



细胞工厂中的代谢传质与过程强化

王颖, 李春*

北京理工大学生命学院生物工程系, 北京 100081

* 联系人, E-mail: lichun@bit.edu.cn

收稿日期: 2017-03-21; 接受日期: 2017-04-23; 网络版发表日期: 2017-05-12

国家杰出青年科学基金(批准号: 21425624)和中国博士后科学基金面上项目(批准号: 2015M580052)资助

摘要 细胞工厂是生物制造的重要技术平台, 为生物质资源的开发和利用奠定了基础. 代谢传质是细胞新陈代谢必不可少的部分, 也是提高代谢产物合成的关键因素之一. 胞内传质的方式和对象多样、效率不一, 低效率的代谢传质严重影响了细胞工厂的生产能力. 跨膜传质和无膜传质是代谢传质的两种主要形式, 通过对这两种传质途径的改造和优化, 可以提高细胞工厂生产初级代谢产物、次级代谢产物和生物大分子的能力. 运用合成生物学和代谢工程手段, 从多个角度对细胞的传质途径进行改造或从头设计、构建, 可以有效提高代谢传质的效率、降低中间代谢物的损耗、提高目标产物的产量. 本文从不同类型的代谢传质出发, 总结了近年来利用强化代谢传质提高细胞工厂合成能力的研究, 为更加深入、系统地研究代谢传质, 拓宽其在细胞工厂生产中的应用提供了参考和策略.

关键词 代谢工程, 跨膜传质, 无膜传质, 细胞工厂, 生物制造

第二次工业革命以来, 以化石燃料为基础的近代工业发展迅速, 工业文明空前繁荣. 然而, 作为不可再生资源, 化石燃料的过度使用导致当今社会能源、资源、环境等方面危机的产生, 影响了人类社会的可持续发展. 近年来, 生物质资源的开发与利用成为人们研究的热点, 利用可再生生物质资源代替化石燃料、打破传统的物质加工方式、采用高效清洁的生产模式, 是实现可持续发展, 解决能源问题和环境危机的有效手段之一. 生物质资源的开发和利用离不开细胞工厂的构建和应用^[1]. 所谓细胞工厂可以笼统地定义为利用细胞的代谢来实现物质的生产加工, 近年来受到许多研究人员的青睐. 代谢工程、合成生物学以及工业生物技术的快速发展为细胞工厂的构建和改造提

供了更多的方法和技术, 从而也为生物质可再生资源的合理利用、实现生物化学转化、合成目标化合物奠定了基础^[1-4]. 细胞工厂的范围很广, 微生物细胞、动物细胞、植物细胞均可被开发改造成高效细胞工厂, 其中, 微生物细胞应用最为广泛^[5,6]. 微生物种类繁多, 可以利用多种底物包括纤维素、淀粉等可再生资源作为碳源. 经改造后的微生物细胞工厂可用于生产氨基酸、有机酸、醇类等工业化合物, 也可用于生产抗生素、药物、维生素等医药产品^[7-9], 具有重要的工业生产价值.

细胞工厂的构建和改造是生物制造的核心技术. 以微生物细胞工厂为例, 由于受到微生物胞内酶系种类、转化效率以及代谢途径等的限制, 天然的微生

引用格式: 王颖, 李春. 细胞工厂中的代谢传质与过程强化. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 544-553

Wang Y, Li C. Metabolite transport and process enhancement in cell factories. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 544-553, doi: 10.1360/N052017-00059

物细胞并不一定适合作为细胞工厂,需要对其进行分子、酶、代谢网络、细胞等多个层面的改造,利用分子生物学、蛋白质工程、合成生物学和代谢调控等方法对其进行设计优化,从而充分利用微生物广泛的物质分解转化和超强的化学合成能力,构建高效微生物细胞工厂.例如,Keasling研究组^[10]通过在酵母细胞中引入青蒿素的合成途径并经过遗传改造、途径优化、后期发酵等,实现了抗疟疾药物前体青蒿酸的微生物高效合成,产量已经达到25 g/L,构建了生产青蒿酸的酵母细胞工厂;Stephanopoulos研究组^[11]在大肠杆菌中引入了紫衫二烯合成途径,通过对合成途径功能模块的精细调控,获得了高产紫衫二烯的大肠杆菌,构建了生产紫衫二烯的大肠杆菌细胞工厂.

除了常见的微生物细胞工厂改造方法外,细胞中的代谢传质研究也是对微生物细胞工厂进行构建、改造及优化的重要组成部分.细胞工厂的正常运行离不开胞内的代谢反应,利用细胞的物质代谢得到目的产物是构建细胞工厂并应用于生产的主要方式^[12],在这个过程中,代谢传质起到了重要的作用.通过物质传递和运输的研究可以加强代谢水平和代谢效率,提高细胞工厂的生产能力、工作效率及其工业化应用.近年来,微生物细胞工厂经过设计、构建和改造,已经成功实现了多种化合物的合成,在合成途径构建成功后,基于细胞工厂的生产目的,通过加强或阻断物质转运的方式可以有效提高代谢物的产量.本文对细胞工厂尤其是微生物细胞工厂中的代谢传质及其应用进行了总结.代谢传质的研究为细胞工厂更广泛、更高效的应用提供了新的方法和手段,有利于细胞工厂的大规模应用,从而为实现生物质资源的有效利用、实现社会的可持续发展奠定了基础.

