

综述

大肠杆菌生产异戊二烯的代谢工程研究进展

郭静^{1,2}, 曹玉锦¹, 咸漠¹, 刘会洲¹

1 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 中国科学院生物基材料重点实验室, 山东 青岛 266101

2 中国科学院大学, 北京 100049

郭静, 曹玉锦, 咸漠, 等. 大肠杆菌生产异戊二烯的代谢工程研究进展. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1026-1037.

Guo J, Cao YJ, Xian M, et al. Advances in metabolic engineering of *Escherichia coli* for isoprene biosynthesis. Chin J Biotech, 2016, 32(8): 1026-1037.

摘要: 异戊二烯作为一种重要的化工原料, 主要用于合成橡胶。此外, 还广泛应用于医药或化工中间体、食品、粘合剂及航空燃料等领域。利用微生物法生产异戊二烯因具有环境友好、利用廉价的可再生原料、可持续发展等优势而成为当今研究的热点。这里介绍了大肠杆菌生产异戊二烯的代谢途径及关键酶, 从代谢工程的角度出发综述了目前为提高大肠杆菌异戊二烯产量所应用到的方法和策略, 并对今后的发展方向进行了展望。

关键词: 异戊二烯, 合成橡胶, 大肠杆菌, 代谢工程

Advances in metabolic engineering of *Escherichia coli* for isoprene biosynthesis

Jing Guo^{1,2}, Yujin Cao¹, Mo Xian¹, and Huizhou Liu¹

1 CAS Key Laboratory of Biobased Materials, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: As an important industrial chemical, isoprene is mainly used as a precursor for synthetic rubbers. In addition, it also has wide applications in the field of pharmaceutical and chemical intermediates, food, adhesives and aviation fuel. Compared with conventional petrochemical routes, production of isoprene in microbial systems has been the research focus considering environment friendly and sustainable development features. This article summarizes the metabolic pathways

Received: December 9, 2015; **Accepted:** February 3, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21572242), Taishan Scholars Climbing Program of Shandong (No. TSPD20150210).

Corresponding author: Huizhou Liu. Tel: +86-532-80662766; Fax: +86-532-80662765; E-mail: liuhuizhou@qibebt.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 21572242), 泰山学者攀登计划 (No. TSPD20150210) 资助。

网络出版时间: 2016-03-07

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160307.1412.005.html>

and key enzymes of isoprene biosynthesis, reviews current methods and strategies in improving isoprene production of *Escherichia coli*, and also gives some basic ideas and expectation.

Keywords: isoprene, synthetic rubber, *Escherichia coli*, metabolic engineering

随着世界经济和汽车行业的迅猛发展,全球橡胶需求量不断攀升。目前我国已经成为世界上最大的橡胶消费国,天然橡胶和合成橡胶的消费量均位居世界第一^[1]。根据美国行业研究机构弗里多尼亚集团(Freedonia)2015年发布的预测报告,中国对橡胶制品的需求量预计将以每年8.8%的速率增长,到2017年将达到7400亿元人民币。轮胎行业仍将是最大的橡胶产品部门。天然橡胶的供应受社会环境,地理位置和气候条件等多种因素影响,其价格走势很难把握,对下游生产成本影响很大。异戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)橡胶作为一种合成橡胶,在供应上比较稳定,价格也有规律可循,而且聚异戊二烯橡胶的综合性能优异,最接近天然橡胶。因此,轮胎、制鞋等行业对异戊二烯橡胶有着强烈的需求。

异戊二烯是聚异戊二烯橡胶的重要单体,其成本占总生产成本的70%以上。因此,能否提供价格低廉、供应稳定的异戊二烯单体对橡胶行业的发展至关重要。目前,异戊二烯的制备主要有石油基原料异戊烷、异戊烯脱氢法、化学合成法(包括丙烯二聚法、乙炔-丙酮法、异丁烯-甲醛法)和裂解C5馏分萃取蒸馏法等^[2-3]。然而,随着化石资源的日益枯竭和价格的不断攀升,原料供给问题必然成为制约异戊二烯生产的重要瓶颈。另外,化学法制备异戊二烯的过程中普遍存在能耗高、工艺复杂、对设备要求高、环境污染严重和产物收率低等问题,制约着异戊二烯工业化生产的发展^[4-5]。因此,寻

找可持续的异戊二烯生产方式是今后异戊二烯工业生产的重要发展趋势。

与传统化学法相比,以生物转化和生物催化为核心的微生物发酵法具有环境友好、利用廉价的可再生原料和可持续发展等优势。因此,微生物合成成为异戊二烯制备领域的重要研究方向。这篇文章介绍了微生物法生产异戊二烯的代谢途径和关键酶,并综述了大肠杆菌生产异戊二烯的研究进展,总结了影响异戊二烯产量的关键酶及改造方式,指导碳代谢流向目标产物异戊二烯,为构建异戊二烯高产工程菌株提供参考。

