

代谢工程发展 20 年

张学礼

中国科学院天津工业生物技术研究所(筹), 天津 300308

摘要: 代谢工程从上世纪 90 年代初期发展至今已有 20 年历史, 对微生物发酵工业的发展起到了极大的推动作用。以下回顾了代谢工程发展至今的三个重要阶段, 讨论了各阶段中代谢工程在技术方面的进展及其对微生物发酵工业的促进作用。最后还讨论了代谢工程将来发展中的关键问题及解决策略。

关键词: 代谢工程, 微生物发酵, 生物基产品, 系统生物技术, 代谢进化, 合成生物学

Twenty years development of metabolic engineering— a review

Xueli Zhang

Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Metabolic engineering has been developed for nearly 20 years since its beginning on 1990s, and it has significantly promoted the improvement of microbial fermentation industry. This review summarized the technology development and their applications in fermentation industry in each of the three important phases during the development of metabolic engineering. Finally, the key issues for future development and solving strategies were discussed.

Keywords: metabolic engineering, microbial fermentation, bio-based products, systems biology, metabolic evolution, synthetic biology

从上世纪 30 年代起, 微生物就开始被大量用于工业发酵生产, 发酵产品遍布化工、食品、医药等多个领域。早期的微生物发酵产品开发主要是筛选天然的高产菌株; 而提高微生物发酵能力的研发主要集中在通过化学诱变和高效筛选技术来获得发酵能力提高的突变菌株。这些传统的菌种选育技术有着极大的局限性: 微生物发酵产物种类非常有限, 主要集中在乙醇、丙酮、丁醇、甘油、有机酸、氨基酸和抗生素等代谢物; 另外, 由于大部分微生物的发酵产物都是多种化合物的混合物, 因此目标产

物的产率通常比较低而下游的分离成本则非常高, 这使得微生物发酵的生产成本一直居高不下。

基因工程(重组 DNA 技术)的问世极大地推动了微生物发酵产业的发展, 它使得微生物代谢途径中特定酶反应的遗传改造成为可能。然而, 微生物发酵生产涉及到的是微生物整个代谢网络中多个酶反应的协同作用。单一(或多个)酶反应的遗传改造很多时候在提高微生物发酵性能时起到的作用非常有限。Jay Bailey^[1]和 Gregory Stephanopoulos 等^[2]针对这个问题, 于 1991 年最先提出了代谢工程的概念:

Received: July 13, 2009; **Accepted:** August 13, 2009

Supported by: Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YW-G-064).

Corresponding author: Xueli Zhang, E-mail: xuelizhang1981@yahoo.com

中国科学院重要方向性项目(No. KSCX2-YW-G-064)资助。

“利用重组 DNA 技术,有目的地操纵细胞的酶、转运和调控功能,从而改善细胞的活性”^[1]。代谢工程和基因工程最重要的区别有 2 点:一、代谢工程是基于细胞代谢网络的系统研究,更多地强调了多个酶反应的“整合”作用;二、在完成代谢途径的遗传改造后,还要对细胞的生理变化、代谢通量进行详细分析,以此来决定下一步遗传改造的靶点。通过多个循环,不断地提高细胞的生理性能(发酵能力)。在随后的近 20 年里,这一概念逐渐发展成为一个新的学术领域,并被大量用于微生物发酵工业。以下将着重介绍代谢工程近 20 年的发展以及其如何用于提高微生物细胞发酵性能,从而推动发酵工业的进展(图 1)。文章最后还将讨论代谢工程中的关键问题并展望其将来的发展。

1 代谢工程的早期发展

如何有效地调控细胞代谢网络,从而改善细胞性能(如提高细胞发酵生产能力、扩大底物利用范围、优化生理性能、合成新化合物),是代谢工程的核心思想,也是微生物发酵工业中的核心问题。在代谢工程发展初期,用于调控细胞代谢网络的策略通常分 3 步^[3-4]: 1) 首先分析细胞代谢网络结构,找出代谢网络中的关键节点。早期的细胞代谢网络结构分析主要是依据已知的生化反应。大部分重要工

业微生物的主要代谢途径都已经被研究得非常透彻。对于未知的重要代谢途径,主要是通过酶法测定和同位素标记法来获得相关信息^[4]。2) 采取合适的遗传改造方法,在关键节点处进行遗传改造,从而改变细胞的代谢网络和代谢通量分布。常用的方法有基因敲除、基因扩增表达、基因整合、解除调控、反义 RNA 技术等。3) 对遗传改造后细胞的生理特征、细胞代谢进行详细分析,从而决定是否进行新一轮代谢工程操作。早期的分析手段主要是研究细胞生理性能;代谢通量分析(Metabolic flux analysis, MFA)用于定量分析胞内代谢网络中各分支的代谢通量;代谢控制分析(Metabolic control analysis, MCA)、途径热力学分析(Thermodynamic analysis)和动态模型(Kinetic modeling)用于分析胞内代谢通量是如何被控制的^[5]。

早期代谢工程用于改善工业微生物发酵最成功的范例之一是纤维素乙醇生产。Ingram 研究小组分析了生产乙醇的大肠杆菌代谢网络,确定丙酮酸和 NADH 供给是乙醇合成的关键节点;通过扩增表达运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶,将碳代谢通量几乎全部转入乙醇合成,从而使乙醇发酵产率达到 95% 以上^[6]。改造后的大肠杆菌代谢工程菌能将木质纤维素中的五碳糖和六碳糖高效快速地转化为乙醇。另一方面, Zhang

