

# 氨基酸高产菌株创制的关键技术

郭亮<sup>1,2\*</sup>, 高熙<sup>1,2</sup>, 张红霞<sup>1,2</sup>

1 山西师范大学生命科学学院, 山西 太原 030031

2 山西省微生物应用技术工程研究中心, 山西 太原 030031

郭亮, 高熙, 张红霞. 氨基酸高产菌株创制的关键技术[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1711-1727.

GUO Liang, GAO Xi, ZHANG Hongxia. Engineering of microorganisms for high production of amino acids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1711-1727.

**摘要:** 氨基酸是构成蛋白质的基本单元, 被广泛应用于食品、医药、饲料和化工等多个领域。利用微生物细胞工厂生产氨基酸, 具备原料可再生、生产过程条件温和、产品纯度高、环境污染小等优点, 能够助力实现碳中和。借助代谢工程和合成生物学技术, 对大肠杆菌(*Escherichia coli*)和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)进行定向设计、改造与优化, 创制了高产氨基酸的微生物细胞工厂, 实现了支链氨基酸、天冬氨酸族氨基酸、谷氨酸族氨基酸和芳香族氨基酸的生物炼制。本文对高产氨基酸的大肠杆菌细胞工厂和谷氨酸棒杆菌细胞工厂创制过程进行分析, 以期对高性能微生物细胞工厂的创制提供参考。

**关键词:** 微生物细胞工厂; 支链氨基酸; 天冬氨酸族氨基酸; 谷氨酸族氨基酸; 芳香族氨基酸

## Engineering of microorganisms for high production of amino acids

GUO Liang<sup>1,2\*</sup>, GAO Xi<sup>1,2</sup>, ZHANG Hongxia<sup>1,2</sup>

1 School of Life Science, Shanxi Normal University, Taiyuan 030031, Shanxi, China

2 Shanxi Engineering Research Center for Microbial Application Technology, Taiyuan 030031, Shanxi, China

**Abstract:** Amino acids as the building blocks of proteins are widely applied in food, medicine, feed, and chemical industries. Amino acid production by microbial cell factories from renewable resources is praised for the environmental friendliness, mild reaction conditions, and high product purity, which helps to achieve the goal of carbon neutrality. Researchers have employed the

资助项目: 国家自然科学基金(22208124, 32201981); 山西省自然科学基金(202303021224010)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22208124, 32201981) and the Natural Science Foundation of Shanxi Province (202303021224010).

\*Corresponding author. E-mail: guoliang@sxnu.edu.cn

Received: 2023-12-06; Accepted: 2024-03-05; Published online: 2024-03-06

methods of metabolic engineering and synthetic biology to engineer *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* and optimized the culture conditions to construct the microbial cell factories with high performance for producing branched chain amino acids, amino acids of the aspartic acid and glutamic acid families, and aromatic amino acids. We review the engineering process of microbial cell factories for high production of amino acids, in the hope of providing a reference for the creation of high-performance microbial cell factories.

**Keywords:** microbial cell factories; branched chain amino acids; amino acids of the aspartic acid family; amino acids of the glutamic acid family; aromatic amino acids

氨基酸不仅是构成蛋白质的基本单元,还具有重要的代谢与生理活动调控功能,广泛应用于食品、医药、饲料和化工等多个领域<sup>[1-4]</sup>。据 Polaris Market Research 统计,2021 年全球氨基酸市场规模达 261.9 亿美元,预计 2027 年全球氨基酸市场规模将达到 398.7 亿美元,年均复合增长率为 7.5%。由于氨基酸的动植物提取法具有原料受限、工艺复杂、成本高等缺点<sup>[5-6]</sup>,化学炼制有原料不可再生、反应条件苛刻、环境污染大等问题<sup>[7]</sup>,利用微生物细胞进行物质加工与合成为氨基酸的绿色生产提供了可能<sup>[8-9]</sup>。氨基酸发酵行业是我国发酵工业的支柱产业,其中谷氨酸、赖氨酸和苏氨酸产量常年居世界首位<sup>[10-11]</sup>。与谷氨酸、赖氨酸和苏氨酸等大宗氨基酸相比,精氨酸、色氨酸和缬氨酸等小品种氨基酸产量仍然较低,关键生产技术被赢创、希杰等国际巨头垄断。

1956 年,日本协和发酵工业株式会社首次开发了谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)发酵生产谷氨酸的工艺,展现了该菌在氨基酸生产中的巨大潜力<sup>[12-13]</sup>。*C. glutamicum* 具有生长速度快、营养需求低、底物谱广等优势,是创制氨基酸高产菌株的理想底盘微生物<sup>[12,14-15]</sup>。与 *C. glutamicum* 相比,大肠杆菌(*Escherichia coli*)具有易培养、遗传背景清晰、基因编辑工具成熟等优势,是研究最为广泛的模式微生物,也被广泛应用于氨基酸高产菌株的创制<sup>[16-17]</sup>。随着合成

生物学与系统代谢工程的发展,对 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 进行定向设计、改造与优化,创制出的氨基酸高产菌株,不仅以可再生资源为原料,而且其生产过程反应条件温和、产品纯度高、环境污染小<sup>[18-20]</sup>。本文综述了以 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 为底盘微生物,创制支链氨基酸、天冬氨酸族氨基酸、谷氨酸族氨基酸与芳香族氨基酸高产菌株的关键技术,以期为高性能微生物细胞工厂的创制提供参考,并展望了氨基酸高产菌株的研究方向。

## 1 创制支链氨基酸高产菌株

缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸支链氨基酸(branched-chain amino acids, BCAAs),参与体内蛋白质合成与糖脂代谢调节,是人体与哺乳动物的必需氨基酸,被广泛应用于动物饲料、食品与药品行业<sup>[21-22]</sup>。利用系统代谢工程与合成生物学技术,工程化改造 *C. glutamicum*,创制了缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸高产菌株<sup>[23-27]</sup>;工程化改造 *E. coli*,创制了亮氨酸高产菌株<sup>[28]</sup>。在支链氨基酸高产菌株的创制过程中,需重点关注辅因子供给问题。为此,开发了乙酰乳酸异构还原酶突变、氨基酸转氨酶替换、谷氨酸脱氢酶替换等改变支链氨基酸合成路径辅因子特异性的方法。

*C. glutamicum* BN<sup>GE</sup>™DLD/ΔLDH 能够实现缬氨酸高产<sup>[24,29]</sup>。在该研究中,敲除乳酸脱氢

酶编码基因 *ldhA*, 减少副产物乳酸积累; 过表达乙酰乳酸合酶编码基因 *ilvBN*、乙酰乳酸异构还原酶编码基因 *ilvC*、二羧酸脱水酶编码基因 *ilvD* 和氨基酸转氨酶编码基因 *ilvE*, 强化缬氨酸合成途径, 获得能够合成缬氨酸的底盘微生物。在该合成路径中, 合成 1 mol 缬氨酸需要消耗 1 mol 葡萄糖和 2 mol 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), 同时伴随 2 mol 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 生成, 导致缬氨酸合成过程中辅因子不平衡, 限制了缬氨酸产量进一步提升 (图 1A, 表 1)<sup>[24]</sup>。为此, 用 NADH 依赖型乙酰乳酸异构还原酶突变体 *IlvC*<sup>S34G, L48E, R49F</sup> (*IlvC*<sup>M</sup>) 替换本源 NADPH 依赖型的 *IlvC*, 用球形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus sphaericus*) 来源的 NADH 依赖型亮氨酸脱氢酶 (leucine dehydrogenase, *LeuDh*) 替换本源 NADPH 依赖型氨基酸转氨酶 (*IlvE*), 将缬氨酸的合成路径的辅因子偏好性从 NADPH 依赖型改造成 NADH 依赖型, 实现缬氨酸合成过程中辅因子的供需平衡。在此基础上, 进一步通过将乙酰乳酸合酶 (*IlvN*) 的第 156 残基从甘氨酸 (G) 突变为谷氨酸 (E), 解除缬氨酸对乙酰乳酸合酶的反馈抑制。最后, 通过为好养条件培养菌体、离心收集菌体、厌氧条件发酵, 使缬氨酸的产量增加到 172 g/L, 葡萄糖转化率达到 0.409 g/g, 生产强度为 7.72 g/(L·h)<sup>[24]</sup>。

缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸合成路径紧密相连, 从丙酮酸开始共用乙酰乳酸合酶、乙酰乳酸异构还原酶、二羧酸脱水酶和氨基酸转氨酶<sup>[23-27]</sup>。因此, 支链氨基酸高产菌株的创制策略可以相互借鉴, 例如强化合成路径、平衡辅因子供给、解除反馈抑制等策略, 在亮氨酸和异亮氨酸工程菌株的构建过程中也广泛使用。天津科技大学张成林课题组改造 *E. coli*, 实现了最高水平的亮氨酸

生产<sup>[28]</sup>。在该研究中, 以 *E. coli* W3110 为出发菌株, 敲除阻遏蛋白编码基因 *lacI*, 引入由启动子  $P_{trc}$  控制的亮氨酸合成基因簇 *leuA*<sup>CP</sup>*BCD* 和由启动子  $P_{trc}$  控制的乙酰乳酸合酶编码基因 *ilvBN*<sup>CP</sup>, 构建了亮氨酸合成途径; 敲除乳酸脱氢酶编码基因 *ldhA*、丙酮酸-甲酸裂解酶编码基因 *pflB*、丙酮酸氧化酶编码基因 *poxB*, 阻断冗余代谢支路强化前体丙酮酸供给; 引入青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) 来源的磷酸转酮酶 *FxpK*、乙酸激酶 A 编码基因敲除 *ackA*, 利用启动子  $P_{trc}$  强化乙酰磷酸转移酶编码基因 *pta* 表达, 构建了非氧化糖酵解途径<sup>[28]</sup>。在此基础上, 利用启动子  $P_{leuBCD}$  替换柠檬酸合酶启动子  $P_{gltA}$ , 动态调控三羧酸循环; 敲除 *ilvC*、引入改变辅因子偏好性的 *ilvC*<sup>EM</sup>、敲除本源 *ilvE*、引入芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 来源的 *bcd* (亮氨酸脱氢酶编码基因), 改变亮氨酸合成途径的辅因子偏好性; 利用 *B. subtilis* 来源的 NADH 依赖型的谷氨酸脱氢酶 *RocG* 替换本源的谷氨酸脱氢酶 *GdhA*; 引入由启动子  $P_{J23110}$  控制的亮氨酸转运蛋白 *LeuE*, 强化亮氨酸转运; 敲除 *livK* (亮氨酸内转运蛋白编码基因), 阻断亮氨酸内转运, 最终获得工程菌 *E. coli* LXH-21, 使亮氨酸的产量增加到 63.3 g/L, 葡萄糖转化率为 0.370 g/g, 生产强度为 2.64 g/(L·h) (图 1B)<sup>[28]</sup>。此外, 利用 *C. glutamicum* 底盘微生物也实现了亮氨酸高产菌株的创制, 在亮氨酸工程菌株的构建过程中, 利用 *IlvC*<sup>M</sup> 替换 *IlvC* 改变乙酰乳酸异构还原酶的辅因子偏好性, 利用赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus subtilis*) 来源的 NADH 依赖型亮氨酸脱氢酶替换本源 NADPH 依赖型氨基酸转氨酶, 将亮氨酸合成路径的辅因子偏好性从 NADPH 依赖型改造为 NADH 依赖型。在此基础上, 通过敲除丙酮酸羧化酶编码基因 *pyc* 与丙酮酸缬氨酸转氨酶编码基因 *avtA*, 下调丙氨酸转