1 微生物产异戊二烯的代谢途径及关键酶

类异戊二烯化合物生物合成的前体物质是异戊烯基焦磷酸(IPP)和其异构体3,3-二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)。自然界中合成这两种前体物质的代谢途径有两种(图1)^[6]:一种是甲羟戊酸(MVA)代谢途径,主要存在于原核细胞、藻类及高等植物的叶绿体中;另一种是4-磷酸甲基赤藻糖醇(MEP)代谢途径,主要存在于真核细胞、古细菌和高等植物的胞液中^[6-10]。

1.1 MEP代谢途径及关键酶

上世纪90年代初,人们才从细菌和植物中发现了MEP代谢途径^[11-12]。直到2001年,MEP途径中的基因才被完全鉴定出来^[8]。虽然MVA途径和MEP途径都起始于中心碳代谢中间体,但不同于MVA途径(以乙酰辅酶A为起始物),

MEP 途径的起始反应物是丙酮酸和 3-磷酸甘油醛,二者缩合生成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(DXP),这一步反应由 DXP 合成酶(DXS)催化完成,也是 MEP 途径的第一个限速酶。DXP 在 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(DXR)的催化下经重排和还原生成 MEP,DXR 的催化活性需要 NADPH 和二价金属离子(Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+})作为辅因子,这是 MEP 途径的第二个限速反应。接下来,MEP 与 CMP 在 ispD 酶催化下偶联生成 4-(胞嘧啶-5'-磷酸)-2-C-甲基-D-赤藻糖醇(CDP-ME),C2 的羟基被磷酸化,脱去 CMP 并生成 2-C-甲基-D-赤藻糖醇 2,4-环焦磷酸(MECDP),再还原成 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸,最后经一步反应生成 IPP 和 DMAPP。MEP 转化为 IPP 和 DMAPP 经过了 5 步反应,依次由 ispD、ispE、ispF、ispG 和 ispH 酶催化完成。目前对大肠杆菌 MEP 途径的研究发现,该途径存在严格的内源调控机制,可以发生在转录中、转录后、翻译后、前体物质的生成与消耗、变构调节、代谢反馈和前馈等不同水平上,然而其调控机理尚不清楚。

1.2 MVA 代谢途径及关键酶

在 MVA 途径中,起始反应物乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 硫解酶(AACT)和 HMG-CoA 合成酶(HMGS)的催化下缩合生成 β -羟基- β 甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)。接着,HMG-CoA 在 HMG-CoA 还原酶(HMGR)的作用下生成甲羟戊酸(MVA)^[13],至此为 MVA 上游途径(MVA upper pathway)。MVA 经焦磷酸化和脱羧作用形成 IPP,经异构化转化为 DMAPP,至此为 MVA 下游代谢途径(MVA lower pathway),共 4 步反应,需要甲羟戊酸激酶(MK)、磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶

(MVD) 和异戊烯基焦磷酸异构酶(IDI)的催化完成。

1.3 异戊二烯合成酶

异戊二烯合成酶(EC 4.2.3.27)能催化 DMAPP 转化为异戊二烯。1957 年, Sanadze 第一次发现植物释放异戊二烯^[14],然而关于异戊二烯合成酶的研究相对较晚。2001 年, Miller 等首次从杨树(*Populus alba* × *Populus tremula*)中分离到异戊二烯合成酶(ispS)并在大肠杆菌中表达^[15]。2005 年 Sasaki 等从 *P. alba* 分离到异戊二烯合成酶(PaIspS)并进行了酶学特征研究,结果表明其特异性底物为 DMAPP^[16]。接着, Sharkey 等从葛根 kudzu vine (*Pueraria montana*)中分离了异戊二烯合成酶基因^[17]。最近, Ilmén 等从甘薯 *Ipomoea batatas*、芒果 *Mangifera indica* 和杜英 *Elaeocarpus photiniifolius* 中分离到 3 种新的异戊二烯合成酶基因,它们与无梗花栎 *Quercus petraea* ispS 的序列相似度分别为 55%、65% 和 60%^[18]。分别将这 3 种新的 ispS 以及杨树 (*P. alba*) 和葛根 (*P. montana*) 的 ispS 在大肠杆菌中过表达,通过测定异戊二烯的产量对不同来源 ispS 的催化效率进行评价,结果表明甘薯 ispS 催化活性最高。

2 微生物法合成异戊二烯的代谢改造策略

大肠杆菌具有合成异戊二烯前体物质 DMAPP 的 MEP 代谢途径,但是自身缺少异戊二烯合成酶,不能在生长过程中产生异戊二烯。因此,需要利用代谢工程手段对微生物的代谢途径进行改造,以提高异戊二烯的生物转化效率。大肠杆菌不仅是第一个被改造生产异戊二烯的微生物,而且是当下异戊二烯产量最高的工程菌株^[19]。其他微生物(包括酿酒酵母、泛

菌、解脂耶氏酵母、里氏木霉以及链霉菌等)也都进行了异戊二烯生物合成途径的代谢工程研究^[20-22],但其异戊二烯产量都低于工程大肠杆菌。因此,本文着重介绍和总结了大肠杆菌异戊二烯合成途径的代谢改造策略。

