

• 工业细胞科学 •

陶勇 博士，博士生导师，研究员。1995年博士毕业于美国罗格斯大学；1995–1997年美国洛克菲勒大学 Robert Roeder 实验室博士后；1997–2010年任职于美国杜邦公司，资深研究员；2012–2015年中国科学院微生物研究所技术转移转化中心研发总监；2015年至今，中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室主任、研究员。担任中国微生物学会酶工程专业委员会副主任，以及 *Journal of Biological Engineering* 和 *Scientific Reports* 等期刊编委。主要从事以代谢工程为基础的新型生物催化剂开发与利用，在国际知名期刊 *Proc Natl Acad Sci USA*、*Metabolic Engineering* 和 *Microbial Cell Factories* 等期刊发表文章 60 余篇，申请包括 PCT 在内的专利 70 余项。



生物制造“细胞工厂”的设计与组装

刘波，陶勇

中国科学院微生物研究所，北京 100101

刘波，陶勇. 生物制造“细胞工厂”的设计与组装. 生物工程学报, 2019, 35(10): 1942–1954.

Liu B, Tao Y. Design and assembly of bio-manufacturing “cell factory”. Chin J Biotech, 2019, 35(10): 1942–1954.

摘要: 以化石资源为原料的化学品制造行业在消耗不可再生资源的同时，还对生态环境造成了破坏，这给以可再生资源为原料的生物制造带来了发展机遇。与传统化工制造不同，生物制造把细胞作为“生产车间”，“车间”内每一道工序由酶催化完成。“细胞工厂”除了反应条件温和，还具有较强的可塑性，可根据需求调整或者重构代谢途径来合成各种目标化学品。“细胞工厂”的设计过程遵循如下的准则：1) 构建一条由原料到产品的最优合成途径；2) 平衡代谢途径中每步反应的代谢流，使该途径代谢通量远高于细胞基础代谢；3) 足量地供应合成途径的前体，多个前体根据需要调整供应比例；4) 酶促反应往往有各种辅因子的参与，顺畅的代谢通路需要平衡或者再生各种辅因子；5) 通过遗传改造或者工艺改进解除产物和代谢中间体的反馈抑制，以获取更高的产量。

关键词: 生物制造，细胞工厂，设计与组装

Design and assembly of bio-manufacturing “cell factory”

Bo Liu, and Yong Tao

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

Abstract: The chemical manufacturing industry that uses fossil resources as raw materials, consumes non-renewable resources

Received: June 22, 2019; **Accepted:** August 23, 2019

Supported by: The Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. ZDRW-ZS-2016-3-1).

Corresponding author: Yong Tao. Tel/Fax: +86-10-64807419; E-mail: taoyong@im.ac.cn

中国科学院重点研究项目 (No. ZDRW-ZS-2016-3-1) 资助。

and also causes damage to the ecological environment, stimulating the development of bio-manufacturing with renewable resources as raw materials. Unlike traditional chemical manufacturing, bio-manufacturing uses cells as a “production workshop”, and each process in the “workshop” is catalyzed by enzymes. In addition to mild reaction conditions, the “cell factory” has strong plasticity, and can be used to synthesize various target chemicals according to demand adjustment or reconstitution of metabolic pathways. The design process of the “cell factory” follows the following guidelines: 1) Construct an optimal synthetic route from raw materials to products; 2) Balance the metabolic flux of each reaction in the metabolic pathway, so that the metabolic flux of this pathway is much higher than the primary metabolism of the cells; 3) Precursor supply in the pathway should be sufficient, and adjust multiple precursors supply ratio as needed; 4) enzymatic reactions often involve the participation of various cofactors, smooth metabolic pathways need to balance or regenerate various cofactors; 5) Through genetic modification or process improvement to remove metabolic intermediates and products feedback inhibition to achieve higher yields.

Keywords: bio-manufacturing, cell factory, design and assembly

作为一种原料可再生和环境友好型的生产方式,生物制造得到了越来越多的关注和研发投入,生物制造可利用诸如淀粉、木质纤维素和油脂等生物质资源合成能源化学品和平台化合物。早在20世纪早期,由于市场对丙酮和丁醇等化学品有强烈的需求,从而促进了 ABE (Acetone-butanol-ethanol) 发酵的发展。1916年以丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* 为宿主的 ABE 发酵首次实现了工业化生产^[1,2],至20世纪中期,采用 ABE 发酵生产方式大约占66%的丁醇和10%的丙酮的市场份额^[8],随着石油化工的迅速发展,ABE 发酵的生产方式已不具备成本优势,逐渐被石油化工替代。当前,出于对资源短缺和环境问题的考虑,以及得益于代谢工程的发展,ABE 发酵重新得到重视,代谢工程改造的菌株以葡萄糖为原料生产丁醇的生产强度达到了 10.7 g/(L·h)^[4-5],据估算当前丁醇生物制造的成本根据原料的不同大约为 0.8 至 2 美元每千克^[6],在不久的将来有可能实现工业化应用。生物制造丁醇的发展经历了一百多年,从 ABE 发酵的建立与工业化应用,到被石油化工生产所替代,再到如今重新得到重视,生产成本一直是影响生物制造工业化应用的关键因素。作为生物制造的核心,细胞工厂(菌株)的性能决定着产品生物合成的生产强度、效价和转化率等,这些指标又直接影响着产品的发酵成本和提取成本。因此高效率细胞工厂的设计与组装

是生物制造实现工业化应用的前提与关键。在本文,我们结合当前常用的代谢工程改造策略以及实例,阐述在细胞工厂设计和组装中所要遵循的一些准则。

1 途径设计

与石化工厂中某个化学品单一的生产线不同,细胞工厂是一个多种化合物和生化反应共存的混合体,所有这些化合物组成一个复杂的代谢网络,它的本能是满足细胞自身的生存和分裂。要在这么复杂的体系中合成目标化学品,首先需要设计一条最优的合成途径。途径设计有两种方法,一种是基于已知的生化反应途径进行设计,这方面有许多可供参考的数据库,例如综合了基因、酶、化合物、生化反应和代谢途径的 KEGG 数据库^[20],以生化反应数据为基础的 BRENDA 数据库^[32],以及整理了各种生物基因的功能与调控的数据库 Metacyc^[3]等;另一种是在已有认知的基础上,通过建立代谢网络模型,进行合理的推测,该方法主要应用于新合成途径的设计与构建。目前已有许多模型建立,例如 RDM 方法^[28]、PPS 系统结合 UMBBD 数据库^[17]和 BNICE 框架结合 ATLAS 数据库^[10,13]等。所有这些方法均通过设定一些规则来计算得到新的反应和代谢途径,其中 PPS 系统是基于已知的生化反应数据库来演算,其生化反应的预测规则存在局限;RDM 与上述方法则不同,它基于化合物

