

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-019

 $\omega$ -氨基酸与内酰胺的生物合成研究进展刘益宁<sup>1,2</sup>, 蒲伟<sup>3,4</sup>, 杨金星<sup>5</sup>, 王钰<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308; <sup>2</sup> 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308; <sup>3</sup> 内江师范学院生命科学学院, 四川 内江 641100; <sup>4</sup> 四川省高等学校特色农业资源研究与利用重点实验室, 四川 内江 641100; <sup>5</sup> 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** 以可再生碳资源为原料, 以工程微生物为核心工具, 通过生物制造的方式生产生物基材料等化学品, 具有绿色、低碳的优势, 已经成为目前研究的热点。 $\omega$ -氨基酸是氨基和羧基分别位于支链碳链两端的一种非天然氨基酸, 其自身环化的产物内酰胺是合成聚酰胺材料(又名尼龙)的关键单体。聚酰胺材料具有广泛的应用与巨大的市场, 目前主要通过石化路线生产, 生物合成路线仍处于研究阶段, 但是近年来进展迅速。本文系统介绍了 $\omega$ -氨基酸与内酰胺的生物合成研究进展。为合成生物基聚酰胺材料, 研究者设计了 $\omega$ -氨基酸的人工合成途径, 挖掘了可环化 $\omega$ -氨基酸合成内酰胺的关键酶, 通过在微生物底盘细胞中组装合成途径, 调控和优化代谢流量, 开发内酰胺生物传感器并进行高通量筛选, 实现了 $C_4 \sim C_6$ 的 $\omega$ -氨基酸和内酰胺的生物合成。尤其以葡萄糖为原料合成戊内酰胺的产量超过70 g/L, 生产强度达到约1 g/(L·h), 接近可工业化的水平。最后, 本文也讨论了目前 $\omega$ -氨基酸与内酰胺生物合成面临的途径原子经济性低、关键环化酶限速、一碳等非粮原料开发利用不足等挑战。

**关键词:**  $\omega$ -氨基酸; 内酰胺; 聚酰胺; 生物基材料; 生物合成

**中图分类号:** Q816 **文献标志码:** A

Recent advances in the biosynthesis of  $\omega$ -amino acids and lactamsLIU Yining<sup>1,2</sup>, PU Wei<sup>3,4</sup>, YANG Jinxing<sup>5</sup>, WANG Yu<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; <sup>2</sup>National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China; <sup>3</sup>Life Science of School, Neijiang Normal University, Neijiang 641100, Sichuan, China; <sup>4</sup>Key Laboratory of Regional Characteristic Agricultural Resources in Sichuan Province, Neijiang 641100, Sichuan, China; <sup>5</sup>School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China)

**Abstract:** Increasing petroleum consumption and growing environmental concerns necessitate the sustainable production of chemicals and fuels from renewable resources. By utilizing renewable resources as raw materials and engineered microorganisms as the core tools, the bio-manufacturing of bio-based materials has become a hot research topic due to its green and low-carbon advantages.  $\omega$ -Amino acids are a type of non-natural amino acids with amino and

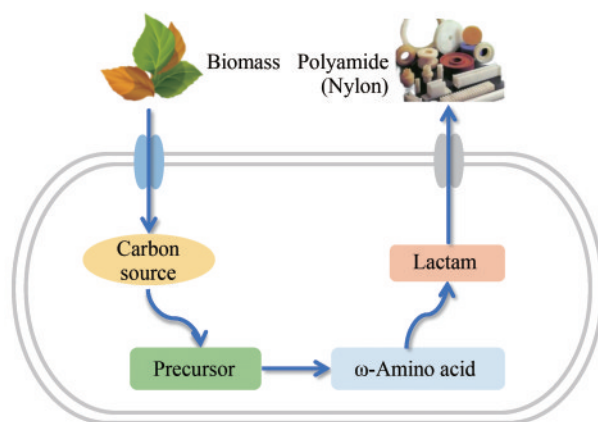
收稿日期: 2024-02-04 修回日期: 2024-04-25

基金项目: 中国科学院关键核心技术攻关先导专项(XDC0110201)

引用本文: 刘益宁, 蒲伟, 杨金星, 王钰.  $\omega$ -氨基酸与内酰胺的生物合成研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(6): 1350-1366

Citation: LIU Yining, PU Wei, YANG Jinxing, WANG Yu. Recent advances in the biosynthesis of  $\omega$ -amino acids and lactams [J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(6): 1350-1366

carboxyl groups located at the ends of the straight carbon chain. Self-cyclization of  $\omega$ -amino acids produce lactams, which are the key monomers for the synthesis of polyamide materials, commonly known as nylon. Polyamide materials have wide applications and a huge global market over seven million tons per year. Nowadays, polyamide materials and their monomers are primarily produced through petrochemical routes with non-renewable resources. The research on biosynthesis of these materials and monomers is still in the early stages, but significant progress has been made in recent years. This review article systematically introduces the recent advances in the biosynthesis of  $\omega$ -amino acids and lactams. To achieve the bio-manufacturing of bio-based polyamide materials, researchers have designed artificial biosynthetic pathways for  $\omega$ -amino acids from renewable carbon sources such as glucose. The key enzymes for the cyclization of  $\omega$ -amino acids to form lactams have been identified. By assembling the biosynthetic pathway in microbial chassis such as *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*, production of  $\omega$ -amino acids and lactams have been achieved. Furthermore, the metabolic flux was fine-tuned by regulating and optimizing the expression of key genes to improve the biosynthesis of  $\omega$ -amino acids and lactams. Besides, biosensors of lactams have been developed to transfer the intracellular concentrations of lactams into easily detectable signals such as fluorescence. Such biosensors have been successfully used for high-throughput screening of  $\omega$ -amino acid cyclization enzymes and dynamic regulation of biosynthetic pathway. These effects have resulted in the successful biosynthesis of  $C_4$ – $C_6$   $\omega$ -amino acids and lactams. Particularly, using glucose as a raw material, the production of valerolactam by fed-batch fermentation exceeded 70 g/L, with a productivity of about 1 g/(L·h), which approaches the level required for industrialization and commercialization. Finally, the review article discusses the current challenges faced in the biosynthesis of  $\omega$ -amino acids and lactams, including the low yield of biosynthetic pathways, rate-limitations posed by key cyclization enzymes, and insufficient utilization of non-food carbon sources such as one-carbon compounds.



**Keywords:**  $\omega$ -amino acid; lactam; polyamide; bio-based material; biosynthesis

内酰胺 (lactam) 是由非天然的直链氨基酸 (也称  $\omega$ -氨基酸) 环化后形成的一类重要化学品<sup>[1]</sup>。这类化合物开环后通过酰胺键 ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ) 聚合形成一类线性的高分子材料——聚酰胺 (polyamide, PA)。PA 以其独特的性能而闻名, 包括高抗拉强度、电绝缘、耐热、耐磨、生物相容性好等。这些特性使得 PA 在汽车、电气、纺织和

医疗等行业应用广泛。自 1938 年首款以尼龙 (nylon) 为名的聚酰胺材料产品面世以来, 聚酰胺材料的市场规模不断扩大, 目前的全球年产量已达 700 万吨<sup>[2-4]</sup>。由 6-氨基己酸 (6-aminocaproic acid, 6-ACA) 环化形成的己内酰胺 (caprolactam) 是合成尼龙-6 的原料, 全球年产量超过 440 万吨, 市场规模估计为 150 亿美元。除了己内酰胺, 一些

碳链较短的内酰胺也具有特殊的应用。由5-氨基戊酸(5-aminovaleric acid, 5-AVA)环化形成的戊内酰胺(valerolactam)可用于合成尼龙-5和尼龙-6,5这两种具有独特性能的聚酰胺材料。由 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)环化形成的丁内酰胺(butyrolactam)可用于合成尼龙-4,这种材料具有更好的热稳定性、更高生物降解性与疏水性。除此之外,丁内酰胺还是生产N-乙基吡咯烷酮的前体,后者是注射剂、药品生产、膜过滤器、地板抛光剂等的溶剂。

目前工业化内酰胺的生产主要依靠石油化工衍生路线,反应条件苛刻,反应工艺复杂,不利于生态环境保护<sup>[5-7]</sup>。随着国际社会对气候、环境、资源等问题的关注度越来越高,传统的化学工业正向着可再生和可持续的方式转变。利用改造的微生物为催化剂,以可再生资源为原料,通过生物催化或生物发酵的方式,已经可以实现在温和的反应条件下合成一些高价值、具有高对映体选择性的化学物质,从而绕过条件苛刻和不可再生的传统化学合成过程。生物基PA材料更具有可持续性和环保性,符合绿色、低碳、可持续发展要求<sup>[8-10]</sup>。为实现PA材料的绿色可持续生产,内酰胺及其前体 $\omega$ -氨基酸的生物合成也成为了近年的研究热点。

由于大部分微生物体内不存在天然的 $\omega$ -氨基酸和内酰胺合成途径,需要引入异源的基因或代谢途径,构建 $\omega$ -氨基酸和内酰胺的生物合成菌种。现有研究表明,部分 $\omega$ -氨基酸和内酰胺可以以蛋白质氨基酸(如L-谷氨酸和L-赖氨酸)为前体,

