

代谢工程：一项不断发展的菌株改造技术

李寅

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 对代谢工程的发展进行了简要回顾, 分析了代谢工程发展的推动力, 重点评述了本期专栏发表的 12 篇代谢工程和细胞工厂方面的论文。

关键词: 代谢工程, 专栏

Metabolic engineering: an evolving technology for strain improvement

Yin Li

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: The background for developing metabolic engineering was reviewed, followed by a discussion on analyzing the driving force for developing metabolic engineering. Twelve papers published in this special section were briefly introduced with the aim to stimulate further developments in this fast evolving field.

Keywords: metabolic engineering, special section

微生物是地球上最古老、分布最广的物种之一。它具有卓越的物质降解能力和化学合成能力, 几乎能合成地球上所有的有机化学品。除了参与传统的酿酒、制醋、酸乳和发酵食品生产过程, 微生物或其一部分(酶)可以生产包括燃料、医药、纤维、塑料在内的几乎所有重要的工业原材料。不仅如此, 微生物(酶)还能实现许多重要的绿色工艺过程, 如生物纺织、生物造纸、生物脱胶、生物制革、生物冶金、生物驱油等。因此, 微生物是生物技术第 3 次浪潮——工业生物技术的核心。

建立在重组 DNA 技术基础之上的代谢工程技术, 是一种在理解细胞代谢功能的基础上, 有目的地设计和改造生物体中已有的代谢网络和表达调控

网络, 从而实现更高效的生物化学转化、能量转移及大分子装配过程的技术。代谢工程技术能够有效地克服传统育种手段的突变非定向性和设计非理性的缺点, 自诞生以来, 在改造植物、动物、微生物的代谢功能方面得到了广泛的应用。

代谢工程在过去 20 年间获得了巨大的发展。其原因之一是社会可持续发展重大需求的推动。石油等不可再生化石资源严重短缺并日渐枯竭的现状, 使得可再生的碳水化合物将有可能逐步替代不可再生的碳氢化合物, 成为能源和原材料的主要来源。但目前, 生物加工过程的效率还不够高。因此, 迫切需要通过代谢工程的研究, 提高认识、设计和改造细胞代谢的能力, 推动工业生物技术进步, 支持工

Received: August 31, 2009

Corresponding author: Yin Li. Tel: +86-10- 64807485; E-mail: yli@im.ac.cn

业的可持续发展。另一方面得益于基因组科学和相关技术的推动。目前,几乎所有重要工业微生物模式种的基因组全序列都已经或即将公布,极大地提高了代谢工程的研究效率。此外,以往有些代谢工程研究中,过量表达或敲除微生物代谢途径中的某一个或几个基因,由于微生物代谢网络的全局调控,不一定能获得预期的代谢通量增大/降低的效果。功能基因组学和系统生物学的发展,提供了从全局规模上深刻认识微生物生理和代谢特性的工具,从而为代谢工程的发展创造了前所未有的机遇。

为了展现代谢工程科研工作者取得的最新进展,促进我国代谢工程研究的进步和发展,本期《生物工程学报》设立了一个专栏“代谢工程与细胞工厂”,邀请国内该领域著名学者对代谢工程、合成生物学等技术发展进行总结,并报道近年来在代谢工程方面取得的创新研究成果。

张学礼的综述全面回顾了过去 20 年间代谢工程的发展情况^[1]。文章将代谢工程的发展分为 3 个阶段。早期的代谢工程(1995 年前),主要思想是“设计—遗传改造—代谢分析”,成功地提高了五碳糖的利用效率和一些初级代谢产品的生产效率。在后基因组时代(1995~2005 年),由于高通量组学分析技术、基因组规模代谢网络模型技术的发展,微生物从黑箱变成灰箱、甚至白箱,科学家对代谢功能的分析能力显著提高。这一阶段新发展的进化代谢工程技术、代谢途径活性调控技术和全局扰动技术,能够显著改善细胞的生理功能。文章还介绍了系统代谢工程的最新发展,以及合成生物学在改善代谢功能方面的成功应用。作者最后从产品、菌种、改造策略方面对代谢工程面临的关键问题进行了深入分析,相信代谢工程在缓解资源短缺和实现节能减排方面仍将起到重要作用。

