



评述

系统代谢工程在微生物定向进化中的应用

王献举^{①†}, 吕静^{①†}, 傅鹏程^{②*}^① 中国石油大学(北京)重质油国家重点实验室, 化学工程学院, 新能源研究院, 北京 102249;^② 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: fupc@mail.edu.cn

收稿日期: 2014-10-28; 接受日期: 2014-12-29

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB734002, 2011CB200902)和国家自然科学基金(批准号: 31270886, 31300049)资助项目
doi: 10.1360/N052014-00267

摘要 系统生物学的迅速发展使人们能够从整体水平上理解细胞的生理生化特性并调控其代谢. 系统代谢工程的主要应用之一是以系统生物学为基础对微生物进行定向进化, 以期增强细胞对环境胁迫的耐受性, 提高目标产品的产量. 前者多采用全局转录机制工程和逆代谢工程的方法; 后者主要通过设计并导入最优化路径, 重构代谢网络及基因的模拟敲除和湿法验证等策略实现. 本文综述了利用系统代谢工程解决细胞生物工程几个主要问题的技术及其应用进展.

关键词系统代谢工程
全局转录机制工程
逆代谢工程
代谢网络
模拟基因敲除

21 世纪初, 随着以人类基因组计划的基本完成为标志的“后基因组”时代的来临, 生物学和生物技术的研究从对细胞内单个或是有限数量的基因、蛋白质及代谢产物功能的“局部”性研究, 升级到对细胞内全部的基因、mRNA、蛋白质、代谢产物进行同时测量分析的“全局”性组学研究. 由于细胞内的基因、蛋白质和代谢物成组的通过“网状”相互作用而从整体水平上影响生物系统的功能, 通过分析细胞内相互作用的网络, 包括基因调控网络、信号转导网络、蛋白相互作用网络、代谢网络等, 不仅可以理解生命的基本规律, 还可以在此基础上利用代谢工程和合成生物学的方法设计修改生物系统, 使之增添新的功能和合成新的产品^[1].

生物细胞的代谢活动处于细胞从遗传物质到代谢物质的调控过程末端, 代谢活动能够使细胞内的大分子分解产生能量, 所产生的能量可以用来驱动

各种细胞活动, 同时也可以用来合成细胞内的各个组分. 尽管不同物种细胞的基因组大小相差悬殊, 并且都包含了大量的代谢反应, 但它们的基本代谢途径是相似的, 代谢网络具有高度保守性, 而这也是细胞代谢的一个重要特点. 代谢网络把细胞内在一定条件下所有可能同时、依次发生的生化反应以网络的形式相连接, 不仅为在系统水平上研究所有参与代谢过程的化合物与催化酶之间的相互作用, 以及细胞与外界进行物质和能量交换提供了一个可供操作的平台, 也为研究者能够利用数学和实验相结合的手段来研究代谢网络的结构特征、网络结构与细胞功能的关系、网络的生成机制及网络演化规律等一系列的问题提供了可能^[2].

在工业生物技术中, 人们常用的代谢工程方法为利用重组 DNA 技术和分子生物学相关的遗传手段, 根据已知细胞代谢网络知识, 对细胞代谢途径进行

引用格式: 王献举, 吕静, 傅鹏程. 系统代谢工程在微生物定向进化中的应用. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 652–664

Wang X J, Lv J, Fu P C. Application of systems metabolic engineering in the microbial directed evolution. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 652–664, doi: 10.1360/N052014-00267

合理设计, 以及相应重组 DNA 操作(基因的敲除或扩增), 以期改善细胞某些方面的代谢活性, 从而达到提高细胞耐性或积累目标产物的目的^[3~5]. 随着基因组大规模测序的完成, 以及对细胞内各代谢途径相关知识积累的不断积累, 特别是近年来基因组学^[6,7]、转录组学^[8~10]、蛋白质组学^[11~13]和代谢物组学^[14~17]等高通量技术和计算机模拟分析研究技术的快速发展, 生命科学从分子生物学时代进入系统生物学时代. 代谢工程的改造范围也已经扩展到对跨种属的多基因的联合协同表达进行调控. 系统生物学的理念和代谢工程新方法的结合, 形成了系统代谢工程: 通过大数据和模型的使用, 组合不同来源的多种酶分子来构建新的代谢路径, 以达到改善细胞表型的目的. 系统代谢工程使人们能够以系统生物学的角度去研究各个组学数据库中离散数据之间的相互关系, 重构细胞的代谢网络, 从而更加透彻地理解复杂生命体的生理机制并加以利用^[18].

细胞代谢工程作为技术手段可以提高生产多种多样的生物产品, 如保健品、药品、化学制品以及营养品等的能力和效率^[19]. 工业上大规模生产上述产品往往需要生产过程具备低能耗和高产率的特点. 而由于细胞内代谢过程和调控路径都异常复杂, 使得从整体水平上对细胞进行定向进化显得异常艰难. 一般传统的方法是通过单个基因进行修饰^[20]以达到提高产物产量的目的. 但是, 该方法不仅费时费力, 而且效率较低^[21]. 虽然随着高通量筛选方法^[22]的迅猛发展, 使得传统上随机突变的方法大大减少了筛选所需要的时间, 但生产目标产品产率依然难以达到大规模工业生产的要求. 本文综述了利用系统代谢工程解决细胞生物工程几个主要问题的技术及其应用进展.

1 系统代谢工程概述

在过去数年里, 工业生物技术的应用领域从生产高附加值产品扩展到污染物的降解以及可再生能源的开发利用^[23~26]. 随着基因工程和代谢工程方法技术的发展, 研究人员可通过遗传操作改造工业微生物, 以提高其性能^[27,28]. 同时也可以从全系统范围的分析和代谢网络的运行, 大规模、多层面地调控其代谢^[29]. 在这方面, 基因组代谢网络为人们提供一个有效的工具, 从而可以调控目的菌株的代谢行为, 提

高目标产物的产量^[30].

基因组代谢网络模型的重构可以预测特定微生物细胞的代谢能力以确定合适的宿主细胞, 并且可以评估特定代谢路径的最大理论生产率. 另外, 在足够多实验数据的支撑下, 其可以表征代谢工程菌的实际代谢情况. 基因组代谢网络通过对细胞内代谢通量进行分析可以确定出实际可利用的代谢路径, 并且通过代谢流量的变化精准地找出特定路径的瓶颈反应^[28]. 基因组代谢网络的重构对于代谢工程具有十分重要的意义: (i) 有助于进一步设计并改良代谢路径; (ii) 具有制定假设和模拟遗传修饰(特定基因的敲除或扩增)潜力的能力. 目标产品产率低一般是由于代谢流量竞争或辅因子竞争路径的存在. 一般通过人工逐个基因敲除可以确定这些路径, 但逐个的基因敲除可能会引起副作用, 如改变辅因子的再生、氧化还原平衡或能量平衡^[30]. 基因组代谢网络模型通过电子敲除预测对细胞表型的影响, 可以批量敲除目的基因, 该方法不仅省时省力, 并且可以实现目标代谢产品产量的最大化.

