重组大肠杆菌的发酵与代谢工程

张惟材　朱厚础

(军事医学科学院生物工程研究所　北京 100071)

关键词　高密度发酵,代谢工程,乙酸

分类号　Q936 **文献识别码**　C **文章编号**　0253 2654(1999)-04-0289-05

在工程菌的发酵中,外源基因高表达条件下的高密度发酵对于提高生产效率、降低生产成本、简化产品纯化工艺以及降低扩大生产投资都具有非常重要的意义。然而在大肠杆菌的高密度发酵中遇到了许多困难[1],其中主要包括有机酸类代谢副产物累积并抑制细菌自身生长、供氧限制和外源基因高表达引起宿主细胞生理负担过重等问题。对此,国内外学者作了许多有意义的探索。应用代谢工程技术对工程菌进行改良,使之有利于外源基因的高表达及高密度发酵,是一项很有应用前景的研究课题,引起了广泛关注。本文拟对近年来有关应用代谢工程改良重组大肠杆菌的一些研究工作简要加以综述,其中主要涉及通过代谢工程减少副产物乙酸的水平及优化代谢系统以实现高密度发酵的有关工作。

大肠杆菌对糖类的摄取是通过所谓基团转移的方式进行的,大肠杆菌对糖类的转运能力很强,而且在糖进入细胞的同时,糖酵解作用就已经开始了,使得大量的碳代谢流涌入细胞。由于大肠杆菌的氧化磷酸化和三羧酸循环的能力有限,造成碳代谢流在糖酵解途径中过量[2]。大肠杆菌主要通过分泌部分氧化的副产物使碳代谢流得到平衡,而乙酸就是其中的主要副产物。一般,大肠杆菌可将来自葡萄糖碳代谢流的 10%～30% 转化为乙酸[3]。由于产生一分子乙酸的同时有一分子的 ATP 产生,成为细胞产生乙酸的优势所在。然而基质中乙酸浓度过高对生物产能具有抑制作用,最终将导致细胞生长停滞。此外,许多研究者还发现,乙酸的浓度超过 1.0～1.5g / L 时重组外源基因的表达会大幅度降低,因而乙酸的累积对于重组蛋白质的生产更为不利。

对于乙酸的产生可以在工艺水平上加以限制,其中包括改变发酵温度和限制补料速率等,两者都以降低菌体的比生长速率为代价。这不仅仅是一个延长发酵时间的问题。一般认为,旺盛的生长和代谢有利于基因的表达,减缓比生长速率对外源基因高表达是不利的,但由于各种因素的影响,在发酵中细胞的比生长速率往往被限制在较低的水平上。此外,上述工艺手段在很大程度上也增加了工艺及设备的复杂性。采用代谢工程对重组大肠杆菌进行改良旨在改变菌株的固有特性,优化细胞的代谢系统,降低副产物的累积并提高细胞的代谢水平,以利于重组大肠杆菌的发酵。对此目前已提出多项代谢工程的策略,概括起来主要包括以下几个方面:(1)阻断乙酸产生的主要途径;(2)限制糖酵解途径上的碳代谢流;(3)将过量的碳代谢流转化为其它低毒的副产物;(4)对碳代谢流进行分流。下面将分别予以讨论。

1 阻断乙酸产生的主要途径

通过切断细胞代谢网络上产生乙酸的途径来减少乙酸的生物合成是降低乙酸产生最直接的手段。已知大肠杆菌产生乙酸的途径有两条[4],一是在丙酮酸氧化酶的作用下直接由丙酮酸产生乙酸,但在大肠杆菌中此酶的活性很低,不足以产生大量的乙酸。另一条是在乙酸激酶(ACK)和磷酸转乙酰基酶(PTA)的作用下将乙酰 CoA 转化为乙酸,这是大肠杆菌产生乙酸的主要途径。

