



从碳代谢流角度新解代谢工程策略

郑艺^{1†}, 王志鹏^{2†}, 王鑫^{3*}, 黄炎和^{1*}, 林金石¹

1. 福建农林大学资源与环境学院, 福州 350002;

2. Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station TX 77840, USA;

3. Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University, College Station TX 77843, USA

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: xwang@tamu.edu; yanhehuang@163.com

收稿日期: 2017-02-19; 接受日期: 2017-03-01; 网络版发表日期: 2017-03-16

国家科学支撑计划(批准号: 2014BAD15B0303)和福建省自然科学基金(批准号: 2015J01156)资助

摘要 代谢工程通过改造微生物代谢过程, 进而利用微生物生产各种有用的医药、化学产品及工业原料. 本文从细胞代谢中碳代谢流的角度入手, 将代谢工程的传统与新型策略进行分类解析. 其中, 传统代谢工程手段主要对目标代谢路径的关键酶进行改造, 通过过表达或基因敲除增大目的代谢路径碳代谢流. 然而, 在代谢路径改造需要进行多基因表达的情况下, 传统手段在如何最佳表达多种酶使碳流通畅上会受到很大限制. 本文提出利用高碳流路径, 通过简单基因改造以获得高效目标产物生产的新策略. 同时, 随着合成生物学与系统生物学的发展, 精细调控多基因表达成为可能. 本文进一步举例讨论了代谢工程中粗略与精细调控基因表达水平对碳流的影响, 以期对教学与前沿科研有助.

关键词 代谢工程, 碳流, 微生物, 生物能源

利用微生物发酵生产各类化学化工产品是现今工业生产中很重要的一个组成部分^[1]. 除了已经广泛应用的医药领域, 微生物发酵正逐步应用于很多其他的新型产业, 例如, 利用微生物发酵进行生物能源的生产, 利用藻类发酵生产次级代谢产物等. 与此同时, 高价值产物的微生物发酵生产也有着广泛的应用前景^[2].

利用代谢工程对微生物进行菌种改造是微生物发酵中的重要工艺, 因此有效的代谢工程手段对整个发酵工艺起着关键的作用. 然而代谢工程通常面临产物产率低, 酶促反应效率不高等一系列问题. 传统代谢工程的方法本质上是通过代谢步骤中限速酶进

行过表达, 从而提高目标产物的产率^[3]. 对单一限速酶的过表达较易控制, 通常也会对产率提升有一定的促进作用. 但是假使代谢途径中有若干限速酶, 这种传统方法则面临对酶表达量不可控等问题.

提高目标产物产量从原理上讲是尽可能多地将底物转化为产物. 这种从底物到产物的代谢最大化, 就是代谢中的碳流问题(carbon flux). 当碳流无法很顺畅地从底物到达目标产物时, 很可能造成代谢中间产物的积累, 激活细胞反馈抑制等调控机制, 反而降低整体代谢路径的碳流, 最终无法实现有效地生产目标产物. 在微生物代谢中, 各类代谢路径的天然碳流并不相同, 某些代谢路径具有天然的高碳流. 这

引用格式: 郑艺, 王志鹏, 王鑫, 等. 从碳代谢流角度新解代谢工程策略. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 262–270

Zheng Y, Wang Z P, Wang X, et al. Hijacking high-flux metabolic pathways to enhance product yield in metabolic engineering. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 262–270, doi: [10.1360/N052017-00031](https://doi.org/10.1360/N052017-00031)

些路径通常属于主代谢路径. 这些主要代谢路径包括糖酵解路径, 许多氨基酸代谢路径, 以及糖存储路径, 如蔗糖的合成等. 而次级代谢路径则具有较低的碳分流(图1). 美国Northeastern University教授Barabási研究组^[4]在其代表性的网络理论学分支网络生物学中指出, 细胞代谢有很多代谢路径属于高碳流路径(high-flux backbone pathways). 这一理论的提出对代谢工程有着重要的指导意义^[5]. 本文从碳流的角度对代谢原理进行分析, 对微生物改造中代谢工程的方法论进行讨论, 希求对后续微生物发酵中菌种改造研究有所指导. 另外, 具体利用微生物发酵生产各类产物的综述文章不胜枚举, 在此不再赘述.

1 传统代谢工程中优化代谢路径的主要手段

传统代谢工程方法的本质是针对代谢路径中的限速步骤与之对应的限速酶进行优化, 包括基于对关键酶的酶量和酶活的控制. 通过对关键酶的过表达, 可以有效地提高酶促反应的速率, 增加该代谢路径的碳流, 从而积累反应产物. 这种优化代谢路径的方法可以视为一种从微观或者战术的角度去优化代谢路径.

