

· 人工细胞智能设计再造 ·

于涛 博士，中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所研究员、博士生导师，国家级青年人才，国家重点研发计划青年项目首席科学家。团队致力于利用合成生物学方法解决可持续制造、绿色能源存储与粮食安全等全球性的问题与挑战。近 5 年来研究成果以第一作者或者通讯作者发表在 *Cell*、*Nature Catalysis*、*Nature Metabolism*、*Nature Communications*、*Cell Research* 等期刊。其中 CO₂ 直接合成葡萄糖与脂肪酸的成果获得两院院士评选的 2022 年度“中国十大科技进展新闻”和 2022 年度 Falling Walls 国际创新科学突破大奖。



细胞工厂能量代谢设计研究进展

杨一群，刘清清，田硕，于涛*

中国科学院深圳先进技术研究院，广东 深圳 518055

杨一群，刘清清，田硕，于涛. 细胞工厂能量代谢设计研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(3): 1098-1111.

YANG Yiqun, LIU Qingqing, TIAN Shuo, YU Tao. Research progress in energy metabolism design of cell factories[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(3): 1098-1111.

摘要：能量代谢调控在代谢工程领域发挥重要作用，主要通过调控细胞内 ATP、还原型电子载体的供给强度和方式来实现物质和能量代谢的平衡或物质和能量利用最大化。能量代谢既可以通过改变物质代谢流分配提升生产效率，也可以通过改变酶催化反应的热力学参数，影响反应平衡减少能量消耗，从而降低生产成本。因此能量代谢调控有望成为微生物细胞工厂改造的有力工具，用于提高细胞生产目标代谢物的生产能力，降低生产成本。本文重点论述了目前常用能量代谢调控方式及其对细胞工厂的影响，为微生物细胞工厂的高效构建提供了参考。

关键词：细胞工厂；能量代谢设计；底物水平磷酸化；氧化磷酸化

资助项目：国家重点研发计划(2021YFA0911000)；国家自然科学基金(32071416)；广东省重点区域研究与发展计划(2022B1111080005)；深圳合成生物学创新研究院科研基金(JCHZ20200003)；深圳市微生物药物智能制造重点实验室项目(ZDSYS20210623091810032)；中国科学院战略重点研究项目(XDB0480000)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0911000), the National Natural Science Foundation of China (32071416), the Key-area Research and Development Program of Guangdong Province (2022B1111080005), the Shenzhen Institute of Synthetic Biology Scientific Research Program (JCHZ20200003), the Shenzhen Key Laboratory for the Intelligent Microbial Manufacturing of Medicines Project (ZDSYS20210623091810032), and the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDB0480000).

*Corresponding author. E-mail: tao.yu@siat.ac.cn

Received: 2024-07-12; Accepted: 2025-01-14; Published online: 2025-01-16

Research progress in energy metabolism design of cell factories

YANG Yiqun, LIU Qingqing, TIAN Shuo, YU Tao*

Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

Abstract: Energy metabolism regulation plays a pivotal role in metabolic engineering. It mainly achieves the balance of material and energy metabolism or maximizes the utilization of materials and energy by regulating the supply intensity and mode of ATP and reducing electron carriers in cells. On the one hand, the production efficiency can be increased by changing the distribution of material metabolic flow. On the other hand, the thermodynamic parameters of enzyme-catalyzed reactions can be altered to affect the reaction balance, and thus the production costs are reduced. Therefore, energy metabolism regulation is expected to become a favorable tool for the modification of microbial cell factories, thereby increasing the production of target metabolites and reducing production costs. This article introduces the commonly used energy metabolism regulation methods and their effects on cell factories, aiming to provide a reference for the efficient construction of microbial cell factories.

Keywords: cell factory; energy metabolism design; substrate level phosphorylation; oxidative phosphorylation

物质和能量代谢是生命活动的基本特征。生物通过分解代谢将物质内的能量释放出来,同时这些能量可以用于细胞的合成代谢。微生物细胞需要各种能源以维持代谢能量稳态,以实现复杂的生理功能,例如物质的吸收,细胞生长、生产,代谢物运输和应激耐受等。当微生物细胞工厂参与高强度生物生产并面临严重的环境压力时,由于细胞中能量需求高,常常因为能量供给不足导致产量或转化率降低^[1]。之前提高微生物细胞工厂的效率的研究主要集中在加强目标化合物的代谢通量,主要包括利用传统代谢工程手段引入外源基因,过表达、弱化或者敲除代谢途径中的一个或多个基因。然而现在越来越多的研究表明,通过上述简单的改造已经很难实现目标产物的产量和转化率的进一步提升。其中很重要的一点是忽视了能量代谢在物质合成中的重要性。

化能营养生物将营养物质如葡萄糖等通过分解代谢及有氧氧化释放出能够用于做功的能量。这种能量一般贮存在三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)中,也可以形成还原型电子载体烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)和黄素腺嘌呤二核苷酸(flavine adenine dinucleotide, FADH₂),一般由 ATP 以磷酸基团转移的形式将贮存的能量加以利用。还原型电子载体既能够以还原力的形式给需要还原力的生化反应提供电子,又可以通过电子传递链和氧化磷酸化产生 ATP。由此可以看出,ATP 是细胞能量代谢的最重要表现形式。细胞必须产生足够的 ATP 以满足其生物合成和细胞维持需求^[2-3]。

在工业生物技术中,细胞内 ATP 供应对微

生物过程生产的目标产品的产量、转化率和生产强度具有重要影响。增加 ATP 供应可以提高生物合成对 ATP 需求量大的产品的产量。例如增加胞内 ATP 供应可以促进氨基酸和多糖等目标代谢物的合成^[4-6], 细胞内环境控制也需要充足的 ATP 供应^[5,7]。在有机酸生产菌株中, 为维持胞内稳态, 细胞需要通过 H^+ -ATPase 和外排泵输出质子和酸性阴离子, 此过程需要消耗大量的 ATP^[8-10]。

细胞产生 ATP 的方式多种多样, 依据其直接产生方式可分为 2 种: 底物水平磷酸化和氧化磷酸化。前者主要通过高能磷酸化合物的高能磷酸键的转移实现 ATP 的生成, 后者主要通过氧化 NADH 形成质子梯度, 通过 ATP 合酶实现 ATP 合成^[11-13]。近年来随着合成生物学的发展, 针对上述 2 种 ATP 的生产方式的人工设计和改造已取得较大进展, 表 1 列举了近些年细胞能量供给调控方面的研究进展。本文将从能量代谢调控策略及其在合成生物学中的应用进行论述, 同时介绍其在人工智能设计方面的最新研究进展, 以期为细胞工厂能量代谢设计提供参考。

1 调控底物水平磷酸化实现的能量供给调控

底物水平磷酸化是细胞能量供应的最直接方式, 它可以通过简单的酶催化反应将高能磷酸化合物的高能磷酸键转移至 ADP 中, 合成 ATP。因此通过简单的基因敲除、弱化或过表达可以直接控制 ATP 的合成和消耗。

