

· 宿主篇 ·

王钰 中国科学院天津工业生物技术研究所副研究员、硕士生导师，2016年于上海交通大学获得博士学位。主要从事工业微生物高效基因组编辑工具的开发和碳一原料的生物转化研究。以第一/通讯作者在 *Trends Biotechnol*、*Metab Eng*、*Green Chem*、*Biosens Bioelectron*、*JBC* 等期刊发表论文 20 余篇，申请专利 10 余项。现主持国家自然科学基金面上项目、国家自然科学基金青年项目、科技部重点研发计划合成生物学专项子课题等项目。曾获上海市明治生命科学奖、天津市优秀科技志愿者等荣誉。



郑平 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员、博士生导师，入选天津市滨海新区“131”人才工程，天津市三八红旗手。长期从事细菌的代谢工程和系统生物学研究，致力于创建绿色、高效、低成本的生物制造体系，提升推动传统生物及化工企业转型升级。先后在 *Metab Eng*、*ACS Synth Biol*、*Biotechnol Biofuels*、*AEM* 等国际学术期刊上发表论文 60 余篇，申请中国专利 50 余项，PCT 专利 3 项，获得授权 22 项，其中，日本、美国等国际专利授权 6 项。



谷氨酸棒杆菌的代谢工程使能技术研究进展

王钰^{1,2}，郑平^{1,2}，孙际宾^{1,2}

1 中国科学院系统微生物工程重点实验室 天津工业生物技术研究所，天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心，天津 300308

王钰，郑平，孙际宾. 谷氨酸棒杆菌的代谢工程使能技术研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1603-1618.

Wang Y, Zheng P, Sun JB. Recent advances in developing enabling technologies for *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1603-1618.

摘要: 谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 是重要的工业微生物，尤其是在氨基酸工业中，每年用于 600 余万 t 氨基酸的生物制造。近年来，谷氨酸棒杆菌代谢工程使能技术正在不断完善，不仅加快了细胞工厂的创建和优化，拓展了底物谱和产物谱，也推动了谷氨酸棒杆菌的基础研究，使谷氨酸棒杆菌成为代谢工程的理想底盘细胞。文中综述了近期针对谷氨酸棒杆菌开发的代谢工程使能技术，着重介绍了基于 CRISPR 的基因组编辑、

Received: October 11, 2020; **Accepted:** December 2, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0901400). National Natural Science Foundation of China (Nos. 32070083, 31870044).

Corresponding authors: Yu Wang. Tel/Fax: +86-22-84861943; E-mail: wang_y@tib.cas.cn

Ping Zheng. Tel/Fax: +86-22-84861994; E-mail: zheng_p@tib.cas.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0901400)，国家自然科学基金 (Nos. 32070083, 31870044) 资助。

网络出版时间: 2020-12-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201221.1102.007.html>

基因表达调控、适应性进化和生物传感器等技术的开发和应用。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, 代谢工程, 基因组编辑, 表达调控, 适应性进化, 生物传感器

Recent advances in developing enabling technologies for *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering

Yu Wang^{1,2}, Ping Zheng^{1,2}, and Jibin Sun^{1,2}

¹ Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Tianjin 300308, China

² National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

Abstract: *Corynebacterium glutamicum* is an important workhorse of industrial biotechnology, especially for amino acid bioindustry. This bacterium is being used to produce various amino acids at a level of over 6 million tons per year. In recent years, enabling technologies for *C. glutamicum* metabolic engineering have been developed and improved, which accelerated construction and optimization of microbial cell factories, expanding spectra of substrates and products, and facilitated basic researches on *C. glutamicum*. With these technologies, *C. glutamicum* has become one of the ideal microbial chassis. This review summarizes recent key technological developments of enabling technologies for *C. glutamicum* metabolic engineering and focuses on establishment and applications of CRISPR-based genome editing, gene expression regulation, adaptive laboratory evolution, and biosensor technologies.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, metabolic engineering, genome editing, expression regulation, adaptive laboratory evolution, biosensor

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 是一株来源于土壤的革兰氏阳性细菌。20 世纪 50 年代, 日本协和发酵工业株式会社首次开发了谷氨酸棒杆菌发酵生产 L-谷氨酸的工艺, 展示了该菌在氨基酸工业生产中的巨大潜力^[1]。目前, 谷氨酸棒杆菌每年被用于生产包括 L-谷氨酸和 L-赖氨酸在内的 600 余万 t 氨基酸产品^[2]。由于具有生物安全 (被美国 FDA 认定为 GRAS, Generally regarded as safe)、生长速度快、营养需求低、底物谱广等优势, 谷氨酸棒杆菌被认为是生物制造的理想微生物底盘^[3]。

由于谷氨酸棒杆菌的重要应用价值, 大量研究致力于开发可用于该微生物遗传改造的工具方法。20 世纪 90 年代初, 研究者建立了谷氨酸棒杆菌的外源 DNA 转化方法, 使用基于自杀质粒的同源重组和转座子插入等方法, 实现了基因组的改造。21 世纪初, 德国和日本的研究人员分别公布了模式菌株 ATCC 13032 的全基因组序列, 为

深入理解和系统改造谷氨酸棒杆菌奠定了基础^[4]。代谢工程概念的提出, 转变了研究人员长期依赖诱变筛选策略获得新菌种的育种模式, 转而用更理性的方式对谷氨酸棒杆菌的代谢和调控网络进行改造和重构, 极大地加速了谷氨酸棒杆菌的应用和基础研究^[5]。目前谷氨酸棒杆菌已被改造用于氨基酸、有机酸、醇类、植物天然产物、蛋白质等 70 余种产品的生物制造, 产值超过千亿元^[2,6]。文中总结了针对谷氨酸棒杆菌开发的基因组编辑、基因表达调控、适应性进化、生物传感器等代谢工程使能技术, 并概述了这些使能技术在创建谷氨酸棒杆菌细胞工厂中的应用。

1 基于 CRISPR 的基因组编辑

CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) 系统已广泛应用于多种真核和原核生物的基因组编辑^[7]。但该系统对谷氨酸棒杆菌的毒性较大,

直至 2017 年, CRISPR/Cas12a (CRISPR/Cpf1) 和 CRISPR/Cas9 系统才成功应用于谷氨酸棒杆菌的遗传改造^[8-10]。借助 CRISPR/Cas 系统的高效反筛能力, 大片段基因敲除和敲入效率得到提高, 操作流程得到简化^[10]。进一步结合 RecT 介导的单链 DNA 重组^[10-12]和碱基脱氨酶催化的胞嘧啶/腺嘌呤脱氨^[13-15], 还可实现染色体的小幅改动和多靶点同时编辑, 极大地丰富了谷氨酸棒杆菌的遗传改造方法, 为谷氨酸棒杆菌的代谢工程和合成生物学研究提供了技术支持 (图 1)。

1.1 基因敲除和敲入

敲除内源基因和敲入外源基因是重构微生物代谢和调控的基本策略。基于自杀质粒 pK18mobsacB 的经典方法已经广泛应用于谷氨酸棒杆菌的基因敲除和敲入, 几乎可以在染色体任何位置进行遗传改造^[16]。但是, 该方法需要进行两轮同源重组和两轮筛选, 分别使用抗生素抗性基因和蔗糖致死基因 *sacB* 作为筛选标记, 后者易被失活, 导致反向筛选失效; 尤其在敲除对生长造成负面影响的基因时, 成功率较低。借助 CRISPR/Cas 系统, 可实现更高效的反向筛选, 从而富集被成功编辑的细胞。该方法的原理为, 在未编辑的细胞中, Cas 蛋白在引导 RNA (Guide RNA, gRNA) 的引导下, 通过识别前间隔序列邻近基序 (Protospacer adjacent motif, PAM) 序列和靶序列, 结合到特定位点, 并引入对细菌致死的双链 DNA 切割 (Double-stranded DNA break, DSB); 而在成功编辑的细胞中, 靶位点被改变, 因此 Cas-gRNA 复合体无法结合并引入 DSB, 细胞得以存活 (图 1A)^[17]。

目前应用最为广泛的 CRISPR/Cas 系统为来自酿脓链球菌 *Streptococcus pyogenes* 的 CRISPR/Cas9 系统。该系统识别 NGG 的 PAM 序列, 结合特异性高, 切割效率高, 非常适合于高 GC 含量的谷氨酸棒杆菌基因组编辑。但是, 研究发现, 携带 *cas9* 基因的质粒难以转化进入谷氨酸

