基因工程微生物合成黄连素的代谢途径优化研究进展

孙安妮 杨艳 薛梦恒 蔡耀旻
宁波杰顺生物科技有限公司 浙江宁波 315800

【摘 要】黄连素作为一种具有广泛药理活性的生物碱，在医药领域具有重要应用价值。传统从植物中提取黄连素存在资源有限、提取效率低等问题，利用基因工程微生物合成黄连素成为研究热点。本文综述了基因工程微生物合成黄连素的代谢途径，重点阐述了代谢途径优化的研究进展，包括关键酶的改造、代谢流调控、合成模块的优化等方面，分析了当前研究面临的挑战，并对未来的研究方向进行了展望，旨在为进一步提高基因工程微生物合成黄连素的效率提供参考。

【关键词】基因工程微生物合成黄连素；代谢途径；优化研究进展

Research progress on optimization of metabolic pathway of berberine synthesis by genetically engineered microorganisms

Sun Annie
Yang Yan，Xue Mengheng，CAI Yaomin Ningbo Jieshun Biological Technology Co.，LTD.Ningbo，Zhejiang Province 315800

【Abstract】Berberine，a broad-spectrum alkaloid with significant pharmacological activity，holds important application value in the pharmaceutical industry.Traditional methods of extracting berberine from plants are limited in resources and efficiency.Therefore，the use of genetically engineered microorganisms to synthesize berberine has become a research hotspot.This article reviews the metabolic pathways for the synthesis of berberine using genetically engineered microorganisms，focusing on the progress in optimizing these pathways.It covers the modification of key enzymes，regulation of metabolic flow，and optimization of synthetic modules.The article also analyzes the current challenges faced in this field and outlines future research directions，aiming to provide a reference for enhancing the efficiency of berberine synthesis through genetic engineering.

【Key words】microbial synthesis of berberine by genetic engineering；metabolic pathway；optimization research progress

一、引言

黄连素（Berberine）是一种异喹啉类生物碱，具有抗菌、抗病毒、抗炎、降血糖、降血脂等多种药理活性，在临床治疗感染性疾病、糖尿病、心血管疾病等方面有着广泛的应用。传统上，黄连素主要从黄连、黄柏等植物中提取，但这些植物生长周期长、资源有限，且提取过程复杂、效率低，难以满足日益增长的市场需求。

随着基因工程和代谢工程技术的发展，利用基因工程微生物合成黄连素成为一种具有潜力的替代方法。通过构建和优化微生物的代谢途径，可以在微生物细胞内实现黄连素的高效合成。然而，目前基因工程微生物合成黄连素的产量仍然较低，需要进一步优化代谢途径以提高合成效率。因此，研究基因工程微生物合成黄连素的代谢途径优化具有重要的理论和实际意义。

二、基因工程微生物合成黄连素的代谢途径

（一）天然黄连素生物合成途径

在植物中，黄连素的生物合成途径较为复杂，主要经过多个酶促反应步骤。首先，由酪氨酸或苯丙氨酸等氨基酸作为前体物质，经过一系列的氧化、脱羧、环化等反应，生成多巴胺或酪胺等中间产物。然后，这些中间产物进一步被转化为小檗碱前体，如（S）–网状番荔枝碱等。最后，经过甲基化、氧化等反应，最终合成黄连素。

（二）基因工程微生物合成黄连素的代谢途径构建

为了在微生物中合成黄连素，研究人员通过基因工程手段将植物中参与黄连素生物合成的关键酶基因导入微生物细胞中，构建人工代谢途径。例如，在大肠杆菌、酿酒酵母等模式微生物中，已经成功表达了来自植物的酪氨酸脱氢酶、多巴胺脱羧酶、（S）–网状番荔枝碱合成酶等关键酶基因，实现了黄连素前体物质的合成。然而，由于微生物和植物在细胞环境、代谢网络等方面存在差异，构建的代谢途径往往效率较低，需要进一步优化。