细胞进化通常为了达到以下 2 个目的: (i) 提高细胞对终产物或发酵副产物的耐受能力; (ii) 提高目标产品的产量. 在提高细胞耐受性方面, 系统代谢工程主要通过细胞全局转录机制工程(global transcriptional mechanism engineering, gTME)和逆代谢工程的方法来实现. 在提高目标产品产量方面, 主要采用的方法步骤包括: 设计生产产物的最优化路径, 初级代谢工程及相关基因的初步敲除, 路径深度优化, 转录组分析, 目的基因的敲除或导入, 代谢网络模拟基因敲除获得目的产物产量提高的突变株, “湿法”实验验证上述模拟敲除的准确性. 系统代谢工程具体指导流程图如图 1 所示.

2 利用系统代谢工程提高细胞耐受性

2.1 全局转录机制工程

2006 年, 美国麻省理工学院 (Massachusetts Institute of Technology, MIT) 的 Stephanopoulos 研究组^[31]系统地阐述了全局转录机制工程(gTME)的理念. gTME 首先通过易错 PCR(error-prone PCR)或 DNA 改组(DNA shuffling)的方法获得结构改变的转录因子,

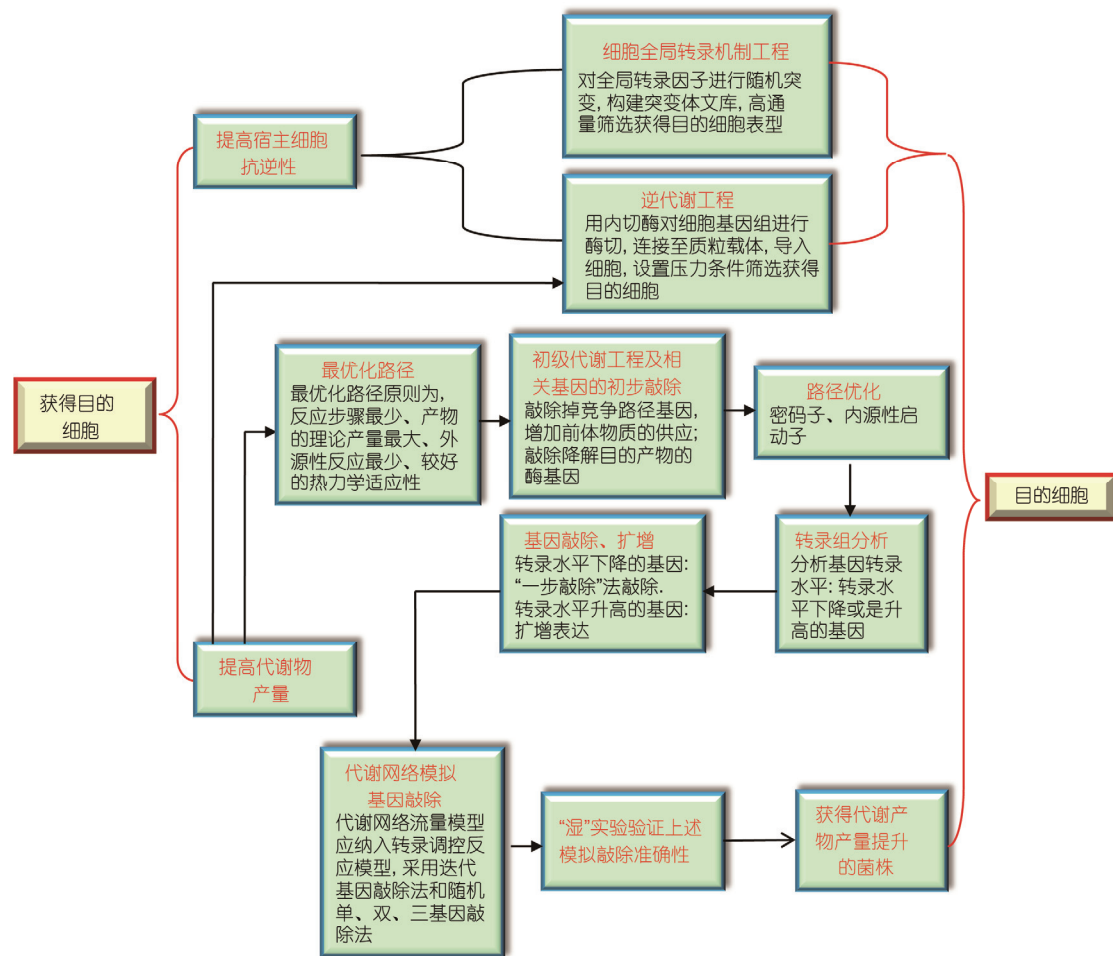


图1 系统代谢工程具体指导流程图

使得转录因子与其调控众多基因启动子(promoter)序列的结合水平发生改变,从而达到从全局水平上调控多个基因转录效率的目的. 众所周知, 细胞对环境胁迫的耐受性受多基因控制, 改变细胞耐受性往往涉及对细胞内多个基因进行系统性修饰. 因此传统意义上对单个基因的遗传修饰很难获得耐受性显著增强的突变株, 此种突变株的获得需要对多个基因修饰效果进行迭代相加. 通常情况下1个转录因子能够调控多个基因的转录表达. 因此通过对转录因子特别是全局转录因子进行随机突变, 再结合高通量筛选方法, 以相关抗性作为筛选条件, 就能得到抗性提高的菌株. 全局转录机制工程的工作流程图如图2所示.

应用方面, Stephanopoulos 研究组^[32]通过调控全局转录因子 SPT15 得到了乙醇耐受性增强的酵母突变

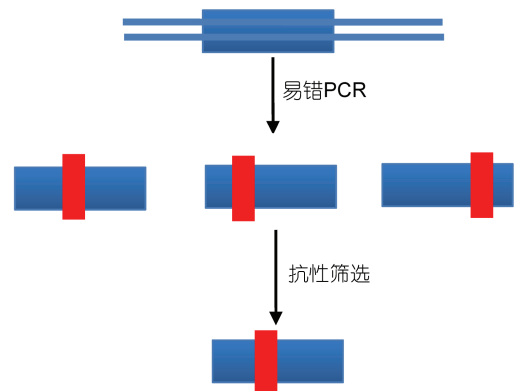


图2 全局转录机制工程的工作流程图

首先用易错 PCR(error-prone PCR)或 DNA 改组(DNA shuffling)的方法构建转录因子的突变文库. 将突变的转录因子转入宿主细胞, 用相关抗性压力筛选, 获得期望抗性提高的菌种. 图中红色部分代表转录因子的基因突变及所在位置

株. Jiang 研究组通过调控大肠杆菌(*Escherichia coli*)中全局转录因子 CRP(调控大肠杆菌中近 400 个基因的转录), 获得了耐受氧化压力^[33]、耐受渗透胁迫^[34]、耐受有机溶剂(甲苯)^[35]、耐受醋酸盐类和生物醇(乙醇、丁醇)^[36]的突变株. gTME 应用研究实例如表 1 所示.

2.2 逆代谢工程

一般用代谢工程的方法来定向进化菌种采用的常规步骤如下: (i) 鉴别出指定代谢路径中的限速步骤; (ii) 通过基因扩增增大该限速步骤中编码相关酶基因的表达水平, 以克服代谢的“瓶颈”^[45]. 这种定向进化的方法可以适当增加目标物质的产量, 但是提高的程度有限. 逆代谢工程是一种先确定菌株所期望的表型, 然后采用相应的措施获得该表型的方法^[46]. 其主要步骤为: (i) 确定所期望的菌株表型; (ii) 鉴别出控制该表型的基因片段; (iii) 将该基因片段导入宿主细胞表达, 检测细胞是否获得期望的细胞表型.