棒杆菌, 说明谷氨酸棒杆菌对 Cas9 造成的细胞毒性较为敏感^[9]。Jiang 等使用新凶手弗朗西斯菌 *Francisella novicida* 的 *FnCas12a* 代替 Cas9 进行基因组编辑。*Fncas12a* 和 gRNA 的表达盒, 以及同源重组所需 DNA 模板可整合在一个工具质粒上, 利用该系统, 作者实现了最长 7.5 kb 的片段敲除, 效率最高达到 (46.7±9.4)%^[9]。但是, *FnCas12a* 识别富含 T 的 PAM 序列 TTTN, 这导致其在高 GC 含量的谷氨酸棒杆菌基因组中的靶位点数量受限。

与此同时, Liu 等和 Peng 等分别开发了适用于谷氨酸棒杆菌的 CRISPR/Cas9 系统, 实现了高效的大片段敲除和敲入。两个研究均使用了双质粒系统, 分别用于表达 *cas9* 和 gRNA+同源臂片段^[10,18]。以 Liu 等报道的方法为例, 首先, 选择严谨的 *P_{lac}* 启动子减少 *cas9* 的泄露表达, 克服 Cas9 的细胞毒性; 使用 *T_{rmB}* 终止子替代酿脓链球菌 gRNA 的终止子, 提高 gRNA 转录终止效率, 成功在谷氨酸棒杆菌中构建了基于 CRISPR/Cas9 的反向筛选系统, 实现了利用质粒携带同源臂片段进行基因敲除。但是, 敲除过程中仍发现大量的假阳性转化子, 对其中的工具质粒进行测序, 作者发现 *cas9* 基因内部存在失活基因的随机突变。为降低假阳性率, 开发了双质粒一步共转化结合平板筛选的策略, 尽量缩短工具质粒在细胞中的复制时间, 减少 *cas9* 基因突变失活的概率。该策略成功提升了基因敲除和敲入效率, 在模式菌株 ATCC 13032 中分别达到 60% 和 62.5%, 在模式菌株 ATCC 13869 和谷氨酸工业菌株 SL4 中也可实现高效的编辑^[10]。随后, 有多个研究团队对基于 CRISPR/Cas 的谷氨酸棒杆菌基因敲除和敲入方法进行了系统优化, 不断提升编辑效率^[11,19-22]。

1.2 单链 DNA 重组

谷氨酸棒杆菌中外源双链 DNA (Double-stranded DNA, dsDNA) 模板与染色体 DNA 的同源重组效率较低, Binder 等在谷氨酸棒杆菌中表

达异源的 RecT, 实现了外源单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA) 模板与染色体 DNA 高效的同源重组^[23]。但是当时缺乏有效的突变体筛选方法, 只能借助流式细胞分选技术 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) 筛选具有特殊表型, 如具有荧光信号输出的突变体。谷氨酸棒杆菌中 CRISPR/Cas 系统的建立, 使得筛选 ssDNA 重组编辑的突变体成为可能 (图 1B)。CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cas12a 系统均成功与 ssDNA 重组相结合, 用于谷氨酸棒杆菌染色体 DNA 的小幅改动, 编辑效率高达 100%^[8-10,12]。使用该方法, 一次可获得数百个正确编辑的克隆。因此, 该方法被用于构建靶基因单个位点的突变文库。Jiang 等和 Krumbach 等分别利用该方法构建了 γ -谷酰基激酶和机械敏感通道蛋白 MscCG 的单氨基酸突变文库, 筛选得到解除产物反馈抑制和外排谷氨酸能力增强的突变体^[9,12]。ssDNA 重组高效的编辑能力, 使得同时编辑多个靶点成为可能。Liu 等使用两条 ssDNA, 表达两个 gRNA, 结合 CRISPR/Cas9 筛选, 成功实现了双基因的同时编辑, 效率达到 40%。但是, 双靶点编辑使获得的克隆数大幅下降 (约 10 个), 难以进行更多靶点的同时编辑^[10]。

1.3 碱基编辑

上述基因组编辑方法均基于 dsDNA 或 ssDNA 模板与染色体 DNA 的同源重组, 以及 CRISPR/Cas 系统对未发生同源重组细胞的反向筛选。但是, 一方面谷氨酸棒杆菌的同源重组效率较低, 另一方面, 具有 dsDNA 切割活性的 Cas 蛋白对细胞的毒性较强, 导致被成功编辑的细胞数量较少, 难以实现多于 2 个靶点的同时编辑^[10]。基于以上考虑, 新兴的碱基编辑 (Base editing) 技术被应用于谷氨酸棒杆菌的基因组编辑^[13-15]。2016 年 Komor 等和 Nishida 等分别开发了真核细胞的 BE (Base editor) 和 Target-AID (Target-

activation-induced cytidine deaminase) 碱基编辑技术^[24-25]。该技术将 CRISPR/Cas 系统的定位功能和碱基脱氨酶的脱氨功能相结合, 使用 dsDNA 切割功能受损的 Cas 突变体 (dCas 或 nCas) 与碱基脱氨酶的融合蛋白, 在 gRNA 的引导下, 将靶位点的胞嘧啶 (C) 脱氨生成尿嘧啶 (U), U 在 DNA 复制过程中被 DNA 聚合酶识别为胸腺嘧啶 (T), 借此实现靶位点 C-T 的碱基转换 (Transversion) (图 1C)。之后, 研究者陆续开发了可实现 A-G 转换、C-A 颠换 (Transition) 和 C-G 颠换的碱基编辑技术^[26-28]。

由于碱基编辑不依赖于外源 DNA 模板与染色体 DNA 的同源重组, 不产生对细菌致死的 DSB, 因此非常适合于谷氨酸棒杆菌等细菌的基因组编辑, 尤其是多靶点的同时编辑^[29]。Wang 等首先在谷氨酸棒杆菌中建立了 Target-AID 系统并进行了系统的测试。nCas9(D10A)-AID 的融合蛋白比 dCas9-AID 和 nCas9(H840A)-AID 具有更高的编辑效率, 可在 PAM 区 5'上游-20 至-16 位 (PAM 序列 NGG 为 0 至 2 位) 高效地引入 C-T 转换, 对单靶点、双靶点和三靶点的编辑效率可分别达到 100%、87.2%和 23.3%。C-T 转换可用于在基因内部制造终止密码子 (例如 CAA 转换为 TAA), 从而失活靶基因, 达到与基因敲除类似的效果。作者利用 Target-AID 的多靶点高效编辑能力, 构建了 *pyk*、*ldhA* 和 *odhA* 等 3 基因的组合失活文库, 并结合高通量筛选, 筛选出最有利于 L-谷氨酸生产的基因组合失活模式, 为快速研究多基因的组合功能提供了借鉴^[14]。

基于 nCas9(D10A)-AID 的碱基编辑方法, 需要识别 NGG 的 PAM 序列, 才可在 PAM 序列的 5'上游进行碱基编辑, 这限制了谷氨酸棒杆菌基因组中可编辑的靶点数量。为此, Wang 等使用多个具有不同 PAM 偏好性的 nCas9(D10A) 突变体, 如 nCas9-NG 和 xnCas9 3.7 等, 使碱基编辑器可