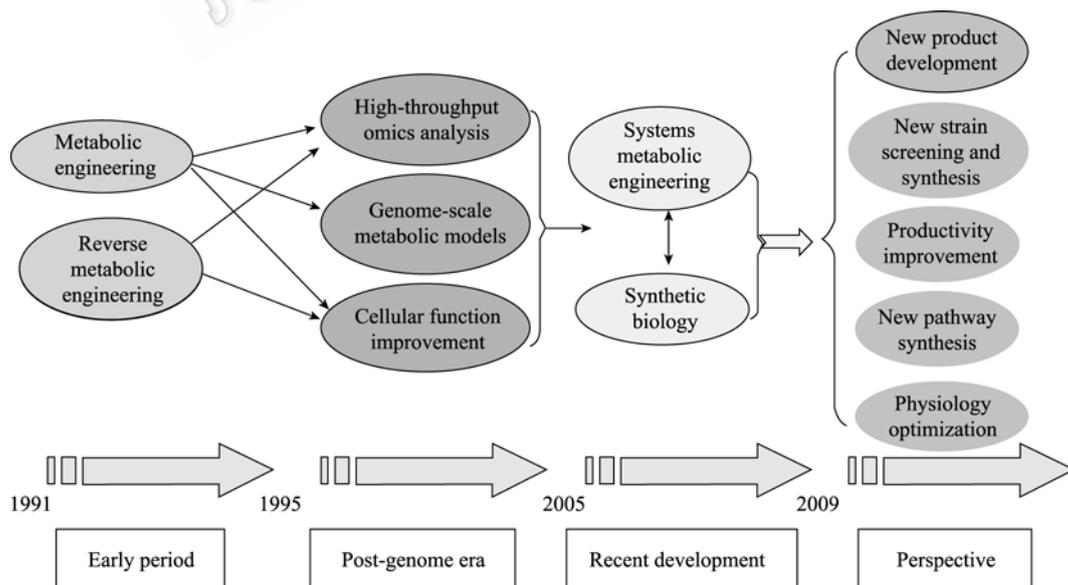


图 1 代谢工程发展概括图

Fig. 1 Summary of development of metabolic engineering.

和 Ho 研究小组分别将外源五碳糖利用途径转入到运动发酵单胞菌和酿酒酵母中, 拓展了这 2 类天然乙醇高产菌的底物利用范围^[7-8]。这些工作极大地推动了纤维素乙醇工业的发展。

早期代谢工程用于改善工业微生物发酵最成功的另一个范例是氨基酸发酵工业。Stephanopoulos 研究小组分析了生产苏氨酸的乳糖发酵棒杆菌 (*Corynebacterium lactofermentum*) 的代谢网络, 确定天冬氨酸半醛是苏氨酸合成的关键节点; 通过扩增表达反馈抑制不敏感的高丝氨酸脱氢酶和野生型高丝氨酸激酶, 可以将大部分从天冬氨酸半醛流往赖氨酸合成的代谢通量转入高丝氨酸和苏氨酸合成; 进一步提升高丝氨酸激酶对高丝氨酸脱氢酶的比例, 可以减少高丝氨酸的积累, 使更多的代谢通量转入苏氨酸合成, 从而使苏氨酸的终浓度提高 120%^[9]。代谢工程的策略也大大提高了其他重要氨基酸的发酵生产能力^[10], 如谷氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸等。

除此之外, 代谢工程的研究策略还被成功用于改造微生物提高其他重要工业发酵产品的生产能力或合成新型化合物。Metabolix 公司及其他研究单位成功开发了聚羟基烷酸 (poly 3-hydroxyalkanoates, PHA) 代谢工程生产菌^[11], 用于生产可降解塑料; Popoutsakis 研究小组运用代谢工程成功提高了丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 的丙酮和丁醇产率^[12]; Khosla 研究小组运用代谢工程成功合成出新的聚酮类化合物 (Polyketides)^[13]。

虽然代谢工程在改造某些微生物提高其发酵性能中取得了很大的成功, 但是早期的相当一部分改造并没能取得预期的效果。最主要的原因是人们对大部分微生物的生理遗传背景、酶反应特性、代谢网络结构的了解还不是很透彻。与此同时, 传统微生物发酵工业在几十年的发展过程中, 已经获得了很多具有特殊生理性能的野生菌以及发酵能力显著提高的突变菌株。在此基础上, Jay Bailey 等在 1996 年首次提出了另一种代谢工程策略——反向代谢工程 (Inverse metabolic engineering)^[14]。这种策略的研究思路是在获得预期表型的基础上, “运用反向遗传策略” 鉴定出相应的遗传基础; 再将鉴定的遗传特

性转移到工业菌株中, 使其也具有同样的表型^[14]。反向代谢工程早期最成功的应用范例是利用透明颤菌血红蛋白来缓解供氧不足^[15]。最初研究发现透明颤菌在供氧不足的环境下大量合成一种血红蛋白, 这种特殊表型提示该菌在供氧不足时通过合成血红蛋白来提高其代谢和生长。Bailey 研究小组克隆了透明颤菌的血红蛋白基因, 并通过在大肠杆菌中表达该基因, 大大地提高了大肠杆菌在微氧环境中的细胞生长^[15]。该遗传特性随后被转移至其他多种重要工业微生物, 有效地提高了细胞生长和产物合成^[14]。

反向代谢工程的策略虽然非常有效, 但其早期的发展受到很多限制, 最重要的 2 点因素是: 1) 如何有效地获得预期的表型; 2) 如何高效快速地鉴定出特殊表型所对应的基因型。传统的物理化学诱变结合高强度筛选的方法效率比较低: 诱变时在微生物基因组上造成的是随机突变, 目的性不强; 随机突变给下一步基因型鉴定带来很大的难题。这些问题随着后来功能基因组学的发展得到很大的改善。

2 后基因组时代的代谢工程

从 1995 年第一个细菌流感嗜血杆菌全基因组序列测定开始, 短短十几年内, 各种微生物全基因组测序以及重要微生物群落元基因组测序发展迅速。到目前为止, 已经启动了 3500 多个微生物的全基因组测序计划, 其中近 1000 个已经完成 (<http://www.genomesonline.org>)。大量微生物全基因组序列的测定和功能基因组学技术的涌现, 能够从整体上认识微生物代谢网络; 能够从基因、RNA、蛋白、代谢物、代谢通量等多个层次系统地分析微生物代谢, 极大地推动了代谢工程和微生物发酵工业的发展。后基因组时代的代谢工程的发展主要体现在以下几个方面:

