

· 导 读 ·

本期主要选择酶蛋白改造优化与在生物催化中的应用、微生物细胞工厂构建、底盘微生物开发和优化以及高价值生物基化学品生产等方面，特别是高效酶突变体获得、酿酒酵母合成生物学技术和包括人乳铁蛋白、 α -熊果苷、橘烯、半乳糖醇在内的多种活性产物生物合成等研究论文，以及人工智能辅助酶蛋白设计和微生物形态工程等相关综述进行导读。

赵心清 《生物工程学报》编委

(微生物代谢国家重点实验室 上海交通大学, 上海 200240)

酶蛋白改造和优化

天津农学院和中国科学院天津工业生物技术研究所的研究人员对环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glucosyltransferase, CGTase)进行了分子改造^[1]。CGTase 利用麦芽糊精为供体和以对苯二酚为受体，催化合成在化妆品和医药领域具有重要价值的 α -熊果苷。作者同时关注了提高催化活性和温度稳定性这两个方面，通过定点饱和突变和定点突变的方法，对来源于戈特沙尔克厌氧分支杆菌(*Anaerobranca gottschalkii*)的 CGTase 酶进行蛋白质工程改造，筛选得到了活性和稳定性提升的双突变体 AgCGTase-F235G-N166H, 其酶活力是野生型的 3.48 倍。进一步通过优化反应 pH、温度以及对苯二酚的添加量，在最优反应条件下催化合成 α -熊果苷产量为 15.4 g/L, 对苯二酚转化率达到 63%，取得了比较好的效果^[1]。作者利用同源建模与分子对接筛选获得了突变位点并推测了突变酶活性和高温稳定性提高的可能机理，相关研究结果为其他关键酶的蛋白工程改造提供了

借鉴。

现有酶分子的改造技术除了基于蛋白质工程技术的传统酶分子改造方法以外，人工智能辅助的数据驱动的酶分子改造方法引起了越来越多的关注。徐沛等综述了人工智能辅助的酶分子改造应用进展^[2]。目前基于机器学习，采用公开数据集的信息，已能成功预测蛋白质的多种性能，包括溶解度、功能、稳定性和结构等，但是酶分子改造需要借鉴酶活性的预测，从而挑选优良的突变体进行实验验证，目前存在的问题是可利用的数据少，而且不同数据的标准化缺乏也为预测带来了难度。为了解决这些挑战，酶分子改造可以从实验室定向进化或理性设计后对酶的改造特性实验中获取数据，包括实验中性能不佳的突变体阴性数据。为了得到充分的初始数据，研究人员利用各种方法生成新的数据，作者综述了利用机器学习和深度学习辅助酶分子改造的进展，重点是如何在样本量少的情况下提高预测模型的可靠性。高效酶不仅对通过酶转化生产代谢物至关重要，也是细胞工厂非常关键的优化内容，因此，未

来需要在构建高质量的酶数据库和开发高效的人工智能辅助设计技术方面加大研发力度, 获得高效酶和微生物菌株, 促进工业生物技术的商业化实际应用。

高效微生物细胞工厂

本期论文涉及的微生物细胞工厂包括芽孢杆菌^[3]、放线菌^[4]、蓝细菌^[5]、酿酒酵母^[6-7]和丝状真菌^[8]等。芽孢杆菌是生产多种蛋白的优良宿主, 江南大学研究者报道了利用芽孢杆菌胞外蛋白酶失活菌株 G601 生产人乳铁蛋白以及促进分泌的代谢工程策略, 包括优势启动子选择以及核糖体结合位点和信号肽的组合等经典的优化策略^[3]。*dlt* 操纵子(*dltA-dltE*)介导磷壁酸和脂磷壁酸的酯化反应, 降低细胞壁和周质空间的负电荷, 从而使细胞壁结合更多的阳离子折叠因子, 进而改善输出蛋白的易位后折叠。作者对细胞膜表面金属离子相关基因 *dltD* 进行了无义突变, 所获得的菌株中 G6dltD0 蛋白分泌得到了明显提高, 不同信号肽 SP_{bigc} 和 SP_{mpr} 引导的绿色荧光蛋白分泌量分别提升了 46.5% 和 118.5%, 最终构建的菌株乳糖蛋白分泌量达到 637.28 $\mu\text{g/L}$ ^[3]。该研究使用的策略可为利用芽孢杆菌生产其他蛋白提供借鉴。