的分子结构进行推演,结果具有更广泛的预测性,但可靠度有所降低;同样是基于已有的数据库来演算, BNICE 框架采取了多样性的规则来囊括已有的生化反应和预测新的生化反应,从而使其能够更加有效地预测新的生化反应和代谢途径。

以 3-羟基丙酸的途径设计为例, Henry 等^[15]采用 BNICE 框架以丙酮酸为出发前体进行推演,不仅重现了已知的合成途径(图 1A),还成功地预测了若干新的合成途径(图 1B)。以丙酮酸为出发前体,已知的合成途径中,无论是经过 Malonyl-CoA、 β -丙氨酸中间体,亦或者是 Acryloyl-CoA 中间体,合成途径至少需要四步酶催化,而采用 BNICE 框架预测的代谢途径最短可由两步反应完成。假设 n 步生化反应的代谢途径中某一步生化反应的实际摩尔转化率为 Y_n ,那么由原料至终产品的实际转化率 $Y=Y_1 \cdot Y_2 \cdot Y_3 \cdot \dots \cdot Y_n$,由于 $Y_n \leq 1$,那么代谢途径越长,实际可实现的转化率越低,也就暗示生产成本越高,而途径越短实际转化率提升的难度也就越小,因此在化学

品合成的途径设计中,应尽可能地选择较短的合成途径,但这一原则并非一成不变的,因为有些较短的合成途径从热力学上来讲并非是有利的。

采用 eQuilibrator 来计算图 1B 中两步反应和三步反应的标准吉布斯自由能变 (ΔG° , equilibrator.weizmann.ac.il)^[11],经乳酸的两步反应途径 $\Delta G^\circ = +29.6$ kJ/mol,经草酰乙酸的三步反应途径 $\Delta G^\circ = -10.1$ kJ/mol。虽然丙酮酸和 3-羟基丙酸之间转化的 $\Delta G^\circ = +29.5$ kJ/mol,但是由于代谢途径不同,所以整体上的能量变化也有所差异。因此从计算的角度来讲经草酰乙酸中间体合成 3-羟基丙酸的途径具有较大的优势,新设计的代谢途径需要新的生化反应才能实现,该三步反应代谢途径中,催化草酰乙酸至丙二酸半醛的反应理论上存在,但至今仍未被发现,未来或许可通过新酶设计等手段实现该代谢途径。总体上来讲,代谢途径的设计要依次考虑途径中的生化反应数量、热力学可行性以及生化反应实际的可执行性。

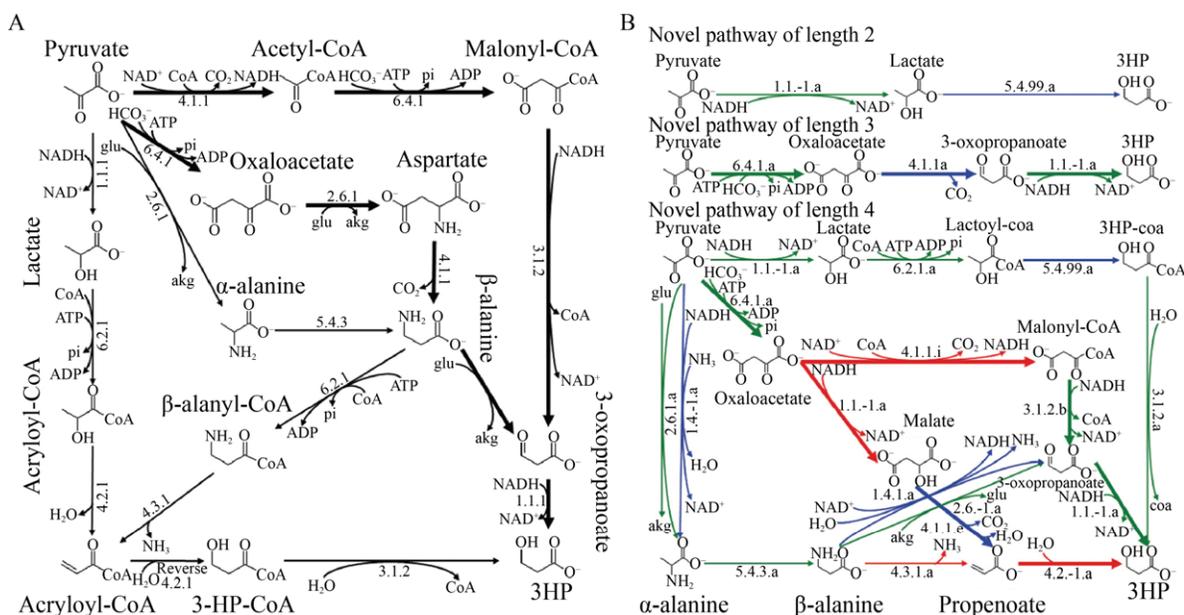


图 1 3-羟基丙酸的生物合成途径^[15]

Fig. 1 Biosynthesis pathways of 3-hydroxypropionic acid^[15]. (A) Known synthetic pathway. (B) Predicted synthetic pathway. The most thermodynamically favorable pathways are highlighted in bold.

2 代谢流平衡

生物依赖初级代谢来合成胞内各种前体化合物和提供能量,用于维持细胞的生存和分裂,对于微生物来说,过多的合成氨基酸、有机酸和某种蛋白等并不利于其生存,生物可通过调控基因的表达和酶的催化活力来控制碳代谢流分布,使其在诸如糖酵解、三羧酸(TCA)循环和磷酸戊糖途径等初级代谢中的比例处于最有利于生长的状态,这也被称作是“初级代谢网络的刚性”^[34],当目标化学品为参与初级代谢的化合物时,细胞工厂的构建就无法避免地要考虑初级代谢和化学品合成途径间的平衡,初级代谢的刚性会使改造存在一定困难。例如2015年Song等^[33]改造大肠杆菌合成β-丙氨酸过程中发现,单纯过表达来源于大肠杆菌的天冬氨酸脱羧酶PanD,并没有检测到β-丙氨酸的生成,因此他们对初级代谢途径进行了一系列的改造,包括敲除乙醛酸途径负调控因子

基因*iclR*和延胡索酸酶基因*fumABC*,此时仍未检测到β-丙氨酸的生成,直至他们过表达天冬氨酸合酶AspA,才检测到了0.855 g/L的β-丙氨酸。由此可见初级代谢网络具有较强的刚性,碳代谢流的分布对目标化合物产量的提升有较大的影响,随后他们采用不同强度过表达的PEP羧化酶(由*ppc*基因编码),将碳代谢流尽可能地引向L-天冬氨酸,最终可合成3.94 g/L的β-丙氨酸(图2)。

