

代谢工程

郁静怡 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要 代谢工程,也称途径工程,是基因工程一个重要分支,一般是多基因的基因工程,与细胞的基因调控、代谢调控和生化工程密切相关。讨论了代谢工程的应用,包括通过改变代谢流和代谢途径提高产量,改善生产过程,构建新的代谢途径和产生新的代谢产物等。

关键词 代谢工程, 代谢流, 代谢途径

代谢工程 (Metabolic engineering), 也称为途径工程 (Pathway engineering), 是基因工程的一个重要分支。细胞代谢网络是由至少上千种酶, 膜传递系统, 信号传递系统组成的受精密调控又互相协调的复杂系统组成的, 因此代谢工程一般是多基因的基因工程。Bailey⁽¹⁾综述了代谢工程的各方面的应用进展、代谢工程的潜力和合理设计。Stephanopoulos 和 Vallino⁽²⁾的综述讨论了在过量生产一代代谢产物时代谢工程与代谢网络的刚性。Stephanopoulos⁽³⁾的综述重点讨论了代谢流的分配、关键分叉点的速度限制步骤的确定以及生化途径的合成。Cameron 和 Tong⁽⁴⁾的综述全面介绍了代谢工程的应用, 共列举了 169 篇文献。本文举例说明代谢工程的应用, 重点讨论代谢工程的设计思路。

1 改变代谢流

改变代谢流的研究主要用于改变分叉代谢途径的流向、阻断有害代谢产物的合成。设计和操作中的主要困难是细胞代谢网络的刚性和细胞的应答反应。

1.1 加速速度限制的反应

Skatrud 等⁽⁵⁾分析了头孢菌素 C 工业生产菌株的发酵液发现有生物合成的中间体青霉素 N 的积累, 表明下一步酶反应是头孢菌素 C 合成的速度限制步骤, 于是克隆了编码脱乙酰氧基头孢菌素 C (Deacetoxycephalosporin C, DAOC) 合成酶基因 *cefEF*, 再将其导入头孢菌素 C 生产菌株 (*Cephalosporium acremonium*, 顶头孢), 结果转化子的头孢菌素 C 产量提高了 25%, 而青霉素 N 的积累量减少了 15 倍。分析结果表明 *cefEF* 基因剂量、DAOC 合成酶表达量都增加了 1 倍。这个代谢工程菌已用于工业规模发酵, 使工业发酵效价提高了 15%。

1.2 改变分叉代谢途径的流向

提高代谢分叉点的某一个分支代谢途径酶系的活力, 以得到高产的末端代谢产物, 是代谢工程的一个战略。用代谢工程方法设计和构建氨基酸高产菌株方面已得到较大进展, Sano 等⁽⁶⁾将去除反馈抑制机制的高丝氨酸脱氨酶基因转到产赖氨酸棒状杆菌中, 结果使赖氨酸产量由 65g/L 下降到 4g/L, 而苏氨酸产量增加到 52g/L。代谢工程研究使大肠杆菌也成为氨基酸的重要工业生产菌种。吴汝平等⁽⁷⁾克隆了苏氨酸合成的操纵子, 经体外诱

变得副去反馈抑制别位调节的天门冬氨酸激酶基因,并诱变得到抗高丝氨酸的大肠杆菌。构建了苏氨酸高产菌株,苏氨酸产量达 30g/L 以上。Aiba 等^[8]用相似的战略得到了高产色氨酸的大肠杆菌。

