

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-032

天冬氨酸族饲用氨基酸微生物细胞工厂的创制

赵欣雨, 盛琦, 刘开放, 刘佳, 刘立明

(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 氨基酸作为动物饲料的重要组成部分, 是提高畜禽消化机能、禽肉品质、蛋白转化效率以及降低豆粕使用量的关键要素。合成生物技术的快速发展为氨基酸高产菌株构建和优化铺平了道路, 极大地提升了氨基酸生产效率, 显著降低了生产成本。本文在分析L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和L-异亮氨酸等四种天冬氨酸族氨基酸合成途径的基础上, 详细介绍了菌种改造方法和策略, 包括代谢路径重构、代谢途径优化、辅因子供应和增强产物外排等四个方面, 未来要从工业环境抗逆性、底物利用范围的拓展以及动态调控系统的优化三个方面进行突破, 才能为高性能氨基酸生产菌株的创制提供理论指导和技术支撑。

关键词: 天冬氨酸族氨基酸; 微生物细胞工厂; 代谢工程; 合成生物学; 基因编辑

中图分类号: Q815 **文献标志码:** A

Construction of microbial cell factories for aspartate-family feed amino acids

ZHAO Xinyu, SHENG Qi, LIU Kaifang, LIU Jia, LIU Liming

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Amino acids are essential components of animal feed, playing key roles in improving digestive function in livestock, enhancing meat quality, increasing protein conversion efficiency, and reducing reliance on soybean meal. Driven by global population growth and dietary changes, the increasing demand for animal protein has strained the livestock industry. This industry traditionally relies heavily on soybean meal as its primary protein source, a method that results in low nitrogen utilization and exacerbates environmental pollution from nitrogen emissions. Aspartate-family amino acids, including L-lysine, L-methionine, L-threonine, and L-isoleucine, represent the most significant category of feed amino acids, accounting for nearly 90% of global consumption. They address current challenges by balancing feed nutrition according to the ideal protein standard and enabling a low-carbon transition in animal husbandry. The primary method for producing these four amino acids is through microbial fermentation, with *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* serving as the primary host organisms. Rapid advances in systems

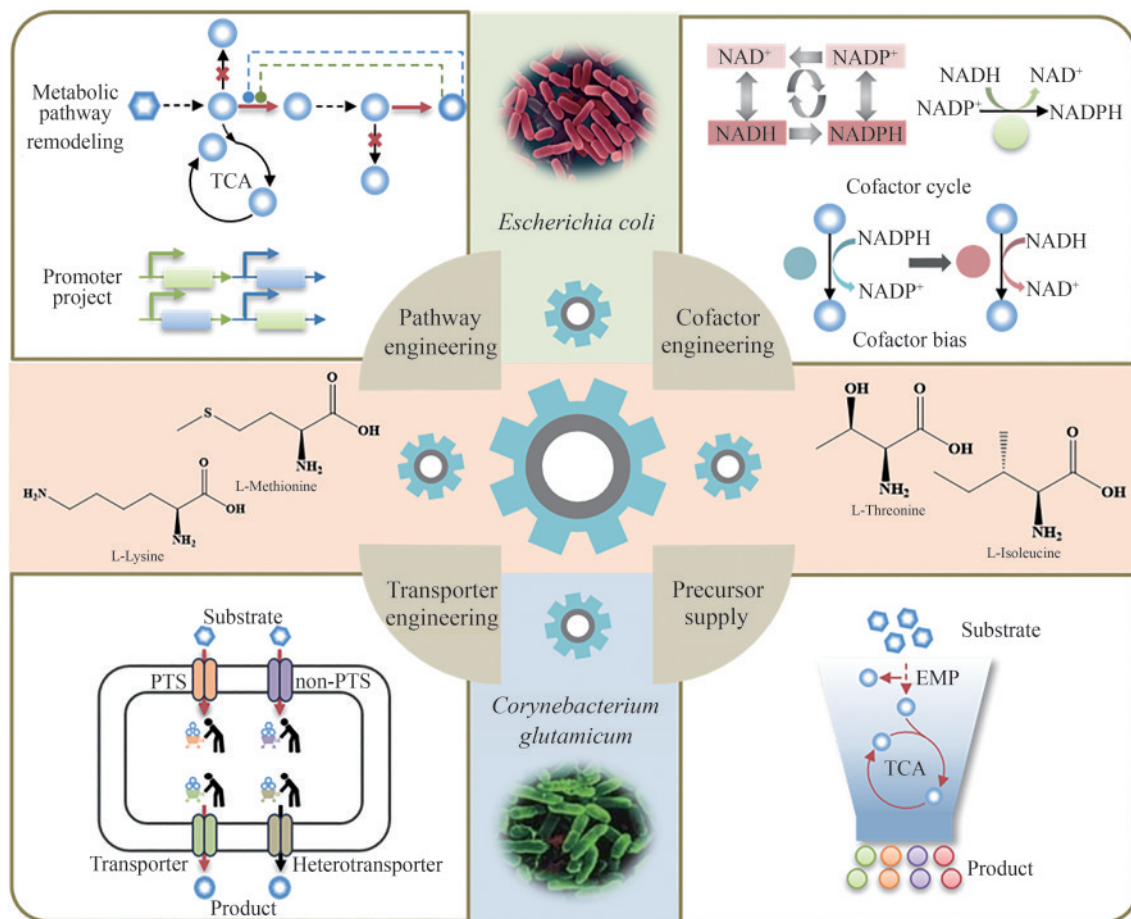
收稿日期: 2025-04-02 修回日期: 2025-06-18

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX(23)2005)

引用本文: 赵欣雨, 盛琦, 刘开放, 刘佳, 刘立明. 天冬氨酸族饲用氨基酸微生物细胞工厂的创制[J]. 合成生物学, 2025, 6(5): 1184-1202

Citation: ZHAO Xinyu, SHENG Qi, LIU Kaifang, LIU Jia, LIU Liming. Construction of microbial cell factories for aspartate-family feed amino acids[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(5): 1184-1202

biology, synthetic biology, metabolic engineering, and evolutionary engineering have facilitated the construction and optimization of high-yield amino acid-producing strains. This has significantly enhanced production efficiency and substantially reduced costs. Based on an analysis of the aspartate-family amino acid biosynthetic pathways, this paper details strain modification methods and strategies. These encompass four key aspects: metabolic pathway reconstruction, metabolic pathway optimization, cofactor supply enhancement, and improved product efflux. These approaches have enabled the industrial-scale production of strains achieving high titers and yields. Finally, future research directions are discussed, focusing on three fronts: enhancing strain stress resistance in industrial environments, expanding the range of utilizable substrates, and optimizing dynamic regulatory systems. These advancements are intended to offer theoretical guidance and technical support for the development of high-performance amino acid-producing strains. The ultimate objective is to facilitate the global shift towards efficient and environmentally sustainable feed amino acid production, thereby alleviating pressures on protein resources.



Keywords: aspartate-family amino acids; microbial cell factory; metabolic engineering; synthetic biology; gene editing

在全球人口激增与膳食结构升级的双重压力下，动物蛋白需求的持续攀升对养殖业提出了严峻挑战。当前饲料配方过度依赖豆粕、玉米、小

麦等为主的传统植物蛋白源，其必需氨基酸组成难以满足畜禽生长需求，直接导致蛋白质利用率低下，养殖企业需要添加外源氨基酸以平衡营养

组成,同时,现有饲料结构造成每年超千万吨的无效氮排放,加剧环境污染^[1-2]。饲用氨基酸是专门用于畜禽饲料中添加的氨基酸,旨在补充饲料中天然氨基酸的不足或优化其配比,以满足动物生长发育和健康维持的营养需求^[3]。提高饲用氨基酸的生产效率不仅有助于优化氨基酸供给体系,对推动养殖业的可持续发展也具有重要的战略意义。天冬氨酸族饲用氨基酸主要包括L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和L-异亮氨酸四种必需氨基酸,其中前三种氨基酸作为核心品种,占据了全球饲用氨基酸用量的80%~90%^[4]。天冬氨酸族饲用氨基酸的生产可有效弥补植物蛋白的氨基酸组成缺陷,使饲料结构接近理想蛋白标准,提升氮源利用率,助力畜牧业的低碳转型^[5-6]。目前欧盟在饲用氨基酸生产菌种方面的相关法规较为完善,欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)已经公布了微生物菌种安全资格认证(QPS)名单(官网<https://www.efsa.europa.eu/en>),而在中国发布的《可用于食品的菌

种名单》和《饲料添加剂安全使用规范》中明确了饲用氨基酸的生产标准,但暂未公布授权允许生产饲用氨基酸的菌种名单。因此,总结分析现阶段饲用氨基酸生产菌种的构建策略,对完善国内相关法规和行业标准的建立具有重要意义^[3]。

目前,用于饲用氨基酸生产的微生物主要为遗传背景清晰、生长速率快、代谢灵活性高的大肠杆菌(*Escherichia coli*)和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)^[7-8],其中被欧盟授权允许在饲料中使用的L-赖氨酸菌种15株(3株*E. coli*和12株*C. glutamicum*)、L-苏氨酸菌种12株(10株*E. coli*和2株*C. glutamicum*)、L-甲硫氨酸菌种2株(1株*E. coli*和1株*C. glutamicum*)和L-异亮氨酸菌种4株(1株*E. coli*和3株*C. glutamicum*) (表1)。为实现饲用氨基酸的高效生产,一系列代谢工程策略已被成功应用于饲用氨基酸细胞工厂的构建与优化,主要包括:①基于途径工程的重构代谢路径,通过优化关键酶的表达和调控以增强目标氨基酸的合成通量^[9-10];②基于辅因子工程

表1 欧盟授权允许可在饲料中使用的天冬氨酸族氨基酸生产菌种

Table 1 EU-authorized microbial strains for production of aspartate-family amino acids approved as feed additives

产品	菌种	
液体L-赖氨酸碱	大肠杆菌KCCM 80190	大肠杆菌NITE BP-02917
	谷氨酸棒状杆菌KCCM 80216	谷氨酸棒状杆菌KCTC 12307BP
	谷氨酸棒状杆菌NRRL-B-67439	谷氨酸棒状杆菌NRRL-B-67535
液体L-赖氨酸单盐酸盐	大肠杆菌NITE BP-02917	
技术纯L-赖氨酸单盐酸盐	大肠杆菌NITE BP-02917	谷氨酸棒状杆菌NRRL-B-67439
	谷氨酸棒状杆菌DSM 32932	谷氨酸棒状杆菌CGMCC 7.266
	谷氨酸棒状杆菌KCCM 80183	谷氨酸棒状杆菌CGMCC 17927
	谷氨酸棒状杆菌NRRL B-67535	谷氨酸棒状杆菌CCTCC M 2015595
L-赖氨酸硫酸盐	大肠杆菌CGMCC 7.398	谷氨酸棒状杆菌CGMCC 7.266
	谷氨酸棒状杆菌KFCC 11043	谷氨酸棒状杆菌CGMCC 17927
	谷氨酸棒状杆菌KCCM 80227	谷氨酸棒状杆菌CCTCC M 2015595
L-苏氨酸	大肠杆菌DSM 25085	大肠杆菌FERM BP-11383
	大肠杆菌DSM 25086	大肠杆菌FERM BP-10942
	大肠杆菌CGMCC 3703	大肠杆菌NRRL B-30843
	大肠杆菌CGMCC 7.58	大肠杆菌KCCM 11133P
	大肠杆菌CGMCC 7.232	谷氨酸棒状杆菌KCCM 80117
	大肠杆菌CGMCC 13325	谷氨酸棒状杆菌KCCM 80118
L-甲硫氨酸	大肠杆菌KCCM 80245	
L-异亮氨酸	大肠杆菌FERM ABP-1064	谷氨酸棒状杆菌KCCM 80189
	谷氨酸棒状杆菌KCCM 80185	谷氨酸棒状杆菌CGMCC 20437

