

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-003

忆王义翘教授对生物炼制的贡献和我对此领域未来发展的观点

张以恒

(中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

摘要: 本文目的是回忆王义翘 (Daniel I. C. Wang) 教授对生物炼制领域的贡献, 以及作者与王教授在该领域的交往、互动和激励, 并且作者针对生物炼制领域几个问题提出个人观点。王教授大力地推动多学科交叉的研究创新, 使生化工程正式发展成为化学工程的一个前沿分支。为面向重大需求, 王教授一生中多次调整他的科研方向。基于粮食原料的第一代生物炼制工厂生产工艺已经十分成熟, 但对粮食安全和环境有着负面影响, 发展受限。因为当前石油价格下行, 基于非粮生物质的第二代生物炼制工厂受到预处理和纤维素酶成本的限制, 举步维艰, 在经济上暂时还缺乏可行性。未来的新生物炼制工厂能够将非粮生物质 (如秸秆) 有效地转化为多个产品, 如粮食和饲料、健康糖以及众多大宗生物产品 (如燃料和材料)。多种新生化工程工具的发展和使用将有助于新生物精炼厂的实现, 例如整合生物加工、新酶发现和利用、体外合成生物学 (如多酶分子机器)、基因工程、合成生物学等。未来的新生物精炼厂将具有工业可放大性、经济可盈利性和环境可持续性的性质。种植多年生的非粮作物和未来生物炼制工厂相结合, 将有可能帮助解决中国社会经济发展所面临的重大需求, 如粮食安全、能源安全、大健康以及环境保护等。

关键词: 农业革命; 生物炼制; 生化工程; 生物制造; 粮食安全; 多酶分子机器; 酶工程; 体外合成生物学

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

Remembering Professor Daniel I.C. Wang's contribution to biorefining and my perspective on the progress

ZHANG Yi-Heng

(Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: The goals of this article are in memory of Professor Daniel I.C. Wang's contribution to biorefining, the interaction and motivation between Professor Wang and me in this area, and I present opinions on addressing several key challenges of the next-generation biorefinery. Prof. Wang was the primary driver of innovation in both education and multidisciplinary research initiatives that have defined modern Biochemical Engineering, a frontier of chemical

收稿日期: 2021-01-08 修回日期: 2021-03-30

引用本文: 张以恒. 忆王义翘教授对生物炼制的贡献和我对此领域未来发展的观点[J]. 合成生物学, 2021, 2(4): 497-508

Citation: ZHANG Yi-Heng. Remembering Professor Daniel I.C. Wang's contribution to biorefining and my perspective on the progress[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(4): 497-508

engineering. To meet great needs, he adjusted his scientific research directions timely throughout his career from microbial fermentation, single cell protein production, animal cell cultures to biorefineries. The industrial processes of the first-generation biorefinery plants based on food resources (*e.g.*, corn kernel, sucrose, aged grains, used oil) have been very mature, but they potentially have negative impacts on food security and the environment, resulting in their limited development. Due to current low prices of crude oil, the second-generation biorefineries based on non-food lignocellulosic biomass are suffering from relatively high production cost, leading to their economic inviability. New biorefineries, which could be distinctive from the second generation biorefineries that produce liquid biofuels as dominant products, would convert lignocellulosic feedstock (*e.g.*, rice straw, corn stover, energy crops) to multiple products, such as food and feed, healthy sweeteners, and other biocommodities (*e.g.*, biofuels and biomaterials). New biorefineries could be implemented with newly-developed biochemical engineering tools, such as consolidated bioprocessing, novel enzymes, metabolic engineering, *in vitro* synthetic biology (*i.e.*, multiple-enzyme molecular machines that assemble a number of natural enzymes, novel-function or engineered enzymes, coenzymes, and/or biomimetic coenzymes to form artificial pathways to implement novel biomanufacturing capacity beyond the limits of microbial fermentation and cell cultures). They could be industrial scalability, economic viability, and environmental sustainability. Also, agricultural revolution would take place by the cultivation of perennial plants in marginal lands to replace annual crops, wherein perennial plant communities have higher biomass yield per hectare with less resource management, store more carbon, maintain better water quality, utilize fertilizers more efficiently, tolerate extreme weather, and resist pests. The combination of the cultivation of nonfood perennial (energy) crops and next-generation biorefineries could address major social and economic needs of China, such as food supply, energy security, general health, and environmental conservation. Also, new biorefineries and new agricultural revolution could address challenge of our time to meet increasing need in the energy-food-water nexus without compromising the benefit of next generations.



Keywords: agricultural revolution; biorefining; biochemical engineering; biomanufacturing; food security; multiple-enzyme molecular machine; enzyme engineering; *in vitro* synthetic biology

1 生物化学工程学和王义翹教授对生物炼制的贡献

现代的生物化学工程学 (biochemical engineering, 简称生化工程) 始于 20 世纪 50 年代, 开始于利用微生物发酵技术满足对抗生素生产和现代食品加

工的需求。现在, 生化工程已经发展成为化学工程的最重要前沿分支之一, 应用化学工程的原理和方法, 研究解决活的生物体或酶参与的生物制造过程, 即生化反应过程中的基础理论及工程技术问题。生化工程是一种使能技术, 促进生物学、微生物学、化学工程、酶学和食品学之间的合作,

是生物技术中将现代生物学的成就转变成生产力和财富所必不可少的重要组成部分。1943年,美国默克公司利用具有通气搅拌装置的发酵罐大量培养青霉素生产菌,代替了原来用上万个表面培养皿的生产方法。这个时期,生化工程师成功地解决了好气性微生物在液体培养中的氧供应、培养基优化、空气灭菌、青霉素提取以及青霉素储存中的关键技术和设备问题,从中建立了发酵过程中的搅拌通气、培养基灭菌和空气灭菌等单元操作,也为生化工程学科的建立奠定了初步的理论基础。为了解决青霉素降解问题,冷冻干燥技术被发明、改进和大规模应用,人们可以方便地储存、运输和使用青霉素。随后,1944年发现的链霉素,1946年发现的氯霉素等都相继顺利地工业化发酵生产。在此以后,生化工程在为其后出现的氨基酸发酵、酶制剂生产、甾体生物转化以及酶的工业应用等过程开发和对微生物发酵过程的改造起了决定性作用。