2.1 大肠杆菌异源表达异戊二烯合成酶

自然界中有些微生物可以合成异戊二烯^[23-24],其中枯草芽孢杆菌为异戊二烯产量最高的天然菌^[25-26],但是目前还没有从微生物中分离到异戊二烯合成酶基因,人们获得的 *ispS* 全部来源于植物。因此,对大肠杆菌异戊二烯合成途径的第一个改造策略就是将植物来源的 *ispS* 在大肠杆菌中过表达。Miller 等首次将杨树 *ispS* 在大肠杆菌中过表达,异戊二烯产量提高了 1.85 倍^[15]。由于天然的植物异戊二烯合成酶 cDNA 序列密码子偏好性与大肠杆菌有差异,为了使其在大肠杆菌中高效表达,苏思正等按照大肠杆菌偏好密码子进行优化后利用化学方法合成,并且去掉编码信号肽部分的氨基酸的核苷酸序列,该重组异戊二烯合成酶能够催化异戊二烯的合成,重组菌的异戊二烯产量可达到 60 $\mu\text{g/L}$ ^[27]。但仅仅过表达异源异戊二烯合成酶的大肠杆菌异戊二烯产量还是很低。为了进一步提高异戊二烯的产量,需要用其他代谢工程手段对大肠杆菌进行改造。

2.2 大肠杆菌 MEP 代谢途径改造策略

在大肠杆菌 MEP 途径中,催化前两步反应的 DXS 和 DXR 是关键限速酶,DXS 和 DXR 的高效表达可以提高类异戊二烯的产量^[28-31]。Zhao 等将来自大肠杆菌自身的 DXS、DXR 和来自黑杨 *Populus nigra* 的 *ispS* 在大肠杆菌中过表达,异戊二烯产量达到 160 mg/L ^[32]。而异源表

达枯草芽孢杆菌 MEP 途径中的关键酶 DXS 和 DXR 使异戊二烯产量进一步提高到 314 mg/L ,提高了两倍。另一方面,代谢中 IPP 和 DMAPP 在异戊二烯焦磷酸异构酶的作用下相互转化,而 DMAPP 在 *ispS* 的催化作用下生成异戊二烯。因此,过表达异戊二烯焦磷酸异构酶可以提高异戊二烯的产量^[22-33]。杰能科 (Genencor) 的研究发现,过表达 DXS、IDI 和葛根 *ispS* 的工程大肠杆菌异戊二烯产量达到 300 mg/L ,相比于只过表达了 *ispS* 基因的大肠杆菌,异戊二烯产量提高了 5-12 倍^[22]。本课题组刘敏和杨建明等将来自大肠杆菌的异戊二烯焦磷酸异构酶基因 (IDI) 和来自枯草芽孢杆菌的异戊二烯焦磷酸异构酶基因 (FNI) 构建到原核表达载体上,并在大肠杆菌中异源过量表达^[34]。研究发现,来自枯草芽孢杆菌 FNI 具有更高的催化活性,异戊二烯的产量由 0.80 mg/L 提高到 2.96 mg/L 。由以上研究结果可以推测,大肠杆菌中表达异源基因有利于提高酶的催化活性,其原因可能是提高了酶自身的催化活性,也可能是避免了 MEP 途径的内源调控机制。

2.3 大肠杆菌 MVA 代谢途径改造策略

从理论计算结果来看,以葡萄糖为底物时 MEP 途径的异戊二烯产率 (30.2%) 要高于 MVA 途径 (25.2%)^[19],但是由于 MEP 途径研究较晚,代谢中相关酶的功能及其调控机制研究不透彻使得整个途径催化效率不高^[35]。尽管上述研究取得了一些进展,但是由于内源 MEP 代谢途径的调控机制限制了异戊二烯的最终产量。为了避免大肠杆菌自身 MEP 途径的内源调控机制限制,研究者开辟了新的途径,在大肠杆菌中异源表达部分或完整的 MVA 途径,提高