2.1 高通量组学分析技术 (High-throughput omics analysis)

各种高通量组学分析技术的发展大大提高了系统分析微生物代谢功能的能力, 尤其是提高了反向代谢工程中分析鉴定特殊表型遗传机制的能力^[16-18]。

1) 比较基因组学: 直接对比分析微生物基因组

序列的技术。通过对具有特殊表型的突变菌进行全基因组测序并和野生型基因组进行比较分析,直接鉴定出突变基因(或调控因子)。Ikeda 研究小组比较分析了高产赖氨酸的谷氨酸棒杆菌突变菌和野生型的基因组序列,成功鉴定出一系列和赖氨酸生产相关的突变基因^[19]。将其中 3 个突变基因导入野生型,获得了迄今为止生产速率最高的赖氨酸生产菌。通过这种“基因组育种(Genome breeding)”重新构建的工程菌遗传背景清晰,没有多余的对细胞生长代谢造成负面影响的随机突变,适合更好地进一步遗传改造。

2) 转录组学: 利用 DNA 芯片对比分析细胞 mRNA 的技术。高密度 DNA 芯片技术的发展大大提高了基因组水平基因转录的分析能力,使得同时分析多个样品的 mRNA 相对含量成为可能。对具有特殊表型的突变菌和野生型菌株或对同一菌株在不同时空、不同培养条件下的转录组对比分析,可以快速鉴定出转录水平显著变化的基因,从而指导下一步遗传改造的靶点。Lee 研究小组分析了生产人类胰岛素生长因子 I 的重组大肠杆菌在高细胞密度培养条件下的转录组,鉴定出转录水平显著下降的 200 个基因。对其中与氨基酸和核苷酸合成相关的 2 个基因进行扩增表达,大大提高了胰岛素生长因子 I 的生产^[20]。

3) 蛋白质组学: 利用 2-D 胶对比分析细胞蛋白质图谱的技术。蛋白质图谱的对比分析可以在 2-D 胶上快速鉴定出蛋白含量显著变化的位点;结合质谱分析可以鉴定出该位点所对应的相关蛋白。由于细胞的大部分代谢活性是直接由蛋白来控制的,因此蛋白质组学相比转录组学来说更进一步加深了对细胞代谢功能的理解。Lee 研究小组利用蛋白质组分析发现生产瘦素(Leptin)的重组大肠杆菌中,丝氨酸合成途径中的某些蛋白含量显著下降,这表明丝氨酸类氨基酸的供给可能受到限制。对其中的半胱氨酸合成酶基因的扩增表达有效地提高了细胞生长和瘦素的生产^[21]。

4) 代谢组学: 高通量定量分析细胞内代谢物的技术。核磁共振(NMR)、气质联用(GC-MS)、液质联用(LC-MS)和气相色谱-飞行时间质谱仪(GC-TOF)

的开发大大提高了分析胞内代谢物的能力。代谢组学分析提供的是一个整合的信息,因此很难将代谢物浓度的变化和特定的基因突变联系起来;由于代谢物浓度是直接和代谢途径相关联的,因此它可以指导应该对哪些途径进行改造。Microbia 公司结合转录组和代谢组分析,使土曲霉(*Aspergillus terreus*)生产洛伐他汀(Lovastatin,降低胆固醇的药物)的能力提高了 50%^[22]。

5) 通量组学: 分析细胞内代谢通量的技术。通量分析可以获知细胞内哪些代谢途径是有活性,活性有多高,从而更好地了解某个特定时空点上细胞的代谢情况。由于胞内的代谢通量很难直接测定,一般都是采用同位素标记底物并分析细胞蛋白中氨基酸的标记状态,再结合数学模型计算的方法来进行测定。和代谢组学分析类似,通量组学得到的也是一个整合的信息。Nielsen 研究小组对比分析了高产和低产青霉素的青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)的代谢通量,发现高产青霉素的能力和戊糖磷酸途径的高通量相关^[23]。

6) 组学分析技术的整合: 各种组学分析技术各有所长,将它们整合在一起能最大限度地了解细胞的代谢功能。这一方面有很多成功的案例。Ikeda 研究小组利用比较基因组学技术分析了高产赖氨酸的谷氨酸棒杆菌突变菌的戊糖磷酸途径相关基因,鉴定出 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的点突变使该酶对胞内代谢物的变构抑制不敏感。通量组分析表明该突变使赖氨酸生产过程中戊糖磷酸途径的通量提高了 8%,从而提高了 NADPH 的供给^[24]。Wittmann 研究小组分析了生产赖氨酸的谷氨酸棒杆菌在批式培养发酵不同阶段的转录组、代谢组和通量组^[25]。他们发现葡萄糖利用速率的降低导致细胞由生长转为生产赖氨酸,代谢通量由 TCA 循环转为回补羧化和赖氨酸合成。在这一转化过程中,胞内代谢物有短暂的动态变化: 赖氨酸在胞内积累到 40 mmol/L。虽然赖氨酸的代谢通量显著提高了,但赖氨酸合成相关的基因表达水平基本不变。这些研究为进一步提高细胞的赖氨酸生产能力鉴定了很多关键的基因靶点。Degussa 公司综合利用了转录组、蛋白质组和通量组分析来提高大肠杆菌生产苏氨酸的能力^[18]。他

们在重复使用补料分批发酵技术强化生产工艺时发现, 苏氨酸的生产能力越来越差。通量组分析表明磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶途径的碳通量显著提高了, 转录组分析表明编码该酶的基因及其下游的一些基因被显著激活。敲除该基因和其他一些靶点基因使苏氨酸的生产速率提高了 40%。