1965年,王义翘(Daniel I. C. Wang)教授加入麻省理工学院营养和食品科学系,担任生化工程方向的助理教授。在接下来的50多年中,他成功地定义生化工程学科的教育,大力地推动多学科交叉的研究创新,使之正式发展成为化学工程的一个前沿分支^[1]。

王义翘教授的科研选题总是面向世界重大需求。20世纪60年代中期,全球玉米和大豆的价格迅速上涨,而全球粮食资源却分布极其不均。基于对未来粮食可能短缺的预测,科学家和工程师面临一个新挑战——如何利用创新方式生产足够的粮食?王教授选择研究单细胞蛋白(single cell protein, SCP)的培养和生产^[2]。单细胞蛋白,也叫微生物蛋白,它是利用工农业废料及石油废料培养的微生物菌体,可作为蛋白质的新来源。单细胞蛋白具有诸多优点:①生产速度快,比动植物高成百上千倍,这主要是因为微生物的生长繁殖速度快。②生产原料来源广,如农业废物、废水,工业废物、废水,石油、天然气及相关产品,以及含氢气、一氧化碳等的工业废气。③可以工业化生产,不受地区、季节和气候的限制,而且质量稳定。④能源转化利用效率高。单细胞蛋白已被广泛用于食品加工和饲料中。在欧美,每天

有几百万人食用单细胞蛋白制成的“人造肉”,如Quorn[®]。单细胞蛋白可作为食品添加剂,用以补充蛋白质、维生素、矿物质等,例如,酵母浓缩蛋白具有鲜味,已广泛用作食品的增鲜剂。干酵母含热量低,常作为减肥食品的添加剂。在全世界范围内,单细胞蛋白也作为动物饲料蛋白,其营养价值优于鱼粉和大豆粉。

为了实现单细胞蛋白的经济生产,王教授实验室集中解决低成本、大规模单细胞蛋白培养和分离技术,包括气升式(air-lifted)发酵罐^[3]、絮凝技术^[4]、针对细胞和蛋白质回收的膜技术^[5],并阐明了高压破碎细胞的原理。当时石油和天然气等化石能源价格低廉,他利用甲烷、甲醇和石油烷烃作为碳源来培养微生物,生产单细胞蛋白^[6]。

但是,到1975年,绿色革命对全球小麦、玉米和大豆的供应产生积极影响,全球粮食价格开始持续下降。几乎与此同时,第一次石油危机(1973—1974年)发生,石油价格从1973年的每桶不到3美元暴涨到接近12美元。紧接着,第二次石油危机(1979年至20世纪80年代初)发生,造成石油价格从1979年的每桶15美元左右涨到1981年2月的39美元。此时,人们对石油以及粮食价格的预期完全反转了,开始考虑利用多余的粮食生产生物燃料,解决能源危机。比如,美国开始利用多余的玉米生产乙醇,巴西利用富余的蔗糖生产乙醇。

将粮食转化为生物燃料会对粮食安全和环境产生一些负面影响,所以人们将注意力集中在非粮的纤维素生物质(以下简称生物质)的转化和利用。在20世纪70年代后期,王教授将他的研究兴趣集中于利用厌氧微生物将生物质中纤维素和半纤维素直接转化生物燃料(direct microbial conversion, DMC)^[7-8]。在这个厌氧过程中,纤维素降解微生物生产纤维素酶,将生物质中的纤维素水解,发酵水解糖生产乙醇,整个过程不添加昂贵的外源纤维素酶。厌氧发酵是高效率生物转化的关键,因为避免了碳水化合物的直接氧化。除了简化生产过程,支持DMC观点的科学家和工程师相信这种生产方式可能大幅降低生物燃料的生产成本。王教授实验室研究一些在严格厌氧条件下生长的微生物,比如,热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)^[7]。除了

生产乙醇，他还关注生产乙酸、丁酸、丁醇和丙酮等大宗生物产品（biocommodity），同时开发了用于对专性厌氧菌的基因改造方法^[9]。尽管王教授证明了可以将纤维素生物质直接发酵生产乙醇和其他生物产品^[8]，但是由于全球石油价格再次下降，该技术无法大规模应用。

到1980年，重组DNA技术开始用于改造微生物和动植物细胞，生产许多新的生物制品，如促红细胞生成素、胰岛素、单抗等。因为在细菌系统中很难生产重组人源蛋白质（尤其是糖基化蛋白质），因此动物细胞培养技术再一次受到重视。20世纪60年代后期，王教授就开始构建动物细胞培养的研究平台^[10]。1977年，他进一步发展微载体技术进行大规模培养动物细胞来生产病毒^[11]。王教授实验室长期改善动物细胞培养技术，包括：重新设计动物细胞的生长培养基^[12]，设计用于动物细胞培养的新型生物反应器^[13]，引入新型传感器来监测发酵性能^[14]，应用计算机控制以增强和理解发酵过程^[15]。同时，他利用数学模型分析了动物细胞培养中的供氧需求和机械剪切的关系，得出一个全新的理论，推动了动物细胞培养技术的重大改进^[16-17]。王教授的学生以及合作者共同发展的动物细胞培养的研究平台，成为了生物制造的最关键平台之一^[18]。

2010年，本文作者有幸获得《生物技术和生物工程》（*Biotechnology & Bioengineering*）杂志以王义翘教授（Daniel I.C. Wang）名字命名的奖项，该奖项每年授予全球生物工程领域的一位青年科学家。当时，本人是美国维吉尼亚理工大学（Virginia Tech.）的副教授，刚刚获得终身教职，因此有着新梦想——开创属于自己的全新领域。王教授和他夫人邀请我一起吃饭，我利用这个机会请教王教授有关科研选题的问题。王教授告诫我：“针对重大需求，抓住关键问题。”“有所为，有所不为，甘心坐冷板凳。”“不必追求发表高分论文，有影响的工作，无论发表在什么杂志，都会有长期影响力的。”几年之后，我在全美化学年会的生物技术分会场再次见到王教授，我十分兴奋地告诉他我的新突破——在未来的生物炼制工厂中，我们可以将纤维素转化为淀粉，从而可能最终解决人类的粮食问题。王教授立刻就理解了