1 细胞工厂中的代谢传质

代谢反应涉及种类繁多的化合物相互关联,意味着代谢传质也是一个多样化的过程,通过对代谢传质特征和对象的分析,可以从两个方面来对其进行分类(图1).

根据传质的物理和结构特征,细胞工厂中的代谢传质可以分为跨膜传质和无膜传质两类.跨膜传质主要是指物质通过细胞膜和细胞器膜的转运过程.细胞膜传质包括胞内传入和胞外转出^[13],而细胞器膜的传

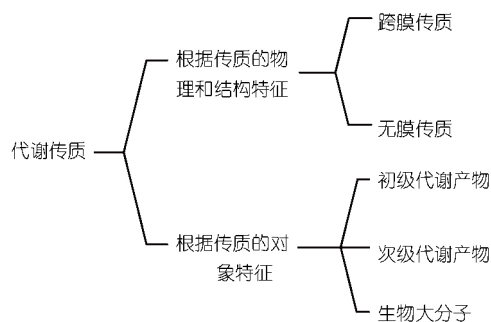


图1 细胞工厂中的代谢传质分类

质包括物质在细胞器中的进入和转出^[14].细胞内的膜结构是许多代谢反应得以顺利进行的保障,底物的摄入、代谢中间产物在不同膜结构之间的转运以及代谢终产物的胞外转运是化合物合成的主要步骤,对代谢过程中跨膜转运的研究有利于加强代谢效率、合成特异性产物、简化后期处理^[15].研究表明,通过对跨膜转运的控制和设计,例如,加强代谢产物的胞外转运,可以提高产物的合成^[16,17].无膜传质是指细胞质或细胞器中的物质传输,加强无膜传质可以缩短代谢中间产物在空间上的距离,有利于产物的合成.近年来,人们在物质无膜传质中的研究也取得了不错的成果,例如,通过多种脚手架(scaffold)的构建来提高胞内传质效率,从而提高产物合成的效率和产量^[18,19].

根据传质的对象特征可以将代谢传质分为几类物质的传递.包括初级代谢产物(如醇类、酸类)、次级代谢产物(如植物天然产物、抗生素、维生素)以及生物大分子(如蛋白质、酶).不同种类的物质在传递和运输过程中具有不同的原理和传质方式,对不同种类物质的传质研究有利于拓宽细胞工厂的产物范围.目前,已经成功应用细胞工厂实现了1,4-丁二醇、多种氨基酸、天然产物、抗生素等的合成,其生产过程中代谢传质的研究也得到了极大的关注.

2 跨膜传质提高细胞工厂的生产能力

跨膜传质在细胞新陈代谢中发挥着关键的作用,最常见的营养物质的摄入和代谢废物的排出就涉及细胞膜的物质转运过程^[20-22].不仅如此,跨膜传质在利用细胞工厂进行化合物生产过程中也很重要,例如,许多氨基酸、醇类、天然产物的生产都与这一过程密不可分^[22-25].

2.1 跨膜传质在氨基酸生产中的应用

氨基酸转运系统在原核和真核生物中都很常见, 不仅体现在最普遍的生物体吸收氨基酸用于蛋白质的合成或分解代谢, 还体现在不同氨基酸的生产过程中^[26,27]. 微生物发酵是目前生产氨基酸最常用的方法, 高产氨基酸的微生物细胞工厂的构建也是当前研究的热点之一. 随着合成生物学与代谢工程的发展, 除传统的诱变育种外, 对氨基酸生产菌株的合成基因表达强化、途径优化与调控、代谢流控制等代谢改造策略都已成功应用于高产菌株的筛选, 在经过一系列改造后显著提高了氨基酸的含量^[28]. 然而, 氨基酸在胞内的过量积累会抑制细胞的生长, 尽管细胞本身会

对此作出应急措施, 如通过改变细胞膜的通透性或通过氨基酸转运蛋白将胞内的氨基酸转运至胞外, 但自身的调控相对于工业生产来说作用有限, 氨基酸的胞外转运过程仍然成为获得高产量的瓶颈. 因此, 通过强化氨基酸的胞外转运能力来提高其产量是构建高效氨基酸细胞工厂的有效途径. 大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌中与氨基酸运输相关的基因如表1所示^[22].

从表1可以看出, 不同种类氨基酸转运涉及的基因不同, 转运的方式也不一. 人们基于氨基酸转运系统的研究, 将其应用于氨基酸的生产中, 取得了显著的效果. 例如, Petra研究组^[48]通过上调谷氨酸棒状杆菌中*thrE*基因的表达量, 增加ThrE转运蛋白的表达水

表1 谷氨酸棒状杆菌与大肠杆菌中与氨基酸转运相关的基因及蛋白^[22]