许多作者尝试过筛选 PTA 或 ACK 变株的策略。Bauer 等[4]利用乙酸代谢变株对氟乙酸钠的抗性由大肠

1998-05-27收稿,1998-12-12修回

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

杆菌 MM294 筛到了一株 PTA 突变株 MD050，用摇瓶和 14L 发酵罐进行的发酵试验表明，PTA 缺陷株的生长速率并未减缓，但乙酸的分泌水平有了显著降低。在诱导表达 IL-2的阶段该菌保持继续生长的能力强于它的亲株，IL-2基因的表达亦有所加强。但 Diaz-Ricci 等[5]的实验结果却并非如此乐观。他们从野生型大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 得到 PTA 和 ACK 双基因缺失的 TA3476 菌株，研究表明，PTA 和 ACK 的突变无论在好氧还是厌氧方面均对大肠杆菌的代谢产生不利影响，推测造成这种不利影响的原因可能是乙酰 CoA 的累积。乙酰 CoA 累积将影响丙酮酸脱氢酶的活性，造成丙酮酸的累积。丙酮酸会直接分泌出来或会还原为乳酸。乙酰 CoA 累积还会造成 NADH 的再生途径受到抑制，引起 NADH 累积，通过抑制磷酸甘油醛脱氢酶的活性引起糖酵解速率下降。Hahm 等[6]对 PTA 变株的生长特性进行了研究。通过 P1 噬菌体转导得到了大肠杆菌 HB101 的 PTA 突变株 PN101。研究发现在含葡萄糖、甘露糖或甘油的 M9 培养基中 PTA 缺陷株的生长速率比亲株降低了 30%，而在利用生糖的碳源如乙酸、苹果酸或琥珀酸生长时却未见生长速率下降。而且在含生糖碳源的改良 M9 培养基中，缺陷株的生长速率还有所增加（增加了约 20%），研究还表明 PTA 变株的葡萄糖摄取速率也有所降低，乳酸和丙酮酸的分泌水平并未提高。由此可见乙酸的减少不只是切断了乙酸产生的主要途径所致，还可能通过降低葡萄糖的摄取来降低乙酸的产生，与限制比生长速率的工艺手段有相同的效果。用以葡萄糖为碳源的限定培养基进行补料分批培养试验，结果表明，即使在不采用控制比生长速率的补料策略的情况下，也能容易地获得 A_{600} 达 75 的培养密度。尽管在高密度培养条件下外源基因的表达量有明显下降，但仍然认为该 PTA 变株在进行重组菌的高密度发酵时性能是优良的。

切断乙酸生成的主要途径，虽直接针对了乙酸的成因，对降低乙酸的分泌有显著作用。但这一策略既未消除有机酸类副产物产生的来源，也未为过量的碳代谢流找到一条合理的出路。事实证明，在很多情况下 ACK 或 PTA 缺陷还造成了菌株的生长速率显著降低。近年来这方面的工作报道已不多见。

2 限制糖酵解途径上的碳代谢流

在高密度发酵的有关报道中，在工艺上通过补料策略限制细菌的比生长速率来降低乙酸分泌水平，从而成功地实现高密度发酵的例子最多见。由此推测，通过限制糖酵解途径上的碳代谢流来降低乙酸分泌的代谢工程手段也应当是有效的。在这方面主要有两种策略，一是通过代谢工程手段改变大肠杆菌对葡萄糖的摄取速率，二是将摄入细胞的葡萄糖以一定方式加生成糖原的形式储存起来。

2.1 降低葡萄糖的摄取速率 大肠杆菌对葡萄糖的摄取是在葡萄糖磷酸转移酶系统（PTS）的作用下通过基团转移进行的，这个系统由酶 I、酶 II 及 HPr 三种蛋白质组成。Chou 等[7]通过 P1 噬菌体转导从大肠杆菌 GJT001 获得了编码酶 II 的基因 pstG 缺陷的变株 CBS111。发现在以葡萄糖为碳源的限定型培养基中变株的生长速率低于其亲株，而在复合培养基中两者无明显差异。分批发酵实验结果显示，缺陷株的性能因乙酸分泌水平的降低而得到显著的改善，生物量和重组蛋白质的产量均比亲株提高 50% 以上。用该变株在一个简单的批式发酵罐中进行补料发酵实验时，一般可获得高达 1.6g/L 的重组蛋白（β-半乳糖苷酶）的表达水平。该实验也说明控制乙酸的产生未必要以降低比生长速率为代价。Chen 等[8]也通过 P1 噬菌体转导由大肠杆菌 PPA305 获得了 PTS 缺陷的大肠杆菌株 PPA316，用半乳糖 - 质子同向转运系统代替 PTS 进行葡萄糖的摄取。结果缺陷株的比生长速率有所下降，在厌氧条件下 PPA316 的比生长速率为 PPA305 的 1/5，在好氧条件下前者为后者的 60%。获得的最大细胞密度在好氧条件下 PPA316 比 PPA305 提高了 8%，而在厌氧条件下却下降了 14%。进一步研究表明 PTS 缺陷株的细胞内环境发生了很大的变化，包括磷酸化糖、NAD(H)、三磷酸核苷及磷酸烯醇式丙酮酸的水平下降，二磷酸核苷水平上升等。