经过人工组装的代谢途径转化为 $\omega$ -氨基酸和内酰胺。目前大部分蛋白质氨基酸已经实现了生物发酵工业生产<sup>[11-13]</sup>,L-赖氨酸和L-谷氨酸的发酵产量均已超过200 g/L,这为 $\omega$ -氨基酸和内酰胺的生物合成奠定了基础<sup>[14-15]</sup>。本文首先简单介绍以石化资源化学合成内酰胺的传统路线,然后重点综述了 $\omega$ -氨基酸和内酰胺的生物合成研究进展,以及基于生物传感器的高通量筛选方法和动态调控策略在内酰胺合成菌种优化中的应用,最后对使用木质纤维素原料、一碳原料等非粮原料进行聚酰胺材料单体合成的前景进行展望。

## 1 内酰胺的化学合成方法

目前,内酰胺主要由石化原料合成。例如,己内酰胺的生产以苯或苯酚的衍生产物环己酮为原料,首先使用硫酸羟胺将环己酮转化为环己酮肟,然后在90~120 °C的高温和硫酸条件下,通过Beckmann重排反应将肟分子转化为己内酰胺(图1)。己内酰胺的后续分离纯化需要添加NH<sub>3</sub>,因此每生产1.0 kg的己内酰胺就会产生1.8~5.0 kg的硫酸铵废物。通过一些绿色化学工艺可减少硫酸铵废物,但整个反应过程仍然需要高温和酸性的反应条件<sup>[5]</sup>。目前,丁内酰胺的工业生产以1,4-丁二醇为原料,首先通过脱氢反应生成丁内酯,后者与氨反应生成4-羟基丁酰胺,后者与氨反应生成丁内酰胺(图1)<sup>[16]</sup>。由此可见,目前内酰胺的生产主要依赖石化原料,生产工艺耗能较高,且

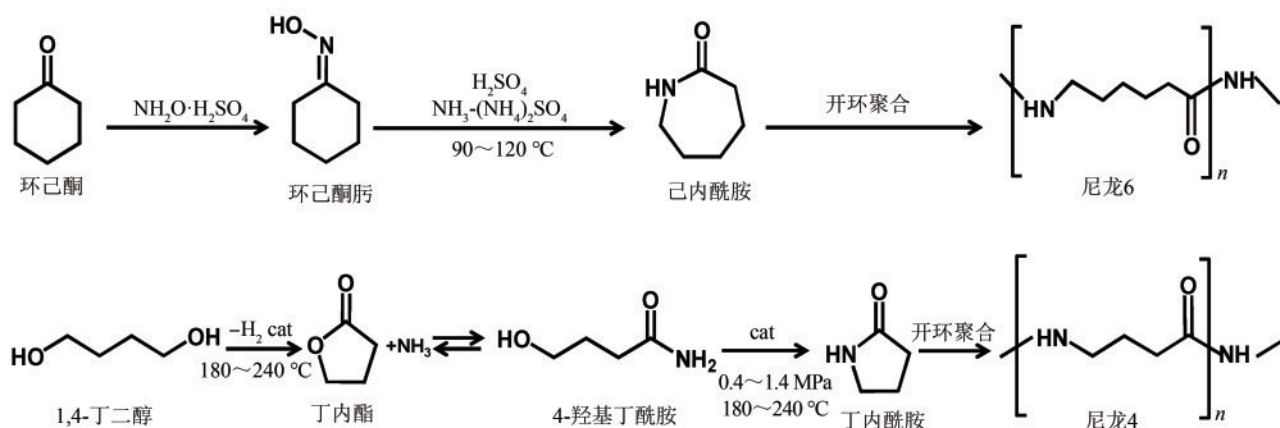


图1 以石化资源化学合成内酰胺和聚酰胺的路线

Fig. 1 Petrochemical route for synthesis of lactams and polyamides

需要高温、酸性等反应条件。

## 2 内酰胺的生物合成方法

内酰胺生物合成方法主要是先合成非天然的直链 $\omega$ -氨基酸，后者自身环化后形成内酰胺。已实现生物合成的 $\omega$ -氨基酸主要有三类，分别是GABA、5-AVA和6-ACA，三种 $\omega$ -氨基酸的生物合成途径如图2所示。下面将就三种 $\omega$ -氨基酸的生物合成研究进展进行详细的介绍。

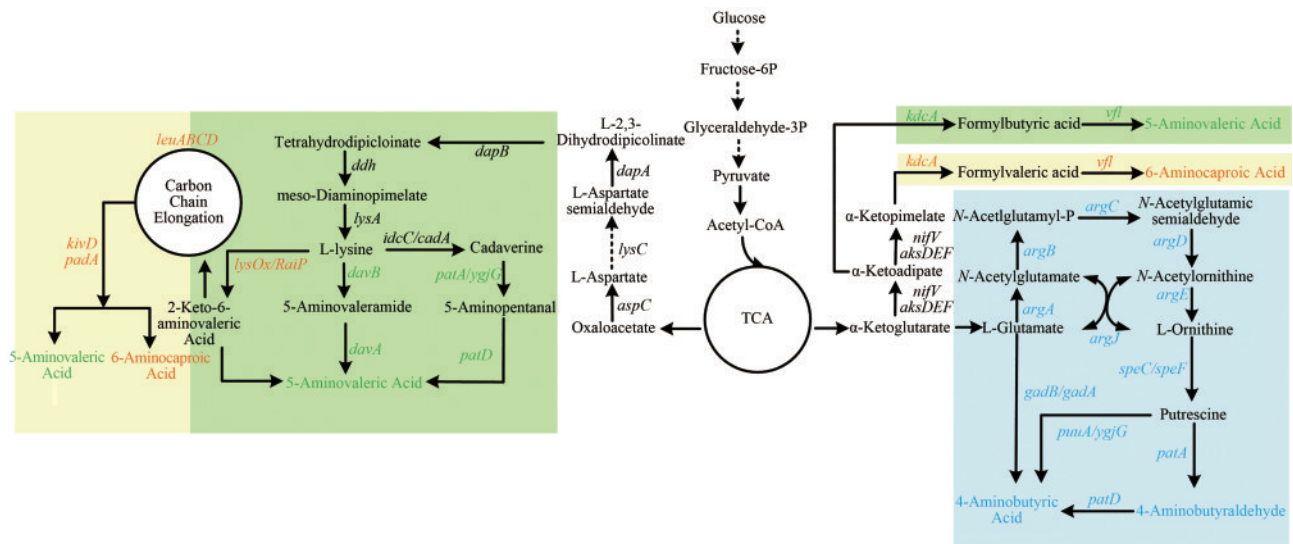


图2  $\omega$ -氨基酸的生物合成途径

*aspC*—编码天冬氨酸转氨酶；*lysC*—编码天冬氨酸激酶；*dapA*—编码二氢二吡啶合酶；*dapB*—编码4-羟基四氢二吡啶还原酶；*ddh*—编码内消旋二氨基庚二酸-脱氢酶；*lysA*—编码二氨基庚二酸脱羧酶；*davA*—编码5-氨基戊酰胺水解酶；*davB*—编码赖氨酸单加氧酶；*patD*—编码 $\gamma$ -氨基丁醛脱氢酶；*ldcC*—编码赖氨酸脱羧酶；*cadA*—编码赖氨酸脱羧酶；*patA*—编码丁二胺氨基转移酶；*puuA/ygiG*—编码丁二胺转氨酶；*lysOx/RaiP*—编码赖氨酸 $\alpha$ -氧化酶；*kivD*—编码2-酮异戊酸脱羧酶；*padA*—编码苯乙醛脱氢酶；*nifV*—编码高柠檬酸合酶；*kdcA*—编码酮酸脱羧酶；*vfl*—编码氨基转氨酶；*argA*—编码氨基酸乙酰转移酶；*argB*—编码乙酰谷氨酸激酶；*argC*—编码N-乙酰赖氨酸-谷氨酰-磷酸还原酶；*argD*—编码乙酰鸟氨酸转氨酶；*argE*—编码乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶；*argJ*—编码鸟氨酸乙酰转移酶；*speC/speF*—编码鸟氨酸脱羧酶；*gadB*—编码谷氨酸脱羧酶 $\beta$ 亚基；*gadA*—编码谷氨酸脱羧酶 $\alpha$ 亚基；*leuA*—编码 $\alpha$ -异丙基苹果酸合成酶；*leuB*—编码3-异丙基苹果酸脱氢酶；*leuCD*—编码3-异丙基苹果酸脱水酶；*aksD*—编码异丙基苹果酸脱水酶大亚基；*aksE*—编码异丙基苹果酸脱水酶小亚基；*aksF*—编码异丙基苹果酸/高异柠檬酸脱氢酶

