
- [138] 王永亮. 生物技术处理油泥及资源化利用的试验研究. 石化技术, 2022, 29(4): 69-72. Wang YL. Experimental study on sludge treatment and resource utilization by biotechnology. Petrochem Ind Technol, 2022, 29(4): 69-72 (in Chinese).
- [139] 黄志勇, 王兴彪, 徐爽, 等. 高浓度油泥处理及资源回收生物绿色新工艺[EB/OL]. [2022-07-01]. 天津市科技成果: 中国科学院天津工业生物技术研究所. Huang ZY, Wang XB, Xu S, et al. New bio-green technology for high concentration sludge treatment and resource recovery[EB/OL]. [2022-07-01]. Scientific and technological achievements of Tianjin: Tianjin institute of industrial biotechnology, CAS (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)