2.2 将过量的碳代谢流引向糖原的合成 既然乙酸是碳代谢流过量引起的，那么把碳代谢流引向糖原的合成，使过量的碳代谢流变为一种碳源的储存形式，在适当的时候还可以再加以利用，这一策略至少在理论上是可行的。Dedhia 等[9]采用了两种代谢工程策略均使大肠杆菌的糖原得到过量累积，但乙酸的分泌水平并未因此而降低。这两种策略一是采用糖原合成的调节基因 glgQ 的变异株 AC70RI，二是在细胞中引入糖原合成的有关基因 glgC（编码 ADPG 焦磷酸酶）和 glgA（编

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

码糖原合成酶)。然而在将 glgC 和 glgA 引入大肠杆菌的 PTA 和 ACK 缺陷株 TA3476 时，却发现糖原的过量合成能使对数后期的生物量提高 15%～30%，丙酮酸的分泌水平也有所降低。后来，Dedhia 等[10]还构建了控制糖原合成和分解的"代谢转移开关"，在一定发酵时期向培养基中加入诱导物 IPTG 时，可以关闭糖原合成的操纵子，同时活化另一个负责糖原降解的操纵子，使细胞由糖原的合成代谢转向分解代谢。通过这种策略也可以使在摇瓶培养条件下细胞达到的最大发酵密度得到提高。

3 将过量碳代谢流转化为其它低毒的副产物

限制糖酵解途径上的碳代谢流常常要以降低细菌的生长速率为代价，这对重组蛋白的高表达有时是不利的。不对乙酸生成的渠道加以控制，而是延伸代谢途径，将过量的碳代谢流转化为对细胞生长抑制作用小得多的其它副产物，是解决乙酸产生问题的另一种思路。

3.1 将丙酮酸转化为乙醇　Ingram 等[11]将运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶 II 的基因引入大肠杆菌，可将丙酮酸转化为中性产物乙醇。他们将这两个基因置于同一个启动子的控制之下，构建成一个所谓 pet 操纵子。值得注意的是，上述转化过程还可提供一条 NAD 再生的途径，有利于细胞在氧化磷酸化不足的情况下通过糖酵解作用维持细胞的代谢。Ingram 和 Conway[12]还将 Sau3A 部分酶切得到的运动发酵单胞菌 DNA 酶切片段连接在丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶 II 基因的上游，筛到了 pet 表达水平最适的 pLOI308-10 质粒，其丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶 II 的表达水平分别为 6.5 和 2.5IU / mg 总细胞蛋白。引入该质粒的大肠杆菌 TC4 菌株无论在好氧还是厌氧条件下均可产生乙醇。用乙醇取代乙酸后最终细胞密度得到显著提高。Diaz－Ricci 等[5]还将 pet 操纵子引入 PTA 和 ACK 双缺的大肠杆菌 TA3476。结果表明，将携带 pet 操纵子的质粒 pLOI308－10 引入 TA3476 后，pet 操纵子的表达克服了质粒引起的代谢压力，使细胞的生长和葡萄糖的摄取恢复到不带质粒的 TA3476 的水平。另外还检测到 pet 操纵子的表达可以将发酵初期前几个小时生成的丙酮酸消耗掉。

3.2 将丙酮酸转化为乙偶姻　Aristidou 等[13]将枯草杆菌的乙酰乳酸合成酶(ALS)基因引入大肠杆菌 GJT001 和 RR1，该酶可催化丙酮酸缩合为乙酰乳酸，在乙酰乳酸脱羧酶的作用下乙酰乳酸可进一步转化为乙偶姻(3－羟基丙酮)。这种中性产物的毒性只有乙酸毒性的 1 / 50。结果表明 ALS 基因的表达可使乙酸水平降到对细胞产生毒性的阈值以下。Aristidou 等[4]还利用这一手段成功地提高了外源基因的表达。将含有 ALS 基因的质粒与携带β－半乳糖苷酶基因的质粒 pSM552－545C－转化大肠杆菌 GJT001 构成一个双质粒表达系统，分批发酵结果蛋白的比活性计算提高了 60%，产物达细胞总蛋白的 30%。在补料－分批培养条件下，重组蛋白产量达 1.1g / L，是对照组的 2.2 倍，最终细胞密度提高了 35%。同时，乙酸的分泌保持在 20mmol / L 以下，对照组则达 80mmol / L。