细胞内萜烯前体物质 (DMAPP) 的浓度, 进而提高类异戊二烯的产量。2003 年, Martin 等首次在大肠杆菌中过表达了酿酒酵母的 MVA 途径和紫穗槐-4,11-二烯合酶提高了萜类物质青蒿酸的产量^[36]。Pitera 等在研究中发现, 虽然在大肠杆菌中异源表达 MVA 途径可以提高萜类物质的产量, 但是细胞内中间代谢产物 HMG-CoA 的大量积累会抑制细胞的生长, 通过调节 HMGR 的表达量可以解决代谢途径中的瓶颈限制, 提高上游途径的 MVA 产量^[37]。Anthony 等发现 MK 是大肠杆菌 MVA 途径中的限速酶, 使用强启动子和高拷贝的质粒提高 MK 的表达量, 萜类物质青蒿酸的产量提高了 7 倍^[38]。随后, 定量蛋白质组学分析也表明 MVA 下游途径中的 MK 和 PMK 是代谢瓶颈^[39]。Ma 等对含有整个酿酒酵母 MVA 途径的工程大肠杆菌进行了优化, 通过选择合适酶活性质的 HMGR 和提高细胞内还原当量, 萜类物质青蒿酸的产量提高了 120%^[40]。另一方面, 细胞内异戊二烯前体物质 IPP 和 DMAPP 的过量积累会对细胞产生毒性作用。这主要是由于下游的异戊二烯合成酶催化活性不高所造成的, 为了减少或避免中间代谢产物浓度过高的毒性作用, 必须提高异戊二烯合成酶的催化效率。有文献指出, 利用蛋白工程手段可以提高异戊二烯合成酶的催化活性, 但目前尚无详细的研究报道^[4]。由以上研究报道可以看出, 尽管在大肠杆菌中构建 MVA 代谢途径比其自身 MEP 途径更有效地合成了类异戊二烯化合物, 但整个代谢途径涉及多个编码基因的表达, 使用了多个重组质粒的表达系统来实现完整的代谢通路构建, 这就涉及到不同表达模块在细胞内的调控。冯凡等基于蛋白质

预算理论的指导, 通过优化质粒拷贝数和稀有密码子来调控系统内关键限速酶编码基因的表达量, 在摇瓶发酵水平上使异戊二烯产量比对照菌株提高了 73%, 达到了 761.1 mg/L^[41]。此外, 异源基因来源不同表达效率也不同。Yoon 等评价了不同微生物来源 (包括肺炎链球菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、酿脓链球菌及酿酒酵母) 的 MVA 上下游途径基因在大肠杆菌中表达后的生物转化效率, 其中粪肠球菌的上游 MVA 途径和肺炎链球菌的 MVA 下游途径转化效率相对较高^[42]。本课题组杨建明等在大肠杆菌中构建了完整的酿酒酵母 MVA 途径, 同时过表达了白杨 ispS, 在发酵罐水平 48 h 发酵后异戊二烯产量达到 532 mg/L^[43]。虽然比利用 MEP 途径的产量有所提高, 但是离工业化还相差甚远。造成目标产量低的原因可能是 MVA 途径中存在限速步骤。因此, 杨建明等将酿酒酵母 MVA 下游基因和 ispS 基因在大肠杆菌中过表达, 考察了添加外源 MVA 对该菌株异戊二烯产量的影响。结果发现, 异戊二烯产量随着加入 MVA 浓度的增加而增加, 说明 MVA 下游途径具有很高的转化效率。然而异源表达酿酒酵母 MVA 上游途径仅产生了低浓度的 MVA。以上研究表明, MVA 上游途径是整个 MVA 途径的限速步骤。为了优化 MVA 代谢途径, 将来自粪肠球菌和酿酒酵母的 MVA 上游途径的转化效率进行了对比, 发现来自粪肠球菌的 MVA 上游途径转化效率较高, 其产生的 MVA 浓度比酿酒酵母 MVA 上游途径提高了 50 倍^[44], 这与 Yoon 等的研究结果相一致。此外, 本课题组还发现表达宿主的选择对异戊二烯的产量也有影响, 同等条件下, BL21 starTM (DE3) 的异戊二烯产量最高,

其次是 BL21 (DE3), JM109 (DE3) 产量最低。因此,在大肠杆菌 BL21 starTM (DE3) 中过表达粪肠球菌 MVA 上游途径、酿酒酵母的 MVA 下游途径以及白杨 *ispS*, 经摇瓶发酵培养 24 h 后异戊二烯产量进一步提高到 1 091 mg/L。在发酵罐水平经 48 h 的诱导培养, 异戊二烯累积浓度达到 6.3 g/L, 从葡萄糖到异戊二烯的转化效率为 7%, 达到理论转化率的 28%。

杰能科公司和美国固特异轮胎与橡胶公司 (Goodyear Tire & Rubber Company) 在异戊二烯的生物合成中做了大量工作^[4]。他们在大肠杆菌中过表达了来自粪肠球菌的 *mvaS* 和 *mvaE* 基因 (MVA 上游途径基因) 和来自酿酒酵母的 *MK*、*PMK*、*MVD* 和 *IDI* 基因 (MVA 下游途径基因), 以及来自葛根的异戊二烯合成酶基因, 该工程菌株的异戊二烯产量比 MEP 途径工程菌株提高了 3 倍, 40 h 的发酵培养可以产生 20 g/L 的异戊二烯^[45]。在此基础上, 他们过表达了对下游产物法尼烯基焦磷酸 (FPP) 反馈抑制作用不敏感的马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶 *MK* 和杨树的 *ispS*。在批次发酵中, 该工程菌株的异戊二烯产量达到 35 g/L, 葡萄糖转化为异戊二烯的产率为 5.2%, 该菌株比只表达了 *ispS* 基因的工程大肠杆菌异戊二烯产量提高了 73 倍, 而相比于含有 MEP 途径的工程菌株, 异戊二烯产量提高了 10–20 倍。虽然研究表明粪肠球菌 MVA 上游途径转化效率最高, 但是将其基因整合到大肠杆菌染色体上之后 MVA 途径的转化效率受到了下游途径的限制。