合成生物学是当前的研究热点,其概念也在不断发展,核心思想是基因片段、DNA 分子、代谢途径、基因调控网络、信号传导路径到细胞的人工设计与合成。祁庆生等作者总结了如何用合成生物学的思想来解决代谢工程遇到的问题^[2]。作者通过对文献的总结,详细阐述了合成生物学的概念,强调合成生物学的特点是标准化和简便性。作者介绍了

近年来合成生物学在代谢工程领域的一些实际应用,包括如何通过合成基因来提高代谢途径酶的表达水平,如何构建目标产物的从头合成代谢途径,如何通过操纵子的设计来调控多基因的表达,以及如何改造宿主细胞的基因组以提高宿主细胞的稳定性等。文章认为合成生物学为代谢工程的发展提供了一个更系统、更有力的分子生物学工具,这是对合成生物学与代谢工程关系的一个有趣解读。

对经过改造的生物体的代谢功能进行分析,是代谢工程的核心技术之一。花强和杨琛结合自己多年的工作基础,系统地介绍了基于代谢物同位体信息的代谢分析法在代谢工程中的应用^[3]。文章重点介绍了利用同位体分布数据的代谢流量比率分析法,以及结合流量比率信息和质量平衡关系的 ¹³C 限制型稳态代谢流量定量法。这些方法有助于快速有效地定量细胞特性、高通量分析代谢途径的功能差异、辨识可能的代谢限制,并获得相应的改造位点。作者特别指出了实际研究工作中利用这类方法进行代谢分析时需注意的地方,并指出如何进一步完善和拓展基于流量比率的代谢流量和网络特性解析技术。这对于从事细胞代谢分析和改造的研究者具有很强的实践指导意义。

赵心清、白凤武等作者介绍了蛋白质定向进化技术在改造细胞生理功能方面的应用^[4]。这包括对启动子进行定向进化以实现基因表达水平的精细调控;对转录因子进行定向进化,从而同时改变多个基因的表达水平,获得单基因操作很难获得的表型(如抗逆能力提高、蛋白表达效率提高等)。这些研究极大地扩展了定向进化技术在代谢工程领域的应用,使工业微生物菌种改造从经典的物理化学诱变、代谢途径基因的过量表达或敲除,向对特定启动子的定向进化和细胞整体代谢网络的操纵转变,从而使快速、高效提高菌种的胁迫耐受性和工业生产性能成为可能。

丝状真菌是一类重要的工业微生物,但是缺乏高效的基因敲除操作系统,阻碍了丝状真菌代谢工程改造的发展。黄和等作者结合自己正在开展的研究工作,介绍了反义 RNA 技术在丝状真菌代谢工程中的应用^[5]。文章首先介绍了反义 RNA 技术的基本

原理及丝状真菌基因工程操作技术的进展, 然后介绍了如何利用反义 RNA 技术, 抑制丝状真菌代谢途径中关键基因的表达水平, 从而实现代谢中间产物或终产物的过量累积。对提高丝状真菌生产初级代谢产物(如氨基酸、有机酸等)和次级代谢产物(如抗生素等)的能力具有较好的参考价值。

乙醇是重要的生物燃料之一, 利用木质纤维素生产乙醇是燃料乙醇工业未来的发展方向, 各国研究方兴未艾。木质纤维素预处理后产生的抑制物对发酵菌种的抑制作用, 是纤维素乙醇生物加工过程亟待解决的难题之一。鲍晓明等作者系统介绍了纤维素乙醇生产过程中抑制物的产生和对发酵菌种的影响^[6]。文章总结了木质纤维素乙醇生物加工过程中抑制物的形成、影响及其作用机制, 介绍了如何对经过预处理的原料进行脱毒处理, 如何通过进化工程技术驯化菌种, 如何通过对抑制物耐受性相关基因进行代谢工程操作, 或如何控制和优化发酵过程, 来提高酿酒酵母对抑制物的耐受性。该论文对利用其他微生物进行纤维素乙醇生产也有较高的参考价值。

