

# 后基因组时代的工业生物技术

张延平, 李寅

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

**摘要:** 简述了工业生物技术的发展背景和意义, 分析了基因组学和功能基因组学发展对工业生物技术的推动作用, 重点介绍了本期专刊发表的代谢工程、发酵工程以及工业酶与生物催化领域的 17 篇论文。

**关键词:** 工业生物技术, 代谢工程, 基因组学, 专刊

## Industrial biotechnology in the post-genomic era

Yanping Zhang, and Yin Li

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

**Abstract:** The background and the importance of developing industrial biotechnology were illustrated, followed by a brief analysis on the driving effect of genomics and functional genomics. Seventeen papers covering metabolic engineering, fermentation engineering, industrial enzymes and biocatalysis are published in this special issue. These papers were briefly introduced to show the most recent developments of industrial biotechnology.

**Keywords:** industrial biotechnology, metabolic engineering, genome, special issue

在 19–20 世纪, 基于化石资源的人类工业文明取得了辉煌成就, 极大地提高了人们的生产生活水平。但是由于其不可再生性及加工使用过程中的废弃物排放, 人类赖以生存和发展的化石资源正日益匮乏, 环境污染也日益加剧, 迫使我们必须寻求以可再生资源为原料, 环境友好、过程高效的新一代物质加工技术。工业生物技术因其绿色、可持续的特点, 已经成为世界各经济强国保障能源安全、环境质量和经济可持续发展的国家战略。美国、欧盟、日本等都制定了雄心勃勃的战略目标和重大行动计划, 以加速发展低碳、清洁、高效的工业生物制造技术。OECD 报告认为: “工业生物技术是工业可持续发展最有希望的技术”。

工业生物技术 (Industrial biotechnology) 是指以微生物或酶为催化剂进行物质转化, 大规模生产人类所需的化学品、医药、能源、材料等产品的生物技术。由于其关键技术的快速发展和在化石基产品替代方面的卓越表现, 工业生物技术已成为现代生物技术发展的第 3 次浪潮, 推动着一个以生物催化和生物转化为特征, 以生物能源、生物材料、生物化工、生物冶金等为代表的现代工业体系的形成, 在全球范围内掀起了一场新的现代工业技术革命。2003 年, 工业生物技术已经影响了全球 5% 的化学品市场 (约 500 亿美元的市场值)。美国国家委员会预测, 至 2020 年, 将有 50% 的有机化学品和材料产自生物质原料<sup>[1]</sup>, 工业生物技术将起着核心作用。

工业生物技术的核心是生物催化剂, 主要包括全细胞和酶。工业生物技术的发展, 很大程度上依赖于具有重要工业应用性能的微生物及酶的开发。目前, 工业生物技术领域的研发人员已经发现了大量具有重要工业应用潜力的新酶及微生物资源。但作为一个新兴领域, 工业生物技术的发展还有许多问题需要解决。目前, 生物加工过程的效率还不够高, 能利用的可再生资源还很有限, 产品的产量和种类还不足, 因此, 迫切需要发展新技术、新策略和新方法, 提高认识、设计和改造微生物和酶的能力, 提高生物加工过程效率, 推动工业生物技术发展。另一方面, 近年来基因组学和系统生物学的快速发展, 提供了从组学水平上系统认识微生物生理功能和代谢特性的工具; 元基因组和蛋白表达技术的发展, 则为工业酶开发提供了新的推动力。

为了展现工业生物技术领域取得的最新进展, 促进我国工业生物技术的进步和发展, 本期特设“工业生物技术”专刊, 邀请国内该领域著名学者对工业生物技术的新方法、新技术和新策略进行总结, 主要报道了微生物代谢工程、发酵工程以及工业酶与生物催化领域的一些最新研究成果。

目前, 几乎所有重要工业微生物模式菌种的基因组全序列已经或即将公布, 转录组、蛋白质组、代谢组、通量组等数据资源正在迅速扩展。充分利用生物信息学工具, 挖掘组学数据中包含的有用信息, 可以更有效地改造和控制细胞性能、提高底物利用及产品收率、改善微生物工业适应性, 促进工业生物技术发展。例如, 对微生物菌种进行代谢工程改造, 需要考虑很多因素, 包括如何确定决定细胞生理状态的重要靶标, 如何修饰或改造这些靶标才有利于目的产物合成, 如何预测这些定向改造的生理影响等等。很明显, 代谢网络的建立和分析是对微生物细胞进行定向改造和调控的基础。基于基因组序列注释和详细生化信息的整合, 构建基因组规模代谢网络模型, 为全局理解和理性调控微生物生理代谢功能提供了最佳平台。刘立明和陈坚<sup>[2]</sup>总结了应用基因组规模代谢网络模型成功进行代谢网络特性分析、微生物生长表型预测和分析、组学数据阐释, 以及基于模型进行系统代谢工程改造的多