2.2 基因组水平代谢网络模型 (Genome-scale metabolic models)

早期的细胞代谢网络结构分析主要是依据已知的生化反应、酶法测定和同位素标记法来获得相关信息; 微生物全基因组序列的测定以及基因功能注释工具的开发极大地促进了基因组水平代谢网络模型的构建, 进而提高了分析代谢网络结构的能力。Palsson 研究小组在 1999 年构建了第一个微生物基因组水平代谢网络模型(流感嗜血杆菌)。到目前为止, 科学家们已经完成了大约 20 个微生物的代谢网络模型。这些模型有助于从系统水平上认识复杂的微生物代谢网络、预测细胞生理属性、预测遗传改变或环境扰动后细胞的代谢应答、模拟筛选出遗传改造的靶点基因^[26]。

Stephanopoulos 研究小组运用大肠杆菌代谢网络模型成功鉴定出单一或多个基因敲除目标, 使细胞在保持良好生长速率的同时能提高番茄红素的产率^[27]; Maranas 研究小组运用大肠杆菌代谢网络模型开发的 OptKnock 程序能鉴定出特定的基因敲除目标, 使细胞生长速率的提高和目标产物生产速率的提高互相偶联^[28], 他们联合 Palsson 研究小组用实验证明了这一方法可以有效提高乳酸的生产速率; Maranas 研究小组开发的 OptStrain 程序能够从已知的酶催化反应数据库中筛选出合适的酶催化反应, 用于在模式微生物宿主中有效合成新化合物^[29]; 他们还开发了 OptReg 程序用于预测各基因表达的最优水平, 从而提高目标产物的产率^[30]。

2.3 改善细胞性能的新方法

代谢工程和微生物工业发酵的核心问题是改善细胞性能。组学分析技术和基因组水平代谢网络模型虽然大大提高了系统分析微生物代谢网络结构和代谢功能的能力, 但在实际应用上仍然有一定的局限性。组学分析技术目前在实际应用中主要是对比分析细胞性能已经获得改善的突变菌和野生型菌株,

可是其并不能指导如何改善细胞性能。代谢网络模型虽然在一定程度上可以预测细胞生理属性以及预测遗传改变或环境扰动后细胞的代谢应答, 但由于目前的模型还很不完善, 还没有结合动态的代谢变化, 所以其目前指导如何改善细胞性能的能力还非常有限, 已经报道的成功案例非常少。与此同时, 科学家们开发了一些其他的方法来有效地改善细胞性能。

1) 进化代谢工程(Metabolic evolution): 利用适应进化有效提高微生物发酵生产速率、产率和终浓度的技术。在微生物发酵过程中, 底物利用过程一般产生能量(ATP)和还原力(NADH); 而很多产物的合成过程则是消耗还原力。通过遗传改造可以构建出初级的微生物细胞工厂, 使目标产物成为唯一能够消耗还原力的代谢途径, 从而使能量产生和还原力平衡相偶联。因此, 通过在发酵反应器中连续传代培养微生物, 筛选生长速率越来越快的突变菌, 可以同步筛选出目标产物生产速率、产率和终浓度均显著提高的突变菌。Ingram 研究小组利用此技术, 成功提高了大肠杆菌发酵生产乙醇、L-乳酸、D-乳酸等化合物的生产性能, 效果非常显著(提高 1~2 个数量级)^[31]。作者本人结合途径理性设计和代谢进化, 成功构建了大肠杆菌代谢工程菌, 使其能高效生产 L-丙氨酸^[32]、丁二酸^[33-34]。其中 L-丙氨酸工程菌能使用简单无机盐培养基, 在厌氧批式培养条件下, 48 h 内生产 115 g/L 的 L-丙氨酸, 产率达到 95%, 手性纯度达到 99.5%, 使生产成本大大低于目前使用的酶催化技术。丁二酸工程菌能使用简单无机盐培养基, 在厌氧批式培养条件下, 96 h 内生产 90 g/L 左右的丁二酸, 产率达到 1.5 mol/mol 葡萄糖。大肠杆菌在代谢进化过程中激活了 2 条新型的能量保存途径, 使丁二酸发酵生产的同时能产生足够的能量用于维持细胞生长代谢。作者利用这些新型能量保存途径, 又成功构建了生产 L-苹果酸、L-天冬氨酸的代谢工程菌。

2) 合理调控代谢途径表达: 代谢合成途径的高效表达很多时候不仅仅只受限于某个单一的限速反应步骤, 而是需要多个酶的协同平衡。以前经常使用的单一酶的质粒高表达很多时候会造成细胞代谢

的高负荷,对生长代谢合成均不利。近些年来,科学家们开发了多种方法来合理调控代谢途径表达的平衡。一种常用的方法是合成启动子文库(Synthetic promoter libraries):科学家们构建了用于调控多种模式微生物(大肠杆菌、乳酸菌、酿酒酵母)基因表达的一系列组成型启动子文库,使基因的表达水平可以在很大范围内进行调节^[35-36]。具体技术主要有通过改造启动子-10和-35区域的间隔序列来控制启动子的强弱^[35]和通过使用易错PCR(Error-prone PCR)技术在原始启动子序列上造成随机突变的方法,获得基因表达强度差异很大的一组启动子文库^[36]。另一种常用的合理调控代谢途径表达的方法是转录后调控(Post-transcriptional control)。Keasling 研究小组开发了一种新型的调控合成操纵子上多个基因协同合理表达的技术方法^[37]。他们构建了可调控基因间区域(Tunable intergenic regions, TIGRs)文库来实现这一目标,其中可调控的因子有 mRNA 二级结构、RNA 酶切位点、核糖体结合位点序列等。这些可调控的因子可以改变基因的表达终止、mRNA 稳定、翻译起始,从而达到协同调节多个基因合理表达的目标。这一技术被成功用于优化大肠杆菌代谢工程菌中外源甲羟戊酸(Mevalonate)途径的多基因合理表达,使甲羟戊酸的产量提高了 7 倍^[37]。