转运蛋白	基因	底物	功能	参考文献
谷氨酸棒状杆菌				
AroP	<i>aroP</i>	L-色氨酸、L-酪氨酸、L-苯丙氨酸	芳香族氨基酸摄入系统	[29]
BrnQ	<i>brnQ</i>	L-异亮氨酸	Na ⁺ 偶联的氨基酸摄入系统	[30]
谷氨酸通透酶	—	L-谷氨酸	在复合培养基中的摄入系统	
LysE	<i>lysE</i>	L-赖氨酸、L-精氨酸	转膜蛋白, 表达受LysG调控, 同时受L-脯氨酸和L-组氨酸的协同诱导表达	[31]
LysI	<i>lysI</i>	L-赖氨酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸	低效率的反向转运体	[32]
ThrE	<i>thrE</i>	L-苏氨酸、L-丝氨酸	外排载体	[33]
大肠杆菌				
AroP	<i>aroP</i>	L-色氨酸、L-酪氨酸、L-苯丙氨酸	芳香族氨基酸摄入系统	[34]
天冬氨酸/谷氨酸载体	—	L-天冬氨酸、L-谷氨酸	结合蛋白依赖型摄入系统, 受半胱氨酸抑制	[35]
GltP	<i>gltP</i>	L-天冬氨酸、L-谷氨酸	非Na ⁺ 依赖型摄入系统, 受半胱氨酸和β-羟基天冬氨酸抑制	[36]
GltS	<i>gltS</i>	L-谷氨酸	Na ⁺ 依赖型摄入系统, 受α-甲基谷氨酸抑制	[37]
谷氨酸外排载体	—	L-谷氨酸	应急反应相关外排系统	[38]
LIV1	<i>LivGHJM</i>	L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-缬氨酸、L-丙氨酸、L-苏氨酸、L-高丝氨酸	结合蛋白依赖型摄入系统, 表达受LRP抑制	[39]
Orf299	<i>ydeD</i>	L-半胱氨酸及半胱氨酸途径的其他化合物	外排过程的主要促进蛋白	[40]
PheP	<i>pheP</i>	L-苯丙氨酸	苯丙氨酸高特异性摄入系统	[41]
RhtA	<i>rhtA</i>			[42]
RhtB	<i>rhtB</i>		抵抗高浓度高丝氨酸和苏氨酸	[43]
RhtC	<i>rhtC</i>			[44]
SstT	<i>sstT</i>	L-丝氨酸、L-苏氨酸	Na ⁺ 偶联的丝氨酸/苏氨酸摄入蛋白	[45]
TdcC	<i>tdcC</i>	L-亮氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-高丝氨酸	厌氧条件下的摄入蛋白	[46]
苏氨酸通透酶	—	L-苏氨酸、L-丝氨酸	非Na ⁺ 依赖型摄入系统	[47]

平,可以显著提高细胞中苏氨酸的分泌,苏氨酸的产量相较于原始菌株提高了49%。Xu研究组^[49]通过在谷氨酸棒状杆菌中引入大肠杆菌的*argO*基因,并同时过表达自身的*lysE*基因,在谷氨酸棒状杆菌中进行了两种精氨酸转运蛋白的过量表达,精氨酸的产量相对于原始菌株提高了13.6%。此外,Ikeda和Katsumata等人^[50]通过诱变的方法获得了色氨酸摄入能力受损的突变株,通过阻止细胞外积累的色氨酸重新转运回细胞内,成功将产量提高了20%左右。由此可见,无论是强化氨基酸从胞内转运到胞外,还是阻止积累的氨基酸从胞外转运回胞内,都有利于解除胞内过多积累氨基酸而造成的反馈抑制,从而生产更多的目的产物。

不仅通过细胞膜的传质过程可以调控氨基酸的生产,细胞器膜的传质也可以用于氨基酸生产过程的优化。Nielsen研究组^[51]研究发现,通过对酿酒酵母中L-鸟氨酸合成通路的重新设计和模块化构建,可以实现L-鸟氨酸的高产。酿酒酵母可以作为大宗化学品、生物燃料、天然产物等多种化合物的底盘宿主,因其优良的生产性能、成熟的遗传改造方法而广受研究人员的青睐,是性能优良的细胞工厂^[52]。Nielsen研究组^[51]通过对酿酒酵母中的鸟氨酸循环进行重新设计、并对亚细胞结构之间的传质进行改造(图2)以及代谢通路的重新定位,得到了产量为1.04 g/L的鸟氨酸,通过进一步的发酵优化将产量提高到了5.1 g/L。

在L-鸟氨酸的合成过程中,L-鸟氨酸需由转运蛋

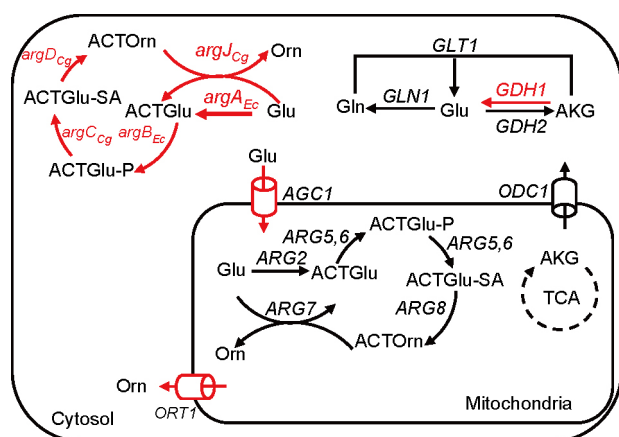


图2 L-鸟氨酸合成中亚细胞结构的传质改造^[51](网络版彩图)

ORT1: 线粒体内膜鸟氨酸转运蛋白; AGC1: 谷氨酸单向传递体; ODC1: ornithine decarboxylase 1, 线粒体内膜 α -酮基甲酸酯或 α -酮戊二酸转运蛋白; Glu: glutamic, 谷氨酸; Orn: ornithine, 鸟氨酸