逆代谢工程应用于提高细胞耐受性方面的步骤为: (i) 确立相应耐受性高的表型细胞; (ii) 从该表型细胞基因组中鉴定出编码相应耐受性相关蛋白的基因片段; (iii) 将此基因片段导入目的细胞, 检测该细胞的相应耐受性是否获得提高. 其具体流程图如图 3 所示.

Yong-sun Jin 课题组^[47]通过逆代谢工程的方法鉴别出酿酒酵母 *S. cerevisiae* SC288C 编码耐受发酵终产物乙醇的基因片段 *EN.PK2-1D*, 将其转入宿主细胞后, 显著提高了细胞耐受乙醇的能力. 逆代谢工程同样可应用于提高目标产品产量方面. Jin 等人^[48]利用逆代谢工程的方法提高了酿酒酵母的生长速率和乙醇产量(以木糖作为原料). 该研究组首先确定了影响毕赤酵母(*Pichia Stipitis*)木糖发酵的基因片段 PsTAL1, 再将其与质粒载体连接后导入到酿酒酵母启动子的调控下大量表达, 使得宿主细胞生长速率提高了 1 倍, 同时其由木糖发酵生产乙醇的产量也大幅度上升. 逆代谢工程在提高宿主细胞耐受性和目

表 1 gTME 应用研究实例^{a)}

表达宿主	所调控转录因子	产生良性结果	转录因子产生变化	文献
酿酒酵母菌 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	SPT15(<i>spt15</i> 基因编码)	耐受乙醇、葡萄糖能力提升; 葡萄糖发酵生产乙醇能力增强	F177S, Y195H, K218R	[31]
大肠杆菌	σ^{70} (<i>rpoD</i> 基因编码)	耐受乙醇能力增强; 重组菌种番茄红素的产量进一步提升; 同时耐受乙醇和 SDS	根据筛选目的的不同获得不同突变类型的转录因子	[32]
大肠杆菌	CRP(<i>crp</i> 基因编码)	1-丁醇耐受性增强	G71D, T127N, D138V, T208N	[37]
大肠杆菌	CRP(<i>crp</i> 基因编码)	宿主细胞耐渗透胁迫能力增强	K52I, K130E	[34]
大肠杆菌	CRP(<i>crp</i> 基因编码)	宿主细胞耐受更高的氧化压力	F69C, R82C, V139M	[33]
大肠杆菌	CRP(<i>crp</i> 基因编码)	耐受有机溶剂甲苯能力增强	T127N, V176A	[35]
大肠杆菌	CRP(<i>crp</i> 基因编码)	乙醇耐受能力增强	V47E, Q80L	[38]
大肠杆菌	CRP(<i>crp</i> 基因编码)	耐受乙酸盐能力增强	D138Y	[36]
大肠杆菌	H-NS(<i>hns</i> 基因编码)	生物质膜合成量受限制	K57N	[39]
大肠杆菌	Hha(<i>hha</i> 基因编码)	诱导生物质膜消散	D22V, L40R, V42I, D48A	[40]
大肠杆菌	DR0167(<i>ire</i> 基因编码)	耐受乙醇、丁醇、乙酸能力增强	根据筛选目的的不同获得不同突变类型的转录因子	[41]
大肠杆菌	CRP(<i>crp</i> 基因编码)	异丁醇发酵中耐受异丁醇的能力显著提升	S179P, H199R	[42]
大肠杆菌	ATF	正丁醇发酵中耐受正丁醇能力提升	—	[43]
大肠杆菌	DR0167(<i>irrE</i> 基因编码)	发酵中耐受水解酶抑制剂糠醛能力显著提升	E163A, E225G, A258T, A267D, R273H R68L, H98R	[44]

a) 转录因子产生变化: 转录因子蛋白氨基酸序列发生替换, 如“AmB”表示转录因子蛋白第 m 位的氨基酸“A”被“B”替换; CRP: 环 AMP 受体蛋白, 是原核生物中共有的 7 种全局转录因子之一(其他 6 种分别为 IHF(融合宿主因子)、FNR(延胡索酸和硝酸盐还原蛋白)、FIS(反转刺激因子)、ArcA(厌氧呼吸调控蛋白)、Lrp(亮氨酸应答调控蛋白)、NarL(硝酸盐/亚硝酸盐应答调节); *ire* 基因: 来源于外源宿主耐辐射奇球菌 *Deinococcus radiodurans*; ATF(artificial transcription factor): 人工构建转录因子, 由锌指结构和 CRP 组成, 转录因子活性由锌指结构和 CRP 结合水平决定

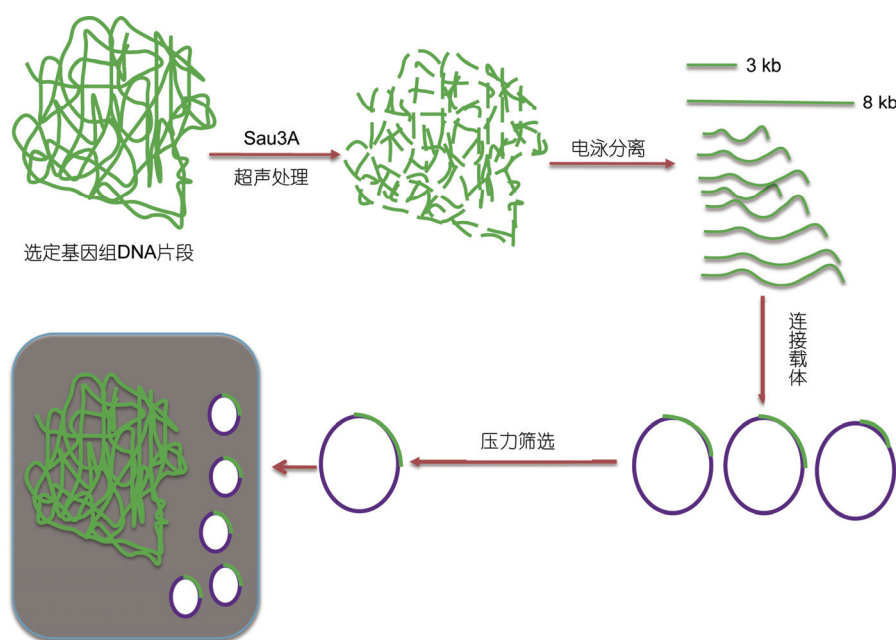


图3 逆代谢工程在提高细胞耐受性方面流程图

首先提取耐受性高的菌种基因组 DNA, 通过限制性内切酶 *Sau3A* 或超声波处理, 将基因组 DNA 切成大小不等的片段. 电泳分离出 3~8 kb 长的片段, 将其与高拷贝质粒载体连接并转入目的宿主细胞, 给予压力筛选获得耐受性提高的目标菌株

标产物产量方面的应用研究进展如表 2 所示.

应用实例如表 3 所示.

