

· 产品篇 ·

陈宁 天津科技大学生物工程学院教授、博士生导师，代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室主任，天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室主任，享受国务院特殊津贴。现担任中国氨基酸技术服务中心技术总监、中国生物发酵产业协会氨基酸分会副理事长、中国生物发酵产业协会氨基酸专业技术委员会副主任、中国食品工业协会发酵工程研究会副会长、中国微生物学会理事、天津市微生物学会副理事长、中国生物发酵产业标准化技术委员会委员、中国微生物学会科技开发与咨询工作委员会委员、《发酵科技通讯》编委会副主任等职务。



氨基酸生产的代谢工程研究进展与发展趋势

马倩^{*}, 夏利^{*}, 谭森, 孙全伟, 杨蒙雅, 张颖, 陈宁

天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

马倩, 夏利, 谭森, 等. 氨基酸生产的代谢工程研究进展与发展趋势. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1677-1696.

Ma Q, Xia L, Tan M, et al. Advances and prospects in metabolic engineering for the production of amino acids. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1677-1696.

摘要: 氨基酸发酵是我国发酵工业的支柱产业, 近年来, 随着代谢工程的快速发展, 氨基酸的代谢工程育种蓬勃发展。传统的正向代谢工程、基于组学分析与计算机模拟的反向代谢工程以及借鉴自然进化的进化代谢工程, 都有越来越多的应用。在氨基酸的工业生产中涌现出了一系列具有高效生产、抗逆性强等优良性状的菌株。日益剧烈的市场竞争对菌株的选育提出了新的要求, 如开发高附加值氨基酸品种、菌株代谢的动态调控、适应新工艺的要求等。文中介绍了氨基酸生产相关的代谢工程研究进展以及未来的发展趋势。

关键词: 氨基酸, 代谢工程, 大肠杆菌, 谷氨酸棒杆菌, 生物传感器

Received: September 14, 2020; **Accepted:** October 30, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0900300), National Natural Science Foundation of China (No. 21808168).

Corresponding author: Ning Chen. Tel/Fax: +86-22-60601251; E-mail: ningch@tust.edu.cn

^{*}These authors contributed equally to this study.

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0900300), 国家自然科学基金 (No. 21808168) 资助。

网络出版时间: 2020-11-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201111.1646.002.html>

Advances and prospects in metabolic engineering for the production of amino acids

Qian Ma*, Li Xia*, Miao Tan, Quanwei Sun, Mengya Yang, Ying Zhang, and Ning Chen

College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Fermentative production of amino acids is one of the pillars of the fermentation industry in China. Recently, with the fast development of metabolic engineering and synthetic biology technologies, the metabolic engineering for production of amino acids has been flourishing. Conventional forward metabolic engineering, reversed metabolic engineering based on omics data and *in silico* simulation, and evolutionary metabolic engineering mimicking the natural evolution, have shown increasingly promising applications. A series of highly efficient and robust amino acids-producing strains have been developed and applied in the industrial production of amino acids. The increasingly fierce market competition has put forward new requirements for strain breeding and selection, such as developing high value-added amino acids, dynamic regulation of cellular metabolism, and adapting to the requirements of new process. This review summarizes the advances and prospects in metabolic engineering for the production of amino acids.

Keywords: amino acids, metabolic engineering, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, biosensor

民以食为天，这是亘古不变的自然法则。在追求美好生活的新时代，人们对于营养与健康的需求日趋高涨。氨基酸作为重要的营养与功能元素，与我们的生活息息相关，其应用领域涉及食品、医药、饲料、化妆品等多种行业。目前，氨基酸发酵已成为我国发酵工业的支柱产业。据中国生物发酵产业协会统计，2019年，我国氨基酸发酵产品总产量约为609万t，其中，L-谷氨酸286.6万t，L-赖氨酸253.3万t，L-苏氨酸60.6万t，L-色氨酸1.7万t，其他氨基酸6.9万t。与大宗氨基酸品种L-谷氨酸、L-赖氨酸、L-苏氨酸相比，小品种氨基酸、高附加值氨基酸（L-组氨酸、L-丝氨酸、L-酪氨酸等）的产量仍然较低，具有广阔的市场提升前景。随着代谢工程育种技术的快速发展，氨基酸优良生产菌株的选育发展也越来越迅猛，为大宗氨基酸的低成本高效生产、高附加值小品种氨基酸的市场开拓提供了有力保障。本文将就代谢工程在氨基酸生产菌株选育方面的研究与应用进展进行综述，并对氨基酸代谢工程育种的一些新的发展趋势进行介绍。

1 代谢工程育种

1956年，日本协和发酵公司木下祝郎博士选

育出了可以积累L-谷氨酸的谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*，随后，L-谷氨酸工业发酵的成功推动了其他氨基酸的发酵研究与生产，自此氨基酸的工业发酵生产正式拉开帷幕。传统的氨基酸生产菌株主要基于代谢控制发酵原理，通过诱变筛选获得。诱变菌株在氨基酸工业发酵中发挥了非常重要的作用，极大地推动了氨基酸发酵工业的发展。然而，诱变菌株在工业发酵过程中容易存在营养缺陷、发酵不稳定、产能难以继续提升等问题。近年来，代谢工程育种在氨基酸生产菌株选育中的应用越来越多，成为诱变育种的有力补充。*C. glutamicum*、大肠杆菌 *Escherichia coli* 等模式微生物成为氨基酸生产代谢工程改造的主要宿主，一系列小品种、高附加值氨基酸产品及其衍生物生产菌株得到开发。

1.1 基于理性设计的正向代谢工程

基于一定的理性设计原则，从宿主菌株出发，进行目标合成途径构建与强化^[1]、前体物供应强化^[2]、旁路代谢阻断与弱化^[3]、辅因子平衡优化^[4-6]、目标产物输出系统强化^[7]等，以实现目标产物的高效生产，这是一种自上而下的正向代谢工程策略。

氨基酸作为初级代谢产物,在微生物中的合成通常存在复杂的调控系统,包括反馈调节、弱化调节等。如分支链氨基酸合成途径中的关键酶乙酰羟酸合酶容易受到产物 L-缬氨酸的反馈抑制^[8],色氨酸操纵子存在受 L-色氨酸调节的弱化子结构^[9]。因而,在氨基酸生产菌株的正向代谢工程中,解除关键酶受到的反馈调节作用对于强化目标氨基酸的合成通常有较为明显的作用^[10]。除了关键酶的强化,目标氨基酸合成途径上的非限速酶通常也需要调整其表达强度,通过启动子优化、核糖体结合位点优化,以及合成途径上多基因表达强度的组合优化等,进行最佳生产强度合成途径的构建与强化。

如图 1 所示,多数氨基酸的合成需要以中心碳代谢过程的中间代谢产物为前体物^[11],如 L-谷氨酸、L-谷氨酰胺等以三羧酸 (TCA) 循环的 α -酮戊二酸为前体物; L-缬氨酸、L-亮氨酸以糖酵解过程的产物丙酮酸为前体物; 天冬氨酸族氨基酸以三羧酸循环的草酰乙酸为前体物; 芳香族氨基酸需要以糖酵解中的磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 与磷酸戊糖途径的赤藓糖-4-磷酸 (E4P) 为前体物。因此,在进行前体物供应强化时,需要对目标氨基酸合成途径与中心碳代谢进行平衡重构,使代谢流尽可能多地流向目标氨基酸合成,以实现对

细胞生长不构成严重损害的条件下,尽可能地提高目标氨基酸的合成效率。近些年来,动态调控、精确调控成为代谢工程领域研究的重要方向,这也是代谢工程改造更加精细化的一种表现。

辅因子在细胞代谢的诸多过程都发挥重要作用,许多氨基酸的合成途径也依赖特定的辅因子,如 L-谷氨酸、L-赖氨酸、L-苏氨酸、L-缬氨酸等的合成需要依赖 NADPH; L-组氨酸、L-丝氨酸等的合成需要依赖 NAD⁺。辅因子的供应与平衡对于目标氨基酸的合成效率也起着至关重要的作用,辅因子的供应平衡也是氨基酸代谢工程改造中的重要方面。近年来,研究者尝试通过改变氨基酸合成路径上相关酶的辅酶依赖性,实现发酵工艺的改变。Hasegawa 等^[4]通过对 *C. glutamicum* 中相关酶的辅酶依赖性由 NADPH 改变为 NADH,实现了在无氧条件下进行 L-缬氨酸的生产,生产强度与转化率都有明显的提升。此外,调控辅因子的合成,以及调控辅因子不同形态之间的转变^[12],也是辅因子平衡调控的重要方式。

目前,基于理性设计的正向代谢工程仍然是氨基酸代谢工程育种的主要方式,通过组合运用不同的代谢工程策略,通常可以获得菌株发酵水平的提升。但由于微生物系统的复杂性,有时理

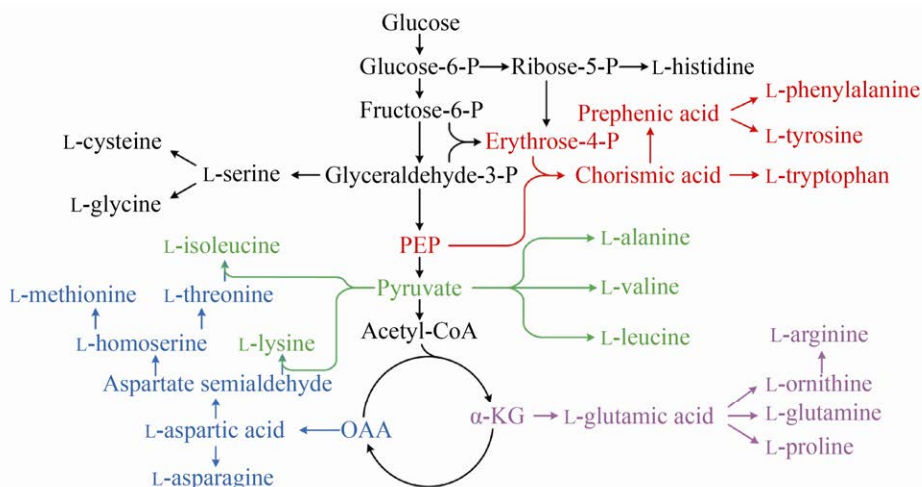


图 1 氨基酸合成途径^[11]

Fig. 1 Biosynthesis pathway of amino acids^[11].