则案例。在此基础上, 作者概述了构建高精度度模型的步骤和原则, 包括: 所需数据库与软件、基于基因组注释的粗略代谢模型构建、基于手工修正的精细代谢网络构建、数学模型转换、以及模型评估、修正、模拟和可视化。基因组规模的代谢网络模型及其结构和功能的分析, 为从全局规模上深刻认识和高效、定向调控微生物生理功能奠定了坚实基础, 从而为利用代谢工程提高工业微生物性能创造了前所未有的机遇。

组学技术也可以用于在系统水平上对细胞代谢进行全面的分析, 阐释“基因型-表型”的关系, 从而帮助研究者确定菌种改造的靶标, 加速对微生物细胞工厂的合理设计和构建。其中, 转录组分析技术已经得到广泛的应用。陈涛等<sup>[3]</sup>介绍了几种主要的转录组分析平台技术的原理, 包括基因芯片技术、基因表达系列分析技术、大规模平行测序技术以及最新提出的 RNA 测序技术, 比较了这几种技术的优缺点, 并系统总结了利用转录组技术优化菌种耐受性及减少代谢副产物合成、扩大底物利用范围、合成异源蛋白产物、提高代谢产物产率和产量以及改造动植物细胞特性方面的最新进展。这对科研人员深入了解及应用转录组技术是非常有帮助的。

在深入理解微生物生理功能和代谢调控的基础上, 借助基因操作技术对细胞进行改造或修饰是选育优良菌株的核心步骤。基因敲除技术是一项重要的分子生物学技术, 在工业微生物代谢工程改造中广泛应用。于慧敏等<sup>[4]</sup>从基因敲除技术的遗传重组原理出发, 总结了基因敲除策略的类型、特征和应用, 重点介绍了采用线性双链 DNA 的  $\lambda$  Red 同源重组系统、使用环状质粒载体介导的单交换或双交换同源重组策略以及采用转座酶介导的转座重组等几种主要的基因敲除方法, 并对基因敲除技术的一些新方法和新原理进行了展望。微生物基因敲除技术为定向改造细菌、放线菌、酵母菌、霉菌等工业微生物、培育微生物新品种、提高工业微生物应用性能提供了重要的技术支持。

除常规的代谢能力改造之外, 微生物在恶劣环境下的鲁棒性、对高浓度底物或产物的耐受性、生产全过程的适合性等也是影响工业微生物在实际生

产性能的重要因素。付瑞燕和李寅<sup>[5]</sup>的综述较系统地总结了借鉴传统代谢工程技术和反向代谢工程技术构建胁迫抗性突变株的进展, 阐述了菌株抗胁迫性能对提高目标产品产量和工业适应性的重要性。虽然目前对很多重要的抗胁迫机制尚缺乏系统认识, 但无疑这将是工业微生物性能改造的重要组成部分。将微生物生理学、系统生物学、合成生物学的相关理论与代谢工程方法结合起来, 来改善宿主菌的生理功能, 将有可能满足多元化的工业需求, 特别是满足新兴生物燃料、生物基化学品种和生物材料发展的需求。

随着代谢工程技术的不断发展, 很多重要产品生产菌株的性能得到不断提升。郑裕国等<sup>[6]</sup>总结了微生物法生产 1,3-二羟基丙酮代谢工程研究进展, 包括解析 1,3-二羟基丙酮的代谢途径和关键酶, 对关键酶进行过量表达, 或将代谢途径导入其他宿主菌等, 以提高目标产品产量、降低生产成本。黄和等则对二十二碳六烯酸生产菌<sup>[7]</sup>及花生四烯酸生产菌<sup>[8]</sup>的代谢工程研究情况进行了总结, 分别介绍了合成途径、合成调控机制以及菌种遗传操作系统开发等方面的进展。这些研究为利用现代生物技术手段提高菌株发酵水平奠定了基础, 对从事相关产品生产研究的人员具有很强的实践指导意义。