注:信息来源于欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)官网(<https://www.efsa.europa.eu/en>)公布的微生物菌种安全资格认证(QPS)名单。

的辅因子供应强化, 通过平衡细胞内辅因子水平以提高代谢效率^[11-12]; ③基于转运体工程的物质运输能力改善等^[2]。本文系统综述了以 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 为底盘微生物, 创制L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和L-异亮氨酸四种天冬氨酸族饲用氨基酸高产菌株的关键技术与代谢工程策略, 此外, 展望了未来氨基酸高产菌株的研究方向, 包括人工智能驱动的代谢网络设计、多组学整合分析以及合成生物学工具的进一步开发, 以期为高性能微生物细胞工厂的构建提供理论指导和技术支撑, 推动饲用氨基酸生产的工业化升级。

1 天冬氨酸族氨基酸的生物合成机制

1.1 天冬氨酸族氨基酸的生物合成途径

天冬氨酸族氨基酸的生物合成途径起始于草酰乙酸 (OAA) (图1)。①从OAA开始, L-赖氨酸

合成需要10步反应, L-甲硫氨酸合成需要8步反应, L-苏氨酸合成需要6步反应, 而L-异亮氨酸合成需要11步反应 [图1(a)]。②上述4种氨基酸从OAA节点开始的合成途径, 对辅因子需求各不相同 [图2(a)], 如L-赖氨酸合成需要4分子还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 和1分子三磷酸腺苷 (ATP)、L-甲硫氨酸需要2分子NADPH和2分子ATP、L-苏氨酸需1分子NADPH和2分子ATP、L-异亮氨酸需2分子NADPH和2分子ATP。③天冬氨酸族氨基酸在 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 合成过程中对转运蛋白的需求同样存在显著差异 [图2(b)~(c)], *E. coli* 分泌L-赖氨酸涉及2种内运蛋白 LysP 和 CadB 以及1种外排蛋白 YahN^[13-14], 而在 *C. glutamicum* 中涉及1种内运蛋白 LysP^[15] 和1种外排蛋白 LysE^[16-17]; L-甲硫氨酸在 *E. coli* 中涉及2种内运蛋白 MetD 和 MetP 以及1种外排蛋白 YjeH^[18], 在 *C. glutamicum* 中涉及2种内运蛋白 MetD 和 MetP^[19]、1种外排蛋白 BrnFE^[20]; L-苏氨酸在 *E. coli* 中涉及2种内运蛋白 TdcC 和

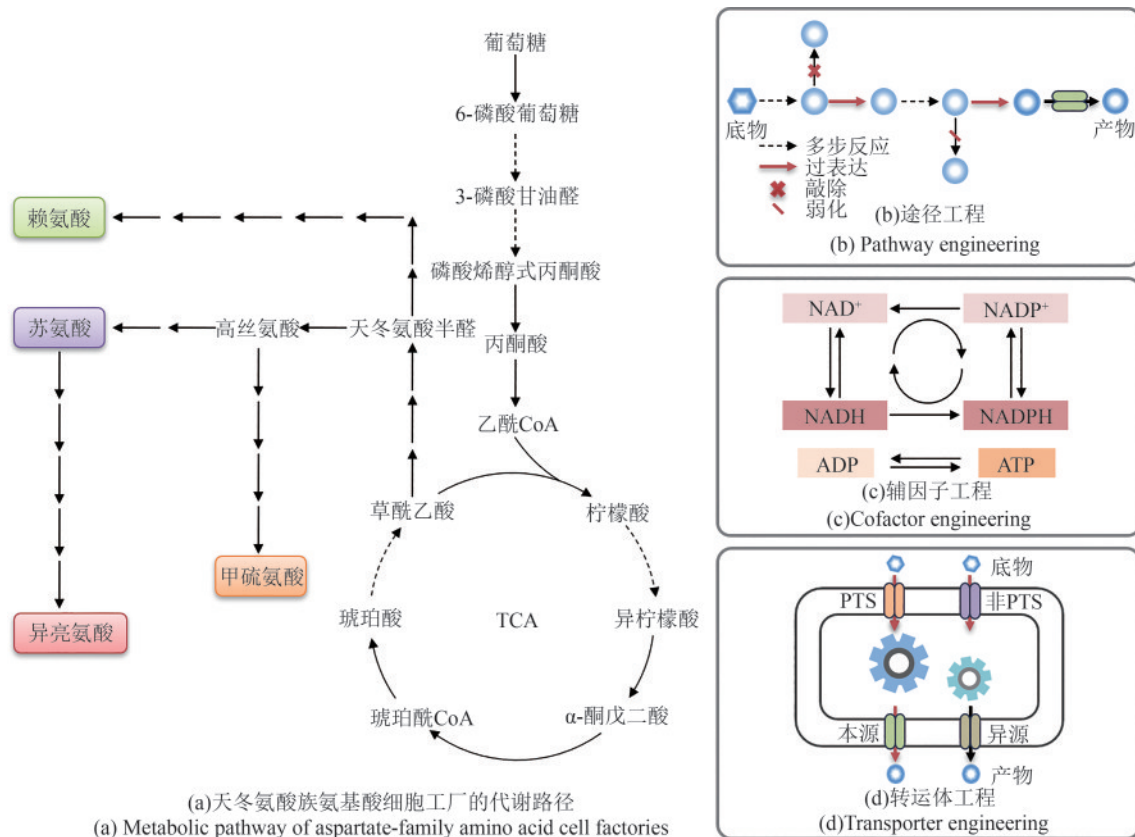


图1 天冬氨酸族氨基酸细胞工厂的代谢路径及其优化策略

Fig. 1 Metabolic pathway and optimization strategy of aspartate-family amino acid cell factories

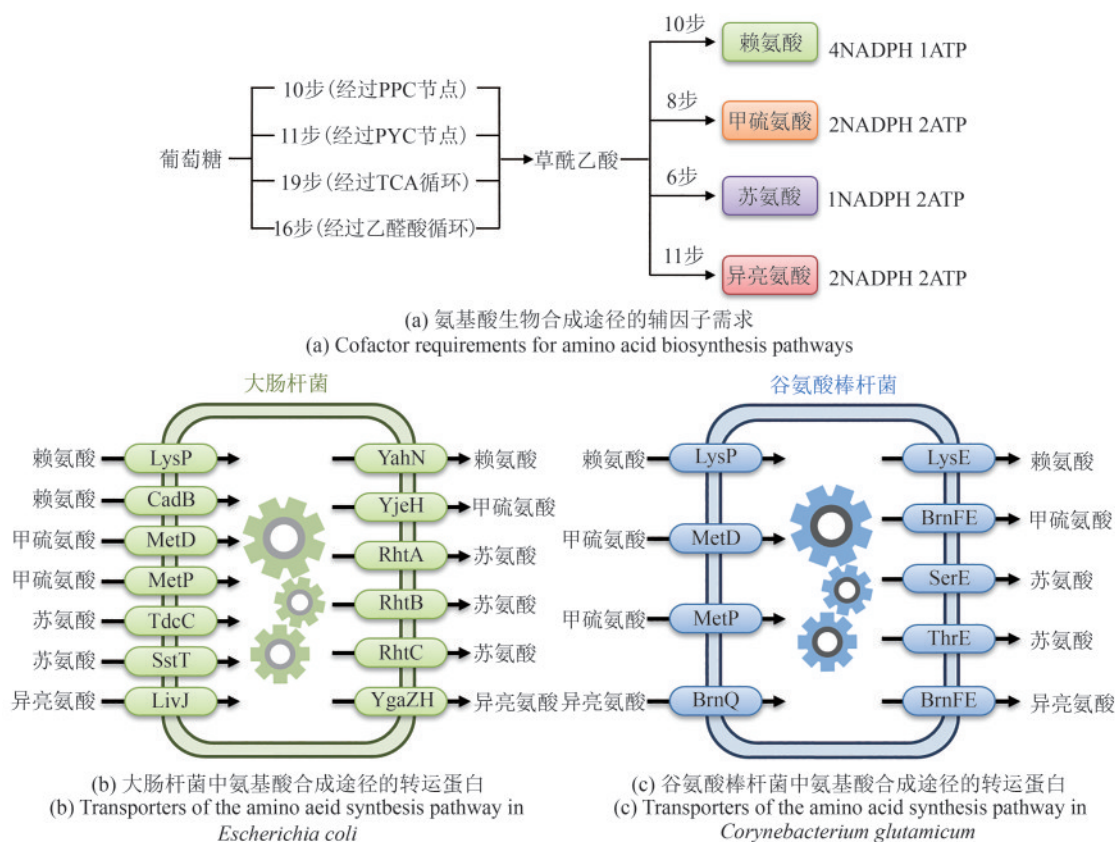


图2 天冬氨酸族氨基酸生物合成的辅因子需求和转运蛋白

Fig. 2 Cofactor requirements and transporters for aspartate amino acid biosynthesis

SstT^[21]、3种外排蛋白RhtA/B/C^[22-23]，在*C. glutamicum*中涉及2种外排蛋白ThrE^[24]、SerE^[25]，尚无内运蛋白的相关报道；L-异亮氨酸在*E. coli*中涉及1种内运蛋白LivJ^[26]、1种外排蛋白YgaZH^[27]，在*C. glutamicum*中涉及1种内运蛋白BrnQ、1种外排蛋白BrnFE^[28]。这些差异不仅反映了不同氨基酸合成途径的复杂性，也为代谢工程改造提供了特异性的关键靶点。

1.2 生物合成关键途径中关键酶的反馈调控

天冬氨酸族氨基酸的生物合成途径存在3种反馈调控机制，包括：①反馈抑制；②反馈阻遏/激活；③弱化作用。

1.2.1 反馈抑制

天冬氨酸激酶（aspartate kinase, AK）、苏氨酸脱水酶（threonine dehydrase, TD）和乙酰乳酸合酶（acetolactate synthase, AHAS）是天冬氨酸族氨基酸合成途径中的关键酶，三者均受代谢终

产物的反馈抑制 [图3(a)]。AK负责调控代谢流在L-赖氨酸、L-甲硫氨酸和L-苏氨酸之间的分配，在天冬氨酸族氨基酸的代谢调控中发挥核心作用^[29]。*E. coli*的AK存在3种同工酶，分别为AK-HSDH I（由*thrA*基因编码）、AK II（由*metL*基因编码）和AK III（由*lysC*基因编码），其中AK-HSDH I受L-苏氨酸的反馈抑制，AK III受L-赖氨酸的反馈抑制^[30]；*C. glutamicum*中仅存在1种AK（由*lysC*基因编码），该酶受L-赖氨酸和L-苏氨酸的协同反馈抑制。TD负责催化L-苏氨酸脱氨生成 α -酮基丁酸（ α -KB），*E. coli*的TD（由*ilvA*基因编码）受L-异亮氨酸的反馈抑制^[31]；*C. glutamicum*中TD拥有2种同工酶TD I（由*ilvA*基因编码）和TD II（由*tdcB*基因编码），只有TD I受L-异亮氨酸的反馈抑制^[32]。AHAS负责催化 α -KB和丙酮酸（PYR）形成乙酰羟酸，*E. coli*的AHAS分为3种同工酶，分别为AHAS I（由*ilvBN*基因编码）、AHAS II（由*ilvGM*基因编码）和AHAS III（由*ilvIH*基因编码），其中AHAS I和AHAS III均受