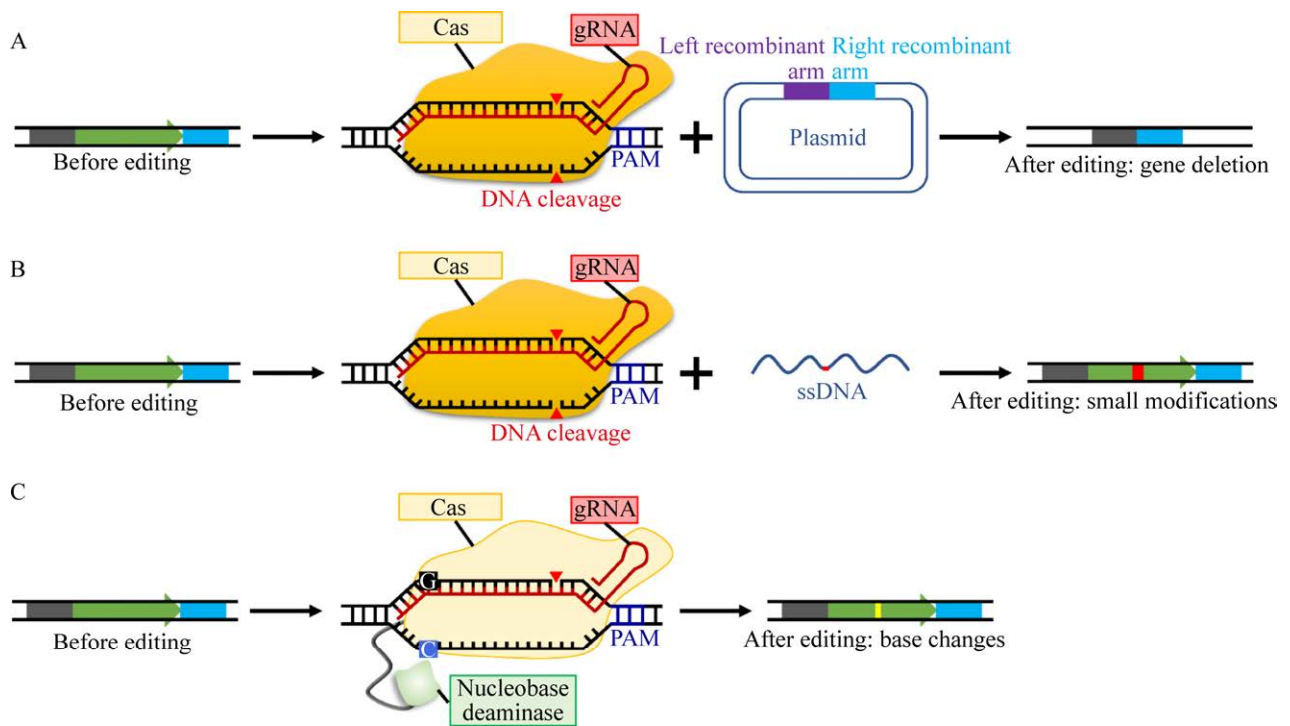


图1 基于 CRISPR 的谷氨酸棒杆菌基因组编辑技术

Fig. 1 CRISPR-based genome editing technologies for *C. glutamicum*. (A) CRISPR/Cas-mediated gene deletion with plasmid-borne templates. (B) CRISPR/Cas-mediated ssDNA recombineering for introducing small modifications with ssDNA templates. (C) Base editing with nCas-nucleobase deaminase fusion protein for introducing base changes.

识别的 PAM 从 NGG 扩展为 NG, 将用于制造终止密码子失活基因的可编辑靶点数量提高了 3.9 倍。在模式菌株 ATCC 13032 的 3 099 个基因中, 3 075 个基因可通过改进后的碱基编辑方法失活。为拓展碱基编辑的类型, 作者在谷氨酸棒杆菌中重现了哺乳动物细胞的腺嘌呤碱基编辑技术 (Adenine base editing), 实现了 A-G 转换^[13]。之后, 李俊维等对培养基、诱导剂用量、编辑时长等进行了系统优化, 进一步提升了 Target-AID 在谷氨酸棒杆菌中的编辑效率^[30]。此外, 黄华媚等在谷氨酸棒杆菌中开发了基于 BE 的胞嘧啶碱基编辑器^[31]; Deng 等在谷氨酸棒杆菌中将胞嘧啶和腺嘌呤碱基编辑技术融合, 构建了一个双功能的碱基编辑器, 可在靶位点附近同时实现 C-T 和 A-G 转换, 在对靶位点进行突变时, 可获得更多样的单核苷酸多态性^[15]。

2 基因表达调控

2.1 启动子与 RBS 元件

调控基因的表达水平是常用的代谢工程策略。使用具有不同强度的启动子和核糖体结合位点 (Ribosome binding site, RBS), 可分别在转录和翻译水平对靶基因的表达水平进行精细的调控。Albersmeier 等通过对谷氨酸棒杆菌的转录起始位点进行系统的分析, 鉴定了大量内源的启动子, 为进一步的启动子表征和应用奠定了基础^[32]。Shang 等对 16 个内源启动子进行了表征, 这些启动子可覆盖 31 倍的表达强度, 利用它们调控 *sucCD* 的表达, 可提高 L-赖氨酸的产量^[33]。Li 等基于 RNA 测序数据, 对谷氨酸棒杆菌中 90 个 200–500 bp 的启动子-5'-UTR 序列进行了表达强度表征, 鉴定了比常用组成型启动子 P_{sod} -UTR 强 5 倍的启动子 $P_{NCgl1676}$ -UTR, 以及受 L-甲硫氨酸

激活的启动子 P_{brnF} -UTR 和受 L-赖氨酸抑制的启动子 $P_{NCgl1202}$ -UTR^[34]。王迎春等基于时间序列转录组筛选到谷氨酸棒杆菌高效的内源组成型启动子 P_{cysK} 、 P_{gapA} 和 P_{fumC} ，其中最强的 P_{cysK} 启动子在部分测试菌株中强于 IPTG 诱导型启动子 P_{tac} ^[35]。

除内源启动子外，研究者还开发了大量适用于谷氨酸棒杆菌的异源和合成启动子。例如，Kortmann 等将来自大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 的 T7 表达系统转移至谷氨酸棒杆菌，实现了靶基因的严谨可控和高水平的表达^[36]。Yim 等利用 70 bp 的随机序列构建了一个合成启动子文库，使用绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 作为报告基因，结合 FACS 筛选获得 20 个具有不同强度的组成型启动子元件，荧光强度介于 100–1 200 之间^[37]。Patek 等基于谷氨酸棒杆菌启动子-10 区保守序列和大肠杆菌-35 区保守序列，并在-35 区上游添加一段额外的富含 AT 的序列，构建了 4 个组成型启动子文库。此外，作者还以大肠杆菌的 *lac* 启动子为基础，对-35 区和-10 区间的 17 bp 进行随机突变，构建了一个诱导型启动子文库，诱导强度范围为 7–59 倍^[38]。构建合成启动子文库，调控基因表达已成为谷氨酸棒杆菌代谢工程的常用策略，已被用于 L-苏氨酸、四氢嘧啶等高值化合物生产菌株的构建和改造^[39-42]。

目前谷氨酸棒杆菌中使用的诱导型启动子，通常具有一定程度的泄露表达，当基因表达产物有毒性或影响中心代谢时，需要更严谨的诱导表达系统和代谢开关。Wiechert 等借助谷氨酸棒杆菌的异种沉默 (Xenogeneic silencing) 蛋白 CgpS 和葡萄糖酸响应调控因子 GntR，构建了一个严谨的葡萄糖酸诱导激活和诱导沉默系统。该系统使用了融合了噬菌体启动子 P_{priP} 和 GntR 结合域的合成启动子，当不添加葡萄糖酸时，GntR 与启动子结合，阻止了 CgpS 与启动子的结合，下游基因的转录被激活；当添加 GntR 的效应物葡萄糖

酸时，葡萄糖酸与 GntR 结合，导致 GntR 从启动子处脱落，CgpS 与启动子结合，抑制下游基因的表达。该诱导型启动子被用于调节丙酮酸脱氢酶复合体的表达，实现细胞生长和 L-缬氨酸生产状态的切换^[43]。

在细胞特定生长时期激活转录的自诱导型启动子可避免诱导剂的使用，在基因表达调控中也具有广泛的应用。Kim 等发现 sigma 因子 B (SigB) 依赖型的 P_{cg3141} 启动子在对数期与稳定期的过渡时期被激活，以此为基础，作者构建了合成启动子文库，筛选得到比野生型启动子诱导幅度高 3.5 倍，最高表达强度高 20 倍的自诱导型启动子，并用于谷胱甘肽硫转移酶的表达^[44]。

除了启动子文库，RBS 文库也常用于谷氨酸棒杆菌的基因表达调控。Zhang 等以 AAAGG(N)₆₋₉ 序列进行 RBS 文库构建，并使用了靶基因与 GFP 的融合蛋白作为报告系统，针对莽草酸合成途径的 *aroGBDE* 基因进行 RBS 表征和筛选。通过在文库中选择不同强度的 RBS，作者优化了 *aroGBDE* 基因的表达水平，提高了莽草酸的产量^[45]。此外，Schneider 等和 Henke 等的研究表明，RBS 与下游基因起始密码子之间的序列也显著影响靶基因表达，通过对该区域进行文库构建，优化相关基因的表达，可提高丁二胺和虾青素等产物的产量^[46-47]。