3.3 将乙酸转化为丙酮　最近，Bermejo 等[15]报道将丙酮丁醇羧状芽孢杆菌的 4 个有关丙酮合成的基因(*adc*, *ctf*A, *ctf*B 及 *thl*)置于 *thl* 启动子的控制之下，构成了一个称为 ace4 的丙酮合成操纵子。将携带 ace4 的质粒 pACT 引至几株大肠杆菌，考察了不同菌株丙酮和乙酸的产生情况。在摇瓶培养条件下丙酮的产生量在 2～40mmol / L 之间，在以葡萄糖补料培养的条件下丙酮的产量增至 125～154mmol / L。在培养基中添加乙酸能够进一步加强丙酮的产生。丙酮合成基因在大肠杆菌中的表达不但在有机溶剂的发酵法生产中具有很大潜力，而且由于上述途径可直接转化乙酸以及丙酮具有较强的挥发性，这种代谢工程手段在消除乙酸的毒副作用方面也具有良好的前景。

4 对碳代谢流进行分流

Delgado 和 Liao[16]提出了一项称为反向代谢流量分析(Inverse flux analysis)的技术，据此对大肠杆菌中心代谢的分析结果揭示，添补途径是通过代谢工程降低大肠杆菌乙酸分泌应选择的最佳位点。其中包括磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PPC)催化的反应以及乙醛酸旁路。预测增加添补途径的代谢流将减少乙酸的产生并增加生长得率。Farmer 和 Liao 等[17]通过实验对上述预测进行了验证。通过引入 *ppc* 基因过量表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶，通过引入 FadR(一个负责在转录水平上对乙醛酸操纵子进行调节的基因)的突变增强乙醛酸循环。结果表明，经过上述两种方法加强添补途径后，产生的乙酸与对照相比减少了 4 倍多，而生物量仍保持在原来的水平上。认为这个结果证实了代谢流

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

分析所作的预测，并证明大肠杆菌在葡萄糖的有效利用方面并不是最优化的。

通过添补途径减少乙酸分泌的策略不妨这样来理解：与三羧酸循环相比这些途径产生的 NADH 较少，因此在氧化磷酸化水平不变的条件下可以通过这些途径消耗更多的碳代谢流，起到了分流的作用。

5 讨论

随着分子生物学技术的丰富和发展以及对代谢网络的日益了解，代谢工程的内容也更加丰富，代谢工程成为近年来发展很快的一个领域。不同学者对代谢工程的定义还不尽相同。Bailey[18](1991)曾把代谢工程解释为：代谢工程是利用重组 DNA 技术通过操纵细胞的酶、转运及调控功能改善细胞的活动。也有人把代谢工程视为基因工程的分支[19]。我们采取了 Cameron[20]所给出的如下定义：代谢工程是有目的地对生化反应的代谢网络进行修饰的技术。我们认为，代谢工程本身是一项应用技术，在围绕这项技术而展开研究工作的过程中，形成一系列独特的理论和方法，使代谢工程正在发展成为一门应用学科。尽管重组 DNA 技术是代谢工程研究中的一个非常重要的技术手段，但并不是唯一和必要的手段。代谢工程既不限于所采用的研究手段，也不依赖于其它学科而存在。

一项代谢工程方案能否获得成功受到各方面因素的制约，其中主要取决于设计上的合理性。在代谢工程的设计中一个重要的问题是应将细胞的代谢系统视为一个网络，而不是简单地改变某些特定生化反应的反应速率，其中涉及到代谢工程方案的合成、评估和控制组织等诸方面问题。在代谢工程的实际工作中最常见的问题是实施代谢工程反而导致一些意想不到的实验结果。因此在代谢工程的设计中要更多地考虑代谢途径之间相互关联和代谢调控作用，以对细胞原有代谢网络的影响作出判断。利用代谢流分析(Flux analysis)技术，根据代谢网络中已知生化反应的化学定量关系，通过计算机技术对代谢网络修饰的结果进行定量预测是在代谢工程设计中的一项很有用的辅助手段。