3) 全局扰动技术(Global perturbation):在优化微生物生理性能时,很多情况下不知道明确的靶基因和调控因子。过去科学家们大多是通过随机诱变的方法获得生理性能优化了的突变菌株。然而这种方法会在微生物基因组上造成随机突变,其中很多是对细胞生长代谢不利的。突变菌株虽然提高了特定的生理性能,但同时也伴随了很多负面作用。近年来,科学家们开发了多种全局扰动技术,有目的针对性地在微生物基因组上造成改变,结合高通量筛选目标生理性能,从而获得遗传背景清晰的代谢工程菌。全局扰动技术主要有以下几种:(a) 转座子突变(Transposon mutagenesis):可以在微生物全基因组上造成随机基因敲除。科学家们优化了这一技术方法,使转座子能更均匀地随机插入到基因组上^[38]。使用热不对称交错 PCR(Thermal asymmetric interlaced PCR)技术和基因芯片技术,可以迅速鉴定

出转座子插入在基因组上的位置。Stephanopoulos 研究小组使用该技术,快速鉴定出 3 个基因的敲除能提高大肠杆菌工程菌番茄红素的产量^[36]。(b) 质粒编码的基因组文库(Plasmid-encoded library):通过大量表达质粒编码的基因组文库,随机提高一个或多个基因的表达,从而提高目标产物的合成。Gill 研究小组开发了一种多尺度分析文库富集的方法(Multiscale analysis of library enrichment, SCALES),能够快速鉴定表达水平提高了的基因^[39]。(c) 全局转录机器改造(Global transcription machinery engineering, gTME):通过易错 PCR 造成关键转录机器组分突变,从而系统改变细胞转录组的技术^[40]。通过改造原核生物的 sigma 因子($\sigma 70$)或是真核生物的 TATA 结合蛋白及其关联因子,可以有效地提高细胞的抗逆性能以及目标产物的合成。Stephanopoulos 研究小组使用该技术,成功提高了细胞对乙醇和十二烷基硫酸的抗性,以及提高了细胞合成番茄红素的能力。其他重要的全局扰动技术还包括:转录因子改造(Transcription factor engineering)、核糖体改造(Ribosome engineering)、基因组重排技术(Genome shuffling)等^[41]。

3 代谢工程的最新进展

3.1 系统代谢工程(Systems metabolic engineering)

传统代谢工程只是对局部的代谢网络进行分析以及对局部的代谢途径进行改造。由于其还没有真正意义上从全局的角度去分析改造细胞,所以具有很大的局限性。高通量组学分析技术和基因组水平代谢网络模型构建等一系列系统生物学技术的开发能够从系统水平上分析细胞的代谢功能。将这些系统生物学技术和传统代谢工程以及下游发酵工艺优化相结合,科学家们进一步提出了系统代谢工程的概念^[42]。典型系统代谢工程的策略分为以下 3 轮步骤:1) 构建起始工程菌。这一阶段和前面提及的传统代谢工程策略类似:通过分析局部代谢网络结构对局部代谢途径进行改造(如通过敲除竞争途径减少副产物的生产)、优化细胞生理性能(如解除产物毒性和反馈抑制效应)等。2) 基因组水平系统分析和计算机模拟代谢分析。如前所述,各种高通量组学

分析技术的联合使用能有效地鉴定出提高细胞发酵生产能力的新靶点基因和靶点途径。与此同时, 通过使用基因组水平代谢网络模型也可以模拟分析出另外一些新的靶点基因。需要强调的是, 这 2 种系统分析方法鉴定出的靶点基因很多都是和局部代谢途径不相关的, 用传统的代谢分析是不可能鉴定出来的。3) 工业水平发酵过程的优化。第一轮和第二轮的微生物发酵都是在实验室条件下进行的, 其发酵性能和大规模工业发酵相比有很多差异。规模扩大后经常会伴随高浓度的副产物产生, 因此还需要再进行下一轮代谢工程改造来优化菌种发酵能力。另一方面, 还需要通过进化代谢工程来进一步提高细胞发酵的产率、速率和终浓度, 以达到工业发酵的要求。

Lee 研究小组运用系统代谢工程成功改造了大肠杆菌用于缬氨酸(Valine)的发酵生产^[43]。他们首先分析了缬氨酸合成途径的局部代谢网络, 使用位点特异突变解除了所有已知的缬氨酸合成途径中的反馈抑制和转录消减效应, 使用基因敲除阻断了缬氨酸合成的竞争途径, 并通过质粒过量表达扩增了缬氨酸合成第一步反应的操纵子。传统代谢工程策略得到的起始工程菌生产缬氨酸的产率提高到 0.066 g/g 葡萄糖。在进行第二轮改造时, 他们通过转录组分析成功鉴定出能有效提高缬氨酸合成的亮氨酸应答蛋白和缬氨酸转运蛋白基因, 这些调控回路的扩增使缬氨酸合成产率提高了一倍。同时, 他们通过基因组代谢网络模型模拟分析成功鉴定出另外 3 个基因敲除靶点, 这些基因的敲除使缬氨酸的产率提高到 0.378 g/g 葡萄糖。Lee 研究小组随后使用相同的策略又改造了大肠杆菌用于苏氨酸(Threonine)的生产^[44]。

3.2 合成生物学(Synthetic biology)

合成生物学是以工程学理论为依据, 设计和合成新的生物元件, 或是设计改造已经存在的生物系统^[45-46]。这些设计和合成的核心元件(如酶、基因电路、代谢途径等)具有特定的操作标准; 小分子生物元件可以组装成大的整合系统, 从而解决各种特殊问题, 如可再生生物能源和化合物的生产、药物前体合成、基因治疗等。合成生物学和传统的代谢工