2.4 中心碳代谢流改造策略

MVA 途径反应的起始物是乙酰辅酶 A, 经两步反应使 3 分子的乙酰辅酶 A 缩合成 HMG-CoA。

而在微生物代谢过程中还存在其他消耗乙酰辅酶 A 的代谢支路, 减少这些途径对乙酰辅酶 A 的消耗, 保证细胞内足够的乙酰辅酶 A 供给是提高 MVA 途径转化效率的重要因素之一。另一方面, 减少其他途径的碳源消耗, 为 MVA 途径提供更多的还原力, 也是提高 MVA 途径转化效率的重要途径。研究发现, 过表达磷酸葡萄糖酸内酯酶 (*pgl*) 可以提高戊糖磷酸途径的效率, 促进 NADPH 的生成, 从而提供给粪肠球菌 HMGR 更多的还原力。将 *pgl* 和密码子优化的 *ispS*、完整的 MVA 途径以及马氏甲烷八叠球菌甲羟戊酸激酶 *MK* 在大肠杆菌中过表达, 经过发酵条件优化后, 该工程菌株异戊二烯产量达到了 79 g/L, 转化率为 10.2%^[5]。在此基础上, 将柠檬酸合成酶基因 *glcA* 表达下调, 敲除磷酸葡萄糖酸内酯酶 *pgl* 并过表达磷酸转酮酶 *pkl* 基因, 从而提高中心碳源代谢流中木酮糖-5-磷酸转化为甘油醛-3-磷酸的效率, 为 MVA 途径提供更多的前体物质, 提高异戊二烯产量^[19]。在这个策略中, *pkl* 起到了关键作用, 将鸚鸡肠球菌的 *pkl* 基因在含有 MVA 途径的大肠杆菌中过表达, 同时过表达密码子优化后的白杨 *ispS*, 异戊二烯产量达到 123.6 g/L, 转化率达到 16.3%, 是目前报道的异戊二烯最高产量。表 1 对目前大肠杆菌生产异戊二烯的代谢改造策略及其产量和转化率进行了总结。

2.5 下游异戊烯基磷酸盐的反馈抑制调控策略

以 IPP 和 DMAPP 为起始物, 在 MEP 和 MVA 途径中还存在着下游异戊烯基磷酸盐代谢途径 (图 2)^[49]。根据微生物体内异戊烯转移酶的不同而产生不同的异戊烯基磷酸盐。相比于异戊烯转移酶, 异戊二烯合成酶 *IspS* 的 $K_{m(\text{DMAPP})}$

较高,微生物代谢产生的大量 IPP 和 DMAPP 将更倾向于作为下游异戊烯基磷酸盐合成的前体物质,从而对异戊二烯的合成途径产生反馈抑制作用。为了降低异戊烯基磷酸盐的积累,

将单萜和半萜合成酶与 ispS 在含有 MVA 途径的工程大肠杆菌内共表达可以提高异戊二烯的产量,该策略已经应用于目前异戊二烯产量最高的工程菌株中^[19]。

表 1 大肠杆菌代谢工程改造策略及其异戊二烯产量和转化率

Table 1 Metabolic engineering of *Escherichia coli* and their isoprene production and yield

No.	Strains	Isoprene production		Pathways	References
		Titer (g/L)	Yield (%)		
1	BL21(DE3)/pACY-ispS _{pn}	0.096	-	MEP	[32]
2	BL21(DE3)/pACY-DXS _{E. coli} -DXR _{E. coli} -ispS	0.16	-	MEP	[32]
3	BL21(DE3)/pACY-DXS _{B. subtilis} -DXR _{B. subtilis} -ispS	0.31	-	MEP	[32]
4	BL21(DE3)/pET-DXS-IspS/pESF-IDI(ispA-weakened)	0.02	-	MEP	[46]
5	BL21(DE3)/pCOLAUpper _{S. cerevisiae} /pTrcLower _{S. cerevisiae} /pACY-ispS _{pa}	0.53	-	MVA	[43]
6	BL21(DE3)/pACY-mva _{E. faecalis} -mvaS _{E. faecalis(MT)} -ispS _{pa} /pTrcLower	6.3	7	MVA	[44]
7	BL21(DE3)/pCLpTrcUpper/pTrcKKDyIKIs	3.0	1.0	MVA	[47]
8	BL21(DE3)/pCLpTrcUpperHGS2/pTrcKKDyIKIs	3.3	1.2	MVA	[47]
9	BL21(DE3)::GI1.2-Lower/pCLpTrcUpper/pTrcKudzu	1.6	0.4	MVA	[47]
10	BL21(DE3) Tuner/pCLpTrcUpper/pTrcKKDyIKIs	1.3	0.6	MVA	[47]
11	MG1655/pCLpTrcUpper/pTrcKKDyIKIs	0.39	-	MVA	[47]
12	FM5/pCLpTrcUpper/pTrcKKDyIKIs	0.24	-	MVA	[47]
13	ATCC11301/pCLpTrcUpper/pTrcKKDyIKIs	1.4	0.5	MVA	[47]
14	BL21(DE3)::GI1.2-Lower/pCLpTrcUpper/pTrcKudzu-mMVK	23.8	6.3	MVA	[48]
15	BL21(DE3)::GI1.2-Lower/pCLpTrcUpper/pTrcAba-MVK _{M. mazei} /pBBR-pgl	60.5	10.7	MVA	[45]
16	BL21(DE3)::PL.2mKKDyI/pCLUpper/pTrcAlba(truncated)-MVK _{M. mazei}	76	11	MVA	[5]
17	BL21(DE3)::PL.2mKKDyI/pCLUpper/pTrcAlba(truncated)-MVK _{M. mazei} +restored chromosomal 17257bp containing pgl	68	14.5	MVA	[5]
18	BL21(DE3)::PL.2mKKDyI/pCLUpper/pTrcAlba(truncated)-MVK _{M. mazei} +restored chromosomal 17257bp without pgl	79	10.2	MVA	[5]
19	BL21(DE3)Δpgl::PL.2mKKDyI,GI1.2-Lower,yhfSFRTPyddVIs _p ,AyhfS _p ,thiFRTtruncIspA _p ,bMVK	123.6	16.3	MVA	[19]