1.1 代谢路径中限速酶的过表达

微生物中次级代谢产物的生物合成一般具有复杂的多步骤代谢路径, 通常会有一个或数个步骤由于酶的表达含量低或活性差而成为整个通路的限速步骤, 而细胞代谢中也常会通过对这些步骤的酶进行精细调控, 从而影响整个代谢路径的碳流. 传统方法中

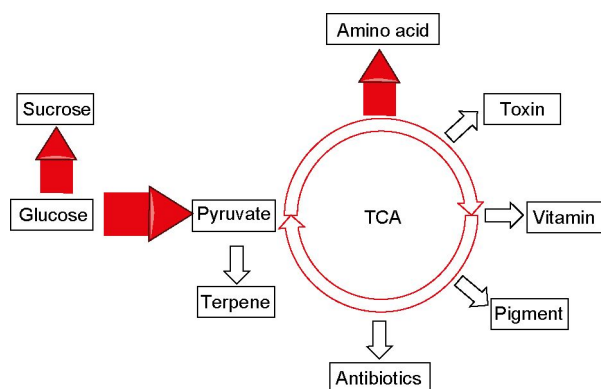


图1 微生物代谢过程中的碳流示意图
红色箭头表示某些高碳代谢流的代谢路径

最为经典的对限速步骤的改进是直接对限速酶的过表达. 该方法的优势在于对症下药, 直接优化特定步骤. 但酶的过度表达也可能带来其他问题, 例如, 过高表达酶量可能会导致其无法正确折叠而形成包涵体等负面结果. 此外, 有些代谢路径整体速率较低并不是由于一个特定的限速酶, 而是存在若干个限速步骤, 并且这些限速步骤很可能受不同代谢机制的调控. 此时, 对这些限速步骤进行酶量的过表达并不能起到提高碳流的作用, 因此不会对整个代谢路径产生有效的促进作用.

萜类化合物作为微生物的一种重要次级代谢产物, 具有复杂的多步骤生源合成途径. 由于很多高经济价值的产物或前体都来自萜类, 故而对于各类萜类化合物生源合成的探索与优化一直是一个重要的科学问题^[6]. 例如, 紫杉醇(taxol)作为重要的抗癌药, 其半合成依赖于特定前体紫杉二烯(taxadiene)的代谢路径. 该过程由萜类合成前体异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)/焦磷酸二甲基烯丙酯(γ -dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)起始, 在GGPP(geranylgeranyl diphosphate)合成酶和紫杉二烯合成酶的催化下转化为紫杉二烯.

长期以来, 由微生物发酵生产紫杉二烯很难达到理想的产量, 究其原因不乏对萜类前体异戊烯焦磷酸/焦磷酸二甲基烯丙酯合成路径的了解匮乏. 在大肠杆菌或很多其他微生物中, 这类前体由非甲羟戊酸路径(MEP pathway)合成, 将糖酵解产生的3-磷酸甘油醛(glyceraldehyde-3phosphate, G3P)/丙酮酸(pyruvate)经多步骤转化得来. 虽然该路径中的代谢酶早在2000年左右就已经全部阐释, 但人们仍然对其调控机制知之甚少. 研究表明, 该路径可能受到多种形式的调控^[7], 对个中关键酶的说法也不一. 另外, 下游GGPP合成酶和紫杉二烯合成酶也都属于酶活较低的步骤. 同时有研究表明, GGPP合成酶这一步很可能对重新分流萜类前体起着很关键的作用^[8]. 对该路径中各个限速酶的单一过表达, 往往差强人意, 不能有效提高非甲羟戊酸路径的整体碳流. Stephanopoulos研究组^[9]于2010年创新性地提出了一种调和模式的限速酶过表达研究法. 他们将整个代谢过程分为上游模块(异戊烯焦磷酸的生源合成)与下游模块(紫杉二烯的生源合成), 并将两个模块中已知的限速步骤酶分别克隆到不同的质粒载体上(图2). 此时, 整个过程就变成了两

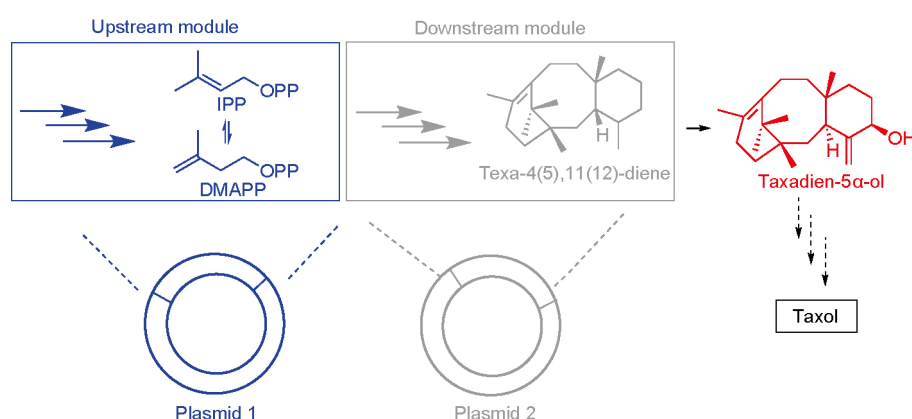


图2 大肠杆菌中通过双模块粗调基因表达水平以生产紫杉二烯(网络版彩图)

大模块间的协同调和. 通过控制两套质粒表达系统启动子活性及拷贝数, 这两个模块的酶表达水平也可以得到调节. 该研究组测试了30多种不同的配比, 最终优选出两个模块在保持良好协同性的前提下的最大产物表达. 通过研究这些不同的菌株, 他们还发现如果碳流无法顺畅地由上游传到下游模块路径, 还有可能会导致有毒中间产物吲哚(indole)的积累, 从而对细胞生长产生负面影响.