2.2 CRISPR 干扰

当需要抑制细胞生长必需基因，或者需要研究大量靶基因的表达弱化对细胞生长和代谢的影响时，对靶基因进行编辑将非常困难，且耗时耗力。因此，需要方便、高效的基因表达弱化工具。CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 技术是使用 DNA 切割功能失活的 Cas 突变体 (Catalytically inactivated Cas, dCas)，在 gRNA 的引导下，结合到靶基因位置，影响 RNA 聚合酶的结合，从而抑制靶基因的转录 (图 2A)^[48]。Cleto 等最先在谷氨酸棒杆菌中开发了基于 CRISPR/dCas9 的 CRISPRi 方法。该方法使用双质粒系统和 IPTG

诱导型启动子 P_{tac} 控制 dCas9 和 gRNA 的表达, 以 pgi 、 pck 和 pyk 作为靶基因, 当靶向基因的非模板链时, 弱化效率均可达到 97% 以上, 可获得与基因敲除相似的 L-赖氨酸和 L-谷氨酸产量提升效果^[6]。Park 等同样使用了类似的双质粒系统, 分别以四环素诱导型启动子和组成型启动子控制 dCas9 和 gRNA 的表达, 并通过同时表达两个 gRNA, 实现了双基因的表达弱化^[49], 作者使用该方法快速鉴定了谷氨酸棒杆菌中未知的羧酸酯酶编码基因^[50]。该研究团队随后构建了一个单质粒的 CRISPRi 系统, 并在基因工程谷氨酸棒杆菌中通过弱化 acn 基因提高了丁酸产量^[51], 通过弱化 $idsA$ 基因提高了角鲨烯产量^[52]。Gauttam 等同样构建了一个单质粒 CRISPRi 系统, 但是分别使用四环素和 IPTG 诱导型启动子控制 dCas9 和 gRNA 的表达, 也可用于双基因的同时弱化^[53]。

基于 CRISPR/dCas9 的 CRISPRi 工具可高效抑制靶基因的表达。但是, Cas9 无法自加工 gRNA 阵列 (gRNA array) 形成多个成熟的 gRNA (Mature gRNA)。因此, 在同时靶向多个基因时, 需要在质粒上插入多个启动子、终止子等序列高度相似的 gRNA 表达盒, 导致质粒构建过程烦琐, 质粒稳定性差。因此, 目前只有使用 CRISPR/dCas9 进行双基因弱化的报道^[49,53]。CRISPR/Cas12a 具有切割 RNA 和 DNA 的双重功能, 可加工 gRNA 阵列成为单个的成熟 gRNA, 在多基因调控中有明显的优势。Li 等利用 DNA 切割功能失活的 dCas12a 和一个 gRNA 阵列, 实现了 $gltA$ 、 pck 、 pgi 和 hom 等 4 个基因的同时弱化, 每个基因的弱化效率均超过 90%, 可快速筛选有利于 L-赖氨酸生产的表型^[54]。Liu 等使用具有 RNA 和 DNA 切割活性的 Cas12a, 结合截短的 gRNA (15 nt 或 16 nt), 不会引入 DSB, 但可实现高效的基因表达弱化^[19]。

2.3 人工小 RNA 介导的基因表达弱化

不同于在转录水平抑制基因表达的 CRISPRi 技术, 人工小 RNA (Synthetic small regulatory

RNA, sRNA) 可在翻译水平实现基因表达弱化。该技术的原理为 sRNA 与其分子伴侣蛋白 Hfq 形成复合体, 与靶基因的 mRNA 结合, 并招募 RNA 酶降解 mRNA, 实现基因表达弱化 (图 2B)^[55]。Sun 等使用大肠杆菌来源的 MicC sRNA 结构和 Hfq, 在谷氨酸棒杆菌中建立了该系统。sRNA 的表达盒和 hfq 基因均由组成型启动子 P_{HIF} 控制。sRNA 包含与靶 mRNA 互补的 24 bp 结合区, 以及 MicC 结构域。通过对报告基因 gfp 和内源基因 pyk 、 $ldhA$ 和 $odhA$ 的测试, 该系统对靶基因的表达弱化效率超过 80%, 有望加快谷氨酸棒杆菌的代谢工程研究^[56]。

3 适应性进化

新型的基因组编辑与基因表达调控技术提高了研究人员对谷氨酸棒杆菌的代谢改造和调控能力。但是对于一些遗传靶点未知或代谢调控机制复杂的生物学表型, 难以通过理性的遗传改造实现。适应性进化技术在此方面有独特的优势, 已

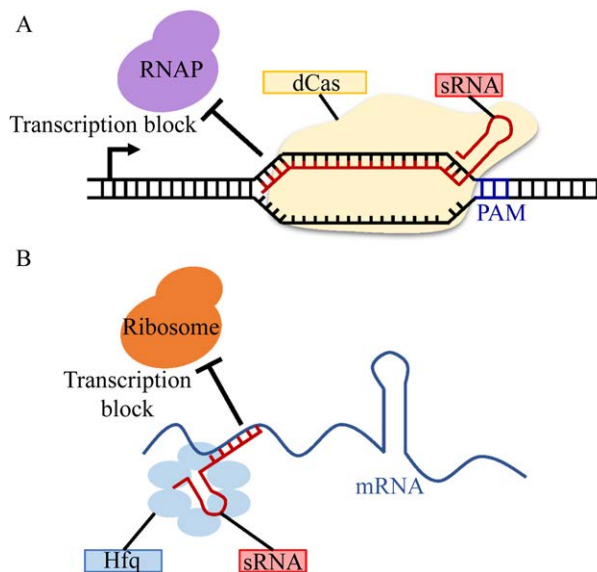


图 2 谷氨酸棒杆菌的转录和翻译抑制技术
Fig. 2 Technologies for transcription and translation repression in *C. glutamicum*. (A) Transcription repression via CRISPRi. (B) Translation repression via synthetic sRNA.

被广泛应用于提高谷氨酸棒杆菌的生长速度、压力耐受性和底物利用能力等, 在提高小分子化合物的合成能力方面也展现出应用潜力^[57]。

3.1 直接适应性进化

在特定条件下直接对菌株进行适应性进化是最常用的进化方法, 适合于提高菌株的生长速度和压力耐受性等。生长速度是菌株的一个关键指标, 对于代谢工程应用十分重要。多个团队尝试提高谷氨酸棒杆菌在基本培养基中利用葡萄糖的生长速度^[58-60]。例如, Pfeifer 等通过适应性进化, 将谷氨酸棒杆菌的比生长速率提高至 0.67 h^{-1} , 较出发菌株提高了 26%, 并鉴定了 *pyk*、*fruK* 和 *corA* 等基因的关键突变^[59]。Graf 等在不含原儿茶酸的培养基中对谷氨酸棒杆菌进行进化, 筛选获得了可在不含原儿茶酸的基本培养基中快速生长的突变株, 比生长速度达到 0.54 h^{-1} ^[61]。

针对谷氨酸棒杆菌在工业化应用中可能面临的环境压力和抑制因子, 研究者通过在逆境下对谷氨酸棒杆菌进行适应性进化, 提高了菌株的耐受性。Oide 等和 Leszczewicz 等通过高温下的适应性进化, 提高了谷氨酸棒杆菌在高于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下的生长速度^[62-63]。Oide 等还发现高温耐受突变株同时具有更强的有机溶剂耐受性, 通过对突变株的基因组分析, 推测耐受表型可能与能量代谢的变化相关^[62]。廉价生物质原料如木质纤维素水解液中常含有糠醛等抑制微生物生长的化合物, Wang 等使用含有玉米秸秆水解液的培养基中连续培养谷氨酸棒杆菌, 筛选获得了对糠醛、香兰素、乙酸等抑制物具有更强耐受性和降解能力的突变株^[64]。

