

· 导 读 ·

本期主要选择玉米赤霉烯酮水解酶、聚羟基脂肪酸酯解聚酶、脂肪酶等酶的设计改造,谷胱甘肽和纤维寡糖的生物催化合成, L-缬氨酸、L-蛋氨酸、L-谷氨酸等氨基酸和 L-乳酸、丁二酸等有机酸以及酪醇、水杨酸葡萄糖苷等芳香族化合物的代谢工程,以及啤酒酵母线粒体自噬基因功能等研究论文进行导读。

霉菌毒素污染是全球畜牧业和食品工业面临的重大挑战,镰刀菌毒素——玉米赤霉烯酮就是其中的重要一种。来源于粉红螺旋聚孢霉的玉米赤霉烯酮水解酶(zearalenone hydrolase, ZHD) 101 能有效降解饲料中的玉米赤霉烯酮,但其最适温度为 37–45 °C, 50 °C 条件下基本失活,热稳定性需要提高。目前已经从进化信息、能量信息、结构信息等不同方面出发,开发了多种策略用于提高蛋白质的热稳定性,但是单一策略在改造效果方面仍存在局限。官媛林等^[1]首先通过对多个蛋白质的结构进行比对,筛选出 ZHD101 的结构灵活区域,进一步对灵活区域残基进行序列保守性分析和构象自由能计算,综合结构、进化和能量多方面信息,筛选获得潜在的提高热稳定性的突变文库,与野生型比较,两个突变体 S220R 和 S220W 的 T_m 分别提高了 5.6 °C 和 4.0 °C, 45 °C 条件下的热半失活时间分别延长了 15.4 倍和 3.1 倍,突变位点及其周围区域的相互作用力增强,表明结合蛋白质结构比对、序列分析和自由能计算的理性设计策略,可有效提高酶的热稳定性。

聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA) 是一种由微生物合成的可生物降解聚酯。PHA 在特定条件下可以降解,但降解速率比较慢,由此催生了对 PHA 解聚酶的需求。PHA 解聚酶广泛存在于微生物中,但大部分酶的最适温

度为 30–40 °C,极少数酶的最适温度为 50 °C,在高温环境下的稳定性较差,难以应用。李志刚等^[2]研究了一种来自短须嗜热单孢菌的 PHA 解聚酶的酶学性质,并通过二硫键理性设计,获得了热稳定性提升的突变体 A190C/V240C,其最适温度比野生型提高了 20 °C, 50 °C 条件下的半衰期比野生型提高了 20 倍, 50 °C 条件下聚羟基丁酸 (polyhydroxybutyrate, PHB) 12 h 的降解率是对照的近 4 倍,表明引入二硫键可以显著提高酶的热稳定性。

甘油二酯有 1,2-和 1,3-两种同分异构体,其中 1,3-甘油二酯由于具有较高的营养价值,是新型食品开发的热点。但是 1,2-甘油二酯和 1,3-甘油二酯这两种同分异构体的检测比较困难,脂肪酶特异催化油脂生成 1,3-甘油二酯的位置特异性机制也不清楚。马亚迪等^[3]模拟了脂肪酶与三油酸甘油酯的分子对接,分析底物的结合模型后挑选了 5 个突变位点,并利用超临界流体色谱方法筛选出 1,3-位置选择特异性较野生型提高 12% 的突变体,为进一步提高 1,3-甘油二酯的生物催化制备效率奠定了基础。

很多生物催化过程需要 ATP 提供能量,ATP 的廉价、可持续供给是决定这些生物合成过程成本的关键因素。多聚磷酸盐激酶能够以廉价的聚磷酸盐为底物,为消耗 ATP 的生化反应提供 ATP。高惠等^[4]对哈氏噬纤维菌来源的

多聚磷酸盐激酶的双底物通道腔进行了理性改造,以提高其催化活性。筛选得到的突变体其相对酶活提高了3倍多,底物利用范围扩大,耐热性与耐碱性提高。采用该多聚磷酸盐激酶的突变体与谷胱甘肽生物合成双功能酶耦合,在无细胞体系中添加5 mmol/L ATP的启动条件下,可产生45 mmol/L (14 g/L)的谷胱甘肽,L-半胱氨酸的转化率达到90%以上,表明了该ATP再生系统的有效性。