性设计并不总能产生预期的效果,基于组学分析与计算机模拟的反向代谢工程,以及借鉴自然进化的进化代谢工程可作为正向代谢工程的有力补充。

1.2 基于组学分析与计算机模拟的代谢工程

在传统的氨基酸工业中,很多生产菌株是通过诱变育种的方式获得的,与出发菌株相比,诱变菌株往往在基因、mRNA、蛋白质、代谢物等水平存在差异,而这些差异很可能是菌株高产的原因。基于不同菌株(如诱变菌株与出发菌株)的表型差异,利用组学技术反向解析导致表型差异的代谢水平、蛋白水平、mRNA水平、DNA水平差异,以获得影响目标性状的关键基因位点,作为代谢工程改造的潜在靶点^[13-14]。随着生物信息学与计算机模拟技术的不断发展,基于组学分析获得的潜在改造靶点,可先利用计算机模拟进行代谢预测^[15],再进行实验室代谢工程改造,这样可以使后续的代谢工程更加具有方向性、更加高效。

1.3 进化代谢工程

进化是大自然丰厚的馈赠,适者生存是高效的筛选法则。于是,人们尝试在实验室中模拟自然进化,并进行进化加速,以高效获得理想的生物表型。进化在代谢工程中的应用,形成了进化代谢工程,涉及酶的定向进化、代谢进化、适应性进化等内容^[16]。通过代谢工程构建,将目标基因型的筛选与容易识别的表型(如生长偶联^[17]、

抗性偶联^[17]等)或易于识别的信号(如荧光信号^[18]等)相关联,实现了理性与随机策略的结合,可通过高通量筛选,以提高筛选效率。近年来,进化代谢工程育种在氨基酸生产中的应用越来越多。Long等^[17]将鸟氨酸环化脱氨酶的定向进化与抗生素抗性基因表达偶联起来,通过在抗性培养基中筛选生长快速的菌株,获得了高效催化鸟氨酸合成L-脯氨酸的鸟氨酸环化脱氨酶,并最终在L-精氨酸生产菌钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* 中实现了38.4 g/L的L-脯氨酸产量。随着生物传感技术的迅速发展,其在进化代谢工程中的应用越来越广泛^[19]。在氨基酸的进化代谢工程研究方面,生物传感器的主要应用如表1所示。构建响应目标氨基酸浓度的生物传感器,可将胞内目标氨基酸浓度与荧光信号强度相偶联,通过筛选高强度的荧光信号,获得高产目标氨基酸的菌株。目前,基于转录调控因子Lrp响应分支链氨基酸/甲硫氨酸浓度^[20]、转录调控因子LysG响应L-赖氨酸浓度产生转录调控作用构建的生物传感器已在相应氨基酸的生产菌选育中应用。除基于转录调控因子构建的生物传感器之外,基于RNA调控的核糖开关也是构建生物传感器的重要基础,目前已发现的响应氨基酸的核糖开关有L-赖氨酸核糖开关^[21]与甘氨酸核糖开关^[22]。随着新型生物传感器的研发,进化代谢工程在氨基酸育种中将会发挥越来越重要的作用。

表1 生物传感器在氨基酸代谢工程中的应用

Table 1 Application of biosensors in metabolic engineering for production of amino acids

Amino acid	Type of biosensor	Output	Host	Reference
L-valine	Transcriptional regulation based on Lrp	eYFP	<i>C. glutamicum</i>	[18]
L-tyrosine	Transcriptional regulation based on TyrR	mCherry	<i>E. coli</i>	[23]
L-lysine	Transcriptional regulation based on LysG	eYFP	<i>C. glutamicum</i>	[24]
L-lysine	Riboswitch based on <i>lysC</i>	tetA-sGFP	<i>E. coli</i>	[25]
L-tryptophan	Synthetic riboswitch	tetA-sGFP	<i>E. coli</i>	[25]
L-phenylalanine	Transcriptional regulation based on screening of <i>mtr</i> promoter	Venus	<i>E. coli</i>	[26]

2 大宗氨基酸代谢工程育种

2.1 L-谷氨酸的代谢工程育种

L-谷氨酸作为最大宗的氨基酸品种,具有成熟的发酵生产工艺。目前,L-谷氨酸的工业生产主要采用 *C. glutamicum* 生物素亚适量控制工艺与温度敏感突变株发酵工艺,应用的菌株大多通过诱变筛选获得,发酵产量最高可达 220 g/L 以上。L-谷氨酸的高效生产与细胞内代谢状态变化、细胞的高效分泌过程密切相关,多种处理方式都可以促进 *C. glutamicum* 高效分泌 L-谷氨酸,如生物素亚适量控制、表面活性剂添加、青霉素添加、温度提升等。但对于 *C. glutamicum* 中 L-谷氨酸快速分泌的机制仍然未有清晰阐释,这也限制了 L-谷氨酸代谢工程育种的应用。目前人们多利用组学分析手段比较诱变菌株与出发菌株的基因组、转录组、蛋白组等差异,探索影响 L-谷氨酸快速合成与分泌的关键所在。Shi 等^[27]通过对温度敏感的 *C. glutamicum* TCCC 11822 与野生型菌株 ATCC 13032 进行基因组比较,发现 TCCC 11822 中存在细胞膜合成基因的突变以及细胞壁合成基因 *murAB* 的缺失。在野生型菌株 *C. glutamicum* ATCC 13032 中敲除 *murAB* 基因^[27],或引入相应突变基因^[28],可以激发 *C. glutamicum* ATCC 13032 中 L-谷氨酸的温度敏感分泌。

随着基因组编辑技术的快速发展,其在 *C. glutamicum* 中的应用研究也陆续开展,Krumbach 等^[29]利用 CRISPR/Cas12a 技术对 *C. glutamicum* 基因组上表达 L-谷氨酸输出机械通道蛋白 MscCG 的基因进行了密码子饱和突变,最终筛选到一系列可以促进 L-谷氨酸输出的 MscCG 突变体。Cleto 等^[30]尝试在 *C. glutamicum* 中利用 CRISPRi 技术对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶编码基因 *pck* 与丙酮酸激酶编码基因 *pyk* 进行转录干扰,并探索其对 L-谷氨酸生产的影响;结果表明,相比于 *pck* 与 *pyk* 的直接敲除,转录干扰可更加有效地提升 L-谷氨酸的产量。未来随着 CRISPRi 技术在 *C. glutamicum*

中的成熟应用,可更方便地进行代谢过程的精确调控与动态调控。

2.2 L-赖氨酸的代谢工程育种

L-赖氨酸是饲料中最常用的氨基酸添加剂,具有促进动物生长发育、提高肉质品品质等重要功能,市场需求非常广泛。近年来,L-赖氨酸的发酵生产水平不断提升,实现了在 *C. glutamicum*、*E. coli* 中的高效生产,最高发酵产量可达 240 g/L^[31],转化率在 68% 以上。

传统的 L-赖氨酸生产菌是通过诱变筛选获得,基于组学分析与计算机模拟的反向代谢工程在 L-赖氨酸的生产中也发挥了重要的作用。Ohnishi 等^[13]通过对诱变菌株 *C. glutamicum* B-6 与其原始菌株进行比较基因组学分析,确定了 L-赖氨酸高产菌中存在 3 个突变基因对 L-赖氨酸的高产有重要作用,于是将 *lysC*^{T311I}、*hom*^{V59A}、*pyc*^{P458S} 这 3 个突变基因引入野生型菌株中,达到了 80 g/L 的 L-赖氨酸产量。Ikeda 等^[32]后来同样基于 *C. glutamicum* B-6 与其原始菌株的比较基因组学分析,确定了 L-赖氨酸末端合成、中心碳代谢中的 5 个突变基因对于 L-赖氨酸的高产有重要作用,在野生型菌株中引入这些突变基因,构建的工程菌株不仅获得了 L-赖氨酸高产量与高转化率,同时具有良好的发酵稳定性与耐热性。除组学分析之外,代谢模拟也是反向代谢工程改造的有效手段。Ye 等^[33]基于 *E. coli* 代谢模型 iML1515,构建了酶约束模型 ec_iML1515,并基于此模型对 20 个高需求蛋白的表达水平进行了优化,使 L-赖氨酸产量达到 95.7 g/L,进一步优化 NH_4^+ 及溶氧水平使 L-赖氨酸产量达到 193.6 g/L,葡萄糖转化率达 0.74 g/g,展现了代谢模拟在指导代谢工程改造方面的强大功能。

目前,L-赖氨酸生产菌的正向代谢工程选育工作主要涉及酶的反馈抑制解除、前体物与辅酶 NADPH 供应增强、阻断竞争代谢途径等。其中,辅酶平衡对于 L-赖氨酸的合成有非常重要的作

用, 因为合成 1 mol L-赖氨酸需要消耗 4 mol 的 NADPH。一系列代谢工程工作针对辅酶的平衡展开, 一种策略是提高胞内 NADPH 的供应, 如增强磷酸戊糖途径 (PPP 途径) 以增加 NADPH 的合成^[1]; 通过引入吡啶核苷酸转氢酶编码基因 *pntAB* 强化 NADH 与 NADPH 之间的转换; 或者构建新的 NADPH 合成途径^[5,34]; 另一种策略是将 L-赖氨酸合成中的 NADPH 依赖改变为 NADH 依赖, 减少对 NADPH 的需求。Wu 等^[6]尝试在 *C. glutamicum* 中使用不同来源的 NADH 依赖的脱氢酶, 以减少对于 NADPH 的消耗需求。结果表明, 这种辅酶改造可有效地促进 L-赖氨酸的生产。

代谢过程的动态调控是提升目标氨基酸合成效率的有效方式。在 L-赖氨酸的正向代谢工程中, 利用 L-赖氨酸核糖开关进行相关基因的调控可以实现不依赖外加诱导剂的条件下, 利用胞内 L-赖氨酸对相关途径进行自调控, 以促进 L-赖氨酸的生产。在 *E. coli* 与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 中发现的 L-赖氨酸核糖开关位于 *lysC* 基因的 5'非翻译区, 在 L-赖氨酸存在时, 会抑制 *lysC* 的翻译起始过程, 是一种“lysine-OFF”开关。Zhou 等^[21]在 *C. glutamicum* 中分别引入来自 *E. coli* 与 *B. subtilis* 的 L-赖氨酸核糖开关, 使其控制柠檬酸合酶 (*gltA*) 的翻译过程, 从而对三羧酸循环产生负调控作用, 使更多的前体物草酰乙酸用于 L-赖氨酸的合成过程。所构建的菌株分别使 L-赖氨酸的产量提高了 63% 与 38%。后来, 他们通过进行 *tetA*-依赖的双重基因筛选, 从“lysine-OFF”开关构建出了“lysine-ON”开关^[35], 并在 *C. glutamicum* 中对 L-赖氨酸输出蛋白 (*lysE*) 进行“lysine-ON”控制, 对柠檬酸合酶 (*gltA*) 进行“lysine-OFF”控制, 因而通过 L-赖氨酸对目标合成途径与竞争代谢途径实现了协同的动态调控, 有效提高了 L-赖氨酸的转化率。

