

• 综 述 •

微生物辅因子平衡的代谢调控

陈修来^{1,2,3}, 刘佳^{1,2,3}, 罗秋玲^{1,2,3}, 刘立明^{1,2,3}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 食品微生物制造工程实验室, 江苏 无锡 214122

陈修来, 刘佳, 罗秋玲, 等. 微生物辅因子平衡的代谢调控. 生物工程学报, 2017, 33(1): 16–26.

Chen XL, Liu J, Luo QL, et al. Manipulation of cofactor balance in microorganisms. Chin J Biotech, 2017, 33(1): 16–26.

摘 要: 辅因子平衡对于酶制剂、药品和化学品的生产具有重要的作用。为了满足工业化生产的需求, 维持辅因子长期有效的平衡是实现代谢流高效化导向目标代谢产物的必要手段。本文在总结辅因子生理功能的基础上, 从生化工程和代谢工程两方面分析归纳了辅因子的代谢调控策略, 并展望了辅因子进一步精深调控的发展方向。

关键词: 辅因子, NADH, 代谢工程, 合成生物学, 调控策略

Manipulation of cofactor balance in microorganisms

Xiulai Chen^{1,2,3}, Jia Liu^{1,2,3}, Qiuling Luo^{1,2,3}, and Liming Liu^{1,2,3}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Laboratory of Food Microbial-Manufacturing Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Cofactor balance plays an important role in producing enzymes, pharmaceuticals and chemicals. To meet the

Received: June 14, 2016; **Accepted:** September 23, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21422602), the Key Technologies R & D Program of Jiangsu Province (No. BE2014652), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51611A), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP116022), the Research Program for State Key Laboratory of Food Science and Technology of Jiangnan University (No. SKLF-ZZA-201602).

Corresponding author: Liming Liu. Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21422602), 江苏省科技支撑计划社会发展项目 (No. BE2014652), 江南大学自主科研计划重点项目 (No. JUSRP51611A), 江南大学自主科研计划青年基金 (No. JUSRP116022), 江南大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题 (No. SKLF-ZZA-201602) 资助。

网络出版时间: 2016-10-24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20161024.1100.002.html>

demand of industrial production, microbes should maintain a maximal carbon flux towards target metabolites without fluctuations in cofactor. We reviewed the physiological function of cofactor and discussed detailed strategies to manipulate cofactor balance through biochemical engineering and metabolic engineering. Furthermore, we indicated future research needs to further regulate cofactor balance.

Keywords: cofactor, NADH, metabolic engineering, synthetic biology, manipulation strategy

广义的辅因子平衡是指借助生化工程或代谢工程的相关技术策略,实现辅因子的转变速率与细胞生理功能及目标代谢物合成速率的平衡。狭义的辅因子平衡是指在细胞代谢过程中辅因子对被氧化的速率与被还原的速率之间的平衡。辅因子 NADH/NAD^+ 、 $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ 、 ATP/ADP 等是微生物细胞内重要的代谢因子,作为底物或产物参与生物化学反应,通过辅因子的再生和竞争性利用,影响代谢网络、信号转导和物质转运,进而影响微生物细胞的生理功能。

控制胞内辅因子平衡是维持细胞正常代谢的一项基本需求^[1]。辅因子对 NADH/NAD^+ 和 $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ 作为细胞代谢中最重要的氧化还原载体,不仅作为催化底物分解代谢的电子受体,也为能量依赖型的氧化还原反应提供还原力^[2]。因此, NADH/NAD^+ 和 $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ 的氧化与还原速率平衡是维持正常合成代谢与分解代谢平衡的必然需求^[2]。目前,已经有许多的实例证明了胞内辅因子平衡对细胞代谢的必要性。在丙醇的发酵生产过程中,通过在微生物胞内表达 Transenoyl-CoA 还原酶,能够有效地将胞内积累的 NADH 转化为介导丙醇合成的催动力^[3]。为了改善木糖发酵,通过表达 NADP^+ 依赖型的甘油醛-3-磷酸脱氢酶,能够有效增加 NADPH 通道,创造一个更加良好的辅因子平衡^[4]。

为了在辅因子层面上深入调控碳代谢流,实现对目标碳代谢流的高效调节,科研人员提

出了辅因子工程,即采用分子生物学的手段,改造细胞内辅因子的再生途径,调控微生物细胞内辅因子的形式和浓度,定向改变和优化微生物细胞代谢功能,实现代谢流最大化、快速化地导向目标代谢产物^[5]。然而,传统的辅因子工程策略已经无法满足现实需求,也不能有效阐明由于胞内辅因子不平衡而导致的一系列复杂的生理学现象。因此,本综述在深入分析辅因子生理功能的基础上,从生化工程和代谢工程两个方面详细论述了辅因子调控相关的现代生物技术,并展望了辅因子进一步精深调控的发展方向。