本期也报道了利用代谢工程原理或方法改善菌体生长、提高目标产品产量以及拓宽底物利用等方面的一些最新研究成果。储炬和朱笃等<sup>[9]</sup>利用代谢通量分析方法, 考察了聚球藻混养培养条件下的能量利用效率, 从碳代谢和能量利用的微观角度出发, 阐释了混养条件下有机碳源促进聚球藻细胞生长和产物合成的机理, 一定程度上为利用混养培养来提高藻细胞的培养密度、实现微藻的大规模培养奠定了理论基础。姜岷等<sup>[10]</sup>则利用代谢通量分析方法, 研究了外源添加代谢中间体磷酸烯醇式丙酮酸促进丁二酸发酵的原因。他们发现, 添加磷酸烯醇式丙酮酸后己糖磷酸途径通量大幅提高, 由此增加的还原力 (NADPH) 供给, 是丁二酸代谢通量提高的主因。这一策略还同时降低了副产物乙酸、甲酸等的合成, 对进一步提高丁二酸发酵的经济性具有实际意义。祁庆生等<sup>[11]</sup>通过敲除大肠杆菌磷酸烯醇式丙

酮酸葡萄糖转移酶系统中的葡萄糖转移酶基因 *ptsG*, 消除了利用混合糖生长时的碳源代谢阻遏现象, 使得聚羟基丁酸酯合成工程菌能够同时利用多种碳源合成目标产物。这一研究实现了大肠杆菌同时利用多种糖混合物的目标, 对降低聚羟基丁酸酯发酵成本具有重要意义。

微生物的性能要在发酵过程中得到发挥, 需要通过优化发酵工艺和发酵控制, 提高产量和降低生产成本。刘立明和陈坚等<sup>[12]</sup>为了提高酮古龙酸菌和巨大芽胞杆菌生产 2-酮基-L-古龙酸的生产效率, 分析了 pH 对酮古龙酸菌和巨大芽胞杆菌生长和产 2-酮基-L-古龙酸的影响, 建立了分阶段 pH 调控生产工艺, 显著提高了酸的产量和产率。通过单因素实验和正交试验设计确定重要因素的最佳水平, 黄日波等<sup>[13]</sup>优化了木薯粉和甘蔗汁混合原料进行高温高浓度乙醇发酵的工艺, 发酵成熟醪乙醇浓度达到 17% (V/V) 以上, 为木薯和甘蔗资源丰富的地区发展非粮燃料乙醇提供了重要技术支持。分批发酵产生的大量菌体的处理是发酵工业需要解决的一个重要问题。姜岷等<sup>[14]</sup>提出了一种循环利用菌体的新思路。他们将丁二酸厌氧发酵后的废弃细胞进行破壁处理, 然后作为氮源替代添加到发酵液中, 提高了丁二酸的产量, 同时有机氮源用量降低, 成本下降。这些研究对提高工业生物制造过程的经济性都具有较高的借鉴意义和参考价值。

除利用全细胞进行生物加工和炼制之外, 基于酶的生物催化也是工业生物技术的一个重要领域。生物催化产业的发展, 很大程度上依赖于特定性能酶的开发, 包括酶基因的获取、酶的生产、修饰、进化及应用。具有特定催化性能的酶基因的获取和高效表达是生物催化的基础。惠丰立等<sup>[15]</sup>报道了借助 DNA 软件辅助设计合成牛凝乳酶原基因的过程, 并利用乳酸克鲁维酵母实现了牛凝乳酶原的分泌生产。类似地, 孙晶翼等<sup>[16]</sup>利用毕赤酵母表达生产出溶栓剂 DSPA $\alpha$ 1, 继而利用定点突变对糖基化侧链进行缺失, 发现突变体的表达水平显著下降, 酶活性也明显低于对照。这些研究利用 DNA 重组技术生产重组酶, 解决了酶来源受限的问题, 是现代生物技术促进工业酶开发的重要例证。基因组学和功能基