在细胞工厂的构建过程中,除了要考虑基础代谢与合成途径的平衡,合成途径中的每一步反应也需要优化与调整,以防止某一中间体过多的积累,对细胞产生负面的影响。2003年Jay D Keasling实验室首次公开报道了在大肠杆菌中构建外源MVA途径(甲羟戊酸类异戊二烯合成途径),通过将外源基因引入大肠杆菌,他们成功地构建了一条由七步生化反应组成的DMAPP合成途径,并以此为基础合成了青蒿素的前体化合物紫穗槐二烯(图3)。他们对该菌株进行分析后发现:

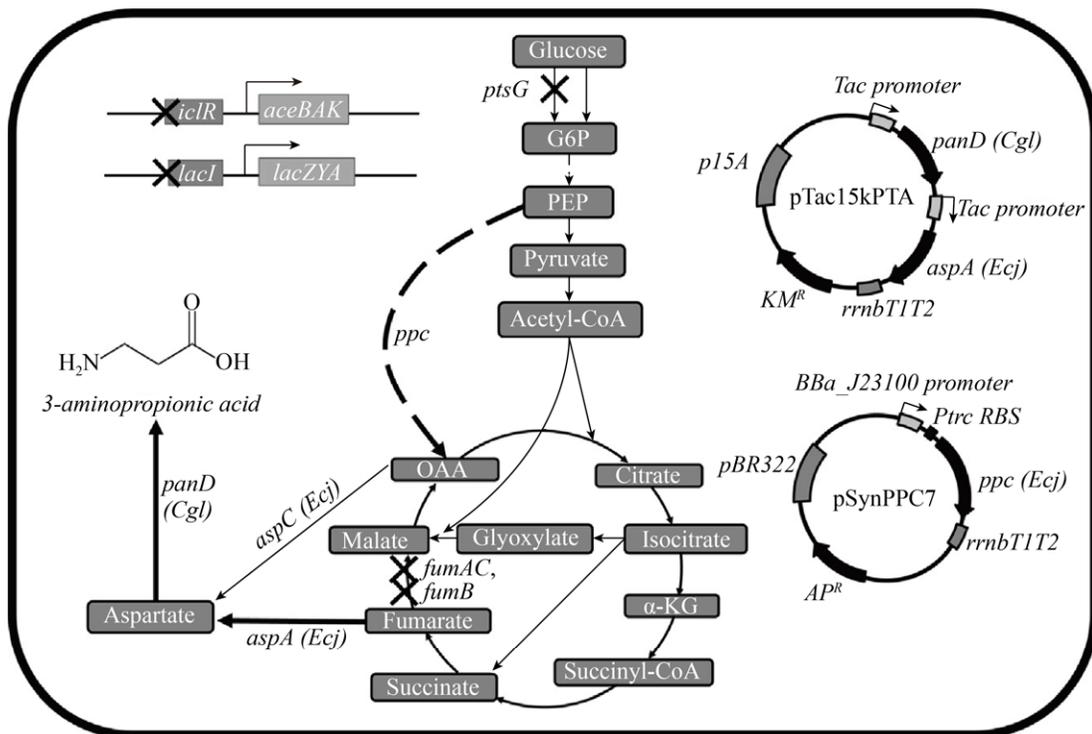


图2 β-丙氨酸生物合成途径^[33]

Fig. 2 The biosynthesis pathway designed for the production of β-alanine^[33].

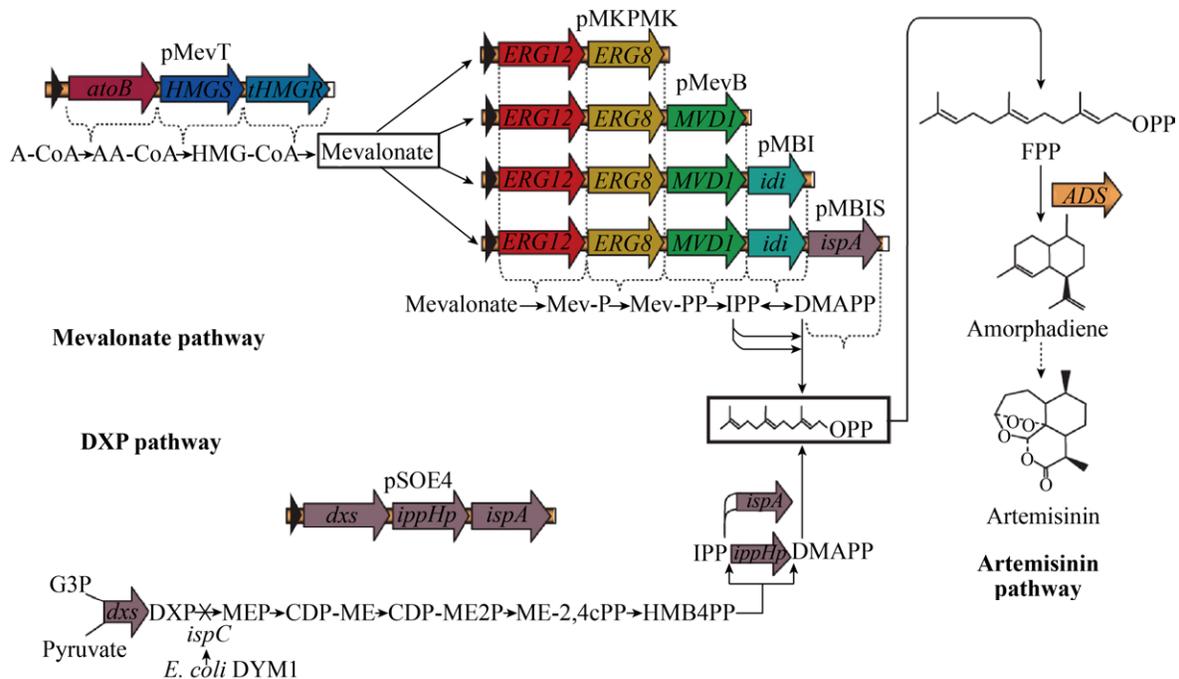


图3 MVA或MEP途径合成DMAPP及紫穗槐二烯^[12]

Fig. 3 Production of amorphaadiene and DMAPP via the MVA (mevalonate isoprenoid) or MEP (DXP) pathways^[12].