微生物的絮凝能力是一种重要的生理功能, 但是在工业生物技术领域对微生物絮凝能力的认识和利用都还不足。白凤武等作者报告了利用自絮凝酵母进行重复批次高浓度乙醇发酵的研究结果^[7]。为了进一步降低乙醇生产的成本, 特别是蒸馏能耗, 需要尽可能地提高发酵液中乙醇的浓度。作者建立了重复批次发酵的新工艺, 在一个较长的操作周期内保持酵母的絮凝无明显下降, 从而使系统在高乙醇浓度下(120 g/L)可以以较高的生产强度(4 g/(L·h))稳定连续生产 24 d 以上, 为将自絮凝酵母作为一种重要的细胞工厂生产乙醇等生物燃料及大宗化学品奠定了基础。

丁二酸是美国能源部列出的 12 种重要平台化合物之一, 其最重要的用途是生产高分子可降解材料聚丁二酸丁二醇酯。目前, 国外利用代谢工程菌株生产丁二酸正处在产业化前期。邢建民等作者报告了用乳糖诱导丙酮酸羧化酶的表达并促进了丁二酸生物合成的研究结果^[8]。作者在敲除了葡萄糖磷酸转移酶(*ptsG*)、乳酸脱氢酶(*ldhA*)、丙酮酸甲酸裂解

酶(*pf1A*)的大肠杆菌 DC1515 中表达了丙酮酸羧化酶基因 *pyc*, 通过乳糖(而非 IPTG)诱导, 重组菌生产丁二酸的水平比出发菌株提高 78%。利用乳糖诱导代谢关键酶基因的表达, 对未来工业生产是有利的。

丙酮酸由于其在糖代谢途径中承上启下的重要地位, 也是一种潜在的重要平台化合物。姚善泾等作者利用产丙酮酸的大肠杆菌为模式“细胞工厂”, 研究了细胞工厂利用葡萄糖、果糖、木糖和甘露糖生产丙酮酸的能力^[9], 结果发现细胞工厂对利用甘露糖生产丙酮酸的类型(部分偶联型发酵)不同于利用葡萄糖、果糖和木糖(生长偶联型)。研究结果为生物炼制体系中微生物对木质纤维素不同糖组分的利用能力提供了实验证据。

微藻生物技术、尤其是微藻生物能源是近年来国内外的研究热点。为了有效提高微藻产量和光能利用效率, 需要从细胞代谢角度了解微藻培养的碳流和能流传递规律。储炬等作者对聚球藻光自培养的碳代谢和能量代谢进行了分析^[10]。作者通过代谢通量方法分析了不同入射光强下的聚球藻 7942 碳代谢流分布和能量代谢, 发现 CO₂ 固定是代谢能量和还原力消耗的主要途径。研究还发现, 基于总吸收光能细胞得率和对应的光能转换效率随着光强的增加而降低, 表明聚球藻存在光能利用率低的问题, 为下一步通过合理的光生物反应器设计提高光能利用效率奠定了基础。

红球菌具有广泛的底物作用谱, 在生物降解、生物修复、生物转化和生物表面活性剂等领域用途广泛。建立针对红球菌的遗传操作系统, 可以为发展以红球菌为技术体系的生物技术奠定基础。于慧敏等作者研究了一些启动子被红球菌 RNA 聚合酶的识别情况, 以及β-半乳糖苷酶报告基因(*lacZ*)在红色红球菌宿主中的表达^[11], 为红球菌的基因工程与代谢工程研究提供了重要的遗传信息。

宋存江等作者发现门多萨假单胞菌 *Pseudomonas mendocina* NK-01 在菌体内积累中长链聚羟基脂肪酸酯(PHA)的同时, 也能够合成褐藻寡糖分泌到发酵液中, 其产量与培养基的碳氮比有关^[12]。作者用多种光谱、¹H 和 ¹³C 核磁共振对褐藻寡糖的结构进行了分析鉴定, 发现褐藻寡糖的结构

是由 β -D-甘露糖醛酸、 α -L-古洛糖醛酸通过 β -(1-4)/ α -(1-4)键连接而成的无支化线性多糖,并且在单体的2位或3位羟基上部分乙酰化。未来的研究若能揭示门多萨假单胞菌合成中长链PHA与褐藻寡糖之间的关系,也许可以为同时生产中长链PHA和褐藻寡糖奠定理论基础。