基因组学的发展, 可以提供海量的基因和蛋白信息, 可以预期, 与生物信息学结合的基因挖掘技术, 将提供更多更丰富的基因和酶资源。

与工业微生物菌株需要改善性能一样, 野生酶通常在催化效率、热、酸等稳定性方面无法满足工业需求。体外定向进化是近几年快速发展的一种酶改造策略, 利用该技术可以在目标蛋白三维结构信息和作用机制未知的情况下, 通过容错 PCR 等技术对编码酶的基因进行随机突变, 再由 DNA 改组、交错延伸过程、随机引导重组、递增截短技术等进行突变基因的体外重组, 最终通过定向筛选获得具有改进功能或全新功能的酶, 使几百万年的自然进化过程在短期内得以实现, 因而是发现新的生物活性分子和反应途径的重要方法, 已在短短几年内取得了令人瞩目的成就。李崎等<sup>[17]</sup>利用该技术成功提高了淀粉液化芽胞杆菌  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶的热稳定性, 为进一步将该酶用于工业生产奠定了基础。

利用酶催化以廉价底物生产高价值产品是生物催化研究的主要目的。刘军等<sup>[18]</sup>通过考察 L-色氨酸转化途径所需酶的特性, 确定了以丝氨酸羟甲基转移酶催化廉价的甘氨酸和甲醛合成 L-丝氨酸, 然后利用色氨酸酶将之转化为 L-色氨酸的工艺。利用重组大肠杆菌将两种酶分别或共表达, 双菌双酶和单菌双酶法均有效地合成了目标产品, 为下一步酶法生产 L-色氨酸的产业化奠定了基础。未来的研究若能充分挖掘现有基因组信息, 获得更高效的合成途径和酶信息, 有望进一步提高酶法生产 L-色氨酸的水平。

工业生物技术作为一种与工业生产联系最紧密的生物技术学科, 承担了解决能源、资源、环境问题的重任, 社会需求非常迫切, 发展速度也非常快。从技术体系的发展看, 工业酶开发和生物催化技术起步较快, 已经在很多精细化学品的生产中得到应用。以代谢工程为核心的工业微生物改造技术备受关注, 近年来国内代谢工程相关研究取得了很大进展, 在提高目标代谢产物的生产速率和生产能力、合成新物质、降解环境有害物质等方面都有出色的研究。但由于活体细胞代谢和调控机制的复杂性, 目前我国的代谢工程研究还只是利用可再生生物质

生产特殊化学品、精细化学品及大宗化学品、降解环境有害物质的开端。应该看到, 尽管众多研究人员对糖酵解、戊糖磷酸化、三羧酸循环、氨基酸合成等初级代谢途径及微生物、植物等的次级代谢途径的代谢工程研究已经取得了许多成绩, 但对这些代谢途径进行调控有时并不能尽如人意, 也可能带来一些新的问题。随着组学规模高通量分析技术的进一步发展, 在微生物细胞整体水平上进行系统研究, 并与生产要求紧密结合, 是代谢工程进一步发展的必然趋势。研究人员如能抓住这一契机, 必能在工业生物技术领域创造更广阔的发展空间, 并促进化石资源经济模式向生物加工经济模式的转变。

《生物工程学报》作为报道我国生物工程领域创新成果研究的重要期刊, 设置“工业生物技术”专刊, 集中报道工业生物技术领域的新技术、新方法、新策略, 以及取得的重要研究进展, 将促进我国工业生物技术的方法创新和策略创新, 推动生物产业的发展。

## REFERENCES

- [1] 工业生物技术: 工业可持续发展最有希望的技术——欧阳平凯院士访谈. 生物产业技术, 2010(1): 69-71.
- [2] Liu LM, Chen J. Reconstruction and application of genome-scale metabolic network model. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1176-1186.  
刘立明, 陈坚. 基因组规模代谢网络模型构建及其应用. 生物工程学报, 2010, **26**(9): 1176-1186.
- [3] Shi SB, Chen T, Zhao XM. Transcriptome platforms and applications to metabolic engineering. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1187-1198.  
史硕博, 陈涛, 赵学明. 转录组平台技术及其在代谢工程中的应用. 生物工程学报, 2010, **26**(9): 1187-1198.
- [4] Yu HM, Ma YC. Gene knockout strategies for metabolic pathway regulation in industrial microbes. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1199-1208.  
于慧敏, 马玉超. 工业微生物代谢途径调控的基因敲除策略. 生物工程学报, 2010, **26**(9): 1199-1208.
- [5] Fu RY, Li Y. Improving industrial microbial stress resistance by metabolic engineering: a review. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1209-1217.  
付瑞燕, 李寅. 利用代谢工程技术提高工业微生物对胁迫的抗性. 生物工程学报, 2010, **26**(9): 1209-1217.
- [6] Sun LH, Hu ZC, Zheng YG, *et al.* Progress in