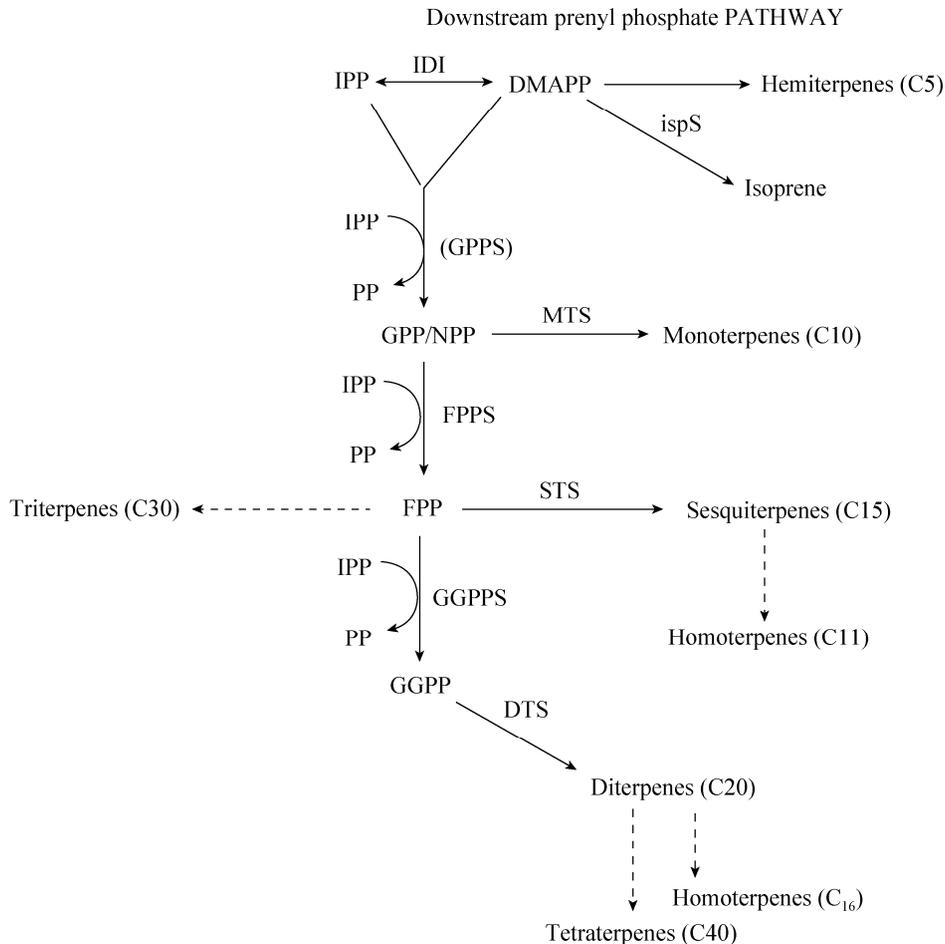


图 2 下游异戊烯基磷酸盐代谢途径

Fig. 2 Downstream prenyl phosphate metabolism.

