

微生物菌种改良的新方法新策略

赵文婷, 邹懿, 胡昌华

西南大学药学院 现代生物医药研究所, 重庆 400716

摘要: 自然分离得到的原始菌种远不能达到工业生产要求, 通过菌种改良获得高产菌种是有效的手段。传统方法虽然无需了解过多遗传背景就能取得成效, 但往往耗时费力。随着 DNA 重组技术、原生质体融合、组学研究的应用日益广泛, 微生物菌种改良的新方法和新策略诸如代谢工程、基因组改组和系统生物技术、核糖体工程、表观遗传修饰等逐步发展起来。以下综述了近年来菌种改良相关领域方法和策略特别是首次报道的表观遗传修饰的最新进展。

关键词: 菌种改良, 抗生素生物合成, 代谢工程, 基因组改组, 系统生物技术, 核糖体工程, 表观遗传修饰

Novel methods and strategies for strain improvement

Wenting Zhao, Yi Zou, and Changhua Hu

Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Improvement of the productivity of industrial strains is an important field in micro-biology, because wild-type strains isolated from nature usually produce only a low level of antibiotics. Although random screening and simple rational screening are still effective without using genomic information, they are always time- and labor-consuming. With the broad application of recombinant DNA technology, protoplast fusion and X-omics, novel methods and strategies such as metabolic engineering, genome shuffling, system biology and system biotechnology, ribosome engineering, epigenetic modification are being exploited for the industry microbiology. In this review, we will focus on the progress of these novel methods and strategies for strain improvement in recent years.

Keywords: strain improvement, antibiotic biosynthesis, metabolic engineering, genome shuffling, system biotechnology, ribosome engineering, epigenetic modification

青霉素和链霉素的相继发现, 开启了现代微生物药学的大门。微生物产生的生物活性物质(比如: 抗生素、维生素、氨基酸、酶等)渗透了人们的生活, 并在医药、食品和化工工业中有着不可取代的地位^[1]。但是, 由于刚从自然界分离得到的原始菌株代谢产物产量往往很低, 远不能满足生产需要, 所以, 通过菌种改良手段筛选高产菌种, 从而降低生产成本的工作就显得尤为重要^[2]。早期的菌种改良思路主要集中于

随机筛选和简单的理性筛选, 利用这些传统方法进行菌种改良也取得了许多成功, 例如: 最初的青霉素生产菌产黄青霉(*Penicillium chrysogenum* NRRL 1951)的产量为 60 mg/L, 经过多年的传统选育, 如今的生产菌种产量已到达 70 g/L^[3]。但是, 传统方法耗时、费力、工作量大以及诱变结果不具定向性的缺点随着时间推移也逐渐暴露出来^[4]。

随着 DNA 重组技术、原生质体融合和组学研究

Received: December 10, 2008; **Accepted:** April 22, 2009

Supported by: Chongqing Key Technologies R&D Program (No. CSTC 2009AB1029).

Corresponding author: Changhua Hu. Tel: +86-23-68250520; E-mail: chhhu@swu.edu.cn
重庆市科技攻关重点项目(No. CSTC 2009AB1029)资助。

的应用日益广泛,菌种改良的新方法和新策略如雨后春笋,层出不穷。如今,对于那些生化途径清晰的菌株,通过代谢工程策略可以更容易地选择菌种改良靶点;而对那些生化代谢途径不清楚的菌株,也可以直接通过基因组改组(Genome shuffling)、系统生物技术、核糖体工程和表观遗传修饰等手段进行遗传选育,从而获得理想突变表型。新方法和新策略的出现,使得微生物菌种选育的工作更具定向性和正突变性,为构造高产菌种提供了更广阔的空间。以下就近年来菌种改良相关领域的最新方法和策略的进展做简要综述。

1 代谢工程

代谢工程是使用现代基因工程技术对产生菌细胞进行定向改造的优化手段。以了解相关代谢产物的生化反应途径为重点,应用多种不同的代谢分析手段确定生物合成的“瓶颈”,集中于细胞代谢流的控制,比如:调整参与目的抗生素合成的前体化合物的代谢通路,以提高目的代谢物的产量或产率;最小限度地限制流向副产物的代谢流,排除某些不需要的副产物的合成;使微生物合成新的代谢产物等。