纤维寡糖(cello-oligosaccharide)是指由2-10个D-葡萄糖单体通过 β -1,4糖苷键连接形成的线性寡糖,被认为是一种新型的益生元,但以纤维素为原料直接制备纤维寡糖的收率较低。蔗糖磷酸化酶催化蔗糖可以生成葡萄糖-1-磷酸(G-1-P),作为纤维寡糖生产的糖基供体。G-1-P在纤维二糖磷酸化酶催化下,可脱去磷酸基团与葡萄糖缩合,生成纤维二糖。纤维寡糖磷酸化酶则能够将纤维二糖与G-1-P进一步聚合,生成聚合度 ≥ 3 的纤维寡糖,且聚合度与纤维寡糖磷酸化酶的活性密切相关。郑棚等^[5]在大肠杆菌中构建了蔗糖磷酸化酶-纤维二糖磷酸化酶-纤维寡糖磷酸化酶的级联催化路线,以葡萄糖和蔗糖为底物合成了97 g/L的纤维寡糖,聚合度为2-6,纯度为97%,且能够促进多种乳杆菌的生长,表明有可能利用廉价底物葡萄糖和蔗糖来高效生产高纯度纤维寡糖。

L-缬氨酸在医药、饲料领域具有广泛用途。近年来,科创板上市公司华恒生物率先采用厌氧发酵法工业化生产L-缬氨酸,为L-缬氨酸工业生产方式带来重大创新。赵阔等^[6]通过在谷氨酸棒杆菌中强化丙酮酸的供给、改造乙酰羟酸合酶以及改变乙酰羟酸还原异构酶和支链氨基酸转氨酶的辅因子偏好性,构建了L-缬氨酸的高效生产途径。在5 L罐中采用两阶段发酵策略,发酵48 h,L-缬氨酸的产量和得率分别

达到110 g/L和0.51 g/g的较高水平,具有较好的应用潜力。

L-蛋氨酸是四大饲料氨基酸之一,目前主要还是通过化学法生产。蛋氨酸、赖氨酸与苏氨酸同属天冬氨酸族氨基酸,但由于蛋氨酸是含硫氨基酸,且生物合成途径复杂,因此发酵法生产蛋氨酸挑战很大,目前文献报道的较高水平为17-18 g/L。蛋氨酸的生物合成主要包括3个模块:碳模块、硫模块和一碳模块,其中一碳模块决定了蛋氨酸分子上甲基的来源,对蛋氨酸的合成十分重要。张博等^[7]在大肠杆菌中过表达亚甲基四氢叶酸还原酶以及活性更高的丝氨酸羟甲基转移酶,增强了一碳模块甲基供体的生成;进而过表达了胱醚裂解酶和半胱氨酸内运基因,有效提高了L-高半胱氨酸和L-半胱氨酸的供应。最后获得的工程菌株在5 L罐中发酵60 h,可生产18 g/L的蛋氨酸,为进一步提高蛋氨酸发酵生产水平奠定了基础。

我国L-谷氨酸年产量近300万t,占全球的70%,目前L-谷氨酸的工业生产水平可以达到220 g/L。刘佳峰等^[8]等首先对一株能够产生近100 g/L谷氨酸的谷氨酸棒杆菌及其出发菌株进行转录组分析,进而敲除丙氨酸氨基转移酶降低副产物丙氨酸含量,弱化 α -酮戊二酸脱氢酶复合体活性、增加谷氨酸合成的前体、筛选高活性的谷氨酸脱氢酶来强化谷氨酸代谢流,并通过优化谷氨酸转运蛋白的结构促进谷氨酸外排,最后获得的工程菌株,其L-谷氨酸产量和得率较原始菌提高了40%和10%以上,为工业菌株的改造提供了新的参考。

在酸性条件下发酵生产有机酸,可以避免中性条件下发酵产生的盐对后处理工艺的压力。但大多数微生物对酸性环境的耐受性较差,因此提升产酸菌对酸性环境的耐受性是提高酸性条件下有机酸产量的关键。李静等^[9]对乳酸

产生菌凝结芽孢杆菌 DSM1 及其乳酸脱氢酶双敲除菌株进行比较转录组分析, 筛选出在发酵 12 h 和 24 h 转录水平显著增强的 4 个基因。其中, 过表达 *RS10595* 基因的菌株, 在 pH 4.6 的弱酸性条件下, 其乳酸产量比对照提高 5 倍; 但在 pH 6.0 的近中性条件下, 乳酸产量受到抑制。基因 *RS10595* 编码一个 ATP 转运家族蛋白, 其在弱酸性环境下显著提升乳酸产量的机制值得进一步探索。