移酶编码基因 *alaT* 表达, 阻断丙酮酸支路代谢, 增加前体丙酮酸供给; 并过表达乙酰乳酸合酶编码基因 *ilvBN*、乙酰乳酸异构还原酶编码基因 *ilvC* 和异丙基苹果酸合酶编码基因 *leuA*, 强化亮氨酸合成路径。然后, 下调柠檬酸合酶编码基因 *gltA*, 引入大肠杆菌来源的乙酰 CoA 合酶 (acetyl-CoA synthase, Acs) 和其调控因子 CobB, 强化乙酰 CoA 的供应; 敲除转录调控因子 SugR, 解除对特异性转运蛋白酶 II (PtsG) 的转录抑制, 强化磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统

(phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, PTS) 葡萄糖转运系统, 获得工程菌株 *C. glutamicum* JL-3/AcsCobB, 使亮氨酸的产量增加到 40.1 g/L, 葡萄糖转化率 0.250 g/g, 生产强度为 0.557 g/(L·h)<sup>[30]</sup>。虽然谷氨酸棒杆菌细胞工厂的亮氨酸生产性能低于大肠杆菌细胞工厂, 但谷氨酸棒杆菌被美国 FDA 认定为 GRAS (generally regarded as safe) 菌株, 在某些行业仍具有独特的优势。在异亮氨酸工程菌株的构建过程中, 通过引入抗反馈抑制的乙酰羧基酸合成酶 (*IlvBN<sup>fbt</sup>*)

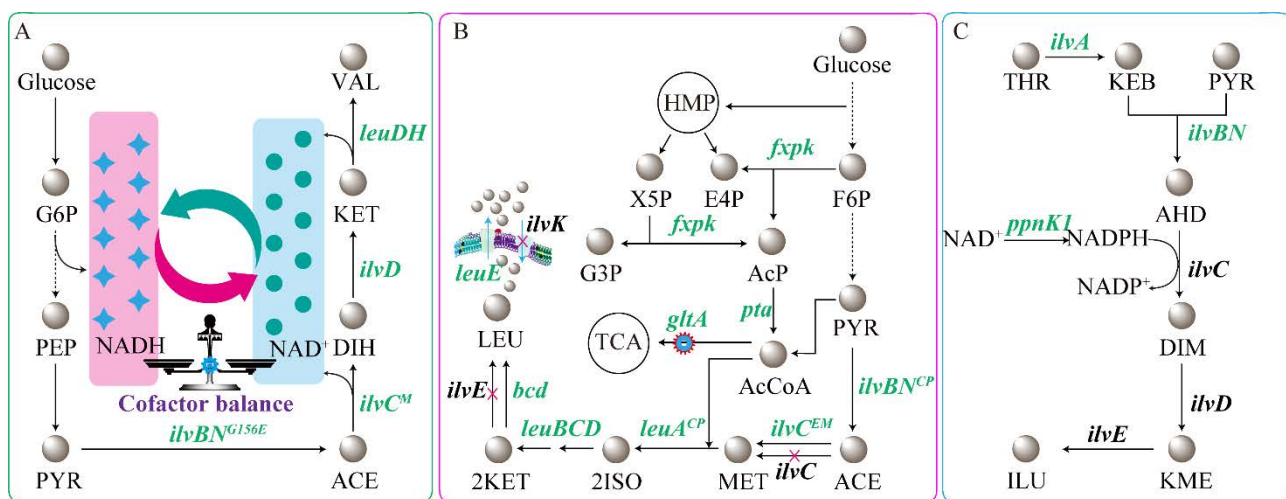


图 1 支链氨基酸高产菌株的合成途径

Figure 1 Designed and optimized the high performance of microbial cell factories for branched chain amino acids. A: Schematic of valine biosynthetic pathway. B: Schematic of leucine biosynthetic pathway. C: Schematic of isoleucine biosynthetic pathway. The black dashed arrow represents a multistep pathway. Solid arrows represent central fermentative pathways. A red X depicts that the corresponding gene was knocked out. Arrows along with genes written in green bold letters denote the engineering pathway. Each gene encodes the following: *ilvBN<sup>G156E</sup>*/*ilvBN<sup>CP</sup>*: Aceto-hydroxy acid synthase; *ilvC<sup>M</sup>*/*ilvC<sup>EM</sup>*: Aceto-hydroxy acid isomer reductase (NAD-prefering mutant); *ilvD*: Dihydroxy acid dehydratase; *leuDh*: Leucine dehydrogenase; *fxpk*: Phosphoketolase; *pta*: Phosphotransacetylase; *gltA*: Citrate synthase; *leuA<sup>CP</sup>*: 2-isopropylmalate synthase; *leuBCD*: 3-isopropylmalate dehydrogenase and 3-isopropylmalate isomerase; *bcd*: Leucine dehydrogenase; *ilvE*: Branched chain amino acids aminotransferase; *leuE*: Leucine exporter; *ilvK*: Leucine importer; *ilvA*: Threonine dehydratase; *ppnK1*: NAD kinase. Abbreviations: G6P: Glucose 6-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; PYR: Pyruvate; ACE: 2-acetolactate; DIH: 2,3-dihydroxyisovalerate; KET: 2-ketoisovalerate; VAL: Valine; HMP: Pentose phosphate pathway; TCA: Tricarboxylic acid cycle; F6P: Fructose-6-phosphate; X5P: Xylulose-5-phosphate; E4P: Erythrose-4-phosphate; G3P: 3-phosphoglycerate; AcP: Acetyl phosphate; AcCoA: Acetyl coenzyme A; 2ISO:  $\alpha$ -isopropyl malate; 2KET:  $\alpha$ -ketoisocaproate; LEU: Leucine; THR: Threonine; KEB: 2-ketobutyrate; AHD:  $\alpha$ -aceto-2-hydroxybutyrate; DIM: 2,3-dihydroxy-3-methylvalerate; KME: 2-keto-3-methylvalerate; ILU: Isoleucine.

表 1 工程菌株的氨基酸发酵性能

Table 1 Performances of amino acid fermentation by metabolically engineered microorganisms

Product	Engineered strain	Titer (g/L)	Productivity (g/(L·h))	Yield (g/g)	Reference
Valine	<i>C. glutamicum</i> R BN <sup>GE</sup> C <sup>TM</sup> DLD/ $\Delta$ LDH	172.0	7.720	0.409	[24]
Leucine	<i>C. glutamicum</i> JL-3/AcsCobB	40.1	0.557	0.250	[30]
Leucine	<i>E. coli</i> LXH-21	63.3	2.640	0.370	[28]
Isoleucine	<i>C. glutamicum</i> IWJ001/pDXW-8-ilvBN1-ilvA1-ppnk1	32.4	0.450	0.116	[26]
Homoserine	<i>E. coli</i> W-H18/pM2/pR1	111.0	1.820	0.635	[31]
Homoserine	<i>E. coli</i> H28	85.3	1.780	0.430	[32]
Homoserine	<i>E. coli</i> HS15	84.1	1.960	0.500	[33]
Threonine	<i>E. coli</i> TWF083	117.0	2.430	0.486	[34]
Lysine	<i>E. coli</i> Lc(H)-Fe(M)	194.0	NA	0.740	[35]
Lysine	<i>E. coli</i> LY-4	213.0	5.900	NA	[36]
Methionine	<i>E. coli</i> MET17	21.3	0.333	NA	[37]
Arginine	<i>C. glutamicum</i> AR6	92.5	1.280	0.400	[38]
Arginine	<i>E. coli</i> ARG28	132.0	2.750	0.510	[39]
Ornithine	<i>C. glutamicum</i> YW06(pSY223)	51.5	1.290	0.240	[40]
Citrulline	<i>E. coli</i> CIT24	82.1	1.710	0.340	[41]
Proline	<i>C. glutamicum</i> PRO-19	142.0	0.310	2.900	[42]
Tryptophan	<i>E. coli</i> TPR11	52.1	1.447	0.171	[43]
Phenylalanine	<i>E. coli</i> Xllp12	72.6	1.450	0.260	[44]
Tyrosine	<i>E. coli</i> HGD	92.5	1.490	0.266	[45]

NA: Not available.