三、代谢途径优化的研究进展

（一）关键酶的改造

酶的定向进化

定向进化是一种通过模拟自然进化过程，在实验室中对酶进行随机突变和筛选，从而获得具有改良性能的酶的方法。研究人员利用定向进化技术对参与黄连素合成的关键酶进行了改造，提高了酶的活性、稳定性和底物特异性。例如，对酪氨酸脱氢酶进行定向进化，使其对酪氨酸的催化效率得到显著提高，从而增加了多巴胺的产量，为后续黄连素的合成提供了更多的前体物质。

理性设计

理性设计是基于对酶的结构和功能关系的深入理解，通

过计算机模拟和分子生物学技术对酶进行定点突变，以改善酶的性能。通过解析关键酶的晶体结构，研究人员可以确定酶的活性位点和关键氨基酸残基，然后对其进行理性设计。例如，对多巴胺脱羧酶进行理性设计，改变了其活性位点的氨基酸序列，增强了酶与底物的结合能力，提高了脱羧反应的效率。

（二）代谢流调控

基因表达调控

通过调控参与黄连素合成途径中关键酶基因的表达水平，可以优化代谢流，提高目标产物的产量。研究人员采用了多种基因表达调控策略，如更换启动子、调控核糖体结合位点、使用诱导型表达系统等。例如，在大肠杆菌中，使用强启动子替换原有的启动子，显著提高了酪氨酸脱氢酶基因的表达水平，增加了多巴胺的合成量。同时，利用诱导型表达系统可以根据需要精确控制关键酶基因的表达时间，避免代谢产物的积累对细胞生长产生抑制作用。

竞争途径的阻断

微生物细胞内存在多种代谢途径，某些途径可能会与黄连素合成途径竞争前体物质或能量，从而降低黄连素的产量。通过基因敲除或基因沉默等技术阻断这些竞争途径，可以将更多的代谢流导向黄连素合成途径。例如，在大肠杆菌中，敲除与酪氨酸代谢相关的竞争途径基因，减少了酪氨酸向其他产物的转化，使更多的酪氨酸用于黄连素前体物质的合成。

（三）合成模块的优化

模块化组装

将黄连素合成途径分解为多个功能模块，如前体物质合成模块、中间产物转化模块和目标产物合成模块等，然后对每个模块进行独立优化，最后将优化后的模块进行组装，可以提高整个代谢途径的效率。例如，研究人员分别对前体物质合成模块中的酪氨酸合成途径和中间产物转化模块中的多巴胺到（S）-网状番荔枝碱的转化途径进行了优化，然后将优化后的模块组合在一起，在大肠杆菌中实现了黄连素前体物质的高效合成。

异源模块的引入

从其他生物中引入具有高效催化活性的代谢模块，可以丰富微生物的代谢途径，提高黄连素的合成能力。例如，某些微生物具有独特的代谢途径，能够高效合成某些中间产物。研究人员将这些异源模块导入到基因工程微生物中，与原有的代谢途径相结合，实现了黄连素合成途径的进一步优化。

（四）发酵条件优化

培养基成分优化

培养基的成分对微生物的生长和代谢产物的合成有着重要影响。通过优化培养基中的碳源、氮源、无机盐和维生素等成分的种类和浓度，可以提高基因工程微生物合成黄连素的效率。例如，研究发现，添加适量的酪氨酸作为前体物质可以显著提高黄连素前体物质的产量。同时，优化无机盐和维生素的浓度，可以为微生物的生长和代谢提供良好的营养环境。

发酵工艺参数优化

发酵工艺参数如温度、pH 值、溶氧量等也会影响微生物的代谢活动。通过优化这些工艺参数，可以提高黄连素的合成产量。例如，在不同的生长阶段控制适宜的温度和 pH 值，可以促进微生物的生长和代谢产物的合成。同时，通过调节搅拌速度和通气量，控制发酵液中的溶氧量，满足微生物对氧气的需求，提高代谢效率。