浙江工商大学研究者对生产阿维拉霉素 (avilamycin, AVI) 的利用核糖体工程技术改造的高产突变菌株绿色产色链霉菌菌株 (*Streptomyces viridoehrongenes*) 77 的代谢组进行了研究, 比较了突变菌株和出发菌株胞内代谢的差异; 在 29 种胞内代谢物中发现 11 种为胞内差异代谢物, 进一步筛选出 6 种关键差异代谢物, 包括 L-缬氨酸、L-丝氨酸和 L-丙氨酸等氨基酸, 以及 D-半乳糖、D-纤维二糖和 D-葡

萄糖^[4]。微生物细胞工厂的代谢分析不仅阐释了高产菌株的机理, 也可为进一步理性设计高产菌株提供参考。未来还可以整合转录组、蛋白组和代谢组分析, 获得对代谢的动态调控和代谢物合成不同层次调控的更深刻的认知。

外源基因稳定表达的整合位点对提高菌株稳定性和调整基因表达剂量非常重要。华南理工大学研究者对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 基因组中的基因间隔区 (intergenic region, IGR) 进行了筛选^[6], 筛选主要根据以下特征: (1) 远离着丝粒两端各 20 kb; (2) 远离端粒内侧 10 kb; (3) IGR 的长度大于 5 000 bp, 从而减少对转录元件如启动子和终止子的影响^[6]。筛选结果获得了 16 个候选 IGRs, 所构建的重组菌株报告蛋白相对荧光强度差异是 1.91 倍, 并且表达稳定^[6]。该研究为其他微生物体系包括非常规酵母和丝状真菌等选择稳定的整合表达位点提供了新的方法。

丝状真菌在液体深层发酵过程中通常形成大小和疏松度不同的菌球, 而且菌丝的分支有可能影响生产性能。福建师范大学研究者重点对菌丝分支这一形态特征进行了综述^[8], 总结了木霉、曲霉和粗糙脉孢霉等关键丝状真菌的相关研究进展, 包括关键基因、营养情况以及过程工程参数等。形态发生影响到培养体系的流变特征和代谢相关基因的表达, 也影响生产性能。除了丝状真菌, 链霉菌作为重要的抗生素和天然产物生产细菌, 也存在丝状形态, 因此形态工程^[9]相关研究对具有菌丝形态的工业微生物具有重要的价值。值得指出的是, 酵母也存在丝状和絮凝颗粒等形态特征, 而且这些特征也影响菌株的生产性能和对环境胁迫的耐受性^[10-11]。未来更多围绕微生物形态发生相关

分子机理的研究结果, 将为工业生物技术应用提供更多有价值的信息。

微生物代谢产物生产

本期除了利用芽孢杆菌生产人乳铁蛋白以及促进分泌^[3]的研究论文, 还有通过优化整合位点利用酿酒酵母生产橘烯^[6]的研究报道, 此外, 还有利用酿酒酵母的全细胞催化^[7]生产半乳糖醇的研究报道, 通过酶基因的挖掘和比较, 获得了性能较好的来自黑曲霉的木糖还原酶, 在酿酒酵母中进行表达; 还对酿酒酵母宿主进行了改造, 敲除了分解利用半乳糖的半乳糖激酶基因, 半乳糖醇最高产量达到 12.1 g/L^[7]。

此外, 本期还包括氨基酸^[12]、2-苯乙醇^[13]和四氢嘧啶^[14]等产物生物合成和微生物生产方面的综述。随着功能基因组学、代谢工程和合成生物学的发展, 以及合成生物学和人工智能的逐步紧密结合, 有望能更有效地提高微生物生产燃料、生物基化学品和活性天然产物的效率, 降低生产成本, 提高我国绿色生物制造大规模产业化的效率。