应用代谢工程进行微生物的遗传育种主要体现在提高途径限制酶的活力、对全局性调控基因或整个基因簇的操作、增强菌种代谢产物的耐受性及其生物合成途径的异源表达^[4]。以氨基酸和有机酸的代谢工程育种研究为例,Lutke-Eversloh等^[5]研究发现,单独高表达L-Try生物合成莽草酸途径中的 $ydiB$ 或 $arok$ 基因,*E.coli*生产L-Try的水平并不会提高,但共表达这2个基因时,L-Try产量则提高了45%,以此确定了L-Try生物合成的代谢节点,便于进行分子育种改良。除此而外,1,3-丙二醇、乙醇、维生素以及次级代谢产物诸如萜类化合物和聚酮类化合物等的代谢工程育种也取得了很大进展^[4]。代谢工程育种的控制分析,不再拘泥于单个途径或限制条件的分析,而在于全局性地考察细胞代谢流的走向,为微生物的遗传操作提供“刚性”与“柔性”节点比较,比传统的理性筛选更具有定向性^[6]。

2 基因组改组

基因组改组(Genome shuffling)技术是结合传统

菌种改良技术与细胞融合技术发展的一种新兴菌种改良手段,它主要是指将传统育种得到的具有不同表型的菌株进行全基因重组,从而使得这些菌株的优良性状能集于一身。Zhang等^[7]在弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)的菌种改良研究中,以自然筛选得到的野生菌株SF1为出发菌株进行一轮NTG诱变以后,将得到的11个产量较SF1有提高的突变株进行一轮Genome shuffling,产生的新菌株产生泰乐菌素的产量就可以达到需20轮传统诱变才能达到的水平。Xu等^[8]将原始链霉菌(*Streptomyces pristinaespiralis*)进行4轮递归原生质体融合,使原始菌素的产量提高了45.9%。除了在提高次级代谢产物方面的应用以外,Genome shuffling在增加微生物对环境因子的耐受性以提高微生物初级代谢物产量方面也功不可没。乳酸杆菌(*Lactobacillus* spp.)对酸的耐受性一直是其发酵生产的限制因素,Patnaik等^[9]以乳酸杆菌的野生型菌株为出发菌株,用传统诱变手段分别得到对酸耐受性增加的 $pop1$ 和 $pop2$ 菌株,将 $pop1$ 和 $pop2$ 进行五轮递归原生质体融合以后,突变株F5与野生型相比,对酸的耐受性增加,产生乳酸的能力也提高了3倍。另外,链霉菌U-121菌株经过3轮Genome shuffling,(2S,3R)-羟基柠檬酸产量也得到大大提高。Dai等^[10]利用Genome shuffling成功提高了*Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723对杀虫剂五氯苯酚(PCP)的耐受性,从而增加了它对PCP的降解能力。近年来,随着该技术研究深入,Genome shuffling对于真菌的菌种改良方面也取得了突破性的进展,Zhao等^[11]利用Genome shuffling使树状多节孢菌(*Nodulisporium sylviform*)生产紫杉醇的能力比野生型高出64.41%。

3 系统生物技术

近年来,随着组学(基因组、蛋白质组、代谢组等)和高通量筛选技术的蓬勃发展,探索细胞内复杂的次级代谢调控网络逐渐成为可能。通过系统生物技术将获得的相关组学数据整合,通过计算机建模和预测,从而确定相关的遗传操作靶点,使微生物的遗传育种更具定向性。

传统的系统生物技术应用于微生物遗传改造主要集中在单一的组学分析,比如通过芯片技术分析泰乐菌素高产菌株的基因组表达情况发现, aco 和 $icmA$ 基

因的转录水平较野生型菌株有很大提高, 增加这 2 个基因的拷贝数能为泰乐菌素的生产提供更多的脂肪酸前体^[12]; 提高谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中 2 个新的遗传操作点 *NCg1-0855* (假想的甲基转移酶基因) 和外显子 *amtA-ocd-soxA* (编码氨基盐利用基因) 的转录表达水平, 可提高 L-Lys 产量 40%^[13]。高产人瘦素重组大肠杆菌蛋白质组学研究表明, 丝氨酸生物合成途径中的酶系负调控瘦素的生产, 下调半胱氨酸合成酶编码基因 *cysK* 的表达, 细胞生长和瘦素的产量分别提高了 2 倍和 4 倍^[14]。除此而外, 通过组学分析描绘了天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中初级代谢与次级代谢的紧密关系, 发现关键途径中蛋白质转录后修饰方式可能也涉及代谢的调控^[15]。