1.1 ATP 或高能磷酸化合物相关酶的调控

在糖酵解途径中, 能量的生成由两步底物水平磷酸化实现, 分别涉及甘油酸-3-磷酸激酶

(由 *pgk* 基因编码)催化的 1,3-二磷酸甘油酸和 ADP 生成 ATP 和 3-磷酸甘油酸, 以及丙酮酸激酶(由 *pyk* 基因编码)催化的磷酸烯醇式丙酮酸和 ADP 生成的 ATP 和丙酮酸。对于这 2 个基因的调控, 可以增加细胞能量的直接供给, 明显提升产品的产量和转化率。通过在谷氨酸棒杆菌中过表达 *pgk*, L-精氨酸或 L-鸟氨酸的转化率得到明显提高^[5,47]。在解淀粉芽胞杆菌中单独过表达 *pgk* 或 *pyk*, 提高了发酵过程中 ATP 的供给水平, 实现了腐胺生产强度的大幅提升^[48]。在地衣芽胞杆菌中过表达 ATP 合成关键基因 *purB* (编码腺琥珀酸裂解酶)和 *adk* (编码腺苷酸激酶)亦能提升 ATP 产量^[14]。Zhang 等^[15]通过实验室进化, 获得了磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(由 *pck* 基因编码)的突变体, 该突变使磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶途径(phosphoenolpyruvate carboxykinase pathway)成为大肠杆菌中主要的羧化途径, 同时利用该途径与原本利用磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(由 *ppc* 基因编码)途径相比可净增加 1 分子 ATP 合成。通过在乙醇梭菌中引入乙酸激酶, 将乙酰磷酸转化为乙酸的同时驱动 ADP 合成 ATP, 增加细胞内的 ATP 供给, 最终使该菌的乙醇生产强度增加了 180%^[16]。Milne 等^[17]通过替换酿酒酵母的 ATP 依赖性脲酶(由 *dur1,2* 基因编码)为粟酒裂殖酵母的 ATP 非依赖性脲酶(由 *ure2* 基因编码)和其附属基因 *ureD*、*ureF*、*ureG*, 使得酿酒酵母在转运氮源时消耗更少的 ATP。

改善底物水平磷酸化是增强能量供应的有效策略, 相比于氧化磷酸化, 它可以更加快速地增加能量供应, 并且不需要外部电子受体或膜结合 ATP 合酶。但是其能量效率低、原料浪费严重, 并且可利用的高能磷酸化合物较少。

表 1 细胞能量设计调控策略及其应用

Table 1 Cellular energy regulation strategies and applications

Regulation strategy		Strain	Product	Yield	References
Regulating by substrate-level phosphorylation					
Strengthening or Introduction	Overexpression of <i>pgk</i> or <i>pyk</i> genes	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-Arg and L-ornithine	–	[5]
energy-producing metabolic pathways	Overexpression of <i>purB</i> and <i>adk</i> genes	<i>Bacillus licheniformis</i>	γ -polyglutamic acid	–	[14]
	Overexpression of <i>pck</i> gene	<i>Escherichia coli</i>	Succinic acid	–	[15]
	Heterologous expression of <i>ack</i> gene	<i>Clostridium</i>	Ethanol	–	[16]
Adding high energy compounds	Adding ATP	<i>Streptomyces albulus</i>	ϵ -poly-L-lysine	2.3 g/L	[17]
Replacing energy consumption pathway	<i>ure2</i> replaces <i>dur1,2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–	–	[18]
Regulating by oxidative phosphorylation					
Regulating pH	pH 4.5	<i>Streptomyces albulus</i>	ϵ -poly-L-lysine	~1.5 g/L	[19]
Regulating oxygen supply	Adding <i>n</i> -heptane	<i>Pichia pastoris</i>	S-adenosylmethionine	1.4 g/L	[20]
	Adding <i>n</i> -dodecane	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Lipids	0.2 g/L	[21]
	Overexpression of <i>yhb</i> and <i>fhb</i> genes	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Erythritol	55.8 g/L	[22]
		<i>Aureobasidium melanogenum</i> P16	Amylopectin	101.4 g/L	[23]
		<i>Bacillus licheniformis</i>	γ -polyglutamic acid	46.4 g/L	[24]
Regulating precursor supply	Feeding sodium citrate	<i>Bacillus licheniformis</i>	γ -polyglutamic acid	35.0 g/L	[25]
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S-adenosylmethionine	2.8 g/L	[26]
	Feeding formic	<i>Escherichia coli</i>	–	–	[27]
	Knockout of <i>frd1</i> , <i>frd2</i> and <i>noxA</i> genes	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-Arg and L-ornithine	–	[5]
	Knockout of <i>amn</i> gene	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-Arg and L-ornithine	–	[5]
		<i>Escherichia coli</i>	–	–	[28]
Regulating electron transport chain activity	Regulating by <i>nuo</i> , <i>cyd</i> , <i>cyo</i> , <i>atp</i> operon	<i>Escherichia coli</i>	β -carotene	2.1 g/L	[29]
	Knockout of <i>cydB</i> and <i>cydC</i> genes	<i>Bacillus subtilis</i>	N-acetylglucosamine	20.6 g/L	[30]
		<i>Bacillus licheniformis</i>	γ -polyglutamic acid	43.8 g/L	[14]
Regulating of cell membrane components	Overexpression of <i>fabB</i> gene	<i>Escherichia coli</i>	–	–	[31]
Regulating proton pump	Heterologous expression of rhodopsin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATP	–	[32]
		<i>Escherichia coli</i>	ATP	–	[33-35]
Transcription factor regulation	<i>arcA</i> , <i>fur</i> , <i>pdhR</i> , <i>ihfA</i> , <i>ihfB</i> genes regulation	<i>Escherichia coli</i>	–	–	[36]
	Knockout of <i>arcA</i>	<i>Escherichia coli</i>	Lactic acid	–	[37]
	Overexpression of <i>fnr</i> gene	<i>Bacillus licheniformis</i>	γ -polyglutamic acid	40.0 g/L	[38]

(待续)

(续表 1)

Regulation strategy	Strain	Product	Yield	Reference	
<i>hap1</i> and <i>hap2/3/4/5</i> genes regulation	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–	–	[39]	
<i>oca3</i> gene regulation	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–	–	[40]	
<i>oca5</i> gene regulation	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fatty acid	2.7 g/L	[41]	
Construction of new metabolic pathways					
Construction of new energy supply system	PPP pathway combined with mitochondrial outer membrane NADH dehydrogenase (NDE I/II)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fatty acid	20 g/L	[42]
	Overexpression of <i>xfpk</i> gene	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Farnesene	–	[43]
	Thiolase reverse reaction	<i>Escherichia coli</i>	Fatty acid and its derivatives	–	[44]
Computer model optimization					
Fermentation process optimization	Computer dynamic simulation balances growth and production	<i>Escherichia coli</i>	Lactic acid	266.8 mmol/L	[45]
Optogenetic regulation	Dynamic constraint model combined with optogenetic control	<i>Escherichia coli</i>	Lactic acid	1 567.8 mmol/L	[46]

1.2 外源添加高能化合物调控细胞能量供给

外源添加高能磷酸化合物也可以调控细胞内的能量供给。添加的高能磷酸化合物主要为廉价的多聚磷酸或直接添加 ATP。直接在培养基中添加适量 ATP 可以显著影响细胞内的 ATP 水平,在白色链霉菌培养基中外源添加 0.5 mmol/L ATP,其目标产物 ϵ -聚赖氨酸产量增加了 13.64%^[18]。多聚磷酸在多聚磷酸激酶的作用下可以将 1 分子高能磷酸键转移至 ADP 中生成 ATP。外源添加多聚磷酸配合多聚磷酸激酶异源表达可以快速提高细胞内的 ATP 水平,提高目标产品产量。通过在大肠杆菌中过表达多聚磷酸激酶同时外源添加多聚磷酸,Cho 等^[49]实现了茶氨酸的高效合成,其产量可达 41.6 g/L。同样地,在大肠杆菌中过表达多聚磷酸激酶同时外源添加多聚磷酸,Chen 等^[50]实现了谷胱甘肽和 S-腺苷甲硫氨酸的高效生产,其产量较原