目前, 响应 L-赖氨酸浓度构建的生物传感器在 L-赖氨酸生产菌进化代谢工程育种中应用较多。一种传感器类型是基于转录调控因子 LysG

响应高浓度 L-赖氨酸促进 *lysE* 基因的表达, 将 *lysE* 基因与荧光蛋白基因融合, 通过荧光激活细胞分选技术 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) 筛选荧光信号强的细胞, 获得高产 L-赖氨酸的菌株^[36]。Kortmann 等^[37]利用此 L-赖氨酸传感器进行 *C. glutamicum* 中丙酮酸羧化酶突变体的筛选, 通过 FACS 筛选获得了有利于 L-赖氨酸产量提升的丙酮酸羧化酶突变体, 突变体 PCx^{T132A} 与 PCx^{T343A} 的基因组整合, 可使 L-赖氨酸的产量提升 6%–14%。Wang 等^[38]在 *E. coli* 中利用 L-赖氨酸传感器从常压室温等离子体 (Atmospheric Room Temperature Plasma, ARTP) 诱变突变体库中筛选到了产量、转化率相比于出发菌株分别提升 21% 与 9.05% 的突变菌株 MU-1。另一种传感器类型是基于 L-赖氨酸核糖开关与 L-赖氨酸的结合, 产生调控作用。如前所述, L-赖氨酸核糖开关识别细胞内的 L-赖氨酸, 并抑制所调控基因的翻译过程。Yang 等^[25]利用 *E. coli* 来源的 L-赖氨酸核糖开关调控 *tetA* 的表达, 当细胞内 L-赖氨酸浓度高时, *tetA* 表达受阻, 细胞不具有四环素抗性; TetA 可以转运 Ni²⁺ 进入细胞, 导致细胞死亡, 若其表达受阻, 则可避免 Ni²⁺ 的胞内转运, 此时细胞可以在 NiCl₂ 环境中生长。通过选择适当浓度的 NiCl₂ 作为选择压力, 可以筛选 L-赖氨酸产量高的菌株; 他们利用此生物传感器, 对 L-赖氨酸生产中对代谢流分配起关键作用的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (*ppc* 基因编码) 进行了启动子优化, 从构建的 *ppc* 启动子文库中筛选对 L-赖氨酸生产有利的启动子。

2.3 L-苏氨酸的代谢工程育种

L-苏氨酸是人类与动物所必需的一种氨基酸, 常作为饲料添加剂使用。目前, L-苏氨酸的工业生产主要利用 *E. coli* 发酵进行, 发酵产量可达 120 g/L 以上^[31]。*E. coli* 中 L-苏氨酸的代谢工程育种工作主要集中在正向代谢工程方面^[39]: (1) 解除关键酶受到的反馈抑制^[3,40]。众多研究通过在

天冬氨酸激酶编码基因 *thrA* 以及 *lysC*^[41] 中引入定点突变,解除天冬氨酸激酶 I 与 III 受到的反馈抑制,可有效提升 L-苏氨酸的产量。(2) 通过启动子替换、增加拷贝数等强化 L-苏氨酸合成途径中酶的表达。(3) 竞争代谢途径及 L-苏氨酸利用途径的阻断。L-甲硫氨酸与 L-赖氨酸的合成需要以 L-苏氨酸合成途径中的代谢物为前体物,高丝氨酸琥珀酰转移酶编码基因 *metA*、二氨基庚酸脱羧酶编码基因 *lysA* 的敲除,可增强 L-苏氨酸的合成。甘氨酸、L-异亮氨酸的合成需要以 L-苏氨酸为前体物,苏氨酸脱氢酶编码基因 *tdh* 的敲除、苏氨酸脱水酶编码基因 *ilvA* 的突变可以减少 L-苏氨酸的降解。(4) NADPH 供应的平衡优化。1 mol L-苏氨酸的合成需要 3 mol NADPH,辅因子的平衡供应是 L-苏氨酸高效合成的有效保障^[42-43]。(5) 强化输出蛋白 RhtA、RhtB、RhtC 的表达,增强 L-苏氨酸的胞外输出过程^[3];敲除 *thcC*、丝氨酸/苏氨酸运输蛋白编码基因 *sstT*^[44],阻断 L-苏氨酸的胞内摄取途径。

这些正向代谢工程策略的综合应用,获得了许多 L-苏氨酸高产菌株, Lee 等^[3]利用系统代谢工程构建的 *E. coli* 工程菌具有 82.4 g/L 的产量。然而, L-苏氨酸的合成需要以 TCA 循环的草酰乙酸为前体物,因此,细胞生长与 L-苏氨酸生产存在碳流竞争,影响转化率的进一步提升。Liu 等^[43]进行了碳流分布的双阶段动态调控,将发酵过程分为细胞生长阶段与产物生产阶段。在细胞生长阶段异源表达丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶与柠檬酸合酶,促进 TCA 循环的进行,加快葡萄糖利用与细胞生长;在生产阶段,利用 IPTG 诱导异源柠檬酸合酶的表达关闭,将碳代谢流引向 L-苏氨酸的合成途径;同时,进行了 NADPH 再生系统的构建,最终使 L-苏氨酸的生产在摇瓶和发酵罐水平分别提升了 2.02 倍和 1.21 倍。Fang 等^[45]利用 *cI^{ts}-p_{PR}-p_L* 温度感应开关控制丙酮酸羧化酶 (*pyc*) 与 L-苏氨酸输出蛋白 (*rhtC*),动态调控碳代谢在丙酮酸与草酰乙酸之间的分配,

实现碳代谢流的动态平衡调控,显著提高了 L-苏氨酸的转化率;他们进一步利用此温度开关关闭 L-丙氨酸合成途径后,使 L-苏氨酸的摩尔转化率达到 124.03%,展现了碳代谢流动态调控对 L-苏氨酸转化率的有效提升。

3 分支链氨基酸代谢工程育种

3.1 分支链氨基酸育种策略

分支链氨基酸 (BCAAs),即 L-亮氨酸、L-异亮氨酸和 L-缬氨酸,是哺乳动物的必需氨基酸^[46],主要生产菌株包括 *E. coli*^[47-48] 和 *C. glutamicum*^[47,49-50]。分支链氨基酸在 *C. glutamicum* 中的合成途径如图 2 所示。三种分支链氨基酸合成过程中存在非常紧密的联系,合成途径存在若干共用的酶与前体物,并且利用相同的转运蛋白进行胞外输出。因此,3 种分支链氨基酸在代谢工程改造中有很多相似的策略,如 *C. glutamicum* 中分支链氨基酸输出蛋白 BrnFE 的强化^[51-56]、分支链氨基酸摄取蛋白 BrnQ 的敲除^[54,56]、乙酰羟酸合酶 IlvBN 的反馈抑制解除^[49,57-58]、前体物丙酮酸的供应增强^[49,59]等基于理性设计的正向代谢工程策略(表 2),以及基于组学分析与计算机模拟的反向代谢工程与基于生物传感器的进化代谢工程^[60-61]。

3.2 L-亮氨酸的代谢工程育种

由于 3 种分支链氨基酸在合成途径上密切相关,它们的代谢工程策略存在很多相似之处,本文将主要以 L-亮氨酸的代谢工程研究为代表进行介绍。目前, L-亮氨酸的代谢工程研究主要集中在正向代谢工程方面(表 2): (1) 解除关键酶的反馈抑制是高效生产 L-亮氨酸最重要的一步。众多研究通过筛选解除反馈抑制的异丙基苹果酸合酶编码基因 *leuA* 突变体,提升了 L-亮氨酸的产量^[46,49,62]。Vogt 等^[49]通过对野生型菌株 *C. glutamicum* B018 的 *leuA* 点突变 (G1586A, G1595A),消除 L-亮氨酸对异丙基苹果酸合酶的反馈抑制,增强了 L-亮氨酸生产的碳通量。(2) 合成途径相关基因的强化。

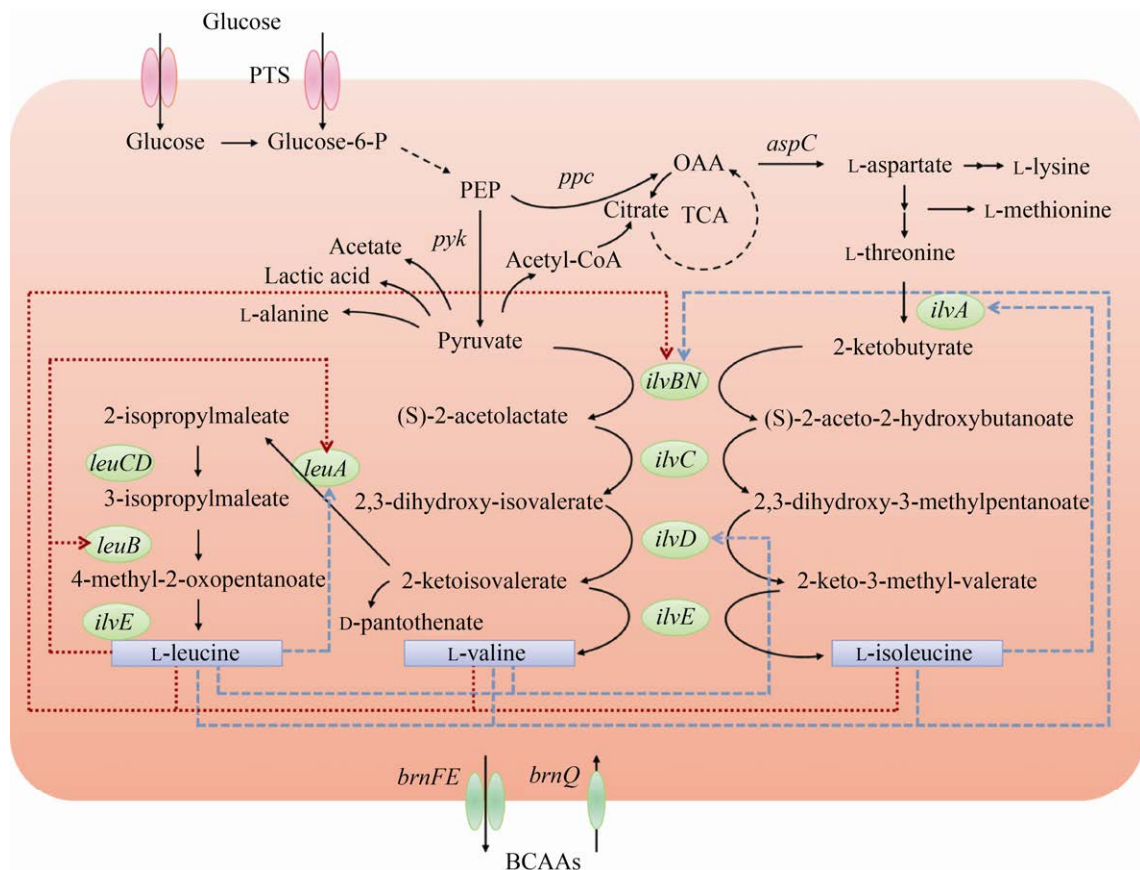


图2 *C. glutamicum* 中分支链氨基酸的合成途径

Fig. 2 Biosynthesis pathway of branched-chain amino acids in *C. glutamicum*. Blue dashed lines indicate feedback inhibition, red dotted lines indicate feedback repression.