这个想法的重要性，但是他也反复提醒一定要解决该生物转化的经济可行性问题。2015年，作者实验室在《美国国家科学院院刊》发表论文，证明了利用体外合成生物技术联合微生物发酵生产人造淀粉的技术可行性^[19]。

2 生物炼制工厂以及现存问题

生物炼制工厂（biorefinery）是一种将广义的生物质（包括所有的植物、微生物以及以植物、微生物为食物的动物及其生产的废弃物）转化过程和设备集成在一起的设施，用于从生物质中生产生物燃料、电力、热量和增值的生物产品（如燃料和材料）（即大宗生化产品）。生物炼制工厂概念类似于石油炼制厂，后者以石油为原料生产多种液体燃料（如汽油、柴油、煤油）和多种石化产品（如乙烯、丙烯、苯、甲苯等）。

第一代生物炼制工厂是指使用蔗糖和淀粉类等原料（如玉米、陈化粮）进行发酵产生乙醇制得生物燃料，还包括从油脂生产生物柴油。第一代生物炼制工厂生产工艺已经十分成熟，美国、巴西、中国和欧盟等一些国家和地区已经形成了完善的产业链。燃料乙醇主要产自甘蔗和玉米，产自小麦、甜菜和木薯的较少。生物柴油大多产自油菜籽和被回收的食用油（如地沟油），但棕榈油、大豆油、麻疯树等也可用于制造生物柴油。图1显示了一个生物炼制工厂利用玉米生产乙醇和其他多种生物产品[如玉米油、面筋、淀粉、多种甜味剂(包括高果糖浆、葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、山梨醇等)]。对于第一代生物炼制工厂，原料成本常常占据整个生产成本的一半以上。在这个炼制过程中，生产其他生物产品可以带来一半以上的收入，超过乙醇收入，可以有效地改善生物炼制工厂的经济可行性和持续性。同理，石油炼制厂的大多数营收是来自石化产品，仅仅生产液体燃料（如汽油和柴油）的石油炼制厂在经济上是不可持续的。

燃料乙醇是对环境相对友好的生物燃料，可作为汽油品质改善剂和增氧剂，用于取代甲基叔丁基醚（methyl tert-butyl ether, MTBE），以一定比例添加到汽油中，形成车用乙醇汽油（比如

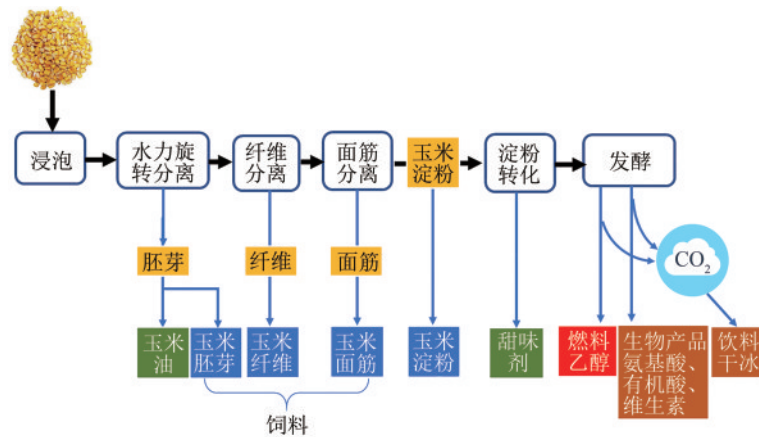


图1 基于玉米的第一代生物炼制工厂生产乙醇和多种生物产品

Fig. 1 Scheme of corn kernel-based first-generation biorefinery that can make multiple products from food & feed to sweeteners to ethanol, biochemicals and CO₂

E10, 是指包括 10% 乙醇和 90% 汽油的燃料)。2019 年全球燃料乙醇产量大约是 8700 万吨^[20]。MTBE 是一种高辛烷值汽油添加剂, 常被用作汽油添加剂, 以改善汽油的冷启动特性、加速性能及提升辛烷值。但是 MTBE 具有一定的毒性, 它易于与水融合, 可渗入土壤, 是一种环境污染物。与常规汽油相比, 使用乙醇汽油可减少汽车尾气中 40% 的碳排放、36%~64% 的细颗粒物 (PM) 排放, 能明显降低汽车尾气有毒物质含量。同时, 汽车油路比较清洁, 发动机积炭较少。

第一代生物燃料有着诸多缺点: ①利用粮食生产燃料, 可能造成粮食短缺和食品价格上涨; ②绝大多数国家没有足够的耕地能够满足哪怕仅仅 10% 的液态燃油原料需求; ③当将玉米生长、收获及加工期间的所有碳排放纳入整个经济成本, 二氧化碳减排效果有限。美国利用第一代生物炼制工厂将过剩的玉米生产乙醇, 是“一箭双雕”的策略, 可以提高农民收入 (通过财政补贴) 和改进国家的能源安全。但是, 其他国家难以效仿。

第二代生物炼制工厂是指以非粮生物质为原料, 生产以纤维素乙醇为代表的第二代液体生物燃料。生物质是重要的可再生能源之一, 分布广泛, 数量巨大, 比如全球的木质纤维素生物质年产量大约是 2000 亿吨, 是全球粮食总产量 (大约 27 亿吨) 的 70 倍。(非粮的) 木质纤维素材料包括从木材废料 (如锯木屑、木质建筑残片) 到农业废弃物 (如玉米秸秆、小麦茎秆), 富含纤维素、

生长迅速的草本植物, 再到“能源作物”。能源作物是指生长迅速、纤维含量高、专门种植用作能源生产的多年生草本和木本植物。能源作物的种植生产不会干扰和危及现有粮食生产, 因为大多数能源作物能够在不能用作农田的边际土地上快速生长, 还有一些能够在被废水或者重金属污染的土壤里生长并净化土壤, 如生长周期较短的灌木柳树。利用木质纤维素原料生产纤维素乙醇, 可以更有效实现二氧化碳减排, 大幅提高燃料乙醇的生产潜力。中国可用的非粮生物质以农业废弃物和木材废物为主。随着生活水平的提高, 家用电器、煤气使用日益广泛, 农民对柴草的需求下降; 秸秆焚烧产生的有害气体及颗粒物成为导致雾霾天气的污染源之一。