1 辅因子的生理功能

辅因子为生物合成与分解反应提供氧化还原载体,是细胞内能量传递的重要原料因子^[6]。换句话说,辅因子在生物化学反应中具有重要作用,合理控制辅因子水平有利于实现目标代谢物的高效生产^[7]。根据 BRENDA 数据库 (<http://www.brenda-enzymes.org/>) 的统计结果,辅因子 NADH/NAD^+ 、 $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ 、 ATP/ADP 依赖型代谢反应的相关酶总计 1 610 个,主要涉及到氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶和连接酶。

对于辅因子 NADH/NAD^+ 和 $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$,维持辅因子平衡是首要功能。其次是产生 ATP ,参与构成细胞骨架系统。 NADH/NAD^+ 依赖型相关酶总计 524 个(图 1A),包括: NADH 依赖型

3 个、NADH/NAD⁺共依赖型 505 个和 NAD⁺依赖型 16 个 (图 1B)。另外, NADPH/NADP⁺依赖型相关酶总计 582 个 (图 1A), 包括: NADPH 依赖型 3 个、NADPH/NADP⁺共依赖型 575 个和 NADP⁺依赖型 4 个 (图 1B)。NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺依赖型相关酶主要集中于氧化还原酶 (图 1A), 一方面作为 NADH 和 NADPH 的供体, 另一方面以辅因子依赖型分子作为受体氧化金属离子。

对于源于底物水平磷酸化和氧化磷酸化的辅因子 ATP/ADP, 能够以底物、产物、激活剂和抑制剂等多种方式进入微生物的代谢网络, 从而控制细胞的生理功能, 参与构成细胞骨架系统^[8]。ATP/ADP 依赖型相关酶总计 504 个 (图 1A), 包括: ATP 依赖型 125 个、ATP/ADP 共依赖型 361 个和 ADP 依赖型 18 个 (图 1B)。ATP/ADP 依赖型相关酶主要集中于转移酶、水解酶和连接酶 (图 1B)。转移酶主要用于转移一碳基团、含磷基团, 如: 酰基转移酶、糖基转移酶等。水解酶主要用于水解酯键、碳氮键,

而不作用于肽键、酸酐。连接酶主要用于形成碳氧键、碳硫键、碳氮键、碳碳键、磷酸键和氮金属键。

上述微生物辅因子参与的代谢反应表明, 辅因子是大量生物化学反应的必需因子, 能够显著影响胞内的辅因子平衡。同时, 也赋予了辅因子一系列的生理功能, 包括: 控制能量代谢^[9]、调节细胞内氧化还原态、控制碳代谢流、改善线粒体的功能与活性^[10]、控制细胞的生命周期^[11]和控制细胞的毒性^[12]等。

2 基于生化工程的辅因子平衡调控

微生物胞内氧化还原态可以通过 2 个方面得以改善 (图 2): 一方面, 提供能够作为电子受体或 NAD⁺前体的复合物, 如底物氧化还原态、共底物等; 另一方面, 改变培养条件, 如碳源、溶氧、温度、氧化还原电位等。因此, 辅因子平衡的生化工程调控策略, 通常能够控制不同氧化还原态之间的转换, 从而改善微生物对发酵条件的适应能力。

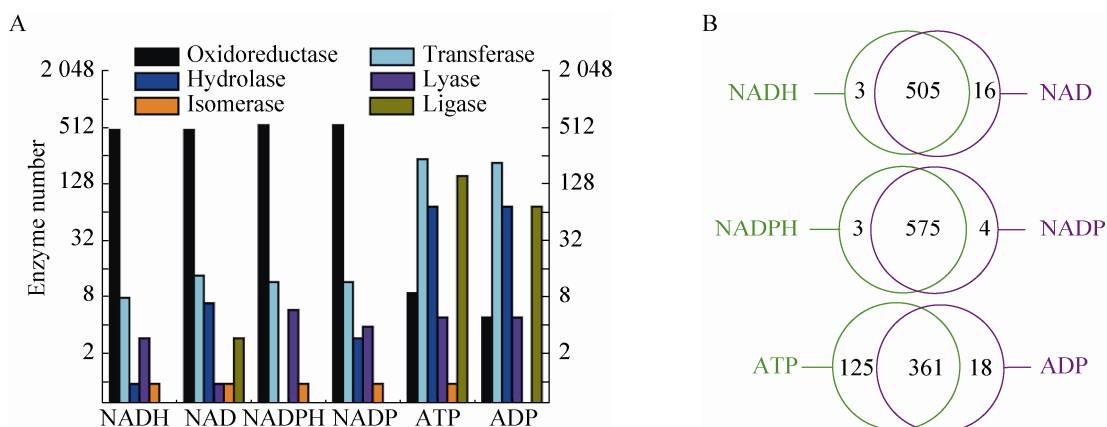


图 1 辅因子依赖型酶的分类与数量

Fig. 1 The classification and quantity of different cofactor-dependent enzymes. (A) The classification of different cofactor-dependent enzymes. (B) The quantity of different cofactor-dependent enzymes.