和抗反馈抑制的苏氨酸脱水酶(IlvA<sup>fbn</sup>), 强化异亮氨酸合成途径(图 1C)。并通过强化 NAD 激酶(NAD kinases, NADK)的表达, 增加异亮氨酸合成途径中的辅因子供给, 获得工程菌株 *C. glutamicum* IWJ001/ pDXW-8-ilvBN1- ilvA1-ppnk1, 使异亮氨酸的产量增加到 32.4 g/L, 葡萄糖转化率为 0.116 g/g, 生产强度为 0.450 g/(L·h)<sup>[26]</sup>。

## 2 创制天冬氨酸族氨基酸高产菌株

苏氨酸、赖氨酸和甲硫氨酸参与体内蛋白质合成, 是人体与动物必需氨基酸, 高丝氨酸属于非必需氨基酸, 是苏氨酸、赖氨酸和甲硫氨酸的前体<sup>[46-50]</sup>。天冬氨酸是苏氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸和高丝氨酸的共同前体, 因此将苏氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸和高丝氨酸统称为天冬氨酸族氨基酸<sup>[51]</sup>。利用系统代谢工程与合成生物学技术工程化改造 *E. coli*, 创制了苏氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸和高丝氨酸高产菌株(表 1)。在天冬氨酸族氨基酸高产菌株的创制过程中, 利用模块化工程、无质粒表达系统、动态调控系统、酶约束模型等, 重编程微生物细胞代谢流, 增加氨基酸合成途径与微生物细胞代谢的适配性。

工程化改造大肠杆菌, 实现了最高水平的高丝氨酸生产<sup>[31]</sup>。在该研究中, 以 *E. coli* W3110 为出发菌株, 敲除二氨基庚二酸脱羧酶编码基因 *lysA*、高丝氨酸激酶编码基因 *thrB*、O-琥珀酰高丝氨酸转琥珀酰酶编码基因 *metA*, 分别阻断赖氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸合成途径; 敲除 *ldhA*、乙醇脱氢酶编码基因 *adhE*、*pflB*, 减少副产物乳

酸、甲硫氨酸和高丝氨酸统称为天冬氨酸族氨基酸<sup>[51]</sup>。利用系统代谢工程与合成生物学技术工程化改造 *E. coli*, 创制了苏氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸和高丝氨酸高产菌株(表 1)。在天冬氨酸族氨基酸高产菌株的创制过程中, 利用模块化工程、无质粒表达系统、动态调控系统、酶约束模型等, 重编程微生物细胞代谢流, 增加氨基酸合成途径与微生物细胞代谢的适配性。

酸、乙醇和甲酸的积累;敲除 *lacI*, 解除  $P_{lac}$  和  $P_{trc}$  启动子的反馈抑制, 并过表达天冬氨酸激酶II (MetL) 和高丝氨酸转运蛋白(RhtA), 构建了合成高丝氨酸的底盘微生物(图 2A)<sup>[31]</sup>。在此基础上, 将高丝氨酸的合成路径分为上游途径(葡萄糖转运和糖酵解)、中游途径[三羧酸(tricarboxylic acids, TCA)循环和乙醛酸循环]、下游途径(天冬氨酸到高丝氨酸合成模块和高丝氨酸分泌)。针对上游途径, 敲除 *ptsG* 阻断葡萄糖 PTS 转运系统; 利用  $P_{lac}$  启动子, 分别替换半乳糖苷透性酶(galactoside permeabilization enzyme, GalP)本源启动子, 强化 GalP 表达促进葡萄糖吸收; 替换磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, Ppc)本源启动子, 强化 Ppc 的表达增加草酰乙酸供应。针对中游途径, 敲除低氧诱导因子(ArcA)和异柠檬酸调控蛋白(*iclR*), 调控 TCA 和乙醛酸循环, 并利用  $P_{trc}$  启动子替换天冬氨酸裂解酶(aspartate lyase, AspA)本源启动子, 强化 AspA 表达, 增加天冬氨酸供给。在此基础上, 利用  $P_{lac}$  启动子替换葡萄糖激酶(glucokinase, Glk)本源启动子, 强化糖酵解途径。针对下游途径, 利用  $P_{trc}$  启动子替换天冬氨酸半醛脱氢酶(aspartic semialdehyde dehydrogenase, Asd)本源启动子, 强化 Asd 表达; 利用不同强度的核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)和启动子, 分别优化天冬氨酸激酶II (MetL)与高丝氨酸转运蛋白(RhtA)表达。最后, 利用运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)来源的葡萄糖转运蛋白(Glf)替换本源的半乳糖苷透性酶(GalP), 强化葡萄糖转运, 获得工程菌株 W-H18/pM2/pR1, 使高丝氨酸的产量增加到 111 g/L, 葡萄糖转化率 0.635 g/g, 生产强度为 1.82 g/(L·h)<sup>[31]</sup>。此外, 也可以将高丝氨酸合成途径, 分为从磷酸烯醇式丙酮酸→草酰乙酸→高丝氨酸的 AspC 途径, 以及从葡萄糖→三羧酸循环→富马酸→天冬氨酸→

高丝氨酸的 AspA 途径, 其中 AspC 途径具有较高的高丝氨酸转化率, 但合成途径需要较多还原力, 而 AspA 途径可以产生还原力, 但由于释放二氧化碳导致高丝氨酸转化率较低。基于此, 研究人员开发了基于启动子工程和 RBS 文库, 协同优化 AspC 途径和 AspA 途径的策略, 获得工程菌 *E. coli* HS15, 使高丝氨酸产量增加到 84.1 g/L, 葡萄糖转化率 0.500 g/g, 生产强度为 1.96 g/(L·h)<sup>[33]</sup>。在工程菌株的构建过程中, 虽然质粒表达易于操作, 但外源添加抗生素增加了生产成本, 维持质粒稳定增加工程菌株的代谢负荷, 质粒稳定性也会影响生产的稳定性<sup>[32]</sup>。为此, 开发了无质粒的高丝氨酸生产菌株<sup>[52]</sup>。在该研究中, 通过在 *E. coli* 基因组上, 敲除 *lacI*, 利用启动子  $P_{trc}$  替换 *thrB* 本源启动子, 同时插入分别由启动子  $P_{trc}$  控制本源的 *thrA*<sup>trc</sup>、*aspC* (天冬氨酸转氨酶编码基因)、*aspA*、*ppc*、*pntAB* (转氨酶编码基因), *C. glutamicum* 来源的 *lysC*<sup>trc</sup> (抗反馈调节的天冬氨酸激酶编码基因)、运动替斯崔纳菌(*Tistrella mobilis*)来源的 *Asd*, 以及铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)来源的 *Adh* (天冬氨酸脱氢酶), 获得无质粒工程菌株 *E. coli* H28, 在无抗生素条件下, 使高丝氨酸产量达到 85.3 g/L, 葡萄糖转化率为 0.430 g/g, 生产强度为 1.78 g/(L·h)<sup>[52]</sup>。

以大肠杆菌为底盘微生物, 实现了苏氨酸高产菌株的创制<sup>[34,53]</sup>, 该研究以产苏氨酸菌株 *E. coli* TWF001 (*E. coli* CCTCC M2017730)为出发菌株, 利用响应苏氨酸的抑制调控元件(ThrR)调控异柠檬酸调控蛋白(isocitrate regulatory proteins, *IclR*)激活乙醛酸循环。利用响应苏氨酸的促进调控元件( $P_{cysH}$ )调控天冬氨酸转氨酶(AspC)强化草酰乙酸到天冬氨酸的合成途径。在此基础上, 进一步利用 ThrR, 调控脂肪酸代谢调控因子(FadR)促进脂肪酸降解强化乙酰辅

酶 A 供应、调控低氧诱导因子(ArcA)激活 TCA 循环和有氧呼吸、调控细胞质反应调节蛋白(CpxR)和细胞压力响应调节蛋白(GadE)激活参与游离或 II 型脂肪酸合成系统的相关基因、调控丙酮酸激酶 I (PycK)增加前体磷酸烯醇式丙酮酸供给, 获得工程菌 *E. coli* TWF083, 使苏氨酸产量提高到 116.6 g/L, 转化率为 0.486 g/g, 生产强度为 2.43 g/(L·h)<sup>[34]</sup>。此外, 为了平衡苏氨酸合成过程中代谢流分布, 在 *E. coli* TWF001 中, 构建了由四环素操纵子阻遏蛋白 TetR 和温度敏感性调控元件  $\lambda$ cI (ts)组成的温敏动态调节开关, 动态调控丙酮酸羧化酶(Pyc)、苏氨酸转运蛋白(RhtC)和丙氨酸转氨酶(AlaA)表达<sup>[53]</sup>。在菌体生产阶段, 将发酵温度控制在 37 °C, 关闭 Pyc 和 RhtC 表达, 开启 AlaA 表达, 使碳流流向 TCA 循环用于菌体生长; 在苏氨酸生产阶段, 将发酵温度控制在 42 °C, 开启 Pyc 和 RhtC 表达, 关闭 AlaA 表达, 使碳流流向为丙酮酸→草酰乙酸→苏氨酸, 最终使苏氨酸对葡萄糖的转化率超过理论转化率 122.47%, 达到 124.03% (图 2B)<sup>[53]</sup>。

工程化改造大肠杆菌细胞工厂, 实现了赖氨酸高产菌株的创制。以产赖氨酸的 *E. coli* CCTCC M2019435 为底盘微生物, 通过 *ec\_iML1515* 酶约束模型分析, 预测出 20 个影响赖氨酸合成的关键靶点<sup>[35]</sup>。对这些靶点进行实验验证, 发现前体积累(二氢硫辛酰胺脱氢酶 LpdA)、产物合成(二氨基二甲酸脱羧酶 LysA 和天冬氨酸激酶 LysC)和能量供给(黄素还原酶 Fre)是决定赖氨酸合成的关键<sup>[35]</sup>。对 *fre* 和 *lysC* 的表达水平进行组合优化, 使赖氨酸产量提高了 169.1%; 进一步将动态流量平衡分析(flux balance analysis, FBA)模拟与发酵罐实验数据相结合, 对氮源种类和溶氧水平进行优化, 最终使

赖氨酸产量提高到 194 g/L<sup>[35]</sup>。此外, 在 *E. coli* CCTCC M2019435 发酵过程中, 当赖氨酸浓度达到 200 g/L 时, 将胞内活性氧增加了 226.7%, 导致胞内蛋白质损失增加了 21.9%, *E. coli* 细胞活力下降了 80%, 表明高浓度赖氨酸通过增加胞内活性氧积累, 加速了 *E. coli* 细胞死亡, 限制了细胞工厂生产性能的进一步提升<sup>[36]</sup>。为此, 利用遗传表型分析, 发现敲除类组氨酸蛋白(Hns)和过表达低氧诱导因子(ArcA), 使胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)浓度分别降低 28.7%和 22.2%, 最终, 使赖氨酸产量提高到 213 g/L, 生产强度为 5.90 g/(L·h) (图 2C)<sup>[36]</sup>。