第二代生物炼制工厂对木质纤维素利用, 在技术发展初期是以酸水解技术作为起点, 获得单糖 (葡萄糖和木糖) 后, 再用微生物将葡萄糖发酵成为乙醇。在第二次世界大战中, 美国曾经大规模生产木糖部分取代蔗糖, 作替代性甜味剂。20 世纪 70 年代之后, 纤维素酶水解技术概念开始取代酸水解技术, 因为反应条件更温和、水解产物杂质更少。同时, 第二代生物炼制工厂将利用水解糖生产液体生物燃料以及其他生化产品和材料。第二代生物炼制工厂比第一代生物炼制工厂更复杂, 主要包括三个步骤: 生物质原料的预处理, 糖平台技术 (从木质纤维素和半纤维素酶解制糖), 以及发酵技术 (尤其是木糖的利用和转

化)。在过去20多年间,全世界的科研活动主要集中在以上三个方向,比如:美国的生物质加工应用联合体(CAFI)集中研究和比较不同生物质的预处理技术^[21];酶制剂公司(如诺维信公司和杜邦杰能科)大幅减少纤维素酶生产成本,使之接近酶的最低理论生产成本[每千克酶(干重)大约10~20美元]^[22-23];多糖共同发酵^[24-25]。

除了以上三个主要方向,王义翘教授提出的DMC概念再次引起大家的兴趣。因为DMC概念可以有效地减少纤维素酶和半纤维素酶成本,避免专门生产和添加纤维素酶;同时,基因工程改造的DMC细菌或者混合细菌可以同时利用葡萄糖和戊糖。美国达特茅斯学院的Lee Lynd教授将DMC重新命名为Consolidated BioProcessing(CBP,整合生物加工)^[26]。作者在Lee Lynd的实验室中,证明了热纤梭菌拥有一个特殊的纤维素酶水解机理,是利用纤维小体(一种纤维素酶的多酶复合体),将纤维素水解到纤维多糖而不是葡萄糖,将纤维多糖快速运输到细胞体内,进行体内纤维多糖磷酸化(而不是简单纤维多糖水解),再进行代谢,最后生产目标产物乙醇^[27]。这种特殊的纤维素水解机理能够让专性厌氧菌热纤梭菌生产足够ATP用于合成纤维素酶和菌体,同时,提高纤维水解速度,减少纤维素酶的合成量^[28]。

但是,到21世纪10年代后期,全球石油价格再次大幅下降,基于纤维素乙醇的第二代生物炼制工厂面临与20世纪80年代中期一样的困局。相较于石油汽油和粮食乙醇,纤维素乙醇目前没有任何市场竞争优势,主要原因是生产成本过高。这主要包括以下几方面的问题:①原料收集困难,没有现成基础设施;②原料预处理过程能耗高、物耗高;③水解制糖用的纤维酶制剂水解能力低(酶用量大、成本高);④废水处理难度大。美国、意大利和巴西等国纤维素乙醇技术已经接近成熟,商业化示范项目都已建成投产,但均没有实现可盈利性生产。纤维素乙醇售价和石油价格紧密相关。即使国际油价重回70~80美元/桶,第二代生物炼制工厂仅仅靠生产乙醇和其他低值产品(比如沼气、发电)可能还是难以为继的。

在低油价时期,为了改进第二代生物炼制工厂的投资回报率(ROI, return on investment),除

了减少生产成本(包括生物质原料、直接工资和制造费用),另一个重要的方法是增加产品收入。寻找可以从木质纤维素生产大宗、高值生物产品的方法是未来生物炼制工厂的核心问题。高值产品可以帮助生物炼制工厂改进投资回报率,实现经济可行性;大宗产品意味着广大的市场潜力,可以和燃料乙醇生产规模相匹配(例如,2019年全球燃料乙醇产量大约8700万吨^[20])。生产小宗高值产品对第二代生物炼制工厂在经济上帮助有限。比如,尽管可以利用木质素生产香兰素(一种广泛使用的高值可食用香料),但是它的市场规模太小,难以补贴多个第二代生物炼制工厂。

生物炼制工厂经济可行性的关键是联产高值生物产品,而其重大影响是在于大宗生物产品(如燃料和材料)的生产。比如,从半纤维素生产低聚木糖,是由2~7个木糖分子以 β -1,4-糖苷键结合而成的功能性聚合糖,它可以通过半纤维素部分水解得到。低聚木糖是一种重要的食品和饲料添加剂,其附加值远远超过葡萄糖和乙醇。它是有益肠道微生物(如双歧杆菌、丁酸梭菌)生长的碳源,促进益生菌增殖,同时生产多种有机酸,降低肠道pH值,抑制有害菌生长。随着各国禁止在动物饲料中添加抗生素,低聚木糖已经成为重要的饲料添加剂,减少甚至避免抗生素使用。中国山东龙力生物技术公司就是将低聚木糖作为纤维素乙醇生产的副产品进行开发和推广使用,目前其低聚木糖的生产规模已达万吨以上。

生物炼制工厂也可以将生产特定高值产品为主要产品,如健康糖。健康糖是一种几乎无热量、无脂肪、不含蔗糖的甜味剂,不会使人发胖,适用于任何人群,广泛用于冰淇淋、饮料、饼干等食品。健康糖主要分为糖醇产品(如木糖醇、D-木糖、L-阿拉伯糖、赤藓糖醇、麦芽糖醇、D-阿洛酮糖、D-塔格糖)、三氯蔗糖、阿斯巴甜、甜菊糖等。其中,木糖醇是一种低热量的健康糖,可以部分取代蔗糖(但是对狗有剧毒),其售价也比蔗糖高几倍。它的生产工艺是以玉米芯或其他木质纤维素(如桦树皮、甘蔗渣)为原料,半纤维素经过酸水解得到D-木糖,对纯化的D-木糖加氢合成得到木糖醇。现在,全球木糖醇总销量已达30万吨左右。丹麦丹尼斯克以及中国的华康药业