丁二酸是聚丁二酸丁二醇酯(polybutylene succinate, PBS)的单体, 由于材料工业对生物基单体的追求, 生物基丁二酸的生产受到广泛重视。山东兰典已经率先实现了丁二酸的生物法生产, 科创板上市公司华恒生物也已经公告即将建设 5 万 t/年的生物法丁二酸生产能力。对大肠杆菌进行工程改造生产丁二酸, 核心是胞内 ATP 的充足供应和 NADH 的再平衡。王学明等^[10]通过减少 ATP 消耗、强化 ATP 合成、阻断 NADH 竞争途径和构建 NADH 回补路径等策略, 获得的大肠杆菌工程菌株在 1 m³ 中试罐中发酵 72 h, 可产生 140 g/L 丁二酸, 具有较好的应用潜力, 但其生产成本需结合得率数据进一步评价。

酪醇在医药、食品、化工领域具有广泛用途。其生物合成需引入外源酶催化 4-羟基苯丙酮酸生成酪醇的前体 4-羟基苯乙醛, 后者经醇脱氢酶还原后生成酪醇。由于酪醇对微生物生长的抑制作用, 目前发酵法生产酪醇的产量在 3–4 g/L。沈玉平等^[11]首先将苯丙酮酸脱羧酶突变体与醇脱氢酶融合表达在大肠杆菌中, 随后阻断 4-羟基苯乙酸竞争途径, 进而通过群体感应系统动态调控酪醇合成途径, 减轻酪醇对底盘细胞的毒性作用, 在 2 L 罐中酪醇产量达到 4.2 g/L, 为提高酪醇生物合成提供了一种新思路。

水杨酸和水杨酸葡萄糖苷都具有消炎止痛的作用, 但水杨酸葡萄糖苷的刺激性更小, 理论上也可以减少对细胞生长的抑制作用, 因此其生物合成受到关注。李若松等^[12]利用前期构建的高产 3-脱氢莽草酸大肠杆菌工程菌株, 引入铜绿假单胞菌的异分支酸裂解酶, 调控分支酸下游水杨酸代谢途径及不同芳香族氨基酸代谢途径关键基因的表达, 构建了水杨酸生产菌株。随后引入植物来源的水杨酸糖基转移酶, 获得了水杨酸葡萄糖苷的生产菌株, 5 L 发酵罐的产量达到 36.5 g/L, 是目前水杨酸葡萄糖苷发酵生产的最高水平。

线粒体是真核生物的“动力工厂”, 也是活性氧(reactive oxygen species, ROS)的主要来源。ROS 的积累会导致线粒体损伤, 受损或老化的线粒体则会被细胞选择性地清除, 即线粒体自噬。酿酒酵母的乙醇发酵过程虽然是在无氧条件下进行的, 但是生长过程一般需要有氧存在, 因此会产生 ROS, 也会诱导自噬的发生。程万琪等^[13]研究了酿酒酵母中 3 个与线粒体自噬相关基因的敲除和过表达对其抗氧化性能的影响, 发现缺失这些基因会导致线粒体损伤及细胞活力显著下降, 同时造成胞内 ROS 失衡; 而表达其中 2 个基因可以显著降低 ROS 含量, 并显著提高线粒体膜电位和 ATP 含量, 提示线粒体自噬基因可以作为调控酿酒酵母细胞抗氧化活性的潜在靶点。

REFERENCES

- [1] 官媛林, 张萌, 许菲. 结构指导的玉米赤霉烯酮水解酶的热稳定性改造[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3336-3350.
GUAN AL, ZHANG M, XU F. Structure-guided engineering for improving the thermal stability of zearalenone hydrolase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3336-3350 (in Chinese).
- [2] 李志刚, 陈世恒, 孔德民, 陈晟, 王蕾, 吴敬. 短须嗜