始菌株分别提升了 137.40%和 82.18%。尽管高能化合物种类比较多,但可供选择的应用于细胞生产的非常少且成本非常高。这也极大限制了该方法的使用。

2 调控氧化磷酸化实现的能量供给调控

氧化磷酸化是细胞能量供应的最重要方式,通过细胞代谢或环境摄取的还原性物质提供电子,并通过电子传递(electron transport chain, ETC)传递至终端电子受体,伴随生成的质子梯度被用于合成细胞能量“通货”ATP。电子传递链由复合物 I、II、III 和 IV 组成,对于许多微生物,均以脂溶性辅酶 Q 作为电子载体,以氧作为最通用的终端电子受体。此外,亦有许多原核生物利用氮氧化合物作为电子受体。在电子传递过程中,驱动质子的转运进而形成质子梯度,由 ATP 合酶催化形成 ATP,动态维持

细胞内部能量动态稳定。依据氧化磷酸化原理, 已开发出多种形式的调控模式, 调控细胞的能量供给, 图 1 展示的是目前常用的通过调控氧化磷酸化调控细胞能量供给的几种方式。

2.1 微环境调控

对于异养微生物而言, 在生长和生产过程

中, 其胞外微环境显著影响着代谢能量的供应。其中, pH 和溶氧量是胞外微环境优化的重点。此外, 亦可在培养基中直接添加 ATP 提升代谢物产量^[51-52]。质子梯度在电子传递过程中产生, 并作为 FoF1-ATP 合酶合成 ATP 的动力。控制原核微生物培养条件为酸性有利于质子梯度的形成,

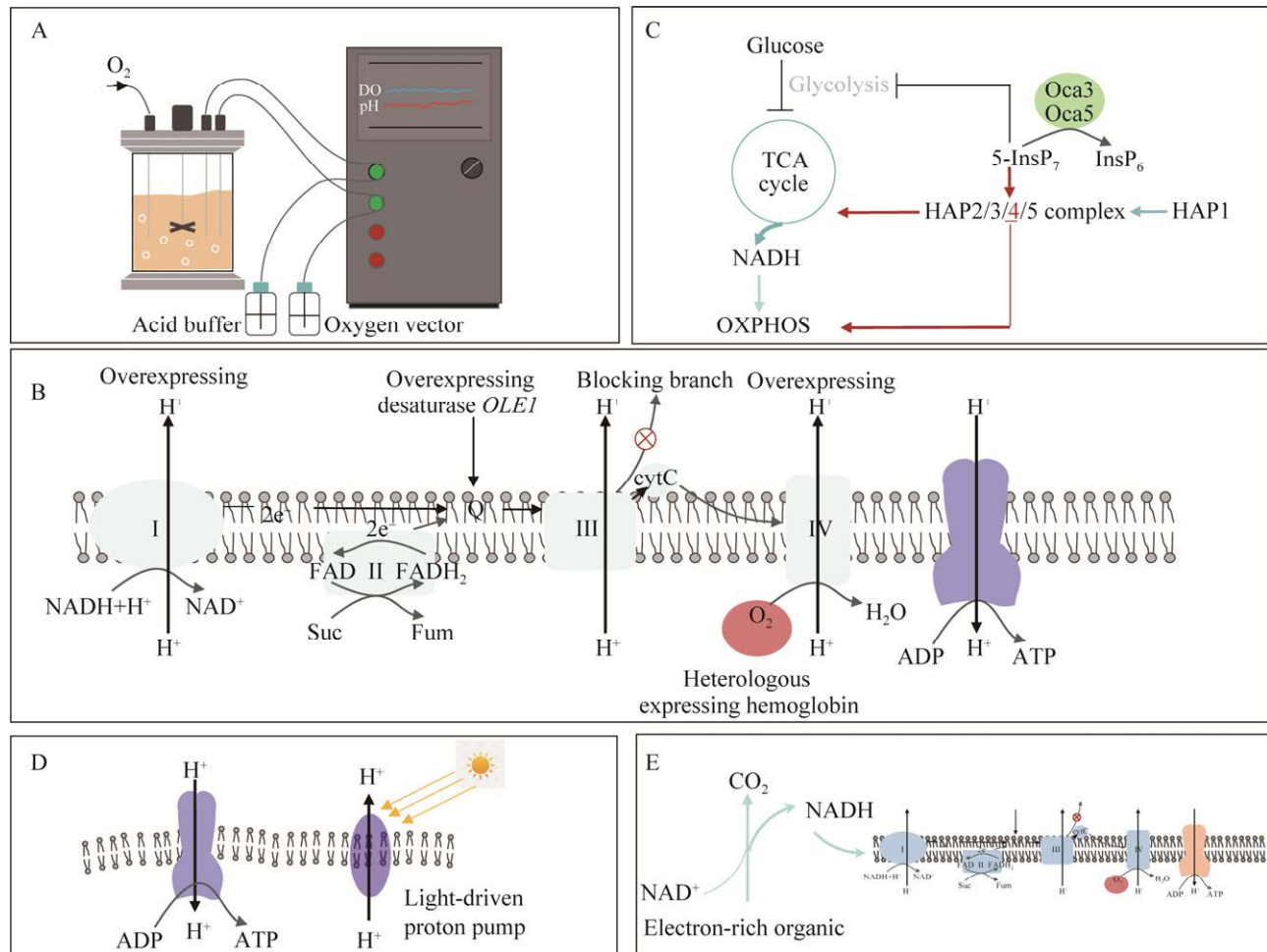


图 1 能量代谢调控策略 A: 细胞胞外微环境调控强化能量供应; B: 调控电子传递链优化能量代谢; C: 代谢分流加强胞内能量代谢途径; D: 外源能量转化系统增强能量供应; E: 富电子前体物转化增强氧化磷酸化增加能量供应。

Figure 1 Energy metabolism regulation strategies. A: Optimize the extracellular microenvironment by adjusting pH and dissolved oxygen to enhance metabolic energy supply; B: Regulate the electron transport chain and ATP synthase to optimize the cell's background energy metabolism; C: Transcription factors and signal molecules regulate cell fermentation and respiration to enhance intracellular energy metabolism pathways; D: Exogenous energy conversion system enhances energy supply; E: Electron-rich precursors enhances oxidative phosphorylation and increases energy supply. OXPHOS: Oxidative phosphorylation; Suc: Succinic; Fum: Fumaric.

从而显著增强微生物 ATP 的供应^[3]。Yamanaka 等^[19]在利用白色链霉菌生产 ϵ -聚赖氨酸时,发现在酸环境培养下,胞内的 ATP 供应显著提升,进一步激活 ATP 依赖的 ϵ -聚赖氨酸合酶活性,使 ϵ -聚赖氨酸高水平生产。Zhang 等^[53]进一步探究了白色链霉菌在酸性条件下 ϵ -聚赖氨酸高产机制与耐酸性机制,发现细胞胞内 pH 会维持在 7.5 而非环境酸度;此时,细胞增加了不饱和脂肪酸比例、延长了脂肪酸链长度并提升了 H^+ -ATP 酶活性,该酶作为 ATP 依赖型酶,促使细胞加强了电子传递链相关基因的表达,以供应充足的 ATP 维持其胞内 pH 稳态。氧作为大多数微生物电子的最终受体,研究者常通过发酵工程控制或引入氧载体等方法提升溶氧量。Zhang 等^[20]在毕赤酵母产 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)研究中,发现氧载体正庚烷和正己烷可增强氧气传递,协同增强细胞 ATP 供应,显著提升 SAM 产量。在生物反应器发酵过程中,高通气量并添加 1%正十二烷协助氧气扩散等方法显著提升了产油酵母的脂积累^[21]。Rossatto 等^[54]在关于透明质酸(hyaluronic acid, HA)生产的综述中,也表明溶氧量对 HA 合成的重要作用。此外,在解脂耶氏酵母^[22,55]、黑酵母菌出芽短梗霉 P16^[23]和地衣芽胞杆菌^[24]中过表达血红蛋白用于协助胞内氧的运输,均有效提升了胞内 ATP 供应。