细胞内 mRNA、蛋白质、代谢流的变化不是孤立存在而是相互联系的, 单一的组学分析不利于理解细胞生理和调控代谢, 也不利于微生物遗传选育操作点的选择, 因此整合各种组学进行组学间的多元分析显得异常重要。Askenazi 等^[16]构建涉及洛伐他汀生物合成基因表达的菌株文库, 通过整合转录组和代谢组数据, 用统计学相关的分析确定影响洛伐他汀生物合成的关键因素, 进而鉴定出靶基因并对其调控, 使得洛伐他汀的产量提高 50%。除此之外, 应用组学间结合分析进行 L-Thr^[17] 和 L-Lys^[18] 的菌种选育也取得了巨大成功。

4 核糖体工程

微生物在恶劣的环境下, 比如: 碳源、氮源或者磷酸盐营养突然匮乏时, 自身的 rRNA 以及 tRNA 合成受到限制, 从而导致蛋白合成水平降低, 启动抗生素等次级代谢产物的合成, 这种应答机制被称作应急反应^[19]。通过研究发现, 小分子化合物四磷酸鸟苷 (ppGpp) 是导致微生物出现应急反应中的主要响应因子, 它能直接作用于 RNA 聚合酶, 调节 tRNA 和 mRNA 合成水平^[20]。实验表明, 作用位点与 ppGpp 邻近的抗生素利福平以及作用位点在核糖体上的抗生素 (链霉素、庆大霉素、巴龙霉素、硫链丝菌肽) 等, 都能模拟 ppGpp 的作用, 使微生物产生类似应急反应的现象, 从而使得菌株相关代谢产物产量增加或者产生新型化合物, 基于这些发现, Ochi 等提出了核糖体工程育种技术的概念^[19]。该技术主

要通过单独和组合选择对微生物进行抗性突变, 如: 天蓝色链霉菌中, 通过筛选链霉素的抗性突变株, 能得到放线紫红素产量为野生型 5 倍和 10 倍的突变株^[21]; 组合链霉素、庆大霉素和利福平对其进行抗性突变, 能使其产放线紫红素高达野生型的 48 倍^[22], 通过组合 8 种抗性筛选到的菌株, 产量比野生型提高了 160 倍^[23]。除了次级代谢产物合成以外, 核糖体工程技术对酶的高产和提高恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 对芳香化合物的耐受性也有成功的报道^[24,25]。有报道表明, 抗生素耐受株在生长末期比野生型菌株具有更高的蛋白质合成水平, 其中次级代谢生物合成途径特异性蛋白 (如: act II-ORF4) 的高表达是抗生素高产的关键^[22,23]。在前期工作中, 作者运用核糖体工程技术对肽类抗生素产生菌株进行选育, 已经取得一定成效。其中, 利用链霉素和利福平筛选得到的抗性突变株, 产量比原始菌株提高 2~3 倍, 菌种形态和颜色的变化与肽类抗生素的生产有一定联系。对于该技术使肽类抗生素高产的相关分子机制的研究正在进行中。Fabrizio 等^[26]运用该技术也成功提高了肽类抗生素 GE2270 的产量。目前, 核糖体工程的应用范围主要集中在原核生物尤其是放线菌中, 至于真菌中是否存在应急对抗生素合成的类似调控机制, 以及是否能运用核糖体工程进行真菌的菌种选育, 值得深入探讨和考证。

5 表观遗传修饰

上述的微生物遗传育种的新方法与新策略主要集中于提高已知目的代谢物的产量, 其实寻找新结构的代谢产物也是微生物遗传育种的重要方面。近年来, 由于真菌具有强大的生物酶系和代谢系统的特殊性等特点, 其产生的一系列新颖的化学小分子实体引起了广泛微生物药学家的重视^[27]。通过“基因组挖掘”技术研究发现, 真菌基因组中存在广泛的次级代谢生物合成途径, 但由于实验室条件对于菌株的“驯化”, 大量潜在的生物合成基因簇仍处于沉默状态, 菌株实际产生的次级代谢产物远远低于预期^[28]。虽然通过改变培养条件或分子操作手段能适当激活一些沉默基因的表达, 但是操作基因的未知性以及异源宿主的兼容性等原因依然成为限制的主要因素^[29,30]。因此, 寻找一种能有效激活真菌沉默的次级代谢生物合成基因的遗传育种方法迫在眉睫。