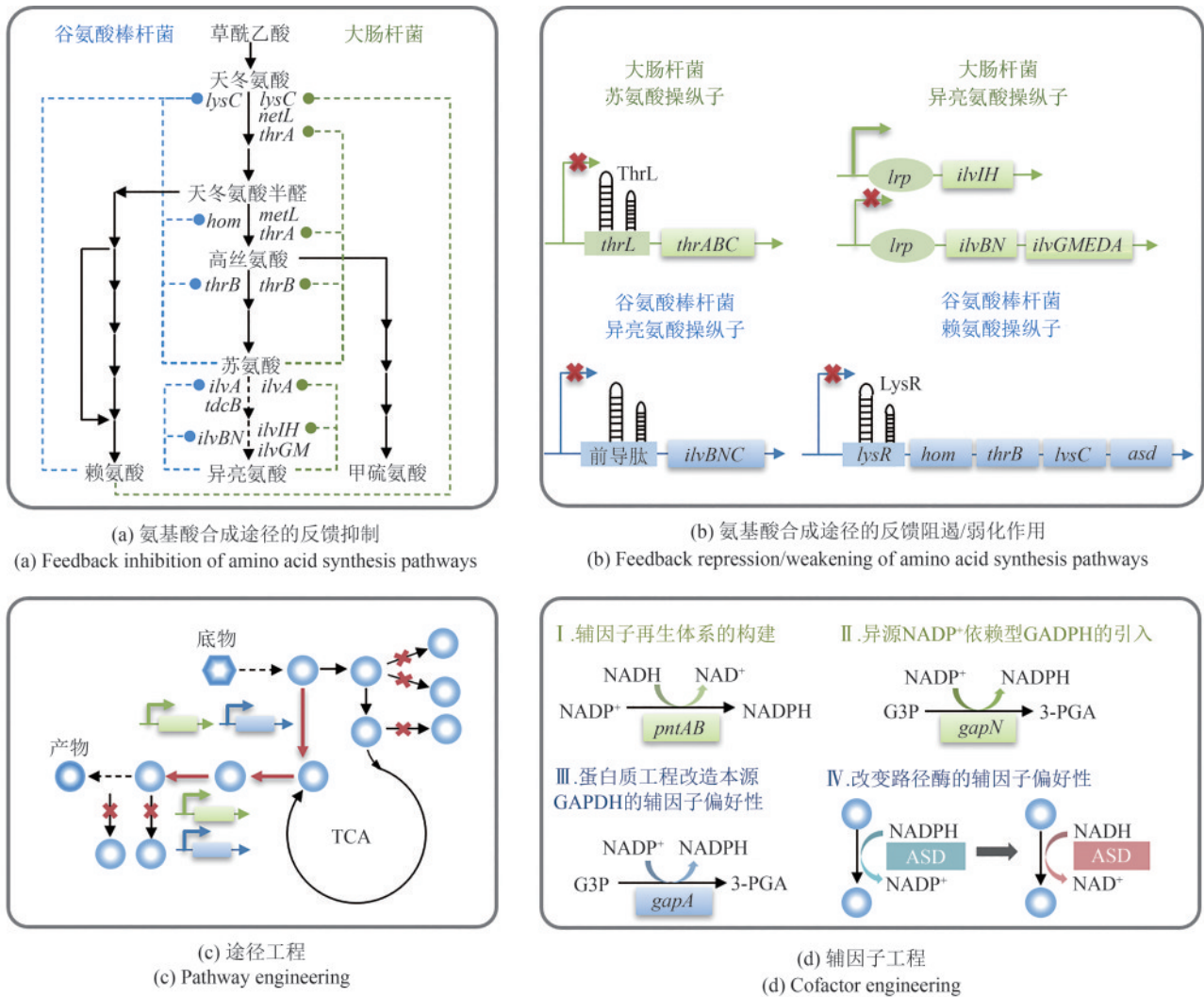


图3 天冬氨酸族氨基酸的反馈调控机制及代谢路径优化策略

(*thrA*—编码天冬氨酸激酶 I; *metL*—编码天冬氨酸激酶 II; *lysC*—编码天冬氨酸激酶 III; *hom*—编码高丝氨酸脱氢酶; *thrB*—编码高丝氨酸激酶; *ilvA*—编码苏氨酸脱水酶 I; *tdcB*—编码苏氨酸脱水酶 II; *ilvBN*—编码乙酰乳酸合酶 I; *ilvGM*—编码乙酰乳酸合酶 II; *ilvIH*—编码乙酰乳酸合酶 III; *asd*—编码天冬氨酸半醛脱氢酶; *pntAB*—编码 NAD(P) 转氢酶亚基; *gapN/gapA*—编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶; *lrp*—编码转录调控因子 Lrp; G3P—3-磷酸甘油醛; 3-PGA—3-磷酸甘油酸; ASD—天冬氨酸半醛脱氢酶)

Fig. 3 Feedback regulation mechanism and metabolic pathway optimization strategy of aspartate-family amino acids

(*thrA*—Encoding aspartate kinase I; *metL*—Encoding aspartate kinase II; *lysC*—Encoding aspartate kinase III; *hom*—Encoding homoserine dehydrogenase; *thrB*—Encoding homoserine kinase; *thrB*—Encoding homoserine kinase; *ilvA*—Encoding threonine dehydrase I; *tdcB*—Encoding threonine dehydrase II; *ilvBN*—Encoding acetolactate synthase I; *ilvGM*—Encoding acetolactate synthase II; *ilvIH*—Encoding acetolactate synthase III; *asd*—Encoding aspartate semialdehyde dehydrogenase; *pntAB*—Encoding subunits of NAD(P) transhydrogenase; *gapN/gapA*—Encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *lrp*—Encoding transcriptional regulatory factor Lrp; G3P—Glyceraldehyde 3-phosphate; 3-PGA—3-Phosphoglyceric acid; ASD—Aspartate semialdehyde dehydrogenase)

L-异亮氨酸的反馈抑制^[33-34]; *C. glutamicum* 的 AHAS (由 *ilvBN* 基因编码) 同样受 L-异亮氨酸的反馈抑制^[35]。

1.2.2 反馈阻遏/激活

在 *C. glutamicum* 中, *hom-thrB* 和 *lysC-asd* 基因簇受到转录调控因子 LysR (由 *lysR* 基因编码) 的

反馈阻遏^[36-37]; 在 *E. coli* 中, *metL* 基因受到转录调控因子 MetJ (由 *metJ* 基因编码) 的反馈阻遏^[38-39], 而 *ilvGMEDA* 操纵子和 *ilvBN* 操纵子受到转录调控因子 Lrp (由 *lrp* 基因编码) 的反馈阻遏 [图3(b)]^[40]。值得注意的是, *E. coli* 的 *ilvIH* 操纵子受到 Lrp 的反馈激活^[41]。

1.2.3 弱化作用

E. coli 的 *thrABC* 操纵子受到前导肽 ThrL (由 *thrL* 基因编码) 的转录弱化调控^[21], *C. glutamicum* 的 *ilvGMEDA* 操纵子和 *ilvBN* 操纵子同样受到转录弱化调控^[42]。

2 基于途径工程重构代谢路径

微生物自身存在的代谢瓶颈使菌株的天然代谢路径难以满足高效工业化生产的需要, 导致目标产物产量低、副产物积累或前体供应不足, 通过定向改造关键酶活性、优化代谢通量分配和引入异源合成模块, 从而平衡代谢负担与细胞生长, 实现从代谢机理到工业生产的闭环优化^[43-45]。基于途径工程重构微生物细胞的代谢路径是构建细胞工厂的首要步骤, 主要包括反馈调节机制的解除以及细胞代谢网络的重构 [图3(a)~(c)]。

2.1 解除反馈调节机制

反馈抑制、反馈阻遏以及弱化作用是微生物的3种反馈调节机制。基于随机诱变/蛋白质工程定向改造是解除关键路径酶反馈抑制的常用方法。目前针对抗反馈抑制关键路径的研究已经趋于成

熟, 将突变体作为酶元件已应用于不同饲用氨基酸细胞工厂的构建 (表2)。

①AK作为天冬氨酸族氨基酸合成过程中的关键路径酶, 解除该酶的反馈抑制已被证明可有效提高L-赖氨酸和L-苏氨酸的产量。已报道的AK突变体包括: *E. coli* 来源的 *lysC*^{T344M}^[46]、*lysC*^{T352I}^[22]、*thrA*^{S345F}^[48] 和 *thrA*^{G433R}^[49]; *C. glutamicum* 来源的 *lysC*^{T311I}^[47] 和 *lysC*^{S301F}^[24]。

②AHAS和TD作为L-异亮氨酸合成过程中的关键路径酶, 解除二者的反馈抑制已被证明可有效提高L-异亮氨酸的产量^[52]。已报道的AHAS突变体包括: *E. coli* 来源的 *ilvH*^{G14D, S17F}^[50]、*ilvN*^{H47L}^[28] 和 *ilvB*^{K30Q, N156D, V233I}^[28]; *C. glutamicum* 来源的 *ilvB*^{P176S, D426E, L575W}^[35] 和 *ilvB*^{I47Y}^[51]。已报道的TD突变体包括: *E. coli* 来源的 *ilvA*^{S97F}^[50]; *C. glutamicum* 来源的 *ilvA*^{G96D}^[24]。

通过敲除阻遏蛋白或前导肽编码基因, 可以解除或弱化转录水平的反馈阻遏作用。通过敲除 *E. coli* 的 *thrL* 基因^[21-22]、*metJ* 基因^[18, 38] 或者 *C. glutamicum* 的 *lysR* 基因可解除天冬氨酸族氨基酸合成过程中受到的反馈阻遏或弱化作用, 从而提高L-苏氨酸、L-甲硫氨酸和L-赖氨酸的产量 (表2)。如以 *E. coli* MG1655 为出发菌株, 通过敲除 *thrL* 基因, 成功解除了L-苏氨酸合成过程中受到的弱化作用, 使L-苏氨酸摇瓶发酵产量达到1.63 g/L^[21]。

表2 解除反馈调节机制的策略

Table 2 Strategies for relieving feedback regulation mechanisms

酶/前导肽/阻遏蛋白	基因	菌株	策略	效果	参考文献	
AK	<i>lysC</i>	<i>E. coli</i>	T344M	L-赖氨酸产量 6.3 g/L	[46]	
			T352I	L-苏氨酸产量 14.4 g/L, 提升 30.9%	[22]	
			T311I	L-苏氨酸产量 0.27 g/L	[47]	
	<i>thrA</i>	<i>E. coli</i>	S301F	L-苏氨酸产量 14.17 g/L, 提升 4.2%	[24]	
			S345F	L-苏氨酸产量 82.4 mmol/L	[48]	
			G433R	L-苏氨酸产量 36.61 mg/L	[49]	
AHAS	<i>ilvH</i>	<i>E. coli</i>	G14D, S17F	L-异亮氨酸产量 0.322 g/L	[50]	
			<i>ilvN</i>	<i>E. coli</i>	H47L	L-异亮氨酸产量 5.1 g/L, 提升 59.4%
	<i>ilvB</i>	<i>E. coli</i>	K30Q, N156D, V233I	L-异亮氨酸产量 5.1 g/L, 提升 59.4%	[28]	
			<i>C. glutamicum</i>	P176S, D426E, L575W	L-异亮氨酸产量 4.17 g/L, 提升 61.0%	[35]
				I47Y	L-异亮氨酸产量 22.7 g/L, 提升 10.2%	[51]
TD	<i>ilvA</i>	<i>E. coli</i>	S97F	L-异亮氨酸产量 0.322 g/L	[50]	
		<i>C. glutamicum</i>	G96D	L-异亮氨酸产量 12 g/L	[24]	
ThrL	<i>thrL</i>	<i>E. coli</i>	敲除 <i>thrL</i> 基因	L-苏氨酸产量 1.63 g/L	[21]	
MetJ	<i>metJ</i>	<i>E. coli</i>	敲除 <i>metJ</i> 基因	L-甲硫氨酸产量提升 11%	[38]	