白Ort1从线粒体转出至细胞质。Nielsen研究组过表达了Ort1,使L-鸟氨酸的量提高了44%;再对谷氨酸单向传递体AGC1过表达,提高L-鸟氨酸合成的前体L-谷氨酸进入线粒体的量,又进一步将产量提高了30%。通过对两个转运蛋白的强化,酿酒酵母的生产能力得到了提高,该方法既及时补充足够的前体物,又将代谢产物输出到反应的亚结构之外,积累更多的代谢终产物。细胞内部的传质过程经常成为代谢通路的限速步骤,影响细胞工厂的高效生产,而过表达相关转运蛋白则为解决这一问题提供了有效的手段。

2.2 跨膜传质在植物天然产物生产中的应用

天然产物是自然界中生物体产生的通常具有药理学或生物学活性的化学物质。来源包括植物、动物以及微生物等。天然产物具有丰富的结构和化学多样性,是药物研发的理想资源^[53],同时也在化工、化妆品、保健品、农业等领域具有广泛的应用^[54,55]。其中,植物天然产物种类繁多,功能多样,其有效成分包括萜类、黄酮类、生物碱类、皂苷类、多糖类等,受到了人们较多的研究关注。植物天然产物的合成包括从天然植物中提取、化学合成或半合成、植物细胞培养和微生物合成等方法。天然产物的合成是一个细胞内多个亚结构共同作用的过程。以植物次生代谢产物中最大的一类化合物萜类为例,其合成就是一个复杂的多细胞器参与的过程(图3)^[56]。萜类合成的前体物质是IPP和DMAPP,自然界中存在两种提供IPP或DMAPP的途径,即甲羟戊酸途径(mevalonic acid, MVA)和1-脱氧木酮糖-5-磷酸途径(2-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway, MEP)^[57],这两条途径都是在细胞质中发挥作用;以此为基础进行的其他中间产物及终产物合成的酶则多分布于内质网和线粒体内膜上,如细胞色素氧化酶P450;在合成萜类物质后,如何将得到的目的产物转运到细胞外是细胞膜传质的研究内容。由此可见,在萜类的合成过程中,代谢传质起到了关键的作用,也是人们在构建萜类合成的细胞工厂中研究的热点之一。

随着基因测序技术的不断成熟以及代谢工程与合成生物学的快速发展,利用微生物作为细胞工厂来合成植物天然产物受到了越来越多的关注。上文提到过的Keasling研究组^[10]通过多年的努力最终在酿酒酵母中实现了抗疟疾药物前体青蒿素的生物合成,为利用微生物细胞工厂进行植物天然产物的合成提供了成

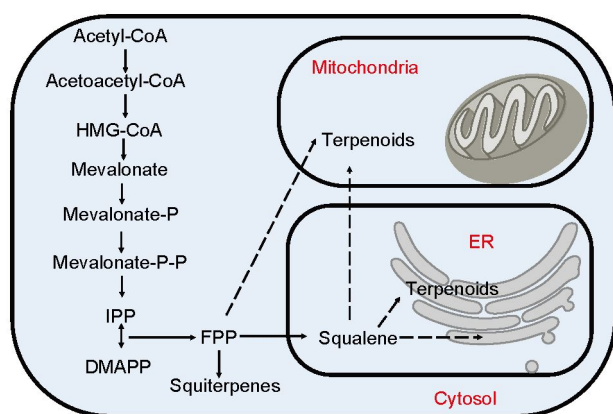


图3 萜类的合成过程(网络版彩图)

HMG-CoA: 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A; Mevalonate-P: 甲羟戊酸磷酸; Mevalonate-P-P: 甲羟戊酸焦磷酸; IPP: isoprene pyrophosphate, 异戊二烯焦磷酸; DMAPP: dimethylallyl pyrophosphate, 二甲基丙烯基焦磷酸; FPP: farnesyl pyrophosphate, 法尼基焦磷酸

功的案例. Keasling研究组^[58]发现, 在青蒿酸高产的酿酒酵母中, 属于ABC转运蛋白家族的多效抗药基因(*PDR*)的表达有明显的提高, 即酵母通过加强自身的外排能力来耐受更高浓度的青蒿酸, 这说明在青蒿酸的合成过程中, 转运蛋白起到了一定的促进作用, 因而, 研究在青蒿酸合成过程中的代谢传质对于提高其产量具有重要的意义. 国内的邓子新研究组^[16]通过在链霉菌中过表达ABC转运蛋白AvtAB, 使阿维菌素的产量提高了2倍, 说明在天然产物的合成过程中, 细胞胞外转运能力的增强有利于提高目的产物产量.

2.3 跨膜传质在酶、生长因子等生物大分子合成中的应用

生物大分子如酶、蛋白类生长因子、疫苗等与人们的日常生活和身体健康息息相关. 蛋白质是最常见的生物大分子, 从mRNA翻译后得到的前体蛋白到形成具有特定功能的成熟蛋白, 需要经过一系列的修饰、传质和转运过程. 细胞中的蛋白质在合成后需要定位到特定的位置发挥功能, 包括膜结构(细胞膜、细胞器膜等)、细胞质、溶酶体、过氧化物酶体等或者分泌到胞外, 其定位和转运需要信号肽、分子伴侣、异位子等的共同作用从而使蛋白质能够顺利穿过膜结构, 到达正确的位置, 是一个复杂的传质过程. 而通过转运和传递过程到达内质网和高尔基体的蛋白质会经过修饰和加工, 获得多种多样的结构和功能, 常见

的蛋白质修饰方法包括磷酸化、乙酰化和甲基化、泛素化和糖基化. 对蛋白质修饰转运和传递的研究, 为蛋白质生产过程的改造和优化提供了理论支持和靶标, 有利于提高细胞工厂中蛋白质的合成, 其中最突出的例子就是酶的生产和改造.