电子受体或 NAD^+ 前体复合物能够通过修饰改善 NADH 的再氧化影响电子传递链, 从而实现辅因子水平的改变, 达到改善辅因子平衡的目的。一个关于控制底物氧化还原态的典型例子是甘油的厌氧发酵^[13]。在甘油厌氧发酵过程中, 辅因子平衡主要通过两条路径进行维持^[14]: 将电子转移到内源产生的有机化合物和将电子转移到还原性产物。此两种路径为维持辅因子平衡和还原产物的最大化生产提供了有效的通道^[15]。另一方面, 共底物 (如: 氰铁酸盐、硝酸盐、有机酸、乙偶姻、乙醛和吩嗪) 能够作为外源电子受体, 促进 NADH 的再氧化、维持 NADH/NAD^+ 比例与 ATP 水平的最优化、实现辅因子平衡。在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001 发酵木糖生产乙醇的过程中, 通过添加乙偶姻作为外源电子受体, 有效地增加了胞内 NAD^+ 含量, 提高了乙醇的产率^[16]。

微生物胞内辅因子平衡还可以通过控制营养及环境条件来实现 NADH/NAD^+ 与 ATP/ADP 比例的最优化^[5]。在琥珀酸生产菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* NZN111 中, 由于丙酮酸甲裂解酶 (*pflB*) 和乳酸脱氢酶 (*ldhA*) 基因的敲除, 引起 NAD^+ 不能再生, 导致菌株生长缓慢、代谢能力差, 严重影响琥珀酸的生产效率^[17]。为了解决这一问题, 叶勤教授课题组设计了好氧-厌氧两阶段培养策略^[18], 即: 好氧阶段采用糖异生碳源 (如: 乙酸、丙酮酸、甘油等) 调节 *E. coli* NZN111 的 NAD^+ 再生能力, 恢复 *E. coli* NZN111 厌氧阶段快速代谢葡萄糖, 从而实现了琥珀酸的高效生产。当 NADH 氧化为 NAD^+ 时, 溶氧作为氧化磷酸化的电子受体, 通过影响辅因子相关酶的活性来维持辅因子平衡, 满足细胞代谢的能量需求^[19]。在丙酮酸发酵过程中,

低溶氧条件 (20%) 会降低 NADH/NAD^+ 的比率, 导致丙酮酸的产量、产率和生产强度分别提高了 68%、44% 和 45%^[9]。另外, 氧化还原电位也能够影响某些酶的合成与稳定性, 如电子传递相关的酶^[20]、 NADH/NAD^+ 依赖型酶^[21], 最终导致 ATP 得率、 NADH/NAD^+ 比例与代谢流的改变^[22]。通过改变肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 发酵液的氧化还原电位, 有效地提高了 NAD^+/NADH 比率, 改善了 1,3-丙二醇的产量^[23]。

3 基于代谢工程的辅因子平衡调控

在典型的代谢路径中, $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$ 能够在一定程度上反映微生物胞内的氧化还原状态。当辅因子的产生与消耗接近相等时, 氧化还原达到平衡。然而, 不平衡的氧化还原状态会浪费代谢能量、消耗碳代谢流和破坏细胞,

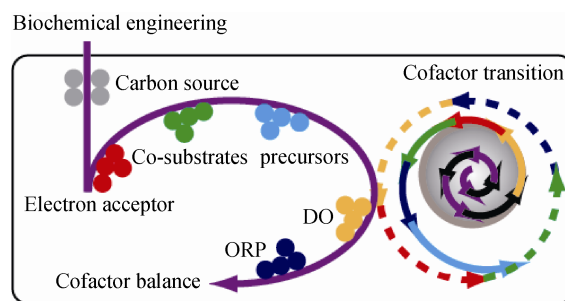


图2 辅因子平衡的生化工程调控策略

Fig. 2 Strategies of biochemical engineering are used to regulate cofactor balance. The intracellular cofactor state can be improved by providing various compounds that can serve as electron acceptor (red), co-substrates (green) and NAD^+ precursors (light blue), or by altering the environmental conditions such as dissolved oxygen (DO, yellow) and oxidoreduction potential (ORP, deep blue). Such strategies can affect electron transfer by modifying NADH reoxidation, and thus achieve cofactor transition to improve cofactor balance.