1) 途径中代谢中间体的积累限制合成途径通量的提升; 2) 过表达 MVA 途径中的酶会抑制大肠杆菌的生长^[29]。通过 LC/GC-MS 和实验设计分析胞内化合物含量后发现, HMG-CoA 的积累导致大肠杆菌生长被抑制, 这可能是由于 HMG-CoA 影响了脂肪酸的合成; 此外细胞中某一基础代谢中间体过度的消耗会竞争细胞生长的资源, 同时也有可能引发细胞对过多外源蛋白产生压力响应机制^[14], 正如 Pitera 等所发现的, MVA 途径的不平衡, 导致中间体和副产物的积累, 进而抑制了途径中酶的活力以及对细胞产生了毒性, 使得终产物难以高效率地合成, 在他们的实验中, 提高 tHMGR 的表达量即可解除 HMG-CoA 对细胞的毒性。2009 年 Jay D Keasling 团队通过代谢通路分析、阻断代谢旁路、消除有毒中间体积累、基因密码子优化和提高限速酶活力等手段, 使 MVA 途径的代谢流更为畅通, 并将紫穗槐二烯的产量提高了 7 倍^[12]。

随着合成生物学技术的发展, 许多新的调控

手段被应用于代谢工程改造。为了使细胞在不同时期更好地分配资源, 以满足生长与生产的需求, 以传感-调控系统 (Sensor-regulator system) 为基础的动态调控手段已被应用于“细胞工厂”的构建, 该调控方式以代谢物响应的转录因子为基本的工具, 可构建一套自适应和自主控制的系统, 缩减成本同时提高目标化合物的产量^[38]。此外群感效应 (Quorum sensing, QS) 由于在微生物群体中广泛存在, 并且在调控群体生物学功能中有重要作用, 也被应用于代谢工程改造。2016 年, Sun 等对肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 响应信号分子呋喃酰硼酸二酯 (Furanosyl borate diester, AI-2) 的群感响应系统进行了研究, 该群感响应系统在次级代谢产物积累方面扮演着重要角色。他们通过敲除基因 *luxS* 以阻断该群感响应系统, 降低了副产物羟基丁酮、乙醇和乙酸的含量, 同时使 2,3-丁二醇的产量提高了 23.8%, 达到了 54.93 g/L^[35]。

3 前体供应

即便是合成途径代谢流很通畅,有时目标化学品的产量仍难以提升,这时需考虑化学品的合成前体是否得到了足量的供应。与丙酮酸和 Acetyl-CoA 等容易从葡萄糖快速获得的中间体不同,一些化合物合成中间体需要经过特别的优化才能得到足够的供应,例如聚酮和黄酮类化合物合成前体 Malonyl-CoA, 需要由 Acetyl-CoA 经过 CO₂ 固定的羧化反应获得,在大肠杆菌胞内 Malonyl-CoA 被维持在很低的水平^[36],对聚酮化合物的生物制造来讲是一种障碍。Huimin Zhao 实验室曾对大肠杆菌的 Malonyl-CoA 供应进行了系统性地改造(图 4),研究人员首先过表达了 Acetyl-CoA 羧化酶基因 *acc*,使 Malonyl-CoA 的胞内含量提高了 3 倍,进而敲除了 *ackA*、*pta* 和 *adhE* 基因,同时过表达了 *acs* 和 *fabF* 基因,以增加 Acetyl-CoA 的供应和削弱 Malonyl-CoA 代谢旁路,最终使得 Malonyl-CoA 的胞内含量提高了 15 倍,这一系列的改造使间苯三酚的产量大幅度提升了 4 倍^[40]。

化学品合成前体不仅需要足量的供应,对于

需要多个前体的合成途径,不同前体需要协同供应才能使途径更顺畅。B1a 是阿维菌素中最为有效的组分,一分子 B1a 母核的合成需要以一分子的 Methylbutanoyl-CoA (甲基丁酰 CoA) 为起始单元,同时还需要 5 分子的 Methylmalonyl-CoA (甲基丙二酸单酰 CoA) 和 7 分子的 Malonyl-CoA (丙二酸单酰 CoA) 为延伸单元^[19,39],上述 3 种代谢中间体以 1:5:7 比例聚合成糖苷配基,进而形成 B1a 母核。虽然至今尚未在大肠杆菌中实现阿维菌素的异源合成,但有许多工作已经为其异源合成作了前体供应的准备。2017 年 Cui 等尝试在大肠杆菌中过表达来源于阿维链霉菌的支链 α -酮酸脱氢酶复合体,同时强化异亮氨酸的合成途径,调整部分碳代谢通路(图 5A),以提供 Methylbutanoyl-CoA、Malonyl-CoA 和 Methylmalonyl-CoA,得到的工程菌株 Methylbutanoyl-CoA 含量提升了 632 倍, Malonyl-CoA 含量提升了 13 倍, Methylmalonyl-CoA 含量提升了 7.5 倍,此外还能使大肠杆菌合成 Isovaleryl-CoA,为阿维菌素及其他聚酮化合物的异源合成奠定了基础。在此工程菌株的基础上,他们构建了同样需要协同两个前体的 PIVP (3-甲

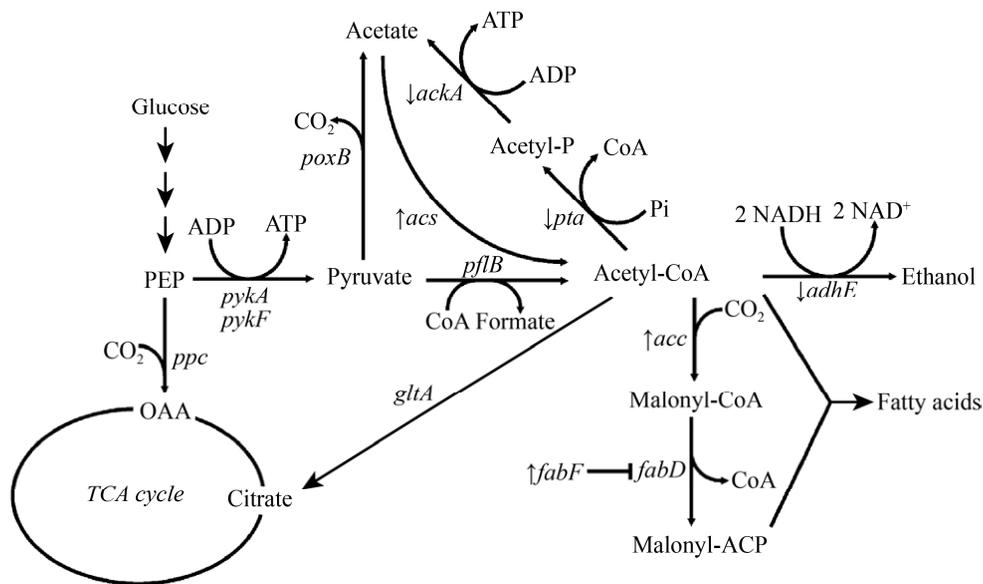


图 4 大肠杆菌中心代谢图^[40]

Fig. 4 Scheme of central metabolism in *E. coli*. Genes knocked out (↓) and overexpressed (↑) are noted^[40].