研究发现, 沉默基因簇一般呈异染色质状态, 位于基因组的端粒附近, 其结构基因受表观遗传机制调控, 如: 组蛋白的(去)乙酰化和 DNA 的(去)甲基化。2007 年, Keller 等^[31]研究发现, 组蛋白去乙酰化酶基因缺失的构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*), 其产生杂色曲霉素和青霉素的生物合成基因簇的转录水平大大提高, 代谢产物发生明显改变。除此而外, 在赤星病菌 (*Alternaria alternata*) 和扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 中, 抑制组蛋白去乙酰化酶活力能使代谢产物谱增加。这是在世界范围内首次报道利用表观遗传学机制调控微生物次级代谢产物合成。由此提示, 表观遗传学可能在激活沉默的次级代谢生物合成基因方面扮演重要角色。2008 年, Williams 等^[32]采用表观遗传学试剂对真菌进行遗传选育, 包括曲霉属、青霉属、担子菌等在内的 12 种真菌都产生了一定的新代谢产物, 其中一些菌种的已知代谢产物的产量也得到了提高。2009 年, Henrikson 等^[33]利用组蛋白去乙酰化试剂作用黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 筛选得到了全新的化合物 nygerone A, 该化合物与 microspaeones 属于同一家族, 为黑曲霉中首次报道产生。这一系列研究结果表明, 利用表观遗传学方法对真菌的基因表达调控方式进行调控, 是一种激活沉默生物合成基因簇, 寻找新型小分子化合物的有效手段, 不仅能对真菌产生新型化合物的潜力进行深度挖掘, 更能为整个微生物遗传育种带来巨大革新。

6 结语与展望

在过去的 50 年中, 全新结构的抗菌活性化合物只有利奈唑酮、达托霉素和平板霉素得到开发^[34]。随着次级代谢产物生物合成基因簇研究的迅猛发展, 在此基础上通过基因分析, 寻找结构新颖、作用靶点独特的新型化合物已成为微生物药学的研究热点^[33]。微生物遗传育种的新方法和新策略的出现, 特别是系统生物学技术、核糖体工程、表观遗传学等手段不但能提高生物活性物质的产量, 而且也使得微生物产生新型次级代谢产物的潜力得到充分展示。随着这些新方法应用领域的拓广, 技术路线日益成熟, 可以预见工业微生物发展史上又一次飞跃。

REFERENCES

- [1] Demain AL, Adrio JL. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol Biotechnol*, 2008, **38**(1): 41–55.
- [2] Olano C, Lomb F, Mendez C, *et al.* Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng*, 2008, **10**(5): 281–292.
- [3] Demain AL. From natural products discovery to commercialization: A success story. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, **33** (7): 486–495.
- [4] Adrio JL, Demain AL. Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, **30**(2): 187–214.
- [5] Lutke-Eversloh T, Stephanopoulos G. Combinatorial pathway analysis for improved L-tyrosine production in *Escherichia coli*: Identification of enzymatic bottlenecks by systematic gene overexpression. *Metab Eng*, 2008, **10**(2): 69–77.
- [6] Kim HU, Kim TY, Lee SY. Metabolic flux analysis and metabolic engineering of microorganisms. *Mol Biosyst*, 2008, **4**(2): 113–120.
- [7] Zhang YX, Perry K, Vinci VA, *et al.* Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, 2002, **415** (6872): 644–646.
- [8] Xu B, Jin ZH, Wang HZ, *et al.* Evolution of *Streptomyces pristinaespiralis* for resistance and production of pristinamycin by genome shuffling. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **80** (2): 261–267.
- [9] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, *et al.* Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(7): 707–712.
- [10] Dai MH, Copley SD. Genome shuffling improves degradation of the anthropogenic pesticide pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC39723. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(4): 2391–2397.
- [11] Zhao K, Ping W, Zhang L, *et al.* Screening and breeding of high taxol producing fungi by genome shuffling. *Sci China C Life Sci*, 2008, **51**(3): 222–231.
- [12] Lum AM, Huang JQ, Hutchinson CR, *et al.* Reverse engineering of industrial pharmaceutical-producing actinomycete strains using DNA microarrays. *Metab Eng*, 2004, **6**(3): 186–196.
- [13] Sindelar G, Wendisch VF. Improving lysine production by *Corynebacterium glutamicum* through DNA microarray-based identification of novel target genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**(3): 677–689.
- [14] Han MJ, Jeong KJ, Yoo JS, *et al.* Engineering *Escherichia coli* for increased productivity of serine-rich proteins based on proteome profiling. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(10): 5772–5781.
- [15] Han MJ, Jeong KJ, Yoo JS, *et al.* Engineering *Escherichia coli* for increased productivity of serine-rich proteins based on proteome profiling. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(10): 5772–5781.