酶的生产和应用可以追溯到19世纪末期, 德国生物学家Edward Buchner第一次提出酶的概念. 在这之后, 酶作为一种催化剂, 广泛应用于各个生产领域, 并且在医药、化妆品、食品等领域的应用也日益扩大. 微生物发酵法是20世纪50年代以来生产酶的主要方法, 而利用微生物细胞工厂生产时离不开酶的分泌和传质过程. 大多数细菌的蛋白质是通过Sec蛋白转运途径分泌到胞外的, 例如, 经常用作工业酶制剂生产菌的枯草芽孢杆菌^[59]. Sec途径可以转运多种蛋白质, 包括毒性因子、菌毛、蛋白酶、黏附素等, 该途径的主要组分有信号肽、信号肽酶、SecREG通道以及各种细胞因子等^[60,61]. Sec途径的主要功能是把蛋白质转运到周质中, 要求被转运的蛋白不能发生折叠或部分折叠, 到达周质或胞外后方能进行折叠从而成为有活性的蛋白质, 发挥相应的功能^[61]. 通过对Sec途径的改造可以提高枯草芽孢杆菌生产内源蛋白或外源蛋白的能力^[62-64]. 例如, Zhao研究组^[65]通过对枯草芽孢杆菌中Sec途径信号肽的优化和筛选, 提高了其分泌耐碱木聚糖酶的能力, 提高了耐碱木聚糖酶的产量.

提高生物大分子的跨膜转运效率不仅可以加快细胞内的代谢反应还能提高产物的胞外积累, 对于生物大分子的生产有着重要的作用.

3 无膜传质提高细胞工厂的生产能力

跨膜传质在底物摄入、有膜结构参与的代谢过程、产物转运到胞外或多个细胞器之间的代谢反应中发挥着重要的作用, 而在细胞质或细胞器内部, 无膜传质的能力决定着细胞工厂的生产效率.

3.1 提高无膜传质效率、降低无膜传质消耗来提高细胞工厂的生产能力

利用细胞进行化合物的生物合成时, 途径酶的反应效率决定了目标产物的转化效率与产量. 在多种酶参与的反应中, 中间代谢物需要从一个酶的作用空间到达下一个酶的作用空间, 该过程离不开无膜传质. 在

多酶反应中,一种酶催化产生的代谢产物直接转移到下一种顺序反应酶而不被扩散的现象称为“底物隧道效应”^[66].底物隧道效应有利于减少多酶催化反应中的空间位阻,缩短无膜传质距离,减少有害中间体的积累,提高合成效率.融合蛋白表达和酶的空间定位都可以通过减少代谢传质的消耗来提高底物隧道效应.

融合蛋白技术是减少代谢合成过程中无膜传质最简单的方法,相关的研究也很成熟.例如,Mortensen研究组^[67]通过将酿酒酵母中MVA途径中的FPP合酶与广藿香醇合酶融合,使其产量提高了2倍.Ohto等人^[68]在酿酒酵母中融合表达了羟甲基戊二酰辅酶A还原酶和两个异戊二烯二磷酸合酶,经过进一步的条件优化得到了138.8mg/L的香叶基香叶醇.虽然融合蛋白表达的方法可以直接减少无膜传质过程,但融合蛋白表达时容易形成包涵体,也难以控制酶的空间位置,在实际应用中具有一定的局限性.鉴于此,人们又开发出了“脚手架”(scaffolds)的方法来实现级联酶促反应的空间定位,减少无膜传质过程,提高传质效率.

Dueber等人^[18]首先利用人工设计的蛋白质脚手架实现了代谢流的控制.在大肠杆菌中合成甲羟戊酸需要内源的乙酰乙酰辅酶A硫解酶和来源于酵母细胞的羟甲基戊二酰辅酶A合酶、羟甲基戊二酰辅酶A还原酶, Dueber等人以蛋白-蛋白相互作用域/配体的方式设计和构建蛋白质脚手架,将这3种酶通过脚手架共定位,从而对甲羟戊酸合成中的代谢流加以控制和量化计算,最终在酶表达量较低的情况下仍能将甲羟戊酸的量提高77倍,同时利用相似的方法来生产葡萄糖二酸,可以将产量提高3倍.在此之后, Wang和Yu^[69]在酿酒酵母中利用信号传导过程中的蛋白作为支架,将白藜芦醇合成所需要的酶进行空间定位,使其产量提高了5倍. Liu等人^[70]通过三功能蛋白支架对3个脱氢酶进行共定位,并在酵母表面展示后,将NADH的量提高了5倍.不仅蛋白质脚手架可以用于对代谢途径的控制,其他形式的脚手架也被开发出来. Silver研究组^[71]通过RNA脚手架的构建与优化,将十五烷合成过程中的两个酶进行共定位,使其产量提高了140%,当这种RNA脚手架应用于多酶的共定位生产琥珀酸时,琥珀酸的产量提高了83%.该研究组还设计了一种脂类和蛋白混合的脚手架,并用于靛蓝的生产,能够有效提高靛蓝的产量^[72].脚手架的方法可以增强底物隧道效应,是构建高效细胞工厂的新途径.