3.2 代谢途径改造辅助的适应性进化

当需要提高菌株对非天然碳源的利用能力或特定酶的活性时, 可首先对菌株的代谢途径进行理性改造, 将菌株对特定底物的利用能力或特定酶的催化活性与细胞生长速度偶联, 再结合适应性进化获得理想的突变株或突变体。为提高谷氨

酸棒杆菌对廉价一碳原料甲醇的利用能力, Tuyishime 等在谷氨酸棒杆菌中引入了异源的甲醇利用途径, 并敲除了戊糖磷酸途径的 *rpiB* 基因, 将甲醇利用与细胞生长相偶联, 构建了甲醇依赖型菌株; 进而通过甲醇和木糖共利用的适应性进化, 将菌株利用甲醇的生长速度提高了 20 倍^[65]。Wang 等进一步在高甲醇浓度下对甲醇依赖型菌株进行第二轮进化, 提高甲醇耐受性的同时提高了菌株对甲醇的利用速率^[66]。为提高丙酮酸的供给, 为 L-缬氨酸合成提供更多前体, Schwentner 等^[67]敲除了谷氨酸棒杆菌的草酰乙酸回补基因 *ppc* 和 *pyc*, 但是严重影响了菌株利用葡萄糖的生长速度, 经过适应性进化, 菌株以葡萄糖为唯一碳源的生长速度恢复到 0.31 h^{-1} 。通过对突变株的测序, 发现突变株的异柠檬酸脱氢酶失活, 乙醛酸支路激活, 从而增强草酰乙酸的回补, 该菌株同时表现出更强的 L-缬氨酸合成能力^[67]。

通过对内源代谢途径进行改造, 可将关键酶的活性与菌株生长速度相关联, 快速对靶标酶的活性进行进化。例如, Dele-Osibanjo 等通过失活谷氨酸棒杆菌的果糖-6-磷酸激酶 (6-phosphofructokinase, PFK), 阻断糖酵解途径, 并引入异源的转酮酶 (Phosphoketolase, PKT), 使细胞通过非氧化糖酵解 (Non-oxidative glycolysis, NOG) 代谢葡萄糖。借此, 将细胞生长速度与 PKT 的活性相关联。进一步将 PKT 的随机突变文库转入 PFK 敲除的突变株中, 通过简单的连续传代培养, 富集筛选到高活性的 PFK 突变体, 展示了代谢工程结合适应性进化在酶定向进化中的应用前景^[68]。

3.3 荧光报告系统辅助的适应性进化

当需要进化的表型难以与细胞生长相关联时, 可通过报告系统将目标表型转化为易于检测和筛选的信号, 实现高通量和高选择性的进化, 加快菌株表型的提升速度。由于荧光蛋白输出的荧光信号易于检测, 可使用 FACS 进行高通量筛选, 因此, 荧光报告系统是目前最常使用的报告

系统之一。Choi 等为提高谷氨酸棒杆菌的重组蛋白表达量,以 *gfp* 为报告基因,在适应性进化过程中,使用 FACS 分选荧光信号较强的细胞,再继续进行传代进化,共经过 7 代进化和筛选,获得了荧光信号提升 4.5 倍的突变株。进一步的测序分析表明,该突变株中质粒的 *parB* 基因突变,使质粒拷贝数提升约 10 倍,致使 GFP 表达水平大幅提升^[69]。另一种常用的进化筛选方式是借助生物传感器 (Biosensor),将特定代谢物的浓度信息转化为易于检测的荧光信号或抗生素抗性,实现高效的适应性进化^[70]。

4 生物传感器

生物传感器是一种将生物物质浓度转化为电信号、荧光信号等易于检测的信号装置,包含信号识别元件和信号输出元件,可辅助适应性进化,加快进化过程,还可用于高通量筛选、代谢途径的优化与动态调控、细胞成像等。常用的生物传感器主要包括基于转录调控因子 (Transcription factor, TF)、核糖体开关 (Riboswitch) 和蛋白质相互作用 (例如荧光共振能量转移 Förster resonance energy

transfer, FRET) 的生物传感器 (表 1)^[71]。最近,研究者还开发了基于稀有密码子的新型生物传感器,并应用于氨基酸生产菌的高通量筛选^[72]。

4.1 转录调控因子

Lrp 是谷氨酸棒杆菌中响应 L-甲硫氨酸和支链氨基酸 (L-亮氨酸、L-缬氨酸和 L-异亮氨酸) 的转录调控因子。Lrp 可响应胞内 L-甲硫氨酸和支链氨基酸的浓度,并激活外排蛋白 BrnFE 的表达,以维持胞内正常的氨基酸浓度^[73]。Mustafi 等发现 Lrp 对 L-缬氨酸的亲和力最强,并以黄色荧光蛋白 (Enhanced yellow fluorescent protein, eYFP) 作为报告系统,构建了可监测胞内 L-缬氨酸浓度的生物传感器^[74]。之后,该生物传感器被应用于从随机突变文库中筛选可胞外积累支链氨基酸的突变株^[74-75],以及在单细胞水平监测细胞的 L-缬氨酸合成能力的差异^[76]。Mahr 等使用 Lrp 生物传感器,将胞内的 L-缬氨酸浓度转化为 eYFP 的表达量,在适应性进化中,通过 FACS 筛选荧光信号较高的细胞,通过 5 代进化和筛选,获得了 L-缬氨酸产量提升一倍的突变株,并鉴定到脲酶辅助蛋白 UreD 的关键突变^[70]。Tan 等进一步对

表 1 应用于谷氨酸棒杆菌的生物传感器

Table 1 Biosensors developed for *C. glutamicum*

Sensor	Type	Source	Analyte	Signal	References
Lrp	TF	<i>C. glutamicum</i>	L-valine, L-isoleucine, L-leucine, L-methionine	eYFP, GFP, TetA	[70,74-77]
LysG	TF	<i>C. glutamicum</i>	L-lysine, L-arginine, L-histidine	eYFP	[78-80]
NCgl0581	TF	<i>C. glutamicum</i>	L-serine	eYFP	[81]
GlxR	TF	<i>C. glutamicum</i>	cAMP	eYFP	[82]
ShiR	TF	<i>C. glutamicum</i>	Shikimate	eGFP	[83]
CrtR	TF	<i>C. glutamicum</i>	Geranylgeranyl pyrophosphate	GFP	[84]
PadR	TF	<i>B. subtilis</i>	<i>p</i> -coumaric acid	YFP	[85]
CgtSR2 ^a	TF	<i>C. glutamicum</i>	Protein secretion	eYFP	[86]
LAO-BP	FRET	<i>E. coli</i>	L-lysine	eCFP, Citrine	[87]
MglB	FRET	<i>E. coli</i>	Glucose	Cyan, Venus	[88]
RppA	Enzyme	<i>S. griseus</i>	Malonyl-CoA	Red-colored flaviolin	[89]
mBFP	Enzyme	Metagenome	NADPH	mBFP	[90]
Mrx1-roGFP2	Enzyme	<i>C. glutamicum</i>	Mycothiol redox potential	roGFP2	[91]
tRNA	Rare codon-rich marker	<i>C. glutamicum</i>	L-arginine	Kan ^R	[72]

^aPredicted by authors.