包括 *leuA*、*leuBCD* 等基因的直接过表达，以及抑制 *leuBCD* 转录的转录调控因子 LtbR 的敲除^[63]等。(3) 前体物的供应增强。丙酮酸是产生 BCAAs 的常见中间体，也用于生产其他竞争副产品，如乳酸、乙酸、L-丙氨酸等^[46,59]。Huang 等^[59]通过敲除 *ilvA* 基因、丙氨酸转氨酶编码基因 *alaT*、乳酸脱氢酶编码基因 *ldh*、羟基酮泛酸甲基转移酶和 D-泛酸合酶编码基因 *panBC*，以减少副产物 L-异亮氨酸、L-丙氨酸、乳酸、D-泛酸的形成，获得的工程菌株 MDLeu-19 产量比对照菌株高出 54.1%，在分批补料条件下，可积累 38.1 g/L 的 L-亮氨酸。另一方面，大量的丙酮酸需要用于 TCA 循环，因此许多研究尝试通过弱化 TCA 循环，使更多的丙酮酸用于分支链氨基酸的合成。崔毅^[12]将 TCA 循环中柠檬酸

合酶 (*gltA* 编码) 启动子替换为 L-亮氨酸生产菌 *C. glutamicum* CP 中的特异性启动子 $P_{Cp-2928}$ ，从而使碳源在乙酰辅酶 A 代谢节点流向 TCA 循环的通量降低，获得了 L-亮氨酸工程菌 AL13，L-亮氨酸产量达 (13 ± 0.1) g/L，比出发菌株提升了 21 倍。Vogt 等^[49]通过将较弱的启动子 $P_{dapA-L1}$ 替换为柠檬酸合酶编码基因 *gltA* 的启动子，获得的菌株 MV-LeuF2 比对照菌株 L-亮氨酸产量增加了 15%，副产物 L-缬氨酸减少了 69.3%。(4) 提高 L-亮氨酸的转运能力。Kutukova 等^[64]报道在 *E. coli* 中过表达编码 L-亮氨酸输出蛋白编码基因 *yeaS* (*leuE*)，可以提高 L-亮氨酸的产量。在 *C. glutamicum* 中，*brnFE* 基因受到转录调控因子 Lrp 的正调控，研究报告 *brnFE* 和 *lrp* 过表达有利于 L-亮氨酸的生物合

表 2 分支链氨基酸生产菌株的正向代谢工程研究进展

Table 2 Summary of forward metabolic engineering for production of branched-chain amino acids

Amino acid	Approaches	Host	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))	References
L-leucine	<i>ilvE^{mut}, tyrB</i>	<i>E. coli</i>	2.70		0.038	[65]
	<i>leuA^{mut}</i>	<i>E. coli</i>	5.20		0.108	[62]
	<i>leuA^{ibr}, ΔilvE, P_{tac-21-sucAB/pACYC-tyrB}</i>	<i>E. coli</i>	11.40		0.158	[66]
	<i>ΔilvE/pEC-XK99E-aspB</i>	<i>C. glutamicum</i>	20.81	0.174	0.289	[57]
	<i>ΔltbR, AHAIIR^{mut}, rocG, ilvABNC^{mut}, leuD^H</i>	<i>C. glutamicum</i>	23.31	0.191	0.324	[63]
	<i>ΔavtA, ΔiolR, ΔltbR, ΔgluA, ilvBN^{mut}, P_{tur-leuA_B018}, ΔP_{gluA::P_{dapA-L1}}</i>	<i>C. glutamicum</i>	24.00	0.218	0.330	[49]
	<i>ΔilvA, ΔalaT, Δldh, ΔpanBC, ΔltbR, pZ8-1leuA^{ibr}</i>	<i>C. glutamicum</i>	38.10	0.305	0.794	[59]
	<i>ilvBN^{XV}, leuCD^{CP}, leuA^{CP}, bcd_{Bsu}, leuBCD, P_{gapA-pntAB_{E. coli}}, Δldh, ΔilvA, ΔP_{gluA::P_{cp-2928}}</i>	<i>C. glutamicum</i>	39.80	0.158	0.829	[12]
	<i>ilvA^{mut}, ilvIH^{mut}, thrABC, ygaZH, ilvCED, lrp</i>	<i>E. coli</i>	9.46	0.140	0.157	[52]
	<i>SG^f, α-ABA^f, pTHR101 with a thr operon and ilvA, carbon source and glucose feeding strategy</i>	<i>E. coli</i>	11.95			[67]
L-isoleucine	<i>MH20-22B^{mut}, ilvA^{ibr}, hom^{ibr}, dapA^{mut}, ilvA^{mut}, hom^{mut}, ΔP_{hom::P_{cspB}}</i>	<i>C. glutamicum</i>	14.30	0.137	0.184	[68]
	<i>thrABC, ΔalaT</i>	<i>C. glutamicum</i>	15.40			[69]
	<i>JHI3-156/pDXW-8-lrp-brnFE</i>	<i>C. glutamicum</i>	26.90	0.122	0.374	[7]
	<i>pDXW-8-fusA-frr-ilvA-ilvB-ilvN-ppnk</i>	<i>C. glutamicum</i>	28.50	0.139	0.360	[70]
	<i>pDXW-8-gnd-pgl-fbp</i>	<i>C. glutamicum</i>	28.96	0.138	0.345	[71]
	<i>ΔbrnQ, brnFE</i>	<i>C. glutamicum</i>	29.00	0.240		[53]
	<i>TD^{ibr}, AHAS^{ibr}</i>	<i>C. glutamicum</i>	30.70	0.120	0.426	[58]
	<i>TD^{ibr}, AHAS^{ibr}, ppnk</i>	<i>C. glutamicum</i>	32.30			[72]
	<i>hom</i>	<i>C. glutamicum</i>	36.50			[73]
	<i>ΔlacI, attilvG::ptac, attilvB::ptac, ilvH^{G41A,C50T}, ΔilvA, ΔpanB, ΔleuA, ΔaceF, Δmdh, ΔpfkA::Km^R, pKBRilvBN^{mut}CED, pTrc184ygaZHlrp</i>	<i>E. coli</i>	32.30		0.580	[15]
L-valine	<i>ΔlacI, ΔilvA, overexpressing ilvBN^{mut}, ilvCED, ygaZH, lrp</i>	<i>E. coli</i>	60.70	0.220	2.06	[74]
	<i>ICD^{mut}(G407S), Δppc, Δpyc, pJC4ilvBNCE, MGE analysis</i>	<i>C. glutamicum</i>	8.50	0.220		[60]
	<i>ΔaceE/pJC4ilvBNCE, Δpqo</i>	<i>C. glutamicum</i>	35.20	0.130		[75]
	<i>ΔaceE, Δpqo, Δpgi/pJC4ilvBNCE</i>	<i>C. glutamicum</i>	48.00	0.490	0.656	[76]
	<i>ΔaceE, ΔalaT, ΔilvA/pJYW-4-ilvBNC^{VWB-1}-lrp^{VWB-1}-brnFE</i>	<i>C. glutamicum</i>	51.00	0.307	0.533	[55]
	<i>ΔldhA Δppc Δpta ΔackA ΔctfA ΔavtA, ilvN^{GE}CTM, gapA, pyk, pfkA, pgi, tpi, /pCRB-BNGECTTM, pCRB-DLD, oxygen deprivation conditions</i>	<i>C. glutamicum</i>	149.90	0.572		[77]
	<i>ΔldhA, pCRB-BN^{ibr}C^{mut}, pCRB-DLD, oxygen deprivation conditions, 24 h</i>	<i>C. glutamicum</i>	172.20	0.409		[4]
	<i>ΔldhA, pCRB-BN^{ibr}C^{mut}, pCRB-DLD, oxygen deprivation conditions, 48 h</i>	<i>C. glutamicum</i>	227.20			[4]

成^[51]。(5) 辅酶供应的平衡优化。合成 1 mol L-亮氨酸需要消耗 2 mol NADPH。而在糖酵解过程中产生 3 mol NADH。因此, NADH 过剩和 NADPH 不足也会抑制 L-亮氨酸的产生^[78]。目前报道的策略主要有两种类型:一种是增强 NADPH 的供应;另一种是改变相关酶的辅酶依赖性,改变对 NADPH 的需求。Cui 等^[12]引入了 *E. coli* 中的吡啶核苷酸转氢酶编码基因 *pntAB*,并由启动子 P_{gapA} 控制转录,以提高胞内 NADPH 的转化合成。构建的 L-亮氨酸工程菌产量达到 12.5 g/L,是出发菌株的 19.8 倍。Wang 等^[63]通过引入异源 NADH 依赖的亮氨酸脱氢酶 LeuDH 和谷氨酸脱氢酶 RocG,替换内源性依赖 NADPH 的支链氨基酸转氢酶 TA 和谷氨酸脱氢酶 GDH,有效地利用 NADH 生产 L-亮氨酸,最终菌株积累了 (23.31±0.24) g/L 的 L-亮氨酸,葡萄糖转化效率达到 0.191 g/g。

在进化代谢工程方面,除前面提到的利用基于转录调节因子 Lrp 的生物传感器^[51]进行筛选外,Zheng 等^[79]报道了利用稀有密码子从 *E. coli* 突变体库中筛选 L-亮氨酸菌株。分别将抗性基因 (*kan^R* 和 *spec^R*) 和颜色蛋白编码基因 (*gfp* 和 *ppg*) 中的 L-亮氨酸密码子替换为稀有密码子,建立以生长水平和颜色标记为指示的两类筛选体系。当细胞内 L-亮氨酸合成增强时,稀有密码子对应的 tRNA 得以被额外的氨基酸“装载”,从而恢复了由稀有密码子编码的抗性蛋白的翻译,菌体生长得以恢复,这种基于稀有密码子的筛选策略为氨基酸高产菌株的筛选和改造提供了一种不同于类似物筛选的新系统,克服了使用类似物筛选存在的高毒性、低阳性率和适用种类有限等缺点,理论上可以用于任何一种天然氨基酸高产菌株的筛选;同时也为氨基酸高产机制的发现和高产菌株的构建提供了新的思路。