1.3 构建代谢旁路

用代谢工程方法还可以阻断或降低副产物的合成,特别是有毒产物的产生。乙酸是大肠杆菌糖代谢的一个末端产物,对大肠杆菌有毒,目前一般用控制糖流和加速度,超滤等方法控制发酵液中乙酸浓度,近年来用代谢工程方法降低乙酸积累取得了成功。Aristidou 等^[9]将枯草杆菌的乙酰乳酸合成酶基因克隆到大肠杆菌,明显改变了细胞的糖代谢流,特别是使乙酸保持在低于细胞毒的浓度,Imgram 和 Conway^[10]将运动发酵单孢菌 (*Zymomonas mobilis*) 的丙酮酸脱羧酶基因和乙醇脱氢酶基因克隆到大肠杆菌中结果使转化子不积累乙酸而产生乙醇,乙醇对宿主细胞毒性远小于乙酸,因此导入这两个基因的大肠杆菌与原种比在摇瓶发酵时细胞密度高 3 倍。这个菌种可用于酒精生产和细胞高密度培养的宿主细胞。

1.4 改变能量代谢途径

上述用代谢工程改变代谢流都是通过相关代谢途径基因的操作完成的,有时用间接方法也可增大或改变细胞代谢流。Chen 等^[11]成功地通过导入血红蛋白基因,提高酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的乙醇产量,血红蛋白通过影响电子传递链,间接影响了线粒体的乙醛歧化途径而起作用的,这条途径产生的乙醇占总产量的三分之一。将血红蛋白基因导入大肠杆菌和链霉菌中,不仅在限氧条件下提高了宿主细胞的生长速率,而且促进了蛋白质和抗生素的合成,血红蛋白也不是直接作用于生物合成途径,而是提高了在限氧条件下产生的 ATP 的效率^[11,12]。食甲基嗜甲基菌 (*Methylophilus methylotrophus*) 经谷氨酸合成酶途径同化氮源,每个氮参入谷氨酸需消耗一个 ATP,而经谷氨酸脱氢酶途径同化氮不需 ATP,但 *M. methylotrophus* 没有这条同化途径。为了提高细胞产量,Windass 等^[13]将谷氨酸脱氢酶基因克隆到 *M. ethylophilus* 中,结果碳源转化菌体的效率从 4% 提高到 7%。

2 扩展代谢途径和构建新的代谢途径

代谢工程研究中引入外源基因可延伸原来的代谢途径,产生新的末端代谢产物,或者利用新的底物作为生物合成的原料,也可构建新的代谢途径合成具新化学结构的代谢产物。近十年来这方面研究十分活跃。

2.1 延伸代谢途径

Cantwell 等^[14]克隆了克拉维链霉菌 (*Streptomyces clavuligenis*) 的扩环酶基因 *cefE*,并将其转化青霉素 V 产生菌产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*),后所得的转化子可直接发酵产生脱乙酰氧基头孢菌素 V,经体外一步酶解即可得 7-氨基脱乙酰氧基头孢菌素 (7-ADCA)。Isogai 等^[15]将 D-氨基酸氧化酶基因和头孢菌素酰化酶基因克隆在 *C. acremonium* 碱性蛋白酶基因调控序列的下游,转化头孢菌素产生菌 *C. acremonium*,结果所得转化子在发酵液中积累 7-氨基头孢菌素 (7-ACA),但因反应同时产生的 H_2O_2 使原料和产物降价而产量较低。Anderson 等^[16]将棒状杆菌的 2,5-二酮基葡萄糖酸 (2,5-

DKG) 还原酶基因导入草生欧文氏菌 (*Erwinia herbicola*), 结果转化菌株直接将葡萄糖转化为 2-酮基古龙酸 (2-KLG), 但产量不高。化学分析发现 2-KLG 被宿主细胞内源的 2-酮基醛糖酸 (2-keto-aldonate) 还原酶 (KR) 转化为艾杜糖酸 (Idonic acid)。进一步将 *E. herbicola* 染色体的 KR 基因缺失失活, 结果使 2-KLG 的产量提高到 120g/L 以上^[17]。