Fig. 2 Biosynthetic pathways for  $\omega$ -amino acids

*aspC*—Encodes aspartate transaminase; *lysC*—Encodes aspartate kinase; *dapA*—Encodes dihydrodipicolinate synthase; *dapB*—Encodes 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase; *ddh*—Encodes meso-diaminopimelate dehydrogenase; *lysA*—Encodes diaminopimelate decarboxylase; *davA*—Encodes 5-aminopentanamide hydrolase; *davB*—Encodes lysine monooxygenase; *patD*—Encodes  $\gamma$ -aminobutyraldehyde dehydrogenase; *ldcC*—Encodes lysine decarboxylase; *cadA*—Encodes lysine decarboxylase; *patA*—Encodes putrescine aminotransferase; *puuA/ygiG*—Encodes putrescine transaminase; *lysOx/RaiP*—Encodes lysine  $\alpha$ -oxidase; *kivD*—Encodes 2-ketoisovalerate decarboxylase; *padA*—Encodes phenylacetaldehyde dehydrogenase; *nifV*—Encodes homocitrate synthase; *kdcA*—Encodes ketoacid decarboxylase; *vfl*—Encodes aminotransferase; *argA*—Encodes amino acid acetyltransferase; *argB*—Encodes N-acetylglutamate kinase; *argC*—Encodes N-acetylglutamate-phosphate reductase; *argD*—Encodes ornithine transcarbamoylase; *argE*—Encodes ornithine carbamoyltransferase; *argJ*—Encodes ornithine acetyltransferase; *speC/speF*—Encodes ornithine decarboxylase; *gadB*—Encodes glutamate decarboxylase  $\beta$  subunit; *gadA*—Encodes glutamate decarboxylase  $\alpha$  subunit; *leuA*—Encodes  $\alpha$ -isopropylmalate synthase; *leuB*—Encodes 3-isopropylmalate dehydrogenase; *leuCD*—Encodes 3-isopropylmalate dehydratase; *aksD*—Encodes isopropylmalate dehydratase large subunit; *aksE*—Encodes isopropylmalate dehydratase small subunit; *aksF*—Encodes isopropylmalate/homocitrate dehydrogenase

表1  $\gamma$ -氨基丁酸的生物合成Table 1 Biosynthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid

微生物底盘	基因型	培养模式	碳源	生产水平			参考文献
				产量 (g/L)	生产强度 /[g/(L·h)]	转化率 /(g/g)	
<i>E. coli</i> BW25113	$\Delta gadAB$ , $P_{araBAD}$ : $gadBopt$ from <i>L. lactis</i>	反应器补料分批发酵	谷氨酸钠	614.15	40.94	0.99	[19]
<i>L. paracasei</i> NFRI 7415	野生型	反应器补料分批发酵	谷氨酸钠	31.1	0.185	0.37	[20]
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> Y2	野生型	反应器补料分批发酵	谷氨酸钠	7.98	0.095	0.53	[21]
<i>L. brevis</i> NCL912	野生型	反应器补料分批发酵	葡萄糖	205.8	4.29	1.43	[22]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$P_{ADHI}$ : $gadA$	反应器补料分批发酵	葡萄糖, 谷氨酸钠	300	8.57	0.69	[23]
<i>E. coli</i> XL1-Blue	$P_{gnt104}$ : $gadB$ from <i>L. brevis</i> subsp. <i>Lactis</i> IL1403	反应器补料分批发酵	葡萄糖, 谷氨酸钠	94.8	1.98	0.777	[24]
<i>E. coli</i> XL1-Blue	$P_{lac}$ : $gadB$ from <i>N. crassa</i>	摇瓶发酵	谷氨酸钠	5.35	0.11	0.878	[25]
<i>E. coli</i> XL1-Blue	$P_{lac}$ : $gadB$ from <i>P. horikoshii</i>	摇瓶发酵	谷氨酸钠	5.07	0.11	0.83	[26]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$P_{T7}$ : GAD from <i>S. cerevisiae</i>	反应器补料分批发酵	乳糖, 甘油	252	—	0.99	[27]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$P_{T7}$ : GAD from <i>L. lactis</i> FJNUGA01	反应器补料分批发酵	谷氨酸钠	204.1	34	0.99	[28]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$P_{T7}$ : $gadA$ , $gadB$ , $gadC$ from <i>E. coli</i>	反应器补料分批发酵	谷氨酸钠	31.3	0.55	—	[29]
<i>E. coli</i> XBT	$\Delta gabT$ , $P_{T7}$ : $gadBC$ from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	谷氨酸钠	5.46	0.114	0.895	[30]
<i>E. coli</i> BW25113	$\Delta gadC$ , $\Delta gadAB$ , $P_{araBAD}$ : $gadB$ (M4)- <i>groES-groEL</i> , $gadB$ mutant from <i>L. lactis</i> IL1403	反应器补料分批发酵	谷氨酸钠	308.26	44.04	0.996	[31]
<i>E. coli</i> XBM3	$\Delta ackA$ , $gabT$ , $P_{arcC}$ : <i>icd</i> -GBD, <i>gltB</i> -SH3, $gadA$ -PDZ from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	1.3	0.027	0.13	[32]
<i>E. coli</i> (XL1-Blue) XBM4	$\Delta frdB$ , $gabT$ , $P_{araBAD}$ : $gadC$ -GBD, <i>gltB</i> -SH3, $gadB$ -PDZ from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	1.23	0.026	0.123	[33]
<i>E. coli</i> (XL1-Blue) XBM6	$\Delta pflB$ , <i>poxB</i> , <i>ldhA</i> , $P_{arcC}$ : $gadC$ -GDB, <i>gabD</i> -SH3, <i>gabT</i> -PDZ from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	0.79	0.016	0.079	[34]
<i>E. coli</i> XBM7	$\Delta ackA$ , <i>ldhA</i> , $P_{arcC}$ : <i>sdhA</i> -GBD, <i>gabD</i> -SH3, <i>gabT</i> -PDZ from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	0.75	0.016	0.075	[35]
<i>E. coli</i> XBM6	$\Delta pflB$ , $\Delta poxB$ , $\Delta ldhA$ , $P_{arcC}$ : $gadD$ -GDB, <i>gabD</i> -SH3, <i>puuE</i> -PDZ from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	0.87	—	—	[36]
<i>E. coli</i> JWZ08	$\Delta waaF$ , $\Delta waaC$ , $\Delta sucA$ , $\Delta puuE$ , $\Delta gabT$ , $\Delta gabP$ , $\Delta xylA$ , $\Delta xylB$ , $P_{T7}$ : <i>xylB</i> , <i>xylX</i> , <i>xylD</i> , <i>xylC</i> , <i>xylA</i> from <i>C. crescentus</i> NA1000, $P_{T7}$ : <i>gdhA</i> and <i>torA-gadB</i> from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	木糖	3.95	0.065	0.20	[37]
<i>E. coli</i> BW25113	$\Delta lacI$ , $\Delta gabT$ , $\Delta sucA$ , $\Delta aceA$ , $P_{LacO1}$ : <i>gltB</i> , $gadB$ (E89Q, $\Delta 452-466$ ), $gadC$ (1-470), <i>glnA</i> from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	4.8	0.15	0.29	[38]
<i>E. coli</i> EDK11	$gadB$ , $gadC$ , $gabT$ , $gltA$ from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	1.2	0.05	—	[39]
<i>E. coli</i> Nissle 1917 pMT1-G/pMT2-R/EcNP	$P_{arc}$ : $gadB$ from <i>E. coli</i>	全细胞催化	谷氨酸钠	17.9	—	—	[40]
<i>C. glutamicum</i> GAD	$P_{HCE}$ : $gadB$ from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	12.37	0.172	0.247	[41]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	$P_{lacM}$ : $gadB1$ , $gadB2$ from <i>L. brevis</i> Lb85	摇瓶发酵	葡萄糖	27.13	0.226	0.52	[42]

续表

微生物底盘	基因型	培养模式	碳源	生产水平			参考文献
				产量 /(g/L)	生产强度 /[g/(L·h)]	转化率 /(g/g)	
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	$P_{H36}: gadB_{(E89Q, \Delta 452-466)}$ from <i>E. coli</i>	反应器补料分批发酵	葡萄糖	38.6	0.536	0.32	[43]
<i>C. glutamicum</i> H36 GD1852	$P_{H36}: gadB_{mut}, xylAB$ from <i>E. coli</i>	反应器补料分批发酵	EFB	35.47	0.68	—	[44]
<i>C. glutamicum</i> SH	$P_{tacM}: R4a-gabB2B1^{mut}$ from <i>L. brevis</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	26.5	0.442	0.269	[45]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	$\Delta cglIM, \Delta cglIR, \Delta cglIIR, \Delta ncg10464$ LVIS1847 from <i>L. brevis</i> ATCC367	摇瓶发酵	葡萄糖	25.6	2.4	0.729	[46]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	$\Delta pknG, P_{HCE}: gadB$ from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	31.1	0.26	0.311	[47]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	$\Delta odhA, P_{tac}: gadB1, gadB2$ from <i>E. coli</i>	反应器补料分批发酵	葡萄糖	29.5	0.41	—	[48]
<i>C. glutamicum</i> SH	$\Delta mdh, P_{tac}: gadB1, gadB2, ppc$ from <i>E. coli</i>	反应器补料分批发酵	葡萄糖	26.3	0.365	—	[49]
<i>C. glutamicum</i> PUT21	$\Delta argF, \Delta argR, \Delta snaA, \Delta gabTDP, P_{tac}: patD,$ $patA$ from <i>E. coli</i> , $P_{tac}: speC-5'_{21}-argF$	摇瓶发酵	葡萄糖	8.0	0.31	—	[50]
<i>C. glutamicum</i> APLGGP	$\Delta argB, \Delta proB, \Delta dapA, P_{tac}: plk$ from <i>L. plantarum</i> GB 01-21, $gad$ from <i>L. plantarum</i> GB 01-21	反应器补料分批发酵	葡萄糖	70.6	1.001	—	[51]
<i>C. glutamicum</i> ORN1	$\Delta argF, \Delta argR, \Delta snaA, \Delta gabTDP, \Delta yggB,$ $\Delta cgmA, odhA_{TTG}, odhI_{T15A}, P_{tac}: patDA$ from <i>E. coli</i> , $P_{tac}: gapA, pyc$ and $argB^{A49V/MS4V}$ from <i>C. glutamicum</i> , $speC$ from <i>E. coli</i> and leaky expression of $argF$	反应器补料分批发酵	葡萄糖	63.2	1.34	0.24	[52]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	$\Delta argR, \Delta gabT, \Delta gabP, P_{tac}: gadB2$ from <i>L. brevis</i> ATCC 367	摇瓶发酵	葡萄糖	28.7	0.3	—	[53]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	$P_{urf}: can, P_{urf}: icd, \Delta sucCD, \Delta gabD, \Delta gabP::$ $potE$ harboring pXMJ19- $P_{urf}: guaB-gadM$	反应器补料分批发酵	葡萄糖	23.07	0.38	0.52	[54]
<i>C. glutamicum</i> KCTC 1852 H36 LIGAD	$P_{H36}: gadB$ from <i>L. lactis</i> CICC20209	反应器补料分批发酵	葡萄糖	42.5	1.18	0.425	[55]
<i>L. brevis</i> NCL912	野生型	反应器补料分批发酵	谷氨酸钠	103.7	—	—	[56]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	$CgGly 2, \Delta gabTDP, P_{GPP1}-odhA-DAS+8,$ $P_{GPP1}-argJ-DAS+8; pGN-GGPCe$	反应器补料分批发酵	甘油	45.6	—	0.4	[57]