2.2 电子传递链调控

电子传递链对于细胞能量稳态至关重要,该途径涉及的基因数量较多,研究者主要通过多个相关基因的操控或低效电子传递分支途径的敲除来提升胞内 ATP 供应。Zhao 等^[29]通过调控呼吸链中 NADH:辅酶 Q 氧化还原酶(nuo)、细胞色素 bd-I 氧化酶(cyd)、细胞色素 bo 氧化酶(cyo)和 ATP 合酶(atp)操纵子,提升了大肠杆菌 β -胡萝卜素的产量。Liu 等^[30]为了减少低效电子

传递分支途径所消耗的代谢能,在枯草芽胞杆菌敲除细胞色素 bd 辅酶 Q 氧化酶 cydB 和 ATP 结合的细胞色素 bd 合成蛋白 cydC,有效提升了电子传递链效率和 N-乙酰葡萄糖胺产量。类似地,Cai 等^[14]通过敲除 *cydBC* 提升胞内 ATP 含量,在地衣芽胞杆菌中实现 γ -聚谷氨酸的高效生产。

细胞膜作为电子传递链复合物的载体,细胞膜黏度的降低可使辅酶 Q 在膜内有效扩散,进而提高电子传递速率。Budin 等^[31]通过加强大肠杆菌中不饱和脂肪酸(unsaturated fatty acids, UFA)合成路径限速酶 FabB 的表达,提升细胞膜 UFA 含量有效提升了细胞呼吸速率。此外,在酿酒酵母中,UFA 合成的操控亦影响了线粒体呼吸作用。Glignon 等^[56]发现,耻垢分枝杆菌休眠细胞中甲基化吡啶的积累会伴随细胞膜流动性的降低,从而导致呼吸链功能障碍。Persson 等^[57]发现酿酒酵母在响应低 ATP 水平时,会增加糖原和海藻糖的合成从而调节细胞质黏度,协助细胞适应外界温度的改变并提升能量利用率。

2.3 外源能量转化系统的能量供给调控

电子传递链形成 ATP 主要依赖其复合物形成的质子梯度。质子梯度的形成还可以通过光驱动的离子泵系统实现。微生物视紫红质可作为光驱动膜离子泵、阳离子通道或光传感器,广泛分布于细菌和古菌中^[58-59]。微生物离子泵视紫红质可作为光驱动质子泵,利用光能产生质子动力用于 ATP 生成^[60]。通过异源表达离子泵视紫红质相关基因,可以在目标菌株中实现光驱动的 ATP 再生。通过在大肠杆菌中表达变形菌来源的视紫红质相关基因,同时整合表达合成视黄醛相关基因,Martinez 等^[33]实现了重组大肠杆菌通过视紫红质利用光能驱动 ATP 再生。同样地,Toya 等^[34]在大肠杆菌中异源表达合成 δ 视紫红质的相关基因,实现了在光照条

件下,工程菌株合成谷胱甘肽(glutathione, GSH)和 3-羟基丙酸(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)的能力显著提升。通过在大肠杆菌中引入土库曼盐藻的 δ -视紫红质基因和异戊二醇合成相关基因, Sano 等^[35]实现了光驱动的异戊二烯合成异戊二醇。在酿酒酵母中,细胞为了维持液泡内的酸化环境消耗大量的 ATP,通过液泡 ATP 酶(vacuolar-type ATPase, V-ATPase)将质子从液泡溶胶泵送至液泡腔,液泡 ATP 酶位于液泡膜中, Daicho 等^[32]通过在液泡膜中引入非消耗 ATP 的光驱动 H 泵视紫红质,减少了 V-ATPase 维持液泡酸化所需的 ATP 消耗,增加用于生物生产的细胞内 ATP 供应。

2.4 代谢分流控制

发酵和呼吸均是细胞代谢获取能量的有效途径,在微生物细胞工厂中,发酵与呼吸的关系是研究者关注的重点。代谢能量稳态是微生物细胞工厂生存和正常工作的关键,然而,在生物生产过程中,由于无效的能量供应和过量的能量消耗往往导致稳态失衡。因此,如何调节细胞能量稳态是当前微生物工厂亟待解决的问题。近年来,通过转录因子控制中心碳代谢分流来实现对能量代谢的调控成为重要研究方向。

对于原核微生物,关于中心碳代谢分流的转录因子调控研究较为常见。Haverkorn 等^[36]通过对比大肠杆菌呼吸和发酵代谢,发现 *arcA*、*fur*、*pdhR*、*ihfA* 和 *ihfB* 等转录因子直接或间接控制乙酰 CoA 进入呼吸途径。类似地, Matsuoka 等^[37]在大肠杆菌中敲除 *arcA* 基因,发现其发酵乳酸产量显著高于野生型。Cai 等^[38]在利用地衣芽胞杆菌 WX-02 厌氧生产 γ -聚谷氨酸时,通过过表达厌氧调控因子 *Fnr* 有效提升了硝酸盐转运蛋白和硝酸还原酶表达水平,进一步加强用于 γ -聚谷氨酸生产的 ATP 供应。

真核生物由于不同细胞器的存在,其代谢

调控也较为复杂。作为模式生物和工业微生物的酿酒酵母,其代谢转录调控研究较为广泛。转录激活因子 HAP1 和复合物 HAP2/3/4/5 可结合至 CYC1 启动子的 CCAAT 盒,激活细胞色素 c1 的表达,进一步激活电子传递链^[61-62]。Barba-Aliaga 等^[39]发现酵母的翻译延长因子 TIF51A 受到 Hap1 的调控,在呼吸作用下, Hap1 结合 *TIF51A* 启动子激活其转录,但在非呼吸条件下,则通过募集 Tup1 抑制其转录,进而调控线粒体呼吸作用。Steidle 等^[40]和 Qin 等^[41]先后发现, *Oca3* 和 *Oca5* 作为肌醇焦磷酸酶可催化 5-二磷酸肌醇 1,2,3,4,6-五磷酸生成六磷酸肌醇,将其敲除可以在 Crabtree 阴性的丙酮酸脱羧酶缺失菌株中解除葡萄糖引发的细胞呼吸抑制;推测 5-二磷酸肌醇 1,2,3,4,6-五磷酸可通过转录因子 Gcr1 和 Hap4 实现对呼吸和糖酵解的中心调控,而六磷酸肌醇作为 ATP 的感应器,可通过转录因子控制中心碳代谢流动来实现对能量代谢的调节。

2.5 前体供给调控

外源添加还原性物质同样可以快速为细胞供能,一方面还原性物质氧化产生的 NADH 可以直接作为合成过程中的还原力;另一方面,产生的 NADH 可以经过氧化磷酸化产生大量 ATP 为细胞供应能量。常见的外源添加还原性物质有甲酸、柠檬酸和亚磷酸等,甲酸和亚磷酸在甲酸脱氢酶或亚磷酸脱氢酶作用下可以快速产生 NADH,添加柠檬酸钠可提高异柠檬酸脱氢酶活性,而异柠檬酸脱氢酶活性与细胞内 ATP 水平相关。通过流加柠檬酸钠, Yoon 等^[25]实现了在地衣芽胞杆菌中高产 γ -聚谷氨酸。类似地,研究人员通过外源添加柠檬酸钠,增加了胞内 ATP 供给,在酿酒酵母中 S-腺苷甲硫氨酸的产量较之原始菌株提升了 19%^[26]。通过外源添加甲酸作为细胞能量供给, Antonovsky