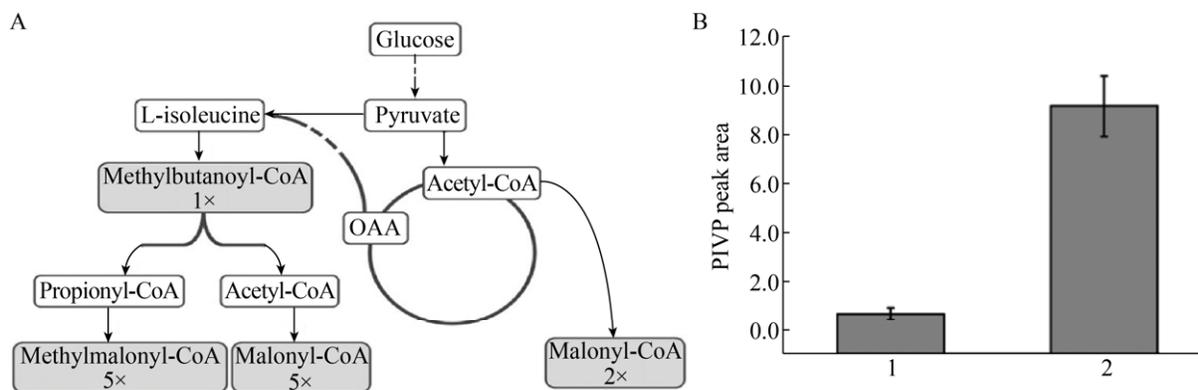


图5 阿维菌素前体的协同合成途径(A)以及3-甲基-异丁酰间苯三酚产量^[19](B)

Fig. 5 Synergistic synthesis pathway of avermectin precursors (A) and Phlorisovalerophenone (PIVP) production^[19] (B).

基-异丁酰间苯三酚)合成途径,一分子该化合物的合成需要一分子的 Isovaleryl-CoA 和 3 分子的 Malonyl-CoA,优化多种前体供应可使 PIVP 产量大幅度提升了 13.9 倍(图 5B)。

4 NAD(P)H 等辅因子的再生与平衡

在化学品的生物制造中,理想的状态是细胞工厂以最大的速率将碳流引向目标化学品,且在此过程中包括还原力在内的辅因子维持一个相对平衡的状态。由于一条完整的代谢途径往往伴随着还原力的消耗或释放,虽然维持胞内还原力平衡是细胞的基本需求之一^[18],但在细胞工厂中,单纯依赖细胞自身调节是很难维持这种平衡状态的,需要人为地进行干预。作为胞内最重要的辅因子之一,FAD(H₂)、NAD(P)⁺和 NAD(P)H 既可作为氧化反应的电子受体,又可作为还原反应的推动力,在细胞代谢中扮演者重要的角色。以酿酒酵母为例,胞内 NADH/NADPH 含量是影响酿酒酵母发酵产物的主要因素,Heux 等将来源于乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 的 NADH 氧化酶(生成水)引入酿酒酵母,使 NADH 的胞内浓度下降了 5 倍,NADH/NAD⁺的比率下降了 6 倍,结果使乙醇、甘油和丁二酸的产量急剧下降,相应的

具有更高氧化态的化合物如丁二酮、乙醛和乙酸有了更多的积累^[16]。类似的例子还有乳酸菌的发酵,de Felipe 等将 NADH 氧化酶引入乳酸乳杆菌后,菌株从单纯的乳酸发酵变成了混合酸发酵,更有利于多种其他化学品的合成^[25]。由此可见,细胞的氧化还原平衡状态决定了碳代谢流的方向,对于有过多还原力释放的代谢途径,过表达 NADH 氧化酶是一种必然的选择。

而对于合成途径需要大量 NADPH 的途径,需要加强 NADH 向 NADPH 转换,2017 年 Qiao 等构建了 13 株解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica*,将糖酵解过程产生的 NADH 转变为 NADPH,用于脂肪酸甲酯的合成,最终使脂肪酸甲酯的生产强度提高至 1.2 g/(L·h),转化率达到 0.27 g 脂肪酸甲酯/g 葡萄糖,相比改造之前提高了 25%^[30]。同样地,Liu 等在大肠杆菌中通过敲除基因 *sthA* 和加强 *pntAB*,使脂肪酸 β -氧化得到的 NADH 转变为 NADPH,使大肠杆菌用脂肪酸产 3-羟基丙酸的产量提高至 3.29 g/L,提高了 55%^[22]。

对于某些消耗还原力的代谢途径,还原力再生与循环成为提高目标化合物产量与转化率的关键。自然界中存在许多厌氧发酵生物可将甘油还原为 1,3-丙二醇,然而每合成 1 分子的 1,3-丙二

醇需要消耗 1 分子的 NADH，在厌氧的生物催化中，只能通过将甘油降解至乙酸来提供还原力(图 6A)，一方面产生了大量的副产物，另一方面 1,3-丙二醇的生产强度、效价和转化率均存在瓶颈，再加上高昂的原料价格成本，这种生产方式并不具备市场竞争力^[26]，因此有人提出外加葡萄糖补充还原力，但是在厌氧发酵条件下这种策略会进一步增加副产物的生成。为了解决 1,3-丙二醇发酵时所面临的还原力困境，杜邦 (DuPont) 和杰能科 (Genencor) 在以葡萄糖为原料好氧条件下合成 1,3-丙二醇方面进行了大量的研发投入。研究人员首先对大肠杆菌进行一系列的改造使 50% 的碳流向 1,3-丙二醇的合成，剩余 50% 的碳流向 TCA 循环(图 6B1)，以提供更多的还原力。在好氧条件下，他们史无前例地以葡萄糖为碳源合成了高达 130 g/L 的 1,3-丙二醇，远高于甘油转化路线的 78 g/L，在这种 *tpi* 阻断的前提下，质量转化率达到近 40% (此途径的理论转化率为 42.5%)，此后他们进一步优化了糖摄入方式，以便更有效地提供 PEP (磷酸烯醇式丙酮酸)，并

且将部分流向 TCA 循环的碳引流至 1,3-丙二醇和合成途径，最终在 10 L 发酵罐中合成了 135 g/L 的 1,3-丙二醇，转化率达到 51%^[9]，成功实现了生物制造 1,3-丙二醇的工业化生产。在合成途径中还原力供应不足的情况下，可适量“燃烧”部分碳源来换取足量的还原力供给，以保证代谢途径的顺畅。