4 芳香族氨基酸代谢工程育种

4.1 芳香族氨基酸育种策略

芳香族氨基酸包括 L-色氨酸、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸,它们在高分子材料、食品、保健品、药

品等领域有重要的应用,是一类具有高附加值的氨基酸品种,目前主要利用模式微生物 *E. coli*^[80-82]、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、*C. glutamicum*^[83] 等进行生产。其中,*E. coli* 中芳香族氨基酸的代谢工程研究报道最多。芳香族氨基酸在 *E. coli* 中的合成途径如图 3 所示,从图中可以看出,芳香族氨基酸的合成过程主要由共同的莽草酸途径与各自的分支途径组成,其中,L-苯丙氨酸与 L-酪氨酸的合成途径更为相似,而 L-色氨酸的合成途径则更为复杂,存在终产物 L-色氨酸的反馈阻遏、反馈抑制、弱化调节等多重调控机制。目前,芳香族氨基酸的正向代谢工程研究(表 3)主要集中在两方面^[84],一方面是中心碳代谢的改造,增强前体物 PEP 与 E4P 的供应,同时提高 PEP 与 E4P 的缩合效率,提高莽草酸途径强度;另一方面是解除分支途径关键酶受到的反馈调节,强化分支合成效率。

PEP 与 E4P 是莽草酸途径的前体物,而这两种物质的来源均与中心碳代谢过程有关。增强 PEP 供应的策略包括阻断或减弱 PEP 的消耗途径(如敲除 *ppc*、*pykA*、*pykF* 基因,用非磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(non-PTS)系统替换 PTS 系统进行糖利用等),以及增强 PEP 的合成(如过表达 *pps*、*pck* 基因等)。E4P 是磷酸戊糖途径的中间产物,已有报道表明,增强转酮醇酶(*tktA* 编码)^[85]的表达,可以增强 E4P 的供应,利于芳香族氨基酸的合成。除此之外,也有阻断糖酵解途径,以强化磷酸戊糖途径的尝试,但往往对于细胞生长有损害^[86]。因此,如何动态重构中心碳代谢与芳香族氨基酸合成之间的平衡,在保障细胞正常生长前提下,使更多的代谢流用于芳香族氨基酸的合成,是提升芳香族氨基酸产量与转化率的关键。

响应芳香族氨基酸的生物传感器构建已有文献报道,如 Yang 等^[25]在构建 L-赖氨酸响应核糖开关时,采用类似的方法构建了 L-色氨酸响应的核糖开关;Chou 等^[23]基于 TyrR 响应 L-酪氨酸对 *aroF* 的转录调控,在 *E. coli* 中构建了表型进化的反馈控制(Feedback-regulated evolution of phenotype,

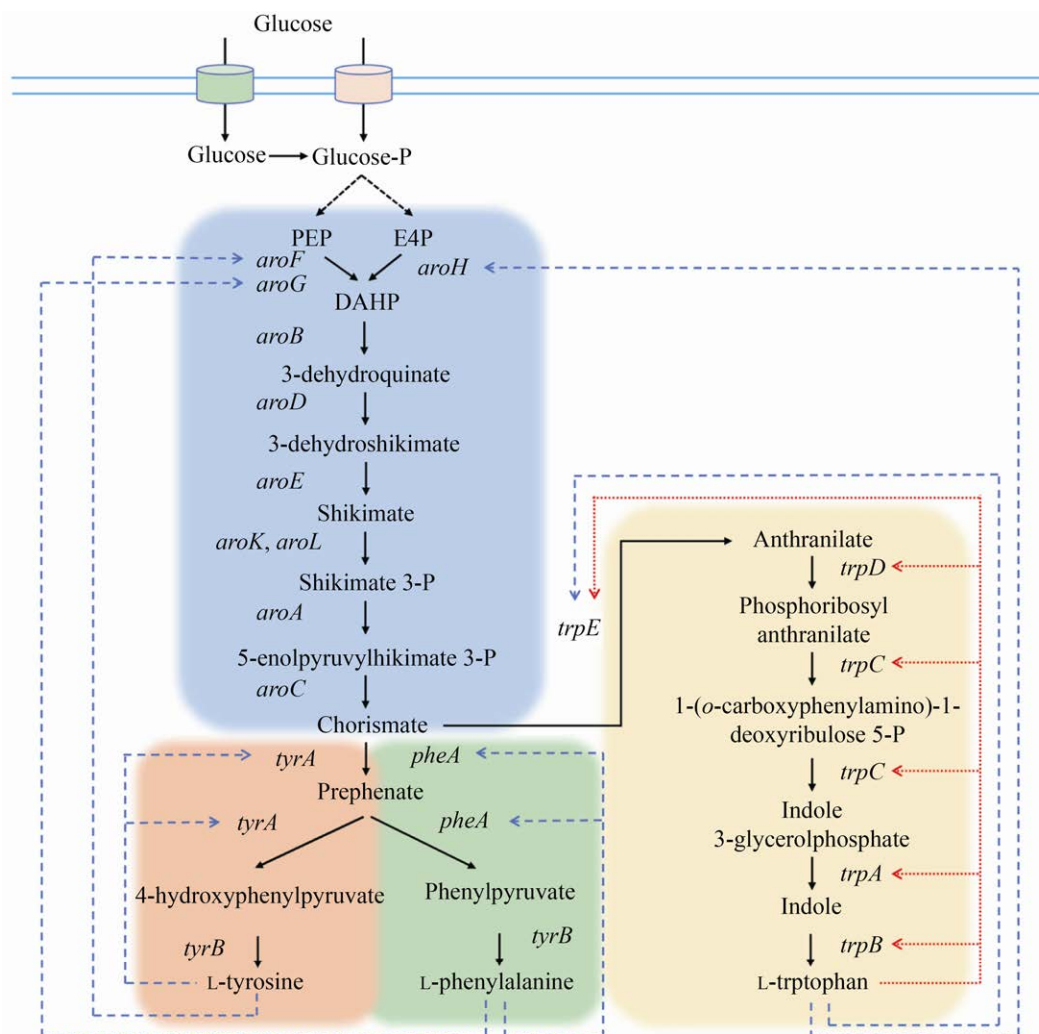


图3 *E. coli* 中芳香族氨基酸的合成途径

Fig. 3 Biosynthesis pathway of aromatic amino acids in *E. coli*. Blue dashed lines indicate feedback inhibition, and red dotted lines indicate feedback repression. The shared chorismate synthesis pathway and the three branched synthesis pathways are highlighted in different colors.

FREP) 系统, 随着 L-酪氨酸胞内浓度的升高, 不断减慢基因突变速率, 最终获得了 L-酪氨酸产量提高了 5 倍的菌株。Mahr 等^[26]基于 *mtr* 基因 (编码 L-色氨酸转运蛋白) 的启动子, 成功构建了响应 L-苯丙氨酸的生物传感器, 并从 *E. coli* K-12 MG1655 突变体库中筛选到了 L-苯丙氨酸产量提升的菌株。未来随着这些生物传感器的不断发展, 它们将在芳香族氨基酸进化代谢工程中发挥重要的作用。

4.2 L-色氨酸的代谢工程育种

三种芳香族氨基酸在代谢工程育种策略上存在很多相似之处, 在此主要以 L-色氨酸的代谢工程育种进展为代表, 进行详细介绍。在 *E. coli* 中, AroF、AroG 与 AroH 为 3 个同工酶, 共同催化莽草酸途径的第一步缩合反应, 它们分别受到 L-酪氨酸、L-苯丙氨酸、L-色氨酸的反馈抑制, 其中 AroG 与 AroF 分别占据 80%、20% 的 DAHP 合成酶活性^[87], 因此很多研究中进行 AroG、AroF 解

表 3 芳香族氨基酸生产菌株的正向代谢工程研究进展

Table 3 Summary of forward metabolic engineering for production of aromatic amino acids

Amino acid	Approaches	Host	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))	References
L-Tyr	$\Delta tyrR/pCL1920::P_{LtetO-1}aroG^{fbr}tyrA^{fbr}ppsAtktA^b$	<i>E. coli</i>	9.70	0.102		[88]
	Global transcription machinery engineering	<i>E. coli</i>	13.80	0.120		[82]
	Small regulatory RNAs engineering	<i>E. coli</i>	21.90			[89]
	$\Delta tnaA, \Delta mtr, yjiv::P_{trc}-aroG, yghx::P_{trc}-trpE, yyrk::P_{lac}-trpD, ycvj::P_{ser}-serA$, repeated batch fermentation	<i>E. coli</i>	45.60	0.301	2.53	[90]
	$aroG^{fbr}, tyrR^{mut}, \Delta pheLA, P_{trc}-tyrA$	<i>E. coli</i>	55.00	0.300		[91]
	$\Delta pheA, \Delta tyrR/pAP-aroG^{fbr}-tyrA^{fbr}$	<i>E. coli</i>	55.54	0.250	1.38	[92]
	$\Delta pheA, \Delta tyrA, \Delta aroF, \Delta lac::P_{tac}::aroFBL^+, \Delta rbs::P_{tac}::glpX, \Delta gal::P_{tac}::tktA-cat/pF81(P_{tac}::aroF, pheA^{fbr}, aroB, aroL, Amp^R, lacI)$	<i>E. coli</i>	10.10		0.37	[85]
L-Phe	$\Delta ptsI::iolT2-ppgK, \Delta aroP, \Delta aceE, \Delta ldh$	<i>C. glutamicum</i>	15.76			[93]
	$pheA^{fbr}, ydiB, aroK, aroG15$	<i>E. coli</i>	23.80	0.154	0.073	[94]
	$\Delta pheA, \Delta tyrA, \Delta aroF, aroF^{fbr}, pheA^{fbr}$	<i>E. coli</i>	32.00			[95]
	$\Delta pheA, \Delta tyrA, \Delta aroF/pJF119EH-aroF^{mut}-pheA^{fbr}-aroL^{mut}$	<i>E. coli</i>	35.00			[96]
	L-tyrosine auxotrophic	<i>E. coli</i>	35.38	0.238	0.61	[97]
	Multiple random mutagenesis, $aroF^{mut}, pheA^{fbr}$	<i>E. coli</i>	57.63	0.242	1.153	[98]
	Multiple random mutagenesis, $aroF^{mut}, pheA^{fbr}, aroA$	<i>E. coli</i>	62.47	0.236		[99]
	L-tyrosine auxotrophic, $\Delta tyrR, aroF^{mut}, aroD, pheA^{fbr}, galP, glk$	<i>E. coli</i>	72.90	0.259		[100]
	$\Delta trpR, \Delta traA, \Delta ptsG$, with tryptophan attenuator deletion and <i>trp</i> promoter swapping by 5CP <i>tacs</i> promoter cluster, $\Delta aroP, \Delta tnaB, \Delta mtr/pCL1920-aroG^{fbr}-trpE^{fbr}-tktA$	<i>E. coli</i>	16.30			[101]
	$\Delta tnaA, trpEDCBA, yddG$	<i>E. coli</i>	36.30			[102]
L-Try	$aroG^{fbr}, trpEDCBA, \Delta pykF, \Delta ptsH, \Delta trpR, \Delta attenuator, \Delta trpL, galP, glk$, repressing <i>pta</i>	<i>E. coli</i>	39.70	0.167	1.6	[103]
	$\Delta lacU169, gal490\lambda C1857, \Delta(cro-bioA), rpsL, (StrR), \Delta aroF, \Delta aroG, \Delta mtr, \Delta tnaA, \Delta tnaB, \Delta \lambda^a, \Delta aroH::P_{J23119-tpsL-tac}-(aroG^{S180F}-serA^{H344A/N364A})$	<i>E. coli</i>	40.30	0.150	0.6	[10]
	$P_{trc}-trpE^{S40F}DCBA$					
	$serA6 lacU169$	<i>E. coli</i>	42.30	0.176		[104]
	$tna2/pBE7-P_{lacUV5}-aroG^{fbr}-P_{lacUV5}-trpE^{fbr}$					
	$\Delta trpR, \Delta tnaA, \Delta pheA, \Delta tyrA, pta::pta1/pSTV-03-aroF^{fbr}-trpE^{fbr}D$	<i>E. coli</i>	44.00	0.130	0.82	[105]
	$\Delta tnaA, \Delta gltA, \Delta pta, \Delta ackA, \Delta poxB, trpEDCBA$	<i>E. coli</i>	47.18	0.156		[106]
$\Delta trpR, \Delta tnaA, \Delta pta, \Delta mtr, aroG^{fbr}, trpERDCBA, serA, tktA, ppsA, yddG$	<i>E. coli</i>	48.68	0.218		[107]	