相较于苏氨酸、赖氨酸和高丝氨酸合成路径, 甲硫氨酸代谢合成路径较为复杂, 导致以葡萄糖为底物的微生物细胞工厂难以实现甲硫氨酸的工业化生产。目前, 文献报道的甲硫氨酸最高产量由 *E. coli* MET17 实现<sup>[37]</sup>。在该研究中, 以 *E. coli* W3110 为出发菌株, 敲除负转录因子编码基因 *metJ*, 在基因组上利用抗反馈调节的 *O*-琥珀酰高丝氨酸转琥珀酰酶编码基因 *metA<sup>fbr</sup>* 替换本源的 *metA*, 并将  $P_{trc}$ -*metA<sup>fbr</sup>* 插入到高丝氨酸转运蛋白编码基因 *rthA* 的基因座上增加 *metA<sup>fbr</sup>* 基因拷贝数; 利用启动子  $P_{trc}$  替换胱硫醚裂解酶编码基因 *metC* 本源启动子, 并将  $P_{trc}$ -*metC* 插入到 *rthA* 基因座上; 利用支链氨基酸转运蛋白 YjeH 替换本源的丙氨酸转运蛋白 MetD, 在阻断甲硫氨酸吸收的同时强化甲硫氨酸外排; 敲除 *pykF* 和 *pykA* (丙酮酸激酶编码基因); 引入抗反馈调节的丝氨酸乙酰转移酶 *CysE<sup>fbr</sup>* 和磷酸甘油酸脱氢酶 *SerA<sup>fbr</sup>*, 增加前体半胱氨酸的供给; 引入由  $P_{trc}$  控制的硫酸腺苷酰转移酶 *CysDN*, 强化前体硫元素的供给, 最终获得工程菌株 *E. coli* MET17, 使甲硫氨酸的产量提高到 21.3 g/L, 生产强度为 0.333 g/(L·h) (图 2D)<sup>[37]</sup>。

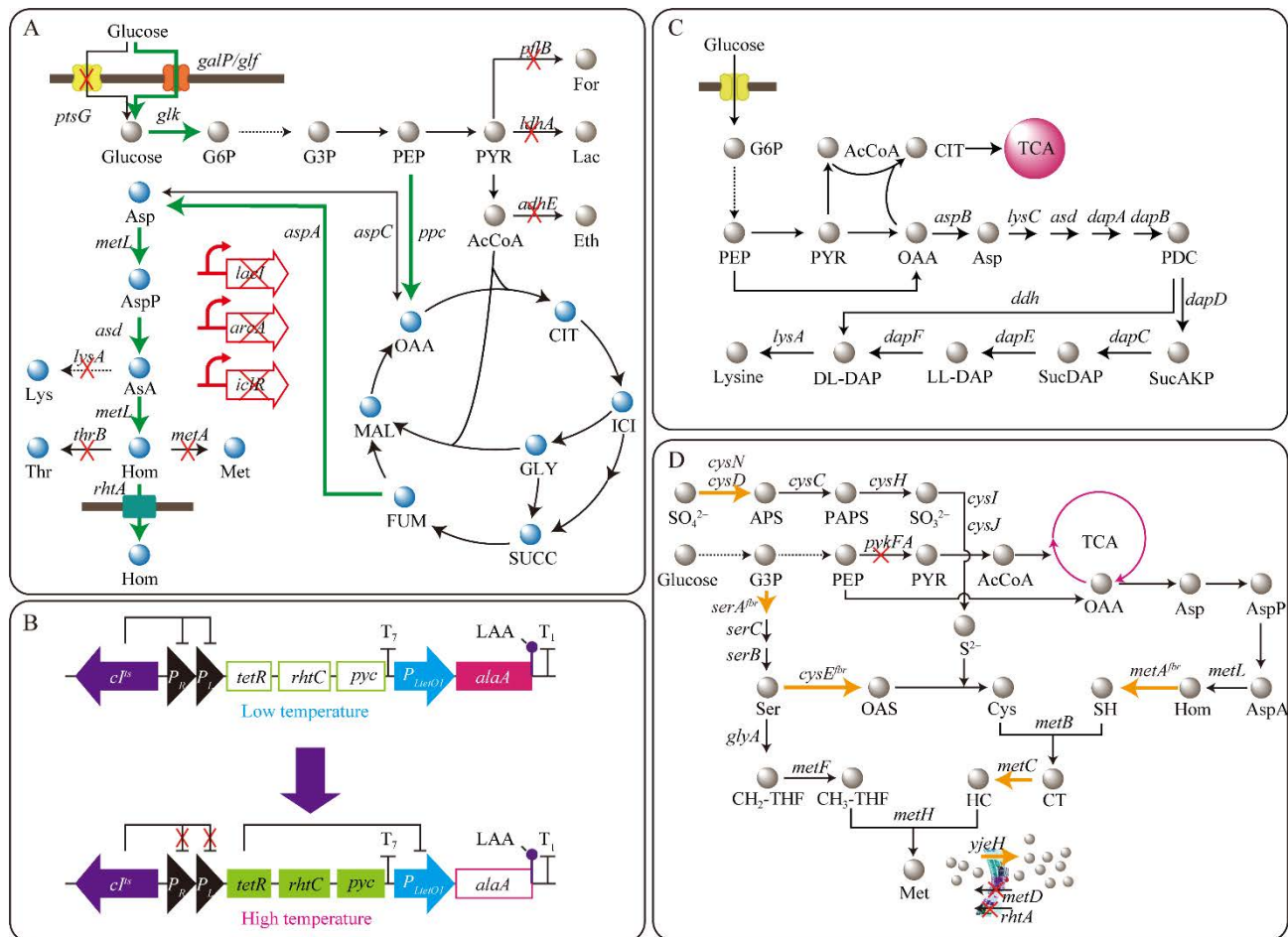


图2 天冬氨酸族氨基酸高产菌株的合成途径

Figure 2 Designed and optimized the high performance of microbial cell factories for aspartic acid family of amino acids. A: Schematic of homoserine biosynthetic pathway. B: Regulatory mechanism model of thermal switch plasmids for threonine production. C: Schematic of lysine biosynthetic pathway. D: Schematic of methionine biosynthetic pathway. The black dashed arrow represents a multistep pathway. Solid arrows represent central fermentative pathways. A red X depicts that the corresponding gene was knocked out. Green along with genes written in letters denote the biosynthesis pathway of homoserine. Orange along with genes written in letters denote overexpression in the biosynthesis pathway of methionine. Each gene encodes the following: *ptsG*: Glucose-specific transporter enzyme II CBGlc; *galP*: Galactose permease; *glf*: Glucose facilitator; *glk*: Glucose kinase; *pflB*: Pyruvate-formate lyase; *ldhA*: Lactate dehydrogenase; *adhE*: Alcohol dehydrogenase; *ppc*: PEP carboxylase; *aspC*: Aspartate aminotransferase; *aspA*: Aspartate ammonia-lyase; *lacI*: Lac repressor; *arcA*: Anoxic redox control; *iclR*: Isocitrate lyase regulation; *metL*: Bifunctional aspartokinase-homoserine dehydrogenase II; *asd*: Aspartate semialdehyde dehydrogenase; *lysA*: Meso-DAP decarboxylase; *thrB*: Aromatic amino acid transaminase; *metA*: Homoserine succinyltransferase; *rthA*: Homoserine exporter; *tetR*: Tet repressor; *rhtC*: Export protein; *alaA*: Alanine-synthesizing transaminases; *aspB*: Aspartate aminotransferase; *lysC*: Aspartate kinase; *dapA*: 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase; *dapB*: 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase; *dapD*: Tetrahydro dipicolinate succinylase; *dapC*: Succinyl diaminopimelate transaminase; *dapE*: Succinyl-diaminopimelate desuccinylase; *dapF*: Diaminopimelate epimerase; *ddh*: Diaminopimelate dehydrogenase; *cysN*: Sulfate adenylyltransferase subunit 1; *cysD*: Sulfate adenylyltransferase subunit 2; *cysC*: Adenylylsulfate kinase; *cysH*: Phosphoadenosine phosphosulfate reductase; *cysI*: Sulfite reductase (NADPH) flavoprotein beta-component; *cysJ*: Sulfite reductase (NADPH)



flavoprotein alpha-component; *pykFA*: Pyruvate kinase; *serA<sup>fb</sup>*: Phosphoglycerate dehydrogenase; *serC*: Phosphoserine aminotransferase; *serB*: Phosphoserine phosphatase; *glyA*: Serine hydroxymethyltransferase; *cysE<sup>fb</sup>*: Serine O-acetyltransferase; *metC*: Cystathionine lyase; *metH*: Homocysteine methyltransferase II; *metB*: Succinyl homoserine lyase; *metF*: Methylenetetrahydrofolate reductase; *metA<sup>fb</sup>*: Homoserine O-succinyltransferase; *metL*: Fused aspartate kinase/homoserine dehydrogenase 2; *metD*: Methionine absorption transporter operon; *yjeH*: Methionine exporter; *rhtA*: Homoserine exporter. Abbreviations: G6P: Glucose 6-phosphate; G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; PYR: Pyruvate; For: Formate; Lac: Lactate; Eth: Ethanol; AcCoA: Acetyl-CoA; CIT: Citrate; ICI: Isocitrate; SUCC: Succinate; FUM: Fumarate; MAL: Malate; GLY: Glyoxylate; OAA: Oxaloacetate; ASP: Aspartate; AspP: Aspartyl phosphate; AsA: Aspartate semialdehyde; Hom: Homoserine; Lys: Lysine; MET: Methionine; THR: Threonine; PDC: Tetrahydrodipicolinate; SucAKP: N-succinyl-2-amino-6-ketopimelate; SucDAP: N-succinyl-L,L-diaminopimelate; LL-DAP: L,L-diaminopimelate; DL-DAP: Meso-diaminopimelate; SH: Succinyl homoserine; CT: Cystathionine; HC: Homocysteine; Ser: Serine; OAS: O-acetyl serine; Cys: Cysteine; PYR: Pyruvate; APS: Adenosine 5-phosphosulfate; PAPS: 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate.