3 利用系统代谢工程提高代谢物的产量

3.1 设计最优化代谢路径生产目标产物

利用细菌细胞生产目标产品往往需要将编码相应酶的基因通过质粒载体或是基因重组的方式导入到宿主细胞中以获得生产目标产品的代谢路径^[54,55]. 此种经过构造获得的新的代谢路径通常是以中央代谢路径(糖酵解、TCA 循环等)中间产物作为前体物质进行目标产品的生产^[56-59]. 生产目标产品时首先需要设计出最优化的代谢路径, 最优化代谢路径的设计需要满足以下几个条件^[60]: (i) 总反应步骤最少. 反应步骤越多, 消耗能量越大, 较少的反应步骤可以节约更多的能量用于细胞生长; (ii) 产物的理论产量最大. 代谢途径中每个代谢物含量应该足够多, 并且其生产和消耗应处于动态平衡之中; (iii) 外源性反应最少. 因宿主细胞适应性, 加入外源反应可能会造成目标产物的生成速度降低, 因此加入的外源反应应该最少; (iv) 较好的热力学适应性. 导入代谢路径中的酶类应能很好地适应宿主细胞特定的代谢环境. 在宿主细胞中导入最优化路径生产目标产品的

3.2 初级代谢工程及相关基因的敲除

将以上设计的最优化代谢路径“复制”到宿主细胞后, 需要对宿主细胞新的全代谢路径做基本优化以达到目标产品产量初步提高的目的. 基本优化项目包括: (i) 敲除“复制”路径明显的竞争路径(宿主细胞内前体物质的其他消耗路径)相关酶类编码基因以增加目标产物合成前体物质的供应. 对于此类基因的敲除应以不影响宿主细胞生长为前提条件; (ii) 敲除编码降解目标产物相关酶类的基因, 以增加终产物即目标产品的积累; (iii) 敲除对于“复制”路径起负调控的基因. 除以上基本优化项目之外, 基本优化还包括对于终产物转运蛋白的修饰以使宿主细胞最大程度地向外分泌目标产品^[66-68], 所修饰的转运蛋白包括产物的对内转运蛋白和对外转运蛋白 2 种.

Park 等人^[54]在采用系统代谢工程的方法以大肠杆菌作为宿主细胞生产 *L*-缬氨酸的过程之中, 初步敲除以下基因: (i) 对 *L*-缬氨酸生产路径中相关基因起反馈抑制和转录衰减作用的基因, 如 *ilvH*, *ilvG*; (ii) *L*-缬氨酸生产路径的竞争路径酶类编码基因, 如 *ilvA*, *panB*, *leuA*. 之后扩增(使用高拷贝质粒载体表

达)*L*-缬氨酸生产路径中限速步骤相关酶类编码基因. 最后获得初步的大肠杆菌突变株, 其中 *L*-缬氨酸的产量达到 1.31 g/L(原始菌株中不生产 *L*-缬氨酸).

3.3 代谢路径的深入优化

将“外源性”的最优化路径相关酶类编码基因导入到宿主细胞后, 由于宿主细胞特定的代谢环境往往造成“外源性”酶类的表达量有很大的差异, 此种差异不利于目标产品的合成. 因此提高目标产品的合成量需要对以上代谢路径进行进一步优化即深入

优化. 深入优化包括: (i) “外源”基因密码子优化^[69]. 导入的“外源”基因需要对其密码子进行相应的优化, 将其改造成适合宿主细胞表达系统的最有密码子, 密码子优化可以使用“相邻基因决定法”^[70]; (ii) “内源”性启动子替换“外源”性启动子即启动子优化. “外源”性基因表达量低的另一原因是“外源”性启动子不适合宿主细胞表达系统而导致“外源”基因转录水平下降, 如果用在宿主细胞内高效表达的“内源”性启动子替换掉“外源”性启动子, 则“外源”基因的表达效率会大大提高. 采用密码子优化和启动子优化的应用研究实例如表 4 所示.

表 2 逆代谢工程应用研究进展^{a)}

表达宿主	期望获得表型	外源基因或基因片段来源细胞	外源基因或基因片段表达载体构建	所获得良性结果	文献
酿酒酵母菌 (<i>S. cerevisiae</i>)	异源淀粉酶的生产和分泌量均提升	AAC 基因组	CPOTud 质粒	最终淀粉酶产量是对照株的 5 倍	[49]
酿酒酵母菌 (<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1D)	生物乙醇发酵中耐受乙醇和葡萄糖	酿酒酵母菌 (<i>S. cerevisiae</i> SC288C)基因组	多拷贝质粒 pRS424(TRP1 为选择性标记)为骨架	获得突变株能耐受乙醇和葡萄糖的浓度分别为 5%和 10%	[47]
酿酒酵母菌 (<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1D)	提升目的菌株发酵半乳糖的能力	酿酒酵母菌(<i>S. cerevisiae</i> SC288C) 基因组	多拷贝质粒 pRS424(TRP1 为选择性标记)为骨架	发酵半乳糖能力相比于对照菌株提升 250%	[50]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> CLM24)	生产 <i>N</i> -糖基化蛋白	大肠杆菌 K12 基因组	PSMART™LC-kan 质粒为构建骨架	<i>N</i> -糖基化蛋白的生产量是对照组的 6.7 倍	[51]
大肠杆菌(<i>E. coli</i> BL21 pLysS)	大量表达重组蛋白	大肠杆菌(<i>E. coli</i> JM109)基因组	高拷贝质粒 pRSETA(含 T7 强启动子)为构建骨架	特定产物的重组蛋白比对照组提升 7 倍	[52]
酿酒酵母菌 (<i>S. cerevisiae</i>)	高效的利用木糖生产获得乙醇	树干毕赤酵母 (<i>Pichia stipitis</i>)	多拷贝质粒 pRS424(TRP1 为选择性标记)为骨架	获得突变株利用木糖生产乙醇的量相比于对照组多 70%	[48]

a) ACC: 一种酿酒酵母菌, 含有 CPOTud 质粒能够表达真菌 α -淀粉酶^[53]; 最终淀粉酶产量是对照株的 5 倍; 实验时还在实验株基因组中引入突变, 结合逆代谢工程的方法使得淀粉酶的生成和分泌量均有不同程度的增加; 文献[52]: 在此利用逆代谢工程的方法, 主要是用 K12 基因组 DNA 片段制成反义 RNA 库(抑制相应 DNA 片段的转录过程), 从中筛选获得需要的突变株

表 3 在宿主细胞中导入最优化路径生产目标产品^{a)}

宿主细胞	导入基因	导入基因方式	细胞内前体物质	终产物	文献
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> K-12 MG1655)	<i>vioA, vioB, vioC, vioE</i>	pBvioABCE-Km 为连接载体	<i>L</i> -色氨酸	脱氧紫色杆菌素	[61]
酿酒酵母菌 (<i>S. cerevisiae</i> BY4741)	<i>atfA</i> (编码酰基转移酶)	pRS426TEF 为连接载体	乙酰辅酶 A	脂肪酸乙酯	[62]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> JM109)	<i>panD, panM, pp0596, ydfG, prpE, phaC1</i>	pACYCDuet-1, pETDuet, pTrc His2 B	β -丙氨酸	聚-3 羟基丙酸酯(P3HP)	[63]
刺糖多孢 (<i>Saccharopolyspora spinosa</i> MUV)	<i>rmbA, rmbB</i>	pSET152, pIBR25	<i>S</i> -腺苷甲硫氨酸	多杀菌素 A, D	[64]

a) *vioA, vioB, vioC, vioE* 基因为一大基因簇 *vioABCE*^[65], 其在 *araBAD* 启动子的控制下表达; Km 为卡那霉素抗性筛选