甚至导致代谢休克。幸运的是,不平衡的氧化还原路径能够通过调节辅因子重新达到平衡(图3):1) 启动子工程,精确调控辅因子依赖型基因的表达式;2) 蛋白质工程,改善辅因子依赖型酶的特异性;3) 结构合成生物学,增强辅因子在合成路径中的传输效率;4) 系统代谢工程,系统地探索与优化辅因子对细胞的影响;5) 辅因子工程,重构辅因子的代谢路径。

3.1 启动子工程

目前,利用微生物发酵法生产化学品引起了人们的普遍关注。由于微生物代谢路径多数

由多基因共同编码^[24],因此,化学品的产量与得率容易受到辅因子不平衡的限制,其主要原因在于合成路径中辅因子依赖型酶的不平衡表达^[13]。为解决此问题,启动子工程在合成生物学上的应用已经表现出强大的潜力,特别是在辅助控制基因精细化表达调控方面^[25]。启动子工程常用的基因表达控制策略^[26-29],包括:改造启动子强度、性质、基因间隔区和核糖体结合位点。改造启动子性质已经用于脂肪酸甲酯的生产^[29]。在此实例中,通过采用动力学敏感器控制系统,有效地改善了脂肪酸甲酯的生物合成路径。

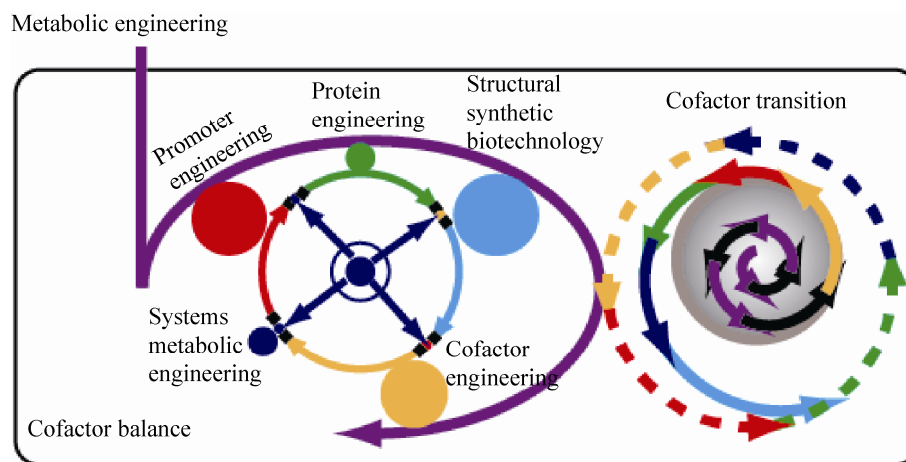


图3 辅因子平衡的代谢工程调控策略

Fig. 3 Strategies of metabolic engineering are used to regulate cofactor balance. Promoter engineering (red) is used to regulate the gene expression levels by engineering promoter strengths, properties, ribosome binding and intergenic regions. Protein engineering (green) can be used to achieve cofactor balance by improving enzyme activity, changing substrate specificity, modifying cofactor specificity, constructing multi-enzyme complexes and creating bioorthogonal redox systems. Structural synthetic biotechnology (light blue) has fostered a variety of activities in cofactor-dependent metabolic pathways, aimed at designing and synthesizing DNA scaffolds, RNA scaffolds and protein scaffolds. Systems metabolic engineering (deep blue) is adopted to create new metabolic pathways, cellular regulatory circuits, and functions with the availability of necessary cofactors through the 'omic' techniques and computational techniques. Cofactor engineering (yellow) has provided an extra route to alter the intracellular cofactor pool and maintain the cellular redox balance by cytoplasmic H_2O -forming NADH oxidase (NOX), mitochondrial alternative oxidase (AOX), phosphite dehydrogenase (PTDH), mitochondrial NADH kinase (POS5), soluble transhydrogenase (UdhA) and membrane-bound transhydrogenase (PntAB). Based on these strategies, the production and consumption of cofactors are approximately equal, and thus achieve cofactor transition to improve cofactor balance.

该脂肪酸甲酯合成路径主要包括 3 个模块, 其中模块 B 主要用于生产脂肪酸甲酯合成前体——乙醇, 包括两个酶: 丙酮酸羧化酶和乙醇脱氢酶。当模块 B 处于低表达水平时, 脂肪酸甲酯的最高产量达到了 1.5 g/L。该结果表明模块 B 的低水平表达有利于平衡高水平表达乙醇脱氢酶所造成的辅因子过剩, 同时也有利于改善辅因子积累所造成的代谢流失衡。另一个启动子工程应用实例也与脂肪酸的合成相关^[30]。该实例中, 将外源引入的脂肪酸合成路径分成 3 个模块: GLY 模块 (包含 NAD(P)^+ 依赖型的还原反应)、ACA 模块和 FAS 模块 (包含 NAD(P)H 依赖型的氧化反应)。通过调节 GLY 模块和 FAS 模块启动子区的核糖体结合位点, 有效地改善了相关基因的表达效率, 进一步提高了脂肪酸的产量。当借助中等强度的核糖体结合位点表达 GLY 模块时, 脂肪酸的产量随着 FAS 模块核糖体结合位点强度的增强而提高。该结果表明: GLY 模块中 NAD(P)^+ 依赖型的还原反应, 能够促进 FAS 模块中 NAD(P)H 依赖型的氧化反应, 从而将丙二酰-ACP 成功转化为脂肪酸。综上两个实例表明, 借助启动子工程, 能够精细化调控合成路径中辅因子依赖型基因的表达, 在一定程度上实现碳流与辅因子平衡的优化。