代谢工程作为一门新兴学科,发展速度非常快。设计思想、遗传改造和高通量分析仍然是代谢工程技术的3个要素。从技术体系的发展看,系统代谢工程目前还处于初期,其特点是在生物信息学和计算生物学的支持下,通过大规模数据分析,来深入理解细胞的生理和代谢功能。合成生物学与代谢工程的领域有部分重叠,在当前,合成生物学理论和技术的进步,将显著推动代谢工程的发展。

《生物工程学报》作为报道我国生物工程方面创新研究成果的重要期刊,能够专门开辟“代谢工程与细胞工厂”栏目,集中报道更多代谢工程与合成生物学领域的创新成果,意义重大。这将大大推动我国生物技术的创新与生物产业的发展。

REFERENCES

- [1] Zhang XL. Twenty years development of metabolic engineering— a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1285–1295.
张学礼. 代谢工程发展 20 年. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1285–1295.
- [2] Wang JS, Qi QS. Synthetic biology for metabolic engineering— a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1296–1302.
王俊姝, 祁庆生. 合成生物学与代谢工程. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1296–1302.
- [3] Hua Q, Yang C. Application of metabolic flux ratio analysis in metabolic engineering— a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1303–1311.
花强, 杨琛. 代谢流量比率分析及其在代谢工程中的应用. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1303–1311.
- [4] Zhao XQ, Jiang RJ, Bai FW. Directed evolution of promoter and cellular transcription machinery and its application in microbial metabolic engineering— a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1312–1315.
赵心清, 姜如娇, 白凤武. 启动子和细胞全局转录机制的定向进化在微生物代谢工程中的应用. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1312–1315.
- [5] Ding YY, Li S, Huang H. Applications of antisense-RNA technology in filamentous fungal metabolic engineering— a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1316–1320.
丁月月, 李霜, 黄和. 反义 RNA 技术在丝状真菌代谢工程中的应用. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1316–1320.
- [6] Li HX, Zhang XR, Shen Y, et al. Inhibitors and their effects on *Saccharomyces cerevisiae* and relevant countermeasures in bioprocess of ethanol production from lignocellulose— a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1321–1328.
李洪兴, 张笑然, 沈煜, 等. 纤维素乙醇生物加工过程中的抑制物对酿酒酵母的影响及应对措施. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1321–1328.
- [7] Li F, Ge XM, Li N, et al. Consecutive very-high-gravity batch ethanol fermentation with self-flocculation yeast. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1329–1337.
李凡, 葛旭萌, 李宁, 等. 自絮凝酵母高浓度重复批次乙醇发酵. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1329–1337.
- [8] Wang D, Mao Y, Ma L, et al. Expression of heterogenous pyruvate carboxylase in *Escherichia coli* with lactose as inducer and its effect on succinate production. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1338–1344.
王丹, 毛雨, 马兰, 等. 乳糖诱导丙酮酸羧化酶基因在大肠杆菌中的表达及对丁二酸产量的影响. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1338–1344.
- [9] Shen DQ, Feng XY, Lin DQ, et al. Effect of different carbon sources on pyruvic acid production by using *lpdA* gene knockout *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1345–1351.
沈冬钱, 冯晓雨, 林东强, 等. 不同碳源对大肠杆菌 *lpdA* 突变菌累积丙酮酸的影响. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1345–1351.
- [10] Yan RM, Zhang ZB, Zhu D, et al. Carbon and energetic metabolism of *Synechococcus* sp. PCC7942 under photoautotrophic conditions. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1352–1359.
颜日明, 张志斌, 朱笃, 等. 聚球藻 7942 光自养培养的碳代谢和能量代谢. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1352–1359.
- [11] Liu CC, Yu HM, Ma YC, et al. Promoter recognition and β -galactosidase reporter gene expression in *Rhodococcus*. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1360–1365.
刘昌春, 于慧敏, 马玉超, 等. 红球菌启动子识别及 β -半乳糖苷酶报告基因表达. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1360–1365.
- [12] Guo WB, Wang SF, Cao MF, et al. Synthesis and characterization of alginate oligosaccharides produced by *Pseudomonas mendocina* NK-01. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1366–1370.
郭文斌, 王淑芳, 曹名锋, 等. 门多萨假单胞菌 *Pseudomonas mendocina* NK-01 合成褐藻寡糖及其结构鉴定. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1366–1370.