1.2 翻译后修饰对碳流的影响

随着蛋白质组学与表观遗传学的深入研究, 人们发现很多重要的代谢酶类都存在各种各样的翻译后修饰. 例如, 赖氨酸乙酰化和甲基化广泛存在于胞质蛋白、组蛋白和膜蛋白上; 棕榈酰化、肉豆蔻酰化常可以将蛋白或酶类固定于细胞膜类结构表面; 而最新发现的丙二酰化(缩苹果酰)、丁二酰化(琥珀酰)、戊二酰化、 β -羟基丁酰化、2-羟基异丁酰化与4-羰基正壬酰化等有待深入研究. 这些翻译后修饰可以通过改变对应酶的结构、折叠状态、与其他蛋白质的相互作用、与底物的相互作用等多种渠道改变其催化活性^[10]. 而这些翻译后修饰的引入、识别与脱除本身也受到对应酶的精细调控. 尤其在最新的一些翻译后修饰方式发现之后, 人们逐渐认识到这可能是一种直接沟通基因表达与细胞新陈代谢的途径.

在细胞代谢过程中, 很多关键酶的活性可能受翻译后修饰的直接调控. 例如, 细菌的糖酵解、三羧酸循环等重要代谢过程的酶都存在多种翻译后修饰. 其中, 乙酰化、磷酸化等对酶活与蛋白-蛋白相互作用都有至关重要的调控作用^[11]. 因此, 人们在代谢工程中

对酶的翻译后修饰的控制也会影响目标产物的产量. 常用的调控手段如过表达对应底物酶的修饰酶或低表达对应底物酶的去修饰酶以增加其翻译后修饰水平; 而过表达去修饰酶或低表达修饰酶则会降低翻译后修饰水平. 例如, 在脂质代谢中, 磷酸丙酮酸二激酶(phosphoric acid pyruvate kinase, PPDK)作为糖酵解与糖异生过程中的关键酶, 其本身也受到磷酸化的调控. 通过提高PPDK的苏氨酸磷酸化水平, 脂质的生物合成产量大为提高^[12]. 另外, 一些非代谢的酶可以通过与代谢酶的蛋白-蛋白相互作用影响代谢过程. 这些酶如果同时受翻译后修饰的调控, 则认为改变这些非代谢酶的翻译后修饰也会对目标产物的产生有影响^[13].

1.3 代谢路径中酶对底物的立体选择性调控

随着人们对酶促反应与选择性的研究逐渐深入, 人们认识到限速酶之所以存在活性低与速率慢等问题, 另一个可能原因是其底物存在结构异构性^[14]. 这一问题在代谢工程中尤其容易出现, 究其原因主要是因为对很多关键酶的选择性问题. 在代谢工程中, 为了降低细胞本身对关键酶的调控, 很多情况下会选择外源物种的同一类酶进行过表达, 以提高该关键酶的活性并减少宿主细胞对该酶的调控. 如果对所选不同物种中酶的反应性质不是很清楚, 很可能由于立体选择性导致前一步酶促反应的产物与下游酶不协调, 从而降低催化效率. 研究发现, 对异构酶的选择有时会对整个代谢路径的碳流产生极大的影响.

生物能源是最近发展出来的新型能源. 作为由微生物代谢产生的绿色高效清洁有机物, 生物能源具备代替石油化学品的潜质. 例如, 正丁醇就是一

种良好的汽油代替物, 其生源合成一直缺乏有效的手段, 很难达到预期的效果. 正丁醇可以由梭菌属的很多微生物(*Clostridium acetobutylicum*)天然合成, 但是产率较低. 科研人员将该菌种中的丁醇代谢途径转入易于工业发酵的大肠杆菌或者酵母中, 也一定程度上实现了正丁醇的有效生产. 加州大学伯克利分校Chang研究组^[15]通过对丁醇合成路径重新组装, 在大肠杆菌中加入了一套非天然的丁醇合成路径, 其丁醇产率较之前工作也显著地提高. 该研究组的丁醇合成路径整合了 *Ralstonia eutrophus* 菌种中多聚羟基烷酸(polyhydroxyalkanoates)的部分合成酶将乙酰乙酸辅酶A(CoA)通过两步反应转化为3-羟基丁酰辅酶A(3-hydroxybutyryl-CoA), 其中第二步的催化酶为乙酰乙酰辅酶A还原酶(PhaB)或3-羟基丁酰辅酶A脱氢酶(Hbd). 进而利用 *C. acetobutylicum* 的巴豆酸酶(crotonase, 缩写为Crt)或巴豆酰辅酶A水合酶(PhaJ)将3-羟基丁酰辅酶A脱水生成烯酰辅酶A(enoyl-CoA). 他们接着利用了 *Streptomyces collinus* 中的巴豆酰辅酶A(crotonyl-CoA)还原酶以及 *C. acetobutylicum* 的多功能脱氢酶(butyraldehyde and butanol dehydrogenase)将巴豆酰辅酶A最终转化为正丁醇. 虽然该合成路径整合了多种微生物的代谢酶, 但是设计思路都是按照如何将丁醇碳流最大化的角度出发的. 该研究涉及了对酶选择的多种原则介绍, 在此不一一赘述. 值得一提的是其中对3-羟基丁酰辅酶A和巴豆酰辅酶A反应步骤中酶的选择极为关键. 该工作反复替换了不同细菌中多种还原酶, 发现各种酶对底物异构的立体选择性将对整体代谢碳流起关键的作用(图3).