类似地，在L-甲硫氨酸生产菌株中敲除 *metJ* 基因，构建 *E. coli* $\Delta metABJ$ 菌株，使L-甲硫氨酸在胞内和胞外积累量分别增加11%和95%^[38]。

2.2 重构细胞代谢网络

竞争/降解路径的阻断/弱化、主合成代谢路径的重构以及关键代谢节点前体供应的强化是细胞代谢网络重构的3种主要策略。竞争/降解路径的阻断/弱化有助于减少副产物积累，并将更多的代谢流导向产物合成^[22]（表3）。

在天冬氨酸族氨基酸中，L-苏氨酸、L-甲硫氨酸和L-赖氨酸的合成具有竞争关系^[53]。L-苏氨酸的合成同时受到L-异亮氨酸以及甘氨酸降解路径的影响，而简单的基因敲除会造成营养缺陷型菌株的出现，影响细胞生长，因此有效调控主合成代谢路径以及竞争/降解路径的代谢流分布对于产物合成至关重要。如为了提高L-苏氨酸产量，通过敲除 *lysA*（编码二氨基庚二酸脱氢酶 DAPDC）、

metA（编码高丝氨酸琥珀酰基转移酶 HST）和 *tdh*（编码苏氨酸脱氢酶 TDH）基因以及引入 *ilvA*^{S97F} 基因阻断了L-赖氨酸、L-甲硫氨酸和甘氨酸的合成路径，并弱化了L-异亮氨酸的合成路径，从而成功构建了 *E. coli* TH07 菌株，经48 h发酵L-苏氨酸的产量达到10.1 g/L^[22]。为了提高 *C. glutamicum* 生产L-苏氨酸的效能，通过引入对L-赖氨酸敏感的肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）来源的 *dapA* 基因（编码二氢吡啶二羧酸合成酶 DHDPS），强化L-赖氨酸对DHDPS的反馈调控，发酵液中没有L-赖氨酸积累，同时引入对L-异亮氨酸敏感的 *E. coli* 来源的 *ilvA* 基因，强化了L-异亮氨酸对TD的反馈调控，在将副产物L-异亮氨酸积累量降低到0.03 g/L的同时，使L-苏氨酸产量提高了1.08倍^[47]。

针对主合成代谢路径的重构，路径关键基因的强化表达以及抗反馈抑制突变体的引入是常用的两种方法（表4）。

路径关键基因的强化表达通过优化启动子强

表3 阻断竞争路径和弱化降解路径的策略

Table 3 Strategies for blocking competing pathways and attenuating degradation pathways

产品	竞争/降解路径	菌株	策略	参考文献
L-苏氨酸	L-赖氨酸、L-甲硫氨酸	<i>E. coli</i>	敲除 <i>lysA</i> 和 <i>metA</i> 基因	[49]
	L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-甘氨酸	<i>E. coli</i>	敲除 <i>lysA</i> 、 <i>metA</i> 和 <i>tdh</i> 基因，引入 <i>ilvA</i> ^{S97F} 基因	[22]
	L-赖氨酸、L-异亮氨酸	<i>C. glutamicum</i>	异源表达 <i>Streptococcus pneumoniae</i> 来源的 <i>dapA</i> 基因和 <i>E. coli</i> 来源的 <i>ilvA</i> 基因	[47]
L-赖氨酸、L-异亮氨酸、L-丙氨酸	<i>C. glutamicum</i>	引入 <i>ilvA</i> ^{G96D} 和 <i>dapA</i> ^{K68H} 基因，敲除 <i>alaT</i> 和 <i>avtA</i> 基因	[24]	

表4 重构主合成代谢路径的策略

Table 4 Strategies for reconstructing primary anabolic pathways

产品	菌株	策略	参考文献
L-苏氨酸	<i>E. coli</i>	过表达 <i>thrB</i> 、 <i>thrC</i> 和编码抗反馈抑制突变体的 <i>thrA</i> ^{S345F} 基因	[22]
		P_{cysJ} 启动子动态调控 <i>asd</i> 和 <i>thrABC</i> 基因的表达量	[54]
L-甲硫氨酸	<i>C. glutamicum</i>	过表达 <i>asd</i> 、 <i>thrB</i> 以及编码抗反馈抑制突变体的 <i>lysC</i> ^{T3111} 和 <i>hom</i> ^{G378E} 基因	[49]
	<i>E. coli</i>	过表达 <i>metC</i> 和编码抗反馈抑制突变体的 <i>metA</i> ^{R27C,I296S,P298L} 基因	[18]
L-赖氨酸	<i>C. glutamicum</i>	过表达 <i>lysC</i> 、 <i>asd</i> 、 <i>hom</i> 、 <i>metH</i> 、 <i>aecD</i> 和 <i>metYX</i> 基因	[20]
	<i>E. coli</i>	过表达 <i>lysC</i> 和 <i>lysA</i> 基因	[55]
L-异亮氨酸	<i>C. glutamicum</i>	过表达 <i>lysC</i> 、 <i>asd</i> 、 <i>dapA</i> 、 <i>dapB</i> 、 <i>ddh</i> 和 <i>lysA</i> 基因	[16]
	<i>E. coli</i>	过表达编码抗反馈抑制突变体的 <i>ilvA</i> ^{P363L} 、 <i>ilvN</i> ^{K30Q,N156D,V233I} 、 <i>metA</i> ^{G189C} 和 <i>metB</i> ^{Q5R,L29H,G69D,F87I,E136G,N148Y,K273G,A346T} 基因	[28]
<i>C. glutamicum</i>	过表达编码抗反馈抑制突变体的 <i>ilvA</i> ^{F383V} 和 <i>ilvB</i> ^{P176S,D426EE,L575W} 基因	[35]	

度、增加基因拷贝数或应用核糖体结合位点 (RBS) 工程^[56], 可以显著提升限速酶的表达水平。抗反馈抑制突变体的引入则聚焦于解除终产物对代谢路径的负反馈抑制, 通过理性设计或定向进化技术对关键酶结构域进行突变, 使其在终产物高浓度环境下仍保持活性。如在大肠杆菌生产 L-苏氨酸中, 通过在中拷贝数质粒上表达 *asd* 和 *thrABC* 基因, 使 L-苏氨酸产量提高了 34%, 然而随着基因表达量增加, 菌株代谢负担过重, 因此利用稳定期激活型启动子 $P_{2.1}$ 和 L-苏氨酸响应启动子 P_{cysD} 、 P_{cysJ} 和 P_{cysHI} 动态调控 *asd* 和 *thrABC* 基因的表达量, L-苏氨酸产量进一步提高到 21.78 g/L, 同时发酵周期缩短至 24 h^[54]。在 *C. glutamicum* 生产 L-赖氨酸过程中, 过表达 *lysC*、*asd*、*dapA*、*dapB*、*ddh* 和 *lysA* 基因强化 L-赖氨酸合成路径, 使 L-赖氨酸产量提高到 55.6 g/L^[16]。

重构细胞代谢网络的第三种策略是关键代谢节点前体供应的强化, 通过调控氨基酸生物合成过程中关键代谢节点的代谢流可以有效增加前体供应, 优化中央代谢网络与分支途径的流量分配, 促进产物合成^[12] (表 5)。

OAA 是天冬氨酸族氨基酸合成途径的共同前体, 该代谢节点涉及糖酵解途径、TCA 循环和草酰乙酸回补途径。为了强化 OAA 的有效供应, 动态调控系统 (如启动子工程) 可优化 OAA 代谢流分配^[58]。如通过过表达 *ppc* 基因以及引入根瘤菌 (*Rhizobium etli*) 来源的 *pyc* 基因, 增加了 PYR 到 OAA 的代谢通量, 同时利用 P_{pic} 启动子动态调控

gltA 基因, 使进入 TCA 循环的碳流重新分配, 使 L-苏氨酸产量提高 2.1%, 达到 49.45 g/L^[48]。在 L-异亮氨酸生产菌种中, 通过敲除 *ptsG*、*pykF* 和 *iclR* 基因, 过表达 *ppc* 基因, 以及引入詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*) 来源的 *cimA*^[47V, E114V, H126Q, T204A, L238S, V373STOP] 基因, 强化了前体 PEP 到 OAA 的供应, 使 L-异亮氨酸产量提高 20%, 达到 5.42 g/L^[27]。

综上所述, 静态调控和动态调控是细胞代谢网络重构的两种有效手段。对比两种调控方式的优缺点可以发现: 静态调控方式具有基因操作便捷、遗传改造周期短、应用效果显著以及设计简单等特点, 在合成生物学领域被广泛应用。目前, 其具体的调控手段主要包括: ①基因敲入和敲除^[59-60]; ②基于启动子工程和 RBS 工程调控^[61-62]; ③中性位点的筛选和拷贝数优化^[63]; ④蛋白质、RNA 和 DNA 支架的引入^[64-65]; ⑤代谢流平衡分析^[66]。虽然通过上述调控手段可使改造后的菌株表现出更高水平的产物积累能力, 但是静态改造方式具有定向性和不可逆性, 会造成细胞生长抑制、代谢稳健性下降、细胞内稳态失衡等问题。相比于静态调控方式, 动态调控是一种以特定信号响应为基础的适应性调控方式, 可感知细胞状态并进行实时代谢调控^[67], 并根据信号的改变达到产物合成或目标系统的最优化状态^[68]。该方式中的特定信号包括 2 种: ①内源性信号, 包括路径中间代谢物、代谢产物、辅因子等; ②外源性信号, 包括引入诱导剂、抗生素、营养物质等。通