股份有限公司和山东福田是木糖醇的主要生产公司。L-阿拉伯糖是从玉米芯半纤维素水解生产木糖醇的副产物。它是一种纯天然的零热量健康糖，甜度为蔗糖的50%，对蔗糖代谢利用具有阻断作用，适用于任何人群，对肥胖症、糖尿病、高血糖、高血脂以及心脑血管病患者来说有预防和治疗作用^[29]。但是，L-阿拉伯糖产量少，因为原料来源有限且含量低。因此，L-阿拉伯糖作为新甜味剂没有得到广泛应用。

3 关于新生物炼制工厂的个人观点

人类社会的重大需求包括粮食安全、环境安全、大健康、能源安全等。粮食安全是中国基本国策。“手中有粮，心中不慌”，粮食安全与社会的和谐、政治的稳定、经济的持续发展息息相关。虽然中国粮食连续十多年取得丰收，但大量使用化肥，导致耕地板结、沙化、酸化。中国的粮食安全必须实施以我为主、立足国内、确保产能、适度进口、科技支撑的国家粮食安全战略。要依靠自己保口粮，集中国内资源保重点，做到谷物基本自给、口粮绝对安全。因此，中国需要不断拓宽新的粮食生产来源以应对可能的粮食危机。

利用生物技术生产非转基因人造食物的研究在美国和欧洲等发达国家和地区刚刚起步，但已经受到广泛关注。从人类食物的热量摄取来看，碳水化合物是膳食的最重要组成，占热量摄取的40%~80%。根据世界卫生组织的推荐，健康膳食中淀粉应该大约占热量摄取的60%。

中国每年大约消耗1500万吨蔗糖，每年进口约300万~400万吨蔗糖。2017年5月，中国商务部最终决定，对关税配额外进口食糖征收保障措施关税。淀粉制果糖正在部分取代蔗糖。但是，越来越多研究表明大量摄入果糖和蔗糖，特别是果糖，会导致肥胖、糖尿病、心血管疾病等^[30-31]。在海外，高果糖浆的生产和消费正在萎缩，大量食品开始标注无高果糖浆添加。

新生物炼制工厂能够将生物质（如秸秆）有效地转化为粮食和饲料（如人造淀粉、单细胞蛋白）、健康糖、大宗低值生物燃料、生物材料及其他高附加值的生物产品（图2），将有效地部分解决中国的粮食安全、环境安全、大健康等挑战。基于目前已有众多技术突破（如生物质预处理^[21, 32]、纤维素酶改进和酶发酵成本下降^[22-23]、多糖共同发酵^[24-25]、高效生产生物制品的代谢工程改造微生物^[33]），个人认为下一代生物炼制过程中最重要的三个技术突破可能是：

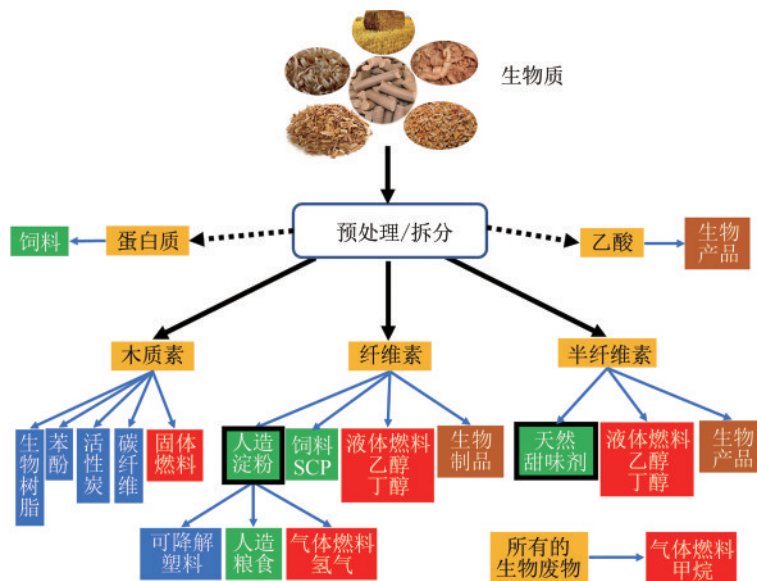


图2 基于生物质的未来生物炼制工厂生产粮食和饲料、健康糖以及多种生物产品（包括半纤维素衍生的产品）

Fig. 2 Scheme of lignocellulose-based new-generation biorefinery that can make multiple products from food & feed, sweeteners, materials to hydrogen, biofuels, biochemicals, and biomaterials.

(1) 为了增加在未来生物炼制工厂的ROI, 将生物质中的D-木糖转化为L-阿拉伯糖是生物炼制的最重要关键之一。首先, 利用D-木糖生产L-阿拉伯糖的增值倍数是利用D-木糖生产乙醇的5~10倍以上, 可以大幅改善生物炼制工厂的ROI。其次, L-阿拉伯糖作为纯天然甜味剂, 有着广大市场潜力, 可以到达每年几千万吨, 甚至1亿吨水平(参考超过1亿吨蔗糖的年产量和几千万吨高果糖浆的年产量)。第三, 天然L-阿拉伯糖的稀缺性和高价导致它没有被广泛接受。近来, 作者在中科院天津生物技术研究所的实验室通过对自然界的酶进行筛选寻找没有被报道过的戊糖碳4位差向异构酶, 利用酶的杂错性挑选出最好的碳4位差向异构酶, 建立D-木酮糖4位差向异构酶的高通量筛选方法, 利用定向进化大幅提高D-木酮糖4位差向异构酶的酶活, 反应速度已经可以满足工业生产。2019年, 作者提交了有关戊糖碳4位差向异构酶的中国专利申请以及PCT^[34]。该技术可以通过三个酶(D-木糖异构酶、D-木酮糖4位差向异构酶和L-阿拉伯糖异构酶)将D-木糖转化为L-阿拉伯糖; 该级联反应不需要辅酶, 不涉及氧化还原反应^[34]。该技术解决了自然界L-阿拉伯糖的来源有限、在半纤维素中含量低、分离成本高的难题, 为大规模从生物质生产L-阿拉伯糖铺平了道路。