- metabolic engineering of microbial production of 1,3-dihydroxyacetone. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1218–1224.
- 孙丽慧, 胡忠策, 郑裕国, 等. 微生物法生产 1,3-二羟基丙酮代谢工程研究进展. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1218–1224.
- [7] Feng Y, Ren LJ, Wei P, *et al.* Progress in metabolic mechanism of docosahexenoic acid production by fermentation. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1225–1231.
- 冯云, 任路静, 魏萍, 等. 微生物发酵产二十二碳六烯酸代谢机理的研究进展. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1225–1231.
- [8] Cong LL, Peng C, Ji XJ. Progress in production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* and genetic modification. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1232–1238.
- 丛蕾蕾, 彭超, 纪晓俊, 等. 高山被孢霉产花生四烯酸及其遗传改造的研究进展. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1232–1238.
- [9] Yan RM, Zhang ZB, Zeng QG, *et al.* Carbon metabolism and energetic utilization of *Synechococcus* sp. PCC7942 under mixotrophic condition. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1239–1248.
- 颜日明, 张志斌, 曾庆桂, 等. 聚球藻 7942 混养培养中碳代谢与能量利用. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1239–1248.
- [10] Huang XM, Jiang M, Li J, *et al.* Effect of adding intermediate metabolites on succinate production by *Actinobacillus succinogenes*. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1249–1256.
- 黄秀梅, 姜岷, 李建, 等. 外源添加代谢中间体对产琥珀酸放线杆菌厌氧发酵制备丁二酸的影响. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1249–1256.
- [11] Wei GQ, Chen Q, Kang Z, *et al.* Efficient polyhydroxybutyrate production from cheap resources by recombinant *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1257–1262.
- 魏国清, 陈泉, 康振, 等. 利用大肠杆菌工程菌廉价高效生产聚羟基丁酸酯. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1257–1262.
- [12] Zhang J, Zhou JW, Liu LM, *et al.* Enhancement of 2-keto-L-gulonic acid production using three-stage pH control strategy. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1263–1268.
- 张静, 周景文, 刘立明, 等. 分阶段 pH 调控提高 2-酮基-L-古龙酸生产. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1263–1268.
- [13] Shen NK, Zhang HY, Wang QY, *et al.* Very high gravity ethanol fermentation with cassava flour and sugarcane juice. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1269–1275.
- 申乃坤, 张红岩, 王青艳, 等. 木薯粉与甘蔗汁混合发酵生产高浓度乙醇. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1269–1275.
- [14] Bai XF, Chen KQ, Ye GZ, *et al.* Recycle of spent cells from anaerobic succinate fermentation. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1276–1280.
- 白雪飞, 陈可泉, 叶贵子, 等. 发酵产丁二酸过程中废弃细胞的循环利用. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1276–1280.
- [15] Yuan W, Ke T, Du MH, *et al.* Gene synthesis of the bovine prochymosin gene and high-level expression in *Kluyvermyces lactis*. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1281–1286.
- 袁伟, 柯涛, 杜敏华, 等. 牛凝乳酶原基因的合成及其在乳酸克鲁维酵母中的表达. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1281–1286.
- [16] Li JF, Yan Y, Wang QM, *et al.* Effect of N-linked glycosylation on secretion and activity of recombinant DSPA $\alpha$ 1 expressed in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1287–1292.
- 李剑凤, 阎岩, 王庆民, 等. N-糖基化对毕赤酵母表达的 DSPA $\alpha$ 1 分泌和活性的影响. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1287–1292.
- [17] Qin JF, Gao WW, Li Q, *et al.* Improvement of thermostability of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus amyloliquefaciens* BS5582 through *in vitro* evolution. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1292–1301.
- 秦久福, 高威威, 李崎, 等. 通过体外分子进化技术提高淀粉液化芽胞杆菌 BS5582  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶热稳定性. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1292–1301.
- [18] Li X, Liu J, Zhao QQ, *et al.* Construction of co-expression SHMT and TPase recombinant vector and dual-enzymatic synthesis of L-tryptophan. *Chin J Biotech*, 2010, **26**(9): 1302–1308.
- 李鑫, 刘军, 赵沁沁, 等. 共表达 SHMT 和 TPase 载体的构建及双酶法合成 L-色氨酸. *生物工程学报*, 2010, **26**(9): 1302–1308.