反馈抑制基因的强化表达来增强莽草酸途径^[108]。L-色氨酸分支合成途径中的酶以 *trpEDCBA* 操纵子结构存在, 基因表达受到 L-色氨酸的反馈阻遏与弱化调节。因此, 筛选解除反馈抑制的突变体酶被众多研究表明是芳香族氨基酸合成途径强化的有效手段^[82,94,108-110]。除此之外, 转录调控因子 TrpR 对 *trpEDCBA*、*aroH*、*trpR*、*mtr*、*aroL* 存在 L-色氨酸依赖的转录阻遏调控^[108], 可以通过敲除 *trpR* 基因或者引入突变解除阻遏。由于这些反馈抑制、转录调控都依赖 L-色氨酸, 降低细胞内 L-色氨酸的浓度, 也可以缓解负面调控的影响。Zhao 等^[111]比较发现 *E. coli* 中 L-色氨酸摄取蛋白 Mtr、TnaB、AroP 的敲除对于 L-色氨酸生产都有促进作用, 其中 *mtr* 基因的敲除作用作为明显, 使 L-色氨酸的产量相对对照提高了 34%。Liu 等^[102]在一株 L-色氨酸生产菌 *E. coli* TRTH 中表达芳香族氨基酸分泌蛋白 YddG, 增强输出过程, 进而影响细胞代谢流分布, 促进 L-色氨酸的生产。

2018 年, Chen 等^[112]发现 *E. coli* 中的 L-色氨酸合成分支中不仅存在以上的反馈调节, 还存在前馈调节, *trpC* 编码的吡啶甘油磷酸合成酶受到邻氨基苯甲酸的非竞争性前馈抑制, *trpC* 中邻氨基苯甲酸结合位点突变后提高了 L-色氨酸的合成。而在黑曲霉 *Aspergillus niger* 中的 *trpC* 则受到邻氨基苯甲酸的前馈激活调节, 在 L-色氨酸生产菌 *E. coli* 中引入来自 *A. niger* 的 *trpC*, 使 L-色氨酸产量与转化率分别由 19 g/L、0.15 g/g 提高到 29 g/L 与 0.18 g/g^[112]。

L-色氨酸合成的复杂性, 一方面是由于存在上述复杂调控; 另一方面, L-色氨酸的合成除了需要 PEP 与 E4P 作为前体物之外, 还需要 L-丝氨酸、谷氨酰胺以及 5-磷酸- α -D-核糖-1-二磷酸盐 (PRPP) 作为前体物, 前体物的协调供应涉及众多代谢过程。Li 等^[113]对这些前体物的供应进行了增强; 同时进行了辅因子平衡, 获得了 L-色氨酸产量比出发菌株高 2.76 倍的 *E. coli* 工程菌。

5 其他氨基酸代谢工程育种

随着氨基酸产业的快速发展, 小品种氨基酸作为高附加值氨基酸, 其市场应用不断拓展, 市场需求不断上涨, 成为氨基酸行业发展的新型趋势。近年来, 采用系统代谢工程方法进行高附加值氨基酸微生物生产的研究不断涌现。Wu 等^[114]在 *E. coli* 中解除 L-组氨酸的反馈抑制、强化 L-组氨酸合成途径的酶表达、增强磷酸核糖焦磷酸的供应、改变嘌呤核苷酸合成路径、引入来自 *B. subtilis* 的 NADH 依赖的谷氨酸脱氢酶以及来自 *C. glutamicum* 的 L-赖氨酸输出蛋白等, 最终在 5 L 发酵罐中获得了高达 66.5 g/L 的 L-组氨酸产量。Zhang 等^[115]利用 CRISPR-Cpf1 基因组编辑系统进行了 *C. glutamicum* 13032 中 L-脯氨酸生产的系统代谢工程构建。通过解除谷氨酸 5-激酶 ProB 受到的反馈抑制并增强其表达、敲除脯氨酸脱氢酶以阻断 L-脯氨酸的分解、增强谷氨酸合成、增强 NADPH 供应、减少副产物 L-丙氨酸合成等策略, 获得了菌株 ZQJY-9, 在 3 L 发酵罐中获得了 120.18 g/L 的 L-脯氨酸产量。由于高浓度的 L-丝氨酸对 *E. coli* 具有毒性, 因此限制了 L-丝氨酸的高效生产。Mundhada 等^[116]利用适应性进化策略, 首先阻断 *E. coli* 中的 L-丝氨酸利用途径, 然后在适应性进化中逐渐将 L-丝氨酸浓度由 3 g/L 上升到 100 g/L, 最终获得的优势菌株在 *thrA*、*rho*、*lrp*、*pykF*、*eno*、*rpoB* 基因存在突变, 产量达到 37 g/L, 展示了适应性进化在代谢工程中的巨大应用潜力。后来, Rennig 等^[117]在 *E. coli* 中将 L-丝氨酸合成途径中的 *serA^{mut}*、*serC*、*serB* 基因构建在一个操纵子上, 并利用抗生素抗性作为筛选标记对 *serA^{mut}CB* 操纵子进行了翻译起始区域文库筛选, 最终在 1 L 发酵罐中获得了 50 g/L 的 L-丝氨酸。四氢嘧啶, 是一种特殊的环化氨基酸, 具有保湿抗衰老等功能, 在化妆品行业具有重要应用。传统采用“细菌挤奶”技术从嗜盐菌中生产, Ning

等^[118]在 *E. coli* 中质粒表达源自伸长嗜盐菌 *Halomonas elongata* 的四氢嘧啶合成基因簇 *ectABC*, 并进行前体物供应协调, 在 7.5 L 发酵罐获得了 25.1 g/L 的四氢嘧啶。未来随着代谢工程技术的不断发展, 必将有更多的高附加值氨基酸及其衍生物实现微生物的高效率生产。

6 氨基酸代谢工程育种的发展趋势

近 30 年来, 代谢工程在中国迅速发展, 在氨基酸与其他化学品的生产菌株选育中发挥着与日俱增的作用。在氨基酸的代谢工程育种方面, 正向代谢工程、反向代谢工程与进化代谢工程都获得了一系列高产优势菌株。随着相关技术的不断发展, 氨基酸代谢工程育种主要有以下发展趋势。

(1) 动态代谢工程

氨基酸作为初级代谢产物, 它们的合成通常伴随细胞的生长过程, 以中心碳代谢过程的中间物质作为前体物, 因此, 细胞生长是目标氨基酸生产的重要保障; 然而, 在氨基酸快速生产阶段, 流向中心碳代谢的代谢流势必会导致目标氨基酸转化率的降低。因此, 在氨基酸代谢工程育种的未来发展中, 动态调控细胞代谢过程, 实现细胞生长与氨基酸生产的平衡重构, 对于提高目标氨基酸的转化率与生产效率具有重要的作用。近年来, 动态代谢工程的应用越来越多, 一系列基于温度^[45]、诱导剂^[119]、胞内代谢产物^[120]等诱导因素进行的动态调控不断涌现, 在提高目标产品的高效合成方面有非常显著的作用。因此, 动态代谢工程是氨基酸代谢工程育种的一个重要发展方向。

(2) 高附加值氨基酸及衍生物的代谢工程育种

随着大宗氨基酸品种的市场不断趋于饱和, 小品种氨基酸、非蛋白质氨基酸、环化氨基酸、氨基酸衍生物等新型产品的需求不断增长, 具有广阔的市场应用前景。因此, 这些新品种氨基酸的代谢工程育种将成为氨基酸行业发展的热点。综合运用系统代谢工程策略, 选育高产量/高转化

率/高生产强度、稳定遗传的新产品生产菌株是氨基酸行业发展的重要趋势。

(3) 系统代谢工程的综合应用

尽管基于组学分析与计算机模拟的代谢工程与进化代谢工程在氨基酸的代谢工程育种方面展现出了强大的功能, 但目前氨基酸的代谢工程育种仍然以基于理性设计的正向代谢工程为主。进一步开发组学数据的整合分析方法, 完善计算机模拟技术方法, 开发构建新的生物传感技术等对于充分发挥反向代谢工程与进化代谢工程的作用, 推动氨基酸的代谢工程育种效率具有重要的意义。