将淀粉酶基因导入 *S. cerevisiae* 菌可改善乙醇发酵, 简化工艺, 降低成本, 但先后将小麦、大麦、水稻和哺乳动物的 α -淀粉酶基因在 *S. cerevisiae* 中表达, 但都不能由淀粉产生大量乙醇, 主要问题是淀粉酶的表达太低, 表达量都在 2mg/L 以下。Kumagai 等从巴期德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 中分离了一个不受乙醇阻遏的醇氧化酶基因 (AOX1) 启动子表达淀粉酶基因, 使 α -淀粉酶分泌量高达 25mg/L。这个基因工程菌可有效地由淀粉直接发酵乙醇, 3% 淀粉至少产生 2% 乙醇。除了淀粉外, 以纤维素、木质素为发酵原料的代谢工程研究也已取得一定进展。

2.2 构建新的生物合成途径

构建新的生物合成途径, 以产生具有新化学结构的末端代谢产物是代谢工程研究的一个重要目标。Hopwood 等^[16]将放线菌红素 (Actinorhodin) 的生物合成基因簇分别导入 Granaticin 和 Medermycin 的产生菌, 结果得到了具有新结构的杂合抗生素 Dihydrogranaticin 和 Mederrhodin A 和 B。用同样策略 Epp 等^[19]将碳霉素生物合成基因转化螺旋霉素产生菌到生二素链霉菌 (*Streptomyces ambofaciens*) 中, 得到杂合抗菌素 4"-异戊酰螺旋霉素。这些先导研究开辟了一条产生新抗生素的途径。

参 考 文 献

- [1] Bailey J E. Science, 1991, 252: 1668.
- [2] Stephanopoulos G, Vallino J J. Science, 1991, 252: 1675.
- [3] Stephanopoulos G, Current Opinion in Biotechnol, 1994, 5: 196.
- [4] Cameron D D, Tong T T. Appl Biochem Bio technol, in press
- [5] Skatrud P L, Titz A J, Ingolia T D *et al.* Biotechnol, 1989, 7: 477.
- [6] Sano K, Sanok, Itok, Miwa K *et al.* Agric Biol Chem, 1987, 51: 597.
- [7] 吴汝平, 杨胜利, 金科铭等. 生物工程学报 1987, 3: 177.
- [8] Aiba S, Imanaka T, Tsunekawa H. Biotechnol Lett, 1980, 2: 525.
- [9] Aristidou A A, San K Y, Bennett G N. Biotechnol Bioeng, 1994, 44: 944.
- [10] Ingran L O, Conway T. Appl Environ Microb, 1988, 54: 397.
- [11] Khosravi M, Webster D A, Stark B C, Plasmid, 1990, 24: 190.
- [12] Magnolo S K, Leenutaphong D L, Demodena J A *et al.* Biotechnol, 1991, 9: 473.
- [13] Windass T D, Worsey M J, Polil E M *et al.* Nature, 1980, 287: 396.
- [14] Cantell C A, Beckman R J, Dotzlafl J E *et al.* Curr Genet, 1990, 17: 213.
- [15] Isogai T, Fukagawa M, Aramori I *et al.* Biotechnol, 1991, 9: 188.
- [16] Anderson S, Marks C B, Miller R L J *et al.* Science, 1985, 230: 144.
- [17] Lazarus R A, in: Biocatalysis, Abramowitz D. Ed Van Nostrand Reinhold, New York, 1990. pp. 136.
- [18] Hopwood D A, Malpartaia F, Kieser H M *et al.* Nature, 1985, 314: 642
- [19] Epp J K, Huler M L B, Turner J R. Gene, 1989, 85: 293.

Metabolic Engineering

Yu Jingyi Yang Shengli

(Shanghai Research of Biotechnology, Academia Sinica, Sanghai 200233)

Abstract Metabolic engineering, also called pathway engineering, is an important part of gene engineering. Metabolic engineering is usually gene engineering of multi-gene, and closely related to gene regulation, metabolic regulation and biochemical engineering. This review discussed the application of metabolic engineering, including increase in yield, improvement of process, construction of new pathway and production of new metabolite by using change of metabolic flow and pathway.

Key words Metabolic engineering, metabolic flow, metabolic pathway