Lrp 调控的 P_{brnFE} 启动子进行突变, 获得了对 L-异亮氨酸响应增强的突变启动子, 用于调控胞内 L-异亮氨酸的浓度, 从而提高 4-羟基-L-异亮氨酸的合成^[77]。

与响应 L-甲硫氨酸和支链氨基酸的 Lrp 相似, LysG 是谷氨酸棒杆菌中响应碱性氨基酸 (L-赖氨酸、L-精氨酸和 L-组氨酸) 的转录调控因子, 当胞内碱性氨基酸浓度升高时, LysG 可激活外排蛋白 LysE 的表达, 启动相应氨基酸外排^[92]。Binder 等使用 LysG 和 eYFP 构建了 L-赖氨酸生物传感器, 鉴定了其对胞内 L-赖氨酸的线性响应范围为 5–25 mmol/L, 并通过 FACS 从随机突变文库中筛选获得了 L-赖氨酸生产菌株, 通过基因组测序鉴定了关键突变位点^[78]。该生物传感器还被用于筛选 L-赖氨酸、L-精氨酸和 L-组氨酸合成关键酶的突变体文库, 获得了解除反馈抑制和催化活性提升的突变体^[79-80]。Zhang 等利用特异性响应 L-丝氨酸的 LysR 型转录调控因子 NCg10581、启动子 $P_{NCg10580}$ 和 eYFP 构建了 L-丝氨酸生物传感器, 并应用于从随机突变菌株文库中筛选高产 L-丝氨酸的突变株。最优突变株的产量 (34.78 g/L, 0.35 g/g 蔗糖) 和转化率较出发菌株分别提高了 35.9% 和 66.7%, 展示了该生物传感器在筛选高产菌株中的应用^[81]。

除氨基酸外, 研究者还开发了谷氨酸棒杆菌其他小分子代谢物的生物传感器。Schulte 等利用全局转录调控因子 GlxR、受其抑制的启动子 P_{cg3195} 和 eYFP, 开发了第二信使环磷酸腺苷 (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的生物传感器, 并对具有不同 cAMP 水平的突变株文库进行了筛选^[82]。Liu 等利用 LysR 型转录调控因子 ShiR、*shiA* 基因的启动子区域和 eGFP 构建了莽草酸生物传感器, 其响应胞内莽草酸的线性范围为 19.5–120.9 pmol/细胞。该生物传感器可以用于实时监测胞内的莽草酸浓度, 以及对莽草酸合成基因的 RBS 文库进行筛选, 获得高产菌株。此外,

与莽草酸摄入蛋白 ShiA 组合使用, 可以对环境中的莽草酸进行监测^[83]。谷氨酸棒杆菌具有类胡萝卜素的合成途径, 在天然产物合成中有着潜在的应用。Henke 等利用类胡萝卜素合成基因簇 *crt* 操纵子的转录调控因子 CrtR、受其抑制的启动子 P_{crtE} 和 GFP, 构建了可响应胞内类胡萝卜素前体——香叶基香叶基焦磷酸 (Geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) 的生物传感器, 可用于筛选 GGPP 积累的突变株和调控类胡萝卜素的合成途径^[84]。

目前, 谷氨酸棒杆菌的生物传感器通常选用内源的转录调控因子, 虽然在谷氨酸棒杆菌中的适配性好, 但是能够检测的代谢物种类有限。因此, 仍需开发利用异源的生物传感器。Siedler 等利用枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 的转录调控因子 PadR, 开发了适用于谷氨酸棒杆菌、大肠杆菌等异源宿主的对香豆酸生物传感器, 并通过微流控液滴同时包埋对香豆酸的生产菌和携带生物传感器的检测菌, 实现了胞外对香豆酸的检测^[85]。

谷氨酸棒杆菌不仅是生产氨基酸等小分子化合物的理想宿主, 也可用于蛋白质的分泌表达。Jurischka 等构建了可监测谷氨酸棒杆菌蛋白质分泌表达的生物传感器。作者通过转录组分析发现, 当谷氨酸棒杆菌分泌表达蛋白质时, 蛋白酶 HtrA 的转录上调, 通过将染色体上的 *htrA* 替换为 *eyfp* 报告基因, 所获得的工程菌在分泌表达蛋白质时, 可输出 eYFP 荧光信号, 且蛋白质分泌表达量在一定范围内与 eYFP 信号呈线性关联。但是, 调控 *htrA* 基因的转录调控因子未知, 作者推测双组分调控系统 CgtSR2 可能起到重要调控作用^[86]。

4.2 FRET

FRET 是指供体荧光分子的荧光发射光谱与另一个受体荧光分子的激发光谱相重叠时, 供体荧光分子的激发能诱发受体荧光分子发出荧光, 同时供体荧光分子自身的荧光强度衰减的现象。该原理被应用于 FRET 型生物传感器的构建。Steffen 等将来自大肠杆菌的 L-赖氨酸、L-精氨酸

和 L-鸟氨酸结合蛋白 LAO-BP 与两个青色白荧光蛋白 (Enhanced cyan fluorescent protein, eCFP) 和 Citrine 融合, 并将 LAO-BP 的 C 端和 N 端使用连接肽进行环化, 构建了 L-赖氨酸生物传感器, 进一步通过优化 LAO-BP 与荧光蛋白间的连接肽, 改进了生物传感器, 应用于检测谷氨酸棒杆菌发酵过程中胞外 L-赖氨酸的浓度^[87]。类似地, Otten 等使用来自大肠杆菌的葡萄糖/半乳糖结合蛋白 MglB 与供体荧光蛋白 Cyan 和受体荧光蛋白 Venus, 构建了可检测葡萄糖的 FRET 型生物传感器, 并应用于谷氨酸棒杆菌微孔板培养过程中发酵液中葡萄糖浓度的在线监测^[88]。

4.3 酶

一些酶由于其具有特定的催化功能, 也可被用于构建生物传感器。III型聚酮合酶 RppA 可催化 5 分子丙二酰 CoA 生成 1,3,6,8-四羟基萘, 后者可自发转化为红色的聚酮类化合物淡黄霉素 (Flaviolin)。Yang 等利用该原理, 从链霉菌 *Streptomyces*、糖多孢菌 *Saccharopolyspora* 等细菌中筛选了对丙二酰 CoA 亲和性较好的 RppA, 构建了可检测胞内丙二酰 CoA 浓度的生物传感器, 在包括谷氨酸棒杆菌在内的多个细菌中均可应用^[89]。除了在可培养微生物中挖掘生物传感器的元件, 宏基因组数据中也蕴藏着丰富的基因元件。Hwang 等从宏基因组数据中挖掘出一个特殊的氧非依赖、NADPH 依赖型蓝色荧光蛋白 (Blue fluorescent protein), 命名为 mBFP^[93]。Goldbeck 等发现 mBFP 对 NADPH 具有高亲和性 ($K_D=0.64$ mmol/L) 和高特异性, 可特异性放大 NADPH 的荧光信号, 不与 NADH 结合, 因此可用作监测 NADPH 的生物传感器。此外, mBFP 还具有 NADPH 依赖的苯乙醛还原酶活性^[90]。

4.4 富含稀有密码子的报告系统

除上述传统的生物传感器外, Zheng 等开发了一种基于稀有密码子的新型生物传感器。其原

理为, 在 *gfp* 报告基因或抗生素抗性基因序列中增加稀有密码子的数量, 稀有密码子的翻译受到稀有的氨酰 tRNA 量的限制, 当胞内相应的氨基酸浓度较低时, 氨酰 tRNA 合成受限, 导致基因低水平表达。添加外源氨基酸或增强内源氨基酸合成, 可提高稀有密码子的翻译速度, 从而提高报告基因或抗性基因的表达水平, 使细胞输出更强的荧光信号或具有更强的抗生素抗性。该生物传感器被用于筛选 L-精氨酸合成能力增强的谷氨酸棒杆菌突变菌株, 在其他氨基酸生产菌株的筛选中也有应用前景^[72]。

5 总结与展望

新型的基因组编辑、基因表达调控、适应性进化、生物传感器等代谢工程和合成生物学使能技术的快速发展, 显著加快了谷氨酸棒杆菌细胞工厂的构建和优化。基于此, 谷氨酸棒杆菌仍是氨基酸生物制造的核心菌种, 在其他大宗化学品、生物燃料、天然产物、蛋白质等产品的生物制造中, 也扮演着越来越重要的角色。但是, 与另外两个常用的底盘微生物大肠杆菌和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 相比, 谷氨酸棒杆菌的多基因或多靶点编辑工具仍需提升, 缺乏多重自动化基因组工程 (Multiplex automated genome engineering, MAGE)^[94]或 eMAGE (Eukaryotic MAGE)^[95]等在染色体上直接产生遗传多样性的高效技术。另一方面, 谷氨酸棒杆菌基因组的 3 000 余个基因中仍有超过 40% 的基因功能未知或缺乏实验证据。因此, 为更好地挖掘谷氨酸棒杆菌的代谢潜力, 进一步提升生物制造的效率, 需要进一步优化代谢工程使能技术, 结合自动化实验装备, 进行高通量的功能基因组研究, 解析谷氨酸棒杆菌优良生物学和工业性状背后的遗传和分子机制。另一方面, 亟需完善谷氨酸棒杆菌的代谢模型和调控网络, 为菌株构建和优化提供更精确的预测和设计。