四、实证分析

（一）大肠杆菌合成黄连素前体物质的优化案例

在大肠杆菌中构建黄连素前体物质（S）-网状番荔枝碱的合成途径是基因工程微生物合成黄连素领域的一项重要研究。研究人员深知，关键酶的活性对于整个代谢途径的效率起着决定性作用。因此，他们首先运用定向进化技术对酪氨酸脱氢酶和多巴胺脱羧酶进行改造。定向进化技术如同在实验室中模拟自然进化的过程，通过随机突变和筛选，从大量突变体中找出具有更高活性的酶。经过多轮筛选和优化，改造后的酪氨酸脱氢酶和多巴胺脱羧酶活性显著提升，能够更高效地催化相应的反应，为后续（S）-网状番荔枝碱的合成提供了充足的中间产物。为了进一步优化代谢流，研究人员利用强启动子调控关键酶基因的表达。强启动子就像一个强大的“开关”，能够增强基因的转录水平，从而提高关键酶的合成量。同时，他们敲除了与酪氨酸代谢相关的竞争途径基因。在大肠杆菌细胞内，酪氨酸不仅参与（S）-网状番荔枝碱的合成，还可能被其他代谢途径利用。通过敲除竞争途径基因，减少了酪氨酸向其他产物的转化，使更多的酪氨酸能够流向（S）-网状番荔枝碱的合成途径。此外，对发酵培养基成分的优化也不容忽视。研究人员添加了适量的酪氨酸作为前体物质，为代谢途径提供了充足的原料，同时优化了特定无机盐的浓度，为微生物的生长和代谢创造了良好的营养环境。

（二）酿酒酵母合成黄连素类似物的优化案例

在酿酒酵母中构建黄连素类似物的合成途径是推动基因工程微生物合成黄连素技术发展的重要一步。研究人员明白，关键酶的催化效率直接影响着目标产物的合成量。于是，他们采用理性设计的方法对参与合成途径的关键酶进行改造。理性设计基于对酶的结构和功能关系的深入理解，通过计算机模拟和分子生物学技术，对酶的活性位点和关键氨基酸残基进行精准定位和改造。经过改造后的关键酶，其与底物的结合能力更强，催化反应的效率更高，从而大大提高了黄连素类似物合成途径的效率。为了提高整个合成途径的可控性和优化效果，研究人员采用模块化组装的方法，将合成途径分为前体物质合成、中间产物转化和目标产物合成三个模块。这种模块化的设计使得研究人员可以对每个模块进行独立优化，避免了各个步骤之间的相互干扰。在前体物质合成模块，通过优化相关基因的表达和代谢流调控，提高了前体物质的产量；在中间产物转化模块，对关键酶进行进一步改造，确保中间产物能够高效地转化为目标产物的前体；在目标产物合成模块，优化反应条件，提高目标产物的合成效率。在发酵条件方面，研究人员也进行了细致的优化。他们

调整了培养基的碳源和氮源比例，为酿酒酵母提供了更合适的营养环境，促进了细胞的生长和代谢。同时，精确控制发酵温度和 pH 值，因为这两个因素对酶的活性和细胞的生理状态有着重要影响。

五、当前研究面临的挑战

（一）代谢途径的复杂性

黄连素的生物合成途径涉及多个酶促反应步骤和多种中间产物，代谢途径复杂。目前，对某些关键酶的催化机制和代谢流的调控机制还不够清楚，这给代谢途径的优化带来了困难。此外，微生物细胞内的代谢网络相互关联，对一个代谢途径的优化可能会影响到其他代谢途径，导致意想不到的结果。

（二）宿主微生物的限制

不同的宿主微生物具有不同的代谢特点和生理特性，对黄连素合成途径的适应性也不同。目前常用的宿主微生物如大肠杆菌和酿酒酵母等，虽然具有遗传操作方便、生长速度快等优点，但在某些方面也存在局限性。例如，大肠杆菌缺乏一些植物特有的后修饰酶，可能无法完成黄连素合成的某些关键步骤；酿酒酵母的代谢途径相对复杂，与植物代谢途径的兼容性较差。