程在用于微生物发酵生产时, 其目的是一样的, 区别在于所使用的技术方法。传统的代谢工程是从整体出发, 先研究微生物的代谢网络, 分析控制代谢通量分布的调控节点, 再在关键节点处进行遗传改造, 从而改变细胞的代谢网络和代谢通量分布; 合成生物学则是从最基本的生物元件出发, 按照标准的模式和程序, 将生物元件一步步地组装, 整合成一个完整的系统(化合物的合成代谢途径)。合成生物学技术在微生物改造应用中有如下几点优势: 1) 能减少遗传改造的时间、提高改造的可预测性和可靠性。2) 能创建有用、可预测、可重复使用的生物部件, 如表达调控系统、环境应答感应器等。3) 能有效地将多个生物部件组装成具有功能的装置。

近些年来, 已有一些运用合成生物学改造微生物生产化合物的成功案例, 其中最具代表性的是 Keasling 研究小组关于抗疟疾药物前体青蒿酸的生产^[45-47]。该研究小组依次设计合成了甲羟戊酸(Mevalonate)途径、amorphadiene 合成酶、细胞色素 P450 单加氧酶, 并将它们在酿酒酵母中组装成一条高效合成青蒿酸的代谢途径, 使最终的青蒿酸产量达到 300 mg/L 的水平。该技术思路同时也用于合成其他类异戊二烯(Isoprenoid)化合物作为新型生物能源^[48]。

Liao 研究小组运用合成生物学的方法构建了长链醇的代谢合成途径^[49]。该研究小组依次设计合成了氨基酸合成代谢中间物 2-酮基酸的合成途径、2-酮基酸脱羧还原途径, 并将它们在大肠杆菌中组装成一条高效合成异丁醇的代谢途径, 使最终的异丁醇产量达到 22 g/L 的水平。该技术思路也可用来合成其他的长链醇, 如异戊醇、丙醇、丁醇、活性戊醇和苯乙醇, 甚至能够合成非天然的碳原子含量更多的长链醇(六碳至八碳)^[50]。

美国 LS9 公司运用合成生物学的方法, 开发了微生物发酵葡萄糖直接生产脂肪酸、脂肪醇和脂肪酸酯的技术专利(WO 2008/100251; WO 2008/113041; WO 2008/119082)。该公司利用来自细菌和动植物的一系列基因, 依次设计合成了脂肪酸合成途径、脂肪酸还原及酯化途径、脂肪酸类化合物转运途径等, 在大肠杆菌中组装出一条高效生产油脂类或烃类化

合物并分泌至胞外的代谢途径。

合成生物学虽然在改造微生物提高发酵能力方面取得了一定的进展,但其方法本身还有很多有待完善之处。Drew Endy 提出了用工程学理论来设计合成生物元件的最关键的 3 个因素:生物元件的标准化、系统的解偶联、系统的抽象化^[46]。针对生物元件的标准化问题,麻省理工学院组建了标准生物部件登记处(<http://partsregistry.org>),目前已经收集了 3200 个 BioBrick 标准生物部件。Knight 研究小组从 BioBrick 标准生物部件出发,进一步开发了一系列 BioBrick 质粒载体^[51]。但是目前已经完成标准生物部件登记并进行使用的仅仅是十几个科研小组,登记的部件数量也非常有限。由于涉及到知识产权问题,许多科研单位并没有参与进来。另一方面,系统的抽象化是解决系统复杂性的一个重要技术。Endy 提出,描述生物功能的信息按照抽象化概念可以分为 4 个阶层:DNA、部件(Parts)、装置(Devices)、系统(Systems)^[46]。各科研小组可以在各个抽象化层次进行研究而不需要熟知其他层次的信息,同时各层次之间可以通过一些有限制的信息进行交流串联。目前看来,制约合成生物学进一步迅速发展的主要因素是标准化生物元件的限制和组装方法程序化模式化的建立。

4 代谢工程中的关键问题及未来展望

代谢工程和微生物发酵工业要解决的根本问题是:如何有效地改造微生物菌种,使其高效地发酵生产各种可再生能源和化合物。

4.1 发酵产品

代谢工程研究的第一步必然是先确定要发酵生产什么产品。微生物发酵产品主要分为 3 大类:可再生能源、大宗化学品(和生物材料)、精细化合物。可再生能源类目前研究的比较多的是纤维素乙醇、生物柴油、丁醇,然而目前的生物能源有着很多缺陷,将来很有必要开发品质高、原材料丰富的下一代生物能源,如长链醇、油酯和碳氢化合物。大宗化学品类目前研究比较多的是柠檬酸、溶剂、乳酸、聚羟基烷酸、1,3-丙二醇、丁二酸以及这些化学品聚合生产的生物材料(如生物塑料、生物橡胶、生物纤

维)。然而目前能工业化发酵生产的大宗化学品数量还非常有限。将来很有必要继续开发生产新型大宗化学品的代谢工程菌,全方位地使生物制造技术代替传统的化工制造技术。3-羟基丙酸/丙烯酸、二羧基酸类、天冬氨酸、糖醇类、1,2-丙二醇、1,4-丁二醇的代谢工程菌改造有希望在短期内取得重大突破。精细化合物目前研究比较多的是氨基酸、核酸、类异戊二烯化合物,如青蒿素(Artemisinin)、类胡萝卜素(Carotenoids)、番茄红素(Lycopene)、甾醇(Sterols)、萜素。虽然大部分氨基酸都能通过发酵法和酶法生产,但甲硫氨酸(需求量第三,全球市场每年 23 亿美元)目前还主要靠化学法制造,将来很有必要研究其发酵生产的代谢工程菌。其他精细化合物如 Omega-3 脂肪酸、辅酶 Q10、芳香族化合物等也具有很大开发潜力。