(4) 基于工艺革新的代谢工程改造

传统的氨基酸发酵一般采用好氧发酵, 依赖 TCA 循环提供能量、进行辅酶循环。L-缬氨酸、L-丙氨酸等氨基酸需要以丙酮酸为前体物, 在好氧发酵时, 大量丙酮酸进入 TCA 循环, 进行细胞代谢, 从而导致目标氨基酸的转化率较低。近年来, 通过基因改造改变相关酶的辅酶依赖性或者引入异源酶实现厌氧发酵或双阶段发酵, 对于氨基酸的转化率有显著的提升作用。新的工艺可以减少能源的消耗, 提高原料的利用率, 有效降低成本。未来基于工艺革新需求, 开发与节能减排、低成本原料利用等相匹配的菌株, 是氨基酸代谢工程育种的新趋势。

代谢工程在中国快速发展的 30 年来为氨基酸行业注入了新的活力, 同时也带来了新的挑战与机遇, 在市场竞争日趋剧烈的今天, 优良菌株的选育成为氨基酸生产企业制胜的法宝, 随着科研力量的不断投入, 氨基酸行业必将迎来更加蓬勃的发展。

REFERENCES

- [1] Becker J, Zelder O, Häfner S, et al. From zero to hero — design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab Eng*, 2011, 13(2): 159-168.
- [2] Park SD, Lee JY, Sim SY, et al. Characteristics of

- methionine production by an engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Metab Eng*, 2007, 9(4): 327-336.
- [3] 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.
- [4] Hasegawa S, Uematsu K, Natsuma Y, et al. Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(3): 865-875.
- [5] Bommareddy RR, Chen Z, Rappert S, et al. A *de novo* NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Metab Eng*, 2014, 25: 30-37.
- [6] Wu WJ, Zhang Y, Liu DH, et al. Efficient mining of natural NADH-utilizing dehydrogenases enables systematic cofactor engineering of lysine synthesis pathway of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2019, 52: 77-86.
- [7] Yin L, Shi F, Hu X, et al. Increasing L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* by overexpressing global regulator *lrp* and two-component export system BrnFE. *J Appl Microbiol*, 2013, 114(5): 1369-1377.
- [8] Elišáková V, Pátek M, Holátko J, et al. Feedback-resistant acetohydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(1): 207-213.
- [9] Prokhorova IV, Osterman IA, Burakovsky DE, et al. Modified nucleotides m(2)G966/m(5)C967 of *Escherichia coli* 16S rRNA are required for attenuation of tryptophan operon. *Sci Rep*, 2013, 3: 3236.
- [10] Chen L, Zeng AP. Rational design and metabolic analysis of *Escherichia coli* for effective production of L-tryptophan at high concentration. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(2): 559-568.
- [11] Hirasawa T, Shimizu H. Recent advances in amino acid production by microbial cells. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 42: 133-146.
- [12] 崔毅. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产 L-亮氨酸. 天津: 天津科技大学, 2019.
- Cui Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine production. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2019.
- [13] Ohnishi J, Mitsuhashi S, Hayashi M, et al. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(2): 217-223.
- [14] Ma Q, Zhang QW, Xu QY, et al. Systems metabolic engineering strategies for the production of amino acids. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(2): 87-96.
- [15] Park JH, Kim TY, Lee KH, et al. Fed-batch culture of *Escherichia coli* for L-valine production based on *in silico* flux response analysis. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(4): 934-946.
- [16] Lee JW, Na D, Park JM, et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(6): 536-546.
- [17] Long MF, Xu MJ, Qiao ZN, et al. Directed Evolution of ornithine cyclodeaminase using an EvolvR-based growth-coupling strategy for efficient biosynthesis of L-proline. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(7): 1855-1863.
- [18] 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.
- [19] Liu D, Evans T, Zhang FZ. Applications and advances of metabolite biosensors for metabolic engineering. *Metab Eng*, 2015, 31: 35-43.
- [20] 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.
- [21] Zhou LB, Zeng AP. Exploring lysine riboswitch for metabolic flux control and improvement of L-lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(6): 729-734.
- [22] Zhou L, Ren J, Li Z, et al. Characterization and engineering of a *Clostridium* glycine riboswitch and its use to control a novel metabolic pathway for 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia*

- coli*. ACS Synth Biol, 2019, 8(10): 2327-2335.
- [23] Chou HH, Keasling JD. Programming adaptive control to evolve increased metabolite production. Nat Commun, 2013, 4: 2595.
- [24] 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.
- [25] Yang JN, Seo SW, Jang S, et al. Synthetic RNA devices to expedite the evolution of metabolite-producing microbes. Nat Commun, 2013, 4: 1413.
- [26] Mahr R, Von Boeselager RF, Wiechert J, et al. Screening of an *Escherichia coli* promoter library for a phenylalanine biosensor. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(15): 6739-6753.
- [27] Shi T, Ma Q, Liu XQ, et al. Double deletion of *murA* and *murB* induced temperature sensitivity in *Corynebacterium glutamicum*. Bioengineered, 2019, 10(1): 561-573.
- [28] Shi T, Fan XG, Wu YS, et al. Mutation of genes for cell membrane synthesis in *Corynebacterium glutamicum* causes temperature-sensitive trait and promotes L-glutamate excretion. Biotechnol Biotechnol Equip, 2020, 34(1): 38-47.
- [29] 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.
- [30] Cleto S, Jensen JVK, Wendisch VF, et al. *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi). ACS Synth Biol, 2016, 5(5): 375-385.
- [31] Li YJ, Wei HB, Wang T, et al. Current status on metabolic engineering for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives. Bioresour Technol, 2017, 245: 1588-1602.
- [32] Ikeda M, Ohnishi J, Hayashi M, et al. A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006, 33(7): 610-615.
- [33] Ye C, Luo QL, Guo L, et al. Improving lysine production through construction of an *Escherichia coli* enzyme-constrained model. Biotechnol Bioeng, 2020, 117(11): 3533-3544.
- [34] Takeno S, Hori K, Ohtani S, et al. L-lysine production independent of the oxidative pentose phosphate pathway by *Corynebacterium glutamicum* with the *Streptococcus mutans gapN* gene. Metabo Eng, 2016, 37: 1-10.
- [35] Zhou LB, Zeng AP. Engineering a lysine-ON riboswitch for metabolic control of lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. ACS Synth Biol, 2015, 4(12): 1335-1340.
- [36] Binder S, Schendzielorz G, Stabler 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.
- [37] 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.
- [38] Wang Y, Li QG, Zheng P, et al. Evolving the L-lysine high-producing strain of *Escherichia coli* using a newly developed high-throughput screening method. J Ind Microbiol Biotechnol, 2016, 43(9): 1227-1235.
- [39] Dong XY, Quinn PJ, Wang XY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine. Biotechnol Adv, 2011, 29(1): 11-23.
- [40] Livshits VA, Zakataeva NP, Aleshin VV, et al. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*. Res Microbiol, 2003, 154(2): 123-135.
- [41] Ogawa-Miyata Y, Kojima H, Sano K. Mutation analysis of the feedback inhibition site of aspartokinase III of *Escherichia coli* K-12 and its use in L-threonine production. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(5): 1149-1154.
- [42] Xie XX, Liang Y, Liu HL, et al. Modification of glycolysis and its effect on the production of L-threonine in *Escherichia coli*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41(6): 1007-1015.

- [43] Liu JH, Li HL, Xiong H, et al. Two-stage carbon distribution and cofactor generation for improving L-threonine production of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(1): 110-120.
- [44] Lee JH, Sung BH, Kim MS, et al. Metabolic engineering of a reduced-genome strain of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Microb Cell Fact*, 2009, 8: 2.
- [45] Fang Y, Wang JL, Ma WJ, et al. Rebalancing microbial carbon distribution for L-threonine maximization using a thermal switch system. *Metab Eng*, 2020, 61: 33-46.
- [46] Yamamoto K, Tsuchisaka A, Yukawa H. Branched-chain amino acids. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2017, 159: 103-128.
- [47] Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(3): 268-274.
- [48] Wang YY, Xu JZ, Zhang WG. Metabolic engineering of L-leucine production in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*: a review. *Crit Rev Biotechnol*, 2019, 39(5): 633-647.
- [49] Vogt M, Haas S, Klaffl S, et al. Pushing product formation to its limit: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine overproduction. *Metab Eng*, 2014, 22: 40-52.
- [50] Zahoor A, Lindner SN, Wendisch VF. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products. *Comput Struct Biotechnol J*, 2012, 3: e201210004.
- [51] 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.
- [52] Park JH, Oh JE, Lee KH, et al. Rational design of *Escherichia coli* for L-isoleucine production. *ACS Synth Biol*, 2012, 1(11): 532-540.
- [53] Xie XX, Xu LL, Shi JM, et al. Effect of transport proteins on L-isoleucine production with the L-isoleucine-producing strain *Corynebacterium glutamicum* YILW. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(10): 1549-1556.
- [54] Zhang YC, Liu YD, Zhang SY, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* WM001 to improve L-isoleucine production. *Biotechnol Appl Biochem*, 2020. DOI: 10.1002/bab.1963.
- [55] Chen C, Li YY, Hu JY, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 for L-valine production. *Metab Eng*, 2015, 29: 66-75.
- [56] Zhang H, Li Y, Wang C, et al. Understanding the high L-valine production in *Corynebacterium glutamicum* VWB-1 using transcriptomics and proteomics. *Sci Rep*, 2018, 8: 3632.
- [57] Feng LY, Xu JZ, Zhang WG. Improved L-leucine production in *Corynebacterium glutamicum* by optimizing the aminotransferases. *Molecules*, 2018, 23(9): 2102.
- [58] Yin LH, Hu XQ, Xu DQ, et al. Co-expression of feedback-resistant threonine dehydratase and acetohydroxy acid synthase increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2012, 14(5): 542-550.
- [59] Huang QG, Liang L, Wu WB, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to enhance L-leucine production. *Afri J Biotechnol*, 2017, 16(18): 1048-1060.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] Gusyatiner MM, Lunts MG, Kozlov YI, et al. DNA coding for mutant isopropylmalate synthase, L-leucine-producing microorganism and method for producing L-leucine. US6403342 B1, 2002. <https://www.freepatentsonline.com/6403342.html>.
- [63] Wang YY, Zhang F, Xu JZ, et al. Improvement of L-leucine production in *Corynebacterium glutamicum* by altering the redox flux. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 2020.
- [64] Kutukova EA, Livshits VA, Altman IP, et al. The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its