(2) 为了降低生物炼制工厂的生产成本, 需要发展能更有效降解纤维素的新CBP微生物, 进一步降低纤维素酶的生产成本, 甚至可以有效降解没有或轻微预处理的生物质^[35]; 同时, 该微生物能够将各种糖(如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖)共同高效、高速发酵到所需的生物产品。另外, 这种微生物可以生长在便宜的工业培养基上; 菌体不含内毒素, 最好是GRAS的微生物, 可以作为SCP用作动物饲料的蛋白添加; 有着成熟的基因改造工具。满足以上要求的微生物现在并不存在, 这种新CBP微生物是下一个研究方向。

(3) 为了增加未来生物炼制工厂的生产灵活性, 将生物质中的(一部分)不可食用纤维素部分转化为人造淀粉。简单而言, 通过体外多酶分子机器和纤维素降解的微生物将预处理后生物质(如稻秆、麦秆等)一步法转化为人造淀粉、乙醇(或其他生物产品)以及单细胞蛋白^[19]。2015年,

作者发表论文, 显示了该想法的技术可行性^[19]。美国《科学》杂志请加州理工的弗朗西丝·阿诺德(Frances Arnold, 2018年诺贝尔化学家获得者)评论, 她写道:“该论文展示了一个重要的转换, 总体思路很酷。……但是, 该过程是否在经济上可行还是一个大问题。”^[36]总体而言, 该转化技术不消耗能源, 不需要昂贵的催化剂和反应器, 并且没有糖损失, 作者认为很有可能实现工业放大和生产。具体而言, “不消耗能源”代表高能源利用效率, “不需要昂贵的催化剂和反应器”代表低成本的催化剂和低设备投入以及工业放大的可行性, “没有糖损失”代表高原料利用率。为了解决该技术的生产成本问题, 需要解决有关酶的生产成本、延长酶的寿命和实现酶的循环利用三个技术难点。参考现有工业酶的生产成本(如纤维素酶和蛋白酶), 以及工业(高温)酶的寿命和固定化酶的循环利用(如葡萄糖异构酶), 作者认为以上三个技术挑战是可以解决的。

利用体外多酶分子机器可以生产与植物淀粉性质完全相同的合成淀粉。人造淀粉可作为动物饲料添加, 部分取代玉米饲料; 人造淀粉也作为工业发酵原料, 部分取代淀粉类粮食。将人造淀粉在淀粉产品中添加, 改变已有产品的口感和营养价值。大鼠实验已经证明人造直链淀粉和人造支链淀粉有着不同的升糖指数, 比天然淀粉更难被大鼠利用(未发表)。将人造淀粉制作人造大米, 难以降解的直链淀粉将是一种益生元, 不能被人体小肠吸收和利用的部分淀粉分子, 能够支持大肠中有益菌的代谢和增殖, 从而改善特殊人群(尤其是老人)的健康; 富含直链淀粉的饮食也是糖尿病易发人群的保健食品。进一步, 改变人造淀粉合成条件也可以生产与天然淀粉性质不同的新型淀粉, 可能具有一些新功能以及新应用。比如, 可控制链长和支链分布的人造淀粉作为药物缓释载体。直链淀粉可用于生产可降解的生物塑料膜, 尤其适合于食品和药品包装, 因为它的氧气透过率较低^[19]。人造淀粉也是高密度储能化合物, 其储氢密度高达14.8%(质量分数), 可以用于驱动氢-燃料电池汽车; 也是高能储电载体, 储电密度超过3 kW·h/kg^[37]。

新生物炼制工厂利用生物质生产粮食和饲料、

健康糖以及生物产品（如乙醇、丁醇以及生物材料等），可能将为中国和世界的农业和生物制造带来划时代变革。对于农业，从种植一年生的淀粉作物到种植多年生的非粮作物可能导致可持续农业的革命。种植多年生的非粮作物（比如草和树）比种植单年生的淀粉作物（粮食）有着十大优点：①生物质产量高，替代粮食生产的潜力大；②以量计算，现代农业是最大的废水生产部门，农业耗水大幅减少，一些半干旱的土地有可能将成为未来的粮仓；③大幅减少农业的投入，如化肥和农药使用，几乎不用翻耕，减少每年种子使用；④化肥利用率高，几乎彻底消除面源污染物污染（如化肥氮、化肥磷、土壤粉尘）；⑤种植多年生作物有利于保护土地，永久土层和根系形成将帮助改善土壤管理，几乎不会有水土流失和土地侵蚀；⑥种植多年生作物对种植条件（降水、温度、光照、肥力）要求低，粮食生产潜力将大大增强，实现粮食生产的绝对安全；⑦非粮生物质可以有着超长保存期，实现真正的“藏粮于山”“藏粮于林”；⑧种植多年生作物更能大幅减少碳排放，减少气候变化的影响；⑨种植多种多年生作物可以增加生物多样性，改善野生动植物栖息地；⑩多年生作物更耐受极端气候（比如干旱、洪水、高温、冰冻等）。

新生物炼制工厂也将有助于生物制造技术的革新。体外多酶分子机器将成为生化过程的新生产平台之一，可以实现高效、高速的生物转化。在很多应用上，它实现微生物发酵难以实现的生物转化。比如，体外多酶分子机器可以将纤维素高效率转化到淀粉；然而，微生物不能有效进行该转化，因为底物和产物都是高分子量的聚合物，难以通过细胞膜。

英国学者托马斯·马尔萨斯在他1798年出版的《人口论》里预言：人口会指数增长超越食物供应，导致人均占有食物减少，最弱者就会因此而饿死。但是，在过去二百多年，几个关键科学技术突破（比如，合成氨、农药、农业机械以及良种）和耕地的增加大幅提高了粮食产量，使马尔萨斯的预言落空。未来的生物炼制工厂将帮助实现“新农业的工业化”，在以市场需求为导向的前提下，用工业生物技术手段和生物炼制工厂，