生物催化法通过表达不同来源的GAD，将前体L-谷氨酸转变为GABA。生物催化法的关键是从不同微生物中克隆性能优异的GAD，并在一些模式微生物，如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中进行异源表达。目前已经从大肠杆菌<sup>[58-59]</sup>、乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB)<sup>[17, 60-63]</sup>、唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*)<sup>[64]</sup>、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)<sup>[65]</sup>、掘越火球菌 (*Pyrococcus horikoshii*)<sup>[66]</sup>、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 和粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)<sup>[67]</sup> 等微生物中克隆了GAD，对这些GAD的酶学性质进行

了详细的表征，并应用于GABA的生物催化合成。Ke等<sup>[19]</sup>在大肠杆菌BW25113  $\Delta gabAB$ 中过表达来自外源乳杆菌中的  $gadB$  基因编码的GAD，以L-谷氨酸为底物进行全细胞催化，在不添加辅因子吡哆醛5'-磷酸 (PLP) 的情况下，添加3 mol/L L-谷氨酸底物时GABA产量达到308.96 g/L；该菌株在添加2 mol/L L-谷氨酸底物中可重复使用三个周期，总GABA产量达到614.15 g/L。由于催化效率高，产物产量高，全细胞生物催化是GABA工业生产的有效策略之一。

### 2.1.2 从头发酵合成法

一些从发酵产品中分离的乳酸菌 (LAB) 天然能够产生 GABA, 例如从泡菜、奶酪、酸奶等中分离的乳杆菌和乳球菌<sup>[68]</sup>。这些菌株中的 GAD 活性较高, 具有较强的 GABA 产生能力。Li 等<sup>[56, 69]</sup> 从我国泡菜中分离了一株短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) NCL912 菌种, 利用该菌株在以 L-谷氨酸钠为底物的丰富培养基中发酵, 最终 GABA 的产量达到了 103.7 g/L。Wang 等<sup>[22]</sup> 同样利用该菌株, 通过进一步优化培养条件, 以 L-谷氨酸为底物, 最终在 10 L 反应器中 GABA 产量达到了 205.8 g/L。除 LAB 外, 研究者们从富含 GABA 的食品中分离出的其他微生物, 也具有一定的 GABA 生产能力, 例如紫红曲霉 (*Monascus purpureus*)、小孢根霉 (*Rhizopus microspores*) 和唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*) 等菌株。但是这些菌株的 GABA 生产能力相对于 LAB 较低, 通过进一步的代谢改造, 有望提升这些菌株的生产能力。

虽然对于天然产 GABA 菌株的研究取得了一定的进展, 但是这些菌株仍需要在培养基中直接添加 L-谷氨酸进行发酵, 以及添加大量其他的氮源, 这限制了 GABA 的大规模生产。因此, 近些年利用工程菌株一步发酵葡萄糖产 GABA 引起了研究者的广泛关注。目前主要利用代谢工程技术改造大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌一步发酵法生产 GABA。Pham 等<sup>[32]</sup> 在大肠杆菌中利用蛋白支架将异柠檬酸脱氢酶、谷氨酸合酶和 GAD 串联在一起, 在以葡萄糖为碳源的培养基中 GABA 产量达到了 1.3 g/L。尽管利用重组大肠杆菌产 GABA 的浓度相对较低, 但是以上研究为 GABA 合成提供了一种新的思路。谷氨酸棒杆菌因其出色的谷氨酸合成能力而被认为是生产 GABA 的理想菌株。Choi 等<sup>[43]</sup> 将来源于大肠杆菌的 GAD 突变体 GAD<sup>Glu89Gln/Δ452-466</sup> 克隆至谷氨酸棒杆菌中, 通过优化 GAD 突变体的表达元件和发酵条件, GABA 的产量达到了 38.6 g/L。Zhang 等<sup>[51]</sup> 在谷氨酸棒杆菌中开发出了一种不需要额外添加辅因子吡哆醛 5'-磷酸, 直接发酵葡萄糖产 GABA 的高效方法, 通过两阶段的 pH 控制策略, 发酵 72 h 后 GABA 产量达到了 70.6 g/L。Baritugo<sup>[44]</sup> 通过在一株高产 L-谷

氨酸的谷氨酸棒杆菌 KCTC 1852 中引入木糖的利用途径和 GABA 合成途径, 以葡萄糖和木糖为混合碳源, 最终 GABA 的产量达到了 35.47 g/L。Zhang 等<sup>[54]</sup> 在谷氨酸棒杆菌中重构三羧酸 (TCA) 循环, 增强乙酰辅酶 A (CoA) 生成  $\alpha$ -酮戊二酸, 进而增加向 GABA 直接前体物质 L-谷氨酸的合成通量, 并阻断了 GABA 分解代谢, 增强运输系统, 进一步提高了 GABA 的合成, 以葡萄糖为碳源发酵, GABA 产量为 23.07 g/L; 此外, 还构建了乙酰辅酶 A 依赖的丁内酰胺生物合成途径, 丁内酰胺产量为 4.58 g/L。

虽然工程微生物生产 GABA 已经取得了一定的进展, 但要进一步提高 GABA 的产量和转化率, 以满足工业化生产的要求, 还需要解决两个问题。首先, 大多数细菌来源的 GAD 仅在酸性条件下具有活性, 而在中性 pH 下失去酶活性, 这严重限制了它们在 GABA 发酵生产中的应用。尽管通过定向进化获得了一些 pH 范围扩大的 GAD 突变体, 但它们在近中性 pH 下的活性仍然很低。其次,  $\alpha$ -酮戊二酸是 GABA 生物合成的重要前体, 但该代谢物也是 TCA 循环的中间体, 主要负责在有氧条件下为细胞生长提供能量和物质。因此, 过量的代谢通量进入 GABA 生物合成途径不可避免地引起细胞生长和 GABA 生产之间的竞争, 从而损害细胞活力和途径生产能力。如何平衡产物合成和细胞生长的关系是提升 GABA 生物合成的关键限制因素<sup>[44, 70]</sup>。Wei 等<sup>[57]</sup> 利用途径工程技术在谷氨酸棒杆菌中优化了甘油的利用途径, 提高了甘油的利用效率, 同时引入 GABA 的生物合成途径, 为了进一步平衡细胞生长和 GABA 合成的碳流, 构建了可调的生长依赖型双功能的遗传开关, 利用该调控技术重构了 GABA 合成代谢网络, 工程菌株能够在积累足量的生物量之后发生代谢状态转变, 使细胞代谢状态由“生长模式”向“生产模式”转变, 从而实现了细胞生长和产物合成的协同平衡。最终构建的工程菌株 GABA 产量为 45.6 g/L, 产率提升至 0.4 g/g 甘油, 是目前报道的利用甘油生产 GABA 的最高产量, 为谷氨酸棒杆菌细胞工厂的代谢调控提供了新的工具和方法。

在实现 GABA 高效的生物合成后, 研究者进一步提升了丁内酰胺的合成水平。Zhang 等<sup>[16]</sup> 在

大肠杆菌中表达 GAD 突变体 GadB<sub>ΔHT</sub> 和环化合酶 MBP-ORF26 (与麦芽糖结合蛋白融合的酰基 CoA 连接酶) 构建丁内酰胺合成途径, 在补充 9 g/L L-谷氨酸培养基中发酵得到 1.1 g/L 丁内酰胺。Chac 等<sup>[71]</sup> 在大肠杆菌中过表达 GaD 突变体 (GadB E89Q Δ452-466)、ω-氨基酸环化酶 β-丙氨酸 CoA 转移酶 (Act), 构建了丁内酰胺代谢途径, 以葡萄糖为碳源补料分批发酵, 丁内酰胺的产量可达到 54.14 g/L。