3 总结与展望

纵观国内外的研究现状，尽管微生物法生产异戊二烯的研究取得了一定的进展，但微生物生产异戊二烯的代谢工程技术中仍有许多工作有待进一步研究。异戊二烯的生物合成代谢途径和调控机制复杂，大肠杆菌自身 MEP 途径的内源调控机制限制了异戊二烯的产量。虽然目前已经将完整的外源 MVA 代谢途径在大肠杆菌中实现了异源表达，但由于所需的编码酶基因较多，只通过一个载体的表达系统很难将

整个代谢通路完全构建成功，需要使用多个重组质粒完成整个 MVA 代谢途径的构建，这其中就涉及到多个表达模块在细胞内的调控。过表达代谢系统中某一个或几个酶不仅无法使目标产物的产量明显提高，还很可能造成细胞毒性作用。只有使整个系统内蛋白质的表达处于相对平衡状态，异戊二烯的产量才会得到提高。另一方面，虽然本文并未涉及发酵控制方面的研究，但是就整个生物转化过程而言，发酵控制点的研究和菌株的代谢改造同样对转化效率

有很大的影响。应根据微生物的代谢特性,对发酵过程进行代谢调控,合理地设计发酵工艺,增加异戊二烯代谢途径的代谢流分配,使底物最大程度地转化为异戊二烯,减少代谢过程中碳源以其他途径的损耗(如降低CO₂的排放等)。

REFERENCES

- [1] Wang QF, Yu Y, Zhang HB, et al. Analysis of prospects for developing isoprene rubber in China. Sino-Global Energy, 2011, 16(8): 68–71 (in Chinese).
王启飞, 于洋, 张红兵, 等. 我国发展异戊二烯橡胶前景分析. 中外能源, 2011, 16(8): 68–71.
- [2] Yue P. Production technology and market analysis of isoprene. Ref Chem Ind, 2006, 17(2): 3–5 (in Chinese).
岳鹏. 异戊二烯的生产技术及市场分析. 炼油与化工, 2006, 17(2): 3–5.
- [3] Zhang HF, Sheng YN, Fu Y, et al. Preparation and application of isoprene. Technol Dev Chem Ind, 2011, 40(10): 35–41 (in Chinese).
张慧芳, 盛永宁, 付燕, 等. 异戊二烯的制备及其应用. 化工技术与开发, 2011, 40(10): 35–41.
- [4] Whited GM, Feher FJ, Benko DA, et al. Development of a gas-phase bioprocess for isoprene-monomer production using metabolic pathway engineering. Ind Biotechnol, 2010, 6(3): 152–163.
- [5] Beck ZQ, Cervin MA, Nielsen AT, et al. Compositions and methods of PGL for the increased production of isoprene: US, 8455236 B2. 2013-06-04.
- [6] Zurbruggen A, Kirst H, Melis A. Isoprene production via the mevalonic acid pathway in *Escherichia coli* (Bacteria). Bioenerg Res, 2012, 5(4): 814–828.
- [7] Kuzuyama T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(8): 1619–1627.
- [8] Rodríguez-Concepción M, Boronat A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. Plant Physiol, 2002, 130(3): 1079–1089.
- [9] Rohmer M. Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. Pure Appl Chem, 2003, 75(2/3): 375–388.
- [10] Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, et al. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(12): 1401–1426.
- [11] Rohmer M, Knani M, Simonin P, et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. Biochem J, 1993, 295(Pt 2): 517–524.
- [12] Schwarz KM. Terpen-biosynthese in *Ginkgo biloba*: eine Überraschende geschichte. Zurich, Switzerland: Eidgenossischen Technischen Hochschule, 1994.
- [13] Kalita R, Patar L, Shasany AK, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Centella asiatica* L. Mol Biol Rep, 2015, 42(9): 1431–1439.
- [14] Sanadze JA. Emission of organic matters by leaves of *Robinia pseudoacacia* L. Soobshch Akad Nauk Gruz SSR, 1957, 19: 83–86.
- [15] Miller B, Oschinski C, Zimmer W. First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and successful expression of the gene in *Escherichia coli*. Planta, 2001, 213(3): 483–487.
- [16] Sasaki K, Ohara K, Yazaki K. Gene expression and characterization of isoprene synthase from *Populus alba*. FEBS Lett, 2005, 579(11): 2514–2518.
- [17] Sharkey TD, Yeh S, Wiberley AE, et al. Evolution of the isoprene biosynthetic pathway in kudzu. Plant Physiol, 2005, 137(2): 700–712.
- [18] Ilmén M, Oja M, Huuskonen A, et al. Identification of novel isoprene synthases through genome mining and expression in *Escherichia coli*. Metab Eng, 2015, 31: 153–162.