2 改造天然高碳流代谢路径以提高目的产物产率

通过对目的产物的代谢路径进行改造来获得高

产率的设计思路是传统代谢工程最常用的研究方法. 大多数情况下, 这种方法也是获得目标产物的唯一路径, 但是这种传统方法受限于所选代谢路径的天然碳分流. 虽然可以通过以上方法增大这些代谢路径的碳流量, 最终也只能达到该路径的饱和值. 以上提到的萜类生产所利用的MEP代谢路径就是很好的例子, 该路径在很多微生物自然代谢条件下只有1%或更少的碳分流^[16], 最终产物的得率也因此受限于此.

传统代谢工程发展至今, 很多工作都围绕以上传统代谢工程手段进行优化, 从而获得高产率. 与此同时, 过去几年发表的一些代谢工程研究也体现出了另一种新的代谢工程设计思路, 并取得了颇优的效果. 本文在此加以提炼, 希望可以给代谢工程研究工作者提供新的启迪. 这种设计思路是通过很多天然高碳流代谢路径进行代谢工程改造, 通过分流这些高碳流以获得较高的产物得率. 相比以上传统代谢工程, 这种设计思路可以说是从战略上对代谢路径进行优化. 需要指出的是, 传统代谢工程的手段主要是针对代谢途径中特定限速酶的优化. 与这种新型代谢工程手段相比, 传统手段并不一定是建立在低碳流的代谢途径. 一些传统的代谢工程本身就建立在高碳流的路径上, 如前文提到的EMP, PPP, TCA路径等.

2.1 通过改造蓝细菌三羧酸循环路径生产乙烯

乙烯是重要的植物激素, 在刺激果实成熟、开花等代谢过程中起着重要的作用. 同时, 乙烯是工业生产的重要原料, 以乙烯为底物可以合成塑料等多种工业产品. 乙烯还可以进行多聚反应生产汽油组分, 是能源产业的重要组成部分. 相比工业生产乙烯的传统路径, 生物合成乙烯是比较新颖的乙烯合成路径, 也有利于乙烯的可持续利用.

乙烯可通过多种路径合成. 在植物体中, 乙烯合成

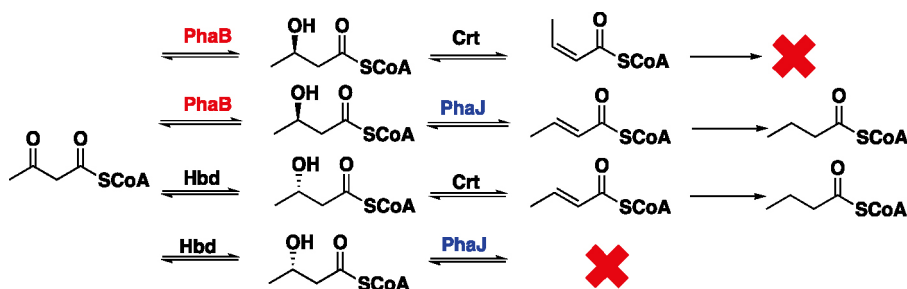


图3 正丁醇合成中的酶的底物立体选择性对碳流的影响(网络版彩图)

路径由甲硫氨酸开始, 通过3步反应经由S-腺苷甲硫氨酸、氨基环丙烷羧酸合成乙烯(图4A)。大多数微生物也可以从甲硫氨酸开始合成乙烯, 由NADH:Fe(III)氧化还原酶(NADH:Fe(III)EDTA oxidoreductase)催化经过2步反应合成乙烯。但该反应效率较低, 在代谢工程中应用价值受限。相反, 某些植物病原菌利用了一套完全不同的乙烯合成路径, 可以直接由乙烯合成酶(ethylene-forming enzyme)将三羧酸循环的中间产物 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate)转化为乙烯。由于该酶可以一步合成乙烯, 很多研究组尝试利用不同微生物进行发酵生产乙烯, 但收效甚微。美国国家可再生能源实验室的Yu研究组^[17]利用蓝细菌为介质, 通过优化密码子选择, 将乙烯合成酶基因中易突变区域进行修复, 增加了该酶表达的稳定性, 并首次在蓝细菌*Synechocystis* sp. PCC 6803中实现了高效乙烯生产。该项工作充分显示了代谢工程在微生物改造中的优势。