### 3 创制谷氨酸族氨基酸高产菌株

谷氨酸是精氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸和脯氨酸的共同前体,因此将精氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸和脯氨酸统称为谷氨酸族氨基酸<sup>[54]</sup>。利用系统代谢工程与合成生物学技术,工程化改造 *C. glutamicum* 创制了精氨酸、鸟氨酸和脯氨酸的高产菌株,改造 *E. coli* 创制了精氨酸和瓜氨酸的高产菌株<sup>[38,40-42,55]</sup>(表 1)。在谷氨酸族氨基酸高产菌株的创制过程中,需要重点关注氨甲酰磷酸和 NADPH 供给问题。为强化氨甲酰磷酸供给,在精氨酸和瓜氨酸细胞工厂的创制过程中,都采用增强氨甲酰磷酸合成路径的策略;针对 NADPH 供给问题,在谷氨酸族氨基酸高产菌株的构建过程中,均采用调控磷酸戊糖途径的方案。

目前,文献报道的精氨酸最高产量由 *E. coli* ARG28 实现<sup>[39]</sup>。在该研究中,以 *E. coli* MG1655 为出发菌株,通过敲除精氨酸脱羧酶编码基因 *speA*、精氨酸脱羧酶编码基因 *adiA* 和精氨酸琥珀酰转移酶编码基因 *astA*,阻断精氨酸降解途径,敲除 *argR*,解除精氨酸对精氨酸合成路径的反馈抑制。敲除 *lacI*,利用 P<sub>trc</sub> 启动子控制的谷氨酸棒杆菌来源的精氨酸合成基因簇 *argCJBDF* 替换 *yghX*、利用 P<sub>trc</sub> 启动子控制的谷

氨酸棒杆菌来源的精氨酸琥珀酸合成酶和精氨酸琥珀酸裂解酶编码基因 *argGH* 替换 *ygaY*、利用谷氨酸棒杆菌来源的乙酰谷氨酸合成酶 *ArgJ* 替换本源的乙酰基鸟氨酸脱乙酰基酶 *ArgE*,构建了精氨酸循环合成途径。并引入 *B. subtilis* F126 来源抗反馈调节的氨甲酰磷酸合成酶(PyrAA/PyrAB<sup>E949\*</sup>),强化前体氨甲酰磷酸供给;增强本源 PntAB 表达,强化辅因子 NADPH 供给。利用生长偶联型启动子 *rpsT* P1 调控  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合体亚基(SucA)表达,平衡代谢流在细胞生产和精氨酸合成之间的分布;通过引入谷氨酸棒杆菌来源的转运蛋白 *LysE*,强化精氨酸转运。进一步利用相应精氨酸的生物传感器辅助诱变筛选系统(biosensor-assisted mutagenesis screening system, BHTS),筛选获得精氨酸高产菌株 *E. coli* ARG28,使精氨酸产量提高到 132 g/L,转化率为 0.510 g/g,生产强度为 2.75 g/(L·h)。

利用 *C. glutamicum* 底盘微生物也实现了精氨酸高产菌株的创制<sup>[38]</sup>。在该研究中,以 *C. glutamicum* ATCC 21831 (AR0)为出发菌株,通过诱变育种获得 *C. glutamicum* AR1,并敲除阻遏蛋白 *ArgR* 和 *FarR*,解除精氨酸合成途径的反馈抑制,获得合成精氨酸的底盘微生物(图 3A)。为了强化 NADPH 供给,将磷酸葡萄糖异构酶

(phosphoglucose isomerase, Pgi)的起始密码子从 ATG 变为 GTG, 弱化糖酵解途径, 同时利用  $P_{\text{sod}}$  启动子上调 *tkt*、*tal*、*zwf*、*opcA* 和 *pgl* 基因簇(*tkt* 和 *tal* 编码转酮醇酶、*zwf* 编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、*opcA* 编码假定葡萄糖-6-磷酸脱氢酶组装蛋白、*pgl* 编码 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶), 强化磷酸戊糖途径。在此基础上敲除 Ncg11221, 阻断精氨酸内转运, 并利用  $P_{\text{sod}}$  启动子上调氨甲酰磷酸合成酶 CarAB, 增加前体氨甲酰磷酸供给。最后利用  $P_{\text{enu}}$  启动子替换 *argGH* 本源启动子, 强化瓜氨酸到精氨酸的代谢通量, 获得工程菌 *C. glutamicum* AR6, 使精氨酸的产量增加到 92.5 g/L, 转化率为 0.400 g/g, 生产强度为 1.28 g/(L·h)。

如图 3B 所示, 在精氨酸的合成路径中鸟氨酸和瓜氨酸都是精氨酸的前体。以 *E. coli* 底盘微生物, 创制了瓜氨酸高产菌株; 以 *C. glutamicum* 底盘微生物, 创制了鸟氨酸高产菌株。在瓜氨酸高产菌株的创制过程中, 以 *E. coli* MG1655 为出发菌株, 敲除 *argG*, 阻断瓜氨酸代谢去路; 敲除 *lacI*, 解除反馈阻遏; 敲除阻遏蛋白 *argR* 减少对瓜氨酸合成途径的反馈阻遏, 并利用  $P_{\text{trc}}$  启动子控制 *C. glutamicum* 来源的 *argJ*、替换 *yncI*, 解除瓜氨酸反馈抑制。利用  $P_{\text{trc}}$  启动子控制 *C. glutamicum* 来源的 *argCJBDF* 替换 *yghX*, 利用  $P_{\text{trc}}$  启动子控制的乙酰谷氨酸激酶编码基因 *argB* 替换 *ycjV*, 并利用 *C. glutamicum* 来源的 *argJ* 替换本源的 *argE*, 构建精氨酸循环合成途径。在此基础上, 引入 *B. subtilis* F126 来源氨甲酰磷酸合成酶(PyrAA/PyrAB\*)强化前体氨甲酰磷酸供给, 过表达本源谷氨酸脱氢酶(Gdh)强化前体谷氨酸供给, 过表达 PntAB 强化 NADPH 供给, 引入 *C. glutamicum* 来源的转运蛋白 LysE 强化瓜氨酸转运; 并引入由群体感应系统和蛋白酶元件组成的动态调控, 控制精氨酸琥珀酸合酶(ArgG)表达, 动态调控精氨酸合成途径, 构建非营养缺陷型菌株, 获得工程菌 *E. coli* CIT24, 使瓜氨酸

产量提高到 82.1 g/L, 转化率为 0.340 g/g, 生产强度为 1.71 g/(L·h)<sup>[41]</sup>。在鸟氨酸高产菌株的创制过程中, 以 *C. glutamicum* ATCC 13032 为出发菌株, 敲除  $\gamma$ -谷氨酰转移酶编码基因 *proB* 和鸟氨酸氨甲酰转移酶编码基因 *argF* 阻断竞争支路, 敲除 *argR* 解除鸟氨酸反馈抑制(图 3C)。为了增加辅因子供给, 将 Pgi 的起始密码子从 ATG 突变为 GTG, 弱化糖酵解途径; 将 Zwf 的起始密码子从 GTG 变为 ATG, 并用强启动子  $P_{\text{sod}}$  上调 *tkt*、*tal*、*zwf*、*opcA* 和 *pgl* 基因簇, 强化磷酸戊糖途径, 增加 NADPH 供给。在此基础上引入 *C. glutamicum* ATCC 21831 来源的 *argCJBD*, 获得工程菌 *C. glutamicum* YW06 (pSY223), 使鸟氨酸的产量提高到 51.5 g/L, 转化率为 0.240 g/g, 生产强度为 1.29 g/(L·h)<sup>[40]</sup>。

目前文献报道脯氨酸的最高产量由 *C. glutamicum* PRO-19 实现<sup>[42]</sup>。在该研究中, 以 *C. glutamicum* ATCC 13032 为出发菌株, 将 ProB 的 150 位氨基酸残基由缬氨酸(V)突变为天冬酰胺(N), 解除脯氨酸对 ProB 的反馈抑制, 获得合成脯氨酸的底盘微生物(图 3D)。然后, 在基因组上, 利用由启动子  $P_{\text{pyc-20}}$  控制的 *proB*<sup>V150N</sup>AC (脯氨酸合成基因簇)替换 *putA* (黄素酶编码基因), 在强化脯氨酸合成路径的同时阻断黄素酶催化的脯氨酸代谢支路。在此基础上, 过表达谷氨酸脱氢酶(Gdh)强化前体谷氨酸供给, 过表达丙酮酸羧化酶(Pyc)强化 C4 回补途径, 过表达 *Streptococcus mutans* 来源的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GapN)强化 NADPH 供给, 增强脯氨酸合成代谢通量。最后, 对脯氨酸转运系统进行改造, 用  $P_{\text{trc}}$  启动子替换脯氨酸转运蛋白编码基因 *cgI2522* 的本源启动子强化脯氨酸转运, 并敲除脯氨酸内转运蛋白编码基因 *cgI1270* 阻断脯氨酸内转运, 获得工程菌 *C. glutamicum* PRO-19, 使脯氨酸的产量达到 142 g/L, 转化率为 0.310 g/g, 生产强度为 2.90 g/(L·h)<sup>[42]</sup>。