## 2.2 5-氨基戊酸及戊内酰胺的生物合成

5-AVA 是恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)

KT2440 中 L-赖氨酸分解代谢途径的一个中间代谢物 (图 2)<sup>[72]</sup>。5-AVA 合成的典型途径包括两步酶催化反应: 首先 L-赖氨酸单加氧酶 (DavB) 介导 L-赖氨酸氧化为 5-氨基戊酰胺, 然后由 5-氨基戊酰胺水解酶 (DavA) 催化 5-氨基戊酰胺最终水解为 5-AVA, 5-AVA 会被进一步降解转化为戊二酸, 因此在恶臭假单胞菌中难以过量积累 5-AVA<sup>[72]</sup>。为了过量积累 5-AVA, Park<sup>[73]</sup> 在大肠杆菌 W3110 中引入恶臭假单胞菌的 *davA* 和 *davB* 基因, 在添加了葡萄糖和 L-赖氨酸的培养基中, 5-AVA 的产量达到了 3.6 g/L (表 2)。随后 Park 等<sup>[74]</sup> 进一步提高细胞密度, 优化底物 L-赖氨酸的补料方式, 最终 5-AVA

表 2 5-氨基戊酸的生物合成

Table 2 Biosynthesis of 5-aminovaleric acid

微生物底盘	基因型	培养模式	碳源	生产水平			参考文献
				产量 /(g/L)	生产强度 /[g/(L·h)]	转化率 /(g/g)	
<i>E. coli</i> WL3110	$P_{LacO-1}$ : <i>davAB</i> from <i>P. putida</i>	摇瓶发酵	葡萄糖, L-赖氨酸	3.6	0.075	—	[73]
<i>E. coli</i> WL3110	pKE112- <i>davAB</i> from <i>P. putida</i>	反应器补料分批发酵	葡萄糖, L-赖氨酸	90.59	—	0.942	[74]
<i>E. coli</i> CJ02RaiP	$\Delta cadA$ , <i>raiP</i> from <i>E. coli</i>	全细胞催化	L-赖氨酸	50.62	1.05	0.506	[75]
<i>C. glutamicum</i> KCTC 12390BP	$\Delta gabT$ , $P_{His6}$ : <i>davA</i> <sub>His6</sub> <i>davB</i> from <i>E. coli</i>	反应器补料分批发酵	葡萄糖	33.1	0.22	0.1	[76]
<i>C. glutamicum</i> LYS-12	<i>bioD</i> :: <i>davBA</i> from <i>P. putida</i> , $\Delta lysE$ , $\Delta gabT$	反应器补料分批发酵	葡萄糖	28	0.9	0.11	[77]
<i>C. glutamicum</i> KCTC 1857	$P_{His6}$ : <i>davBA</i> from <i>P. putida</i>	反应器补料分批发酵	葡萄糖	39.9	0.54	0.11	[78]
<i>C. glutamicum</i> AVA-7	$\Delta argD$ , $\Delta gabTDP$ , $\Delta lysE$ , $P_{nf}$ : <i>davBA</i> from <i>P. putida</i> KT2440 and PP2911 from <i>P. putida</i> KT2440	反应器补料分批发酵	葡萄糖	46.5	1.52	0.34	[79]
<i>E. coli</i> WL3110	$P_{LacO-1}$ : <i>davAB</i> from <i>P. putida</i>	反应器补料分批发酵	葡萄糖	90.59	0.94	0.75	[80]
<i>E. coli</i> BW25113 (DE3)	$\Delta cadA$ , $\Delta ldcC$ , $P_{lac}$ : <i>davBA</i> from <i>P. putida</i> KT2440, $P_{T7}$ : <i>lysC</i> <sub>T3521</sub> , <i>dapA</i> from <i>C. glutamicum</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	0.86	0.018	0.046	[81]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$P_{T7}$ : <i>davA</i> from <i>P. putida</i> KT2440, $P_{T7}$ : <i>davB</i> from <i>P. putida</i> KT2440	反应器补料分批发酵	L-赖氨酸	240.7	8.6	0.868	[82]
<i>E. coli</i> pDABLP	$P_{T7}$ : <i>davAB</i> from <i>P. putida</i> KT2440, $P_{T7}$ : <i>lysP</i> , $P_{T7}$ : PP2911 from <i>P. putida</i>	反应器补料分批发酵	葡萄糖	63.2	0.405	0.62	[83]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$\Delta cadA$ , $P_{T7}$ : <i>raiP</i> from <i>S. japonicus</i>	全细胞催化	L-赖氨酸	29.12	0.40	0.44	[84]
<i>E. coli</i> CJ09	$\Delta cadA$ , <i>raiP</i> from <i>S. japonicus</i> , <i>kivG</i> (F381A/V461A) from <i>L. lactis</i> , <i>pad</i> , <i>katE</i> , <i>lysP</i> from <i>E. coli</i>	反应器补料分批发酵	葡萄糖, L-赖氨酸	52.24	1.19	0.38	[85]
<i>C. glutamicum</i> 5AVA3	$\Delta sugR$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta snaA$ , $\Delta cgmA$ , $\Delta gabTDP$ , $P_{lac}$ : <i>ldcC</i> , $P_{lac}$ : <i>patAD</i> from <i>E. coli</i>	摇瓶发酵	葡萄糖和 其他碳源	5.1	0.12	0.13	[86]
<i>C. glutamicum</i> AVA2_ puoRq	$\Delta sugR$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta snaA$ , $\Delta cgmA$ , $\Delta gabTDP$ , pVWEx1- <i>ldcC</i> , pEC-XT99A- <i>puoRq-patD</i>	微型生物发酵系统	葡萄糖	3.7	—	0.09	[87]

的产量提升到 90.59 g/L。Cheng 等<sup>[75]</sup>报道了另一种 5-AVA 的合成途径，在大肠杆菌中引入来源于日本鲭 (*Scomber japonicas*) 的 L-赖氨酸  $\alpha$ -氧化酶，首先催化 L-赖氨酸合成 2-酮基-6-氨基己酸，后者与过氧化氢反应合成 5-AVA。作者发现加入乙醇可提高 L-赖氨酸  $\alpha$ -氧化酶的表达水平，通过优化乙醇、过氧化氢用量等反应条件，重组细胞催化 L-赖氨酸可生产 50.62 g/L 5-AVA，转化率为 0.84 mol/mol。

与前面通过外源添加 L-赖氨酸不同的是，Park 等<sup>[73]</sup>从头设计了从葡萄糖合成 5-AVA 的途径，将 *davA* 和 *davB* 基因导入重组大肠杆菌 XQ56 中 (W3110  $\Delta$ laci  $\Delta$ speE  $\Delta$ speG  $\Delta$ ygiG  $\Delta$ puuPA  $P_{dapA}::P_{trc}$ )，使用这个菌株，以 10 g/L 葡萄糖为原料，分批发酵产生了 0.27 g/L 的 5-AVA。同时研究者们还在谷氨酸棒杆菌中构建了 5-AVA 的生物合成途径，首先引入针对谷氨酸棒杆菌密码子优化后的 *davA* 和 *davB* 基因，同时失活 5-AVA 的下游代谢途径，发酵葡萄糖合成了 33.1 g/L 的 5-AVA<sup>[76]</sup>。Rohles 等<sup>[77]</sup>在 L-赖氨酸高产菌株 LYS-12 中敲除 L-赖氨酸的外排蛋白编码基因 *lysE*，表达了 *davA* 和 *davB* 基因，在含有葡萄糖的培养基中，5-AVA 产量为 28 g/L。Joo 等<sup>[78]</sup>利用谷氨酸棒杆菌 KCTC 1857 表达 *davA* 和 *davB* 基因，发酵葡萄糖产生了 39.9 g/L 5-AVA，发酵芒属植物水解液产生了 12.5 g/L 5-AVA。近期，Rohles 等<sup>[79]</sup>利用系统代谢工程技术对谷氨酸棒杆菌进行了改造，首先引入来源于恶臭假单胞菌的 5-AVA 合成途径（过表达 *davA* 和 *davB* 基因），阻断 5-AVA 的下游代谢途径，强化 5-AVA 的外排途径，弱化 5-AVA 的吸收途径，最终的谷氨酸棒杆菌发酵葡萄糖产生了 46.5 g/L 的 5-AVA，转化率和生产强度分别为 0.34 g/g 和 1.52 g/(L·h)。

为实现戊内酰胺的合成，Han 等<sup>[88]</sup>将恶臭假单胞菌的 *davA* 和 *davB* 基因、丙酸梭菌 (*Clostridium propionicum*) 的 *act* 基因导入谷氨酸棒杆菌中，并改造前体物质 5-AVA 转运路径以重新吸收外排的 5-AVA，增强 *act* 基因表达以提高 5-AVA 向戊内酰胺的转化，以葡萄糖为碳源进行分批补料发酵，戊内酰胺产量、转化率和生产强度分别达到 76.1 g/L、0.28 g/g 和 0.99 g/(L·h)。Chae 等<sup>[71]</sup>在大肠杆菌中增强 L-赖氨酸生物合成，提高了胞内 L-赖氨酸积