在有些代谢途径中，虽然从等式上来看还原力是不平衡的，但从还原力当量上是平衡的，例如以 L-苯基丙氨酸为原料生物催化合成 L-苯基乙醇的途径中，既有消耗 α -酮戊二酸生成 L-谷氨酸的反应，又有消耗 NADPH 的反应，Wang 等将这两步反应偶联起来，构建了代谢途径内的辅因子自平衡系统(图 7)，使催化效率提高了 3.8 倍^[37]。

除了上述 NAD(P)H 的再生影响代谢途径的顺畅进行，诸如维生素 B6 (各种转氨酶依赖辅因子)、维生素 B12 (甘油脱水酶依赖辅因子) 和生物素 (羧化酶依赖辅因子) 等辅因子对某些关键反应步骤也有较大的影响，在代谢途径限制靶点分析时应给予重视。

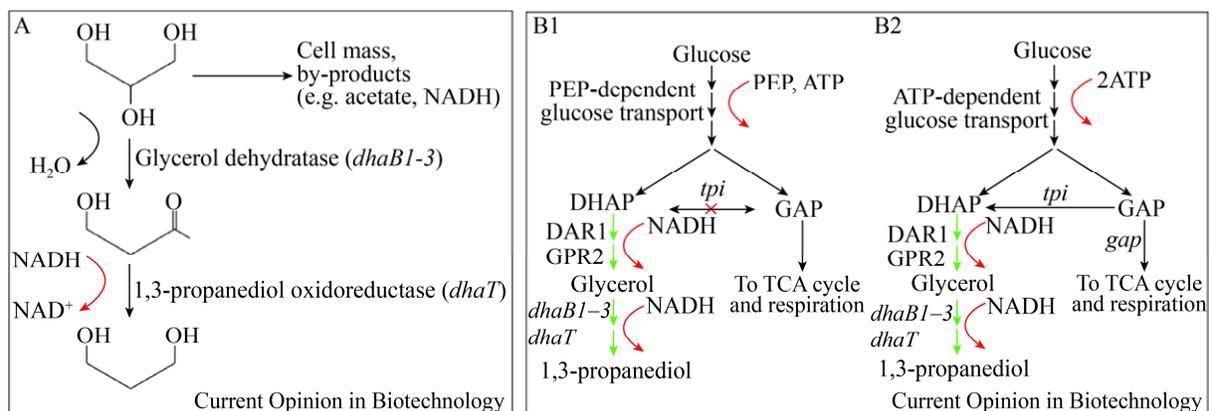


图 6 以葡萄糖或甘油为原料合成 1,3-丙二醇代谢途径 (A: 自然界中 1,3-丙二醇合成途径; B: 代谢工程以葡萄糖为原料合成 1,3-丙二醇^[26])

Fig. 6 Engineering metabolic pathways from D-glucose and glycerol to 1,3-propanediol. (A) 1,3-Propanediol production by natural organisms. (B) Engineering metabolic pathways from D-glucose to 1,3-propanediol^[26].

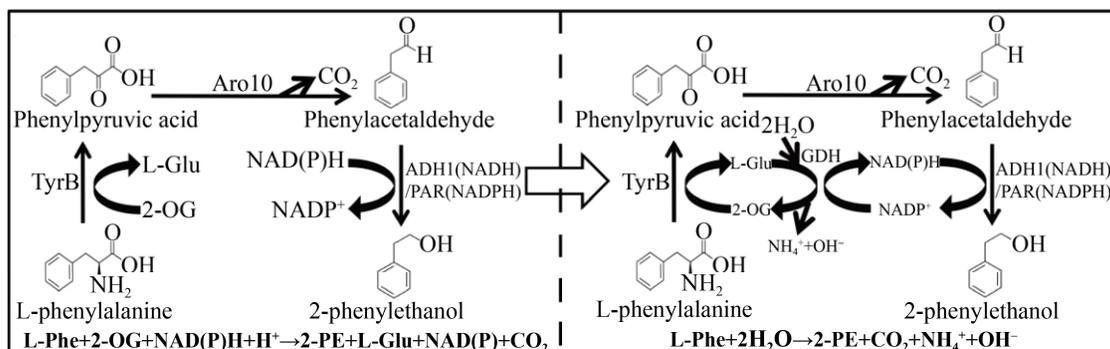


图7 辅因子自平衡转化 L-苯基丙氨酸合成 2-苯基乙醇的代谢工程^[37]

Fig. 7 Metabolic engineering for the cofactor self-sufficient bioconversion of L-Phenylalanine to produce 2-Phenylethanol^[37].

5 产物的反馈抑制与毒性

自然存在的代谢途径普遍受到负反馈调节的抑制，因为生物要维持胞内各种化合物的相对稳定，防止某一化合物的过度合成而消耗太多资源^[34]。例如在辅酶 A 合成途径中泛酸激酶 CoaA 的活性受到胞内 CoA 含量的调控，当胞内 CoA 含量升高时，泛酸激酶的活性几乎完全丧失，以维持胞内 CoA 含量的相对稳定^[31]。这种现象对生物制造来讲是非常不利的，因为细胞工厂的主要目的就是原料尽可能地转化为单一目标化合物，因此在途径设计、构建与优化的基础上，为了得到较高的效价，需解除代谢途径中的反馈抑制。一般来讲，反馈抑制往往是终产物或代谢中间体对途径中某个酶的酶活有抑制作用。对于抑制作用较弱的途径，可通过不断地分离终产物来解除抑制作用；而对于产物抑制作用很强的途径，可通过酶的定向进化与筛选来解除抑制，例如泛酸激酶 CoaA 的突变体 F247V 的酶活力几乎完全不受 CoA 浓度的影响^[31]。

氨基酸是一大类重要的生物制造目标化学品，由于其代谢途径通常受到严格的调控，在合成氨基酸的细胞工厂构建过程中，调控是首先要解决的问题。比较典型的例子是苏氨酸的生物合

成，该途径中不仅天冬氨酸激酶 I 和 III 分别受到苏氨酸和赖氨酸的别构抑制，此外苏氨酸和异亮氨酸还能使操纵子 *thrABC* 衰减表达^[23]。Lee 等在大肠杆菌中对 L-苏氨酸合成途径进行了系统性地改造（图 8），它们首先解决了 L-苏氨酸反馈抑制的问题，通过在天冬氨酸激酶 I (ThrA) 和 III (LysC) 中引入点突变，解除了氨基酸的别构反馈抑制；将 *thrABC* 操纵子的启动子更换为不受调控的 *tac* 启动子，以解除该操纵子的衰减效果，同时提高途径中酶的表达量；更进一步地，他们过表达了苏氨酸转运蛋白，尽可能降低了胞内苏氨酸的含量，以削弱反馈抑制的影响。最终他们可以利用葡萄糖合成 82.4 g/L 的苏氨酸，质量转化率为 0.393 g/g 葡萄糖^[21]。