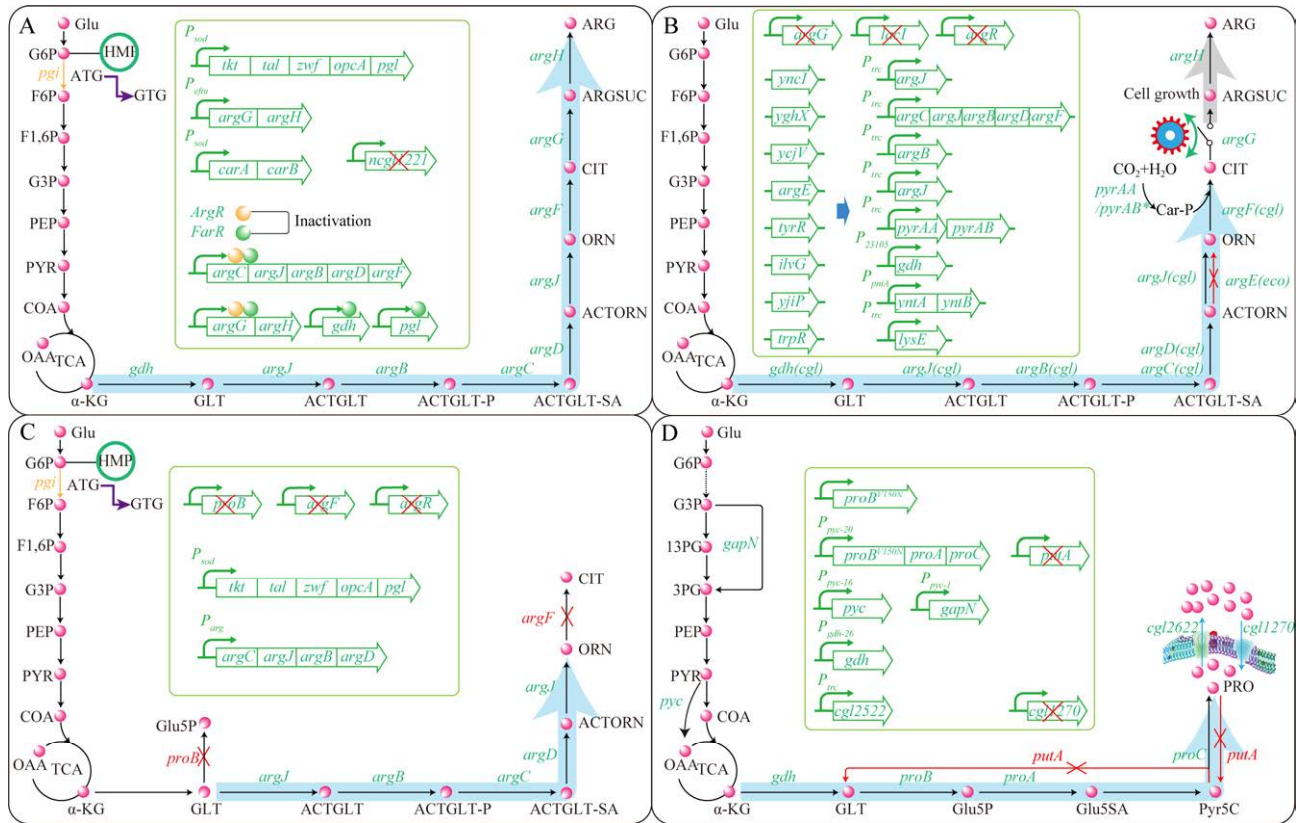


图3 谷氨酸族氨基酸高产菌株的合成途径

Figure 3 Designed and optimized the high performance of microbial cell factories for glutamic acid family of amino acids. A: Schematic of arginine biosynthetic pathway. B: Schematic of citrulline biosynthetic pathway. C: Schematic of ornithine biosynthetic pathway. D: Schematic of proline biosynthetic pathway. Solid arrows represent central fermentative pathways. A red X depicts that the corresponding gene was knocked out. Each gene encodes the following: *pgi*: Glucose-6-phosphate isomerase; *gdh*: Glutamate dehydrogenase; *argJ*: *N*-acetyltransferase; *argB*: Acetylglutamate kinase; *argC*: Acetylglutamate semialdehyde dehydrogenase; *argD*: Acetylornithine transaminase; *argF*: Ornithine transcarbamylase; *argG*: Argininosuccinate synthase; *argH*: Argininosuccinase; *tkt*: Transketolase; *tal*: Transketolase; *zwf*: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; *opcA*: Putative glucose-6-phosphate dehydrogenase assembly protein; *pgl*: 6-phosphogluconolactonase; *carAB*: Carbamoylphosphate synthase; *ncgl1221*: Glutamate exporter; *argE*: Acetylornithine deacetylase; *pyrAA/pyrAB\**: Carbamoyl phosphate synthase; *lacI*: Lac repressor; *argR*: Arg repressor; *yntAB*: Transhydrogenase; *lysE*: Transport protein; *yncl*, *yjiP*, *ilvG*, *ycjV*, *yghX*: Pseudogene; *tyrR*: Tyr repressor; *trpR*: Trp repressor; *proB*:  $\gamma$ -glutamyl kinase; *proA*:  $\gamma$ -glutamyl phosphate reductase; *proC*: Pyrroline-5-carboxylate reductase; *putA*: Multifunctional proline utilization A flavoenzyme; *gapN*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *pyc*: Pyruvate dehydrogenase; *cgl2622*: Proline exporter; *cgl1270*: Proline importer; Abbreviations: Glu: Glucose; G6P: Glucose 6-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate; F1,6P: Fructose-1,6-bisphosphate; G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; PYR: Pyruvate; COA: Acetyl-CoA; OAA: Oxaloacetate;  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -ketoglutarate; GLT: Glutamate; ACTGLT: Acetylglutamate; ACTGLT-P: Acetylglutamyl phosphate; ACTGLT-SA: Acetylglutamate semialdehyde; ACTORN: Acetylornithine; ORN: Ornithine; ARG-SUC: Argininosuccinate; ARG: Arginine; Glu5P: Glutamyl-5-phosphate; Glu5SA: Glutamate-5-semialdehyde; Pyr5C: Pyrroline-5-carboxylate; PRO: Proline.

## 4 创制芳香族氨基酸高产菌株

由于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的分子结构中含有苯环,因此将色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸统称为芳香族氨基酸<sup>[7,56-57]</sup>。利用系统代谢工程与合成生物学技术工程化改造 *E. coli*,创制了色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸高产菌株<sup>[43-44,58]</sup>(表1)。在芳香族氨基酸高产菌株的创制过程中,不仅要强化前体 PEP 与 4-磷酸赤藓糖(erythritose 4-phosphate, E4P)供给,而且要解除芳香族氨基酸对其合成路径关键酶的反馈调节。

在色氨酸高产菌株的创制过程中,利用产色氨酸 *E. coli* CCTCC M20211388 为底盘微生物,通过强化色氨酸操纵子 *trpEDCBA* 表达,增强色氨酸合成途径;敲除色氨酸酶编码基因 *tnaA*、预苯酸脱水酶编码基因 *pheA* 和预苯酸脱氢酶编码基因 *tyrA*,阻断色氨酸分解与冗余代谢支路,构建了工程菌 *E. coli* TRP3,可积累 23.2 g/L 的色氨酸。通过启动子工程,优化胞内色氨酸前体 PEP 与 E4P 的比例,使色氨酸产量增加到 33.2 g/L(图 4A)。同时,通过引入丝氨酸合成途径,增加丝氨酸供给,获得了可合成 40.1 g/L 色氨酸的工程菌 *E. coli* TPR11。对工程菌 *E. coli* TPR11 的胞内代谢产物分析表明,发现胞内色氨酸浓度增加了 50.1%,过表达转运蛋白 YddG,使工程菌胞内色氨酸含量降低了 61.4%,细胞生物量提高了 20.4%,色氨酸产量提高了 29.9%,在 5 L 发酵罐条件下产 52.1g/L 的色氨酸,转化率为 17.1%,生产强度为 1.45 g/(L·h)<sup>[43]</sup>。

在苯丙氨酸高产菌株的创制过程中,以 *E. coli* W3110 衍生菌株 *E. coli* Xllp01 为出发菌株,过表达 3-脱氧-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸合酶(3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate,

DAHP 合酶, *aroF* 编码)和抗反馈调节的分支酸变位酶(*pheA*<sup>\*</sup>编码),强化苯丙氨酸合成途径(图 4B)。敲除 *ptsH*,阻断 PTS 葡萄糖转运系统,强化前 PEP 供给。在基因组上,利用启动子 Pm37 替换 GalP 本源启动子,利用 Pm93 启动子替换 Glk 本源启动子,强化葡萄糖转运,弥补 PTS 缺失对葡萄糖消耗造成的影响。同时将阻遏蛋白 TyrR 的第 495 位氨基酸残基由苏氨酸(T)突变为异亮氨酸(I),解除苯丙氨酸对其合成路径的反馈调控。进一步过表达 3-脱氢奎宁酸脱水酶(AroD),增加苯丙氨酸合成途径,获得工程菌 *E. coli* Xllp12,使苯丙氨酸的产量提高到 72.6 g/L,转化率为 0.260 g/g,生产强度为 1.45 g/(L·h)<sup>[44]</sup>。

在酪氨酸高产菌株的创制过程中,以产酪氨酸 *E. coli* WSH-Z06 为出发菌株,敲除阻遏蛋白编码基因 *tyrR*、分支酸变位酶编码基因 *pheA* 和邻氨基甲酸酯合成酶 I 编码基因 *trpE*,阻断色氨酸和苯丙氨酸代谢支路。引入抗反馈抑制的 DAHP 合酶(AroG<sup>tblr</sup>)、抗反馈调节的分支酸脱氢酶(TyrA<sup>tblr</sup>)、转酮酶(transketases, TktA)和磷酸烯醇丙酮酸合酶(PpsA),强化酪氨酸合成途径,并敲除转运蛋白 AroP。进一步将由启动子 P<sub>J23119</sub> 控制的 *yddG*、*tktA* 和 *ppsA*,分别插入到 *dadX-cvrA*、*tyrP* 和 *trpE* 基因座上;引入 *Bifidobacterium adolescentis* 来源的磷酸转酮酶(*fpk* 编码)和强化 *pta* 表达;并将由启动子 P<sub>J23119</sub> 控制的 *udhA* (吡啶核苷酸转氢酶)和 *pntAB*,分别插入到 *ykgH-betaA* 和 *yeeJ-yeeL* 基因座上,敲除 *poxB*,获得工程菌株 *E. coli* HGD3,进一步通过适应性进化,筛选获得耐受乙酸的工程菌株 *E. coli* HGD,使酪氨酸的产量提高到 92.5 g/L,转化率为 0.266 g/g,生产强度为 1.49 g/(L·h)<sup>[45]</sup>(图 4C)。