累，引入来自恶臭假单胞菌的 *davA* 和 *davB* 基因以及丙酸梭菌的 *act* 基因，以葡萄糖为碳源补料分批发酵，戊内酰胺产量为 1.18 g/L。Zhang 等<sup>[6]</sup>在大肠杆菌中引入恶臭假单胞菌的 *davA* 和 *davB* 基因以及环化酶 MBP-ORF26 的编码基因，在添加 10 g/L 赖氨酸培养基中发酵获得戊内酰胺产量为 705 mg/L。Thompson 等<sup>[89]</sup>在恶臭假单胞菌中过表达 *davA* 和 *davB* 基因及环化酶 MBP-ORF26 编码的基因，通过途径工程，敲除戊内酰胺降解相关的基因 *oplBA*，以及 L-赖氨酸异构化为 D-赖氨酸的编码基因 *alr* 和 5-AVA 降解为戊二酸的编码基因 *davT*，在添加 3.65 g/L L-赖氨酸培养基中发酵获得戊内酰胺产量达到 91.97 mg/L。

除上述 L-赖氨酸降解途径外，研究者还设计了另一条以  $\alpha$ -酮己二酸 (AKA) 为中间物的 5-AVA 合成途径。该途径首先以 TCA 循环的中间物  $\alpha$ -酮戊二酸和乙酰 CoA 为底物，在高柠檬酸合酶 (NifV)、异丙基苹果酸脱水酶 (AksDE)、异丙基苹果酸/高异柠檬酸脱氢酶 (AksF) 的催化下合成 AKA，后者在酮酸脱羧酶 (KdcA) 催化下合成乙酰丁酸，进一步在氨基转基酶 (Vfl) 催化下合成 5-AVA。 $\omega$ -氨基酸 5-AVA 在  $\beta$ -丙氨酸 CoA 转移酶 (Act) 的催化下可合成环化产物戊内酰胺。利用该途径，Chae 等<sup>[71]</sup>构建了工程大肠杆菌，结合 L-赖氨酸合成与降解途径改造，分批补料发酵合成了 1.18 g/L 戊内酰胺，生产强度和转化率分别为 0.017 g/(L·h) 和 0.0045 g/g。

目前构建的戊内酰胺生物合成菌株主要是通过基因敲除和过表达等理性静态调控策略来实现，除此之外，研究者也开发了基于生物传感器的动态调控策略。其中，基于转录因子的生物传感器可以响应细胞内代谢物或产物的浓度变化，输出荧光等信号，或调控相关基因的表达。因此，使用生物传感器，可构建人工基因线路，通过中间代谢物或目标产物的浓度变化，动态调控合成途径中关键基因的表达，协调细胞生长与合成代谢的平衡，促进产物合成<sup>[90]</sup>。在不动杆菌 (*Acinetobacter* sp. NCIMB9871.47) 中，ChnR-Pb 转录调控因子/启动子对参与环己醇氧化，激活环己酮 1,2-单加氧酶和环己醇脱氢酶的表达。Zhang 等<sup>[91]</sup>基于内酰胺与环己醇的结构相似性，开发了一种基于 ChnR-Pb

转录调控因子/启动子对的内酰胺生物传感器，可以定量丁内酰胺、戊内酰胺和己内酰胺。而且该生物传感器具有较高的特异性，不受内酰胺生物合成中间体的影响。该团队进一步通过定向进化策略，对内酰胺生物传感器的灵敏性和动态范围进行了优化，并将优化后的生物传感器用于内酰胺环化酶的动态表达调控，成功增强了戊内酰胺的合成（图3）。在分批补料发酵中，动态调控的菌种可生产约12.33 g/L的戊内酰胺<sup>[92]</sup>。

### 2.3 6-氨基己酸及己内酰胺的生物合成

研究发现大肠杆菌具有较强的6-ACA耐受性，可耐受高达100 g/L的6-ACA，因此被选作6-ACA合成的底盘<sup>[3]</sup>，上述用于合成5-AVA的途径，也可以用于合成6-ACA。 $\alpha$ -酮戊二酸和乙酰CoA在NifV、AksDE、AksF的催化下合成AKA，后者与另一分子的乙酰CoA在上述三个酶的催化下，延长碳链合成 $\alpha$ -酮庚二酸（AKP），AKP在KdcA和Vfl催化下合成6-ACA，进一步在Act的催化下可

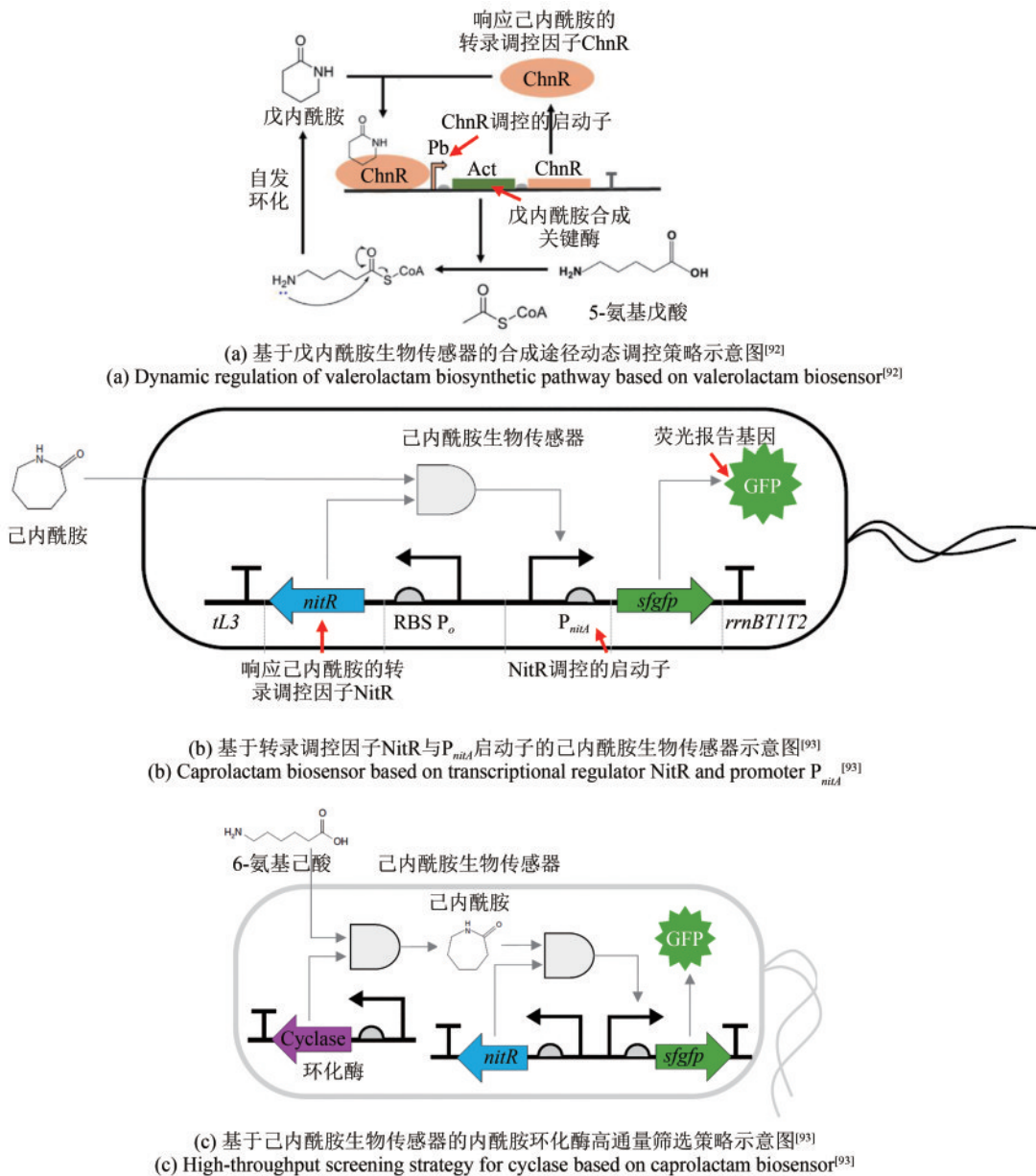


图3 基于内酰胺生物传感器的高通量筛选和动态调控策略<sup>[92-93]</sup>

Fig. 3 High-throughput screening and dynamic regulation strategies based on lactam biosensors<sup>[92-93]</sup>