表 4 密码子优化和启动子优化应用研究实例^{a)}

宿主细胞	采用方法	操作基因或区域	操作基因或区域来源	效果	文献
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> BL21 DE3)	密码子优化	信号肽编码基因 <i>MalE</i> , <i>OmpA</i> , <i>TorA</i> , <i>DsbA</i> , <i>FhuD</i> , <i>YcdO</i> , <i>MdoD</i>	嗜热脂肪芽孢杆菌 (<i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i>)	极大地促进了糖化酶向细 胞外分泌	[71]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> BL21 DE3)	密码子优化	2,3-丁二醇合成路径中相关酶 类编码基因	肺炎克雷伯菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	2,3-丁二醇的合成量相比于 对照组提升 2.54 倍	[72]
隐球藻 (<i>Cryptococcus sp.</i> S-2)	密码子优化	辣根过氧化物酶 C1a 合成基因 <i>HRP-C1a</i>	-	辣根过氧化物酶 C1a 合成 量显著提升	[73]
酿酒酵母菌	密码子优化	黏康酸合成路径中相关酶类编 码基因 <i>CatA</i>	不动杆菌 (<i>Acinetobacter baylyi</i>)	黏康酸的合成量提升 2.9 倍	[74]
酿酒酵母菌 (<i>S. sp.</i> W0)	密码子优化	以菊粉作为前体物质生产乙醇 路径中相关酶类编码基因 <i>INU1</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	以菊粉作为前体物质生产 乙醇的量得到提升	[75]
大肠杆菌(SHuffle Express <i>E. coli</i>)	密码子优化	1 种细胞因子(RANKL)合成基 因 <i>mRANKL</i>	小鼠 (<i>Mus musculus</i>)	RANKL 细胞因子的合成量 得到提升	[76]
大肠杆菌(<i>E. coli</i> K-12 strain MC1061)	启动子替换	异戊二烯途径中相关酶类编码 基因的组成型启动子	噬菌体 T5 启动子(P _{T5})	β-胡萝卜素生产产量提高	[77]
地衣芽孢杆菌 (<i>Bacillus lichenifor-</i> <i>mis</i> WX-02)	启动子替换	Lichenysin 生产路径中相关酶 类编码基因的组成型启动子	组成型启动子(P43); 木糖诱导型启动子(P _{xy1}); 枯草菌操纵子启动子(P _{srf})	Lichenysin 生产量得到提升	[78]

a) 密码子优化: 在此种优化中, Alper 运用了和商业优化不同的方式, 其效率也得到提高. 结果正是在商业优化基础之上提升的倍数; Lichenysin: 一种生物表面活性剂

3.4 转录组分析

经过“路径的深入优化”步骤之后, 目标产品产量有了显著地提升, 但其生产速率依然不能满足工业化生产对于速率的要求. 进一步的基因操作处理需要确定更多的“靶基因”供以敲除或是扩增. 转录组学分析正是为基因的进一步操作处理提供“靶位点”. 转录组学分析操作步骤为: (i) 将经过“路径深入优化”步骤之后的突变株和未经任何处理的宿主细胞的基因表达水平进行比较; (ii) 从以上突变株基因中挑选出相对于对照组转录表达水平显著上升或是下降的基因. 转录组学分析常采用的方法包括 DNA 微阵列分析、定量实时逆转录(qRT-PCR)^[34]、寡核苷酸芯片法^[60]等.

3.5 目的基因的深入敲除或扩增

转录组学分析可以确定突变株中表达量显著升高或下降的基因, 而此类基因可作为目的基因进行基因扩增或敲除. 一方面, 转录水平升高的基因可能是由于生产目标产物对其编码酶类的需求较高, 则需要提高其表达量, 具体策略包括使用高拷贝质粒或“内源”性强启动子. 相反, 转录水平下降的基因在目的代谢路径中需求量少, 则可采用适当降低该基

因的表达量或直接敲除的方法. 具体敲除方法包括“一步敲除”法^[79], 其流程示意图如图 4 所示.

Lee 等人^[55]在生产 *L*-苏氨酸的过程中, 通过转录组学分析确定以下基因供进一步操纵, 并对其做相应处理: (i) 编码磷酸转移酶的 *ppc* 基因, 相应处理为用“外源性”更强的 *trc* 启动子替换掉其自身的启动子以适当增加 *ppc* 基因表达量; (ii) 编码乙醛酸分流途径中相关酶类的 *aceBA* 基因, 相应处理为将其竞争性路径编码基因 *iclR* 敲除掉以增加乙醛酸路径的代谢流量; (iii) 编码 *L*-苏氨酸向胞内转运蛋白基因 *tdcC*, 相应处理为直接将其敲除掉以减少终产物的对内转运; (iv) 编码 *L*-苏氨酸向胞外转运蛋白基因 *rhtC*, 相应处理为将此基因连接在质粒载体上以增加其表达量. 通过以上操作处理, *L*-苏氨酸的合成量从初期的 10.1 g/L 增加到 11.8 g/L.

3.6 利用代谢网络模拟敲除基因获提高目标产物的产量

经过以上操作步骤后, 目标产物生产速率已经达到一个“瓶颈”, 进一步的处理需要更多的“基因库”以供操纵. 虽然转录组学分析为基因的进一步处理提供了“靶基因”, 但对于转录表达量不变或变化不大的基因仍然不能做出较好的判断. 如果能够将代

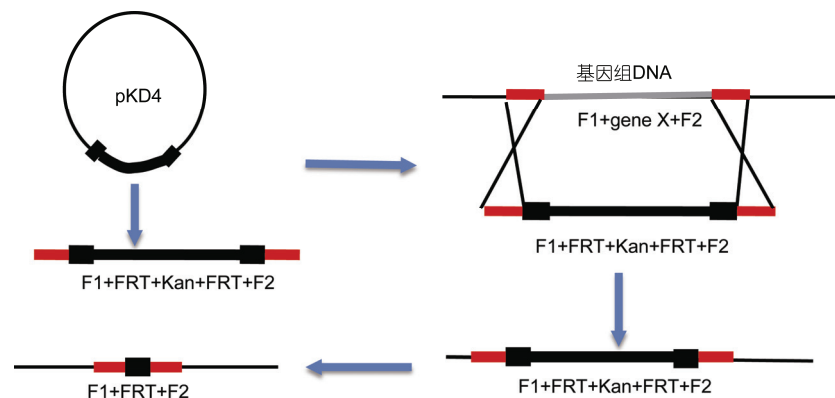


图4 “一步敲除”法流程示意图

以 pKD4 质粒作为模板 PCR 出含 FRT+Kan+FRT(FRT 为 FLP 结合位点)的目的条带, PCR 所用引物中含有和要敲除目的 DNA 片段两端同源序列 F1 和 F2. 将 PCR 出的目的条带导入含有 pKD46 质粒(表达 Red 重组酶)的目的细胞中进行同源双交换, 用 Kan 抗性交换掉要敲除的目的基因, 再用卡那霉素筛选得到抗卡那霉素的菌株. 最后导入 pCP20 质粒(表达 FLP 重组酶)移除卡那霉素抗性编码基因

谢路径相关基因做逐一的敲除效果验证, 固然能够寻找出好的可操纵“基因库”, 但这样做不仅费时、费力, 而且由于不同基因整体敲除效果的不可叠加性, 对多个基因的逐步敲除还有可能导致错误的结果. 若能以 1 种方法代替实验验证大量基因敲除(包括多基因敲除)的效果, 则能极大地减少工作量.