- 热单孢菌聚羟基脂肪酸酯解聚酶的表达、热稳定性改造及在 PHB 降解中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3351-3363.
- LI ZG, CHEN SH, KONG Dm, CHEN S, WANG L, WU J. Expression, thermal stability modification and application in PHB degradation of polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Thermomonospora umbrina*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3351-3363 (in Chinese).
- [3] 马亚迪, 尤翠萍, 张国强, 李江华, 堵国成. 基于半理性设计提高疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶催化特异性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3481-3493.
- MA YD, YOU CP, ZHANG GQ, LI JH, DU GC. Improving the position specificity of *Thermomyces lanuginosus* lipase based on semi-rational design[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3481-3493 (in Chinese).
- [4] 高惠, 王晴, 刘婷婷, 徐美娟, 饶志明. 多聚磷酸盐激酶双底物通道腔的理性设计及其在无细胞催化生产谷胱甘肽中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3318-3335.
- GAO H, WANG Q, LIU TT, XU MJ, RAO ZM. Rational design of polyphosphate kinase dual-substrate channel cavity for efficient production of glutathione by cell free catalysis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3318-3335 (in Chinese).
- [5] 郑棚, 王雷, 胡美荣, 魏华, 陶勇. 多酶级联反应合成能够促进肠道益生菌生长的纤维寡糖[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3406-3420.
- ZHENG P, WANG L, HU MR, WEI H, TAO Y. Synthesis of cello-oligosaccharides which promotes the growth of intestinal probiotics by multi-enzyme cascade reaction[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3406-3420 (in Chinese).
- [6] 赵阔, 程金宇, 郭亮, 高聪, 宋伟, 吴静, 刘佳, 柳亚迪, 刘立明, 陈修来. 谷氨酸棒杆菌代谢工程高效生产 L-缬氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3253-3272.
- ZHAO K, CHENG JY, GUO L, GAO C, SONG W, WU J, LIU J, LIU YD, LIU LM, CHEN XL. Highly efficient production of L-valine by multiplex metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3253-3272 (in Chinese).
- [7] 张博, 王莹, 牛坤, 柳志强, 郑裕国. 代谢工程改造大肠杆菌—碳模块高效合成 L-甲硫氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3302-3317.
- ZHANG B, WANG Y, NIU K, LIU ZQ, ZHENG YG. Efficient synthesis of L-methionine by engineering the one carbon module of *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3302-3317 (in Chinese).
- [8] 刘佳峰, 乔郅钠, 赵有玺, 徐美娟, 张显, 杨套伟, 饶志明. 理性代谢工程改造促进谷氨酸棒杆菌高效合成 L-谷氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3273-3289.
- LIU JF, QIAO ZN, ZHAO YX, XU MJ, ZHANG X, YANG TW, RAO ZM. Rational metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient synthesis of L-glutamate[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3273-3289 (in Chinese).
- [9] 李静, 王玉, 于波, 王丽敏, 鞠建松. 转运蛋白提高凝结芽孢杆菌酸耐受性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3394-3405.
- LI J, WANG Y, YU B, WANG LM, JU JS. Using transporter to enhance the acid tolerance of *Bacillus coagulans* DSM1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3394-3405 (in Chinese).
- [10] 王学明, 潘静宇, 吴静, 陈修来, 高聪, 宋伟, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 调控大肠杆菌胞内 ATP 和 NADH 水平促进琥珀酸生产[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3236-3252.
- WANG XM, PAN JY, WU J, CHEN XL, GAO C, SONG W, WEI WQ, LIU J, LIU LM. Regulation of intracellular level of ATP and NADH in *Escherichia coli* to promote succinic acid production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3236-3252 (in Chinese).
- [11] 沈玉平, 周紫微, 贺茜, 尹乐义, 何春兰, 张祖姣. 群体感应动态调控促进大肠杆菌合成酪醇[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3379-3393.
- SHEN YP, ZHOU ZW, HE X, YIN LY, HE CL, ZHANG ZJ. Dynamic regulation using a quorum-sensing circuit enhances the production of tyrosol by *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3379-3393 (in Chinese).
- [12] 李若松, 彭彦峰, 马龙, 王钦宏. 代谢工程改造大肠杆菌生产水杨酸葡萄糖苷[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3290-3301.
- LI RS, PENG YF, MA L, WANG QH. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salicylate 2-O- β -D-glucoside[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3290-3301 (in Chinese).
- [13] 程万琪, 侯骞尧, 刘春风, 钮成拓, 郑飞云, 李崎, 王金晶. 线粒体自噬基因对酿酒酵母抗氧化性能的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3464-3480.
- CHENG WQ, HOU QY, LIU CF, NIU CT, ZHENG FY, LI Q, WANG JJ. Effect of mitophagy related genes on the antioxidant properties of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3464-3480 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)