表 5 强化关键代谢节点前体供应的策略

Table 5 Strategies for enhancing precursor supply at key metabolic nodes

前体	产品	菌株	策略	参考文献
草酰乙酸	L-赖氨酸	<i>C. glutamicum</i>	过表达 <i>ppc</i> 和 <i>pyc</i> 基因, 敲除 <i>pck</i> 基因	[16]
	L-苏氨酸	<i>E. coli</i>	过表达 <i>ppc</i> 基因, 异源表达 <i>Rhizobium etli</i> 来源的 <i>pyc</i> 基因, 利用 P_{pic} 启动子动态调控 <i>gltA</i> 基因	[48]
		<i>C. glutamicum</i>	过表达 <i>ppc</i> 和 <i>acs</i> 基因, 敲除 <i>iclR</i> 基因	[22]
		<i>C. glutamicum</i>	过表达 <i>ppc</i> 、 <i>pyc</i> 和 <i>aspB</i> 基因, 异源表达 <i>E. coli</i> 来源的 <i>aspA</i> 基因	[24]
	L-甲硫氨酸	<i>E. coli</i>	敲除 <i>pykA</i> 和 <i>pykF</i> 基因	[18]
			过表达 <i>sucA</i> 基因, 敲除 <i>sucD</i> 基因	[57]
		<i>C. glutamicum</i>	过表达 <i>pyc</i> ^{P458S} 基因, 敲除 <i>pyk2</i> 基因	[20]
	L-异亮氨酸	<i>E. coli</i>	敲除 <i>ptsG</i> 、 <i>pykF</i> 和 <i>iclR</i> 基因, 过表达 <i>ppc</i> 基因, 异源表达 <i>Methanococcus jannaschii</i> 来源的 <i>cimA</i> ^[47V, E114V, H126Q, T204A, L238S, V373STOP] 基因	[27]
			敲除 <i>aceA</i> 和 <i>sucCD</i> 基因, 过表达 <i>metA</i> 和 <i>metB</i> 基因	[28]
		<i>C. glutamicum</i>	敲除 <i>alaT</i> 和 <i>alr</i> 基因	[52]

通过对特定基因引入实时响应代谢信号, 可实现对代谢路径进行及时的反馈调节, 以便适应宿主内部代谢或环境的变化^[69-71], 实现产物的稳定合成。值得注意的是, 尽管动态调控是代谢工程领域的一个重要技术方向, 但是其在构建可工业化应用的细胞工厂中仍存在很多挑战, 主要包括: ①信号失真与衰减; ②响应延迟。在工业放大过程中, 从传感器到执行器的信号传递路径变长, 可能导致信号失真或衰减^[72]。例如, 基于代谢物响应的动态调控系统, 当细胞密度增加时, 代谢物信号的扩散和传递可能受到阻碍, 使得传感器接收到的信号强度减弱或变形, 从而无法准确反映实际的代谢状态, 导致调控系统的响应不准确, 影响稳定性^[73]。同时大型工业反应器中, 物质和能量的传递存在时间滞后, 这会使动态调控系统的响应速度变慢。比如在温度调控系统中, 加热或冷却介质与反应物料之间的热传递需要一定时间, 当系统检测到温度变化并发出调控信号后, 反应物料的实际温度变化跟不上调控信号的变化, 造成响应延迟, 进而影响系统的稳定性^[74]。为了实现工业放大过程中基因的表达水平的有效调控, 可采用动静结合的方式, 即先通过基因表达调谐来确定合适的表达强度, 然后再通过动态调控方式激活基因表达^[75]。以一项代表性研究为例, 通过构建感应细胞密度的生物传感器调控葡萄糖-6磷酸节点的代谢流, 实现了在低细胞密度的条件下调控代谢流用于细胞生长, 而在高细胞密度下, 调控代谢流用于肌醇和葡萄糖二酸的生产^[76]。

3 基于辅因子工程强化辅因子供应

氨基酸在高效合成时, 胞内辅因子再生速率往往难以匹配合成途径及胁迫响应的能量需求, 易引发代谢流再平衡障碍, 最终造成目标产物转化效率下降和副产物积累加剧^[77]。基于辅因子工程强化细胞辅因子供应有助于维持细胞内氧化还原平衡, 从而改善饲用氨基酸细胞工厂的发酵性能, 主要包括辅因子供应的强化和辅因子偏好性的改变 [图3(d)]。

3.1 辅因子供应的强化

NADPH和ATP在代谢途径中起到电子传递和能量供应的作用, 它们的平衡与否直接影响到目标产物的产量, 通过对辅因子供需平衡进行合理设计与优化有助于构建高效的氨基酸细胞工厂^[78] [图1(c)]。针对还原性辅因子NADPH的供应, 调整辅因子的合成与转换是目前较为成熟的改造方法 (表6)。

*E. coli*和*C. glutamicum*有5个涉及NADPH合成的关键酶, 包括氧化磷酸化途径的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (由*zwf*基因编码) 和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (由*gnd*基因编码)、TCA循环中的苹果酸酶 (由*maeB*基因编码) 和异柠檬酸脱氢酶 (由*icd*基因编码) 以及膜结合的质子转移酶 (由*pntAB*基因编码)^[79]。在*E. coli*中, 为了满足辅因子NADPH的供应, 通常对*pntAB*基因进行过表达^[21, 81]。在*C. glutamicum*中, 除了强化表达相关基因, 常采用引入NADP⁺依赖型酶和动态调控基因表达的方法

表6 辅因子工程

Table 6 Cofactor engineering

辅因子	菌株	产品	策略	参考文献
NADPH	<i>E. coli</i>	L-苏氨酸	过表达 <i>pntAB</i> 基因, 异源表达 <i>Tistrella mobilis</i> 来源的 <i>asd</i> 基因	[21]
		L-异亮氨酸	过表达 <i>aspA</i> 、 <i>bcd</i> 和 <i>pntAB</i> 基因	[28]
	<i>C. glutamicum</i>	L-赖氨酸	过表达 <i>pntAB</i> 和 <i>zwf</i> 基因, P _{lysE} 启动子动态调控 <i>gapN</i> 基因	[16]
		L-甲硫氨酸	过表达 <i>zwf</i> ^{thr} 和 <i>gnd</i> ^{thr} 基因, 异源表达 <i>Clostridium acetobutylicum</i> 来源的 <i>gapC</i> 基因	[79]
ATP	<i>E. coli</i>	L-苏氨酸	异源表达 <i>Tistrella mobilis</i> 来源的 <i>asd</i> 基因和 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 来源的 <i>adh</i> 基因, 敲除 <i>amn</i> 基因, 异源表达 <i>Mannheimia succiniciproducens</i> 来源的 <i>pckA</i> 基因和 <i>Vitreoscilla</i> 来源的 血红蛋白突变体编码基因 <i>vgb</i> ^{H36R, Q66R}	[48]
		<i>C. glutamicum</i>	L-赖氨酸	过表达 <i>pgk</i> 和 <i>pyk</i> 基因, 敲除 <i>amn</i> 基因 异源表达 <i>M. maripaludis</i> 来源的 <i>glk/pfk</i> 基因, 过表达 <i>ndh</i> 基因, 敲除 <i>sigH</i> 基因

法。如在 *C. glutamicum* LYS-1 中过表达 *pntAB* 和 *zwf* 基因，强化 NADPH 供应；在此基础上引入 NADP⁺ 依赖的甘油醛-3-磷酸脱氢酶（由 *gapN* 基因编码）替代 NAD⁺ 依赖型的甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH，同时利用 P_{lysE}-28 启动子动态调控 *gapN* 基因，实现了 NADPH 动态调控，使 L-赖氨酸产量达到 80.9 g/L^[16]。类似地，在 *C. glutamicum* L-甲硫氨酸生产菌株中，通过定点诱变，引入突变基因 *zwf* (G727A) 和 *gnd* (T1083C)，强化了辅因子 NADPH 的供应，在此基础上引入丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 来源的 NADP⁺ 依赖型 GAPDH（由 *gapC* 基因编码），NADPH 生成量提高了 78%，L-甲硫氨酸产量提高了 1.28 倍^[82]。

针对能量辅因子 ATP 供应受限的问题，通常采用的策略是强化 ATP 供应或减少 ATP 的无效消耗（表 6）。如在 *C. glutamicum* 中引入海沼甲烷球菌 (*Methanococcus maripaludis*) 来源的双功能 ADP 依赖型葡萄糖激酶（由 *glk* 和 *pfk* 基因编码），减少 ATP 的损耗，在此基础上过表达编码 NADH 脱氢酶的 *ndh* 基因，使胞内 NADH/NAD⁺ 比例降低至 0.11，同时敲除 *sigH* 基因，解除了转录因子 SigmaH 对 ATP 的抑制，强化了 ATP 的合成，使 L-赖氨酸产量达到 221.3 g/L^[80]。VHb 作为一种可溶性血红蛋白，具有独特的氧结合特性：在低溶氧条件下，VHb 能够与氧气分子特异性结合，形成氧合血红蛋白复合物，显著提高胞内溶解氧浓度。这种氧传递机制的增强不仅改善了细胞呼吸链的电子传递效率，还促进了氧化磷酸化过程，使每个葡萄糖分子能够产生更多的 ATP 分子^[83]。如在 *E. coli* THRH 中引入运动替斯崔纳菌 (*Tistrella mobilis*) 来源的 *asd* 基因和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 来源的 *adh* 基因（编码天冬氨酸脱氢酶 ASPDH），使二者转变为 NADH 依赖型辅酶，在此基础上敲除 *amn* 基因（编码 AMP 核苷酸酶），引入曼氏产琥珀酸菌 (*Mannheimia succiniciproducens*) 来源的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（由 *pckA* 基因编码），强化 ATP 的供应，同时引入透明颤菌 (*Vitreoscilla*) 来源的血红蛋白突变体（由 *vgb*^{H36R, Q66R} 基因编码），增强了 ATP 合成，使 L-苏氨酸产量达 52.1 g/L^[48]。

3.2 辅因子偏好性的改变

改变路径酶的辅因子偏好性已经成功应用于饲用氨基酸菌株的构建，通过应用这一方法有助于辅因子供需平衡和细胞代谢流的优化，从而提高目标产物的合成^[84-85]。针对路径酶辅因子偏好性的改变，蛋白质工程改造和外源路径酶挖掘是两种常用的策略^[86]。蛋白质工程通过调整酶与辅因子的结合能力，改变酶的辅因子偏好性。如在 *C. glutamicum* 中，通过对甘油醛 3-磷酸脱氢酶 GAPDH（由 *gapA* 基因编码）辅酶结合位点的关键残基进行组合改造，构建了 *gapA*^{D35G, L36R, P192S} 突变体，其对 NADPH 和 NADH 表现出相似的偏好性，使 L-赖氨酸产量提高了 64.8%^[11]。外源路径酶挖掘则通过数据库筛选天然 NADH 依赖型的酶，替换路径中 NADPH 依赖型的酶。如在 *E. coli* 中，通过引入 *Tistrella mobilis* 来源的 *asd* 基因，将 ASD 转变为 NADH 依赖型，使胞内 NADPH/NADP⁺ 提高到 1.1，NADH/NAD⁺ 降低至 0.3，L-苏氨酸产量进一步提高到 21.09 g/L^[21]。

3.3 新型辅因子调控系统的开发

近年来辅因子调控系统在合成生物学领域的重要性日益凸显，通过在微生物细胞工厂的应用实现了多种高价值化合物的生物合成，推动生物制造产业的发展，为代谢工程提供了新的途径和方法^[87-89]。目前针对细胞辅因子的供应已经开发出多种新的调控策略，包括：①非天然辅因子系统的设计与应用^[90]；②光控辅因子再生系统^[91]；③胞内/细胞器内辅因子供应的调控^[92]。非天然辅因子 (nonnatural cofactors or non-canonical cofactors) 具有高度的正交性，能够减少与内源代谢网络干扰，是提高调控代谢网络有效性的新方法^[93]。一个典型的案例是通过途径工程（强化 NMN 合成以及阻断 NMN 降解）和蛋白质工程（改造葡萄糖脱氢酶）将胞内 NMN 含量提高 1000 倍，从而构建了依赖 NMN⁺/NMNH 维持细胞生长以及合成左旋二酮的非天然辅因子系统^[94]。同时，基于光遗传学调控基因表达可实现特定的时空条件下基因表达的精确控制^[95]。例如，一种新型的光遗传学双功能开关 (BOS) 通过调节 *pgi* 和 *zwf* 基因的表达控