除了代谢途径终产物会产生反馈抑制，代谢中间体或者副产物有时也存在反馈抑制。前文中我们提到的以甘油为原料合成 1,3-丙二醇的途径中，往往伴随着丙酮醛和甘油-3-磷酸的积累，这些化合物的积累一方面对细胞产生了毒性，另一方面抑制了关键酶活力，Marie 等分别阻断了上述两个副产物的合成途径，使 1,3-丙二醇的产量分别提升了 50% 和 250%^[41-42]。产物的反馈抑制与毒性问题的解决，对于构建高效价化学品合成的细胞工厂来说尤为重要。

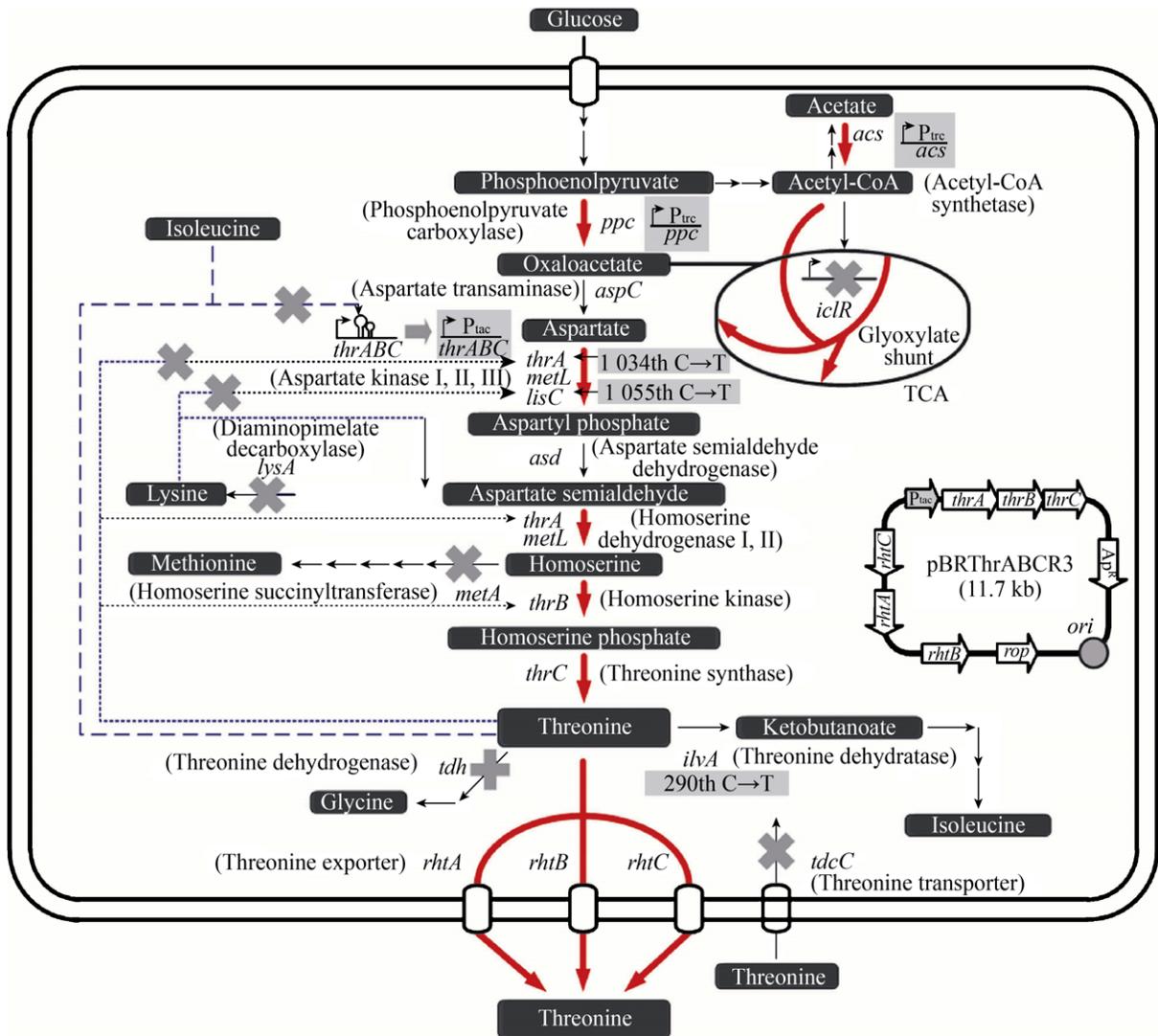


图 8 产苏氨酸大肠杆菌代谢工程改造策略

Fig. 8 Metabolic engineering strategies employed for the development of Thr-overproducing *E. coli* strain.

6 总结与展望

高效率细胞工厂的构建综合了计量化学、计算机模拟和生物技术等学科，尤其是当前合成生物技术的发展，使改造生命体为人类服务成为可能。在细胞工厂的设计与组装过程中，不仅需要通过计量化学来评估代谢途径的可行性，还需要计算机模拟等工具优化和设计更为高效的合成途

径以及合成元件，在此基础上通过生物技术对合成模块进行组装和微调，使代谢途径中的前体得到充足的供应、代谢流顺畅、辅因子平衡和反馈抑制解除，进而得到高效合成目标化学品的细胞工厂（图 9）。随着合成生物技术的进步，将会有许多表达元件与调控手段被开发，这些工具也将逐步被应用于人工合成“细胞工厂”的构建与优化。