（三）产物毒性和反馈抑制

黄连素及其前体物质对微生物细胞具有一定的毒性，随着产物浓度的增加，会对细胞的生长和代谢产生抑制作用。此外，代谢途径中的某些中间产物可能会对关键酶产生反馈抑制，降低酶的活性，从而影响整个代谢途径的效率。如何减轻产物毒性和反馈抑制是当前研究面临的一个重要挑战。

（四）规模化生产的难度

目前，基因工程微生物合成黄连素的研究大多还处于实验室阶段，要实现规模化生产还面临诸多困难。例如，在规模化发酵过程中，如何保证发酵条件的均匀性和稳定性，如何提高发酵设备的利用率和生产效率，以及如何降低生产成本等，都是需要解决的问题。

六、未来研究方向

（一）深入解析代谢途径

利用现代生物技术手段，如蛋白质组学、代谢组学和转录组学等，深入研究黄连素合成途径中关键酶的催化机制和代谢流的调控机制。通过解析酶的结构和功能关系，为酶的改造和代谢途径的优化提供理论依据。同时，揭示微生物细胞内代谢网络之间的相互作用，避免优化一个代谢途径对其他代谢途径产生负面影响。

（二）筛选和改造新型宿主微生物

寻找和筛选更适合黄连素合成的宿主微生物，或者对现有的宿主微生物进行改造，使其具有更好的代谢特性和对黄连素及其前体物质的耐受性。例如，可以利用合成生物学技术构建人工细胞，将黄连素合成途径整合到人工细胞中，实现高效的黄连素合成。

（三）开发减轻产物毒性和反馈抑制的策略

研究开发有效的策略来减轻黄连素及其前体物质对微生物细胞的毒性和反馈抑制。例如，可以通过基因工程手段改造关键酶，使其对反馈抑制不敏感；或者采用原位产物分离技术，在发酵过程中及时将产物从发酵液中分离出来，降低产物浓度，减轻对细胞的抑制作用。

（四）推进规模化生产技术研究

加强基因工程微生物合成黄连素的规模化生产技术研究，优化发酵工艺和设备，提高生产效率和产品质量。例如，研究开发连续发酵、固定化细胞发酵等新型发酵技术，降低生产成本；同时，建立完善的质量控制体系，确保产品的安全性和有效性。

结语

基因工程微生物合成黄连素为解决传统提取方法存在的问题提供了一种有效的途径。通过构建和优化代谢途径，已经在一定程度上实现了黄连素前体物质和类似物的合成。然而，目前基因工程微生物合成黄连素的产量仍然较低，面临着代谢途径复杂、宿主微生物限制、产物毒性和反馈抑制以及规模化生产难度大等挑战。未来的研究需要深入解析代谢途径、筛选和改造新型宿主微生物、开发减轻产物毒性和反馈抑制的策略，并推进规模化生产技术研究，以进一步提高基因工程微生物合成黄连素的效率，实现黄连素的工业化生产，为医药领域提供充足的黄连素原料。综上所述，基因工程微生物合成黄连素的代谢途径优化是一个具有挑战性但又充满潜力的研究领域。随着技术的不断进步和研究的深入，相信在不久的将来，基因工程微生物合成黄连素将取得更大的突破，为人类健康事业做出更大的贡献。

参考文献

[1]雷贝拉唑四联疗法治疗幽门螺杆菌阳性消化性溃疡的临床效果观察.李幼萍.健康之路，2018（04）
[2]标准四联疗法及序贯疗法治疗胃溃疡幽门螺杆菌阳性患者的疗效观察.刘光润.家庭医药.就医选药，2018（06）
[3]雷贝拉唑三联疗法治疗幽门螺杆菌阳性消化性溃疡的效果观察.谢琼；赵润林；张素英.人人健康，2019（06）
[4]四联疗法与常规三联疗法在幽门螺杆菌阳性患者的疗效对比研究.张海萍；张永明.人人健康，2019（09）