- [16] Askenazi M, Driggers EM, Holtzman DA, *et al.* Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lova statin-producing fungal strains. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(2): 150–156.
- [17] Lee JH, Lee DE, Lee BU, *et al.* Global analyses of transcriptomes and proteomes of a parent strain and an L-threonine-overproducing mutant strain. *J Bacteriol*, 2003, **185**: 5442–5451.
- [18] Kromer JO, Sorgenfrei O, Klopprogge K, *et al.* In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J Bacteriol*, 2004, **186**(6): 1769–1784.
- [19] Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci Biotech Biochem*, 2007, **71**(6): 1373–1386.
- [20] Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol*, 2005, **8**(2): 208–215.
- [21] Hesketh A, Ochi K. A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3 (2) for production of actin or hodin by introduction of rpsL (Encoding ribosomal protein S12) mutations conferring resistance to streptomycin. *J Antibiotics*, 1997, **50**(6): 532–535.
- [22] Hu H, Ochi K. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(4): 1885–1892.
- [23] Wang GJ, Hosaka T, Ochi K. Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(9): 2834–2840.
- [24] Kurosawa K, Hosaka T, Tamehiro N, *et al.* Improvement of alpha-amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis* 168. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(1): 71–77.
- [25] Hosokawa K, Park NH, Inaoka T, *et al.* Streptomycin-resistant (rpsL) or rifampicin-resistant (rpoB) mutation in *Pseudomonas putida* KH146-2 confers enhanced tolerance to organic chemicals. *Environ Microbiol*, 2002, **4**(11): 703–712.
- [26] Beltrametti F, Rossi R, Selva E, *et al.* Antibiotic production improvement in the rare actinomycete *Planobispora rosea* by selection of mutants resistant to the aminoglycosides streptomycin and gentamycin and to rifamycin. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, **33**(4): 283–288.
- [27] Hoffmeister D, Keller NP. Natural products of filamentous fungi: Enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep*, 2007, **24**(2): 393–416.
- [28] Bok JW, Hoffmeister D, Maggio-Hall LA, *et al.* Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem Biol*, 2006, **13**(1): 31–37.
- [29] Gross H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: Recent examples and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, (**75**): 267–77.
- [30] Zazopoulos E, Huang KX, Staffa A, *et al.* A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(2): 187–190.
- [31] Shwab EK, Bok JW, Tribus M, *et al.* Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot Cell*, 2007, **6**(9): 1656–1664.
- [32] Williams RB, Henrikson JC, Hoover AR, *et al.* Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org Biomol Chem*, 2008, **6**(11): 1895–1897.
- [33] Henrikson JC, Hoover AR, Joyner PM, *et al.* A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Org Biomol Chem*, 2009, **7**(3): 435–438.
- [34] Luzhetskyy A, Pelzer S, Bechthold A. The future of natural products as a source of new antibiotics. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007, **8**(8): 608–613.



安捷伦举行 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪新产品发布会暨技术讲座

2009年5月25日,安捷伦科技有限公司在北京新世纪日航酒店隆重举行了 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪新产品发布会暨技术讲座。在新品发布会上,安捷伦科技有限公司生命科学与化学分析事业部大中华区总经理牟一萍女士同与会媒体和嘉宾分享了安捷伦在液相色谱领域的发展历史及近几年的成果,并介绍了安捷伦科技有限公司在金融危机严峻环境下,积极应对危机影响,优化运行模式,专注市场发展,坚持加快推出新产品并不断扩充产品线的发展战略,在全球经济衰退的冲击下反而创造了逆市飘红的骄人佳绩。

全新 Agilent 1290 Infinity 液相色谱的推出,将以革新性的新技术带来单位时间内更强的分离度、更高的灵敏度和更大的灵活性,帮助广大色谱爱好者应对 LC、UHPLC 和 LC/MS 分析中的挑战。此次新产品发布会,是安捷伦公司在长沙全国色谱会上举行预发布后 1290 Infinity 液相色谱仪的首次亮相,为充满期待的广大国内用户提供了与此款仪器全方位接触的契机。

如需了解有关 Agilent Infinity 1290 LC 的更多信息,欢迎访问:

www.agilent.com/chem/infinity

www.agilent.com/chem/infinity.cn