3.2 蛋白质工程

随着合成生物学的发展, 利用可再生资源生产化学品已经成为现实, 如生物燃油、药品等^[31]。但是, 仅仅将自然界中的路径单元简单组合在一起所构成的合成生物学路径, 在新的底盘微生物中并不能很好地发挥其应有的生物学功能^[32], 部分原因可能归结为辅因子的影响。为有效实现辅因子平衡, 充分发挥合成代谢路径的生物学功能, 在蛋白质工程方面的研究主

要侧重于^[33-38]: 改善酶的活性、改变底物特异性、修饰辅因子特异性、构建多功能酶复合体、创造生物定向氧化还原系统。例如: 通过修饰辅因子特异性可以有效提高维生素 C 的生产^[39]。该实例中, 将来源于谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 的 2,5-二酮基-D-古龙酸还原酶 (2,5-DKG), 在 5 个位点上通过一系列的定点突变扩大辅因子结合口袋, 发现四重突变体 2,5-DKG-F22Y/K232G/R238H/A272G 对 NADH 的亲合力提高了 2 倍, 成功实现了 2,5-DKG 辅因子偏好性由 NADPH 向 NADH 的转变。该结果表明, 借助蛋白质工程改变合成代谢路径中关键酶的辅因子偏好性, 能够实现胞内辅因子的平衡, 进而提高目标代谢产物的产量。另一方面, 通过构建生物定向氧化还原系统也能够实现辅因子的平衡。将 NAD^+ 依赖型苹果酸酶 (ME)、D-乳酸脱氢酶 (DLDH) 和苹果酸脱氢酶 (MDH) 突变成 ME-L310R/Q401C、DLDH-V152R 和 MDH-L6R, 成功实现 NAD^+ 依赖型酶的辅酶由 NAD^+ 转变为 NAD^+ 的结构类似物 NFCD, 而且能够保持酶的活性不变^[34]。由于生物定向氧化还原系统能够消除代谢路径中辅因子的影响, 使得该系统在系统生物学与合成生物学中具有广阔的应用前景。综上所述, 通过改善合成路径中关键酶的辅因子的偏好性, 有利于降低合成路径系统中辅因子的影响, 消除辅因子失衡所造成的负面效应, 这对于构建高效的合成路径具有非常重要的意义。

3.3 结构合成生物学

结构合成生物学, 利用结构生物学与合成生物学的理论方法与技术手段, 以生物活性结构为基础, 设计与控制细胞代谢或代谢路径效率, 为定位与增强细胞氧化还原路径提供了新

的渠道,同时也为控制辅因子介导的生物合成过程提供了借鉴^[40]。目前,该技术在辅因子相关的代谢路径改造方面,已经取得了一定的研究进展,主要体现在设计与合成蛋白质脚手架、RNA 脚手架和 DNA 脚手架^[41-43]。利用重组 *E. coli* 生产丁酸的过程中,考虑了一系列实现辅因子平衡的化学计量策略^[44-45]。首先,改造本源的辅因子再生系统,如:删除乙醇脱氢酶、乳酸脱氢酶和富马酸还原酶。其次,利用源于丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* 和齿垢密螺旋体 *Treponema denticola* 的 5 个基因,构建丁酸合成途径,该路径的特点在于丁酸是 NAD^+ 再生的唯一最终电子受体。虽然上述策略重置了本源的辅因子再生系统,并借助还原力驱动丁酸的合成,但是该异源合成路径并不能有效地将碳流导向丁酸。因此,需要对丁酸合成途径进一步的优化,提高路径的底物传输效率。借助蛋白质脚手架将丁酸合成途径中的关键酶 3-羟基丁酰 CoA 脱氢酶、3-羟基丁酰 CoA 脱水酶和转酯酰 CoA 还原酶进行空间定位,最终使得丁酸产量提高了 3 倍。该结果表明,蛋白质脚手架能够有效缩短代谢反应距离,驱动合成路径的高效进行,降低中间代谢产物对细胞的毒害作用^[46]。上述策略的运用,成功实现了对细胞代谢功能的三维空间调控,对代谢调控的发展具有重要的指导作用,对于控制辅因子影响范围方面,具有重要的参考意义。