3.2 无膜传质代替跨膜传质提高细胞工厂的生产能力

跨膜传质和无膜传质是细胞中代谢传质的两种主要形式,相较于无膜传质而言,跨膜传质往往是一个耗能的过程,而且需要特定的转运蛋白或通道.细胞中的许多反应常处于特定的细胞器中,且往往不是在同一细胞亚结构内完成的,这增加了跨膜传质的消耗,不利于中间代谢物的有效传递.为解决这一问题,科研人员采取了亚细胞定位的方法,将代谢途径区室化,使跨膜传质转变为无膜传质,提高代谢产物的合成.

酿酒酵母中异丁醇的合成是在线粒体和细胞质中共同完成的,其上游途径在线粒体中完成,下游途径则在细胞质中完成,因此整个过程中,中间代谢物需要进行线粒体的跨膜传质. Stephanopoulos研究组^[73]对该途径进行了分析和改造,采用两种方法来进行合成,一种采取原有的线粒体和细胞质合成途径,另一种将整个合成途径定位到了线粒体中.结果显示,当同样过表达异丁醇合成途径下游的3个酶(未经改造时位于细胞质中)时,定位到线粒体中可以将异丁醇产量提高260%(图4B),而仍然在细胞质中则产量只提高了10%(图4A)^[73].类似地, Vainstein研究组^[56]通过将朱槿倍半萜合酶定位于线粒体中,充分利用了线粒体中的FPP库,提高了朱槿倍半萜的产量.由此可见,利用区室化的方法生产目标产物时,可以利用不同亚细胞结构的优势,提高酶在特定区域的浓度,提高中间代谢物的利用率,降低中间代谢物跨膜转运的需求,由无膜传质代替跨膜传质,减少了中间代谢物的损失.

4 讨论与展望

细胞工厂的提出为生物制造提供了关键的技术平台,代谢工程、合成生物学、系统生物学的发展为细胞工厂的构建和改造提供了理论和技术基础.代谢传质是细胞新陈代谢必不可少的一部分,因而高效细胞工厂的构建离不开代谢传质的调控和优化.通过对不同形式、不同目标产物代谢传质的研究,可以提高产量、降低生产成本,对于细胞工厂的大规模应用意义重大.近年来,科研人员针对不同代谢产物的合成途径及发酵过程进行优化,有效提高了细胞工厂的生产能力.然而,对于传质过程优化的研究还有待深入,

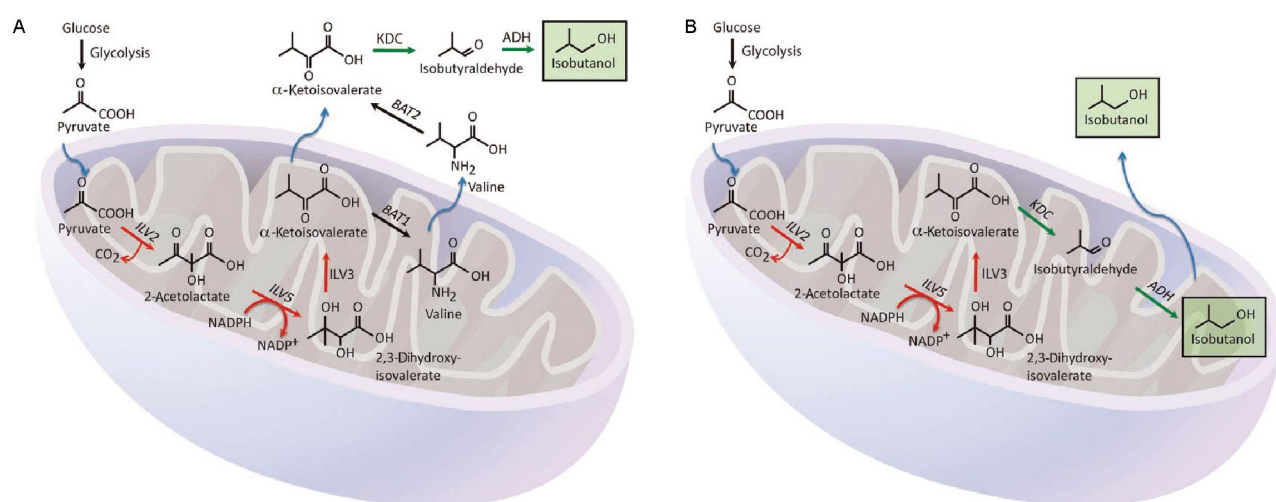


图4 异丁醇在线粒体及细胞质中的合成途径(A)和在线粒体中的合成途径(B)^[73](网络版彩图)

虽然目前也有很多代谢传质的探究,但大部分都是在特定条件下的改进,缺乏系统性和普适性,在研究转运系统的方法策略上也较为单一,限制了代谢传质在细胞工厂生物合成中的应用。随着生物制造需求的提