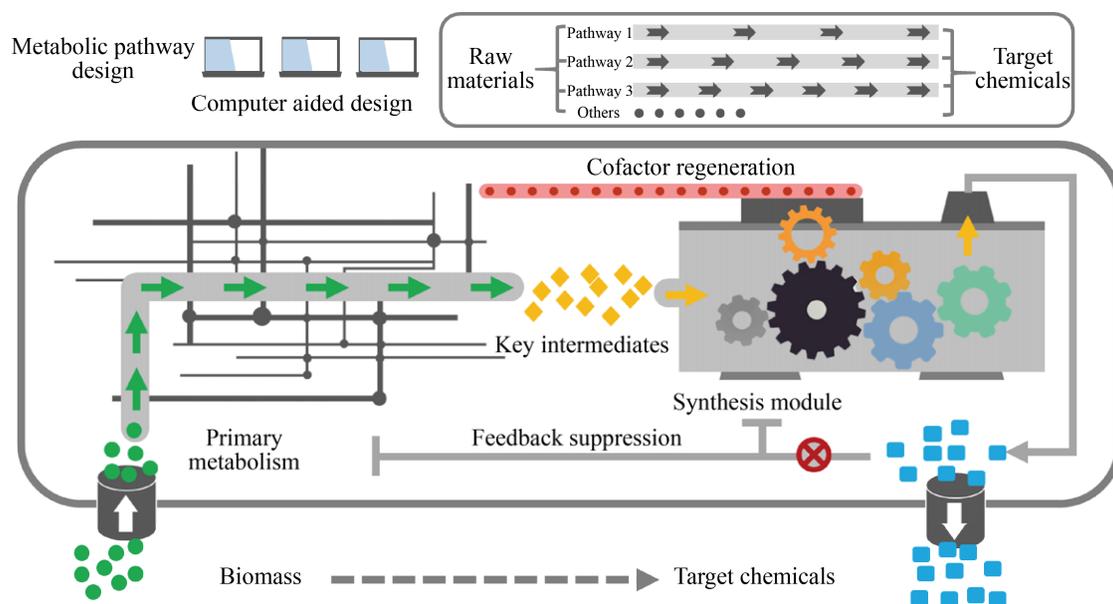


图9 生物制造“细胞工厂”的设计与组装

Fig. 9 Design and assembly of bio-manufacturing “cell factory”.

REFERENCES

- [1] Beesch SC. Acetone-butanol fermentation of sugars. *Ind Eng Chem*, 1952, 44(7): 1677–1682.
- [2] IGabriel CL. Butanol fermentation process. *Ind Eng Chem*, 1928, 20(10): 1063–1067.
- [3] Caspi R, Foerster H, Fulcher CA, et al. MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(S1): D511–D516.
- [4] Jang YS, Lee JY, Lee J, et al. Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*. *mBio*, 2012, 3(5): e00314–12.
- [5] Jang YS, Woo HM, Im JA, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for enhanced production of butyric acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(21): 9355–9363.
- [6] Moon HG, Jang YS, Cho C, et al. One hundred years of clostridial butanol fermentation. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(3): fnw001.
- [7] 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.
- [8] Dürre P. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1125(1): 353–362.
- [9] Emptage M, Haynie SL, Laffend LA, et al. Process for the biological production of 1,3-propanediol with high titer: US, 6514733. 2003-02-04.
- [10] Finley SD, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V. Computational framework for predictive biodegradation. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(6): 1086–1097.
- [11] Flamholz A, Noor E, Bar-Even A, et al. eQuilibrator—the biochemical thermodynamics calculator. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(D1): D770–D775.
- [12] 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 amorpha-4,11-diene. *Metab Eng*, 2009, 11(1): 13–19.
- [13] Hadadi N, Hafner J, Shajkofci A, et al. ATLAS of biochemistry: a repository of all possible

- biochemical reactions for synthetic biology and metabolic engineering studies. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(10): 1155–1166.
- [14] Harcum SW, Bentley WE. Heat-shock and stringent responses have overlapping protease activity in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, 80(1): 23–37.
- [15] Henry CS, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V. Discovery and analysis of novel metabolic pathways for the biosynthesis of industrial chemicals: 3-hydroxypropanoate. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(3): 462–473.
- [16] 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.
- [17] Hou BK, Ellis LBM, Wackett LP. Encoding microbial metabolic logic: predicting biodegradation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2004, 31(6): 261–272.
- [18] Chen XL, Li SB, Liu LM. Engineering redox balance through cofactor systems. *Trends Biotechnol*, 2014, 32(6): 337–343.
- [19] Cui QQ, Zhou FL, Liu WF, et al. Avermectin biosynthesis: stable functional expression of branched chain α -keto acid dehydrogenase complex from *Streptomyces avermitilis* in *Escherichia coli* by selectively regulating individual subunit gene expression. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(10): 1567–1574.
- [20] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, et al. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 42–46.
- [21] Lee KH, Park JH, Kim TY, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol Syst Biol*, 2007, 3(1): 149.
- [22] Liu B, Xiang SM, Zhao G, et al. Efficient production of 3-hydroxypropionate from fatty acids feedstock in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2019, 51: 121–130.
- [23] Lynn SP, Gardner JF, Reznikoff WS. Attenuation regulation in the thr operon of *Escherichia coli* K-12: molecular cloning and transcription of the controlling region. *J Bacteriol*, 1982, 152(1): 363–371.
- [24] 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.
- [25] Lopez de Felipe F, Kleerebezem M, de Vos WM, et al. Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *J Bacteriol*, 1998, 180(15): 3804–3808.
- [26] Nakamura CE, Whited GM. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(5): 454–459.
- [27] Ogata H, Goto S, Sato K, et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 29–34.
- [28] Oh M, Yamada T, Hattori M, et al. Systematic analysis of enzyme-catalyzed reaction patterns and prediction of microbial biodegradation pathways. *J Chem Inf Model*, 2007, 47(4): 1702–1712.
- [29] 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.
- [30] Qiao KJ, Wasylenko TM, Zhou K, et al. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(2): 173–177.
- [31] Rock CO, Park HW, Jackowski S. Role of feedback regulation of pantothenate kinase (CoaA) in control of coenzyme A levels in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2003, 185(11): 3410–3415.
- [32] Schomburg I, Chang A, Hofmann O, et al. BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(1): 54–56.
- [33] Song CW, Lee J, Ko YS, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 3-aminopropionic acid. *Metab Eng*, 2015, 30: 121–129.
- [34] Stephanopoulos G, Vallino JJ. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, 1991, 252(5013): 1675–1681.
- [35] Sun SJ, Zhang HY, Lu SY, et al. The metabolic flux

- regulation of *Klebsiella pneumoniae* based on quorum sensing system. *Sci Rep*, 2016, 6: 38725.
- [36] Takamura Y, Nomura G. Changes in the intracellular concentration of acetyl-CoA and malonyl-CoA in relation to the carbon and energy metabolism of *Escherichia coli* K12. *Microbiology*, 1988, 134(8): 2249–2253.
- [37] Wang PC, Yang XW, Lin BX, et al. Cofactor self-sufficient whole-cell biocatalysts for the production of 2-phenylethanol. *Metab Eng*, 2017, 44: 143–149.
- [38] Xu P. Production of chemicals using dynamic control of metabolic fluxes. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 53: 12–19.
- [39] Yoon YJ, Kim ES, Hwang YS, et al. Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63(6): 626–634.
- [40] Zha WJ, Rubin-Pitel SB, Shao ZY, et al. Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering. *Metab Eng*, 2009, 11(3): 192–198.
- [41] Zhu MM, Lawman PD, Cameron DC. Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of *sn*-glycerol-3-phosphate. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(4): 694–699.
- [42] Zhu MM, Skraly FA, Cameron DC. Accumulation of methylglyoxal in anaerobically grown *Escherichia coli* and its detoxification by expression of the *Pseudomonas putida* glyoxalase I gene. *Metab Eng*, 2001, 3(3): 218–225.

(本文责编 郝丽芳)