3.4 系统代谢工程

系统代谢工程是在整合系统生物学、合成生物学和系统进化工程的理论方法与技术手段的基础上,提出的一套概念性的技术操作框架,主要用于指导合成新酶与代谢途径,或者优化已存在的代谢路径,实现目标代谢物的高效生

产^[47]。因此,系统代谢工程能够在充分考虑辅因子代谢的基础上,创造新的代谢路径及其代谢产物,精细化控制细胞代谢回路。系统代谢工程常用的技术手段,主要包括 2 个方面:组学技术,包括转录组、蛋白组、代谢组^[48];计算机技术,包括以化学结构为基础的计算方法和以理性设计为基础的计算方法^[47]。例如,通过比较 *E. coli* 木糖醇生产与非生产条件下的转录组数据,将下调的 56 个基因作为抑制 NADPH 供应的候选因子,并测定相应基因缺陷型菌株的木糖醇生产水平^[49],发现只有 *yhbC* 缺陷型菌株有效地改善了木糖醇的生产、缩短了菌株的延迟期,其主要原因在于 *yhbC* 缺陷有效地提高了 NADPH 供应。另一个系统代谢工程的应用实例是丁醇的生产^[50]。采用生物代谢路径预测算法,阐释了源自不同代谢中间产物的多种丁醇生物合成路径。由于将 4-羟基丁酸转化为丁醇需要借助 2 步脱氢酶催化的还原反应,利用限制性基因组规模代谢网络模型 *iJR904* 与 OptKnock 模拟算法,设计了一株以丁醇生产为唯一实现辅因子平衡的菌株,并保证其能够在厌氧条件下生长。首先,阻断自然发酵产物代谢路径,如乙醇、甲酸、乳酸、琥珀酸等,迫使菌株借助丁醇积累实现辅因子平衡。其次,采用一系列的代谢工程策略,并借助高 NADH 条件,将碳流导入 TCA 循环,如过量表达 NADH 敏感性的柠檬酸合成酶、替换 NADH 不敏感性的丙酮酸脱氢酶、删除苹果酸脱氢酶等。上述策略表明,系统代谢工程能够在充分考虑辅因子平衡的基础上,设计目标代谢物的高效生产菌株。因此,借助模型技术与组学技术的系统生物学方法,有助于我们更加精确地理解细胞生理功能,扩大代谢工程可改造的范围,有效地解决关键代谢瓶颈。

3.5 辅因子工程

辅因子工程为改变胞内辅因子通道,维持胞内的辅因子平衡,提供了一条额外的路径。因此,作为胞内辅因子状态预测器的胞质水合 NADH 氧化酶(NOX)^[51]、线粒体选择性氧化酶(AOX1)^[52]、磷酸脱氢酶(PTDH)^[53]、线粒体 NADH 激酶(POS5)^[54]、可溶性转氢酶(UdhA)和膜连接转氢酶(PntAB)^[55]等,能够直接影响 NAD(P)H/NAD(P)⁺比例和胞内 ATP 水平。在乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 中,通过构建 noxE 启动子库调控 NOX 的表达与 NADH/NAD⁺比例,能够精确控制乳酸与双乙酰的合成^[51]。通过在 *S. cerevisiae* 中引入异源 AOX1 有效地实现了辅因子平衡、增强了电子传递速率、克服了 Crabtree 效应和降低了乙醇代谢^[52]。PTDH 是一个不常用的生化反应,利用 NADH 或 NADPH 作为氢化物供体,通常用于辅因子的回收利用^[53]。PTDH 三维结构的解析,有利于进一步改善其催化效率、扩展辅因子的功能。利用 POS5 的表达,改善 NADPH 有效性,能够有效提高鸟苷酸二磷酸 L-果糖的生产^[54]。通过在 *E. coli* MBS602 中过量表达 UdhA,能够有效地将 NADH 转变成 NADPH,提高 NADPH 的有效性,使得(S)-2-氯丙酸酯的产量提高了 150%,而过量表达 PntAB,却降低了(S)-2-氯丙酸酯的产量^[55-56]。类似的,在 *E. coli* GJT001 中,过量表达 UdhA,使得聚羟基丁酸的产量和单位细胞得率分别提高了 82.4%和 66%^[56]。上述重置代谢结果表明,针对特定辅因子的代谢工程策略可能是一种更加直接的控制代谢、实现辅因子平衡的方法。为了研究辅因子扰动与发酵动态变化特性的关系,在 *S. cerevisiae* 中分别表达 NOX、AOX1、POS5、UdhA 和 PntAB,分析