从代谢工程的技术手段来看, 以上蓝细菌乙烯合成的研究并没有使用特别复杂的分子生物学工具。该项工作的重要意义在于其首次成功地利用三羧酸循环中间产物, 进行目的产物的高效生产。三羧酸循环是细胞有氧代谢中产生能量的主要代谢路径, 在细胞整体代谢中起着不可或缺的作用。从代谢路径改造的角度来说, 利用三羧酸循环中间产物可以利用其天然的高碳分流, 从而实现目的产物的高产量。相比其他生物中的三羧酸循环, 大部分蓝细菌的三羧酸循环路径并没有形成完整的循环路径。由于该类细菌缺少酮戊二酸脱氢酶(2-oxoglutarate dehydrogenase), 其不能有效地将三羧酸代谢中间产物 α -酮戊二酸转化为琥珀酸辅酶A(succinyl-coenzyme A)。相反, 该类微生物通常为利用另外一套酶系统, 通过酮戊二酸脱羧酶(2-oxoglutarate decarboxylase)和琥珀酸半醛脱氢酶(succinic semialdehyde dehydrogenase)将酮戊二酸转化为琥珀酸, 从功能上形成完整的蓝细菌三羧酸循环路径^[18]。正是由于这种特殊的三羧酸循环路径, 蓝细菌通常情况下进入到三羧酸循环的碳分流受到一定的限制。Yu研究组成功实现了利用三羧酸循环高效生产乙烯的难题。他们在后续工作中对这株乙烯生产蓝细菌进行了整体代谢流分析^[19], 希望从中获得该蓝细菌可以支撑高效乙烯生产的进一步证据。研究表明, 由于乙烯合成酶在生产乙烯的同时, 还产生副产物琥珀酸, 蓝细菌因此在生产乙烯的同时, 本身的三羧酸代

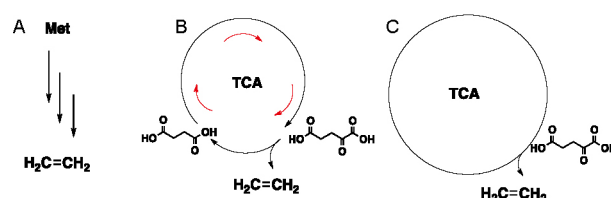


图4 通过分流高代谢流的三羧酸循环进行乙烯合成(网络版彩图)

A: 传统乙烯合成路径示意图; B: 蓝细菌中利用乙烯合成酶合成乙烯, 同时将三羧酸循环形成完整回路; C: 其他微生物或真核细胞中通过稳定乙烯合成酶的表达, 利用完整的三羧酸循环进行乙烯合成

谢路径也得到了有效的刺激。在形成完整回路的同时, 极大地增加了三羧酸循环在整体代谢中的碳分流, 因此也提高了乙烯的产量(图4B)。

在此项工作之前, 很多其他研究组也尝试利用了多种不同微生物, 包括酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[20]和其他类真菌, 通过乙烯合成酶进行乙烯的生产, 但效果都不是很显著。很多研究组也尝试过利用光合蓝细菌实现了乙烯的生产, 但是结果显示乙烯合成酶的表达很不稳定, 导致产率也较低。Yu研究组利用光合蓝细菌的出发点是进行生物能源的生产, 通过光能固定二氧化碳, 从而避免使用糖类作为发酵底物。相比之前的研究, 该项工作取得的进展主要取决于对碳分流中关键问题的解决。当然, 不同微生物三羧酸循环的代谢流会有一定的差异, 但相比各自的整体代谢路径来说, 都属于高碳流路径。之前研究组之所以未能实现高效的乙烯生产, 很大程度上取决于其乙烯合成酶未能有效地对主代谢碳流进行分流。若对乙烯合成酶进行类似的改造, 相信在三羧酸循环完整的其他异养微生物系统中应可以取得类似的高效乙烯生产(图4C)。

此外, Tao研究组^[21]也通过类似思路, 利用三羧酸循环的中间产物酮戊二酸将盘尼西林G转化为苯乙酰-7-氨基-3-脱乙酰氧基头孢烷酸(G-7-ADCA), 同样获得了很高的产量。所不同的是, 该研究还对G-7-ADCA的生产进行了进一步优化, 主要通过多步基因敲除, 阻断大肠杆菌原有三羧酸循环的碳流并减少盘尼西林G的降解, 最终最大化通向目标产物G-7-ADCA的碳代谢流。