对生物质进行深加工，用工业手段生产粮食、饲料、再生能源、材料以及各种生物产品。生物炼制工厂和种植多年生作物将再一次打破“马尔萨斯陷阱”^[38-39]。

4 结 语

王教授的学术生涯可以给我们三个重要的启示：①科研选题的重要性；②经济学决定生物产品产业化的可行性；③持续的科研经费资助对科技人员研发能力的提升，以及技术迭代积累的重要性。王教授一生中多次调整他的科研方向。为解决20世纪60年代的粮食需求，他研究单细胞蛋白的培养和分离。为解决80年代初的可再生液体燃料需求，他研究利用生物质生产第二代生物燃料。20世纪80年代，为解决大规模低成本生产蛋白药物，集中研究动物细胞培养技术。总之，他的科研生涯很好地体现了“社会需求决定科技发展的方向”。同时，尽管很多技术（如纤维素乙醇，利用甲烷生产SCP）可以在实验室实现，但是当外部环境改变（如石油价格上升或下降，粮食价格下降），经济学决定它们是否能工业生产。王教授将传统微生物发酵知识扩展到动物细胞培养中，最终动物细胞培养技术成为了生物制造的最关键平台之一。政府和企业对王教授的持续资助，尤其是他领导下的麻省理工学院生物技术过程工程中心（Biotechnology Process Engineering Center, BPEC），保证他的实验室的持续发展和创新能力，最终在动物细胞培养技术上获得最大的成功。

现在中国正面临重大挑战，粮食安全、能源安全、大健康以及环境保护等等。重大需求对新农业和生化工程、合成生物学的发展指出了新方向。全新的可持续农业革命可能导致从种植一年生粮食作物到种植多年生非粮作物的重大转变。种植多年生非粮作物比种植一年生粮食作物有着诸多优点：生物质产量高，减少农业水需求，减少化肥和农药投入，几乎不用翻耕，基本彻底消除农业面源污染，减少水土流失和土地侵蚀，大幅减少碳排放，实现碳固定，更耐受极端气候，以及增加生物多样性。体外多酶分子机器，合成

生物学分支之一,是生物制造的全新生产平台之一,该技术将众多酶元件、多酶模块、辅酶以及仿生辅酶构成全新多酶代谢途径,可以高效、高速、高得率地将底物转化为目标化合物^[40-44]。与微生物发酵相比,多酶分子机器具有很多优势,例如原子得率高、副反应少、反应速度快、可耐受有毒的环境、产品易分离、系统可操作性强等。与(多)酶催化相比,多酶分子机器能实现更加复杂的生物转化,大大地扩展传统酶催化的领域和利用。在很多工业应用上,它实现微生物发酵和酶催化难以实现的生物转化^[19, 45-50]。

种植多年生非粮作物和未来生物炼制工厂相结合,不仅将能源和农业紧密相连,农业需要能源,也产生能源;同时,推动地方粮食-能源生产体系整合,避免浪费,增加粮食和能源体系的总体生产力。大力推广健康糖的生产和使用不仅提高农民收入,而且促进人民健康,减少糖尿病、肥胖、心血管疾病等的发生率。未来生物炼制工厂将利用生物质生产粮食和饲料、健康糖以及生物产品,这为中国农业生产带来划时代变革,为中国的粮食安全提供新的思路;同时,新生物制造(如体外合成生物学)将加快各子领域科技创新,帮助掌握全球科技竞争先机。未来生物精炼厂和可持续农业革命可以解决我们时代面临的挑战,以满足能源-食品-水需求关系的不断增长。

致谢:本论文是在孙际宾研究员的鼓励下完成的,同时,我也感谢他和三个审稿人的宝贵修改意见。

参 考 文 献

- [1] AFEYAN N B, COONEY C L. Professor Wang Daniel I. C.: a legacy of education, innovation, publication, and leadership [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95: 206-217.
- [2] WANG D I C. Cell recovery in single-cell protein [M]// MATELES R, TANNENBAUM S. *Single cell protein*. Cambridge, MA, USA: MIT Press, 1968.
- [3] WISE D L, WANG D I C, MATELES R I. Increased oxygen mass transfer rates from single bubbles in microbial systems at low reynolds numbers [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1969, 11: 647-681.
- [4] WANG D I C, SINSKEY A J. Collection of microbial cells [M]// PERLMAN D. *Advances in applied microbiology*. Cambridge, MA, USA: Academic Press, 1970: 121-152.
- [5] WANG D I C, SONOYAMA T, MATELES R I. Enzyme and bacteriophage concentration by membrane filtration[J]. *Analytical Biochemistry*, 1968, 26: 277-287.
- [6] WANG D I C. Protein from petroleum [J]. *Chemical Engineering*, 1968, 75: 99.
- [7] AFEYAN N B, WANG D I C. A study of cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum* and its cellulase complex [C]// *Proceedings of the Third World Congress Chemical Engineering*. Tokyo, Japan: Contributors: Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering, Interamerican Confederation of Chemical Engineering, European Federation of Chemical Engineering, 1986.
- [8] AVGERINOS G C, WANG D I C. Direct microbiological conversion of cellulose to ethanol [M]// TSAO G T. *Annual reports on fermentation processes*. New York, NY, USA: Academic Press, 1980, 165-191.
- [9] SCHWARTZ R D, KELLER F A. Acetic acid production by *Clostridium thermoaceticum* in pH-controlled batch fermentations at acidic pH [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43: 1385-1392.
- [10] AUGENSTEIN D C, SINSKEY A J, WANG D I C. Effect of shear on the death of two strains of mammalian tissue cells [J]. *Biotechnology Bioengineering*, 1971, 13: 409-418.
- [11] GIARD D J, THILLY W G, WANG D I C, et al. Virus production with a newly developed microcarrier system [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 34: 668-672.
- [12] XIE L Z. Stoichiometric medium design and nutritional control in fed-batch cultivation of animal cells [D]. Cambridge, MA USA: Massachusetts Institute of Technology, 1997.
- [13] AUNINS J G, WOODSON B A Jr, HALE T K, et al. Effects of paddle impeller geometry on power input and mass transfer in small-scale animal cell culture vessels [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, 34: 1127-1132.
- [14] JUNKER B H, WANG D I C, HATTON T A. Fluorescence sensing of fermentation parameters using fiber optics [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 32: 55-63.
- [15] NESTAAS E, WANG D I C. Computer control of the penicillin fermentation using the filtration probe in conjunction with a structured process model [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1983, 25: 781-796.
- [16] CROUGHAN M S, WANG D I C. Growth and death in over-agitated microcarrier cell cultures [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, 33: 731-744.
- [17] MEIER S J, HATTON T A, WANG D I C. Cell death from bursting bubbles: role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999,