4.2 发酵菌种

在确定了发酵生产的目标后,下一步关键问题是选用什么菌种进行代谢工程改造和发酵。对于可再生能源和大宗化合物,由于需要直接和化工产品竞争,所以发酵生产最重要的因素是生产成本,因此所选用的微生物菌种最好能具备以下的生理特性:厌氧生长速度快;能利用简单无机盐培养基;能利用多种底物(尤其是六碳糖、五碳糖和甘油);能同步利用五碳糖和六碳糖;对木质纤维素水解液及目标产物有很好的抗逆性能;能在低 pH、高温条件下生长发酵。目前用于代谢工程改造和发酵生产的主要是一些模式微生物,如大肠杆菌和酿酒酵母。它们的生理和遗传机制、基因组信息、代谢网络模型都研究的比较透彻,但是它们并不具备上述的重要发酵生理性能。因此将来有必要分离筛选一些新型的具有较好生理性能的重要工业微生物菌种,鉴定其生理性能的遗传机制并转移至其他工业发酵菌种中。与此同时,随着基因组测序技术和组学技术的日益成熟,对新型微生物的代谢网络研究也会越来越普及。再结合有效的遗传操作技术,这些新型的微生物菌种也可以被直接改造用于发酵生产。

从自然进化的角度看,自然环境下的微生物菌种存在的最大目的是为了自身生存,因此绝大部分微生物都进化出非常丰富的代谢途径以维持其细胞

生长代谢和适应环境条件。然而从微生物发酵制造的角度看, 丰富多样的代谢途径却是细胞高效生产目标产物的负担, 这些途径额外消耗细胞代谢的能量, 和产物竞争各种代谢物前体和辅助因子。如果能够改造或是人工合成微生物, 使它们仅仅执行细胞生长和生产单一目标产物的目的, 必然会大大提高微生物发酵生产的能力。各种微生物基因组序列的大量发掘以及系统生物学技术的大量开发使得这一思想非常有可能实现。一方面可以通过对现有模式微生物进行改造, 最大程度地敲除掉不必须的基因; 另一方面, 运用合成生物学技术, 可以人工设计并重新合成出维持细胞生长和生产单一目标产物的微生物基因组。

4.3 代谢工程改造策略

在确定了生产产品和发酵菌种后, 接下来的任务就是如何改造微生物菌种, 提高其发酵能力。目前微生物发酵生产所面临的主要难题有 3 点:

第一, 发酵生产的效率低、产量低, 导致生产成本高。这部分要解决的关键问题是: 如何优化目标产物合成途径, 提高微生物发酵的速率及产率, 从而降低发酵生产成本, 实现工业化大规模生产。系统生物学技术在解决这一问题时必然将发挥至关重要的作用。各种高通量组学分析技术已经比较成熟, 随着技术的标准化和分析成本的降低, 将来应该会广泛用于反向代谢工程, 高效快速地鉴定出微生物菌种发酵能力提高的遗传机制。新型微生物基因芯片的制备、蛋白质图谱中各蛋白位点的有效鉴定方法、更加精密准确的代谢物分析鉴定技术的发展也会进一步推动分析能力的提高。目前的代谢网络模型一定程度上可以预测细胞生理属性以及预测遗传改变或环境扰动后细胞的代谢应答。然而由于还没有结合动态的代谢变化, 所以其指导改造代谢途径从而提高细胞发酵水平的能力还非常有限。将来代谢网络模型的发展必然要整合入各种条件下的动态代谢变化和多种调控因素, 从而使模型更加真实有效。另一方面, 代谢组学和通量组学分析技术的结合使用, 能进一步帮助优化代谢网络模型, 从而指导如何去优化目标产物合成途径。

第二, 微生物本身并不具有一些精细化合物的

合成途径。这部分要解决的关键问题是: 如何鉴定、克隆精细化合物合成途径中的各个关键酶基因, 并整合串联从而制造出目标产品的合成途径。合成生物学技术在解决这一问题时必然将发挥至关重要的作用。标准生物部件数据库、功能基因(酶)资源库、合成代谢途径数据库的建立将是拓展微生物合成途径的重要基础。在此基础上, 建立标准化模式化的组装技术, 用以调控优化合成途径中各个基因的合理协同表达, 使代谢通量最大限度地流入目标产物的生产, 从而使合成途径的效率达到最大。

第三, 高效的微生物菌株除了需要有优化的合成途径外, 还需要具备适合工业发酵的最佳生理性能。目前比较有效的提高微生物工业发酵生理性能的工具主要有进化代谢技术和全局扰动技术, 但仍不够完善。将来一方面需要分离筛选出具有这些重要生理性能的新型微生物菌种; 另一方面则要开发改善细胞生理性能的新技术方法。结合系统生物学技术, 进一步鉴定出特殊生理性能的遗传机制, 从而将这些生理性能转移至已有的工业微生物菌株中。

5 结束语

随着石油资源匮乏、价格飞速增长以及全球气候变暖、环境恶化等问题的日益严重, 各国政府、企业和科学界均致力于推动传统石油化工制造行业的产业升级。工业生物制造技术是一种可再生的、环境友好、节能减排的先进技术, 微生物发酵则是其中的重中之重。代谢工程的发展虽然只有短短的 20 年, 却极大地推动了微生物发酵工业的发展, 既降低了微生物发酵的生产成本, 又拓展了发酵产品的多样性, 使其在和石油化工制造技术的竞争中在局部占据了上风。2006 年全球的化学市场销售中 5% 来自于工业生物技术。麦肯锡咨询公司预测在 2010 年工业生物技术的产值将达到 560 亿美元, 占化学市场的 20%。随着系统生物学和合成生物学等新技术的迅速发展, 代谢工程和微生物发酵工业在不久的将来会取得新一轮的辉煌。

REFERENCES

- [1] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering.