合成环化产物己内酰胺。Turk等<sup>[3]</sup>在大肠杆菌中构建了上述合成 $\alpha$ -酮庚二酸途径(AKP途径),通过优化蛋白表达和培养基组成,在分批发酵中能够产生160 mg/L的6-ACA,在分批补料发酵中6-ACA的产量达到2 g/L。Chae等<sup>[71]</sup>在大肠杆菌BL21(DE3)中表达了经过密码子优化的NifV、AksDE、AksF、KdcA、Vfl和Act,重构以AKP为中间物的6-ACA合成途径,得到菌株CLM01在以甘油为碳源的培养基中,产生2.56  $\mu$ g/L的己内酰胺和12.83 mg/L的戊内酰胺。为避免副产物戊内酰胺的产生,对KdcA进行定点突变(Q377I、Q377L)得到菌株CLM03和CLM04,己内酰胺产率分别为11.87  $\mu$ g/L和5.71  $\mu$ g/L,戊内酰胺产率分别为9.69 mg/L和2.31 mg/L。CLM03菌株进一步分批补料发酵,己内酰胺产量可达到79.60  $\mu$ g/L,生产强度为9.48  $\mu$ g/(L·h),甘油转化率为3.88  $\mu$ g/g。除Act外,Zhang等<sup>[6]</sup>发现来自链霉菌(*Streptomyces aizunensis*) ECO-02301的酰基辅酶A连接酶(ORF26)也可以催化6-ACA合成己内酰胺,表达该酶的大肠杆菌,在添加2 g/L 6-ACA的培养基中发酵,己内酰胺的产量为2.02 mg/L。

Cheng等<sup>[2]</sup>在重组大肠杆菌中建立了人工的迭代碳链延伸循环,用于生产5-AVA、6-ACA和7-氨基庚酸(7-AH)。首先,L-赖氨酸在L-赖氨酸 $\alpha$ -氧化酶(*raiP*基因编码)的催化下合成2-酮基-6-氨基己酸,后者进入由 $\alpha$ -异丙基苹果酸合成酶突变体(*leuA*<sup>H97L/S139G/G462D</sup>基因编码)、3-异丙基苹果酸脱氢酶(*leuB*基因编码)和3-异丙基苹果酸脱水酶(*leuCD*基因编码)构成的碳链延伸循环,构成的碳链延伸循环,以乙酰CoA为供体进行官能团的改造和碳链延伸。产物通过2-酮异戊酸脱羧酶(*kivD*基因编码)和苯乙醛脱氢酶(*padA*基因编码)催化下合成。该重组菌株摇瓶发酵可同时产生2.15 g/L的5-AVA、24.12 mg/L的6-ACA和4.74 mg/L的7-AH,以2-酮基-6-氨基己酸为底物,经体外酶催化反应8 h后可同时产生99.16 mg/L的5-AVA、46.96 mg/L的6-ACA和4.78 mg/L的7-AH<sup>[2]</sup>。除生物合成外,内酰胺的生物降解也受到关注。Thompson等<sup>[89]</sup>在恶臭假单胞菌中研究了己内酰胺的生物降解途径,结合随机条形码转座子测序(RB-TnSeq)和霰弹枪蛋白质组学的组合分析,发

现5-羟脯氨酸酶(OplBA)在己内酰胺分解代谢中起关键作用。敲除*oplBA*基因可减少己内酰胺的降解,这一研究结果为提高己内酰胺产量、避免产物降解提供了参考。

与GABA和5-AVA的高效生物合成相比,6-ACA的产量明显较低。分析原因,可能是由于6-ACA的合成途径更长,途径的原子经济性较差,理论转化率低,且途径中关键酶活性较低、底物特异性和产物特异性差。因此提高6-ACA的产量需要在途径和酶元件两方面重点开展研究。首先,可借助合成生物学设计具有高原子经济性,且热力学和动力学可行的6-ACA新合成途径。其次,可使用人工智能技术在生物数据库中深度挖掘新的6-ACA合成相关酶,并通过理性设计和定向进化提高酶的催化性能。此外,为提高酶和生产菌种的评价和筛选通量,可以基于内酰胺生物传感器开发高通量筛选策略<sup>[94-95]</sup>,综合运用多种技术手段系统地优化6-ACA的生产菌种。例如,Yeom等<sup>[93]</sup>使用粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)中可识别内酰胺的转录调控因子NitR,及受NitR调控的*nitA*启动子元件,以绿色荧光蛋白编码基因*gfp*为报告基因,通过优化核糖体结合位点(RBS)和启动子,构建了己内酰胺的生物传感器(图3),并基于该生物传感器,建立了内酰胺环化酶的高通量筛选策略CL-GESS(caprolactam-detecting genetic enzyme screening system),从海洋宏基因组中成功筛选到一个新的内酰胺环化酶(图3,表3)。

### 3 总结与展望

我国提出了实现“双碳”的战略目标,世界各国也在努力实现“零碳”的发展愿景,因此,利用可再生资源生产生物基材料正变得越来越重要。与化石基材料相比,生物基材料的碳足迹更小,有助于减少碳排放和材料废物。其中,聚酰胺作为应用广泛的关键工业材料之一,其生物合成是目前研究的前沿热点。在过去的几十年里,基于石油化工的聚酰胺生产已经成功地实现了商业化,且市场规模不断扩大,但是,生物基聚酰胺的研究仍然局限于学术研究,工业化生产仍然需要解决众多问题。本文综述了生物基聚酰胺单

表3 6-氨基己酸的生物合成  
Table 3 Biosynthesis of 6-aminocaproic acid

微生物底盘	基因型	培养模式	碳源	生产水平			参考文献
				产量 /(g/L)	生产强度 /[g/(L·h)]	转化率 /(g/g)	
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pZA22- <i>leuA</i> *- <i>leuB</i> - <i>leuC</i> - <i>leuD</i> , pET21a- <i>raiP</i> - <i>kivD</i> - <i>padA</i>	摇瓶发酵	L-赖氨酸	0.024	—	—	[2]
<i>E. coli</i> BL21	$P_{tac}$ : <i>nifV</i> from <i>A. vinelandi</i> , $aksF_{opt}$ from <i>M. aeolicus</i> Nankai-3, $P_{tac}$ : $aksD_{opt}$ from <i>M. aeolicus</i> Nankai-3, $aksE_{opt}$ from <i>M. aeolicus</i> Nankai-3, $P_{tac}$ : $vfl_{opt}$ from <i>V. fluvialis</i> , $kdcA_{opt}$ from <i>L. lactis</i>	反应器补料 分批发酵	葡萄糖	2.0	0.038	—	[3]
<i>E. coli</i> BL21	$P_{17}$ : <i>nifV_{opt}</i> from <i>A. vinelandi</i> $aksF_{opt}$ from <i>M. aeolicus</i> Nankai-3, $P_{17}$ : $aksD_{opt}$ from <i>M. aeolicus</i> Nankai-3, $aksE_{opt}$ from <i>M. aeolicus</i> Nankai-3, $P_{17}$ : $vfl_{opt}$ from <i>V. fluvialis</i> , $kdcA_{opt}$ from <i>L. lactis</i>	摇瓶发酵	葡萄糖	0.048	—	—	[96]

体内酰胺和 $\omega$ -氨基酸的生物合成最新研究进展，也讨论了目前面临的挑战和发展机遇。

对微生物的蛋白质氨基酸（如L-赖氨酸和L-谷氨酸）合成途径进行改造，以蛋白质氨基酸为前体合成 $\omega$ -氨基酸，其次通过环化步骤，可有效实现内酰胺的从头生物合成。但目前面临的三个挑战是：

(1) 设计高原子经济性的 $\omega$ -氨基酸生物合成途径 目前的合成途径存在多个脱羧反应，例如以L-谷氨酸（ $C_5$ ）为中间物合成GABA（ $C_4$ ）需要脱羧释放1分子二氧化碳，而通过TCA循环的氧化分支合成L-谷氨酸，也需要脱羧释放1分子二氧化碳。以L-赖氨酸（ $C_6$ ）为中间物合成5-AVA，同样需要脱羧释放1分子二氧化碳。6-氨基己酸（ $C_6$ ）的合成途径以 $\alpha$ -酮戊二酸（ $C_5$ ）为中间物，需要整合2分子乙酰CoA，最终释放3分子二氧化碳。由此可见，现有的生物合成途径原子经济性较差，这将直接限制以可再生原料合成聚酰胺单体的理论转化率，间接提高了生产的原料成本。因此，充分借助人工智能，设计新的生化反应和高原子经济性的生物合成途径，是提高聚酰胺单体生物合成效率的重要挑战之一。

(2) 解除 $\omega$ -氨基酸环化的限速步骤 最近的研究在GABA和5-AVA的生物合成方面取得了重要进展，已经获得了较高的产量。对于6-ACA，虽然提出了新的合成途径，但产量仍较低，且存在较多的副产物，需要通过途径和酶工程进一步提高产量。在实现 $\omega$ -氨基酸高产的基础上，后续的环化反应成为了主要的限速步骤。高效的 $\omega$ -氨基酸环化酶应具有高活性、良好的稳定性、理想

的底物选择性和高对映体选择性。南极假丝酵母脂肪酶B（CALB），其具有高温稳定性和底物混杂性，是酯化或酯交换反应和聚合反应中最常用的生物催化剂之一。Stavila等<sup>[97]</sup>研究表明，CALB能够在体外将6-ACA环化为己内酰胺，产率高达60%，但是CALB由于需要有机溶剂和高温条件，不适合用于体内合成，而其余三种酶Act、ORF26、CaiC在底物偏好性和活性方面各有权衡。提高环化酶的催化效率等性能，是提高内酰胺产量的一个重要因素。