2.2 通过改造大肠杆菌氨基酸代谢路径生产高级醇类

由微生物发酵生产各类能源替代产物是生物能源

的重要组成部分. 生物能源的发展经历了3个时期. 早期以玉米(*Zea mays* L.)、甘蔗(*Saccharum officinarum*)等高糖原料为发酵底物实现了酒精的生产, 第二代能源以木质纤维素生物质(lignocellulosic biomass)为原料, 通过改性木质素结构^[22], 并进行微生物发酵生产包括酒精在内的各类能源替代产物. 同时, 由于大型藻类木质素含量较低, 很多研究组也通过提取其糖类作为微生物发酵原料^[23,24]. 此外, 利用高油微藻生产生物柴油是第三代生物能源的主要研究方向. 虽然目前第二、三代生物能源还在发展阶段, 早期酒精的生产早已应用到日常的生活当中. 在巴西, 酒精是主要的能源组分. 美国大部分汽油中也含有10%左右的酒精. 酒精之所以被选为生物能源的首选产物, 很大程度上取决于人们对其代谢路径的熟悉, 以及其高效的微生物发酵效率. 但是酒精能量含量较低, 同时其吸水性较强, 对存储和运输带来较多麻烦, 因此最终无法成为汽油的替代品. 相反, 高级醇类(C4和C5醇)具有与汽油相匹配的能量含量, 无吸水性并相较于酒精不容易挥发, 是汽油替代产物中的重要组分.

能够天然生产高级醇类的微生物极少, 很多时候只是在微生物代谢产物中可检测到微量的高级醇类, 通过微生物转化糖类生产高级醇类的例子更是微乎其微. 加州大学洛杉矶分校Liao研究组^[25]通过设计非天然高醇合成路径, 实现了在微生物中通过转化糖类进行各类高级醇类的生产. 该项研究中, Liao研究组利用了大肠杆菌中支链氨基酸代谢的中间产物 α -酮酸(2-keto acid), 并结合 α -酮酸的降解路径(ehrlich pathway), 对各类支链氨基酸产生的 α -酮酸进行脱羧和脱氢反应, 最终形成长链醇类. 其中脱羧和脱氢反应分别由各类广谱的 α -酮酸脱羧酶(2-ketoacid decarboxylase)和醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)实现. 这一设计思路也得益于其对乙醇代谢路径的根本理解. 在微生物乙醇发酵中, 乙醇由丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase)和乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)来实现. 在新的代谢路径设计思路中, 只不过将丙酮酸替换成了氨基酸代谢中的各类 α -酮酸. 例如, 通过延伸大肠杆菌缬氨酸(valine)的代谢产物 α -酮异戊酸(2-ketoisovalerate)可生产异丁醇. 利用苏氨酸(threonine)的代谢产物3-甲基-2-氧基戊酸(2-keto-3-methyl-valerate)也可合成2-甲基-1-丁醇. 以此类推, 各种高醇类, 诸如1-丁醇、3-甲基-1-丁醇、1-戊醇等都可利用该路径进行合成(图5).

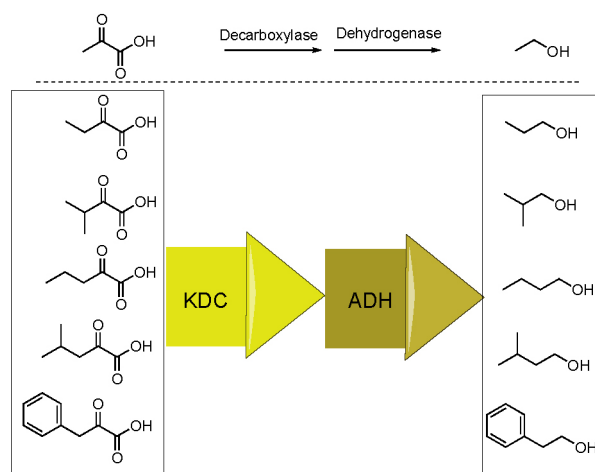


图5 借鉴乙醇生源合成路径及氨基酸合成路径生产高醇(网络版彩图)

利用该合成代谢路径, Liao研究组实现了多种高醇的微生物生产. 但如果仅满足于在微生物中实现这些醇类的合成, 无法获得高产率的话, 将难以用于工业生产. 上述工作设计思路的另一个巧妙之处是通过微生物体内某些高效的氨基酸代谢路径进行改造, 利用这些代谢中天然的高碳流实现了目的产物的高效生产. 当然, 正如上节中提到的三羧酸循环生产乙烯一样, 这种外源加入的代谢路径必须满足一个必要条件, 就是可以对微生物体内的天然高碳流路径进行高效地碳分流. 对主代谢碳流的分流则取决于非天然路径中酶的选择性. 例如, 在高醇生产中, 对 α -酮酸脱羧酶和醇脱氢酶的选择则至关重要. 因此, 在代谢工程应用中, 通过选择组合不同微生物中各种 α -酮酸脱羧酶和醇脱氢酶, 从而特异性地实现某些高醇类的高效生产.