自从 Palsson 等人^[80]建立了全基因组代谢网络重构方案之后, 人们已构建了多种生物的代谢网络模型^[81~84], 其中包括最常用的代谢工程宿主细胞——大肠杆菌^[85]. 全基因组代谢网络的应用之一便是模拟基因敲除(单、双、多基因敲除), 此种模拟能够极大地减少实验工作量. 利用构建好的网络模拟基因敲除时应注意以下 2 点: (i) 代谢网络模型的构建应纳入转录因子调控部分. 通常, 代谢网络模型是以代谢物及代谢物流向作为基本元素, 同时也会加入催化各个反应的不同酶类, 完整的代谢网络精确再现细胞内的物质代谢. 由于调控网络特别是转录因子调控网络异常复杂, 并且很难将其与已有代谢网络进行定量对接. 故现有的代谢网络一般将调控网络“排除”在外, 而这也极大限制了可供敲除的基因数量. 若能建立一套算法, 定量表征转录因子对于已有网络中相关基因的调控作用, 则不仅能丰富可供操纵基因库容量, 而且由于转录因子对众多基因的调控能力也能增强基因敲除的效果性. 2008 年, Stephanopoulos 研究组^[86,87]通过将全局转录因子 Gcn4p 纳入到酵母菌代谢网络中, 准确地预测了酵母细胞中苏氨酸的合成; (ii) 多基因敲除效果不是单

基因敲除效果的简单叠加. 控制特定性状的多个基因在效果上往往具有不可叠加性, 有时单个基因的敲除效果并不明显, 而将不明显的单个基因同时敲除即进行多基因敲除时会产生较好的“整体”效果. Alper 等人^[88]开发了一套程序, 它可以屏蔽掉单或双基因敲除的影响, 选择既具有足够生长速率, 同时又能产生最大量目标产品突变株的最佳基因敲除方案. 他们成功地将其应用于产番茄红素的大肠杆菌上^[88], 最终使得番茄红素生产效率获得提高. 值得注意的是, 该研究组在进行番茄红素合成相关基因敲除实验时, 对 *gdhA* 和 *talB* 基因进行双基因敲除或对 *aceE* 基因进行单基因敲除, 并不能产生大量的番茄红素, 但同时敲除此 3 个基因时, 却能产生所有基因敲除包括多基因敲除中的最大量的番茄红素.

代谢网络模型的构建除了可以应用于基因敲除分析之外, 还可以通过代谢网络模型探索和预测新的代谢反应的加入对宿主细胞的整体影响, 从而选择最为合适的目标产品代谢路径. 出于探索和预测最合适代谢路径的目的, Pharkya 等人^[89]在构建代谢网络模型时设计了一个 OptStrain 方法, 该方法系统性的告诉研究人员如何增加新反应才能更为高效地合成目标产品. OptStrain 主要是依赖综合的生化反应数据库, 并提供相应的备选方案. Lee 等人^[55]在利用大肠杆菌生产 *L*-苏氨酸的研究中, 通过代谢网络模型预测基因表达的变化, 为基因的进一步敲除确定靶位点. 同时, 他们还预测了最优化的 *L*-苏氨酸生产路径中关键反应的通量值, 之后将预测的通量值和

实验测得的值进行比较, 最后再以数据之间的相对差异为指导调节基因的表达。

更为系统的方法是引入 OptReg 方法^[90], 该方法在全基因组水平上确定通量值之间的相对变化。OptReg 方法主要是针对野生型宿主细胞通量分布作出反应, 以优化目标产品产量。OptReg 运行的结果还可以确定代谢路径上下游调控中的备选酶。

3.7 “湿法”实验验证代谢模型模拟敲除的准确性

以上基因敲除实验以不显著影响宿主细胞生长为前提条件, 若“湿法”实验验证和模拟敲除实验结果能很好的吻合, 则更加证明基因模拟敲除的有效性^[91-93]。另外, 通过引入基于遗传算法^[94]和线性规划方法^[95]的优化方法将目标产物生产和宿主细胞生长速率相耦合, 进行有目的的基因敲除实验, 可以在提高宿主细胞生长速率的同时提升目标产品的生成量。这种宿主细胞生长和目标产品生产相耦合也会使宿主细胞朝着更加稳定的方向进化^[95]。以上模拟基因敲除的方法已被“湿法”实验所验证, 其应用于产乳酸的代谢工程菌大肠杆菌中提升了乳酸的产量^[96]。对产乳酸工程菌进行适应性进化实验表明, 乳酸的生产和宿主大肠杆菌细胞的生长相耦合提高了最终产品——乳酸的分泌率即生产速率。微生物宿主细胞经过以上系统代谢工程的定向进化之后, 目

标产物的生产速率基本能够达到工业化应用的要求。

4 结论与展望

基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢物组学的发展为细胞代谢活动的定量表征提供了极其丰富的数据支撑, 也为系统生物学的发展提供了可供操纵的“平台”。生物细胞的系统性研究包括建立细胞代谢物之间的定量相互连接, 以及转录调控网络与代谢物网络的定量对接。系统代谢工程以细胞内代谢活动的系统性构建为基本前提, 从系统层面上考虑细胞定向进化。其在微生物细胞中的定向进化应用有助于减少微生物进化的盲目性, 也可以为进一步提高目标代谢物产量打下良好的基础。

系统代谢工程可以通过全基因组代谢网络模型构建的基因模拟敲除应用鉴别出可供操纵的最佳目的基因。传统构建的代谢网络模型不包含转录调控网络, 限制了可供基因操纵的数量以及效率, 若能纳入转录因子控制的调控网络部分, 则能极大地丰富可供遗传操纵的基因库容量, 并且提高遗传操纵的效率。未来, 系统代谢工程无论在提升目标产品产量、提高宿主细胞耐受性, 还是目标物质的发酵^[97]方面都将会重大的应用。对其研究也应进一步加快以达到工业应用的最终目的。

参考文献

- 1 Kanehisa M. Post-Genome Informatics. Oxford: Oxford University Press, 2000
- 2 Covert M W, Schilling C H, Famili I, et al. Metabolic modeling of microbial strains *in silico*. Trends Biochem Sci, 2001, 26: 179–186
- 3 Bailey J E. Toward a science of metabolic engineering. Science, 1991, 252: 1668–1675
- 4 Stephanopoulos G, Vallino J J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. Science, 1991, 252: 1675–1681
- 5 Nielsen J. Metabolic engineering. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55: 263–283
- 6 Ohnishi J, Mitsunashi S, Hayashi M, et al. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new *L*-lysine producing mutant. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58: 217–223
- 7 Ruckert C, Puhler A, Kalinowski J. Genome-wide analysis of the *L*-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation. J Biotechnol, 2003, 104: 213–228
- 8 Tummala S B, Junne S G, Paredes C J, et al. Transcriptional analysis of product concentration driven changes in cellular programs of recombinant *Clostridium acetobutylicum* strains. Biotechnol Bioeng, 2003, 84: 842–854
- 9 Choi J H, Lee S J, Lee S J, et al. Enhanced production of insulin-like growth factor I fusion protein in *Escherichia coli* by coexpression of the downregulated genes identified by transcriptome profiling. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 4737–4742
- 10 Ohnishi J, Hayashi M, Mitsunashi S, et al. Efficient 40°C fermentation of *L*-lysine by a new *Corynebacterium glutamicum* mutant developed by genome breeding. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62: 69–75
- 11 Kabir M M, Shimizu K. Fermentation characteristics and protein expression patterns in a recombinant *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase for poly(3-hydroxybutyrate) production. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62: 244–255
- 12 Han M J, Jeong K J, Yoo J S, et al. Engineering *Escherichia coli* for increased production of serine-rich proteins based on proteome profiling. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 5772–5781