NADH/NAD⁺、NADPH/NADP⁺和 ATP/ADP 的变化范围对发酵动力学参数的影响,如:菌体最大比生长速率 (μ_{\max})、比葡萄糖消耗速率 (γ_{glu})、比甘油生成速率 (γ_{gly})、比乙醇生成速率 (γ_{eth}) 和比 CO₂ 生成速率 (γ_{co2})^[57],结果表明:提高线粒体 NADH/NAD⁺的范围,有利于提高 γ_{eth} ;提高胞质 NADH/NAD⁺的范围,有利于提高 γ_{gly} ;提高 NADPH/NADP⁺的范围,有利于提高 μ_{\max} ;提高 ATP/ADP 的范围,有利于降低 γ_{glu} 。上述研究初步实现了辅因子变化与碳流分布的关联。

4 结论与展望

针对微生物辅因子平衡的代谢调控,国内外研究人员采用生化工程和代谢工程等策略,开展了卓有成效的研究工作。特别是在代谢工程调控策略方面,发展了辅因子平衡调控的新技术,包括:启动子工程、蛋白质工程、结构合成生物学、系统代谢工程、辅因子工程等,扩展了微生物辅因子系统的改造能力,实现了理性设计与辅因子控制的有效结合。然而,由于辅因子代谢与功能的复杂性,现有的辅因子平衡调控策略并不能有效地俘获与控制胞内辅因子的整体代谢平衡,从而影响了目标代谢物的积累。因此,一方面,结合辅因子的代谢控制机制,发展高效的多重辅因子平衡调控技术,重置细胞整体对辅因子平衡的应激性,优化目标代谢流的辅因子动力学调控能力;另一方面,根据辅因子的生化特性,设计辅因子关联性化学信号,通过实时检测信号变化对目标产物合成的影响,建立辅因子变化与目标产物合成的动态关联,实现辅因子对目标产物合成的高效调节。

REFERENCES

- [1] Heux S, Cachon R, Dequin S. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metab Eng*, 2006, 8(4): 303–314.
- [2] de Graef MR, Alexeeva S, Snoep JL, et al. The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999, 181(8): 2351–2357.
- [3] Shen CR, Lan EI, Dekishima Y, et al. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(9): 2905–2915.
- [4] Bera AK, Ho NWY, Khan A, et al. A genetic overhaul of *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) to improve xylose fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38(5): 617–626.
- [5] Qin Y, Dong ZY, Liu LM, et al. Manipulation of NADH metabolism in industrial strains. *Chin J Biotech*, 2009, 25(2): 161–169 (in Chinese). 秦义, 董志姚, 刘立明, 等. 工业微生物中 NADH 的代谢调控. *生物工程学报*, 2009, 25(2): 161–169.
- [6] Wang YP, San KY, Bennett GN. Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(6): 994–999.
- [7] Vadali RV, Bennett GN, San KY. Cofactor engineering of intracellular CoA/acetyl-CoA and its effect on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2004, 6(2): 133–139.
- [8] Zhou JW, Liu LM, Shi ZP, et al. ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(1): 94–101.
- [9] Liu LM, Li Y, Shi ZP, et al. Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: increase of NAD⁺ availability. *J Biotechnol*, 2006, 126(2): 173–185.
- [10] La Piana G, Marzulli D, Gorgoglione V, et al. Porin and cytochrome oxidase containing contact sites involved in the oxidation of cytosolic NADH. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 436(1): 91–100.
- [11] Lin SJ, Ford E, Haigis M, et al. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev*, 2004, 18(1): 12–16.
- [12] Domergue R, Castaño I, De Las Peñas A, et al. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida adhesins* during UTI. *Science*, 2005, 308(5723): 866–870.
- [13] Clomburg JM, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(1): 20–28.
- [14] Neidhardt FC. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. Amer: Amer Society for Microbiology Press, 1996: 1458–1496.
- [15] Murarka A, Dharmadi Y, Yazdani SS, et al. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(4): 1124–1135.
- [16] Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78(2): 172–178.
- [17] Wu H, Li ZM, Zhou L, et al. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* *pflB ldhA* double mutant as a result of enhanced anaplerotic activities in the preceding aerobic culture. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(24): 7837–7843.
- [18] Wu H, Li ZM, Zhou L, et al. Improved anaerobic succinic acid production by *Escherichia coli* NZN111 aerobically grown on glyconeogenic carbon sources. *J Biotechnol*, 2008, 136(S): S417.
- [19] Diano A, Bekker-Jensen S, Dynesen J, et al. Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 94(5): 899–908.
- [20] Elliott SJ, Léger C, Pershad HR, et al. Detection and interpretation of redox potential optima in the catalytic activity of enzymes. *Biochim Biophys*