等^[27]实现了大肠杆菌转化二氧化碳合成糖类分子。细胞内部调控前体供给同样可以调控胞内 ATP 水平。*aox* 基因编码的交替氧化酶能使用分子氧将 NADH 转化为 NAD⁺，过表达 *aox* 基因能增加 NADH 的直接氧化，增加呼吸作用，Hou 等^[63]在黑曲霉中过表达 *aox* 基因，细胞的生长速率和柠檬酸得率都有所增加。黄素还原酶 Frd181 (由 *frd1* 基因编码)和 Frd188 (由 *frd2* 基因编码)的失活可以减少不产生能量的 NADH 氧化，因此，更多的 NADH 可以通过电子传递链用于 ATP 再生。*noxA* 基因编码 NADH 氧化酶催化 NADH 向 NAD⁺的非产能氧化，AMP 核苷酶 (由 *amn* 基因编码)的存在减少了用于 ATP 合成的 ADP 供应，敲除 *noxA* 和 *amn* 能提高胞内 ATP 水平，利用以上策略，Man 等^[5]在谷氨酸棒杆菌中有效促进了精氨酸的生产。类似地，Morrison 等^[28]通过敲除大肠杆菌的 AMP 核苷酶(由 *amn* 基因编码)，使得胞内 ATP 水平增加了 30%，细胞对于低温的耐受性也显著提升。

3 合成生物学设计构建的能量供给调控

3.1 新代谢途径设计构建的 ATP 调控

近年来，“合成代谢”的概念被越来越多的研究者重视，合成代谢旨在通过实现全新的代谢网络来克服自然代谢的局限性^[64-65]。新型网络是根据简单的物理化学参数(例如动力学和热力学)，从第一原理设计的。在设计过程中，需要定义起始化合物和目标分子，并确定连接 2 个分子的反应步骤少、热力学可行且能量高效的路线。随着合成生物学相关技术的不断进步，目前已有许多新型代谢途径被开发出来，它们或在能量利用率上具有很大优势，或在能量供给效率上有显著提升。Bar-Even 等^[66]通过对自然界已知的 5 000 多个生化反应进行分析，通

过增加能量约束条件，理论上实现了二氧化碳转化为乙醛酸的最低能耗途径设计。通过利用磷酸转酮酶(phosphoketolase, *xfpk*)直接催化果糖-6-磷酸/木酮糖-5-磷酸(fructose-6-phosphate/xylulose-5-phosphate, F6P/Xu5P)转化为乙酰磷酸的特性，Bogorad 等^[43]设计了非氧化糖酵解(non-oxidative glycolysis, NOG)途径，该途径可转化 1 分子葡萄糖为 3 分子乙酰辅酶 A 而不产生 ATP 或 NADH，且比 EMP 途径少消耗 1 分子 ATP。通过在酿酒酵母中过表达 *xfpk*，在减少 ATP 消耗的同时，增加了还原力供给，最终实现了金合欢烯产量提升 25%。脂肪酸或其衍生物主要通过丙二酰辅酶 A 聚合而成，丙二酰辅酶 A 则通过乙酰辅酶 A 转化而来，此过程需要消耗 1 分子 ATP。通过利用硫解酶(thiolase)的逆反应，Gonzalez 团队设计构建了反向 β -氧化循环(reversal of the β -oxidation cycle-box)，该循环可以直接利用乙酰辅酶 A 缩合合成脂肪酸或其衍生物，大大降低了合成目标产品的 ATP 消耗，在大肠杆菌中实现了通过该途径合成脂肪酸及其衍生物等^[67-69]。利用同样的原理，该团队通过改造聚酮酰辅酶 A 硫解酶，实现了乙酰辅酶 A 直接聚合成多种聚酮化合物^[44]。同样是针对丙二酰辅酶 A 衍生物合成途径的改造，Tan 团队利用 β -丙氨酸-丙酮酸(β -alanine-pyruvate)转氨酶实现了丙酮酸转化为丙二酸半醛后直接转化为丙二酰辅酶 A，并在褐黄孢链霉菌和刺糖多孢菌中利用该途径实现了纳他霉素和刺糖素合成^[70]。然而，上述针对代谢途径的改造往往只对细胞的局部代谢进行改造，对整个细胞的能量供给影响不大。本研究团队首次提出在细胞中构建人工合成的能量供给系统实现对天然能量系统的替换并将其应用于生物合成；通过理性设计，组合途径磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)、转氨循环和线粒体外部呼吸链这 3 个模块，在

酵母细胞内构建了一个合成能量系统,如图 2 所示,该系统可以替换天然能量供应系统支持细胞生长,同时与天然在三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环相比,该途径可以大大增加酿酒酵母细胞质中 ATP 和 NADPH 的供给,实现高还原性化合物的高效率生产,通过以脂肪酸为实例,证实了新型能量供给系统在生物合成中的优势,实现 40%的自由脂肪酸转化率,该转化率为目前酿酒酵母中报道的最高水平^[42]。

3.2 ATP 的动态调控

最近 Mu 等^[71]构建了一个胞内 ATP 动态监测的方法,通过对细胞不同生长阶段胞内 ATP 的动态观察,发现在细胞的不同生长阶段,胞内的 ATP 水平存在较大差异,且利用不同碳源时,

胞内的 ATP 浓度差异也非常大;尤其在乙酸培养的大肠杆菌中,其在对数生长后期到稳定前期存在明显的 ATP 浓度峰值;该团队利用这种 ATP 浓度的差异,实现了在大肠杆菌中脂肪酸合成效率提高 1.7 倍;并且该团队发现,与基于细胞生长的传统方法相比,监测 ATP 动力学为评估代谢负担提供了更灵敏的指标。这一新发现为后续细胞生产高耗能产物提供了新的思路^[71]。

3.3 计算机代谢模型优化控制

随着可持续生物技术生产的蓬勃发展,许多生物工艺成功商业化^[72],但由于与传统生物技术相比竞争性较弱,许多研究在早期就被迫中断,问题的关键在于生物发酵工艺如何优化。

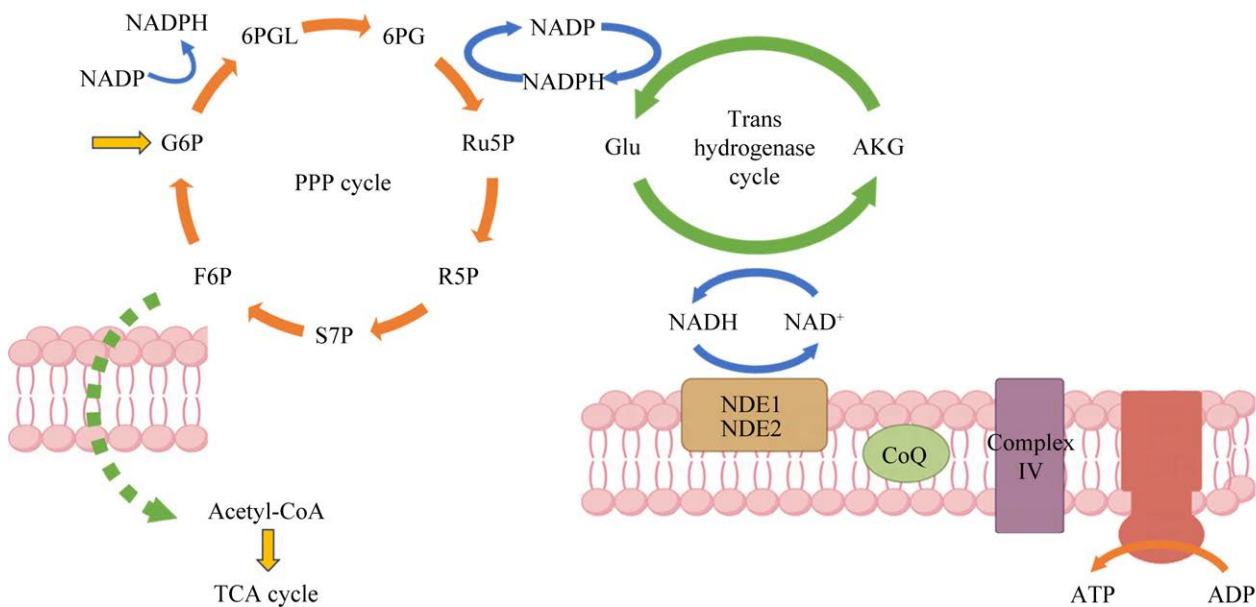


图 2 人工合成能量供给系统 G6P: 葡萄糖-6-磷酸; 6PGL: 6-磷酸葡萄糖酸内酯; 6PG: 6-磷酸葡萄糖酸; Ru5P: 核酮糖-5-磷酸; R5P: 核糖-5-磷酸; S7P: 景天庚酮糖-7-磷酸; F6P: 果糖-6-磷酸; AKG: α -酮戊二酸; CoQ: 辅酶 Q; E4P: 赤藓糖-4-磷酸; Xu5P: 木酮糖-5-磷酸; Acetyl-CoA: 乙酰辅酶 A; Glu: 谷氨酸; NDE1/2 线粒体外膜 NADH 脱氢酶 1/2。