- Science*, 1991, **252**(5013): 1668–1675.
- [2] Stephanopoulos G, Vallino JJ. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, 1991, **252**(5013): 1675–1681.
- [3] Stephanopoulos G, Sinskey AJ. Metabolic engineering—methodologies and future prospects. *Trends Biotechnol*, 1993, **11**(9): 392–396.
- [4] Nielsen J. Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55**(3): 263–283.
- [5] Nielsen J. Metabolic engineering: techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**(2/3): 125–132.
- [6] Ingram LO, Conway T, Clark DP, *et al.* Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**(10): 2420–2425.
- [7] Zhang M, Eddy C, Deanda K, *et al.* Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 1995, **267**(5195): 240–243.
- [8] Ho NW, Chen Z, Brainard AP, *et al.* Successful design and development of genetically engineered *Saccharomyces* yeasts for effective cofermentation of glucose and xylose from cellulosic biomass to fuel ethanol. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1999, **65**: 163–192.
- [9] Colon GE, Jetten MS, Nguyen TT, *et al.* Effect of inducible thrB expression on amino acid production in *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(1): 74–78.
- [10] Jetten MS, Sinskey AJ. Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Crit Rev Biotechnol*, 1995, **15**(1): 73–103.
- [11] Madison LL, Huisman GW. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, **63**(1): 21–53.
- [12] Desai RP, Papoutsakis ET. Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(3): 936–945.
- [13] McDaniel R, Licari P, Khosla C. Process development and metabolic engineering for the overproduction of natural and unnatural polyketides. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2001, **73**: 31–52.
- [14] Bailey JE, Sburlati A, Hatzimanikatis V, *et al.* Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **52**(1): 109–121.
- [15] Khosla C, Bailey JE. Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature*, 1988, **331**(6157): 633–635.
- [16] Bro C, Nielsen J. Impact of 'ome' analyses on inverse metabolic engineering. *Metab Eng*, 2004, **6**(3): 204–211.
- [17] Lee SY, Lee DY, Kim TY. Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol*, 2005, **23**(7): 349–358.
- [18] Hermann T. Using functional genomics to improve productivity in the manufacture of industrial biochemicals. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**(5): 444–448.
- [19] Ohnishi J, Mitsuhashi 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**(2): 217–223.
- [20] Choi JH, Lee SJ, Lee SY. Enhanced production of insulin-like growth factor I fusion protein in *Escherichia coli* by coexpression of the down-regulated genes identified by transcriptome profiling. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(8): 4737–4742.
- [21] 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.
- [22] Askenazi M, Driggers EM, Holtzman DA, *et al.* Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(2): 150–156.
- [23] Christensen B, Thykaer J, Nielsen J. Metabolic characterization of high- and low-yielding strains of *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54**(2): 212–217.
- [24] Ohnishi J, Katahira R, Mitsuhashi S, *et al.* A novel *gnd* mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **242**(2): 265–274.
- [25] 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.
- [26] Price ND, Papin JA, Schilling CH, *et al.* Genome-scale microbial in silico models: the constraints-based approach. *Trends Biotechnol*, 2003, **21**(4): 162–169.
- [27] Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(5): 612–616.
- [28] Burgard AP, Pharkya P, Maranas CD. Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **84**(6): 647–657.
- [29] Pharkya P, Burgard AP, Maranas CD. OptStrain: a computational framework for redesign of microbial production systems. *Genome Res*, 2004, **14**(11):

- 2367–2376.
- [30] Pharkya P, Maranas CD. An optimization framework for identifying reaction activation/inhibition or elimination candidates for overproduction in microbial systems. *Metab Eng*, 2006, **8**(1): 1–13.
- [31] Jarboe LR, Grabar TB, Yomano LP, *et al.* Development of ethanologenic bacteria. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007, **108**: 237–261.
- [32] Zhang X, Jantama K, Moore JC, *et al.* Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **77**(2): 355–366.
- [33] Jantama K, Zhang X, Moore JC, *et al.* Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **101**(5): 881–893.
- [34] Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, *et al.* Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **99**(5): 1140–1153.
- [35] Jensen PR, Hammer K. Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**(2/3): 191–195.
- [36] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, *et al.* Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(36): 12678–12683.
- [37] Pflieger BF, Pitera DJ, Smolke CD, *et al.* Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**(8): 1027–1032.
- [38] Badarinarayana V, Estep PW 3rd, Shendure J, *et al.* Selection analyses of insertional mutants using subgenic-resolution arrays. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(11): 1060–1065.
- [39] Lynch MD, Warnecke T, Gill RT. SCALES: multiscale analysis of library enrichment. *Nat Methods*, 2007, **4**(1): 87–93.
- [40] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, *et al.* Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, **314**(5805): 1565–1568.
- [41] Santos CN, Stephanopoulos G. Combinatorial engineering of microbes for optimizing cellular phenotype. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, **12**(2): 168–176.
- [42] Park JH, Lee SY, Kim TY, *et al.* Application of systems biology for bioprocess development. *Trends Biotechnol*, 2008, **26**(8): 404–412.
- [43] Park JH, Lee KH, Kim TY, *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**(19): 7797–7802.
- [44] Lee KH, Park JH, Kim TY, *et al.* Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol Syst Biol*, 2007, **3**: 149.
- [45] Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem Biol*, 2008, **3**(1): 64–76.
- [46] Endy D. Foundations for engineering biology. *Nature*, 2005, **438**(7067): 449–453.
- [47] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, **440**(7086): 940–943.
- [48] Lee SK, Chou H, Ham TS, *et al.* Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, **19**(6): 556–563.
- [49] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, **451**(7174): 86–89.
- [50] Zhang K, Sawaya MR, Eisenberg DS, *et al.* Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(52): 20653–20658.
- [51] Shetty RP, Endy D, Knight TF Jr. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *J Biol Eng*, 2008, **2**: 5.