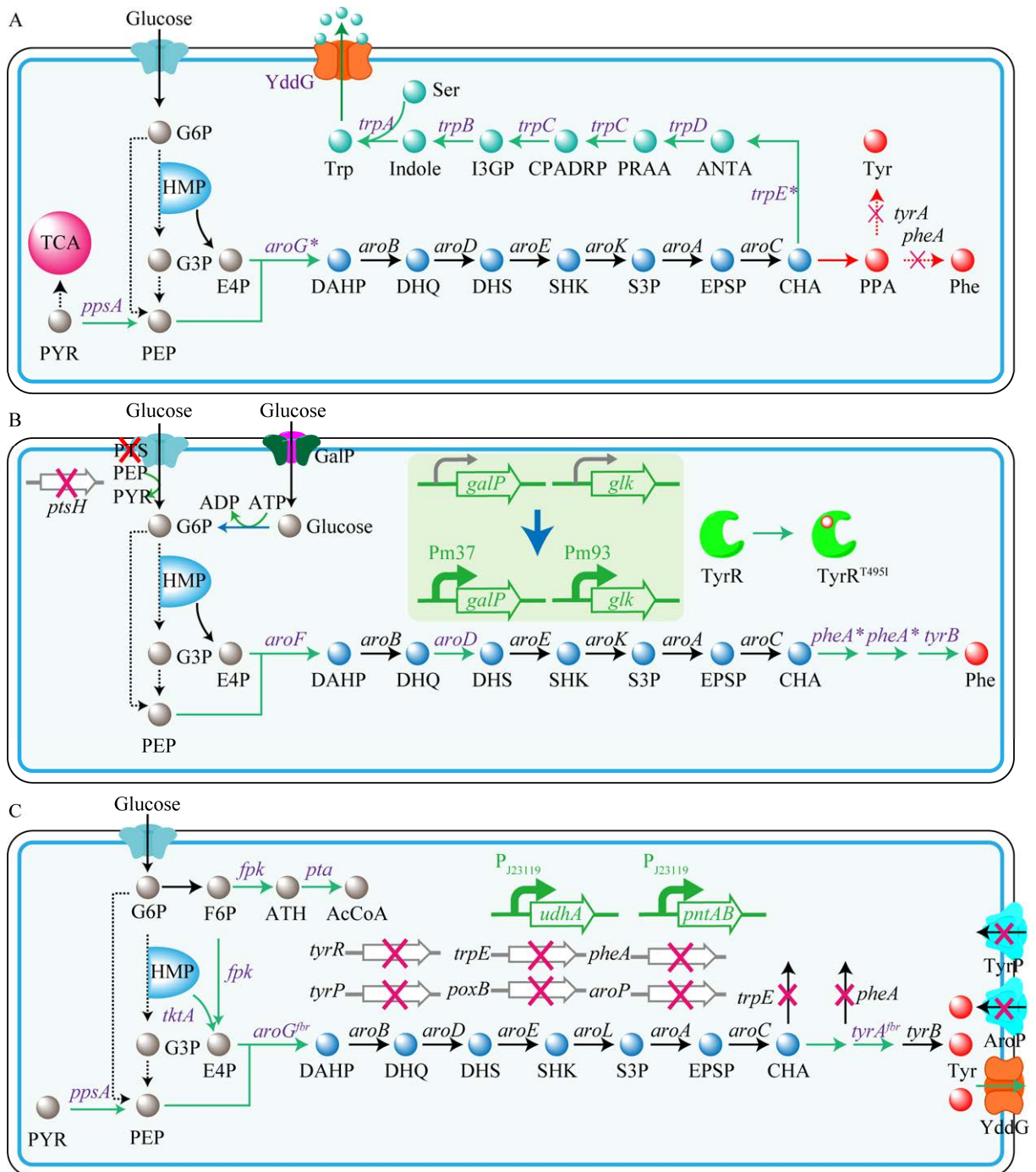


图 4 芳香族氨基酸高产菌株的合成途径

Figure 4 Designed and optimized the high performance of microbial cell factories for aromatic amino acids. A: Schematic of tryptophan biosynthetic pathway. B: Schematic of tyrosine biosynthetic pathway. C: Schematic of phenylalanine biosynthetic pathway. The black dashed arrow represents a multistep pathway. Solid arrows represent central fermentative pathways. A red X depicts that the corresponding gene was knocked out. The green arrow with genes written in purple letters denote the engineering pathway. Each gene encodes the following: *aroG\**/*aroG<sup>fbr</sup>*: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate; *ppsA*: Phosphoenolpyruvate synthase;

*aroB*: 3-dehydroquinase synthase; *aroD*: 3-dehydroshikimate dehydratase; *aroE*: Shikimate 5-dehydrogenase; *aroK*: Shikimate kinase; *aroA*: EPSP synthase; *aroC*: Chorismate synthase; *trpE*\*/*trpE*: Anthranilate synthase I; *trpD*: Anthranilate synthase II; *trpC*: (1S,2R)-1-C-(indol-3-yl) glycerol 3-phosphate isomerase; *trpB*: Tryptophan synthase B; *trpA*: Tryptophan synthase A; *yydG*: Aromatic amino acid exporter; *tyrA*/*tyrA<sup>fbr</sup>*: Chorismate dehydrogenase; *pheA*\*/*pheA*: Chorismate dehydratase; *ptsH*: Phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system enzyme G-encoding; *galP*: Galactose permease; *glk*: Glucose kinase; *tyrB*: Tyrosine aminotransferase; *udhA*: Pyridine nucleotide transhydrogenase; *pntAB*: Proton-translocating transhydrogenase; *fpk*: Phosphoketolase; *tktA*: Transketolase 1; *pta*: Phosphoacetyltransferase; *poxB*: Pyruvate oxidase; *tyrP*: Tyrosine:H<sup>+</sup> symporter; *aroP*: Aromatic amino acid:H<sup>+</sup> symporter. Abbreviations: G6P: Glucose 6-phosphate; G3P: 3-phosphoglycerate; PEP: Phosphoenolpyruvate; PYR: Pyruvate; G3P: Glyceraldehyde-3-phosphate; E4P: Erythrose-4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate; DHQ: 3-dehydroquinase; DHS: 3-dehydroshikimate; SHK: Shikimate; S3P: Shikimate-3-phosphate; EPSP: 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate; CHA: Chorismate; ANTA: Anthranilate; RRAA: N-(5-phosphoribosyl)-anthranilate; I3GP: (1S,2R)-1-C-(indol-3-yl) glycerol 3-phosphate; Trp: Tryptophan; PPA: Prephenate; Phe: Phenylalanine; Tyr: Tyrosine; Pm37, P<sub>J23119</sub> and Pm93: Promoter; F6P: Fructose-6-phosphate; ATH: Acetylphosphate.

## 5 总结与展望

利用系统代谢工程与合成生物学技术,以 *C. glutamicum* 和 *E. coli* 为底盘微生物,创制了支链氨基酸、天冬氨酸族氨基酸、谷氨酸族氨基酸和芳香族氨基酸高产菌株。目前氨基酸高产菌株主要以“粮食生物质”淀粉作为底物,存在“与人争粮,与粮争地”等问题。未来可以扩展氨基酸微生物细胞工厂的底物谱,开发以木质纤维素、食品废弃物与畜禽废弃物等非粮生物质为原料的氨基酸生产技术,创建以一碳(CO<sub>2</sub>、CO、CH<sub>4</sub> 和 CH<sub>3</sub>OH 等)为底物生产氨基酸的关键技术,不仅有望解决“与人争粮,与粮争地”等问题,还减少了温室气体的排放,助力“双碳”目标<sup>[59-60]</sup>。但以一碳为底物氨基酸生产菌株的发酵性能较低,急需开发新的捕碳模块与能量供给模块,提高固碳效率以增加生产过程的经济性。氨基酸具有多样化的官能团,已开发超过 1 000 余种氨基酸衍生物,极大拓展了氨基酸的应用范围<sup>[61-62]</sup>。在氨基酸衍生物制备过程中,主要以氨基酸为底物,利用生物催化或化学催化制备,未来可在氨基酸高产菌株的基础上,开发以葡萄糖为底物直接发酵合成氨基酸衍生物的方法,降低氨基酸衍生物的生产成本。此外,增加氨基酸高

产菌株的鲁棒性,可以减少生产过程中环境扰动对发酵体系的影响,并简化发酵工艺降低发酵过程控制成本。研究具有耐受极端环境条件、性能稳定、鲁棒性强等优异特性的非模式底盘微生物,可为将来更好地利用细胞工厂生产氨基酸以及衍生物提供参考。

## REFERENCES

- [1] SHIMIZU K, MATSUOKA Y. Feedback regulation and coordination of the main metabolism for bacterial growth and metabolic engineering for amino acid fermentation[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 55: 107887.
- [2] 郭亮, 高聪, 柳亚迪, 陈修来, 刘立明. 大肠杆菌生产饲用氨基酸的研究进展[J]. *合成生物学*, 2021, 2(6): 964-981.  
GUO L, GAO C, LIU YD, CHEN XL, LIU LM. Advances in bioproduction of feed amino acid by *Escherichia coli*[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(6): 964-981 (in Chinese).
- [3] WENDISCH VF. Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 58: 17-34.
- [4] FÉLIX FKDC, LETTI LAJ, VINÍCIUS de MELO PEREIRA G, BONFIM PGB, SOCCOL VT, SOCCOL CR. L-lysine production improvement: a review of the state of the art and patent landscape focusing on strain development and fermentation technologies[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(8): 1031-1055.