- Acta, 2002, 1555(1/3): 54–59.
- [21] Menzel K, Ahrens K, Zeng A, et al. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: IV. enzymes and fluxes of pyruvate metabolism. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 60(5): 617–626.
- [22] Riondet C, Cachon R, Waché Y, et al. Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2000, 182(3): 620–626.
- [23] Du C, Yan H, Zhang Y, et al. Use of oxidoreduction potential as an indicator to regulate 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 69(5): 554–563.
- [24] Khosla C, Keasling JD. Metabolic engineering for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(12): 1019–1025.
- [25] Blazeck J, Alper HS. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnol J*, 2013, 8(1): 46–58.
- [26] Na D, Kim TY, Lee SY. Construction and optimization of synthetic pathways in metabolic engineering. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13(3): 363–370.
- [27] Pfleger 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.
- [28] Salis HM, Mirsky EA, Voigt CA. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(10): 946–950.
- [29] Zhang FZ, Carothers JM, Keasling JD. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(4): 354–359.
- [30] Xu P, Gu Q, Wang WY, et al. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*. *Nat Commun*, 2013, 4: 1409.
- [31] Foo JL, Ching CB, Chang MW, et al. The imminent role of protein engineering in synthetic biology. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(3): 541–549.
- [32] Li YG. Beyond protein engineering: its applications in synthetic biology. *Enz Eng*, 2012, 1(2): e103.
- [33] Hoelsch K, Sührer I, Heusel M, et al. Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(6): 2473–2481.
- [34] Ji DB, Wang L, Hou SH, et al. Creation of bioorthogonal redox systems depending on nicotinamide flucytosine dinucleotide. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(51): 20857–20862.
- [35] Liu X, Bastian S, Snow CD, et al. Structure-guided engineering of *Lactococcus lactis* alcohol dehydrogenase LAdhA for improved conversion of isobutyraldehyde to isobutanol. *J Biotechnol*, 2013, 164(2): 188–195.
- [36] Paladini DH, Musumeci MA, Carrillo N, et al. Induced fit and equilibrium dynamics for high catalytic efficiency in ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochemistry*, 2009, 48(24): 5760–5768.
- [37] Zhang KC, Li H, Cho KM, et al. Expanding metabolism for total biosynthesis of the nonnatural amino acid L-homoalanine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(14): 6234–6239.
- [38] Zhou YJ, Gao W, Rong QX, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(6): 3234–3241.
- [39] Banta S, Swanson BA, Wu S, et al. Optimizing an artificial metabolic pathway: engineering the cofactor specificity of *Corynebacterium* 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase for use in vitamin C biosynthesis. *Biochemistry*, 2002, 41(20): 6226–6236.
- [40] Chen Z, Wilmanns M, Zeng AP. Structural synthetic biotechnology: from molecular structure to predictable design for industrial strain development. *Trends Biotechnol*, 2010, 28(10): 534–542.
- [41] Conrado RJ, Wu GC, Boock JT, et al. DNA-guided

- assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(4): 1879–1889.
- [42] Delebecque CJ, Lindner AB, Silver PA, et al. Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies. *Science*, 2011, 333(6041): 470–474.
- [43] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 753–759.
- [44] Baek JM, Mazumdar S, Lee SW, et al. Butyrate production in engineered *Escherichia coli* with synthetic scaffolds. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(10): 2790–2794.
- [45] Lim JH, Seo SW, Kim SY, et al. Refactoring redox cofactor regeneration for high-yield biocatalysis of glucose to butyric acid in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2013, 135: 568–573.
- [46] Agapakis CM, Boyle PM, Silver PA. Natural strategies for the spatial optimization of metabolism in synthetic biology. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(6): 527–535.
- [47] Lee JW, Na D, Park JM, et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(6): 536–546.
- [48] Jang YS, Park JM, Choi S, et al. Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 989–1000.
- [49] Hibi M, Yukitomo H, Ito M, et al. Improvement of NADPH-dependent bioconversion by transcriptome-based molecular breeding. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(23): 7657–7663.
- [50] Yim H, Haselbeck R, Niu W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(7): 445–452.
- [51] Guo TT, Kong J, Zhang L, et al. Fine tuning of the lactate and diacetyl production through promoter engineering in *Lactococcus lactis*. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e36296.
- [52] Vemuri GN, Eiteman MA, McEwen JE, et al. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(7): 2402–2407.
- [53] Zou YZ, Zhang HJ, Brunzelle JS, et al. Crystal structures of phosphite dehydrogenase provide insights into nicotinamide cofactor regeneration. *Biochemistry*, 2012, 51(21): 4263–4270.
- [54] Lee WH, Kim JW, Park EH, et al. Effects of NADH kinase on NADPH-dependent biotransformation processes in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(4): 1561–1569.
- [55] Jan J, Martinez I, Wang YP, et al. Metabolic engineering and transhydrogenase effects on NADPH availability in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2013, 29(5): 1124–1130.
- [56] Sánchez AM, Andrews J, Hussein I, et al. Effect of overexpression of a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (UdhA) on the production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2006, 22(2): 420–425.
- [57] Hou J, Lages NF, Oldiges M, et al. Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2009, 11(4/5): 253–261.

(本文责编 郝丽芳)