REFERENCES

- [1] Sano C. History of glutamate production. *Am J Clin Nutr*, 2009, 90(3): 728S-732S.
- [2] Becker J, Rohles CM, Wittmann C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. *Metab Eng*, 2018, 50: 122-141.
- [3] Zhao N, Qian L, Luo G, et al. Synthetic biology approaches to access renewable carbon source utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(22): 9517-9529.
- [4] Becker J, Wittmann C. Industrial microorganisms: *Corynebacterium glutamicum*, in: Wittmann C, Liao JC, eds. *Industrial Biotechnology: Microorganisms*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016: 183-220.
- [5] 龙梦飞, 徐美娟, 张显, 等. 合成生物学与代谢工程在谷氨酸棒杆菌产氨基酸中的应用. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(5): 541-552.
Long MF, Xu MJ, Zhang X, et al. Synthetic biology and metabolic engineering for amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*. *Sci Sin Vitae*, 2019, 49(5): 541-552 (in Chinese).
- [6] Cleto S, Jensen JV, Wendisch VF, et al. *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi). *ACS Synth Biol*, 2016, 5(5): 375-385.
- [7] Barrangou R, Horvath P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nat Microbiol*, 2017, 2(7): 17092.
- [8] Cho JS, Choi KR, Prabowo CPS, et al. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2017, 42: 157-167.
- [9] Jiang Y, Qian F, Yang J, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun*, 2017, 8: 15179.
- [10] Liu J, Wang Y, Lu Y, et al. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 205.
- [11] Wang B, Hu Q, Zhang Y, et al. A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 63.
- [12] Krumbach K, Sonntag CK, Eggeling L, et al. CRISPR/Cas12a mediated genome editing to introduce amino acid substitutions into the mechanosensitive channel MscCG of *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(12): 2726-2734.
- [13] Wang Y, Liu Y, Li J, et al. Expanding targeting scope, editing window, and base transition capability of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(11): 3016-3029.
- [14] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metab Eng*, 2018, 47: 200-210.
- [15] Deng C, Lv X, Li J, et al. Development of a DNA double-strand break-free base editing tool in *Corynebacterium glutamicum* for genome editing and metabolic engineering. *Metab Eng Commun*, 2020, 11: e00135.
- [16] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145(1): 69-73.
- [17] Wang Y, Zhang ZT, Seo SO, et al. Bacterial genome editing with CRISPR-Cas9: deletion, integration, single nucleotide modification, and desirable "clean" mutant selection in *Clostridium beijerinckii* as an example. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(7): 721-732.
- [18] Peng F, Wang X, Sun Y, et al. Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 201.
- [19] Liu W, Tang D, Wang H, et al. Combined genome editing and transcriptional repression for metabolic pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* using a catalytically active Cas12a. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(21/22): 8911-8922.
- [20] Zhang J, Yang F, Yang Y, et al. Optimizing a CRISPR-Cpf1-based genome engineering system for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*,

- 2019, 18: 60.
- [21] Dong J, Kan B, Liu H, et al. CRISPR-Cpf1-assisted engineering of *Corynebacterium glutamicum* SNK118 for enhanced L-ornithine production by NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020. DOI: 10.1007/s12010-020-03231-y.
- [22] Cameron Coates R, Blaskowski S, Szyjka S, et al. Systematic investigation of CRISPR-Cas9 configurations for flexible and efficient genome editing in *Corynebacterium glutamicum* NRRL-B11474. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(2): 187-201.
- [23] Binder S, Siedler S, Marienhagen J, et al. Recombineering in *Corynebacterium glutamicum* combined with optical nanosensors: a general strategy for fast producer strain generation. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(12): 6360-6369.
- [24] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [25] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729.
- [26] Kurt IC, Zhou R, Iyer S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat Biotechnol*, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0609-x.
- [27] Zhao D, Li J, Li S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat Biotechnol*, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0592-2.
- [28] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [29] Wang Y, Liu Y, Zheng P, et al. Microbial base editing: a powerful emerging technology for microbial genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2020. DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.06.010.
- [30] 李俊维, 刘叶, 王钰, 等. 谷氨酸棒杆菌碱基编辑的条件优化. *生物工程学报*, 2020, 36(1): 143-151. Li JW, Liu Y, Wang Y, et al. Optimization of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Chin J Biotech*, 2020, 36(1): 143-151 (in Chinese).
- [31] 黄华媚, 白立宽, 刘叶, 等. BE3 型胞嘧啶碱基编辑器在谷氨酸棒杆菌中的开发及应用. *生物技术通报*, 2020, 36(3): 95-101. Huang HM, Bai LK, Liu Y, et al. Development and application of BE3 cytidine base editor in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bull*, 2020, 36(3): 95-101 (in Chinese).
- [32] Albersmeier A, Pfeifer-Sancar K, Rückert C, et al. Genome-wide determination of transcription start sites reveals new insights into promoter structures in the actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*, 2017, 257: 99-109.
- [33] Shang X, Chai X, Lu X, et al. Native promoters of *Corynebacterium glutamicum* and its application in L-lysine production. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(2): 383-391.
- [34] Li N, Zeng W, Xu S, et al. Obtaining a series of native gradient promoter-5'-UTR sequences in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Microb Cell Fact*, 2020, 19: 120.
- [35] 王迎春, 刘娇, 倪晓蒙, 等. 基于时间序列转录组筛选谷氨酸棒杆菌内源高效组成型启动子. *生物工程学报*, 2018, 34(11): 1760-1771. Wang YC, Liu J, Ni XM, et al. Screening efficient constitutive promoters in *Corynebacterium glutamicum* based on time-series transcriptome analysis. *Chin J Biotech*, 2018, 34(11): 1760-1771 (in Chinese).
- [36] Kortmann M, Kuhl V, Klaffl S, et al. A chromosomally encoded T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Corynebacterium glutamicum*: construction and comparative evaluation at the single-cell level. *Microb Biotechnol*, 2015, 8(2): 253-265.
- [37] Yim SS, An SJ, Kang M, et al. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(11): 2959-2969.
- [38] Rytter JV, Helmark S, Chen J, et al. Synthetic promoter libraries for *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(6): 2617-2623.
- [39] Zhang S, Liu D, Mao Z, et al. Model-based reconstruction of synthetic promoter library in

- Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol Lett, 2018, 40(5): 819-827.
- [40] Wei L, Xu N, Wang Y, et al. Promoter library-based module combination (PLMC) technology for optimization of threonine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(9): 4117-4130.
- [41] Shen J, Chen J, Jensen PR, et al. A novel genetic tool for metabolic optimization of *Corynebacterium glutamicum*: efficient and repetitive chromosomal integration of synthetic promoter-driven expression libraries. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(11): 4737-4746.
- [42] Gießelmann G, Dietrich D, Jungmann L, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level ectoine production: design, combinatorial assembly, and implementation of a transcriptionally balanced heterologous ectoine pathway. Biotechnol J, 2019, 14(9): e1800417.
- [43] Wiechert J, Gätgens C, Wirtz A, et al. Inducible expression systems based on xenogeneic silencing and counter-silencing and design of a metabolic toggle switch. ACS Synth Biol, 2020. DOI: 10.1021/acssynbio.0c00111.
- [44] Kim MJ, Yim SS, Choi JW, et al. Development of a potential stationary-phase specific gene expression system by engineering of SigB-dependent *cg3141* promoter in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(10): 4473-4483.
- [45] Zhang B, Zhou N, Liu YM, et al. Ribosome binding site libraries and pathway modules for shikimic acid synthesis with *Corynebacterium glutamicum*. Microb Cell Fact, 2015, 14: 71.
- [46] Henke NA, Heider SA, Peters-Wendisch P, et al. Production of the marine carotenoid astaxanthin by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. Mar Drugs, 2016, 14(7): 124.
- [47] Schelder S, Zaade D, Litsanov B, et al. The two-component signal transduction system CopRS of *Corynebacterium glutamicum* is required for adaptation to copper-excess stress. PLoS ONE, 2011, 6(7): e22143.
- [48] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [49] Park J, Shin H, Lee S-M, et al. RNA-guided single/double gene repressions in *Corynebacterium glutamicum* using an efficient CRISPR interference and its application to industrial strain. Microb Cell Fact, 2018, 17: 4.
- [50] Lee SS, Shin H, Jo S, et al. Rapid identification of unknown carboxyl esterase activity in *Corynebacterium glutamicum* using RNA-guided CRISPR interference. Enzyme Microb Technol, 2018, 114: 63-68.
- [51] Yoon J, Woo HM. CRISPR interference-mediated metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for homo-butyrate production. Biotechnol Bioeng, 2018, 115(8): 2067-2074.
- [52] Park J, Yu BJ, Choi JI, et al. Heterologous production of squalene from glucose in engineered *Corynebacterium glutamicum* using multiplex CRISPR interference and high-throughput fermentation. J Agric Food Chem, 2019, 67(1): 308-319.
- [53] Gauttam R, Seibold GM, Mueller P, et al. A simple dual-inducible CRISPR interference system for multiple gene targeting in *Corynebacterium glutamicum*. Plasmid, 2019, 103: 25-35.
- [54] Li M, Chen J, Wang Y, et al. Efficient multiplex gene repression by CRISPR-dCpf1 in *Corynebacterium glutamicum*. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 357.
- [55] Na D, Yoo SM, Chung H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. Nat Biotechnol, 2013, 31(2): 170-174.
- [56] Sun D, Chen J, Wang Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* by synthetic small regulatory RNAs. J Ind Microbiol Biotechnol, 2019, 46(2): 203-208.
- [57] Stella RG, Wiechert J, Noack S, et al. Evolutionary engineering of *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol J, 2019, 14(9): e1800444.
- [58] Park J, Lee S, Lee MJ, et al. Accelerated growth of *Corynebacterium glutamicum* by up-regulating stress-responsive genes based on transcriptome analysis of a fast-doubling evolved strain. J Microbiol Biotechnol, 2020. DOI: 10.4014/jmb.