制细胞内 NADPH 的水平，从而使 *E. coli* LYD-V5 在摇瓶发酵中 L-缬氨酸的产量提高了 18%，转化率提高了 34% [92]。此外，提升胞内/细胞器内辅因子的代谢水平可为目标产物的合成提供稳定的驱动力 [96]。在一项针对酵母菌的研究中通过途径工程（改造中心代谢以提高 NADPH 供应）、亚细胞定位（构建胞浆 FADH₂ 合成途径以及将线粒体 FADH₂ 引导到胞浆）和构建辅因子再生系统（过表达甲基转移酶提升 SAM 水平）驱动了酚酸化合物的高效合成，咖啡酸和阿魏酸的产量分别达到 5.5 g/L 和 3.8 g/L [97]。

4 基于转运体工程改善细胞的物质运输能力

通过转运体工程的优化，可以显著提升细胞工厂物质运输的效率，进而提高氨基酸的生产效率 [44]。首先，通过优化底物摄取机制，确保细胞获得充足的能量来源；其次，提升细胞外运能力，以便更有效地将产物移出细胞，避免内部积累；最后，通过阻断不必要的产物内转运系统，减少能量消耗 [图 1(d)]。

4.1 底物摄取能力的优化

葡萄糖是微生物发酵中应用最广泛的基础碳源，主要通过两种跨膜转运机制进入细胞：磷酸转移酶系统（PTS）依赖的能量耦联转运和非磷酸转移酶系统依赖的主动转运机制。通过代谢工程

策略改造这两种转运系统，可以提升菌株的碳源利用率 [98]。具体而言，过表达 PTS 依赖系统的转运蛋白编码基因 *ptsG*，或通过启动子工程调节 *galP* 和 *glk* 等非 PTS 依赖系统相关基因的表达水平，能够有效改善菌株的葡萄糖摄取能力（表 7）。

如在 *C. glutamicum* 中敲除编码磷酸葡萄糖异构酶的 *pgi* 基因，增加了磷酸戊糖途径的碳通量，同时过表达编码葡萄糖特异性通透酶 E II 的 *ptsG* 基因，强化了 PTS 依赖的葡萄糖转运系统，使 L-赖氨酸产量提高了 1.23 倍 [99]。类似地，在 L-苏氨酸生产菌种中通过敲除编码葡萄糖特异性通透酶 EIIA 的 *crr* 基因，过表达 *glk* 基因，以及引入运动发酵单胞菌（*Zymomonas mobilis*）来源的 *glf* 基因，强化了非 PTS 依赖的葡萄糖转运系统，使 L-苏氨酸产量提高 5.78%，达到 23.17 g/L [21]。

尽管葡萄糖凭借其代谢通用性占据工业发酵碳源的主导地位，但其生产链竞争农业用地，同时原料成本在发酵成本中占比较高，因此，开发替代性碳源是解决底物利用单一性的必要策略。已报道的替代性碳源包括木糖 [100-101]、阿拉伯糖 [102]、蔗糖、糖蜜 [103]、甘油等 [44]。糖蜜是目前氨基酸工业发酵应用最为广泛的替代碳源，已应用于 L-赖氨酸和 L-苏氨酸两种饲用氨基酸的生产。如在 *C. glutamicum* 中引入丙酮丁醇梭菌（*Clostridium acetobutylicum*）来源的果糖激酶，同时敲除 *ptsG* 和 *ptsF* 基因，过表达肌醇通透酶和葡萄糖激酶，提高菌株对果糖和葡萄糖摄取利用的效率，重组菌株 L-赖氨酸产量达到 209 g/L [82]。而在 *E. coli* 中过表达突变体编码基因 *fur*^{V55E}，提高了转录因子 Fur 的转录水平，调节了 L-苏氨酸合成路

表 7 转运体工程

Table 7 Transporter engineering

产品	菌株	策略	参考文献
L-赖氨酸	<i>C. glutamicum</i>	敲除 <i>pgi</i> 基因, 过表达 <i>ptsG</i> 基因	[99]
		过表达 <i>lysE</i> 基因, 敲除 <i>lysP</i> 基因, 异源表达 <i>E. coli</i> 来源的 <i>ybjE</i> 基因	[16]
L-苏氨酸	<i>E. coli</i>	敲除 <i>crr</i> 、 <i>sstT</i> 和 <i>tdcC</i> 基因, 过表达 <i>glk</i> 、 <i>rhtC</i> 和 <i>rhtA</i> 基因, 异源表达 <i>Zymomonas mobilis</i> 来源的 <i>glf</i> 基因	[21]
	<i>C. glutamicum</i>	过表达 <i>thrE</i> 基因, 异源表达 <i>E. coli</i> 来源的 <i>rhtC</i> 基因	[24]
L-甲硫氨酸	<i>E. coli</i>	过表达 <i>yjeH</i> 基因, 敲除 <i>metD</i> 和 <i>rhtA</i> 基因	[18]
	<i>C. glutamicum</i>	过表达 <i>brnFE</i> 基因, 敲除 <i>metD</i> 基因	[20]
L-异亮氨酸	<i>E. coli</i>	过表达 <i>brnFE</i> 基因, 敲除 <i>brnQ</i> 基因	[28]
		过表达 <i>glk</i> 、 <i>ygaZH</i> 基因, 敲除 <i>ptsG</i> 和 <i>rhtC</i> 基因	[27]
		过表达 <i>ygaZH</i> 基因, 敲除 <i>rhtC</i> 和 <i>livJ</i> 基因	[26]

径的代谢通量,在此基础上,引入质粒pUR400的*scrKYABR*操纵子,成功构建了以蔗糖为唯一碳源的菌株*E. coli* THR-49,使L-苏氨酸产量达到92.5 g/L,同时甘蔗糖蜜的原料成本比葡萄糖降低了48%^[55]。

在实际氨基酸生产中,选择强化PTS或非PTS系统需结合菌种代谢特征、产物合成路径、发酵碳源组成等条件进行分析。

①菌种代谢特征:*C. glutamicum*的PTS系统具有多底物适应性^[104],强化PTS系统可显著提升底物摄取速率(如重组菌株葡萄糖消耗速率提高27.3%^[105]),从而增强糖酵解通量;*E. coli*则需引入非PTS系统实现葡萄糖高速摄取与转运蛋白磷酸化的代谢平衡。

②产物合成路径:依赖PEP进行合成的产物,一般需要敲除PTS系统,同时强化非PTS系统的利用,避免PEP的竞争消耗;依赖NADPH/ATP进行合成的产物,可以通过PTS系统快速供能。

③发酵碳源组成:利用单一碳源葡萄糖进行发酵时,强化PTS系统可以提高底物利用效率^[106];利用混合碳源发酵时,引入非PTS系统可以减少葡萄糖对其他底物的阻遏效应,实现混合碳源的协同利用。

4.2 外运能力的强化以及内运系统的阻断

转运蛋白系统直接影响胞内氨基酸的积累量,过表达或引入异源的氨基酸外排蛋白可以强化产物外运能力,同时敲除氨基酸内运蛋白减少产物在胞内的积累,促进产物合成(表7)。目前针对饲用氨基酸外排蛋白的研究已经趋于成熟,各种外排蛋白已经作为一种通用的表达元件在不同饲用氨基酸细胞工厂的构建过程中得以应用^[107]。如在*C. glutamicum*中过表达本源的*thrE*基因以及引入*E. coli*来源的*rhtC*基因,强化了L-苏氨酸外运能力,使胞内L-苏氨酸含量降低了49.4%,L-苏氨酸产量提高了1.07倍^[24]。类似地,在*E. coli*中过表达*ygaZH*基因以强化L-异亮氨酸的外运能力,在此基础上通过敲除*rhtC*基因,增加了L-异亮氨酸合成前体L-苏氨酸的供应,同时敲除*livJ*基因,阻断了L-异亮氨酸向胞内转运,使L-异亮氨酸产量提高了1.2倍^[26]。

5 总结与展望

中国是饲用氨基酸生产大国,年产量约为4.33 Mt,占全球市场的70.4%,市场规模已达到69.5亿美元。2016—2023年,饲用氨基酸产量的复合年均增长率(CAGR)达到12.1%,高于全球的增长速度。然而,我国饲料资源尤其是蛋白饲料资源面临严重短缺,豆粕对外依存度达到80%以上。针对这一现状,农业农村部发布的《饲用豆粕减量替代三年行动方案》旨在通过补充必需氨基酸确保畜禽正常生产性能,并降低动物饲料中蛋白质水平。在现实和政策因素的双重影响下,开发高性能饲用氨基酸细胞工厂加强饲用氨基酸的有效供给,对减少对外依存和促进养殖业行业发展具有重要的战略意义^[3]。目前,研究人员通过代谢工程和合成生物技术改造大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌构建了多种高效的微生物细胞工厂^[108-109]。在这一过程中,现有代谢工程策略可以总结为3种,包括:①基于途径工程重构代谢路径;②基于辅因子工程强化辅因子供应;③基于转运体工程改善细胞的物质运输能力。这些有效策略的应用推动实现了L-赖氨酸、L-苏氨酸、L-甲硫氨酸和L-异亮氨酸的工业化生产^[110]。

随着饲用氨基酸的产量不断提高,微生物细胞工厂的构建已从途径优化转向生物系统优化。目前,通过优化生物系统进一步提升菌株的发酵性能(生产强度和转化率)仍是亟待解决的关键问题,主要体现在以下三个方面:

(1)工业菌株抗逆性的提升 在规模化发酵过程中,微生物细胞常暴露于多重环境胁迫条件下,包括热胁迫、高渗胁迫以及氧化胁迫。这些胁迫因素会显著抑制细胞生长和代谢活性,因此构建具有高鲁棒性的工业菌株是实现高效发酵的前提条件^[48]。例如,ThrA(天冬氨酸激酶/高丝氨酸脱氢酶,AK/HSDH)第474位甘氨酸突变为天冬氨酸降低了HSDH的活性,促进了天冬氨酸半醛向赖氨酸的转化,并赋予了大肠杆菌对高温胁迫(42.5 °C)的耐受性^[111]。在另一项代表性研究中,中国科学院天津工业生物技术研究所利用生物制造平台BioFoundry(天工一号)和MicroScreen仪确定了谷氨酸棒杆菌ATCC13032中的15个赖氨

酸高渗耐受基因靶点，其中过表达 Cgl0470、Cgl0923、Cgl1010、Cgl1472、Cgl2496、Cgl2610、Cgl2998 和 Cgl3003 使 L-赖氨酸产量提高了 70% 以上，而 Cgl1472 提高幅度最大，达到 137%^[112]。

(2) 底物利用范围的拓展 目前，葡萄糖仍是氨基酸工业发酵的主要碳源，但其使用存在“与人争粮”的问题，且影响发酵成本。因此，开发非粮生物质原料（如木质纤维素水解液、甲醇等）的利用能力，对于降低生产成本和实现可持续发展具有重要意义^[55]。一个代表性的案例是中国科学院分子植物科学卓越创新中心杨晟团队通过进化工程协同代谢工程策略，开发了一株能高效利用秸秆糖的酵母并揭示其高产机制，成功实现了纤维素乙醇的商业化生产^[113]。另一个案例是中国科学院大连化学物理研究所周雍进团队通过适应性进化使多形汉逊酵母中以甲醇为唯一碳源进行脂肪酸的合成，脂肪酸产量达到 15.9 g/L^[114]。