- 62: 468-478.
- [18] ZHANG Y-H P, SUN J, MA Y. Biomanufacturing: history and perspective [J]. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 2017, 44: 773-784.
- [19] YOU C, CHEN H, MYUNG S, et al. Enzymatic transformation of nonfood biomass to starch [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110: 7182.
- [20] Renewable Fuels Association. Global ethanol production [OL]. <https://afdc.energy.gov/data/10331>.
- [21] WYMAN C E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol [J]. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25: 153-157.
- [22] KLEIN-MARCUSCHAMER D, OLESKOWICZ-POPIEL P, SIMMONS B A, et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109: 1083-1087.
- [23] ZHANG Y-H P, HIMMEL M, MIELENZ J R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies [J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24: 452-481.
- [24] ZHANG M, EDDY C, DEANDA K, et al. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis* [J]. *Science*, 1995, 267: 240-243.
- [25] HO N W Y, CHANG S-F. Cloning of yeast xylulokinase gene by complementation of *E. coli* and yeast mutations [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1989, 11: 417-421.
- [26] LYND L R, WEIMER P J, VAN ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66: 506-577.
- [27] ZHANG Y-H P, LYND L R. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102: 7321-7325.
- [28] LU Y, ZHANG Y-H P, LYND L R. Enzyme-microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 16165-16169.
- [29] ANTILA J, RAVANKO V, WALLIANDER P. Method of preparing L-arabinose from sugar beet pulp: US6506897B1[P]. 1997.
- [30] LANASPA M A, ISHIMOTO T, LI N, et al. Endogenous fructose production and metabolism in the liver contributes to the development of metabolic syndrome [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2434.
- [31] MULLEE A, ROMAGUERA D, PEARSON-STUTTARD J, et al. Association between soft drink consumption and mortality in 10 European countries [J]. *JAMA Internal Medicine*, 2019, 179 (11): 1479-1490.
- [32] HE Y, ZHANG J, BAO J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 158: 360-364.
- [33] ATSUMI S, HANAI T, LIAO J C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels [J]. *Nature*, 2008, 451: 86-89.
- [34] 张以恒, 周伟. D-木酮糖 4-差向异构酶、其突变体及其用途: CN113122528A[P]. 2021.
- ZHANG Y H, ZHOU W. D-xylulose 4-epimerases, their mutants and their applications: CN113122528A[P]. 2021.
- [35] YANG S-J, KATAEVA I, et al. Efficient degradation of lignocellulosic plant biomass, without pretreatment by the thermophilic anaerobe *Anaerocellum thermophilum* DSM 6725 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 4762-4769.
- [36] CHOI C. Could wood feed the world [EB/OL]? *Science*. 2013-4-15. <https://www.sciencemag.org/news/2013/04/could-wood-feed-world>.
- [37] ZHANG Y-H P, HUANG W-D. Constructing the electricity-carbohydrate-hydrogen cycle for a sustainability revolution [J]. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30: 301-306.
- [38] STOKSTAD E. Will malthus continue to be wrong [J]. *Science*, 2005, 309: 102.
- [39] CHEN H-G, ZHANG Y-H P. New biorefineries and sustainable agriculture: increased food, biofuels, and ecosystem security [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 47: 117-132.
- [40] ZHANG Y-H P. Production of biocommodities and bioelectricity by cell-free synthetic enzymatic pathway biotransformations: challenges and opportunities [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105: 663-677.
- [41] ZHANG Y-H P. Simpler is better: high-yield and potential low-cost biofuels production through cell-free synthetic pathway biotransformation (SyPaB) [J]. *ACS Catalysis*, 2011, 1: 998-1009.
- [42] ZHANG Y-H P, MYUNG S, YOU C, et al. Toward low-cost biomanufacturing through cell-free synthetic biology: bottom-up design [J]. *Journal of Material Chemistry*, 2011, 21: 18877-18886.
- [43] ROLLIN J A, TAM W, ZHANG Y-H P. New biotechnology paradigm: cell-free biosystems for biomanufacturing [J]. *Green Chemistry*, 2013, 15: 1708-1719.
- [44] ZHANG Y-H P. Production of biofuels and biochemicals by *in vitro* synthetic biosystems: opportunities and challenges [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33: 1467-1483.
- [45] ZHANG Y-H P, EVANS B R, MIELENZ J R, et al. High-yield hydrogen production from starch and water by a synthetic enzymatic pathway [J]. *PLoS One*, 2007, 2(5): e456.
- [46] KIM J-E, KIM E-J, CHEN H, et al. Advanced water splitting for green hydrogen gas production through complete oxidation

- of starch by *in vitro* metabolic engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 44: 246-252.
- [47] ZHU Z G, TAM T K, SUN F F, et al. A high-energy-density sugar biobattery based on a synthetic enzymatic pathway [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3026.
- [48] ZHONG C, YOU C, WEI P, et al. Thermal cycling cascade biocatalysis of *myo*-inositol synthesis from sucrose [J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7: 5992-5999.
- [49] KIM E-J, KIM J-E, ZHANG Y-H P J, et al. Ultra-rapid rates of water splitting for biohydrogen gas production through *in vitro* artificial enzymatic pathways [J]. *Energy and Environmental Sciences*, 2018, 11: 2064-2072.
- [50] HUANG R, CHEN H, UPP D M, et al. A high-throughput method for directed evolution of NAD(P)⁺-dependent dehydrogenases for the reduction of biomimetic nicotinamide analogues [J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9: 11709-11719.



通讯作者: 张以恒(1971—),男,博士,中国科学院天津工业生物技术研究所(客座)研究员,曾是美国弗吉尼亚理工大学生物系统工程学的助理教授、副教授和教授。1993年和1996年获得华东理工大学生物工程专业学士和硕士学位;2002年获得美国达特茅斯学院化学工程专业博士学位。生物技术与生物工程王义翹教授奖(Biotechnology & Bioengineering, Daniel I.C. Wang Award)获得者(2010年),还曾获得杜邦青年教授奖(2008)、美国空军青年研究员奖(2008)、美国农业生物工程学会新奇士青年工程设计师奖(2009)等。主要研究方向为生物炼制工厂、体外合成生物学、酶工程、代谢过程和新能源-粮食体系(糖-氢-电循环)。

E-mail: yhjob_zhang@outlook.com