Figure 2 Artificial energy supply system. G6P: Glucose-6-phosphate; 6PGL: 6-phosphogluconolactone; 6PG: 6-phosphogluconic acid; Ru5P: Ribulose 5-phosphate; R5P: Ribose-5-phosphate; S7P: Sedoheptulose 7-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate; AKG: α -ketoglutarate; CoQ: Coenzyme Q; E4P: Erythrose 4-phosphate; Xu5P: Xylulose-5-phosphate; Acetyl-CoA: Acetyl coenzyme A; Glu: Glutamate acid; NDE1/2 Mitochondrial external NADH dehydrogenase 1/2.

在胞外或宏观水平上,生物反应器操控、设计及培养条件优化可对细胞代谢整体进行调控^[73],但无法针对特定代谢元素,而动态模型优化和预测控制策略可最大化特定代谢物生产效率。ATP 作为能量“通货”在调节微生物发酵工艺过程发挥着重要作用,通过无效循环强制 ATP 的消耗,可增强 ATP 合成生物生产途径的通量。但 ATP 强制消耗将导致细胞生长速率减慢和较低的体积生产率。因此, Espinel-Ríos 等^[74-75]通过计算机动态模型模拟和预测控制平衡生长与生产之间的关系,并成功用于提升大肠杆菌生产乳酸工艺。

在胞内或微观水平上,典型静态代谢工程改造可增加细胞产量,但也会导致生物量的降低,其设计往往是基于稳态假设,常导致代谢失衡^[45];通过外部输入信号诱导代谢途径相关蛋白表达对于生物工艺优化有较大前景,其中光遗传学可利用光作为调控代谢途径的开关,操纵细胞的生长和代谢物合成^[76],但其缺乏在线反馈或纠正机制,表现出较差的再现性和产品质量^[77]。Espinel-Ríos 等^[46]基于动态约束模型,整合代谢反应动力学、资源分配和诱导基因表达,实现光遗传控制 ATP 酶复合物,继而动态调节 ATP 浪费,并成功优化了大肠杆菌产乳酸工艺。

4 结语与展望

随着对细胞能量和物质代谢理解的不断加深,通过能量代谢调控设计,增加目标产品产量和转化率已成为一种重要改造手段,越来越受到研究人员的重视。通过对 ATP 相关酶的简单表达调控及对呼吸相关基因和转录因子的协调,合成生物学已经实现在不同层面对细胞的能量供给进行调控,展现出了对于传统生物制造的巨大优势。近些年,随着酶工程、代谢工程和计算机等学科的不断发展和不断交叉融合,构建更

加高效的、全新的并且能量经济的能量代谢途径或者能量代谢系统方兴未艾,已经发展出了通过重构细胞的代谢途径实现对细胞能量供给模式的切换。尽管细胞的能量代谢调控得到了极大的发展,且已广泛应用于提高细胞工厂效率,但依旧存在许多挑战。首先,尽管可以对能量代谢系统进行深入改造,但是能量的最终来源仍然是葡萄糖等传统发酵原料,无法大幅降低原料成本,尽管也有利用甲酸、电能和太阳能等进行能量供给的报道,但能量利用效率都太低。因此大量的研究正聚焦于提高新型供能系统的效率并将其应用于细胞工厂。其次,设计构建的新型能量代谢系统与宿主菌的适配性较差,相较于内源性能量代谢系统,其在能量代谢效率或能量利用率方面并无优势。最后,细胞工厂在不同的阶段对于能量的需求是不一样的,但目前的能量调控模式只针对生产过程,忽视了菌体生长与生产能量供给差异。利用光电信号或诱导剂等,调控细胞代谢模式,使细胞在不同条件下采用最经济的能量代谢模式也越来越受到研究者的关注。

作者贡献声明

杨一群:资料收集、稿件构思、初稿写作;
刘清清:初稿写作、稿件润色修改;田硕:稿件润色修改;于涛:监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

所有作者均声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] TONG T, CHEN XL, HU GP, WANG XL, LIU GQ, LIU LM. Engineering microbial metabolic energy homeostasis for improved bioproduction[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 53: 107841.
- [2] LÖFFLER M, SIMEN JD, JÄGER G, SCHÄFERHOFF K, FREUND A, TAKORS R. Engineering *E. coli* for large-scale production-strategies considering ATP