(3) 动态调控系统的优化 微生物代谢网络具有高度复杂性，各代谢途径之间不仅相互关联，还存在动态平衡与反馈调节机制。因此，在实际应用中，需根据目标氨基酸的合成路径特点（如碳氮流向、能量需求及辅因子平衡）以及宿主微生物的代谢特性（如中心碳代谢通量、氧化还原状态及转运能力），有针对性地选择和组合优化策略，并通过多轮迭代优化实现性能提升。通过生物代谢传感器^[25, 44]、群体感应系统^[114]或动态基因回路设计^[26]，可实现对微生物代谢网络的系统化与精准化调控，从而构建高效的饲用氨基酸微生物细胞工厂。例如，中国科学院天津工业生物技术研究所张大伟团队开发了可实时响应葡萄糖摄取速率的生物传感器（GURB），并通过动态调控代谢通量使 L-色氨酸、核黄素和 D-乳酸的产量分别提高了 91%、59.4% 和 40.6%^[44]。在一项针对群体感应（QS）系统的研究中，北京化工大学袁其朋团队阐释了 QS 系统 *luxR-luxI* 基因间序列对 *lux* 型群体感应启动子的调控机制，并通过设计和重构 CRP 结合位点和 *lux box* 到-10 区序列，创建了兼具动态范围宽和泄漏表达低特点的 QS 突变体文库，实现了在单个细胞内同时控制多组代谢流的次序表达，使水杨酸和 4-羟基对香豆酸素的产量分别提高了 60 倍和 10 倍^[115]。

参 考 文 献

- [1] FANG Q C, ZHANG X Y, DAI G C, et al. Low-opportunity-cost feed can reduce land-use-related environmental impacts by about one-third in China[J]. *Nature Food*, 2023, 4(8): 677-685.
- [2] MA Q, ZHANG Q W, XU Q Y, et al. Systems metabolic engineering strategies for the production of amino acids[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, 2(2): 87-96.
- [3] 刘佳, 盛琦, 刘开放, 等. 微生物制造饲用氨基酸助力豆粕减量替代[J]. *中国科学院院刊*, 2025, 40(1): 25-35.
LIU J, SHENG Q, LIU K F, et al. Microbial production of feed amino acids promotes reduction and replacement of soybean meal[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2025, 40(1): 25-35.
- [4] KIM S Y. 9 What would be the next feed amino acid based on a microbial point of view? [J]. *Journal of Animal Science*, 2021, 99(S1): 12-13.
- [5] LIAO J L, ZHANG P G, YIN J D, et al. New insights into the effects of dietary amino acid composition on meat quality in pigs: a review[J]. *Meat Science*, 2025, 221: 109721.
- [6] OLUWABIYI C T, SONG Z G. Branched-chain amino acids supplementation in low-protein broiler diets: a review[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2024, 318: 116114.
- [7] LI M H, LI H, ZHANG X, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*: unlocking its potential as a key cell factory platform for organic acid production[J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 77: 108475.
- [8] LIU J, XU J Z, RAO Z M, et al. Industrial production of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum*: progress and prospects[J]. *Microbiological Research*, 2022, 262: 127101.
- [9] LI C Y, ZHANG R H, WANG J, et al. Protein engineering for improving and diversifying natural product biosynthesis[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(7): 729-744.
- [10] DONG X Y, ZHAO Y, HU J Y, et al. Attenuating L-lysine production by deletion of *ddh* and *lysE* and their effect on L-threonine and L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 93-94: 70-78.
- [11] BOMMAREDDY R R, 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[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 25: 30-37.
- [12] CHEN Y Y, HUANG L G, YU T, et al. Balancing the AspC and *AspA* pathways of *Escherichia coli* by systematic metabolic engineering strategy for high-efficient L-homoserine

- production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(8): 2457-2469.
- [13] BASSALO M C, GARST A D, CHOUDHURY A, et al. Deep scanning lysine metabolism in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2018, 14(11): e8371.
- [14] OSIRE T, YANG T W, XU M J, et al. Integrated gene engineering synergistically improved substrate-product transport, cofactor generation and gene translation for cadaverine biosynthesis in *E. coli*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 169: 8-17.
- [15] XIAO J, WANG D T, WANG L, et al. Increasing L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* by engineering amino acid transporters[J]. *Amino Acids*, 2020, 52(10): 1363-1374.
- [16] LIU J, OU Y, XU J Z, et al. L-lysine production by systems metabolic engineering of an NADPH auto-regulated *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 387: 129701.
- [17] MALLA S, VAN DER HELM E, DARBANI B, et al. A novel efficient L-lysine exporter identified by functional metagenomics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 855736.
- [18] LI Z C, LIU Q, SUN J H, et al. Multivariate modular metabolic engineering for enhanced L-methionine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 101.
- [19] LI Y, CONG H, LIU B N, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for methionine production by removing feedback inhibition and increasing NADPH level[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2016, 109(9): 1185-1197.
- [20] ZHOU B Z, ZHAO G H, YU J, et al. Multi-step metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 to produce L-methionine[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2025, 5(2): 593-610.
- [21] ZHAO Z Q, YOU J J, SHI X P, et al. Multi-module engineering to guide the development of an efficient L-threonine-producing cell factory[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 416: 131802.
- [22] LEE K H, PARK J H, KIM T Y, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3: 149.
- [23] VO T M, PARK J Y, KIM D, et al. Use of acetate as substrate for sustainable production of homoserine and threonine by *Escherichia coli* W3110: a modular metabolic engineering approach[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 84: 13-22.
- [24] ZHAO G H, ZHANG D Z, ZHOU B Z, et al. Fine-regulating the carbon flux of L-isoleucine producing *Corynebacterium glutamicum* WM001 for efficient L-threonine production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(10): 3446-3460.
- [25] PU W, FENG J H, CHEN J Z, et al. Engineering of L-threonine and L-proline biosensors by directed evolution of transcriptional regulator SerR and application for high-throughput screening[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2025, 12(1): 4.
- [26] SONG J, ZHUANG M M, DU C Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for self-induced production of L-isoleucine[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2025, 14(1): 179-192.
- [27] SHI C R, HUO X J, YOU R, et al. High yield production of L-isoleucine through readjusting the ratio of two direct precursors in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 418: 131889.
- [28] LU N, WEI M H, YANG X J, et al. Growth-coupled production of L-isoleucine in *Escherichia coli* via metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 86: 181-193.
- [29] LI Y J, WEI H B, WANG T, et al. 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.
- [30] LIU Z Y, LIU J, ZHANG F, et al. Modifying *Corynebacterium glutamicum* by metabolic engineering for efficient synthesis of L-lysine[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2025, 5(1): 288-299.
- [31] ZHANG Q Q, WANG Y H, WANG X L, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient L-isoleucine production based on the citramalate pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(19): 11900-11911.
- [32] GUILLOUET S, RODAL A, AN G H, et al. Metabolic redirection of carbon flow toward isoleucine by expressing a catabolic threonine dehydratase in a threonine-overproducing *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57(5): 667-673.
- [33] YU S Z, ZHENG B, CHEN Z Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for producing branched chain amino acids[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 230.
- [34] GUO Y F, HAN M, XU J Z, et al. Analysis of acetohydroxyacid synthase variants from branched-chain amino acids-producing strains and their effects on the synthesis of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2015, 109: 106-112.
- [35] YIN L H, HU X Q, XU D Q, et al. Co-expression of feedback-resistant threonine dehydratase and acetohydroxy acid synthase increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(5): 542-550.
- [36] SHI J, FENG Z Z, SONG Q, et al. Structural and functional insights into transcription activation of the essential LysR-type transcriptional regulators[J]. *Protein Science*, 2024, 33(6):

- e5012.
- [37] DE GRAAF A A, EGGELING L, SAHM H. Metabolic engineering for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2001, 73: 9-29.
- [38] GRUZDEV N, HACHAM Y, HAVIV H, et al. Conversion of methionine biosynthesis in *Escherichia coli* from trans- to direct-sulfurylation enhances extracellular methionine levels [J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 151.
- [39] ZHOU Z, ZHANG X Y, WU J, et al. Targeting cofactors regeneration in methylation and hydroxylation for high level production of Ferulic acid[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 247-255.
- [40] RHEE K Y, PAREKH B S, HATFIELD G W. Leucine-responsive regulatory protein-DNA interactions in the leader region of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(43): 26499-26507.
- [41] JAFRI S, CHEN S L, CALVO J M. *ilvIH* operon expression in *Escherichia coli* requires Lrp binding to two distinct regions of DNA[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(19): 5293-5300.
- [42] MORBACH S, JUNGER C, SAHM H, et al. Attenuation control of *ilvBNC* in *Corynebacterium glutamicum*: evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome binding site[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90(5): 501-507.
- [43] BOOB A G, CHEN J Y, ZHAO H M. Enabling pathway design by multiplex experimentation and machine learning[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 81: 70-87.
- [44] DING D Q, ZHU Y R, BAI D Y, et al. Monitoring and dynamically controlling glucose uptake rate and central metabolism[J]. *Nature Chemical Engineering*, 2025, 2(1): 50-62.
- [45] SHENG Q, YI L X, ZHONG B, et al. Shikimic acid biosynthesis in microorganisms: current status and future direction[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 62: 108073.
- [46] XU J Z, HAN M, REN X D, et al. Modification of aspartokinase III and dihydrodipicolinate synthetase increases the production of L-lysine in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 114: 79-86.
- [47] LIU J H, LIU J, LI J J, et al. Reconstruction the feedback regulation of amino acid metabolism to develop a non-auxotrophic L-threonine producing *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2024, 11(1): 43.
- [48] LEE J H, LEE D E, LEE B U, et al. Global analyses of transcriptomes and proteomes of a parent strain and an L-threonine-overproducing mutant strain[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(18): 5442-5451.
- [49] ZHAO Z Q, YOU J J, SHI X P, et al. Engineering *Escherichia coli* for L-threonine hyperproduction based on multidimensional optimization strategies[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(41): 22682-22691.
- [50] PARK J H, OH J E, LEE K H, et al. Rational design of *Escherichia coli* for L-isoleucine production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(11): 532-540.
- [51] ZHANG Y C, LIU Y D, ZHANG S Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* WM001 to improve L-isoleucine production[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2021, 68(3): 568-584.
- [52] LIU Y D, LI Y Y, WANG X Y. Acetohydroxyacid synthases: evolution, structure, and function[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(20): 8633-8649.
- [53] DUAN M, CHEN S, LIU X L, et al. The application of *Corynebacterium glutamicum* in L-threonine biosynthesis[J]. *Fermentation*, 2023, 9(9): 822.
- [54] JIN X, WANG S M, GAO Y P, et al. Combinatorial metabolic engineering of *Escherichia coli* to efficiently produce L-threonine from untreated cane molasses[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 419: 132058.
- [55] YE C, LUO Q L, GUO L, et al. Improving lysine production through construction of an *Escherichia coli* enzyme-constrained model[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(11): 3533-3544.
- [56] LV Q L, HU M K, TIAN L Z, et al. Enhancing L-glutamine production in *Corynebacterium glutamicum* by rational metabolic engineering combined with a two-stage pH control strategy[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125799.
- [57] WANG L J, GUO Y Y, LI M Y, et al. Antibiotic-free high-level L-methionine production in engineered *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(46): 25791-25800.
- [58] JIANG S, WANG R R, WANG D H, et al. Metabolic reprogramming and biosensor-assisted mutagenesis screening for high-level production of L-arginine in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 76: 146-157.
- [59] YE J W, HU D K, CHE X M, et al. Engineering of *Halomonas bluephagenesis* for low cost production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 143-152.
- [60] YE J W, HU D K, YIN J, et al. Stimulus response-based fine-tuning of polyhydroxyalkanoate pathway in *Halomonas*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 57: 85-95.
- [61] LI T, YE J W, SHEN R, et al. Semirational approach for ultrahigh poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in