- 13 Han M J, Yoon S S, Lee S Y. Proteome analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* cells producing poly(3-hydroxybutyrate). *J Bacteriol*, 2001, 183: 301–308
- 14 Han M J, Lee S Y. Proteome profiling and its use in metabolic and cellular engineering. *Proteomics*, 2003, 3: 2317–2324
- 15 Wittmann C, Heinzle E. Modeling and experimental design for metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacteria* by mass spectrometry. *Metab Eng*, 2001, 3: 173–191
- 16 Dauner M, Sonderegger M, Hochuli M, et al. Intracellular carbon fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis* during growth on two-carbon substrate mixtures. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 1760–1771
- 17 Stephanopoulos G, Alper H, Moxley J. Exploiting biological complexity for strain improvement through systems biology. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 1261–1267
- 18 Thiele I, Palsson B. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc*, 2010, 5: 93–121
- 19 Parekh S, Vinci V A, Strobel R J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 54: 287–301
- 20 Zhang F Z, Rodriguez S, Keasling J D. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. *Curr Opin Biotech*, 2011, 22: 775–783
- 21 王献举, 吕静, 傅鹏程. 大肠杆菌全局调控转录因子环腺苷酸受体蛋白质在代谢工程中的应用. *生物工程学报*, 2014, 30: 1–9
- 22 Oliver D J, Nikolau B, Wurtele E S. Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses. *Metab Eng*, 2002, 4: 98–106
- 23 Janssen D B, Dinkla I J T, Poelarends G J, et al. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environ Microbiol*, 2005, 7: 1868–1882
- 24 Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440: 940–943
- 25 Peng R H, Xiong A S, Xue Y, et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32: 927–955
- 26 Rittmann B E. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100: 203–212
- 27 Bailey J E. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, 252: 1668–1675
- 28 Stephanopoulos G N, Aristidou A A, Nielsen J. *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. San Diego: Academic Press, 1998. 86–95
- 29 Park J H, Lee S Y, Kim T Y. Application of systems biology for bioprocess development. *Trends Biotechnol*, 2008, 26: 404–412
- 30 Kim H U, Kim T Y, Lee S Y. Metabolic flux analysis and metabolic engineering of microorganisms. *Mol Biosyst*, 2008, 4: 113–120
- 31 Alper H, Moxley J, Nevoigt E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, 314: 1565–1568
- 32 Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, 9: 258–267
- 33 Basak S, Jiang R R. Enhancing *E. coli* tolerance towards oxidative stress via engineering its global regulator cAMP receptor protein (CRP). *PLoS One*, 2012, 12: e51179
- 34 Zhang H F, Chong H Q, Ching C B, et al. Random mutagenesis of global transcription factor cAMP receptor protein for improved osmotolerance. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 1165–1172
- 35 Basak S, Song H, Jiang R R. Error-prone PCR of global transcription factor cyclic AMP receptor protein for enhanced organic solvent (toluene) tolerance. *Process Biochem*, 2012, 47: 2152–2158
- 36 Chong H Q, Yenow J W, Wang I, et al. Improving acetate tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP). *PLoS One*, 2013, 8: e77422
- 37 Zhang H F, Chong H Q, Ching C B, et al. Engineering global transcription factor cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli* for improved 1-butanol tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94: 1107–1117
- 38 Chong H Q, Huang L, Yeow J W, et al. Improving ethanol tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP). *PLoS One*, 2013, 8: e57628
- 39 Hong S H, Wang X X, Wood T K. Controlling biofilm formation, prophage excision and cell death by rewiring global regulator H-NS of *Escherichia coli*. *Microb Biotechnol*, 2010, 3: 344–356
- 40 Hong S H, Lee J, Wood T K. Engineering global regulator Hha of *Escherichia coli* to control biofilm dispersal. *Microb Biotechnol*, 2010, 3: 717–728
- 41 Chen T J, Wang J Q, Yang R, et al. Laboratory-evolved mutants of an exogenous global regulator, IrrE from *Deinococcus radiodurans*, enhance stress tolerances of *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2011, 6: e16228
- 42 Chong H Q, Geng H F, Zhang H F, et al. Enhancing *E. coli* isobutanol tolerance through engineering its global transcription factor cAMP

- p>receptor protein.
- Biotechnol Bioeng*
- , 2014, 111: 700–708
- 43 Lee J Y, Yang K S, Jang S A, et al. Engineering butanol-tolerance in *Escherichia coli* with artificial transcription factor libraries. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108: 742–749
 - 44 Wang J Q, Zhang Y, Chen Y L, et al. Global regulator engineering significantly improved *Escherichia coli* tolerances toward inhibitors of lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 3133–3142
 - 45 Bowden A C, Cardenas M L. *Control of Metabolic Processes*. New York: Plenum Press, 1990
 - 46 Bailey J E, Sburlati A, Hatzimanikatis V, et al. Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 52: 109–121
 - 47 Hong M E, Lee K S, Yu B J, et al. Identification of gene targets eliciting improved alcohol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. *J Biotechnol*, 2010, 149: 52–59
 - 48 Jin Y S, Alper H, Yang Y T, et al. Improvement of xylose uptake and ethanol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through an inverse metabolic engineering approach. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 8249–8256
 - 49 Liu Z H, Liu L F, Osterlund T, et al. Improved production of a heterologous amylase in *Saccharomyces cerevisiae* by inverse metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80: 5542–5550
 - 50 Lee K S, Hong M E, Jung S C, et al. Improved galactose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108: 621–631
 - 51 Pandhal J, Woodruff L B A, Jaffe S, et al. Inverse metabolic engineering to improve *Escherichia coli* as an *N*-glycosylation host. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 2482–2493
 - 52 Ghosh C, Gupta R, Mukherjee K J. An inverse metabolic engineering approach for the design of an improved host platform for over-expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 93
 - 53 Patil K R, Nielsen J. Uncovering transcriptional regulation of metabolism by using metabolic network topology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 2685–2689
 - 54 Park J H, Lee K H, Kim T Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of *L*-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 7797–7802
 - 55 Lee K H, Park J H, Kim T Y, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for *L*-threonine production. *Mol Syst Biol*, 2007, 3: 1–8
 - 56 Qian Z G, Xia X X, Lee S Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four carbon diamine. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104: 651–662
 - 57 Lindberg P, Park S, Melis A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng*, 2010, 12: 70–79
 - 58 Atsumi S, Cann A F, Connor M R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng*, 2008, 10: 305–311
 - 59 Altaras N E, Cameron D C. Metabolic engineering of a 1,2-propanediol pathway in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 1180–1185
 - 60 Yim H, Haselbeck R, Niu W, et al. Metabolic engineering *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 445–452
 - 61 Rodrigues A L, Becker J, Lima A O, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for gram scale production of the antitumor drug deoxyviolacein from glycerol. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111: 2280–2289
 - 62 Thompson R A, Trinh C T. Enhancing fatty acid ethyl ester production in *Saccharomyces Cerevisiae* through metabolic engineering and medium optimization. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111: 2200–2208
 - 63 Wang Q, Yang P, Xian M, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for poly(3-hydroxypropionate) production from glycerol and glucose. *Biotechnol Lett*, 2014, 36: 2257–2262
 - 64 Jha A K, Pokhvel A R, Chaudhary A K, et al. Metabolic engineering of rational screened *Saccharopolyspora spinosa* for the enhancement of spinosyns A and D production. *Mol Cells*, 2014, 37: 727–733
 - 65 Hoshino T. Violacein and related tryptophan metabolites produced by chromobacterium violaceum: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91: 1463–1475
 - 66 Zakataeva N P, Aleshin V V, Tokmakova I, et al. The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett*, 1999, 452: 228–232
 - 67 Kruse D, Kramer R, Eggeling L, et al. Influence of threonine exporters on threonine production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59: 205–210
 - 68 Sumantran V N, Schweizer H P, Datta P. A novel membrane-associated threonine permease encoded by the *tdcC* gene of *Escherichia coli*.