3 代谢路径改造中对碳流的精细调控

以上提出的传统及新型代谢工程的设计思路分别从“微观”及“宏观”角度对特异的代谢路径进行改造, 但是在对酶的表达中都属于粗调控. 在现今代谢工程中, 外源基因的表达通常都是通过引入质粒表达系统, 或者通过基因组整合将外源基因引入宿主细胞. 这些外源基因的表达水平因此受到所选启动子对基因表达的控制. 在原核生物的表达中, 外源基因的表达在很大程度上还限制于核蛋白结合位点(ribosomal binding

site)的强弱. 在大多数情况下, 外源基因的表达只是利用科研人员熟知或常用的表达载体, 从而对基因表达水平进行一刀切. 对单一外源基因的表达可以利用该手段, 通过选择表达载体来控制“强”或者“弱”表达两种状态, 从而达到适合的外源基因表达水平. 但是在多基因代谢中, 这种手段就会受到较大的限制, 由于无法精细控制多个外源基因的表达水平, 可能会造成中间产物积累, 无法形成顺畅的碳流, 从而无法实现目的产物的高效生产. 同时, 很多中间产物的积累还有可能对细胞产生毒性, 不利于细胞生长(图6). 以上萜类生产的MEP代谢路径中由于碳流不畅导致吡咯积累, 就是一个很好的例子.

在这种情况下, 近年来迅猛发展的很多合成生物学手段则可以起到意想不到的效果. 当然, 合成生物学还处于发展初期, 各类工具也有待开发, 在此不一一枚举. 下面以一例代谢工程中精细调控基因表达水平的研究, 对合成生物学在代谢工程中精细调控基因表达加以介绍. 以上提到的紫杉醇前体合成路径中, 大肠杆菌利用其很重要的一个次级代谢路径, 非甲羟戊酸路径(MEP pathway)来合成萜类的C5前体. 由于对该路径调控机制知之甚少, 同时其天然碳流较低, 因此代谢工程中很难利用这里萜类的前体高效合成目的产物. 利用传统的代谢工程手段表达非甲羟戊酸路径中的限速酶经常无法收到预期的效果, 不仅无法提高该路径的碳分流, 大多情况下, 还会造成有毒中间产物的积累. 哈佛大学Church研究组^[26]利用合成生物

学手段, 成功实现了基因组多基因的精细调控, 从而在大肠杆菌中实现了番茄红素(lycopene)的高效生产.

Church研究组的设计思路整合了基因工程及加速进化(accelerated evolution)的手段, 巧妙地将多达20多个基因进行同时精细调控. 他们的设计思路主要通过对所选基因核蛋白结合位点的强弱控制来实现基因调控. 在该项研究中, 他们选择了20个合成番茄红素代谢中的主要基因, 并通过利用强弱不一的通用核蛋白位点(degenerate RBS sequence)来取代这些基因天然的核蛋白结合位点, 从而对这些基因的表达水平进行控制. 另外, 他们还选择了4个基因进行无义突变(nonsense mutations), 进一步增加非甲羟戊酸路径的碳分流. 这种设计给每一个所选基因提供了多达2000多种表达水平的选择, 20个基因则有达 4.7×10^5 种表达水平的选择. 最终, 研究人员将这些序列引入大肠杆菌, 生成了大约150亿个不同的基因表达体. 由于番茄红素具有鲜红的颜色标记, 通过对菌落颜色的识别就可以鉴定各个基因在何种表达水平下可以最有效地进行番茄红素的合成. 该项研究突显出了合成生物学在代谢工程中的强大优势, 也给后续他人的代谢工程研究提供了一个有效的合成生物学手段.

4 结论与展望

人类生产生活中很多重要的化学品都可以由代谢工程产生, 但是微生物在产出这些异源化合物时常效率低下. 如何使用代谢工程的方法提高理想产物的产量是一个重要的科学挑战. 代谢工程的方法总体分为优化原有代谢路径与改造新型代谢路径两种. 其中, 优化原有代谢路径针对特定限速反应, 通过对限速酶的过表达进行反应优化, 是微观上的战术性策略. 而利用细胞高碳流路径设计改造新型的代谢路径, 可以大幅度提高产物产率, 属于宏观上的战略性策略. 本文从对碳流调控的角度入手, 分析比较了代谢工程的传统与新型策略, 并分别举例进行了讨论. 将碳流与酶学知识相结合, 以期对教学与科研有助^[27].

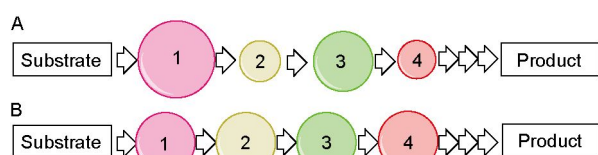


图6 代谢工程精细调控基因表达使得碳流通畅示意图(网络版彩图)

A: 传统代谢工程中, 粗调控酶表达水平使得中间产物积累, 碳流不畅; B: 利用合成生物学手段对酶表达水平进行精细调控以最大化碳流

致谢 感谢Texas A&M University博士生Erol Can Vatansever对本文写作的意见与建议.