- 2006.06035.
- [59] Pfeifer E, Gatgens C, Polen T, et al. Adaptive laboratory evolution of *Corynebacterium glutamicum* towards higher growth rates on glucose minimal medium. *Sci Rep*, 2017, 7: 16780.
- [60] Wang Z, Liu J, Chen L, et al. Alterations in the transcription factors GntR1 and RamA enhance the growth and central metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2018, 48: 1-12.
- [61] Graf M, Haas T, Müller F, et al. Continuous adaptive evolution of a fast-growing *Corynebacterium glutamicum* strain independent of protocatechuate. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1648.
- [62] Oide S, Gunji W, Moteki Y, et al. Thermal and solvent stress cross-tolerance conferred to *Corynebacterium glutamicum* by adaptive laboratory evolution. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(7): 2284-2298.
- [63] Leszczewicz M, Walczak P. Selection of thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* strains for organic acid biosynthesis. *Food Technol Biotechnol*, 2019, 57(2): 249-259.
- [64] Wang X, Khushk I, Xiao Y, et al. Tolerance improvement of *Corynebacterium glutamicum* on lignocellulose derived inhibitors by adaptive evolution. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(1): 377-388.
- [65] Tuyishime P, Wang Y, Fan L, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for methanol-dependent growth and glutamate production. *Metab Eng*, 2018, 49: 220-231.
- [66] Wang Y, Fan L, Tuyishime P, et al. Adaptive laboratory evolution enhances methanol tolerance and conversion in engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Commun Biol*, 2020, 3: 217.
- [67] Schwentner A, Feith A, Münch E, et al. Metabolic engineering to guide evolution-Creating a novel mode for L-valine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2018, 47: 31-41.
- [68] Dele-Osibanjo T, Li Q, Zhang X, et al. Growth-coupled evolution of phosphoketolase to improve L-glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(20): 8413-8425.
- [69] Choi JW, Yim SS, Jeong KJ. Development of a high-copy-number plasmid via adaptive laboratory evolution of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(2): 873-883.
- [70] Mahr R, Gätgens C, Gätgens J, et al. Biosensor-driven adaptive laboratory evolution of L-valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2015, 32: 184-194.
- [71] Eggeling L, Bott M, Marienhagen J. Novel screening methods-biosensors. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 35: 30-36.
- [72] Zheng B, Ma X, Wang N, et al. Utilization of rare codon-rich markers for screening amino acid overproducers. *Nat Commun*, 2018, 9: 3616.
- [73] Lange C, Mustafi N, Frunzke J, et al. Lrp of *Corynebacterium glutamicum* controls expression of the *brnFE* operon encoding the export system for L-methionine and branched-chain amino acids. *J Biotechnol*, 2012, 158(4): 231-241.
- [74] Mustafi N, Grünberger A, Kohlheyer D, et al. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids. *Metab Eng*, 2012, 14(4): 449-457.
- [75] Han G, Xu N, Sun X, et al. Improvement of L-valine production by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Omega*, 2020, 5(10): 4751-4758.
- [76] Mustafi N, Grünberger A, Mahr R, et al. Application of a genetically encoded biosensor for live cell imaging of L-valine production in pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e85731.
- [77] Tan S, Shi F, Liu H, et al. Dynamic control of 4-hydroxyisoleucine biosynthesis by modified L-isoleucine biosensor in recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*, 2020. DOI: 10.1021/acssynbio.0c00127.
- [78] Binder S, Schendzielorz G, Stähler N, et al. A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. *Genome Biol*, 2012, 13(5): R40.
- [79] Kortmann M, Mack C, Baumgart M, et al. Pyruvate carboxylase variants enabling improved lysine production from glucose identified by

- biosensor-based high-throughput fluorescence-activated cell sorting screening. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(2): 274-281.
- [80] Schendzielorz G, Dippong M, Grünberger A, et al. Taking control over control: use of product sensing in single cells to remove flux control at key enzymes in biosynthesis pathways. *ACS Synth Biol*, 2014, 3(1): 21-29.
- [81] Zhang X, Zhang X, Xu G, et al. Integration of ARTP mutagenesis with biosensor-mediated high-throughput screening to improve L-serine yield in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(14): 5939-5951.
- [82] Schulte J, Baumgart M, Bott M. Development of a single-cell GlxR-based cAMP biosensor for *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*, 2017, 258: 33-40.
- [83] Liu C, Zhang B, Liu YM, et al. New intracellular shikimic acid biosensor for monitoring shikimate synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(2): 591-601.
- [84] Henke NA, Austermeier S, Grothaus IL, et al. *Corynebacterium glutamicum* CrtR and its orthologs in *Actinobacteria*: conserved function and application as genetically encoded biosensor for detection of geranylgeranyl pyrophosphate. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 5482.
- [85] Siedler S, Khatri NK, Zsohár A, et al. Development of a bacterial biosensor for rapid screening of yeast *p*-coumaric acid production. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(10): 1860-1869.
- [86] Jurischka S, Bida A, Dohmen-Olma D, et al. A secretion biosensor for monitoring Sec-dependent protein export in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2020, 19: 11.
- [87] Steffen V, Otten J, Engelman S, et al. A toolbox of genetically encoded FRET-based biosensors for rapid L-lysine analysis. *Sensors*, 2016, 16(10): 1604.
- [88] Otten J, Tenhaef N, Jansen RP, et al. A FRET-based biosensor for the quantification of glucose in culture supernatants of mL scale microbial cultivations. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 143.
- [89] Yang D, Kim WJ, Yoo SM, et al. Repurposing type III polyketide synthase as a malonyl-CoA biosensor for metabolic engineering in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(40): 9835-9844.
- [90] Goldbeck O, Eck AW, Seibold GM. Real time monitoring of NADPH concentrations in *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* via the genetically encoded sensor mBFP. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2564.
- [91] Tung QN, Loi VV, Busche T, et al. Stable integration of the Mrx1-roGFP2 biosensor to monitor dynamic changes of the mycothiol redox potential in *Corynebacterium glutamicum*. *Redox Biol*, 2019, 20: 514-525.
- [92] Bellmann A, Vrljic M, Patek M, et al. Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, 2001, 147(7): 1765-1774.
- [93] Hwang CS, Choi ES, Han SS, et al. Screening of a highly soluble and oxygen-independent blue fluorescent protein from metagenome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(4): 676-681.
- [94] Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, 460(7257): 894-898.
- [95] Barbieri EM, Muir P, Akhuetie-Oni BO, et al. Precise editing at DNA replication forks enables multiplex genome engineering in eukaryotes. *Cell*, 2017, 171(6): 1453-1467.e1413.

(本文责编 陈宏宇)