- expression. FEBS Lett, 2005, 579(21): 4629-4634.
- [65] Cusyatiner MM, Voroshilova EB, Rostova YG, et al. Method for producing L-leucine. US2004091980 B2, 2004. <https://www.freepatentsonline.com/y2004/0091980.html>.
- [66] Katashkina JY, Lunts MG, Doroshenko VG, et al. Method for producing an L-amino acid using a bacterium with an optimized level of gene expression. US7604979 B2, 2009. https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=950e6856800433162b27622d0bbdfa6b&site=xueshu_se&hitarticle=1.
- [67] Wang J, Wen B, Xu QY, et al. Optimization of carbon source and glucose feeding strategy for improvement of L-isoleucine production by *Escherichia coli*. Biotechnol Biotechnol Equip, 2015, 29(2): 374-380.
- [68] Vogt M, Krumbach K, Bang WG, et al. The contest for precursors: channelling L-isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* without byproduct formation. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 2(99): 791-800.
- [69] Wang J, Wen B, Wang J, et al. Enhancing L-isoleucine production by *thrABC* overexpression combined with *alaT* deletion in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 171(1): 20-30.
- [70] Zhao JX, Hu XQ, Li Y, et al. Overexpression of ribosome elongation factor G and recycling factor increases L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(11): 4795-4805.
- [71] Ma WJ, Wang JL, Li Y, et al. Enhancing pentose phosphate pathway in *Corynebacterium glutamicum* to improve L-isoleucine production. Biotechnol Appl Biochem, 2016, 63(6): 877-885.
- [72] 尹良鸿. 高产 L-异亮氨酸谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造. 无锡: 江南大学, 2013.
Yin LH. Metabolic engineering modifications of the L-isoleucine producing *Corynebacterium glutamicum*. Wuxi: Jiangnan University, 2013.
- [73] 徐庆阳, 孙家凯, 谢希贤, 等. 过表达 *hom* 基因对谷氨酸棒杆菌发酵 L-异亮氨酸的影响. 天津科技大学学报, 2012, 27(5): 1-6.
Xu QY, Sun JK, Xie XX, et al. Effects of overexpression of homoserine dehydratase on L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*. J Tianjing Univ Sci Technol, 2012, 27(5): 1-6.
- [74] Park JH, Jang YS, Lee JW, et al. *Escherichia coli* W as a new platform strain for the enhanced production of L-valine by systems metabolic engineering. Biotechnol Bioeng, 2011, 108(5): 1140-1147.
- [75] Blombach B, Arndt A, Auchter M, et al. L-valine production during growth of pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* in the presence of ethanol or by inactivation of the transcriptional regulator SugR. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(4): 1197-1200.
- [76] Blombach B, Schreiner ME, Bartek T, et al. *Corynebacterium glutamicum* tailored for high-yield L-valine production. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 79(3): 471-479.
- [77] Hasegawa S, Suda M, Uematsu K, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield L-valine production under oxygen deprivation conditions. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(4): 1250-1257.
- [78] Hao GF, Chen HQ, Gu ZN, et al. Metabolic engineering of *Mortierella alpina* for enhanced arachidonic acid production through the NADPH-supplying strategy. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(11): 3280-3288.
- [79] Zheng B, Ma XY, Wang N, et al. Utilization of rare codon-rich markers for screening amino acid overproducers. Nature Communications, 2018, 9: 3616.
- [80] Yakandawala N, Romeo T, Friesen AD, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance phenylalanine production. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78(2): 283-291.
- [81] Liu LN, Duan XG, Wu J. Modulating the direction of carbon flow in *Escherichia coli* to improve L-tryptophan production by inactivating the global regulator FruR. J Biotechnol, 2016, 231: 141-148.
- [82] Santos CNS, Xiao WH, Stephanopoulos G. Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012,

- 109(34): 13538-13543.
- [83] Zhang CZ, Zhang JL, Kang Z, et al. Enhanced production of L-phenylalanine in *Corynebacterium glutamicum* due to the introduction of *Escherichia coli* wild-type gene *aroH*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40(6): 643-651.
- [84] Noda S, Kondo A. Recent advances in microbial production of aromatic chemicals and derivatives. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(8): 785-796.
- [85] Gottlieb K, Albermann C, Sprenger GA. Improvement of L-phenylalanine production from glycerol by recombinant *Escherichia coli* strains: The role of extra copies of *glpK*, *glpX*, and *tktA* genes. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 96.
- [86] Mascarenhas D, Ashworth DJ, Chen CS. Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(10): 2995-2999.
- [87] Bongaerts J, Krämer M, Müller U, et al. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng*, 2001, 3(4): 289-300.
- [88] Lütke-Eversloh T, Stephanopoulos G. L-tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(1): 103-110.
- [89] 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.
- [90] Li GH, Chen ZC, Chen N, et al. Enhancing the efficiency of L-tyrosine by repeated batch fermentation. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 852-861.
- [91] Patnaik R, Zolanz RR, Green DA, et al. L-tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: fermentation optimization and recovery. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(4): 741-752.
- [92] Xu S, Wang Q, Zeng WZ, et al. Construction of a heat-inducible *Escherichia coli* strain for efficient *de novo* biosynthesis of L-tyrosine. *Proc Biochem*, 2020, 92: 85-92.
- [93] Zhang CZ, Zhang JL, Kang Z, et al. Rational engineering of multiple module pathways for the production of L-phenylalanine in *Corynebacterium glutamicum*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42(5): 787-797.
- [94] Liu SP, Xiao MR, Zhang L, et al. Production of L-phenylalanine from glucose by metabolic engineering of wild type *Escherichia coli* W3110. *Proc Biochem*, 2013, 48(3): 413-419.
- [95] Gerigk MR, Maass D, Kreutzer A, et al. Enhanced pilot-scale fed-batch L-phenylalanine production with recombinant *Escherichia coli* by fully integrated reactive extraction. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2002, 25(1): 43-52.
- [96] Gerigk M, Bujnicki R, Ganpo-Nkwenkwa E, et al. Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant *Escherichia coli* strains. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 80(7): 746-754.
- [97] Zhou HY, Liao XY, Wang TW, et al. Enhanced L-phenylalanine biosynthesis by co-expression of *pheA^{fbr}* and *aroF^{wt}*. *Bioresour Technol*, 2010, 101(11): 4151-4156.
- [98] Zhou HY, Liao XY, Liu L, et al. Enhanced L-phenylalanine production by recombinant *Escherichia coli* BR-42 (pAP-B03) resistant to bacteriophage BP-1 via a two-stage feeding approach. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38(9): 1219-1227.
- [99] Ding DQ, Liu YF, Xu YR, et al. Improving the production of L-phenylalanine by identifying key enzymes through multi-enzyme reaction system *in vitro*. *Sci Rep*, 2016, 6: 32208.
- [100] Liu Q, Wang YP, Yao JY, et al. Impact resistance and static strength analysis of an extremely simplified micro hotplate with novel suspended film. *Sensors Actuators A Phys*, 2018, 280: 495-504.
- [101] Gu PF, Yang F, Li FF, et al. Knocking out analysis of tryptophan permeases in *Escherichia coli* for improving L-tryptophan production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(15): 6677-6683.
- [102] Liu Q, Cheng YS, Xie XX, et al. Modification of tryptophan transport system and its impact on production of L-tryptophan in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2012, 114: 549-554.
- [103] Chen YY, Liu YF, Ding DQ, et al. Rational design and analysis of an *Escherichia coli* strain for high-efficiency tryptophan production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45(5): 357-367.
- [104] Dodge TC, Gerstner JM. Optimization of the

- glucose feed rate profile for the production of tryptophan from recombinant *E. coli*. *J Chem Technol Biotechnol*, 2002, 77(11): 1238-1245.
- [105] Liu LN, Duan XG, Wu J. L-tryptophan production in *Escherichia coli* improved by weakening the *pta-AckA* Pathway. *Plos ONE*, 2016, 11(6): e0158200.
- [106] Xu QY, Bai F, Chen N, et al. Gene modification of the acetate biosynthesis pathway in *Escherichia coli* and implementation of the cell recycling technology to increase L-tryptophan production. *Plos ONE*, 2017, 12(6): e0179240.
- [107] Wang J, Cheng LK, Wang J, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of L-tryptophan. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(17): 7587-7596.
- [108] Cao MF, Gao MR, Suástegui M, et al. Building microbial factories for the production of aromatic amino acid pathway derivatives: From commodity chemicals to plant-sourced natural products. *Metab Eng*, 2020, 58: 94-132.
- [109] Li MJ, Liu CQ, Yang JM, et al. Common problems associated with the microbial productions of aromatic compounds and corresponding metabolic engineering strategies. *Biotechnol Adv*, 2020, 41: 107548.
- [110] Chávez-Béjar MI, Báez-Viveros JL, Martínez A, et al. Biotechnological production of L-tyrosine and derived compounds. *Process Biochemistry*, 2012, 47(7): 1017-1026.
- [111] Zhao ZJ, Chen S, Wu D, et al. Effect of gene knockouts of L-tryptophan uptake system on the production of L-tryptophan in *Escherichia coli*. *Proc Biochem*, 2012, 47(2): 340-344.
- [112] Chen L, Chen ML, Ma CW, et al. Discovery of feed-forward regulation in L-tryptophan biosynthesis and its use in metabolic engineering of *E. coli* for efficient tryptophan bioproduction. *Metab Eng*, 2018, 47: 434-444.
- [113] Li Z, Ding DQ, Wang HY, et al. Engineering *Escherichia coli* to improve tryptophan production via genetic manipulation of precursor and cofactor pathways. *Synthd Syst Biotechnol*, 2020, 5(3): 200-205.
- [114] Wu HY, Tian DG, Fan XG, et al. Highly efficient production of L-histidine from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(7): 1813-1822.
- [115] Zhang J, Qian FH, Dong F, et al. *De novo* engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-proline production. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(7): 1897-1906.
- [116] Mundhada H, Seoane JM, Schneider K, et al. Increased production of L-serine in *Escherichia coli* through adaptive laboratory evolution. *Metab Eng*, 2017, 39: 141-150.
- [117] Rennig M, Mundhada H, Wordofa GG, et al. Industrializing a bacterial strain for L-serine production through translation initiation optimization. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(10): 2347-2358.
- [118] Ning YK, Wu XJ, Zhang CL, et al. Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2016, 36: 10-18.
- [119] Solomon KV, Sanders TM, Prather KLJ. A dynamic metabolite valve for the control of central carbon metabolism. *Metab Eng*, 2012, 14(6): 661-671.
- [120] Zhang CL, Li YJ, Zhu FZ, et al. Metabolic engineering of an auto-regulated *Corynebacterium glutamicum* chassis for biosynthesis of 5-aminolevulinic acid. *Bioresour Technol*, 2020, 318: 124064.

(本文责编 郝丽芳)