- expenses and transcriptional responses[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 73-85.
- [3] HARA KY, KONDO A. ATP regulation in bioproduction[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 198.
- [4] HAO YN, PAN XW, XING RF, YOU JJ, HU MK, LIU ZF, LI XF, XU MJ, RAO ZM. High-level production of L-valine in *Escherichia coli* using multi-modular engineering[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 359: 127461.
- [5] MAN ZW, RAO ZM, XU MJ, GUO J, YANG TW, ZHANG X, XU ZH. Improvement of the intracellular environment for enhancing L-arginine production of *Corynebacterium glutamicum* by inactivation of H₂O₂-forming flavin reductases and optimization of ATP supply[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 310-321.
- [6] CHEN YW, TAN TW. Enhanced S-adenosylmethionine production by increasing ATP levels in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(20): 5200-5209.
- [7] BRYNILDSEN MP, WINKLER JA, SPINA CS, MacDONALD IC, COLLINS JJ. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(2): 160-165.
- [8] BAEK SH, KWON EY, BAE SJ, CHO BR, KIM SY, HAHN JS. Improvement of D-lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* under acidic conditions by evolutionary and rational metabolic engineering[J/OL]. *Biotechnology Journal*, 2017. DOI:10.1002/biot.201700015.
- [9] Van MARIS AJ, WINKLER AA, PORRO D, van DIJKEN JP, PRONK JT. Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2898-2905.
- [10] HARA KY, KOBAYASHI J, YAMADA R, SASAKI D, KURIYA Y, HIRONO-HARA Y, ISHII J, ARAKI M, KONDO A. Transporter engineering in biomass utilization by yeast[J]. *FEMS Yeast Research*, 2017, 17(7).
- [11] COUSTOU V, BESTEIRO S, BIRAN M, DIOLEZ P, BOUCHAUD V, VOISIN P, MICHELS PAM, CANIONI P, BALTZ T, BRINGAUD F. ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level phosphorylation is essential, but not oxidative phosphorylation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(49): 49625-49635.
- [12] JIA Y, LI JB. Reconstitution of FoF1-ATPase-based biomimetic systems[J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2019, 3: 361-374.
- [13] JUNGE W, NELSON N. ATP synthase[J]. *Annual review of biochemistry*, 2015, 84: 631-57.
- [14] CAI DB, CHEN YZ, HE PH, WANG SY, MO F, LI X, WANG Q, NOMURA CT, WEN ZY, MA X, CHEN SW. Enhanced production of poly- γ -glutamic acid by improving ATP supply in metabolically engineered *Bacillus licheniformis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(10): 2541-2553.
- [15] ZHANG XL, JANTAMA K, MOORE JC, JARBOE LR, SHANMUGAM KT, INGRAM LO. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(48): 20180-20185.
- [16] LIEW F, HENSTRA AM, KÖPKE M, WINZER K, SIMPSON SD, MINTON NP. Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for selective alcohol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 104-114.
- [17] MILNE N, LUTTIK MAH, CUETO ROJAS HF, WAHL A, van MARIS AJA, PRONK JT, DARAN JM. Functional expression of a heterologous nickel-dependent, ATP-independent urease in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 130-140.
- [18] YANG H, ZHU DJ, KAI L, WANG L, ZHANG HJ, ZHANG JH, CHEN XS. Engineering *Streptomyces albus* to enhance ϵ -poly-L-lysine production by introducing a polyphosphate kinase-mediated ATP regeneration system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 51.
- [19] YAMANAKA K, KITO N, IMOKAWA Y, MARUYAMA C, UTAGAWA T, HAMANO Y. Mechanism of epsilon-poly-L-lysine production and accumulation revealed by identification and analysis of an epsilon-poly-L-lysine-degrading enzyme[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(17): 5669-5675.
- [20] ZHANG JG, WANG XD, ZHANG JN, WEI DZ. Oxygen vectors used for S-adenosylmethionine production in recombinant *Pichia pastoris* with sorbitol as supplemental carbon source[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105(4): 335-340.
- [21] GUERREIRO F, CONSTANTINO A, LIMA-COSTA E, RAPOSO S. A new combined approach to improved lipid production using a strictly aerobic and oleaginous yeast[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2019, 19(1): 47-56.
- [22] LIU YH, WANG ZX, CUI ZY, QI QS, HOU J. α -farnesene production from lipid by engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1): 78.
- [23] XUE SJ, JIANG H, CHEN L, GE N, LIU GL, HU Z, CHI ZM, CHI Z. Over-expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) and flavohemoglobin (FHb) genes greatly enhances pullulan production[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 701-709.
- [24] ZHANG Q, CHEN YZ, GAO L, CHEN JG, MA X, CAI DB, WANG D, CHEN SW. Enhanced production of poly- γ -glutamic acid via optimizing the expression cassette of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Bacillus licheniformis*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 7(1): 567-573.
- [25] YOON SH, DO JH, LEE SY, CHANG HN. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22(7): 585-588.
- [26] CHEN HL, WANG Z, WANG ZL, DOU J, ZHOU CL. Improving methionine and ATP availability by MET6 and SAM2 co-expression combined with sodium citrate feeding enhanced SAM accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32: 1-10.
- [27] ANTONOVSKY N, GLEIZER S, NOOR E, ZOHAR Y, HERZ E, BARENHOLZ U, ZELCIBUCH L, AMRAM S, WIDES A, TEPPER N, DAVIDI D, BAR-ON Y, BAREIA T, WERNICK DG, SHANI I, MALITSKY S, JONA G, BAR-EVEN A, MILO R. Sugar synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*[J]. *Cell*, 2016, 166(1): 115-125.
- [28] MORRISON BA, SHAIN DH. An AMP nucleosidase

- gene knockout in *Escherichia coli* elevates intracellular ATP levels and increases cold tolerance[J]. *Biology Letters*, 2008, 4(1): 53-56.
- [29] ZHAO J, LI QY, SUN T, ZHU XN, XU HT, TANG JL, ZHANG XL, MA YH. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 17: 42-50.
- [30] LIU YF, ZHU YQ, MA WL, SHIN HD, LI JH, LIU L, DU GC, CHEN J. Spatial modulation of key pathway enzymes by DNA-guided scaffold system and respiration chain engineering for improved N-acetylglucosamine production by *Bacillus subtilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 61-69.
- [31] BUDIN I, de ROND T, CHEN Y, CHAN LJG, PETZOLD CJ, KEASLING JD. Viscous control of cellular respiration by membrane lipid composition[J]. *Science*, 2018, 362(6419): 1186-1189.
- [32] DAICHO KM, HIRONO-HARA Y, KIKUKAWA H, TAMURA K, HARA KY. Engineering yeast with a light-driven proton pump system in the vacuolar membrane[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 4.
- [33] MARTINEZ A, BRADLEY AS, WALDBAUER JR, SUMMONS RE, DeLONG EF. Proterorhodopsin photosystem gene expression enables photophosphorylation in a heterologous host[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(13): 5590-5595.
- [34] TOYA Y, HIRONO-HARA Y, HIRAYAMA H, KAMATA K, TANAKA R, SANO M, KITAMURA S, OTSUKA K, ABE-YOSHIZUMI R, TSUNODA SP, KIKUKAWA H, KANDORI H, SHIMIZU H, MATSUDA F, ISHII J, HARA KY. Optogenetic reprogramming of carbon metabolism using light-powering microbial proton pump systems[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 72: 227-236.
- [35] SANO M, TANAKA R, KAMATA K, HIRONO-HARA Y, ISHII J, MATSUDA F, HARA KY, SHIMIZU H, TOYA Y. Conversion of mevalonate to isoprenol using light energy in *Escherichia coli* without consuming sugars for ATP supply[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(12): 3966-3972.
- [36] HAVERKORN van RIJSEWIJK BR, NANCHEN A, NALLET S, KLEIJN RJ, SAUER U. Large-scale ^{13}C -flux analysis reveals distinct transcriptional control of respiratory and fermentative metabolism in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7: 477.
- [37] MATSUOKA Y, KURATA H. Modeling and simulation of the redox regulation of the metabolism in *Escherichia coli* at different oxygen concentrations[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 183.
- [38] CAI DB, HU SY, CHEN YZ, LIU L, YANG SH, MA X, CHEN SW. Enhanced production of poly- γ -glutamic acid by overexpression of the global anaerobic regulator *fnr* in *Bacillus licheniformis* WX-02[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 185(4): 958-970.
- [39] BARBA-ALIAGA M, ALEPUZ P. The activator/repressor Hap1 binds to the yeast eIF5A-encoding gene TIF51A to adapt its expression to the mitochondrial functional status[J]. *FEBS Letters*, 2022, 596(14): 1809-1826.
- [40] STEIDLE EA, CHONG LS, WU MX, CROOKE E, FIEDLER D, RESNICK AC, ROLFES RJ. A Novel inositol pyrophosphate phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* Siw14 protein selectively cleaves the β -phosphate from 5-diphosphoinositol pentakisphosphate (5pp-ip5)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(13): 6772-6783.
- [41] QIN N, LI LY, JI X, PEREIRA R, CHEN Y, YIN SL, LI CK, WAN XZ, QIU DY, JIANG JF, LUO H, ZHANG YP, DONG GL, ZHANG YM, SHI SB, JESSEN HJ, XIA JY, CHEN Y, LARSSON C, TAN TW, et al. Flux regulation through glycolysis and respiration is balanced by inositol pyrophosphates in yeast[J]. *Cell*, 2023, 186(4): 748-763.e15.
- [42] YU T, LIU QL, WANG X, LIU XJ, CHEN Y, NIELSEN J. Metabolic reconfiguration enables synthetic reductive metabolism in yeast[J]. *Nature Metabolism*, 2022, 4(11): 1551-1559.
- [43] BOGORAD I W, LIN T S, LIAO J C. Synthetic non-oxidative glycolysis enables complete carbon conservation[J]. *Nature*, 2013, 502(7473): 693-697.
- [44] TAN ZG, CLOMBURG JM, CHEONG S, QIAN S, GONZALEZ R. A polyketide-CoA thiolase-dependent pathway for the synthesis of polyketide backbones[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3: 593-603.
- [45] CUI SX, LV XQ, XU XH, CHEN TC, ZHANG HZ, LIU YF, LI JH, DU GC, LEDESMA-AMARO R, LIU L. Multilayer genetic circuits for dynamic regulation of metabolic pathways[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(7): 1587-1597.
- [46] ESPINEL-RÍOS S, MORABITO B, POHLODEK J, BETTENBROCK K, KLAMT S, FINDEISEN R. Toward a modeling, optimization, and predictive control framework for fed-batch metabolic cybergenetics[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2024, 121(1): 366-379.
- [47] REDDY GK, WENDISCH VF. Characterization of 3-phosphoglycerate kinase from *Corynebacterium glutamicum* and its impact on amino acid production[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 54.
- [48] LI L, ZOU D, JI AY, HE YX, LIU YL, DENG Y, CHEN SW, WEI XT. Multilevel metabolic engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* for production of the platform chemical putrescine from sustainable biomass hydrolysates[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(5): 2147-2157.
- [49] CHO DH, KIM S, LEE YD, SHIN Y, CHOI S, OH J, KIM HT, PARK SH, PARK K, BHATIA SK, YANG YH. Enhanced theanine production with reduced ATP supply by alginate entrapped *Escherichia coli* co-expressing γ -glutamylmethylamide synthetase and polyphosphate kinase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2024, 175: 110394.
- [50] CHEN YW, LIAO Y, KONG WZ, WANG SH. ATP dynamic regeneration strategy for enhancing co-production of glutathione and S-adenosylmethionine in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(12): 2581-2587.
- [51] BU X, LIN JY, CHENG J, YANG D, DUAN CQ, KOFFAS M, YAN GL. Engineering endogenous ABC transporter with improving ATP supply and membrane flexibility enhances the secretion of β -carotene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 168.
- [52] LIANG G, LIAO X, DU G, CHEN J. Elevated