高,代谢传质的作用将会吸引更多的关注,从传质的原理和方式出发,提高代谢传质的效率、降低代谢传质的消耗,对于构建全面、绿色、高效的细胞工厂具有深远的意义。

参考文献

- 1 de Jong B, Siewers V, Nielsen J. Systems biology of yeast: enabling technology for development of cell factories for production of advanced biofuels. [Curr Opin Biotech](#), 2012, 23: 624–630
- 2 Punt P J, van Biezen N, Conesa A, et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. [Trends Biotech](#), 2002, 20: 200–206
- 3 Zhou W, Zhuang Y, Bai Y, et al. Biosynthesis of phlorisovalerophenone and 4-hydroxy-6-isobutyl-2-pyrone in *Escherichia coli* from glucose. [Microb Cell Fact](#), 2016, 15: 149
- 4 Xu Y, Tiago Guerra L, Li Z, et al. Altered carbohydrate metabolism in glycogen synthase mutants of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002: cell factories for soluble sugars. [Metab Eng](#), 2013, 16: 56–67
- 5 van Dijl J M, Hecker M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. [Microb Cell Fact](#), 2013, 12: 3
- 6 Wang Y, Wu H, Jiang X, et al. Engineering *Escherichia coli* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space. [Metab Eng](#), 2014, 25: 183–193
- 7 Ferrer-Miralles N, Domingo-Espín J, Corchero J L, et al. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. [Microb Cell Fact](#), 2009, 8: 17
- 8 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
- 9 Rittmann D, Lindner S N, Wendisch V F. Engineering of a glycerol utilization pathway for amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*. [Appl Environ Microbiol](#), 2008, 74: 6216–6222
- 10 Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. [Nature](#), 2013, 496: 528–532
- 11 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
- 12 马延和. 生物炼制细胞工厂: 生物制造的技术核心. [生物工程学报](#), 2010, 26: 1321–1326
- 13 Whittam R, Wheeler K P. Transport across cell membranes. [Annu Rev Physiol](#), 1970, 32: 21–60
- 14 Lodish H, Terazono K, Yamamoto H, et al. Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. A rate-limiting step in protein maturation and secretion. [Transport](#), 1988, 263: 2107

- 15 Wang C, Bao X, Li Y, et al. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. *Metab Eng*, 2015, 30: 79–88
- 16 Qiu J, Zhuo Y, Zhu D, et al. Overexpression of the ABC transporter AvtAB increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 92: 337–345
- 17 Li M, Chen Z, Zhang X, et al. Enhancement of avermectin and ivermectin production by overexpression of the maltose ATP-binding cassette transporter in *Streptomyces avermitilis*. *Bioresour Tech*, 2010, 101: 9228–9235
- 18 Dueber J E, Wu G C, Malmirchegini G R, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 753–759
- 19 Moon T S, Dueber J E, Shiue E, et al. Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*. *Metab Eng*, 2010, 12: 298–305
- 20 Pate J S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol Biochem*, 1973, 5: 109–119
- 21 Moriyama Y, Hiasa M, Matsumoto T, et al. Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica*, 2008, 38: 1107–1118
- 22 Burkovski A, Krämer R. Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotech*, 2002, 58: 265–274
- 23 Wang J F, Xiong Z Q, Li S Y, et al. Enhancing isoprenoid production through systematically assembling and modulating efflux pumps in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 8057–8067
- 24 Yang J, Xiong Z Q, Song S J, et al. Improving heterologous polyketide production in *Escherichia coli* by transporter engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 8691–8700
- 25 Dunlop M J, Dossani Z Y, Szmids H L, et al. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. *Mol Syst Biol*, 2011, 7: 487–487
- 26 Gunji Y, Yasueda H. Enhancement of *L*-lysine production in methylotroph *Methylophilus methylotrophus* by introducing a mutant LysE exporter. *J Biotech*, 2006, 127: 1–13
- 27 Kennerknecht N, Sahm H, Yen M R, et al. Export of *L*-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J Bacteriol*, 2002, 184: 3947–3956
- 28 Wendisch V F. Microbial production of amino acids and derived chemicals: synthetic biology approaches to strain development. *Curr Opin Biotech*, 2014, 30: 51–58
- 29 Wehrmann A, Morakkabati S, Krämer R, et al. Functional analysis of sequences adjacent to dapE of *Corynebacterium glutamicum* reveals the presence of aroP, which encodes the aromatic amino acid transporter. *J Bacteriol*, 1995, 177: 5991–5993
- 30 Tauch A, Hermann T, Burkovski A, et al. Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the brnQ gene product. *Archiv Microbiol*, 1998, 169: 303–312
- 31 Bellmann A, Vrljić M, Pátek M, et al. Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, 2001, 147: 1765–1774
- 32 Seep-Feldhaus A H, Kalinowski J, Pühler A. Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* gene involved in lysine uptake. *Mol Microbiol*, 1991, 5: 2995–3005
- 33 Simic P, Sahm H, Eggeling L. *L*-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, 2001, 183: 5317–5324
- 34 Brown K D. Formation of aromatic amino acid pools in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1970, 104: 177–188
- 35 Schellenberg G D, Furlong C E. Resolution of the multiplicity of the glutamate and aspartate transport systems of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1977, 252: 9055–9064
- 36 Tolner B, Poolman B, Wallace B, et al. Revised nucleotide sequence of the gltP gene, which encodes the proton-glutamate-aspartate transport protein of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1992, 174: 2391–2393
- 37 Kalman M, Gentry D R, Cashel M. Characterization of the *Escherichia coli* K12 gltS glutamate permease gene. *Mol Gen Genet*, 1991, 225: 379–386
- 38 Broda P. Ribonucleic acid synthesis and glutamate excretion in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1968, 96: 1528–1534
- 39 Templeton B A, Savageau M A. Transport of biosynthetic intermediates: homoserine and threonine uptake in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1974, 117: 1002–1009
- 40 Dassler T, Maier T, Winterhalter C, et al. Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol Microbiol*, 2000, 36: 1101–1112