在代谢工程的研究中，对代谢网络修饰作用的程度及其控制是很重要的。代谢工程对细胞代谢网络的修饰作用包括对原有代谢网络的某些位点进行强化或弱化、代谢途径的延伸以及新的代谢途径的构建，无论哪一种修饰作用，它的强度都应该是适度的，过强或过弱都可能对细胞的代谢产生不利影响。代谢工程的目的有这样两种情况，一种情况是代谢产物本身(这种产物也可以是新生代谢途径的产物)就是代谢工程所追求的目标，这类代谢工程工作是以获得较高的代谢产物为中心；在另一种情况下代谢工程的目标不是代谢产物本身，而是需要对原有的代谢网络进行某种优化。由于在长期的自然选择过程中生物自身已经得到了优化、通过自身的调控系统建立起精细的平衡，因此在上述的后一种情况下通过代谢工程策略建立起一个新的平衡尤为重要。另外由于细胞代谢网络存在一定的代谢刚性，往往需要较强的修饰作用才能改变原有的代谢作用，这样往往又要求引入的外源基因表达水平较高，对细胞则可能又增加一份额外的代谢负担。此外，对代谢网络的修饰应该有一个适当的调控机制。由于细胞的代谢状态不断受到内外环境因素的影响，细胞的代谢水平和代谢物的组成始终处在动态的变化中，因此需要有一个合理的调控机制以实现新的代谢平衡，这种调控作用应该通过代谢产物本身的反馈控制来实现。如何建立起有效的调控机制将是代谢工程研究中具有挑战性的课题。

代谢工程是一个比较新颖的研究领域，目前这个方面的研究工作还是比较初步的，在解决一些问题的同时又不断遇到新的问题。尽管如此，从目前所取得的这些进展已经看到，代谢工程在生物物种的改良方面已经展现出了非常诱人的前景。代谢工程的应用研究对于代谢网络的基础研究会起到用力的推动作用，同时代谢工程也将成为代谢网络研究的一种有利的工具，因此代谢工程的研究也不仅仅是一个应用的问题。

参 考 文 献

[1] Lee S Y. Trends Biotechnol, 1996,14(3): 98～105.

[2] Han K, Lim H C, Hong J. Biotechnol Bioeng, 1992, 39(6):663～671.

[3] San K Y, Bennett G N, Anisudou A A *et al*. Ann N Y Acad Sci, 1994, 721:257～67.

[4] Bauer K A, Ben－Bassat A, Dawson M *et al*. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(5): 1296～1302.

[5] Diaz－Ricci J C, Regan L, Bailey J E. Biotechnol Bioeng, 1991, 38(11): 1318～1324.

[6] Hahm D H, Pan J, Rhee J S. Appl Microbiol Bioechnol, 1994, 42: 100～107.

[7] Chou C H, Bennett G N, San K Y. Biotechnol

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Bioeng, 1994, **44**(8): 952～960.

[8] Chen R, Yap W M G J, Postma P W *et al.* Biotechnol Bioeng, 1997, **56**(5): 583～590.

[9] Dedhia N, Hottiger T, Bailey J E. Biotechnol Bioeng. 1994, **44**(1): 132～139.

[10] Dedhia N, Chen W, Bailey J E. Biotechnol Bioeng, 1997, **55**(2): 419～426.

[11] Ingram L O, Conway T, Clark D P. Appl Environ Microbiol, 1987, **53**(2): 2420～2425.

[12] Ingram L O, Conway T. Appl Environ Microbiol, 1988, **54**(2): 397～404.

[13] Aristidou A A, San K-Y, Bennett G N. Biotechnol Bioeng, 1994, **44**(8): 944～951.

[14] Aristidou A A, San K Y, Bennett G N. Biotechnol Prog, 1995, 11:(4) 475～478.

[15] Bermejo L L, Welker N E, Papoutskis E T. Appl Environ Microbiol, 1998, **64**(3): 1079～1085.

[16] Delgado J, Liao J C. Biotechnol Prog, 1997,**13**(4): 361～367.

[17] Farmer W R, Liao J C. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**(8): 3205～3210.

[18] Bailey J E. Science, 1991, **252**: 1668～1675.

[19] 郁静怡，杨胜利.生物工程学报，1996, **12**(2): 109～102.

[20] Stephanopolos G. Curr Opin Biotechnol, 1994, **5**: 196～200.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn