

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-042

大肠杆菌生产饲用氨基酸的研究进展

郭亮^{1,2}, 高聪^{1,2}, 柳亚迪^{1,2}, 陈修来^{1,2}, 刘立明^{1,2}

(¹江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; ²江南大学国际食品安全联合实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 随着畜牧业的快速发展, 人们对畜牧饲料蛋白的需求日益剧增。由于人们对食品安全意识的增强, 迫切需开发安全、高效、可持续动物饲料蛋白的供应途径。由于氨基酸是组成蛋白质的基本单元, 所以在饲料中添加氨基酸可以替代饲料中的蛋白质, 为动物细胞生长发育提供足够的营养。因此, 饲用氨基酸作为动物饲料食品添加剂被广泛应用, 具有广阔的市场应用前景。利用合成生物学技术, 工程化改造大肠杆菌, 构建的细胞工厂, 以生物质为原料可绿色高效合成饲用氨基酸, 而且其具有原料可再生、成本低廉、反应条件温和、环境污染小等优点, 为解决动植物提取和化学炼制引起的环境污染问题提供了一种有效解决方案。本文针对饲用氨基酸(赖氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、苏氨酸、缬氨酸和精氨酸)的生物合成途径, 介绍了大肠杆菌合成饲用氨基酸的生产瓶颈, 并从饲用氨基酸大肠杆菌细胞工厂的构建与优化, 综述了利用合成生物学技术改造大肠杆菌细胞工厂合成饲用氨基酸的研究现状。提升饲用氨基酸的生产技术水平、提高大肠杆菌细胞的鲁棒性和增强大肠杆菌细胞对不利环境的耐受能力, 可以提升饲用氨基酸发酵性能, 简化发酵过程控制, 降低饲用氨基酸的生产成本, 是未来饲用氨基酸生产菌株工程化改造的方向。

关键词: 饲用氨基酸; 大肠杆菌; 微生物细胞工厂; 合成生物学; 代谢工程

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

Advances in bioproduction of feed amino acid by *Escherichia coli*GUO Liang^{1,2}, GAO Cong^{1,2}, LIU Yadi^{1,2}, CHEN Xiulai^{1,2}, LIU Liming^{1,2}

(¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; ²International Joint Laboratory on Food Safety, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: With the rapid development of animal husbandry and fishery, it promotes the development of protein for animal feed. Due to the enhancement of people's safety awareness of food additives, there is an urgent need to enhance the supply of sustainable protein for use in animal feed. Because the protein is composed of amino acids, the feed amino acids can replace protein for animal feed, which can provide enough nutrition for the animal's growth. Thus, the

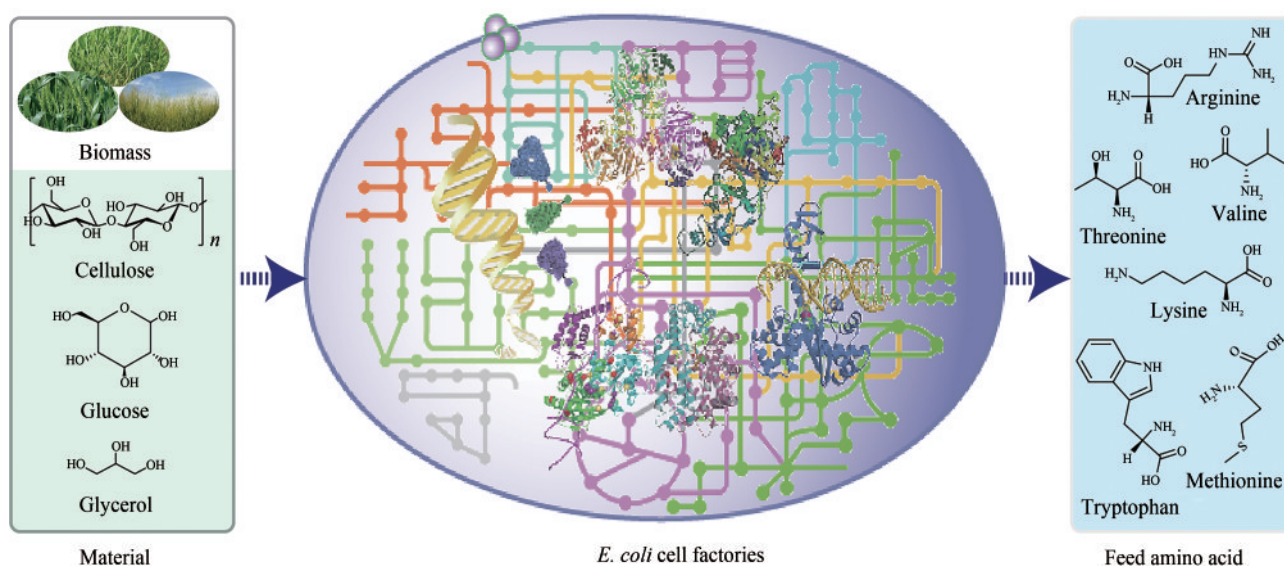
收稿日期: 2021-04-09 修回日期: 2021-05-21

基金项目: 国家自然科学基金创新研究群体科学基金项目(32021005); 国家自然科学基金青年项目(32000037); 江苏省自然科学基金青年项目(BK20210478和BK20200614)

引用本文: 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

Citation: GUO Liang, GAO Cong, LIU Yadi, CHEN Xiulai, LIU Liming. Advances in bioproduction of feed amino acid by *Escherichia coli*[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 964-981

feed amino acid is an important product that has attracted a great attention by investigators because of the widely uses in the fields of animal feed supplement and has broad market potential. Using synthetic biology and metabolic engineering strategy, the metabolic pathway and regulatory network of *Escherichia coli* (*E. coli*) was designed, engineered, and reconstructed to obtain suitable *E. coli* cell factories. These factories provide a promising and sustainable alternative for the production of feed amino acid from renewable feedstock, and is attracting great attention as it is an economic and environmentally friendly bioprocessing. *E. coli* cell factories offer an alternative strategy to replace chemical refinery, animal and plant extraction, reducing the harm to the environment and dependence on natural resources. In the present review, we discussed the biosynthesis pathway of feed amino acid (lysine, methionine, tryptophan, threonine, valine, and arginine) in *E. coli*. According to the biosynthesis pathway of feed amino acid, the production bottlenecks of feed amino acid in *E. coli* cell factories were discussed. We also summarized recent studies about in the feed amino acid production from the constructed and optimized of *E. coli* cell factory. Furthermore, we proposed future research directions to improve the technical level of feed amino acid and enhance the robustness of *E. coli* cell factories for reducing the cost of bioproduction, simplifying downstream separation, and enhancing industrial productivity.



Keywords: feed amino acid; *Escherichia coli*; microbial cell factories; synthetic biology; metabolic engineering

随着畜牧业的快速发展，人们对畜牧饲料蛋白的需求日益剧增。非洲猪瘟、疯牛病目前没有疫苗，倒逼养殖企业加强生物防控，减少甚至不用动物性蛋白，避免携带病毒^[1]。众所周知，蛋白质的营养实际上是由氨基酸提供，通过添加必要的氨基酸可以降低动物膳食中的粗蛋白水平，同时满足动物营养需求^[2-4]。在动物饲料中添加适宜含量的氨基酸，不仅可以最大限度地满足动物的蛋白需求，调控动物的生长和饲料转化率，而且大大降低粗蛋白用量，提高饲料利用率，节约

饲养成本^[5-8]。因此，研究人员发展了利用饲用氨基酸作为氨基酸添加剂，替代天然蛋白成分，生产配合饲料的方法。饲用氨基酸主要是指植物性饲料缺乏的必需氨基酸（如赖氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、苏氨酸）和一些小品种氨基酸（如缬氨酸和精氨酸）^[9-12]。目前饲用氨基酸的生产方法主要有3种：动植物提取、化学炼制和生物炼制^[13-14]。由于动植物提取的原料受限、生产工艺复杂、生产成本低、环境污染大等缺点，在工业上未得到广泛应用^[15-16]。化学炼制具有原料不可再

生、反应步骤多、伴有副反应发生、反应条件苛刻、安全性低差等问题,在实际生产中被逐渐淘汰^[17]。依靠微生物为基础的生物炼制,不仅利用可再生生物质资源为原料,而且具有成本低廉、产品纯度高、反应条件温和、环境污染小等优势,为解决动植物提取和化学炼制中的问题提供了一种有效解决方案,因而被广泛应用于饲用氨基酸生产^[18-27]。

由于大肠杆菌遗传背景清晰、生长迅速与培养简单,成为了研究最为广泛和深入的模式微生物^[15, 28]。利用合成生物学技术,改造大肠杆菌细胞构建的细胞工厂,利用生物质为原料可绿色高效合成饲用氨基酸^[20, 29-34]。本文重点关注了赖氨酸、甲硫氨酸、色氨酸等饲用氨基酸的生物合成途径,介绍了大肠杆菌合成饲用氨基酸的生产瓶颈,综述了大肠杆菌细胞工厂合成饲用氨基酸的研究进展,并展望了未来饲用氨基酸菌株改造的重点方向。

1 天冬氨酸族氨基酸大肠杆菌细胞工厂

1.1 天冬氨酸族氨基酸的生物合成途径

由于天冬氨酸是赖氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸共同前体,因此,将赖氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸统称为天冬氨酸族氨基酸。赖氨酸具有增强动物食欲、增强抗病能力和促进外伤治愈的作用。赖氨酸是植物性饲料中最缺乏的一种氨基酸,分别是猪和禽类饲料的第一与第二限制性氨基酸;苏氨酸是继赖氨酸和甲硫氨酸之后家禽饲料中的第三限制性氨基酸;甲硫氨酸是家禽的第一限制性氨基酸,猪的第二限制性氨基酸^[5-8]。

葡萄糖经糖酵解途径形成的丙酮酸,经羧化反应生成草酰乙酸,草酰乙酸在天冬氨酸氨基转移酶(AAT)的作用下形成天冬氨酸^[35]。如图1所示,天冬氨酸经天冬氨酸激酶(AK I、AK II或AK III)和天冬氨酸半醛脱氢酶(ASD)催化生成天冬氨酸半醛。天冬氨酸半醛,一方面经过二氢吡啶二羧酸合酶(DS)、二氢吡啶二羧酸还原酶(DR)、四氢二吡啶琥珀酰酶(THS)、*N*-琥珀酰二氨基庚二酸氨基转移酶(SDAT I、SDAT II)、

N-琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶(SDD)、二氨基庚二酸差向异构酶(DE)与二氨基庚二酸脱羧酶(DDC)催化合成赖氨酸,另一方面天冬氨酸半醛经高丝氨酸脱氢酶(HD I、HD II)脱羧形成高丝氨酸^[3]。高丝氨酸经高丝氨酸激酶(HK)和苏氨酸合酶(TS)催化形成苏氨酸^[36-37],经*O*-琥珀酰高丝氨酸转琥珀酰酶(HST)、琥珀酰高丝氨酸裂解酶(SHL)、胱硫醚 β -合成酶(CL)、半胱氨酸甲基转移酶(HMT I、HMT II)催化形成甲硫氨酸^[38-40]。

大肠杆菌细胞工厂合成天冬氨酸族氨基酸主要存在以下问题:①天冬氨酸族氨基酸生物合成途径的关键酶受到反馈抑制和反馈阻遏,例如天冬氨酸激酶同工酶AK I (*thrA*)、AK II (*metL*)和AK III (*lysC*)分别受苏氨酸、甲硫氨酸和赖氨酸反馈调节^[35, 41];②从天冬氨酸合成1 mol苏氨酸、1 mol赖氨酸和1 mol甲硫氨酸,分别需要3 mol、4 mol和3 mol的NADPH,在合成过程中可能导致还原力不平衡^[35, 42];③大肠杆菌内源的赖氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸的合成路径之间,竞争代谢流,减弱了合成目标化学品的代谢流^[3];④大肠杆菌存在本源赖氨酸和苏氨酸的分解途径,可能会分解赖氨酸和苏氨酸^[35];⑤在大肠杆菌细胞内合成的氨基酸如何有效分泌到胞外^[35, 43-46]。

1.2 赖氨酸大肠杆菌细胞工厂的构建与优化

研究人员在*E. coli* Δ met Δ thr (CCTCC M2013239)菌株中,过表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Ppc)、吡啶核苷酸转氢酶(PntB)、天冬氨酸酶(AspA),构建了合成赖氨酸的底盘微生物*E. coli* NT1003,在最优发酵条件下赖氨酸产量为134.9 g/L,葡萄糖得率为45.4%^[47]。近年来,围绕大肠杆菌细胞工厂生产赖氨酸的研究工作集中在增加前体供应^[48]、解除赖氨酸对关键酶的反馈抑制^[49]和适应性进化等策略^[50]。草酰乙酸是合成赖氨酸等天冬氨酸族氨基酸的重要前体物质,减少支路代谢消耗草酰乙酸的羧化反应与增强合成草酰乙酸的羧化反应,可以增加前体草酰乙酸的供应^[48, 51]。例如,过表达大肠杆菌本源的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Ppc),增强合成草酰乙酸的羧化反应,使赖氨酸

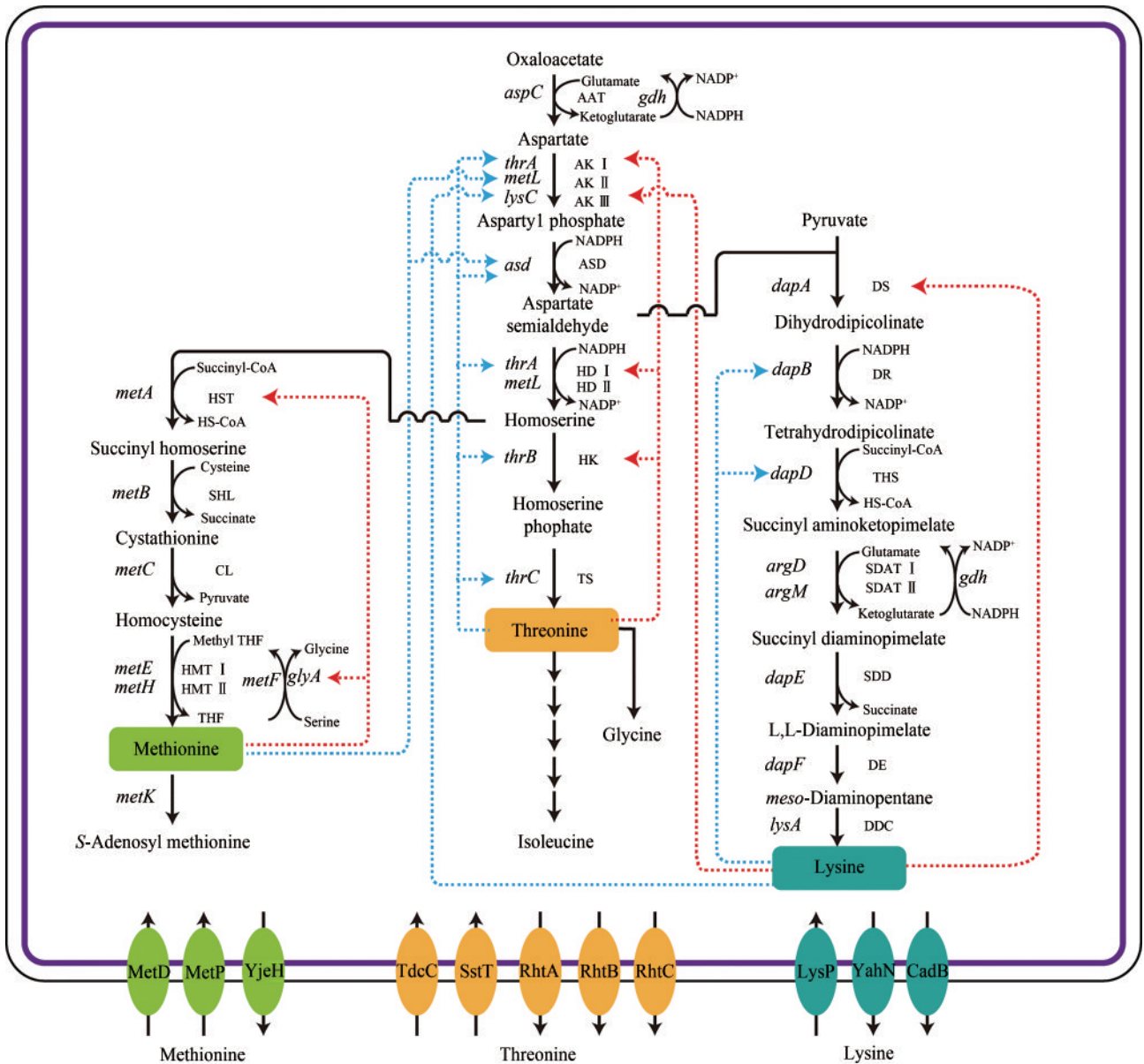


图1 大肠杆菌天冬氨酸族氨基酸的合成路径及其反馈调节示意图

(红色虚线箭头表示反馈抑制、蓝色虚线箭头表示反馈阻遏、实线箭头表示一步代谢路径)

途径涉及的关键酶: AAT—天冬氨酸氨基转移酶; AK I, AK II, AK III—天冬氨酸激酶; ASD—天冬氨酸半醛脱氢酶; HD I, HD II—高丝氨酸脱氢酶; HK—高丝氨酸激酶; TS—苏氨酸合酶; DS—二氢吡啶二羧酸合酶; DR—二氢吡啶二羧酸还原酶; THS—四氢二吡啶琥珀酰酶; SDAT I, SDAT II—*N*-琥珀酰二氨基庚二酸氨基转移酶; SDD—*N*-琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶; DE—二氨基庚二酸差向异构酶; DDC—二氨基庚二酸脱羧酶; HST—*O*-琥珀酰高丝氨酸转琥珀酰酶; SHL—琥珀酰高丝氨酸裂解酶; CL—胱硫醚β-合成酶; HMT I, HMT II—半胱氨酸甲基转移酶。

途径涉及的关键基因: *aspC*—天冬氨酸转氨酶编码基因; *thrA*—天冬氨酸激酶 I 编码基因; *metL*—天冬氨酸激酶 II 编码基因; *lysC*—天冬氨酸激酶 III 编码基因; *asd*—天冬氨酸半醛脱氢酶编码基因; *thrA*—高丝氨酸脱氢酶 I 编码基因; *thrB*—高丝氨酸激酶编码基因; *thrC*—苏氨酸合酶编码基因; *dapA*—二氢吡啶二羧酸合酶编码基因; *dapB*—二氢吡啶二羧酸还原酶编码基因; *dapD*—四氢二吡啶琥珀酰酶编码基因; *argD*—*N*-琥珀酰二氨基庚二酸氨基转移酶 I 编码基因; *argM*—*N*-琥珀酰二氨基庚二酸氨基转移酶 II 编码基因; *dapE*—*N*-琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶编码基因; *dapF*—二氨基庚二酸差向异构酶编码基因; *lysA*—二氨基庚二酸脱羧酶编码基因; *metA*—*O*-琥珀酰高丝氨酸转琥珀酰酶编码基因; *metB*—琥珀酰高丝氨酸裂解酶编码基因; *metC*—胱硫醚β-合成酶编码基因; *metE*—半胱氨酸甲基转移酶编码基因; *metH*—半胱氨酸甲基转移酶编码基因; *metK*—蛋氨酸腺苷转移酶编码基因; *gdh*—谷氨酸脱氢酶编码基因; *glyA*—丝氨酸羟甲基转移酶编码基因; *metF*—亚甲基四氢叶酸还原酶编码基因

Fig. 1 Metabolic pathways of aspartate family amino acids and feedback regulations involved in *E. coli*

(Blue dotted lines indicate feedback repression, red dotted lines indicate feedback inhibition, and solid arrows indicate one-step metabolic pathways)
 Key enzymes in metabolic pathway: AAT—aspargate aminotransferase; AK I, AK II, AK III—aspargate kinase; ASD—aspargate semialdehyde dehydrogenase; HD I, HD II—homoserine dehydrogenase; HK—homoserine kinase; TS—threonine synthase; DS—dihydrodipicolinate synthase; DR—dihydrodipicolinate reductase; THS—tetrahydrodipicolinate succinyltransferase; SDAT I, SDAT II—succinyl diaminopimelate (DAP) aminotransferase; SDD—succinyl DAP desuccinylase; DE—L,L-DAP epimerase; DDC—*meso*-DAP decarboxylase; HST—homoserine succinyltransferase; SHL—succinyl homoserine lyase; CL—cystathionine lyase; HMT I, HMT II—homocysteine methyltransferase.
 Key genes in metabolic pathway: *aspC*—aspargate aminotransferase-encoding gene; *thrA*—aspargate kinase I-encoding gene; *metL*—aspargate kinase II-encoding gene; *lysC*—aspargate kinase III-encoding gene; *asd*—aspargate semialdehyde dehydrogenase-encoding gene; *thrA*—homoserine dehydrogenase I-encoding gene; *thrB*—homoserine kinase-encoding gene; *thrC*—threonine synthase-encoding gene; *dapA*—dihydrodipicolinate synthase-encoding gene; *dapB*—dihydrodipicolinate reductase-encoding gene; *dapD*—tetrahydrodipicolinate succinyltransferase-encoding gene; *argD*—succinyl diaminopimelate (DAP) aminotransferase I-encoding gene; *argM*—succinyl diaminopimelate (DAP) aminotransferase II-encoding gene; *dapE*—succinyl DAP desuccinylase-encoding gene; *dapF*—L,L-DAP epimerase; *lysA*—*meso*-DAP decarboxylase-encoding gene; *metA*—homoserine succinyltransferase-encoding gene; *metB*—succinyl homoserine lyase-encoding gene; *metC*—cystathionine lyase-encoding gene; *metE*—homocysteine methyltransferase I-encoding gene; *metH*—homocysteine methyltransferase II-encoding gene; *metK*—methionine adenosyltransferase-encoding gene; *gdh*—glutamate dehydrogenase-encoding gene; *glyA*—serine hydroxymethyltransferase-encoding gene; *metF*—methylene tetrahydrofolate reductase-encoding gene)

的产量增加22.22%^[48]。在大肠杆菌中引入谷氨酸棒杆菌来源的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Ppc),同时敲除丙酮酸激酶(PykA和PykF),实现了天冬氨酸的积累,在此基础上,进一步敲除天冬氨酸氨裂解酶(AspA)和苹果酸脱氢酶(Mdh),使赖氨酸前体天冬氨酸的积累量增加到6.95 mmol/L^[51]。解除赖氨酸对关键酶的反馈抑制可以强化赖氨酸合成路径效率。例如,通过比对谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌二氢吡啶二羧酸合酶(DS)的序列和结构,将谷氨酸棒杆菌DS抑制剂结合位点周围的残基,引入到大肠杆菌DS中,减弱了赖氨酸对DS的反馈抑制,使赖氨酸得率增加45%^[49];通过将天冬氨酸激酶(AK III,由*lysC*编码)第344位的氨基酸残基由苏氨酸(T)替换为甲硫氨酸(M),减弱了赖氨酸对天冬氨酸激酶的反馈抑制,通过将二氢吡啶二羧酸合酶(DS,由*dapA*编码)第56位的氨基酸残基由组氨酸(H)替换为赖氨酸(K),减弱了赖氨酸对DS的反馈抑制,将突变体*lysC*^{T334M}和*dapA*^{H56K}引入到工程菌*E. coli* LATR11(*E. coli* MG1655衍生菌株)中,使赖氨酸的产量增加了63%^[48]。适应性进化是指微生物种群在一定选择压力条件下不断进化,从而获得理想表型的方法^[52]。为了进一步提高大肠杆菌细胞工厂赖氨酸的生产性能,Wang等^[50]利用突变的DNA聚合酶校对元件(DnaQ),搭建了一个基因组复制工程辅助连续进化系统(GREACE),使随机突变率提高了317倍。并利用GREACE技术,筛选到突

变体*E. coli* RS3,使赖氨酸产量提高了14.8%,增加到155 g/L。利用代谢组学和基因组学技术,对突变菌株*E. coli* RS3进行分析,发现突变菌株主要通过瓜丁胺酶(SpeB^{A302V})、ATP合酶亚基(AtpB^{S165N})和前蛋白转位酶(SecY^{M145V})的突变,改善细胞在应激条件下的完整性和强化赖氨酸合成的代谢通量。本研究团队^[53]在前期诱变育种获得赖氨酸生产菌株*E. coli* CCTCC M2019435的基础上,基于酶约束模型*ec_iML1515*,预测出20个合成赖氨酸的关键靶点(靶点分布在前体物质积累、产物合成路径强化和能量供给)。并通过实验对靶点进行筛选,发现过表达二氢硫辛酰胺脱氢酶、黄素还原酶、乙酰辅酶A合成酶、二氨基二甲酸脱羧酶、天冬氨酸激酶,使赖氨酸产量分别提高了63.8%、108.7%、55.6%、50.0%和123.6%。在此基础上,利用动态FBA的模拟,将发酵周期缩短了47.7%,使赖氨酸产量增加至193.6 g/L(表1)。

1.3 苏氨酸大肠杆菌细胞工厂的构建与优化

研究人员在筛选得到*E. coli* TWF001(CCTCC M2017730)菌株中,通过敲除转录因子IcIR,在基因组上用启动子强化异柠檬酸裂解酶(AceB)、苹果酸合酶(AceA)和天冬氨酸转氨酶(AspC)的表达,获得合成苏氨酸的底盘微生物*E. coli* TWF006,使苏氨酸的产量增加到12.1 g/L^[41]。为了进一步提高苏氨酸的产量,发展了强化苏氨酸

表1 大肠杆菌细胞工厂生产饲用氨基酸进展比较

Tab. 1 Comparison of feed amino acid production by *E. coli* cell factories

| 产品 | 菌株 | 性状 | 发酵方式 | 产量/(g/L) | 生产强度/[g/(L·h)] | 文献 |
|------|---|---|------|----------|----------------|------|
| 赖氨酸 | <i>E. coli</i> NT1003 | <i>E. coli</i> Δmet Δthr ↑ ppc ↑ pntB ↑ aspA | 发酵罐 | 134.9 | 1.87 | [47] |
| | <i>E. coli</i> LATR11/pWG-DC SM A SM BH _c g LP | <i>E. coli</i> LATR11 ↑ lysC ^{T344M} ↑ asd ↑ dapA ^{H56K} ↑ dapB ↑ lysA ↑ ppc ↑ ddh | 发酵罐 | 125.6 | 3.14 | [48] |
| | <i>E. coli</i> DL2 | <i>E. coli</i> MG1655 ↑ lysC ^{T253R} ↑ dapA ^{E84T} | 摇瓶 | 9.5 | — | [49] |
| | <i>E. coli</i> RS3 | <i>E. coli</i> DL2 ↑ lysC ^{D340P} ↑ dapA ^{E84T} speB ^{A302V} atpB ^{S165N} secY ^{M145V} | 发酵罐 | 155 | 3.69 | [50] |
| | <i>E. coli</i> Lc _(H) -Fe _(M) | <i>E. coli</i> CCTCC M2019435 ↑ lysC ↑ fre | 发酵罐 | 193.6 | 4.03 | [53] |
| 苏氨酸 | <i>E. coli</i> TWF006/pFW01-thrA ⁺ BC-asd | <i>E. coli</i> TWF006 ↑ thrBC ↑ asd ↑ thrA ^{S345A} | 摇瓶 | 15.85 | 0.44 | [41] |
| | <i>E. coli</i> W3110 pWYE134 | <i>E. coli</i> W3110 ↑ thrL ↑ thrBC ↑ thrA ^{S345A} | 发酵罐 | 9.22 | 0.19 | [54] |
| | <i>E. coli</i> THPZ | <i>E. coli</i> THRD ↑ zwf | 发酵罐 | 126.1 | 5.25 | [55] |
| | <i>E. coli</i> TWF106/pFT24rp | <i>E. coli</i> TWF001 ΔpoxB ΔpflB ΔldhA ΔadhE ΔtdcC ↑ rhtC ↑ pycmt | 发酵罐 | 80 | 2.22 | [36] |
| | <i>E. coli</i> THPE5 | <i>E. coli</i> THRD ↑ pycA ↑ pckA ↑ fdh ↑ aspC ↑ gdhA ↑ udhA ↑ citA | 发酵罐 | 70.8 | 1.77 | [56] |
| 甲硫氨酸 | <i>E. coli</i> W3110 ΔmetJ/pTrcA*H | <i>E. coli</i> W3110 ΔmetJ ΔmetA ΔlysA ↑ yjeH | 发酵罐 | 9.75 | 0.20 | [38] |
| | <i>E. coli</i> M3/PAmZ | <i>E. coli</i> W3110 IJAHFEBFC ↑ metA ^{br} ↑ yjeH ↑ serA ^{br} ↑ metZ | 摇瓶 | 3.96 | 0.083 | [57] |
| | <i>E. coli</i> Me05 (pETMA ^{Fbr} -B-Y/ pKKmetH) | <i>E. coli</i> W3110 ΔmetJ ΔthrC ΔlysA ↓ metKp ^G ↑ metA ^{Fbr} ↑ metB ↑ metH | 发酵罐 | 5.62 | 0.12 | [58] |
| | <i>E. coli</i> W3110 IJAHFEBFC/pAm | <i>E. coli</i> W3110 IJAHFEBFC ↑ metA ^{Fbr} ↑ yjeH ↑ serA ^{br} | 发酵罐 | 16.86 | 0.35 | [39] |
| 色氨酸 | <i>E. coli</i> w3110 trpAE1 trpR tnaA | <i>E. coli</i> W3110 ΔtrpR ΔtnaA ↑ trpEDCBA | 发酵罐 | 54.5 | 0.70 | [59] |
| | | <i>E. coli</i> FB-04/pSV03E. coli W3110 ΔtrpRΔtnaA ΔpheA ΔtyrA ↑ aroF ^{br} ↑ trpE ^{S40F} D | 发酵罐 | 13.3 | 0.029 | [60] |
| | <i>E. coli</i> Tna (pSC101 trp-115) | — | 发酵罐 | 6.2 | 0.23 | [61] |
| | <i>E. coli</i> KW023 | <i>E. coli</i> KW ΔtrpR ΔpykF ΔptsH ↑ trpEDCBA ↑ aroG ^{br} ↓ pta ↑ galP ↑ glk | 发酵罐 | 39.7 | 1.6 | [62] |
| | <i>E. coli</i> T16 | <i>E. coli</i> TRTH Δppe ↑ acs ↑ aceB ↑ mdh ↑ pck | 发酵罐 | 54.6 | 1.52 | [63] |
| 缬氨酸 | <i>E. coli</i> Val (pKBRilvBNCED, pTrc184 ygaZHlrp | <i>E. coli</i> Val ↑ ilvBNCED ↑ ygaZH ↑ lrp | 摇瓶 | 7.55 | 0.16 | [64] |
| | <i>E. coli</i> VAMF (pKBRilvBN ^{mut} CED, pTrc184ygaZHlrp) | <i>E. coli</i> VAMF ↑ ygaZH ↑ lrp ↑ ilv ↑ ilvBN ^{mut} CED | 发酵罐 | 32.3 | 0.58 | [65] |
| | <i>E. coli</i> V1 cat-PL-ilvE5.7 | <i>E. coli</i> K12 ΔilvIH ΔilvBN ΔilvGME ↑ ilvE ↑ ilvBN ^{N17K} DA | 摇瓶 | 9.8 | 0.20 | [66] |
| | <i>E. coli</i> VHY18 | W3110 ΔlacI ΔycdN ΔycgH ΔydeU ΔyjiT Δyee ΔyjiV ΔpflB ΔldhA ΔadhE ↑ alsS ↑ bcd ↑ ilvD ↑ ilvCM ↑ brnFE ↑ spoT ^[R290E, K292D] | 发酵罐 | 84 | 2.33 | [67] |
| 精氨酸 | <i>E. coli</i> JM109-9039 | <i>E. coli</i> JM109 ΔargR ↑ argCJBDFRGH | 摇瓶 | 0.040 | — | [68] |
| | <i>E. coli</i> SJB009 | <i>E. coli</i> C600 ⁺ ΔspeC ΔspeF ΔadiA ΔargR ΔargA ↑ argA215 ↑ argO | 发酵罐 | 11.64 | 0.24 | [69] |
| | <i>E. coli</i> KO | <i>E. coli</i> MG1655 ↑ argO ↑ argAH15A ΔargR | 摇瓶 | 1.03 | — | [70] |

合成路径^[41]、阻断冗余代谢支路^[54, 71]和辅因子工程^[55]等策略。例如，在*E. coli* TWF006中过表达高

丝氨酸激酶 (ThrB)、苏氨酸合酶 (ThrC)、天冬氨酸半醛脱氢酶 (ASD) 和抗反馈调节的天冬氨酸激

酶 (ThrA), 强化苏氨酸合成路径, 使苏氨酸产量增加了 31%, 达到 15.85 g/L^[41]。张雪等^[54] 将天冬氨酸激酶 (ThrA) 第 345 位的色氨酸残基突变为苯丙氨酸残基, 解除了苏氨酸对天冬氨酸激酶的反馈抑制, 使苏氨酸的产量增加了 2.56 倍。在苏氨酸合成路径中, 阻断冗余代谢支路包括敲除 *lysA* (二氨基庚二酸脱羧酶编码基因), 阻断赖氨酸的合成; 敲除 *metA* (*O*-高丝氨酸琥珀酰转移酶编码基因), 阻断甲硫氨酸的合成; 敲除 *tdh* (苏氨酸脱氢酶编码基因), 阻断苏氨酸向甘氨酸转化; 将 *ilvA* (苏氨酸脱水酶编码基因) 的第 290 位碱基由 C 替换为 T, 降低苏氨酸脱水酶催化活性减少苏氨酸向异亮氨酸的转化^[71]。辅因子工程策略可以改善苏氨酸合成过程中 NADPH 的供给, 维持高效的代谢合成路径。例如, Li 等^[55] 在 *E. coli* THRD (TCCC 11825) 发酵过程中, 发现甜菜碱通过促进 6-磷酸葡萄糖脱氢酶编码基因 (*zwf*) 的转录, 增加了 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性, 强化辅因子 NADPH 的供给, 使苏氨酸产量增加 13.3%, 达到 117.1 g/L。此外, 研究人员还提出了平衡代谢流分配策略^[36] 和两阶段调控策略^[56], 改善苏氨酸生产。Fang 等^[36] 在工程菌 *E. coli* TWF001 中, 利用温度敏感性调控元件和阻遏蛋白, 建立了温控调节开关, 调控丙酮酸羧化酶 (PYC) 的表达, 实现碳流在丙酮酸和草酰乙酸之间的转换。在发酵前期, 将温度控制在 37 °C, 关闭 PYC 表达, 使碳流充分进入 TCA 循环用于生长; 在发酵后期, 将温度提高到 42 °C, 开启 PYC 表达, 让丙酮酸经 PYC 羧化合成草酰乙酸合成苏氨酸, 使苏氨酸对葡萄糖的得率达到 124.03%。Liu 等^[56] 将工程菌 *E. coli* THRD 的发酵过程分为细胞生长阶段和产物合成阶段, 并利用基因开关实现工程菌两阶段转换。在细胞生长阶段, 过表达丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶与柠檬酸合成酶, 增加糖酵解途径到 TCA 途径的碳通量, 从而增加葡萄糖利用和改善细胞生长。在产物合成阶段, 通过基因开关将碳流导向苏氨酸合成路径, 同时表达谷氨酸脱氢酶、甲酸脱氢酶和吡啶核苷酸转氢酶, 构建谷氨酸和 NADPH 再生成系统, 为苏氨酸合成提供底物和辅因子, 最终使苏氨酸产量增加了 2.02 倍 (表 1)。

1.4 甲硫氨酸大肠杆菌细胞工厂的构建与优化

Huang 等^[38] 以 W3110 为出发菌株, 通过敲除负转录因子 (MetJ), 过表达 *O*-琥珀酰高丝氨酸转琥珀酰酶 (MetA) 和甲硫氨酸转运蛋白 (YjeH), 构建了合成 413.16 mg/L 甲硫氨酸的底盘微生物 W3110 $\Delta metJ/pTrcA^*H$ 。在甲硫氨酸生物合成途径中, 甲硫氨酸的 C₄ 骨架、硫和甲基分别由 *O*-琥珀酰高丝氨酸、半胱氨酸与甲基四氢叶酸提供。因此, 强化甲硫氨酸前体供应, 可以提高甲硫氨酸大肠杆菌细胞工厂的生产性能, 例如可以通过上调 *O*-琥珀酰高丝氨酸转琥珀酰酶、解除甲硫氨酸的反馈调节、阻断赖氨酸与苏氨酸的支路代谢, 增强 C₄ 骨架 *O*-琥珀酰高丝氨酸的供应^[38, 57]; 通过硫源优化, 可以强化硫供体半胱氨酸的供应^[38]; 通过敲除 *purU* 或者外源添加甘氨酸, 可以增加甲基供体甲基四氢叶酸的供应^[57]。Tang 等^[57] 在工程菌 *E. coli* W3110 IJAHFEB (W3110 $\Delta metI \Delta metJ \Delta lysA Trc-metH Trc-metF Trc-cysE Trc-serB Trc-serC$) 中, 过表达 *O*-琥珀酰高丝氨酸转琥珀酰酶, 增加 *O*-琥珀酰高丝氨酸的供应, 使甲硫氨酸的产量从 2.8 g/L 增加到 3.22 g/L。同时, 在发酵过程中添加甲基供体甘氨酸, 使甲硫氨酸的产量增加到 3.96 g/L。Huang 等^[38] 在工程菌 *E. coli* W3110 $\Delta metJ/pTrcA^*H$ 中, 敲除转录因子 *metI* 阻断甲硫氨酸内转运系统 MetD, 使甲硫氨酸的产量增加 43.65%。同时, 敲除二氨基庚二酸脱羧酶编码基因 (*lysA*) 阻断赖氨酸合成路径, 使甲硫氨酸的产量增加 8.5 倍。在此基础上, 通过外源添加 Na₂S₂O₃ 增加硫的供应, 使甲硫氨酸的产量增加 11.45%, 再通过发酵工艺优化使甲硫氨酸的产量进一步增加到 9.75 g/L。Li 等^[58] 以 W3110 为出发菌株, 通过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*)、苏氨酸合酶编码基因 (*thrC*), 阻断甲硫氨酸的竞争代谢路径。然后, 敲除负转录调控因子编码基因 (*metJ*), 下调甲硫氨酸抑制因子编码基因 (*metK*) 的表达, 并利用 pN25 启动子强化琥珀酰高丝氨酸裂解酶 (MetB) 的表达, 强化甲硫氨酸合成路径, 获得工程菌 *E. coli* Me05, 在此基础上, 过表达甲硫氨酸合酶 (MetE 和 MetH) 和 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶

(MetF), 获得合成甲硫氨酸的工程菌 *E. coli* Me05 (pETMA^{Fbr}-B-Y/pKKmetH), 使甲硫氨酸的产量增加到 5.62 g/L。随着研究的深入, 发现仅仅依靠单因素叠加调控, 无法实现甲硫氨酸代谢通量的最大化, 基于模块组合的多层次调控策略可能更具合理性, 例如 Huang 等^[39] 首先, 采用 CRISPRi 技术, 对合成甲硫氨酸底盘微生物的中心代谢路径和氨基酸合成路径中 80 个靶点基因进行调控, 获得控制甲硫氨酸合成的关键靶点。然后, 根据甲硫氨酸生物合成的复杂性和多层次性, 提出了基于分支途径功能的模块化策略, 将甲硫氨酸生物合成路径分为碳模块、硫模块和一碳模块。并利用筛选到的关键靶点对这些模块进行调控, 逐步提升甲硫氨酸的产量, 最终使甲硫氨酸的产量增加到 16.86 g/L (表 1)。

2 色氨酸大肠杆菌细胞工厂

2.1 色氨酸的生物合成途径

作为一种必需氨基酸, L-色氨酸在人类与动物的生长发育过程中起着重要作用, 被广泛应用于食品、医药与饲料添加剂等领域。色氨酸具有特殊的结构, 其代谢产物不仅参与体内多种生理、营养、代谢过程, 也参与体内蛋白质合成的调节^[5-8]。在大肠杆菌细胞中, 色氨酸的合成路径由中心代谢途径、莽草酸途径和色氨酸分支途径组成^[72-74]。中心代谢途径是指葡萄糖经糖酵解途径 (EMP) 和戊糖磷酸途径 (HMP), 形成的磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 与赤藓糖-4-磷酸 (E4P), 在 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸 (DAHP) 合酶 (AroG) 的催化下缩合形成 DAHP 的过程。莽草酸途径是指 DAHP 经过 3-脱氢奎宁酸合酶 (AroB)、3-脱氢奎宁酸脱水酶 (AroD)、莽草酸脱氢还原酶 (AroE)、莽草酸激酶 (AroK)、5-烯醇式丙酮酰胺莽草酸合酶 (AroA)、分支酸合酶 (AroC) 催化形成分支酸的过程。色氨酸分支途径是指分支酸经邻氨基苯甲酸合酶 (TrpE)、邻氨基苯甲酸焦磷酸转移酶 (TrpD)、邻氨基苯甲酸异构酶 (TrpC)、色氨酸合酶 (TrpB)、吲哚甘油 3-磷酸 (TrpA) 作用形成色氨酸的过程^[73, 75-76] (图 2)。

大肠杆菌细胞工厂合成色氨酸主要存在以下瓶颈: ①色氨酸的生物合成途径中关键酶 AroG、TrpE 存在反馈阻遏, 例如 AroG 受苯丙氨酸和酪氨酸协同反馈抑制, 色氨酸增强这种抑制, 当 3 种氨基酸共同存在时最大抑制作用接近 90%; TrpE 不仅受色氨酸反馈抑制, 而且还受色氨酸的反馈阻遏^[62, 73]。②色氨酸对色氨酸合成路径关键酶 (色氨酸操纵子 *trpEDCBA*) 与转运蛋白 (*mtr*) 存在反馈阻遏^[77-79]。③芳香族氨基酸合成支路与色氨酸合成途径的竞争代谢流, 减弱了色氨酸合成的代谢流^[73]。④在大肠杆菌色氨酸的代谢调控中, 采用降解色氨酸的方式调控胞内色氨酸的浓度, 色氨酸酶 (TnaA) 将色氨酸降解为吲哚、氨和丙酮酸^[80]。

2.2 色氨酸大肠杆菌细胞工厂的构建与优化

大肠杆菌细胞中存在天然的色氨酸生物合成途径, 通过强化本源代谢路径, 可以实现大肠杆菌色氨酸的合成。Aiba 等^[59] 在色氨酸操纵子阻遏蛋白 (TrpR) 和色氨酸酶 (TnaA) 双缺陷菌株中, 强化色氨酸操纵子基因的表达, 并通过化学诱变, 构建了可以生产 30 g/L 色氨酸的大肠杆菌细胞工厂; 在此基础上, 研究人员通过加入表面活性剂, 降低发酵液中色氨酸的溶解度, 加速色氨酸结晶, 使色氨酸产量增加到 54.5 g/L。近年来, 围绕大肠杆菌细胞工厂生产色氨酸的研究工作主要集中在阻断支路代谢和色氨酸分解代谢、解除色氨酸反馈调节与增加前体供应。敲除或者弱化芳香族氨基酸合成支路关键酶 PheA (预苯酸脱水酶) 和 TyrA (预苯酸脱氢酶), 可以阻断色氨酸合成途径的竞争支路, 增加色氨酸合成的代谢流^[73]; 敲除色氨酸酶 (TnaA) 可以减弱色氨酸的分解^[80], 例如敲除 *tnaA* 的, 使工程菌 *E. coli* FB-02/pSV03 的色氨酸产量增加了 1.7 倍, 达到 7.8 g/L。在此基础上, 敲除 *pheA* 和 *tyrA*, 使色氨酸的产量增加了 0.7 倍达到 13.3 g/L^[60]。解除色氨酸反馈调节主要包括解除色氨酸对色氨酸合成路径关键酶的反馈阻遏与解除中间代谢物对关键酶的反馈抑制。通过敲除 *trpR* (编码阻遏蛋白 TrpR 基因), 解除了阻遏蛋白 TrpR, 对色氨酸合成路径关键酶 (色氨酸操纵子

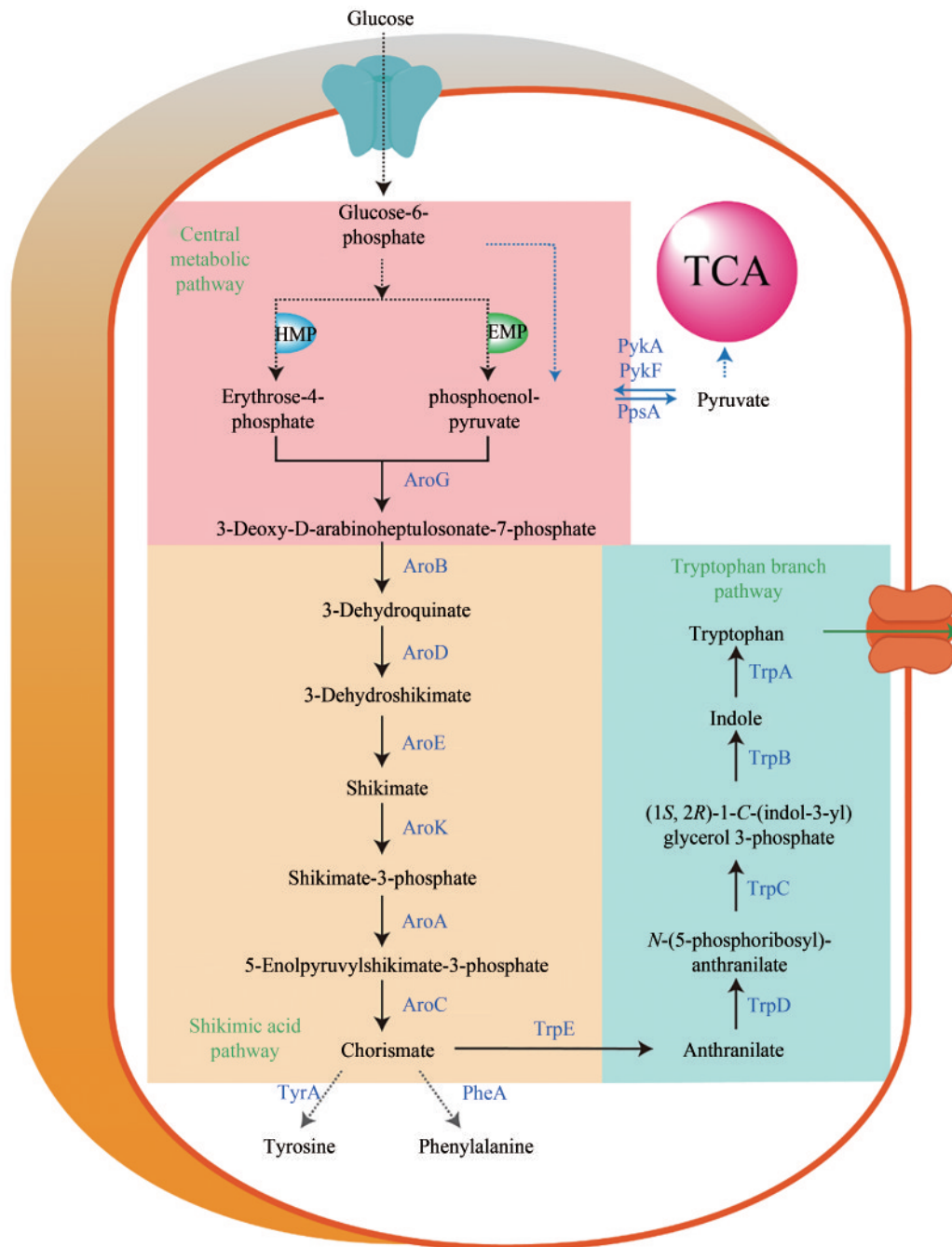


图2 大肠杆菌色氨酸合成代谢路径

途径涉及的关键酶: PykF, PykA—丙酮酸激酶; PpsA—磷酸烯醇式丙酮酸合酶; AroG—3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合酶; AroB—3-脱氢奎宁酸合酶; AroD—3-脱氢奎宁酸脱水酶; AroE—莽草酸脱氢还原酶; AroK—莽草酸激酶; AroA—5-烯醇式丙酮酰胺莽草酸合酶; AroC—分支酸合酶; TrpE—邻氨基苯甲酸合酶; TrpD—邻氨基苯甲酸焦磷酸转移酶; TrpC—邻氨基苯甲酸异构酶; TrpB—色氨酸合酶; TrpA—吲哚甘油 3-磷酸酶; TyrA—预苯酸脱氢酶; PheA—预苯酸脱水酶

Fig. 2 Schematic of the tryptophan biosynthetic pathway in *E. coli*

Key enzymes in metabolic pathway: PykF, PykA—pyruvate kinase; PpsA—phosphoenolpyruvate synthase; AroG—3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate (DHAP) synthase; AroB—3-dehydroquinate synthase; AroD—3-dehydroshikimate dehydratase; AroE—shikimate 5-dehydrogenase; AroK—shikimate kinase; AroA—EPSP synthase; AroC—chorismate synthase; 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; TyrA—chorismate dehydrogenase; PheA—chorismate dehydratase

trpEDCBA)与转运蛋白(*mtr*)的反馈阻遏^[77-79]。例如,在工程菌*E. coli* AE1(pSC101 *trp*·I15)中敲除*trpR*,获得工程菌*E. coli* Ram(pSC101 *trp*·I15),使色氨酸产量增加了5.4倍^[61]。筛选抗反馈调节的突变体,是解除中间代谢物对色氨酸合成关键酶反馈抑制的有效手段。例如将AroG(DAHP合酶)第150位的氨基酸残基由脯氨酸突变为亮氨酸(P150L),或者把第146位的天冬氨酸突变为天冬酰胺(D146N),可以完全解除苯丙氨酸对AroG的反馈抑制^[81];将TrpE(邻氨基苯甲酸合酶)第40位的丝氨酸突变为苯丙氨酸(S40F),可以完全解除色氨酸对TrpE的反馈抑制^[78]。在苯丙氨酸合成菌株中,将AroG的第146位氨基酸残基由天冬氨酸突变为天冬酰胺(D146N),使苯丙氨酸的产量增加了51.4%^[82]。色氨酸有两个关键前体:PEP和E4P,它们是色氨酸合成路径中关键中间代谢物DAHP的限制性底物,直接决定色氨酸合成能力^[83]。目前增加胞内PEP含量的常用策略包括:①阻断PEP竞争支路代谢,例如敲除PykF与PykA(丙酮酸激酶),与敲除Ppc(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶)^[84];②阻断磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(PTS),减少葡萄糖转运过程中PEP的消耗^[85-86];③敲除碳储存调控因子(CsrA),增强糖酵解途径碳通量^[87];④增强PEP循环再利用,例如过表达PpsA(磷酸烯醇式丙酮酸合酶)^[88]。目前增加胞内E4P含量的主要策略:①过表达TktA(转酮酶)^[89];②敲除Pgi(磷酸葡萄糖异构酶)^[90]。例如,Zhang等^[62]首先通过表达色氨酸操纵子(*trpEDCBA*)、抗反馈调节的DAHP合酶(AroG^{br})和敲除色氨酸阻遏蛋白(TrpR),构建了合成色氨酸的底盘微生物,并通过敲除*pykF*和*ptsH*,增加胞内PEP含量,使色氨酸产量增加到11 g/L。为了恢复细胞生长,通过组合优化葡萄糖激酶(GalP)和半乳糖渗透酶(Glk)的表达,使色氨酸的产量增加到37 g/L,在此基础上,通过抑制乙酰磷酸转移酶表达减弱乙酸的积累,使色氨酸的产量进一步增加到39.7 g/L,对葡萄糖的转化率增加到16.7%^[62]。Chen等^[63]在前期构建合成色氨酸底盘微生物*E. coli* TRTH的基础上,利用不同强度的启动子和不同拷贝数的质粒组合优化乙酰辅酶A合酶,重构了TCA循环,增加了前

体PEP的供应,减弱了乙酸的积累,获得工程菌*E. coli* T16,使色氨酸的产量增加到54.6 g/L(表1)。

3 缬氨酸大肠杆菌细胞工厂

3.1 缬氨酸的生物合成途径

缬氨酸不仅可以促进哺乳动物的乳汁分泌,而且还可以提高动物的免疫力,增加动物细胞外伤治愈的作用^[5-8]。葡萄糖经糖酵解途径合成缬氨酸重要前体丙酮酸,2分子丙酮酸在乙酰羟酸合酶(IlvBN、IlvGM和IlvIH)作用下缩合成2-乙酰羟酸。然后,在乙酰羟酸还原异构酶(IlvC)的催化下,将2-乙酰羟酸催化生成双羟基异戊酸。最后,双羟基异戊酸经过二羟酸脱水酶(IlvD)脱水形成2-酮异戊酸,2-酮异戊酸在转氨酶B(IlvE)作用下形成缬氨酸^[64](图3)。

大肠杆菌细胞工厂合成缬氨酸主要存在以下问题:①乙酰羟酸合酶受缬氨酸反馈抑制,而且亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸对转氨酶B存在协同反馈抑制^[65];②强化缬氨酸转运,降低胞内缬氨酸的积累,减缓缬氨酸积累造成的反馈抑制^[64, 91];③由于乙酰羟酸还原异构酶催化活性需要辅因子NADPH提供还原力,因此缬氨酸合成需要提供充足的辅因子^[66];④缬氨酸关键前体丙酮酸也可合成丙氨酸、乙酰辅酶A、草酰乙酸等,这些代谢物的合成,竞争了缬氨酸的前体物质^[64]。

3.2 缬氨酸大肠杆菌细胞工厂的构建与优化

通过改造大肠杆菌本源代谢路径,可以实现缬氨酸的合成。例如,Park等^[64]通过定点突变获得抗反馈调节的乙酰羟酸合酶III,并在基因组上用tac启动子强化缬氨酸操纵子(ilvGMEDA)的表达,同时敲除苏氨酸脱水酶(IlvA)、2-异丙基苹果酸合酶(LeuA)和3-甲基-2-氧代丁酸羟甲基转移酶(PanB),再强化乙酰羟酸合酶(IlvBN)表达,获得工程菌*E. coli* Val可以生产1.31 g/L的缬氨酸。为了进一步提高缬氨酸的产量,开发了强化代谢合成路径效率、辅因子工程和转运子工程策略。强化代谢合成路径效率包括强化前体供

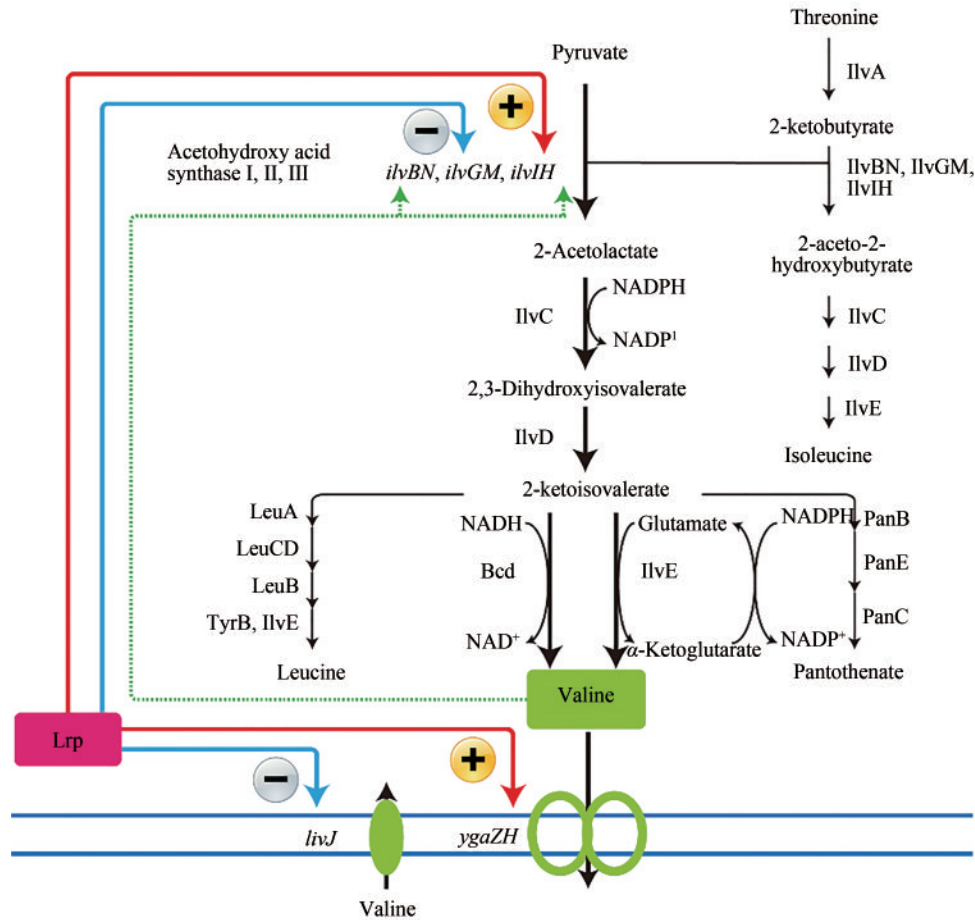


图3 大肠杆菌缬氨酸合成代谢路径

(绿色虚线箭头表示缬氨酸的反馈抑制, 蓝色箭头表示Lrp反馈阻遏, 红色箭头表示Lrp反馈激活)

途径涉及的关键酶: IlvC—乙酰羟酸还原异构酶; IlvD—二羟酸脱水酶; Bcd—亮氨酸脱氢酶; LeuA—异丙基苹果酸合酶;

LeuCD—异丙基苹果酸异构酶; LeuB—3-异丙基苹果酸脱氢酶; ThrB, IlvE—芳香族氨基酸转移酶;

PanB—3-甲基-2-氧代丁酸羟甲基转移酶; PanE—2-脱氢抗坏血酸还原酶; PanC—泛酸-β-丙氨酸连接酶

途径涉及的关键基因: *livJ*—缬氨酸转运蛋白编码基因; *ygaZH*—缬氨酸外排蛋白编码基因; *ilvBN*—乙酰羟酸合酶I编码基因;

ilvGM—乙酰羟酸合酶II编码基因; *ilvIH*—乙酰羟酸合酶III编码基因

Fig. 3 Schematic of valine biosynthetic pathway in *E. coli*

(Green dotted arrows indicate feedback inhibition by valine, blue dotted arrows indicate feedback repression, red arrows indicate activation of gene expression, and black arrows indicate one-step metabolic pathways)

Key enzymes in metabolic pathway: IlvC—aceto-hydroxy acid isomeroreductase; IlvD—dihydroxy acid dehydratase; Bcd—leucine dehydrogenase; LeuA—isonpropylmalate synthase; LeuCD—isonpropylmalate isomerase; LeuB—3-isonpropylmalate dehydrogenase; ThrB, IlvE—aromatic amino acid transaminase; PanB—3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase; PanE—2-dehydropantoate reductase; PanC—pantoate-β-alanine ligase
Key genes in metabolic pathway: *livJ*—valine transporter-encoding gene; *ygaZH*—valine exporter-encoding gene; *ilvBN*—aceto-hydroxy acid synthase I-encoding gene; *ilvGM*—aceto-hydroxy acid synthase II-encoding gene; *ilvIH*—aceto-hydroxy acid synthase III-encoding gene

应和解除路径酶的反馈抑制。例如 Park 等^[64] 利用网络模型模拟基因敲除对缬氨酸生产的影响, 发现敲除丙酮酸脱氢酶 (AceF)、磷酸丙糖异构酶 (TpiA)、磷酸果糖激酶 (PfkA/B) 和苹果酸脱氢酶 (Mdh), 可以增加缬氨酸前体丙酮酸的积累, 并通过实验验证发现敲除 AceF、PfkA 和 Mdh, 使缬氨酸产量增加 1.27 倍。研究人员发现将乙酰羟

酸合酶小亚基 (IlvN) 的第 20~22 位氨基酸残基分别由甘氨酸 (G)、缬氨酸 (V)、甲硫氨酸 (M) 替换为天冬氨酸 (D)、天冬氨酸 (D) 和苯丙氨酸 (F), 解除了缬氨酸对乙酰羟酸合酶的反馈抑制, 使缬氨酸的产量增加了 22%^[65]。辅因子工程策略包括修饰辅因子特异性与辅因子再生。例如, 在缬氨酸生产过程中, 使用枯草芽孢杆菌来源

NADH依赖性的亮氨酸脱氢酶 (BsLeuDH), 替换大肠杆菌本源 NADPH 依赖性的氨基转移酶 (EcilvE), 使缬氨酸产量增加了 2.2 倍^[66]。Hao 等^[67] 通过借鉴改变谷氨酸棒杆菌乙酰羟酸还原异构酶辅因子偏好性的方法, 将大肠杆菌乙酰羟酸还原异构酶 (EcilvC) 的第 67 位氨基酸残基由亮氨酸 (L) 替换为谷氨酸 (E)、第 68 位氨基酸残基由精氨酸 (R) 替换为苯丙氨酸 (F)、第 75 位氨基酸残基由赖氨酸 (K) 替换为谷氨酸, 使 EcilvC 从 NADPH 依赖性改变成为 NADH 依赖性。在此基础上, 利用 BsLeuDH 替换 EcilvE, 使缬氨酸产量增加了 5.6 倍。为了强化缬氨酸合成过程中辅因子的供给, 强化吡啶核苷酸转氨酶的表达, 将 NADH/NAD⁺ 的比例从 11.0 增加到 11.9, 使缬氨酸产量增加了 5.3%; 而敲除乳酸脱氢酶、丙酮酸甲酸裂解酶和乙醇脱氢酶减少辅因子的消耗, 将 NADH/NAD⁺ 的比例从 11.0 增加到 13.5, 使缬氨酸的产量增加了 23.5%^[67]。研究表明, 增强缬氨酸的转运, 是降低胞内缬氨酸积累水平、缓解缬氨酸积累引起反馈抑制的有效策略^[64]。例如, 在 *E. coli* VHY13 中, 过表达谷氨酸棒杆菌来源的缬氨酸转运蛋白 (BrnFE), 使缬氨酸产量增加了 72%^[67]。在工程菌 *E. coli* Val 中, 过表达大肠杆菌本源的缬氨酸转运蛋白 (YgaZH), 使缬氨酸产量增加了 47.1%^[64] (表 1)。

4 精氨酸大肠杆菌细胞工厂

4.1 精氨酸的生物合成途径

精氨酸在生命活动过程中有着十分重要的作用, 参与哺乳动物细胞内的氨解毒、激素的分泌 (包括生长激素、催乳素、胰岛素、胰高血糖素等) 以及免疫系统等多种生化反应, 主要是促进动物生长发育、提高幼仔的存活率、改善肉质、提高饲料利用率等^[5-8]。糖酵解途径形成的丙酮酸, 以乙酰辅酶 A 的形式进入柠檬酸循环, 柠檬酸循环中的 α -酮戊二酸在谷氨酸合酶或者谷氨酸脱氢酶的催化下形成精氨酸的前体谷氨酸。如图 4 所示, 根据乙酰化的作用方式, 可以将微生物精

氨酸合成路径分为线性途径、经济循环途径和新合成途径 3 种^[92]。其中, 大肠杆菌本源的精氨酸生物合成途径是线性途径^[92]。在线性合成路径中, 谷氨酸在 *N*-乙酰谷氨酸合酶 (ArgA) 的作用下合成乙酰谷氨酸, 再经过乙酰谷氨酸激酶 (ArgB)、*N*-乙酰谷氨酸半醛脱氢酶 (ArgC)、乙酰鸟氨酸转氨酶 (ArgD)、乙酰鸟氨酸酶 (ArgE)、鸟氨酸转氨甲酰酶 (ArgF)、精胺琥珀酸合酶 (ArgG) 和精氨酸琥珀酸酶 (ArgH) 作用下, 形成精氨酸^[69, 93] [图 4(a)]。在经济循环途径中由于不存在乙酰谷氨酸合酶, 乙酰鸟氨酸在乙酰鸟氨酸转移酶 (ArgJ) 的催化下形成鸟氨酸, 同时将乙酰基转移到谷氨酸上生成乙酰谷氨酸, 即乙酰鸟氨酸转移酶同时发挥乙酰谷氨酸合酶和乙酰鸟氨酸酶的作用, 从而使乙酰基团在精氨酸合成途径中循环利用^[92] [图 4(b)]。此外, 在野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 中, 发现一条合成精氨酸的新途径, 在该合成途径中, 乙酰鸟氨酸被乙酰鸟氨酸氨甲酰转移酶 (ArgF') 催化生成乙酰瓜氨酸, 然后乙酰瓜氨酸被催化脱乙酰生成瓜氨酸, 再由瓜氨酸合成精氨酸^[94] [图 4(c)]。

大肠杆菌细胞工厂合成精氨酸主要存在以下瓶颈: ①精氨酸合成路径关键酶 *N*-乙酰谷氨酸合酶, 及其合成路径酶 (ArgB、ArgC、ArgD、ArgE、ArgF、ArgG 和 ArgH) 均受到精氨酸的反馈抑制^[95]; ②精氨酸与 ArgR (精氨酸合成途径阻遏蛋白) 相互作用, 反馈阻遏精氨酸合成路径^[96]; ③谷氨酸不仅是合成精氨酸的前体物质, 同时也用于合成脯氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸, 减弱了合成精氨酸的代谢流^[92]; ④由于大肠杆菌中存在精氨酸分解代谢途径 (例如精氨酸酶途径、精氨酸脱亚氨基酶途径、精氨酸琥珀酰转移酶途径等), 胞内合成的精氨酸如不及时转运到胞外, 会增加精氨酸分解代谢的风险^[92, 97]。

4.2 精氨酸大肠杆菌细胞工厂的构建与优化

Rajagopal 等^[98] 在抗反馈调节 *N*-乙酰谷氨酸合酶突变株 *E. coli* EE11、*E. coli* EE17 和 *E. coli* EE51 中, 过表达氨基甲酸酯磷酸合酶和精氨酸酶, 使精氨酸

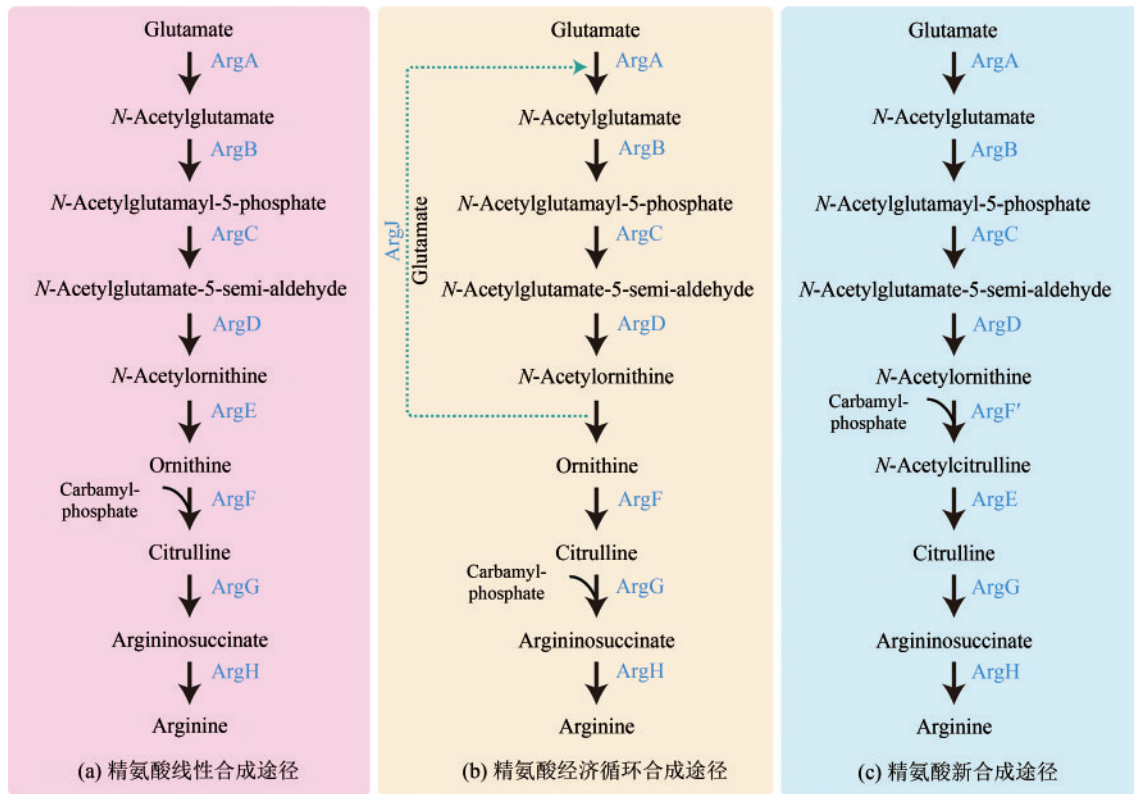


图4 微生物体内精氨酸合成代谢途径

途径涉及的关键酶: ArgA—*N*-乙酰谷氨酸合酶; ArgJ—乙酰鸟氨酸转移酶; ArgB—乙酰谷氨酸激酶;
ArgC—*N*-乙酰谷氨酸半醛脱氢酶; ArgD—乙酰鸟氨酸转氨酶; ArgE—乙酰鸟氨酸酶; ArgF—鸟氨酸转甲酰酶;
ArgF'—乙酰鸟氨酸氨甲酰转移酶; ArgG—精胺琥珀酸合酶; ArgH—精氨酸琥珀酸酶

Fig. 4 Schematic of arginine biosynthetic pathway in microorganisms

Key enzymes in metabolic pathway: ArgA—acetylglutamate synthase; ArgJ—ornithine acetyltransferase; ArgB—acetylglutamate kinase;
ArgC—acetylglutamate semialdehyde dehydrogenase; ArgD—acetylmornithine transaminase; ArgE—acetylmornithine deacetylase;
ArgF—ornithine transcarbamylase; ArgF'—acetylmornithine carbamoyltransferase; ArgG—argininosuccinate synthase; ArgH—arginosuccinase

产率提高了3~15倍。Xu等^[68]在*E. coli* JM109中, 过量表达钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum* SYPA5-5)来源的argCJBD FRGH基因簇(argR已失活), 可以积累40 mg/L的精氨酸。为了进一步强化精氨酸大肠杆菌细胞工厂的生产性能, 发展了阻断竞争代谢路径、强化精氨酸转运、解除精氨酸对关键酶的反馈抑制等策略。例如Ginesy等^[69]以*E. coli* C600+为出发菌株, 首先敲除SpeC(鸟氨酸脱羧酶)、SpeF(鸟氨酸脱羧酶)和AdiA(精氨酸脱羧酶), 阻断竞争代谢路径; 敲除ArgR(精氨酸合成途径阻遏蛋白)和过表达抗反馈调节的ArgA215, 解除精氨酸的反馈抑制, 使精氨酸产量增加到3.03 g/L。在此基础上, 研究人员通过敲除本源ArgA和增加ArgA215的拷贝数, 使精氨酸产量进一步增加到4.11 g/L。然后, 通过表达ArgO

(精氨酸转运蛋白), 强化精氨酸的转运, 获得工程菌*E. coli* SJB009, 使精氨酸产量增加到11.64 g/L。Ginesy等^[99]对发酵条件进一步优化, 在最优发酵条件下, 使工程菌*E. coli* SJB009精氨酸得率增加到0.16 g/g。此外, Sander等^[70]在*E. coli* MG1655中过表达精氨酸转运蛋白(ArgO)和抗反馈调节的ArgAH15A, 同时敲除ArgR, 获得工程菌*E. coli* KO, 可以生产1.03 g/L的精氨酸。但是, 研究人员发现敲除ArgR会影响工程菌生长, 降低发酵生产性能。利用代谢组学和蛋白质组学技术分析, 发现敲除ArgR导致鸟氨酸氨基甲酰基转移酶活性增加17倍, 干扰了精氨酸-嘧啶的分支点, 限制了嘧啶核苷酸的生物合成, 导致ArgR缺失菌株生长不良。利用CRISPRi技术在基因组上下调ArgR, 使工程菌的细胞生长速率增加2倍^[70](表1)。

5 展 望

在饲料中添加饲用氨基酸,可以适当降低原料中的蛋白质水平,降低饲料生产成本,降低氨排放,减少环境污染。然而,由于天然大肠杆菌细胞工厂合成饲用氨基酸的生产性能较低,不具备工业生产的经济可行性。因此,需要借助合成生物学与代谢工程技术,重新设计与优化大肠杆菌细胞工厂,提高饲用氨基酸细胞工厂的生产性能。目前,研究人员利用合成生物学技术,改造大肠杆菌细胞工厂,实现了色氨酸、苏氨酸和缬氨酸工业化生产,改造谷氨酸棒杆菌细胞工厂实现了精氨酸、赖氨酸工业化生产。然而,由于甲硫氨酸代谢合成网络的复杂性,导致微生物细胞工厂还难以实现甲硫氨酸的工业化生产。

随着市场对饲用氨基酸需求的不断增加,氨基酸生产市场的同质性竞争日趋激烈,提高工程菌株鲁棒性,降低饲用氨基酸生产成本,与提升饲用氨基酸生产技术水平是未来的发展方向。提高大肠杆菌细胞工厂的鲁棒性,不仅可以增强大肠杆菌细胞工厂对有害环境的耐受能力,而且还可以提升饲用氨基酸发酵性能,简化发酵过程控制和产品分离提纯工艺,降低生产成本,例如通过与合成生物学相结合的诱变育种策略,提高了工程菌对噬菌体的鲁棒性。目前,主要以“粮食作物生物质”为原料生产饲用氨基酸,存在“与人争粮、与粮争地”等问题。利用合成生物学与代谢工程技术,构建了以甘油、木质纤维素水解液和细菌细胞裂解液等非粮生物质为原料的饲用氨基酸生产菌株,不仅可以降低饲用氨基酸发酵生产成本,而且还可以实现“不与人争粮、不与粮争地”的目标,例如,研究人员利用合成生物学技术与代谢工程技术,对大肠杆菌细胞工厂进行改造,实现了以木质纤维素水解液为底物生产赖氨酸,以细菌细胞裂解液作为氮源生产色氨酸,以甘油为底物生产色氨酸。

然而,由于大肠杆菌细胞精密的调控机制、复杂的代谢调控网络以及外界胁迫环境,限制了饲用氨基酸大肠杆菌细胞工厂性能的进一步提升。此外,基于基因敲除和过表达的静态调控策略,通过剪接代谢路径,构建的合成目标化学品代谢

通路,常常导致宿主菌代谢流扰动与失衡,增加细胞代谢负荷,降低了大肠杆菌细胞工厂的生产性能,限制了饲用氨基酸生产技术水平提升。因此,开发大肠杆菌全细胞代谢网络模型,计算和设计饲用氨基酸的最优合成路径;发展新型生物传感器,建立响应外界环境与胞内代谢物的基因回路,精确调节饲用氨基酸合成路径的物质流和能量流;研究外界胁迫环境对大肠杆菌细胞的影响,特异性增强大肠杆菌细胞对外界胁迫环境的耐受性,是未来的发展方向。

参 考 文 献

- [1] 刘华阳,李祥明.我国疯牛病传染因子研究进展[J].饲料工业,2020,41(15):60-64.
LIU H Y, LI X M. Research progress of infectious factor of BSE in China[J]. Feed Industry, 2020, 41(15): 60-64.
- [2] KIDD M T, MAYNARD C W, MULLENIX G J. Progress of amino acid nutrition for diet protein reduction in poultry[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2021, 12(1): 45-45.
- [3] DO CARMO FELIX F K, JUNIOR LETTI L A, DE MELO PEREIRA G V, et al. 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.
- [4] KARAU A, GRAYSON I. Amino acids in human and animal nutrition[M]// ZORN H, CZERMAK P. Biotechnology of food and feed additives, 2014: 189-228.
- [5] 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 advance on nutritional effects of several major feeding amino acid[J]. China Feed Additive, 2016(1): 10-13.
- [6] ZHANG Y N, WANG S, DENG Y Z, et al. The application of reduced dietary crude protein levels supplemented with additional amino acids in laying ducks[J]. Poultry Science, 2021, 100(4): 1-7.
- [7] YANG Z Y, HTOO J K, LIAO S F. Methionine nutrition in swine and related monogastric animals: beyond protein biosynthesis[J]. Animal Feed Science and Technology, 2020, 268: 114608.
- [8] YOHAN P, JU-HWAN P, SURYEON P, et al. Enhanced cellular uptake and pharmacokinetic characteristics of doxorubicin-valine amide prodrug[J]. Molecules, 2016, 21(10): 1-9.
- [9] 谭伟杰.2016年中国饲用氨基酸产业透视[J].中国畜牧杂志,2016,52(8):12-16.

- TAN W J. The perspective of China feed amino acid industry in 2016[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2016, 52(8): 12-16.
- [10] 董德宽. 合成的饲用氨基酸[J]. 国外畜牧科技, 1983(6): 11-12.
- DONG D K. Synthetic feed amino acids[J]. Animal Science Abroad, 1983(6): 11-12.
- [11] LIU Y N, LI Q, ZHENG P, et al. Developing a high-throughput screening method for threonine overproduction based on an artificial promoter[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 1-11.
- [12] 董迅衍, 王小元. 微生物生产L-苏氨酸的代谢工程研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2016(12): 1233-1240.
- DONG X Y, WANG X Y. Advances in microbial metabolic engineering to increase L-threonine production[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(12): 1233-1240.
- [13] 鲁佩玉, 孙青华. 发酵法生产氨基酸工艺研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(1): 176-178.
- LU P Y, SUN Q H. Study on the production process of amino acids by fermentation method[J]. China Condiment, 2019, 44(1): 176-178.
- [14] LIU L, BILAL M, LUO H, et al. Metabolic engineering and fermentation process strategies for L-tryptophan production by *Escherichia coli*[J]. Processes, 2019, 7(4): 1-17.
- [15] YANG D, PARK S Y, PARK Y S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for natural product biosynthesis[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(7): 745-765.
- [16] WEI J, WANG Z, YU H, et al. Construction and fermentation of L-threonine-producing recombinant *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 695-706.
- [17] HUCCEGULLARI D, LUO Z W, LEE S Y. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 1-29.
- [18] CHEN X, GAO C, GUO L, et al. DCEO biotechnology: tools to design, construct, evaluate, and optimize the metabolic pathway for biosynthesis of chemicals[J]. Chemical Reviews, 2017, 118(1): 4-72.
- [19] D'ESTE M, ALVARADO-MORALES M, ANGELIDAKI I. Amino acids production focusing on fermentation technologies-A review[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(1): 14-25.
- [20] WENDISCH V F. Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production[J]. Metabolic Engineering, 2020, 58: 17-34.
- [21] 马倩, 夏利, 谭淼, 等. 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, 2020, 37(5): 1-20.
- MA Q, XIA L, TAN M, et al. Advances and prospects in metabolic engineering for the production of amino acids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1-20.
- [22] 赵嫚, 彭莉, 成浩, 等. 微生物甲硫氨酸合成调控的综合研究进展与展望[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 257-264.
- ZHAO M, PENG L, CHENG H, et al. Advances on the biosynthesis and regulation of methionine[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(24): 257-264.
- [23] BECKER J, WITTMANN C. A field of dreams: lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(6): 1073-60.
- [24] CHEN Z, LIU D. Toward glycerol biorefinery: metabolic engineering for the production of biofuels and chemicals from glycerol[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 205.
- [25] 王昕, 王静, 陈可泉, 等. 合成生物技术制备脂肪族二元胺的研究进展[J]. 合成生物学, 2020, 1(1): 71-83.
- WANG X, WANG J, CHEN K Q, et al. Research progress in bioproduction of aliphatic diamines by synthetic biotechnology[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(1): 71-83.
- [26] TROENDLE J, SCHOPPEL K, BLEIDT A, et al. Metabolic control analysis of L-tryptophan production with *Escherichia coli* based on data from short-term perturbation experiments[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 307: 15-28.
- [27] DAS A, TYAGI N, VERMA A, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 strain by incorporating genome-level modifications and synthetic plasmid modules to enhance L-Dopa production from glycerol[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2018, 48(8): 671-682.
- [28] PONTRELLI S, CHIU T-Y, LAN E I, et al. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 16-46.
- [29] LEE J-H, WENDISCH V F. Production of amino acids - Genetic and metabolic engineering approaches[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1575-1587.
- [30] LEE S Y, KIM H U, CHAE T U, et al. A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals[J]. Nature Catalysis, 2019, 2(1): 18-33.
- [31] YANG Z Y, HASAN M S, HTOO J K, et al. Effects of dietary supplementation of L-methionine vs. DL-methionine on performance, plasma concentrations of free amino acids and other metabolites, and myogenesis gene expression in young growing pigs[J]. Translational Animal Science, 2019, 3(1): 329-339.
- [32] WANG Y-Y, XU J-Z, ZHANG W-G. Metabolic engineering of L-leucine production in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*: a review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2019, 39(5): 633-647.
- [33] MA Q, ZHANG Q, XU Q, et al. Systems metabolic engineering strategies for the production of amino acids[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2017, 2(2): 87-96.
- [34] 张震, 熊海波, 徐庆阳. 大肠杆菌高密度培养发酵L-色氨酸[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(23): 15-20.
- ZHANG Z, XIONG H B, XU Q Y. L-tryptophan fermentation by high cell density culture of *Escherichia coli*[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(23): 15-20.

- [35] LI Y, WEI H, 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: 1588-1602.
- [36] FANG Y, WANG J, MA W, et al. Rebalancing microbial carbon distribution for L-threonine maximization using a thermal switch system[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 33-46.
- [37] YANG D, YOO S M, GU C, et al. Expanded synthetic small regulatory RNA expression platforms for rapid and multiplex gene expression knockdown[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 180-190.
- [38] HUANG J F, LIU Z Q, JIN L Q, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial production of L-methionine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 843-851.
- [39] HUANG J-F, SHEN Z-Y, MAO Q-L, et al. Systematic analysis of bottlenecks in a multibranch and multilevel regulated pathway: the molecular fundamentals of L-methionine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(11): 2577-2589.
- [40] TELEKI A, RAHNERT M, BUNGART O, et al. Robust identification of metabolic control for microbial L-methionine production following an easy-to-use puristic approach[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 159-172.
- [41] ZHAO H, FANG Y, WANG X, et al. Increasing L-threonine production in *Escherichia coli* by engineering the glyoxylate shunt and the L-threonine biosynthesis pathway[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(13): 5505-5518.
- [42] XU J-Z, YANG H-K, ZHANG W-G. NADPH metabolism: a survey of its theoretical characteristics and manipulation strategies in amino acid biosynthesis[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(7): 1061-1076.
- [43] 高虎涛, 申晓林, 孙新晓, 等. 代谢工程调控策略在生物合成氨基酸及其衍生物中的应用[J]. *化工学报*, 2020, 71(9): 4058-4070.
- GAO H T, SHEN X L, SUN X X, et al. Metabolic engineering strategies in biosynthesis of amino acids and their derivatives[J]. *CIESC Journal*, 2020, 71(9): 4058-4070.
- [44] 李华, 董伟, 李由然, 等. 大肠杆菌 MetD 运输系统缺失对蛋氨酸积累的影响[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(6): 1416-1426.
- LI H, DONG W, LI Y R, et al. Effect of inactivating MetD transporter system of *Escherichia coli* W3110 on L-methionine production[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(6): 1416-1426.
- [45] LIU Q, LIANG Y, ZHANG Y, et al. YjeH Is a novel exporter of L-methionine and branched-chain amino acids in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(22): 7753-7766.
- [46] 杨冬美, 李华, 李由然, 等. 大肠杆菌 TdcC、SstT 和 LIV-1 系统缺失对胞外 L-苏氨酸积累的影响[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(1): 20-29.
- YANG D M, LI H, LI Y R, et al. Effects of TdcC、SstT and LIV-1 systems deletion of *Escherichia coli* on extracellular L-threonine accumulation[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(1): 20-29.
- [47] YING H X, HE X, LI Y, et al. Optimization of culture conditions for enhanced lysine production using engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(8): 3835-3843.
- [48] XU J, HAN M, REN X, 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.
- [49] GENG F, CHEN Z, ZHENG P, et al. Exploring the allosteric mechanism of dihydrodipicolinate synthase by reverse engineering of the allosteric inhibitor binding sites and its application for lysine production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(5): 1963-1971.
- [50] WANG X, LI Q, SUN C, et al. GREACE-assisted adaptive laboratory evolution in endpoint fermentation broth enhances lysine production by *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18: 1-13.
- [51] PIAO X, WANG L, LIN B, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of L-aspartate and its derivative beta-alanine with high stoichiometric yield[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 244-254.
- [52] WANG S, HOU Y, CHEN X, et al. Kick-starting evolution efficiency with an autonomous evolution mutation system[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 127-136.
- [53] YE C, LUO Q, 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.
- [54] ZHANG X, YAN J A, YU L, et al. Construction of recombinant plasmids containing threonine operon and their effects on L-threonine accumulation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(5): 591-596.
- [55] LI Y J, ZHANG D Z, CAI N Y, et al. Betaine supplementation improved L-threonine fermentation of *Escherichia coli* THRD by upregulating *zwf* (glucose-6-phosphate dehydrogenase) expression[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2019, 39: 67-73.
- [56] LIU J, LI H, XIONG H, et al. Two-stage carbon distribution and cofactor generation for improving L-threonine production of *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(1): 110-120.
- [57] TANG X-L, DU X-Y, CHEN L-J, et al. Enhanced production of L-methionine in engineered *Escherichia coli* with efficient supply of one carbon unit[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(3): 429-436.
- [58] LI H, WANG B S, LI Y R, et al. Metabolic engineering of

- Escherichia coli* W3110 for the production of L-methionine[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017, 44(1): 75-88.
- [59] AZUMA S, TSUNEKAWA H, OKABE M, et al. Hyper-production of L-tryptophan *via* fermentation with crystallization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 39: 471-476.
- [60] ZHAO Z-J, ZOU C, ZHU Y-X, et al. Development of L-tryptophan production strains by defined genetic modification in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(12): 1921-1929.
- [61] AIBA S, TSUNEKAWA H, IMANAKA T. New approach to tryptophan production by *Escherichia coli*: genetic manipulation of composite plasmids *in vitro*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(2): 289-297.
- [62] CHEN Y, LIU Y, DING D, et al. Rational design and analysis of an *Escherichia coli* strain for high-efficiency tryptophan production[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2018, 45(5): 357-367.
- [63] DU L, ZHANG Z, XU Q, et al. New strategy for removing acetic acid as a by-product during L-tryptophan production[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2019, 33(1): 1471-1480.
- [64] PARK J H, LEE K H, KIM T Y, et al. 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.
- [65] PARK J H, KIM T Y, LEE K H, et al. Fed-batch culture of *Escherichia coli* for L-valine production based on *in silico* flux response analysis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(4): 934-946.
- [66] SAVRASOVA E A, STOYNOVA N V. Application of leucine dehydrogenase Bcd from *Bacillus subtilis* for L-valine synthesis in *Escherichia coli* under microaerobic conditions[J]. Heliyon, 2019, 5(4): e01406.
- [67] HAO Y, MA Q, LIU X, et al. High-yield production of L-valine in engineered *Escherichia coli* by a novel two-stage fermentation[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 198-206.
- [68] XU M, RAO Z, YANG J, et al. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic argC similar to H cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of L-arginine production[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(3): 495-502.
- [69] GINESY M, BELOTSEKOVSKY J, ENMAN J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced arginine biosynthesis[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 1-11.
- [70] SANDER T, WANG C Y, GLATTER T, et al. CRISPRi-based downregulation of transcriptional feedback improves growth and metabolism of arginine overproducing *E. coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(9): 1983-1990.
- [71] 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.
- [72] CHEN L, CHEN M, MA C, et al. Discovery of feed-forward regulation in L-tryptophan biosynthesis and its use in metabolic engineering of *E. coli* for efficient tryptophan bioproduction[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 434-444.
- [73] LI M, LIU C, YANG J, et al. Common problems associated with the microbial productions of aromatic compounds and corresponding metabolic engineering strategies[J]. Biotechnology Advances, 2020, 41: 107548.
- [74] JIANG J, LIU T, LIN S. Research progress on the biosynthesis of aromatic compounds by microorganisms[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2019, 31(5): 430-448.
- [75] LI Z, WANG H, DING D, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of chemicals derived from the shikimate pathway[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2020, 47(6-7): 525-535.
- [76] CHEN L, ZENG A-P. Rational design and metabolic analysis of *Escherichia coli* for effective production of L-tryptophan at high concentration[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(2): 559-568.
- [77] TROENDLE J, TRACHTMANN N, SPRENGER G A, et al. Fed-batch production of L-tryptophan from glycerol using recombinant *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(12): 2881-2892.
- [78] NIU H, LI R, LIANG Q, et al. Metabolic engineering for improving L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2019, 46(1): 55-65.
- [79] XIONG B, ZHU Y, TIAN D, et al. Flux redistribution of central carbon metabolism for efficient production of L-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(3): 1393-1404.
- [80] LEE J, KIM J, SONG J E, et al. Production of Tyrian purple indigoid dye from tryptophan in *Escherichia coli*[J]. Nature Chemical Biology, 2020: 1-9.
- [81] WYNANDS B, LENZEN C, OTTO M, et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 with minimal genomic modifications for high-yield phenol production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 121-133.
- [82] DING R, LIU L, CHEN X, et al. Introduction of two mutations into AroG increases phenylalanine production in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(10): 2103-2108.
- [83] NODA S, KONDO A. Recent advances in microbial production of aromatic chemicals and derivatives[J]. Trends in Biotechnology, 2017, 35(8): 785-796.
- [84] WANG J, ZHANG R, ZHANG Y, et al. Developing a pyruvate-

- driven metabolic scenario for growth-coupled microbial production[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 191-200.
- [85] GUO L, ZHANG F, ZHANG C, et al. Enhancement of malate production through engineering of the periplasmic rTCA pathway in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(6): 1571-1580.
- [86] LIU L, CHEN S, WU J. Phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system modification increases the conversion rate during L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2017, 44(10): 1385-1395.
- [87] AL-BASSAM M M, KIM J N, ZARAMELA L S, et al. Optimization of carbon and energy utilization through differential translational efficiency[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1-13.
- [88] KOENDJIBIHARIE J G, VAN KRANENBURG R, KENGEN S W M. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node: variation at the heart of metabolism[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020: 1-19.
- [89] DIAO J, SONG X, ZHANG L, et al. Tailoring cyanobacteria as a new platform for highly efficient synthesis of astaxanthin[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 275-287.
- [90] NGUYEN A D, KIM D, LEE E Y. Unlocking the biosynthesis of sesquiterpenoids from methane via the methylerythritol phosphate pathway in methanotrophic bacteria, using alpha-humulene as a model compound[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 69-78.
- [91] 王均成, 王可, 张春宇. L-缬氨酸的应用和育种研究进展[J]. *发酵科技通讯*, 2012, 41(01): 30-34.
- WANG J C, WANG K, ZHANG C Y. Advances in bioproduction of L-valine[J]. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2012, 41(1): 30-34.
- [92] JONES C M, LOZADA N J H, PFLEGER B F. Efflux systems in bacteria and their metabolic engineering applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(22): 9381-9393.
- [93] CHARLIER D, BERVOETS I. Regulation of arginine biosynthesis, catabolism and transport in *Escherichia coli*[J]. *Amino Acids*, 2019, 51(8): 1103-1127.
- [94] 程功, 徐建中, 张伟国. L-精氨酸生物合成机制及其代谢工程育种研究进展[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(6): 1379-1387.
- CHENG G, XU J Z, ZHANG W G. Progress in biosynthesis and metabolic engineering of L-arginine producer[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(6): 1379-1387.
- [95] LU C D. Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(3): 261-272.
- [96] CHARLIER D, ROOVERS M, VAN VLIET F, et al. Arginine regulon of *Escherichia coli* K-12: a study of repressor-operator interactions and of *in vitro* binding affinities versus *in vivo* repression[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 226(2): 367-386.
- [97] NANDINENI M R, GOWRISHANKAR J. Evidence for an arginine exporter encoded by *yggA* (*argO*) that is regulated by the LysR-type transcriptional regulator ArgP in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11): 3539-3546.
- [98] RAJAGOPAL B S, DEPONTE J, TUCHMAN M, et al. Use of inducible feedback-resistant *N*-acetylglutamate synthetase (*argA*) genes for enhanced arginine biosynthesis by genetically engineered *Escherichia coli* K-12 strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(5): 1805-1811.
- [99] GINESY M, RUSANOVA-NAYDENOVA D, ROVA U. Tuning of the carbon-to-nitrogen ratio for the production of L-arginine by *Escherichia coli*[J]. *Fermentation*, 2017, 3(4): 1-11.



通讯作者: 刘立明(1976—),男,博士,教授。研究方向为微生物生理功能解析与调控。

E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn



第一作者: 郭亮(1989—),男,博士,助理研究员。研究方向为合成生物学。

E-mail: gliang1573@163.com