- Escherichia coli* by combining one-step library construction and high-throughput screening[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(11): 1308-1317.
- [62] SHEN R, YIN J, YE J W, et al. Promoter engineering for enhanced P(3HB-co-4HB) production by *Halomonas bluephagenesis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(8): 1897-1906.
- [63] DU F, LI Z J, LI X, et al. Optimizing multicopy chromosomal integration for stable high-performing strains[J]. Nature Chemical Biology, 2024, 20(12): 1670-1679.
- [64] BAEK J M, MAZUMDAR S, LEE S W, et al. Butyrate production in engineered *Escherichia coli* with synthetic scaffolds[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(10): 2790-2794.
- [65] DUEBER J E, WU G C, MALMIRCHEGINI G R, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(8): 753-759.
- [66] ZHOU H, VONK B, ROUBOS J A, et al. Algorithmic co-optimization of genetic constructs and growth conditions: application to 6-ACA, a potential nylon-6 precursor[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(21): 10560-10570.
- [67] VENAYAK N, ANESIADIS N, CLUETT W R, et al. Engineering metabolism through dynamic control[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 34: 142-152.
- [68] CRESS B F, TRANTAS E A, VERVERIDIS F, et al. Sensitive cells: enabling tools for static and dynamic control of microbial metabolic pathways[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 36: 205-214.
- [69] IMMETHUN C M, DELORENZO D M, FOCHT C M, et al. Physical, chemical, and metabolic state sensors expand the synthetic biology toolbox for *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(7): 1561-1569.
- [70] SHEN X L, WANG J, LI C Y, et al. Dynamic gene expression engineering as a tool in pathway engineering[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 59: 122-129.
- [71] LALWANI M A, ZHAO E M, AVALOS J L. Current and future modalities of dynamic control in metabolic engineering [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 52: 56-65.
- [72] PINTO D, VECCHIONE S, WU H, et al. Engineering orthogonal synthetic timer circuits based on extracytoplasmic function σ factors[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(14): 7450-7464.
- [73] MEYER A J, SEGALL-SHAPIRO T H, GLASSEY E, et al. *Escherichia coli* "Marionette" strains with 12 highly optimized small-molecule sensors[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(2): 196-204.
- [74] 叶健文, 陈江楠, 张旭, 等. 动态调控: 一种高效的细胞工厂工程化代谢改造策略[J]. 生物技术通报, 2020, 36(6): 1-12.
- YE J W, CHEN J N, ZHANG X, et al. Dynamic control: an efficient strategy for metabolically engineering microbial cell factories[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(6): 1-12.
- [75] BORKOWSKI O, BRICIO C, MURGIANO M, et al. Cell-free prediction of protein expression costs for growing cells[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1457.
- [76] GUPTA A, REIZMAN I M B, REISCH C R, et al. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 273-279.
- [77] DING X H, YANG W J, DU X B, et al. High-level and-yield production of L-leucine in engineered *Escherichia coli* by multistep metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2023, 78: 128-136.
- [78] YANG L Y, MU X Q, NIE Y, et al. Improving the production of NAD⁺ via multi-strategy metabolic engineering in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2021, 64: 122-133.
- [79] BOUZON M, DÖRING V, DUBOIS I, et al. Change in cofactor specificity of oxidoreductases by adaptive evolution of an *Escherichia coli* NADPH-auxotrophic strain[J]. mBio, 2021, 12(4): e0032921.
- [80] XU J Z, RUAN H Z, YU H B, et al. Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 39.
- [81] WANG K, SONG X T, CUI B Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of ectoine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(1): 646-654.
- [82] LIU B N, SUN X Y, LIU Y, et al. Increased NADPH supply enhances glycolysis metabolic flux and L-methionine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Foods, 2022, 11(7): 1031.
- [83] YU F, ZHAO X R, ZHOU J W, et al. Biosynthesis of high-active hemoproteins by the efficient heme-supply *Pichia pastoris* chassis[J]. Advanced Science, 2023, 10(30): 2302826.
- [84] WANG Y S, BAI Y L, ZENG Q, et al. Recent advances in the metabolic engineering and physiological opportunities for microbial synthesis of L-aspartic acid family amino acids: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 126916.
- [85] 赵阔, 程金宇, 郭亮, 等. 谷氨酸棒杆菌代谢工程高效生产 L-缬氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3253-3272.
- ZHAO K, CHENG J Y, GUO L, et al. Highly efficient production of L-valine by multiplex metabolic engineering

- of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3253-3272.
- [86] XU S Y, ZHOU L, XU Y, et al. Recent advances in structure-based enzyme engineering for functional reconstruction[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2023, 120(12): 3427-3445.
- [87] 贾男, 臧国伟, 李春, 等. 辅因子在微生物细胞工厂中的代谢调控与应用[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(7): 79-89.
- JIA N, ZANG G W, LI C, et al. Metabolic regulations and applications of cofactors in microbial cell factories[J]. China Biotechnology, 2022, 42(7): 79-89.
- [88] 陈修来, 刘佳, 罗秋玲, 等. 微生物辅因子平衡的代谢调控[J]. 生物工程学报, 2017, 33(1): 16-26.
- CHEN X L, LIU J, LUO Q L, et al. Manipulation of cofactor balance in microorganisms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(1): 16-26.
- [89] 陈雅维. ATP 调控策略及其在微生物代谢产物合成中的应用[J]. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1515-1527.
- CHEN Y W. ATP regulation strategy and its application in the synthesis of microbial metabolites[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(8): 1515-1527.
- [90] WEUSTHUIS R A, FOLCH P L, POZO-RODRÍGUEZ A, et al. Applying non-canonical redox cofactors in fermentation processes[J]. iScience, 2020, 23(9): 101471.
- [91] 张鸿伟, 王鹏超. 微生物辅因子工程研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(4): 112-122.
- ZHANG H W, WANG P C. Research progress of microbial cofactor engineering[J]. China Biotechnology, 2023, 43(4): 112-122.
- [92] GAO C, SONG W, YE C, et al. Bifunctional optogenetic switch powered NADPH availability for improving L-valine production in *Escherichia coli*[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2024, 12(41): 15103-15113.
- [93] 刘开放. 新型微生物辅因子系统的开发与应用[D]. 无锡: 江南大学, 2024.
- LIU K F. Development and application of novel cofactor systems in microorganisms[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2024.
- [94] BLACK W B, ZHANG L Y, MAK W S, et al. Engineering a nicotinamide mononucleotide redox cofactor system for biocatalysis[J]. Nature Chemical Biology, 2020, 16(1): 87-94.
- [95] 于袁欢, 周阳, 王欣怡, 等. 光遗传学照进生物医学研究进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(1): 102-140.
- YU Y H, ZHOU Y, WANG X Y, et al. Advances in optogenetics for biomedical research[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(1): 102-140.
- [96] CHEN R B, YANG S, ZHANG L, et al. Advanced strategies for production of natural products in yeast[J]. iScience, 2020, 23(3): 100879.
- [97] CHEN R B, GAO J Q, YU W, et al. Engineering cofactor supply and recycling to drive phenolic acid biosynthesis in yeast[J]. Nature Chemical Biology, 2022, 18(5): 520-529.
- [98] ZHANG Y F, ZHANG G Y, ZHANG H F, et al. Efficient fermentative production of β -alanine from glucose through multidimensional engineering of *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(25): 14274-14283.
- [99] LINDNER S N, PETROV D P, HAGMANN C T, et al. Phosphotransferase system-mediated glucose uptake is repressed in phosphoglucoisomerase-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(8): 2588-2595.
- [100] MOLINA-VÁZQUEZ E R, CASPETA L, GOSSET G, et al. Tailoring *Escherichia coli* BL21 (DE3) for preferential xylose utilization via metabolic and regulatory engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2025, 109(1): 54.
- [101] ZHU X N, FAN F Y, QIU H N, et al. New xylose transporters support the simultaneous consumption of glucose and xylose in *Escherichia coli*[J]. mLife, 2022, 1(2): 156-170.
- [102] LI J, QIU Z T, ZHAO G R. Modular engineering of *E. coli* coculture for efficient production of resveratrol from glucose and arabinose mixture[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 7(2): 718-729.
- [103] HALLE L, HÖPPNER D, DOSER M, et al. From molasses to purified α -ketoglutarate with engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. Bioresource Technology, 2025, 416: 131803.
- [104] MOON M W, PARK S Y, CHOI S K, et al. The phosphotransferase system of *Corynebacterium glutamicum*: features of sugar transport and carbon regulation[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2007, 12(1-2): 43-50.
- [105] 刘冬冬. 强化葡萄糖代谢途径提高L-赖氨酸发酵水平的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- LIU D D. Increasing the fermentation level of L-lysine via enhancing glucose metabolism pathways[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [106] PARCHE S, BURKOVSKI A, SPRENGER G A, et al. *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2001, 3(3): 423-428.
- [107] WANG L, LI N, YU S Q, et al. Enhancing caffeic acid production in *Escherichia coli* by engineering the biosynthesis pathway and transporter[J]. Bioresource Technology, 2023, 368: 128320.
- [108] 郭亮, 高聪, 柳亚迪, 等. 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 Y D, et al. Advances in bioproduction of feed amino acid by *Escherichia coli*[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 964-981.
- [109] 于勇, 朱欣娜, 毕昌昊, 等. 大肠杆菌细胞工厂的创建技术[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1564-1577.
- YU Y, ZHU X N, BI C H, et al. Construction of *Escherichia coli* cell factories[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1564-1577.
- [110] 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 progress on nutrition of several main feed amino acids[J]. China Feed Additive, 2016(1): 10-13.
- [111] ISOGAI S, TAKAGI H. Enhancement of lysine biosynthesis confers high-temperature stress tolerance to *Escherichia coli* cells[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(18): 6899-6908.
- [112] LIU J, ZHAO X J, CHENG H J, et al. Comprehensive screening of industrially relevant components at genome scale using a high-quality gene overexpression collection of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Trends in Biotechnology, 2025, 43(1): 220-247.
- [113] ZHANG Y W, YANG J J, QIAN F H, et al. Engineering a xylose fermenting yeast for lignocellulosic ethanol production [J]. Nature Chemical Biology, 2025, 21(3): 443-450.
- [114] GAO J Q, LI Y X, YU W, et al. Rescuing yeast from cell death enables overproduction of fatty acids from sole methanol[J]. Nature Metabolism, 2022, 4(7): 932-943.
- [115] GE C, YU Z, SHENG H K, et al. Redesigning regulatory

components of quorum-sensing system for diverse metabolic control[J]. Nature Communications, 2022, 13: 2182.



通讯作者: 刘立明(1976—),男,教授,博士生导师,教育部高层次人才。研究方向为合成生物学技术和微生物细胞工厂。
E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn



共同通讯作者: 刘佳(1988—),女,高级实验师。研究方向为酶催化工程技术。
E-mail: liujia@jiangnan.edu.cn



第一作者: 赵欣雨(2001—),女,硕士研究生。研究方向为微生物细胞工厂。
E-mail: zxy_201710@163.com