- [5] YANG D, PARK SY, PARK YS, EUN H, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for natural product biosynthesis[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(7): 745-765.
- [6] 魏佳, 王壮壮, 于海波, 冯丽妍, 徐建中, 张伟国. 产 L-苏氨酸重组大肠杆菌的构建和发酵性能[J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 695-706.  
WEI J, WANG ZZ, YU HB, FENG LY, XU JZ, ZHANG WG. Construction and fermentation of L-threonine-producing recombinant *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 695-706 (in Chinese).
- [7] HUC CETOGULLARI D, LUO ZW, LEE SY. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 41.
- [8] KO YS, KIM JW, LEE JA, HAN T, KIM GB, PARK JE, LEE SY. Tools and strategies of systems metabolic engineering for the development of microbial cell factories for chemical production[J]. Chemical Society Reviews, 2020, 49(14): 4615-4636.
- [9] MA Q, ZHANG QW, XU QY, ZHANG CL, LI YJ, FAN XG, XIE XX, CHEN N. Systems metabolic engineering strategies for the production of amino acids[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2017, 2(2): 87-96.
- [10] 马倩, 夏利, 谭森, 孙全伟, 杨蒙雅, 张颖, 陈宁. 氨基酸生产的代谢工程研究进展与发展趋势[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1677-1696.  
MA Q, XIA L, TAN M, SUN QW, YANG MY, ZHANG Y, CHEN N. Advances and prospects in metabolic engineering for the production of amino acids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1677-1696 (in Chinese).
- [11] 关丹, 李燕军, 陈宁. 氨基酸产业现状及生产菌株选育技术[J]. 发酵科技通讯, 2018, 47(2): 110-114.  
GUAN D, LI YJ, CHEN N. Amino acid industry status and strain breeding technology[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2018, 47(2): 110-114 (in Chinese).
- [12] SANO C. History of glutamate production[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2009, 90(3): 728S-732S.
- [13] WOLF S, BECKER J, TSUGE Y, KAWAGUCHI H, KONDO A, MARIENHAGEN J, BOTT M, WENDISCH VF, WITTMANN C. Advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to produce high-value active ingredients for food, feed, human health, and well-being[J]. Essays in Biochemistry, 2021, 65(2): 197-212.
- [14] ZHAO NN, QIAN L, LUO GJ, ZHENG SP. Synthetic biology approaches to access renewable carbon source utilization in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(22): 9517-9529.
- [15] BECKER J, ROHLES CM, WITTMANN C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 122-141.
- [16] 郭亮. 时空代谢调控大肠杆菌生产精细化学品[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2020.  
GUO L. Temporo-spatial metabolic regulation of *Escherichia coli* for production of fine chemicals[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [17] PONTRELLI S, CHIU TY, LAN EI, CHEN Fyh, CHANG P, LIAO JC. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 16-46.
- [18] HAYES G, LAUREL M, MacKINNON D, ZHAO TS, HOUCK HA, BECKER CR. Polymers without petrochemicals: sustainable routes to conventional monomers[J]. Chemical Reviews, 2023, 123(5): 2609-2734.
- [19] HIRSCHI S, WARD TR, MEIER WP, MÜLLER DJ, FOTIADIS D. Synthetic biology: bottom-up assembly of molecular systems[J]. Chemical Reviews, 2022, 122(21): 16294-16328.
- [20] LEE JH, WENDISCH VF. Production of amino acids-genetic and metabolic engineering approaches[J]. Bioresource Technology, 2017, 245(Pt B): 1575-1587.
- [21] PARK JH, LEE KH, KIM TY, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(19): 7797-7802.
- [22] HOLEČEK M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements[J]. Nutrition & Metabolism, 2018, 15: 33.
- [23] WANG YY, ZHANG F, XU JZ, ZHANG WG, CHEN XL, LIU LM. Improvement of L-leucine production in *Corynebacterium glutamicum* by altering the redox

- flux[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(8): 2020.
- [24] HASEGAWA S, UEMATSU K, NATSUMA Y, SUDA M, HIRAGA K, JOJIMA T, INUI M, YUKAWA H. Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(3): 865-875.
- [25] HASEGAWA S, SUDA M, UEMATSU K, NATSUMA Y, HIRAGA K, JOJIMA T, INUI M, YUKAWA H. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield L-valine production under oxygen deprivation conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(4): 1250-1257.
- [26] YIN LH, ZHAO JX, CHEN C, HU XQ, WANG XY. Enhancing the carbon flux and NADPH supply to increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 19(1): 132-142.
- [27] 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.
- [28] DING XH, YANG WJ, DU XB, CHEN N, XU QY, WEI MH, ZHANG CL. High-level and-yield production of L-leucine in engineered *Escherichia coli* by multistep metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 78: 128-136.
- [29] GAO H, TUYISHIME P, ZHANG X, YANG TW, XU MJ, RAO ZM. Engineering of microbial cells for L-valine production: challenges and opportunities[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 172.
- [30] 王颖好. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌发酵生产 L-亮氨酸[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2020. WANG YY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine fermentation[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [31] VO TM, PARK S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 for efficient production of homoserine from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 104-113.
- [32] CHO JS, KIM GB, EUN H, MOON CW, LEE SY. Designing microbial cell factories for the production of chemicals[J]. *Journal of the American Chemical Society Au*, 2022, 2(8): 1781-1799.
- [33] MU QX, ZHANG SS, MAO XJ, TAO Y, YU B. Highly efficient production of L-homoserine in *Escherichia coli* by engineering a redox balance route[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67: 321-329.
- [34] 赵磊. 大肠杆菌 L-苏氨酸生产菌代谢工程改造优化[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2020. ZHAO L. Metabolic engineering modification of an *Escherichia coli* L-threonine production strain[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [35] YE C, LUO QL, GUO L, GAO C, XU N, ZHANG L, LIU LM, CHEN XL. Improving lysine production through construction of an *Escherichia coli* enzyme-constrained model[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(11): 3533-3544.
- [36] GUO L, QI MY, GAO C, YE C, HU GP, SONG W, WU J, LIU LM, CHEN XL. Engineering microbial cell viability for enhancing chemical production by second codon engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 235-246.
- [37] LI ZC, LIU Q, SUN JH, SUN JJ, LI MJ, ZHANG Y, DENG AH, LIU SW, WEN TY. Multivariate modular metabolic engineering for enhanced L-methionine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 101.
- [38] PARK SH, KIM HU, KIM TY, PARK JS, KIM SS, LEE SY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4618.
- [39] JIANG S, WANG RR, WANG DH, ZHAO CG, MA Q, WU HY, XIE XX. Metabolic reprogramming and biosensor-assisted mutagenesis screening for high-level production of L-arginine in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 76: 146-157.
- [40] KIM SY, LEE J, LEE SY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(2): 416-421.
- [41] JIANG S, WANG DH, WANG RR, ZHAO CG, MA Q, WU HY, XIE XX. Reconstructing a recycling and nonauxotroph biosynthetic pathway in *Escherichia coli* toward highly efficient production of L-citrulline[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 220-231.
- [42] LIU J, LIU MS, SHI T, SUN GN, GAO N, ZHAO XJ, GUO X, NI XM, YUAN QQ, FENG JH, LIU ZM, GUO YM, CHEN JZ, WANG Y, ZHENG P, SUN JB. CRISPR-assisted rational flux-tuning and arrayed CRISPRi screening of an L-proline exporter for L-proline hyperproduction[J]. *Nature Communications*,



- 2022, 13: 891.
- [43] GUO L, DING S, LIU YD, GAO C, HU GP, SONG W, LIU J, CHEN XL, LIU LM. Enhancing tryptophan production by balancing precursors in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(3): 983-993.
- [44] LIU YF, XU YR, DING DQ, WEN JP, ZHU BW, ZHANG DW. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production[J]. *BMC Biotechnology*, 2018, 18(1): 5.
- [45] PING JR, WANG L, QIN ZJ, ZHOU ZM, ZHOU JW. Synergetic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of L-tyrosine[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2023, 8(4): 724-731.
- [46] KARAU A, GRAYSON I. Amino acids in human and animal nutrition[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2014, 143: 189-228.
- [47] 赵静. 几种主要饲用氨基酸的营养研究进展[J]. *中国饲料添加剂*, 2016(1): 10-13.  
ZHAO J. Research advances on nutritional effects of several major feeding amino acid[J]. *China Feed Additive*, 2016(1): 10-13.
- [48] ZHANG YN, WANG S, DENG YZ, HUANG XB, LI KC, CHEN W, RUAN D, XIA WG, WANG SL, ZHENG CT. The application of reduced dietary crude protein levels supplemented with additional amino acids in laying ducks[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(4): 100983.
- [49] YANG ZY, HTOO JK, LIAO SF. Methionine nutrition in swine and related monogastric animals: beyond protein biosynthesis[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2020, 268: 114608.
- [50] PARK Y, PARK JH, PARK S, LEE S, CHO K, KIM DD, SHIM WS, YOON IS, CHO HJ, MAENG HJ. Enhanced cellular uptake and pharmacokinetic characteristics of doxorubicin-valine amide prodrug[J]. *Molecules*, 2016, 21(10): 1272.
- [51] LI YJ, WEI HB, WANG T, XU QY, ZHANG CL, FAN XG, MA Q, CHEN N, XIE XX. Current status on metabolic engineering for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245(Pt B): 1588-1602.
- [52] CAI MM, ZHAO ZQ, LI XF, XU YY, XU MJ, RAO ZM. Development of a nonauxotrophic L-homoserine hyperproducer in *Escherichia coli* by systems metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 270-279.
- [53] FANG Y, WANG JL, MA WJ, YANG J, ZHANG HL, ZHAO L, CHEN SS, ZHANG SY, HU XQ, LI Y, WANG XY. Rebalancing microbial carbon distribution for L-threonine maximization using a thermal switch system[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 33-46.
- [54] CHARLIER D, BERVOETS I. Regulation of arginine biosynthesis, catabolism and transport in *Escherichia coli*[J]. *Amino Acids*, 2019, 51(8): 1103-1127.
- [55] 秦臻. 代谢工程改造大肠杆菌生产胸苷[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2022.  
QIN Z. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for thymidine production[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2022 (in Chinese).
- [56] LI MJ, LIU CQ, YANG JM, NIAN R, XIAN M, LI FL, ZHANG HB. Common problems associated with the microbial productions of aromatic compounds and corresponding metabolic engineering strategies[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 41: 107548.
- [57] NODA S, KONDO A. Recent advances in microbial production of aromatic chemicals and derivatives[J]. *Trends in Biotechnology*, 2017, 35(8): 785-796.
- [58] KIM B, BINKLEY R, KIM HU, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the enhanced production of L-tyrosine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(10): 2554-2564.
- [59] BANG J, HWANG CH, AHN JH, LEE JA, LEE SY. *Escherichia coli* is engineered to grow on CO<sub>2</sub> and formic acid[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5: 1459-1463.
- [60] GLEIZER S, BEN-NISSAN R, BAR-ON YM, ANTONOVSKY N, NOOR E, ZOHAR Y, JONA G, KRIEGER E, SHAMSHOUM M, BAR-EVEN A, MILO R. Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO<sub>2</sub>[J]. *Cell*, 2019, 179(6): 1255-1263.e12.
- [61] 谢希贤, 马倩, 陈宁. 氨基酸生产菌代谢工程研究发展趋势[J]. *生物产业技术*, 2016(4): 32-36.  
XIE XX, MA Q, CHEN N. Research and development trend of metabolic engineering of amino acid-producing bacteria[J]. *Biotechnology & Business*, 2016(4): 32-36 (in Chinese).
- [62] SONG W, CHEN XL, WU J, XU JZ, ZHANG WG, LIU J, CHEN J, LIU LM. Biocatalytic derivatization of proteinogenic amino acids for fine chemicals[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 40: 107496.

(本文责编 陈宏宇)