REFERENCES

- [1] 刘嘉琦, 谭明, 董钧, 刘以银, 刘珊珊, 吴洽庆. 环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造及其在合成 α -熊果苷中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1845-1855. LIU JQ, TAN M, DONG J, LIU YY, LIU SS, WU QQ. Molecular modification of cyclodextrin glucosyltransferase and its application in the synthesis of α -arbutin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1845-1855 (in Chinese).
- [2] 徐沛, 汪卫华, 宁洪伟, 曹瑞芬, 刘胜, 范培锋, 宋小平. 人工智能辅助的酶分子改造应用进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1728-1741. XU P, WANG WH, NING HW, CAO RF, LIU S, FAN
- PF, SONG XP. Progress in the application of artificial intelligence-assisted molecular modification of enzymes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1728-1741 (in Chinese).
- [3] 张予婷, 李洋, 武耀康, 刘延峰, 李江华, 堵国成, 吕雪芹, 刘龙. 枯草芽孢杆菌中人乳铁蛋白的表达与分泌[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1895-1908. ZHANG YT, LI Y, WU YK, LIU YF, LI JH, DU GC, LV XQ, LIU L. The expression and secretion of human lactoferrin in *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1895-1908 (in Chinese).
- [4] 吴江雪, 刘华华, 陈敏, 徐俊辰, 季雯艳. 比较代谢组学分析阿维拉霉素高产突变株代谢途径[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1868-1881. WU JX, LIU HH, CHEN M, XU JC, JI WY. Comparative metabolomics analysis of metabolic pathways in the high-yielding mutant strain of avilamycin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1868-1881 (in Chinese).
- [5] 张婷, 孙绘梨, 齐凤霞, 毛绍名, 栾国栋, 吕雪峰. 嗜热蓝细菌高温适应机制及生物技术应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1752-1775. ZHANG T, SUN HL, QI FX, MAO SM, LUAN GD, LÜ XF. High-temperature adaptation mechanisms and biotechnological potentials of thermophilic cyanobacteria[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1752-1775 (in Chinese).
- [6] 陈东莹, 朱晁谊, 陈和锋, 周靖涛, 李爽. 酿酒酵母稳定整合位点鉴定及其在橘烯生物合成中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1924-1934. CHEN DY, ZHU CY, CHEN HF, ZHOU JT, LI S. Stable integration sites in *Saccharomyces cerevisiae*: identification and application in the biosynthesis of valencene[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1924-1934 (in Chinese).
- [7] 邓连妹, 李娇, 门燕, 孙媛霞, 贾士儒, 朱玥明. 酿酒酵母转化半乳糖醇的工程菌株构建及优化[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1909-1923. DENG LM, LI J, MEN Y, SUN YX, JIA SR, ZHU YM. Construction and culture condition optimization of a

- Saccharomyces cerevisiae* strain for production of galactitol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1909-1923 (in Chinese).
- [8] 孔维华, 尤文晋, 江贤章, 黄建忠, 秦丽娜. 菌丝形态发育: 丝状真菌细胞工厂遗传改造的新切入点[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1776-1791.
KONG WH, YOU WJ, JIANG XZ, HUANG JZ, QIN LN. Filamentous morphology: a new frontier for genetic modification of filamentous fungal cell factories[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1776-1791 (in Chinese).
- [9] LU Z, CHEN Z, LIU Y, HUA X, GAO C, LIU JJ. Morphological engineering of filamentous fungi: research progress and perspectives[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 34(6): 1-9.
- [10] LIU M, ZHANG J, YE J, QI Q, HOU J. Morphological and metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to increase β -carotene production[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(12): 3551-3560.
- [11] CHENG C, ZHANG M, XUE C, BAI F, ZHAO X. Development of stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains by metabolic engineering: new aspects from cell flocculation and zinc supplementation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123(2): 141-146.
- [12] 郭亮, 高熙, 张红霞. 氨基酸高产菌株创制的关键技术[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1711-1727.
GUO L, GAO X, ZHANG HX. Engineering of microorganisms for high production of amino acids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1711-1727 (in Chinese).
- [13] 李园子, 高靖怡, 王凤寰, 廖永红. 2-苯乙醇合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1694-1710.
LI YZ, GAO JY, WANG FH, LIAO YH. Advances in synthesis of 2-phenylethanol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1694-1710 (in Chinese).
- [14] 许慧娴, 陈永涛, 黄建忠, 陶勇, 柯崇榕, 杨欣伟. 四氢嘧啶生物合成及其关键酶生化特性研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1620-1643.
XU HX, CHEN YT, HUANG JZ, TAO Y, KE CR, YANG XW. Advances in ectoine biosynthesis and biochemical characteristics of key enzymes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1620-1643 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)