- 41 Pi J, Wookey P J, Pittard A J. Cloning and sequencing of the pheP gene, which encodes the phenylalanine-specific transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1991, 173: 3622–3629
- 42 Zakataeva N P, Aleoshin V A, Livshits V A. Characterization of a pleiotropic mutation that confers upon *Escherichia coli* cells resistance to high concentrations of homoserine and threonine. *FASEB J*, 1977, 11: A935–A935
- 43 Aleshin V V, Zakataeva N P, Livshits V A. A new family of amino-acid-efflux proteins. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24: 133–135
- 44 Zakataeva N P, Aleshin V V, Tokmakova I L, et al. The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett*, 1999, 452: 228–232
- 45 Ogawa W, Kim Y M, Mizushima T, et al. Cloning and expression of the gene for the Na⁺-coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter. *J Bacteriol*, 1998, 180: 6749–6752
- 46 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
- 47 Kruse D, Six S, Krämer R, et al. Analysis of threonine uptake in *Escherichia coli* threonine production strains. *Biotech Lett*, 2001, 23: 401–404
- 48 Simic P, Willuhn J, Sahm H, et al. Identification of glyA (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 3321–3327
- 49 Xu M, Rao Z, Yang J, et al. The effect of a LYSE exporter overexpression on L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*. *Curr Microbiol*, 2013, 67: 271–278
- 50 Ikeda M, Katsumata R. Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience Biotech Biochem*, 1995, 59: 1600–1602
- 51 Qin J, Zhou Y J, Krivoruchko A, et al. Modular pathway rewiring of *Saccharomyces cerevisiae* enables high-level production of L-ornithine. *Nat Commun*, 2015, 6: 8224
- 52 Borodina I, Nielsen J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotech J*, 2014, 9: 609–620
- 53 Cragg G M, Newman D J, Snader K M. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod*, 1997, 60: 52–60
- 54 Bouvier F, Dogbo O, Camara B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science*, 2003, 300: 2089–2091
- 55 Cantrell C L, Dayan F E, Duke S O. Natural products as sources for new pesticides. *J Nat Prod*, 2012, 75: 1231–1242
- 56 Farhi M, Marhevka E, Masci T, et al. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids. *Metab Eng*, 2011, 13: 474–481
- 57 Roberts S C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 387–395
- 58 Ro D K, Ouellet M, Paradise E M, et al. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. *BMC Biotechnol*, 2008, 8: 83
- 59 Westers L, Westers H, Quax W J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1694: 299–310
- 60 Freudl R. Protein secretion in Gram-positive bacteria. *J Biotech*, 1992, 23: 231–240
- 61 Diao L, Dong Q, Xu Z, et al. Functional implementation of the posttranslational SecB-SecA protein-targeting pathway in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 651–659
- 62 Song Y, Nikoloff J M, Zhang D. Improving protein production on the level of regulation of both expression and secretion pathways in *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Biotech*, 2015, 25: 963–977
- 63 Chen J, Fu G, Gai Y, et al. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 92
- 64 Fu L L, Xu Z R, Li W F, et al. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnol Adv*, 2007, 25: 1–12
- 65 Zhang W, Yang M, Yang Y, et al. Optimal secretion of alkali-tolerant xylanase in *Bacillus subtilis* by signal peptide screening. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 8745–8756
- 66 Spivey H O, Ovádi J. Substrate channeling. *Methods*, 1999, 19: 306–321
- 67 Albertsen L, Chen Y, Bach L S, et al. Diversion of flux toward sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* by fusion of host and heterologous enzymes. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 1033–1040
- 68 Ohto C, Muramatsu M, Obata S, et al. Production of geranylgeraniol on overexpression of a prenyl diphosphate synthase fusion gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87: 1327–1334
- 69 Wang Y, Yu O. Synthetic scaffolds increased resveratrol biosynthesis in engineered yeast cells. *J Biotech*, 2012, 157: 258–260

- 70 Liu F, Banta S, Chen W. Functional assembly of a multi-enzyme methanol oxidation cascade on a surface-displayed trifunctional scaffold for enhanced NADH production. *Chem Commun*, 2013, 49: 3766–3768
- 71 Sachdeva G, Garg A, Godding D, et al. *In vivo* co-localization of enzymes on RNA scaffolds increases metabolic production in a geometrically dependent manner. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 9493–9503
- 72 Myhrvold C, Polka J K, Silver P A. Synthetic lipid-containing scaffolds enhance production by colocalizing enzymes. *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 1396–1403
- 73 Avalos J L, Fink G R, Stephanopoulos G. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 335–341

Metabolite transport and process enhancement in cell factories

WANG Ying & LI Chun

Department of Biological Engineering, School of Life Sciences, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Cell factories are the basis of biorefinery and necessary for the development and application of bio-based resources. Metabolite transport is essential for cell metabolism as well as the synthesis of diverse metabolites. There are a variety of methods to transport metabolites, with different transport efficiencies. A low transport efficiency greatly affects the production of cell factories. The two major transport methods can be defined as transport with or without membranes, which can be modified and optimized to increase the production of primary metabolites, secondary metabolites, and biomacromolecules in cell factories. Synthetic biology and metabolic engineering methods can be used to modify or redesign and construct transport pathways, which can effectively enhance metabolite transport, reduce the loss of intermediate metabolites, and increase the yield of products. Studies on the usage of metabolite transport to enhance the production of cell factories were reviewed, and references and methods for future systematic studies of metabolite transport were identified.

metabolic engineering, trans-membrane transport, non-membrane transport, cell factories, bio-manufacturing

doi: [10.1360/N052017-00059](https://doi.org/10.1360/N052017-00059)