- [19] Beck ZQ, Eliot AC, Peres CM, et al. Utilization of phosphoketolase in the production of mevalonate, isoprenoid precursors, and isoprene: US, 20130089906. 2013-04-11.
- [20] Hong SY, Zurbruggen AS, Melis A. Isoprene hydrocarbons production upon heterologous transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. J Appl Microbiol, 2012, 113(1): 52–65.
- [21] Hayashi Y, Harada M, Takaoka S, et al. Isoprene synthase and gene encoding the same, and method for producing isoprene monomer: US, 20140113344. 2014-04-24.
- [22] Calabria AR, Cervin MA, Chotani GK, et al. Compositions and methods for producing isoprene free of C5 hydrocarbons under decoupling conditions and/or safe operating ranges: US, 20140155660. 2014-06-05.
- [23] Berenguer JA, Calderon V, Herce MD, et al. Spoilage of a bakery product by isoprene-producing molds. Rev Agroquim Technol Aliment, 1991, 31: 580–583.
- [24] Kuzma J, Nemecek-Marshall M, Pollock WH, et al. Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. Curr Microbiol, 1995, 30(2): 97–103.
- [25] Julsing MK, Rijpkema M, Woerdenbag HJ, et al. Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of isoprene in *Bacillus subtilis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(6): 1377–1384.
- [26] Sivy TL, Shirk MC, Fall R. Isoprene synthase activity parallels fluctuations of isoprene release during growth of *Bacillus subtilis*. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294(1): 71–75.
- [27] Su SZ, Liu JZ, Yang JM, et al. Expression of isoprene synthase in *Escherichia coli* for isoprene production. Chin J Bioprocess Eng, 2011, 9(3): 6–10 (in Chinese).
苏思正, 刘建忠, 杨建明, 等. 异戊二烯合成酶 (IspS) 在大肠杆菌中的表达及其产异戊二烯的研究. 生物加工过程, 2011, 9(3): 6–10.
- [28] Albrecht M, Misawa N, Sandmann G. Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids β -carotene and zeaxanthin. Biotechnol Lett, 1999, 21(9): 791–795.
- [29] Harker M, Bramley PM. Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. FEBS Lett, 1999, 448(1): 115–119.
- [30] Wang CW, Oh MK, Liao JC. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng, 1999, 62(2): 235–241.
- [31] Rodríguez-Villalón A, Pérez-Gil J. Rodríguez-Concepción M. Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways. J Biotechnol, 2008, 135(1): 78–84.
- [32] Zhao YR, Yang JM, Qin B, et al. Biosynthesis of isoprene in *Escherichia coli* via methylerythritol phosphate (MEP) pathway. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 90(6): 1915–1922.
- [33] Bott RR, Cervin MA, Kellis Jr. JT, et al. Isoprene synthase variants for improved microbial production of isoprene: US, 8173410. 2012-05-08.
- [34] Liu M, Liu JZ, Feng HR, et al. Expression of isopentenyl diphosphate isomerase and confirmation of its catalytic effect. J Wuhan Univ Sci Technol, 2013, 36(3): 214–218 (in Chinese).
刘敏, 刘建忠, 冯红茹, 等. 异戊二烯焦磷酸异构酶的表达及其催化功能验证. 武汉科技大学学报, 2013, 36(3): 214–218.
- [35] Steinbüchel A. Production of rubber-like polymers by microorganisms. Curr Opin Microbiol, 2003, 6(3): 261–270.
- [36] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. Nat Biotechnol, 2003, 21(7): 796–802.
- [37] Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, et al. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. Metab Eng, 2007, 9(2): 193–207.
- [38] Anthony JR, Anthony LC, Nowroozi F, et al. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid

- biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpho-4, 11-diene. *Metab Eng*, 2009, 11(1): 13–19.
- [39] Redding-Johanson AM, Batth TS, Chan R, et al. Targeted proteomics for metabolic pathway optimization: application to terpene production. *Metab Eng*, 2011, 13(2): 194–203.
- [40] Ma SM, Garcia DE, Redding-Johanson AM, et al. Optimization of a heterologous mevalonate pathway through the use of variant HMG-CoA reductases. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 588–597.
- [41] Feng F, Xu Y, Tao Y, et al. Improving isoprene production by engineered heterologous mevalonate pathway in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2015, 31(7): 1073–1081 (in Chinese).
冯凡, 许杨, 陶勇, 等. 提高大肠杆菌通过 MVA 途径合成异戊二烯. *生物工程学报*, 2015, 31(7): 1073–1081.
- [42] Yoon SH, Lee SH, Das A, et al. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β -carotene in *E. coli*. *J Biotechnol*, 2009, 140(3/4): 218–226.
- [43] Yang JM, Zhao G, Sun YZ, et al. Bio-isoprene production using exogenous MVA pathway and isoprene synthase in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2012, 104: 642–647.
- [44] Yang JM, Xian M, Su SZ, et al. Enhancing production of bio-isoprene using hybrid MVA pathway and isoprene synthase in *E. coli*. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e33509.
- [45] Cervin MA, Whited GM, Chotani GK, et al. Compositions and methods for producing isoprene: US, 20090203102 A1. 2009-08-13.
- [46] Liu CL, Fan LH, Liu L, et al. Combinatorial biosynthesis of isoprene by engineering the MEP pathway in *Escherichia coli*. *Process Biochem*, 2014, 49(12): 2078–2085.
- [47] Chotani GK, Nielsen A, Sanford KJ. Reduction of carbon dioxide emission during isoprene production by fermentation: US, 20100167370 A1. 2010-07-01.
- [48] Beck ZQ, Calabria AR, Miller MC, et al. Increased isoprene production using mevalonate kinase and isoprene synthase: US, 20100184178 A1. 2010-07-22.
- [49] Vickers CE, Sabri S. Isoprene. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2015, 148: 289–317.

(本文责编 郝丽芳)