- J bacteriol, 1990, 172: 4288–4294
- 69 Toth J, Ismaiel A A, Chen J S. The *ald* gene, encoding a coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase, distinguishes *Clostridium beijerinckii* and two other solvent-producing clostridia from *Clostridium acetobutylicum*. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 4973–4980
 - 70 Sivaraman K, Seshasayee A, Cole A M, et al. Codon choice in genes depends on flanking sequence information-implications for theoretical reverse translation. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 1–8
 - 71 Samant S, Grupta G, Karthikeyan S, et al. Effect of codon-optimized *E. coli* signal peptides on recombinant *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase periplasmic localization, yield and activity. J Ind Microbiol Biot, 2014, 41: 1435–1442
 - 72 Park S Y, Kim B, Lee S, et al. Increased 2,3-butanediol production by changing codon usages in *Escherichia coli*. Biotechnol Appl Biochem, 2014, 61: 535–540
 - 73 Utashima Y, Matsumoto H, Masaki K, et al. Heterologous production of horseradish peroxidase C1a by the bacidiomycete yeast *Cryptococcus* sp. S-2 using codon and signal optimizations. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98: 7893–7900
 - 74 Lanza A M, Curran K, Rey L G, et al. A condition-specific codon optimization for improved heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Syst Biol, 2014, 8: 33
 - 75 Liu G L, Fu G Y, Chi Z, et al. Enhanced expression of the codon-optimized exo-inulinase gene from the yeast *Meyerozyma guilliermondii* in *Saccharomyces* sp. Wo and bioethanol production from inulin. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98: 9129–9138
 - 76 Maharjan S, Singh B, Bok J D, et al. Exploring codon optimization and response surface methodology to express biologically active transmembrane RANKL in *E. coli*. PLoS One, 2014, 5: e96259
 - 77 Yuan L Z, Rouviere P E, LaRossa R A, et al. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. Metab Eng, 2006, 8: 79–90
 - 78 Qiu Y M, Xiao F, Wei X T, et al. Improvement of lichenysin in *Bacillus licheniformis* by replacement of native promoter of lichenysin biosynthesis operon and medium optimization. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98: 8895–8903
 - 79 Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 6640–6645
 - 80 Herrgard M J, Swainston N, Dobson P, et al. A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. Nat Biotechnol, 2008, 26: 1155–1160
 - 81 Ma H W, Zeng A P. Reconstruction of metabolic networks from genome data and analysis of their global structure for various organisms. Bioinformatics, 2003, 19: 270–277
 - 82 Lee J M, Yun H, Feist A M, et al. Genome-scale reconstruction and *in silico* analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80: 849–862
 - 83 Becker S A, Palsson B. Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Staphylococcus aureus* N315: an initial draft to the two-dimensional annotation. BMC Microbiol, 2005, 5: 8
 - 84 Forster J, Famili I, Fu P, et al. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. Genome Res, 2003, 13: 244–253
 - 85 Reed J L, Vo T D, Schilling C, et al. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). Genome Biol, 2003, 4: R54
 - 86 Moxley J F, Jewett M C, Antoniewicz M R, et al. Linking high-resolution metabolic flux phenotypes and transcriptional regulation in yeast modulated by the global regulator Gcn4p. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 6477–6482
 - 87 Badarinarayana V, Estep P W, Shendure J, et al. Selection analyses of insertional mutants using subgenic-resolution arrays. Nat Biotechnol, 2001, 19: 1060–1065
 - 88 Alper H, Jin Y S, Moxley J F, et al. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. Metab Eng, 2005, 7: 155–164
 - 89 Pharkya P, Burgard A P, Maranas C D. OptStrain: a computational framework for redesign of microbial production systems. Genome Res, 2004, 14: 2367–2376
 - 90 Pharkya P, Maranas C D. An optimization framework for identifying reaction activation/inhibition or elimination candidates for overproduction in microbial systems. Metab Eng, 2006, 8: 1–13
 - 91 Gao L R, Jiang X, Fu S L, et al. *In silico* identification of potential virulence genes in 1,3-propanediol producer *Klebsiella pneumoniae*. J Biotechnol, 2014, 189: 9–14
 - 92 Yip K Y, Alexander R P, Yan K K, et al. Improved reconstruction of *in silico* gene regulatory networks by integrating knockout and perturbation data. PLoS One, 2010, 5: e8121
 - 93 Ohno S, Furusawa C, Shimizu H. *In silico* screening of triple reaction knockout *Escherichia coli* strains for overproduction of useful metabolites. J Biosci Bioeng, 2013, 115: 221–228

- 94 Patil K R, Nielsen J. Uncovering transcriptional regulation of metabolism by using metabolic network topology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 2685–2689
- 95 Burgard A P, Pharkya P, Maranas C D. Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 84: 647–657
- 96 Fong S S, Burgard A P, Herring C D, et al. *In silico* design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 91: 643–648
- 97 Lee S Y, Lee D Y, Kim T Y. Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol*, 2005, 23: 349–358

Application of Systems Metabolic Engineering in the Microbial Directed Evolution

WANG XianJu¹, LV Jing¹ & FU PengCheng²

1 State Key Laboratory of Heavy oil Processing, College of Chemical Engineering, Institute of New Energy, China University of Petroleum (Beijing), Beijing 102249, China;

2 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Rapid advancement of systems biology enable our understanding of cellular properties in physiology, biochemistry, metabolism and regulation. One of the main applications for systems metabolic engineering, based on systems biology, is to increase microbial cells tolerance to their environmental stress and to enhance production of desired products using directed evolution on microbes. The former goal is achieved using global transcriptional mechanism engineering and inverse metabolic engineering; the latter is implemented by the strategies such as designing and inserting optimal pathways, reconstructing metabolic networks, *in silico* knocking-out of genes and wet-lab validation, etc. This paper reviews some technological and applicational developments involve the use of systems metabolic engineering to solve problems in cellular biological engineering.

systems metabolic engineering, global transcriptional mechanism engineering, inverse metabolic engineering, metabolic networks, *in silico* knocking-out of genes

doi: 10.1360/N052014-00267