- glutathione production by adding precursor amino acids coupled with ATP in high cell density cultivation of *Candida utilis*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(5): 1432-1440.
- [53] ZHANG YL, PAN L, ZHANG Y, WANG KF, WANG L, ZHANG HJ, ZHANG JH, CHEN XS. Understanding the *Streptomyces albulus* response to low-pH stress at the interface of physiology and transcriptomics[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(7/8): 2611-2626.
- [54] ROSSATTO A, TROCADO dos SANTOS J, ZIMMER FERREIRA ARLINDO M, SARAIVA de MORAIS M, DENARDI de SOUZA T, SARAIVA OGRODOWSKI C. Hyaluronic acid production and purification techniques: a review[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2023, 53(1): 1-11.
- [55] MIROŃCZUK AM, KOSIOROWSKA KE, BIEGALSKA A, RAKICKA-PUSTUŁKA M, SZCZEPAŃCZYK M, DOBROWOLSKI A. Heterologous overexpression of bacterial hemoglobin Vhb improves erythritol biosynthesis by yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 176.
- [56] GLIGONOV IA, BAGAEVA DI, DEMINA GR, VOSTROKNUTOVA GN, VOROZHTSOV DS, KAPRELYANTS AS, SAVITSKY AP, SHLEEVA MO. The accumulation of methylated porphyrins in dormant cells of *Mycolicibacterium smegmatis* is accompanied by a decrease in membrane fluidity and an impede of the functioning of the respiratory chain[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2024, 1866(3): 184270.
- [57] PERSSON LB, AMBATI VS, BRANDMAN O. Cellular control of viscosity counters changes in temperature and energy availability[J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1572-1585.e16.
- [58] YOSHIZAWA S, KUMAGAI Y, KIM H, OGURA Y, HAYASHI T, IWASAKI W, DeLONG EF, KOGURE K. Functional characterization of flavobacteria rhodopsins reveals a unique class of light-driven chloride pump in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(18): 6732-6737.
- [59] PUSHKAREV A, INOUE K, LAROM S, FLORES-URIBE J, SINGH M, KONNO M, TOMIDA S, ITO S, NAKAMURA R, TSUNODA SP, PHILOSOF A, SHARON I, YUTIN N, KOONIN EV, KANDORI H, BÉJÁ O. A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics[J]. *Nature*, 2018, 558(7711): 595-599.
- [60] INOUE K, TSUKAMOTO T, SHIMONO K, SUZUKI Y, MIYAUCHI S, HAYASHI S, KANDORI H, SUDO Y. Converting a light-driven proton pump into a light-gated proton channel[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(9): 3291-3299.
- [61] SCHNEIDER JC, GUARENTE L. Regulation of the yeast *CYT1* gene encoding cytochrome c1 by HAP1 and HAP2/3/4[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(10): 4934-4942.
- [62] MAO YH, CHEN CB. The hap complex in yeasts: structure, assembly mode, and gene regulation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1645.
- [63] HOU L, LIU L, ZHANG H, ZHANG L, ZHANG L, ZHANG J, GAO Q, WANG D. Functional analysis of the mitochondrial alternative oxidase gene (*aox1*) from *Aspergillus niger* CGMCC 10142 and its effects on citric acid production[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2018, 102: 7981-7995.
- [64] ERB TJ, JONES PR, BAR-EVEN A. Synthetic metabolism: metabolic engineering meets enzyme design[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 37: 56-62.
- [65] BILGIN T, WAGNER A. Design constraints on a synthetic metabolism[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39903.
- [66] BAR-EVEN A, NOOR E, LEWIS NE, MILO R. Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(19): 8889-8894.
- [67] DELLOMONACO C, CLOMBURG JM, MILLER EN, GONZALEZ R. Engineered reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals[J]. *Nature*, 2011, 476(7360): 355-359.
- [68] CLOMBURG JM, VICK JE, BLANKSCHEN MD, RODRÍGUEZ-MOYÁ M, GONZALEZ R. A synthetic biology approach to engineer a functional reversal of the β -oxidation cycle[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(11): 541-554.
- [69] CHEN J, GONZALEZ R. Engineering *Escherichia coli* for selective 1-decanol production using the reverse β -oxidation (rBOX) pathway[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 79: 173-181.
- [70] LI J, MU X, DONG WY, CHEN Y, KANG QJ, ZHAO G, HOU J, GONZALEZ R, BAI LQ, FENG Y, YANG C, LIU TG, TAN ZG. A non-carboxylative route for the efficient synthesis of central metabolite malonyl-CoA and its derived products[J]. *Nature Catalysis*, 2024, 7: 361-374.
- [71] MU XY, EVANS TD, ZHANG FZ. ATP biosensor reveals microbial energetic dynamics and facilitates bioproduction[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 5299.
- [72] SANFORD K, CHOTANI G, DANIELSON N, ZAHN JA. Scaling up of renewable chemicals[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 38: 112-122.
- [73] VANDERMIES M, FICKERS P. Bioreactor-scale strategies for the production of recombinant protein in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(2): 40.
- [74] ESPINEL-RÍOS S, BETTENBROCK K, KLAMT S, FINDEISEN R. Maximizing batch fermentation efficiency by constrained model-based optimization and predictive control of adenosine triphosphate turnover[J]. *AIChE Journal*, 2022, 68(4): e17555.
- [75] ESPINEL-RÍOS S, MORABITO B, POHLODEK J, BETTENBROCK K, KLAMT S, FINDEISEN R. Optimal control and dynamic modulation of the ATPase gene expression for enforced ATP wasting in batch fermentations[J]. *IFAC-PapersOnLine*, 2022, 55(7): 174-180.
- [76] HOFFMAN SM, TANG AY, AVALOS JL. Optogenetics illuminates applications in microbial engineering[J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2022, 13: 373-403.
- [77] de VRIEZE J, de MULDER T, MATASSA S, ZHOU JZ, ANGENENT LT, BOON N, VERSTRAETE W. Stochasticity in microbiology: managing unpredictability to reach the Sustainable Development Goals[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(4): 829-843.