参考文献

- 1 韩军丽, 李振秋, 刘本叶, 等. 植物萜类代谢工程. 生物工程学报, 2007, 23: 561–569
- 2 邓晓军, 陈晓亚, 杜家纬. 植物挥发性物质及其代谢工程. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30: 11–18
- 3 刘巍峰, 张晓梅, 陈冠军, 等. 木糖发酵酒精代谢工程的研究进展. 过程工程学报, 2006, 6: 138–143
- 4 Almaas E, Kovács B, Vicsek T, et al. Global organization of metabolic fluxes in the bacterium *Escherichia coli*. *Nature*, 2004, 427: 839–843
- 5 Oltvai Z N, Barabási A L, Jeong H, et al. The large-scale organization of metabolic networks. *Nature*, 2000, 407: 651–654
- 6 Wang X, Ort D R, Yuan J S. Photosynthetic terpene hydrocarbon production for fuels and chemicals. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 137–146
- 7 Banerjee A, Sharkey T D. Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. *Nat Prod Rep*, 2014, 31: 1043–1055
- 8 Wu S, Schalk M, Clark A, et al. Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1441–1447
- 9 Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E J, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330: 70–74
- 10 Bell P H, Roblin Jr. R O. Studies in chemotherapy. VII. A theory of the relation of structure to activity of sulfanilamide type compounds¹. *J Am Chem Soc*, 1942, 64: 2905–2917
- 11 Pisithkul T, Patel N M, Amador-Noguez D. Post-translational modifications as key regulators of bacterial metabolic fluxes. *Curr Opin Microbiol*, 2015, 24: 29–37
- 12 Hu C W, Lin M H, Huang H C, et al. Phosphoproteomic analysis of *Rhodospseudomonas palustris* reveals the role of pyruvate phosphate dikinase phosphorylation in lipid production. *J Proteome Res*, 2012, 11: 5362–5375
- 13 Ventura M, Rieck B, Boldrin F, et al. GarA is an essential regulator of metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2013, 40: 356–366
- 14 王志鹏, 邓耿. 酶促反应中的化学平衡改变. 生命的化学, 2015, 35: 691–694
- 15 Bond-Watts B B, Bellerose R J, Chang M C Y. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 222–227
- 16 Melis A. Carbon partitioning in photosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 453–456
- 17 Ungerer J, Tao L, Davis M, et al. Sustained photosynthetic conversion of CO₂ to ethylene in recombinant cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Energ Environ Sci*, 2012, 5: 8998–9006
- 18 Zhang S, Bryant D A. The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science*, 2011, 334: 1551–1553
- 19 Xiong W, Morgan J A, Ungerer J, et al. The plasticity of cyanobacterial metabolism supports direct CO₂ conversion to ethylene. *Nat Plants*, 2015, 1: 15053
- 20 Pirkov I, Albers E, Norbeck J, et al. Ethylene production by metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng Commum*, 2008, 10: 276–280
- 21 Lin B, Fan K, Zhao J, et al. Reconstitution of TCA cycle with DAOCS to engineer *Escherichia coli* into an efficient whole cell catalyst of penicillin G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 9855–9859
- 22 Li Q, Koda K, Yoshinaga A, et al. Dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol in artificial polysaccharides matrices: effects of xylan on the polymerization. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 4613–4620
- 23 陈海燕, 刘宪华, 林青霞, 等. 利用海带联产海藻酸钠和还原糖的研究. 可再生能源, 2014, 32: 1698–1702
- 24 Wang X, Liu X, Wang G. Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation. *J Integr Plant Biol* 2011, 53, 246–252
- 25 Atsumi S, Hanai T, Liao J C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, 451: 86–89
- 26 Wang H H, Isaacs F J, Carr P A, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, 460: 894–898
- 27 王志鹏, 冯天师, 崔丽嘉, 等. 过渡态理论于磺胺药物抑菌机理刍议. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 778–787

Hijacking high-flux metabolic pathways to enhance product yield in metabolic engineering

ZHENG Yi¹, WANG A. Zhipeng², WANG Xin³, HUANG YanHe¹ & LIN JinShi¹

1 College of Resources and Environment, Fujian Agriculture And Forestry University, Fujian 350002, China;

2 Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station TX 77840, USA;

3 Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University, College Station TX 77843, USA

Metabolic engineering can alter metabolic processes through genetic manipulation and enzyme engineering. Metabolic engineering is widely used to produce useful compounds in pharmaceutical and chemical industries. In this context, we recategorize metabolic engineering strategies based on carbon flux. Traditional metabolic engineering strategy focuses on overexpressing or knocking out key enzymes to channel carbon flux toward the end product. However, this traditional strategy is limited when multiple bottleneck genes are involved, in which balancing gene expression often determines the efficiency of carbon flux. Here we summarize several recent research, and show the advantage of utilizing high-flux metabolic pathways as a new strategy to achieve high productivity. In addition, we also discuss the importance of fine-tuning gene expression in metabolic engineering to channel carbon flux more efficiently.

metabolic engineering, carbon flux, microbiology, biofuel

doi: [10.1360/N052017-00031](https://doi.org/10.1360/N052017-00031)