(3) 开发木质纤维素、一碳原料等非粮原料生产聚酰胺单体的路线和菌种 目前聚酰胺单体生物合成面临的另一问题是仍主要使用葡萄糖原料，存在“与人争粮”的潜在风险。秸秆等木质纤维素原料、甘露醇等海洋碳资源、甲醇等一碳原料来源广泛，价格低廉，作为生物制造的原料受到越来越多的关注，未来有望成为聚酰胺单体生物合成的替代原料<sup>[98-100]</sup>。除了目前常用的大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌等工业微生物底盘，一些微生物具有利用这些非粮原料的先天优势，例如恶臭假单胞菌具有较强的木质纤维素原料降解利用能力，甲醇芽孢杆菌具有甲醇高效转化利用能力，未来可以作为聚酰胺单体生物合成的底盘。

可以预见，合成生物学的快速发展，将助力研究者应对这些挑战，推动聚酰胺材料单体和更多生物基材料单体的可持续和低碳生物合成。

## 参 考 文 献

- [1] GORDILLO SIERRA A R, ALPER H S. Progress in the

- metabolic engineering of bio-based lactams and their  $\omega$ -amino acids precursors[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 43: 107587.
- [2] CHENG J, HU G, XU Y Q, et al. Production of nonnatural straight-chain amino acid 6-aminocaproate *via* an artificial iterative carbon-chain-extension cycle[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 23-32.
- [3] TURK S C, KLOOSTERMAN W P, NINABER D K, et al. Metabolic engineering toward sustainable production of nylon-6[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(1): 65-73.
- [4] LEE J A, KIM J Y, AHN J H, et al. Current advancements in the bio-based production of polyamides[J]. *Trends in Chemistry*, 2023, 5(12): 873-891.
- [5] BEERTHUIS R, ROTHENBERG G, SHIJU N R. Catalytic routes towards acrylic acid, adipic acid and  $\epsilon$ -caprolactam starting from biorenewables[J]. *Green Chemistry*, 2015, 17(3): 1341-1361.
- [6] ZHANG J W, BARAJAS J F, BURDU M, et al. Application of an acyl-CoA ligase from *Streptomyces aizunensis* for lactam biosynthesis[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(5): 884-890.
- [7] LEE J W, KIM T Y, JANG Y S, et al. Systems metabolic engineering for chemicals and materials[J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(8): 370-378.
- [8] 王仲霞, 陈春风, 庄毅, 等. 生物基聚酰胺及其单体研究进展[J]. *精细化工中间体*, 2023, 53(4): 11-17.
- WANG Z X, CHEN C F, ZHUANG Y, et al. Progress of bio-based polyamide and its monomer[J]. *Fine Chemical Intermediates*, 2023, 53(4): 11-17.
- [9] 陈万丁, 刘艳林, 倪金平, 等. 新型生物基聚酰胺的研究进展[J]. *塑料工业*, 2023, 51(9): 8-13, 101.
- CHEN W D, LIU Y L, NI J P, et al. Research progress of novel biobased polyamides[J]. *China Plastics Industry*, 2023, 51(9): 8-13, 101.
- [10] LEE J W, KIM H U, CHOI S, et al. Microbial production of building block chemicals and polymers[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(6): 758-767.
- [11] 周文娟, 付刚, 齐显尼, 等. 发酵工业菌种的迭代创制[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(11): 4200-4218.
- ZHOU W J, FU G, QI X N, et al. Upgrading microbial strains for fermentation industry[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(11): 4200-4218.
- [12] 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*, 2021, 37(5): 1677-1696.
- MA Q, XIA L, TAN M, et al. Advances and prospects in metabolic engineering for the production of amino acids[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(5): 1677-1696.
- [13] KOGURE T, INUI M. Recent advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for bioproduction of value-added aromatic chemicals and natural products[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(20): 8685-8705.
- [14] 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.
- [15] 李学朋, 陈久洲, 张东旭, 等. L-谷氨酸生产关键技术创新与产业化应用[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(11): 4343-4351.
- LI X P, CHEN J Z, ZHANG D X, et al. Innovation of key technologies in fermentative production of L-glutamate and industrial application[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(11): 4343-4351.
- [16] ZHANG J W, KAO E, WANG G, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of 2-pyrrolidone[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2016, 3: 1-7.
- [17] PARK J Y, JEONG S J, KIM J H. Characterization of a glutamate decarboxylase (*GAD*) gene from *Lactobacillus zymae*[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(9): 1791-1799.
- [18] DHAKAL R, BAJPAI V K, BAEK K H. Production of GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(4): 1230-1241.
- [19] KE C R, YANG X W, RAO H X, et al. Whole-cell conversion of L-glutamic acid into gamma-aminobutyric acid by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *SpringerPlus*, 2016, 5: 591.
- [20] KOMATSUZAKI N, SHIMA J, KAWAMOTO S, et al. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods[J]. *Food Microbiology*, 2005, 22(6): 497-504.
- [21] YANG S Y, LÜ F X, LU Z X, et al. Production of gamma-aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. thermophilus Y2 under submerged fermentation[J]. *Amino Acids*, 2008, 34(3): 473-478.
- [22] WANG Q, LIU X H, FU J H, et al. Substrate sustained release-based high efficacy biosynthesis of GABA by *Lactobacillus brevis* NCL912[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 80.
- [23] PLOKHOV A Y, GUSYATINER M M, YAMPOLSKAYA T A, et al. Preparation of  $\gamma$ -aminobutyric acid using *E. coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2000, 88(1): 257-265.
- [24] PARK S J, KIM E Y, NOH W, et al. Synthesis of nylon 4 from gamma-aminobutyrate (GABA) produced by recombinant *Escherichia coli*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 36(7): 885-892.
- [25] LE VO T D, KO J S, LEE S H, et al. Overexpression of *Neurospora crassa* OR74A glutamate decarboxylase in

- Escherichia coli* for efficient GABA production[J]. *Biotechnology & Bioprocess Engineering*, 2013, 18(6): 1062-1066.
- [26] LE VO T D, PHAM V D, KO J S, et al. Improvement of gamma-amino butyric acid production by an overexpression of glutamate decarboxylase from *Pyrococcus horikoshii* in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology & Bioprocess Engineering*, 2014, 19(2): 327-331.
- [27] XIONG Q, XU Z, XU L, et al. Efficient production of GABA using recombinant *E. coli* expressing glutamate decarboxylase (GAD) derived from eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2017, 183(4): 1390-1400.
- [28] KE C R, WEI J, REN Y, et al. Efficient gamma-aminobutyric acid bioconversion by engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2018, 32(3): 566-573.
- [29] YU P, CHEN K F, HUANG X X, et al. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in *Escherichia coli* by engineering MSG pathway[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2018, 48(10): 906-913.
- [30] LE VO T D, KIM T W, HONG S H. Effects of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter on the bioconversion of GABA in engineered *Escherichia coli*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(4): 645-650.
- [31] YANG X W, KE C R, ZHU J M, et al. Enhanced productivity of gamma-amino butyric acid by cascade modifications of a whole-cell biocatalyst[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(8): 3623-3633.
- [32] PHAM V D, LEE S H, PARK S J, et al. Production of gamma-aminobutyric acid from glucose by introduction of synthetic scaffolds between isocitrate dehydrogenase, glutamate synthase and glutamate decarboxylase in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 207: 52-57.
- [33] PHAM V D, SOMASUNDARAM S, LEE S H, et al. Efficient production of gamma-aminobutyric acid using *Escherichia coli* by co-localization of glutamate synthase, glutamate decarboxylase, and GABA transporter[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(1): 79-86.
- [34] PHAM V D, SOMASUNDARAM S, LEE S H, et al. Redirection of metabolic flux into novel gamma-aminobutyric acid production pathway by introduction of synthetic scaffolds strategy in *Escherichia coli*[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2016, 178(7): 1315-1324.
- [35] PHAM V D, SOMASUNDARAM S, LEE S H, et al. Engineering the intracellular metabolism of *Escherichia coli* to produce gamma-aminobutyric acid by co-localization of GABA shunt enzymes[J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(2): 321-327.
- [36] PHAM V D, SOMASUNDARAM S, PARK S J, et al. Co-localization of GABA shunt enzymes for the efficient production of gamma-aminobutyric acid via GABA shunt pathway in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(4): 710-716.
- [37] ZHAO A Q, HU X Q, WANG X Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce gamma-aminobutyric acid using xylose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(9): 3587-3603.
- [38] SOMA Y, FUJIWARA Y, NAKAGAWA T, et al. Reconstruction of a metabolic regulatory network in *Escherichia coli* for purposeful switching from cell growth mode to production mode in direct GABA fermentation from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 43(Pt A): 54-63.
- [39] IM D K, HONG J, GU B, et al. <sup>13</sup>C metabolic flux analysis of *Escherichia coli* engineered for gamma-aminobutyrate production[J]. *Biotechnology Journal*, 2020, 15(6): e1900346.
- [40] LAN Y J, TAN S I, CHENG S Y, et al. Development of *Escherichia coli* Nissle 1917 derivative by CRISPR/Cas9 and application for gamma-aminobutyric acid (GABA) production in antibiotic-free system[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 168: 107952.
- [41] TAKAHASHI C, SHIRAKAWA J, TSUCHIDATE T, et al. Robust production of gamma-amino butyric acid using recombinant *Corynebacterium glutamicum* expressing glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51(3): 171-176.
- [42] SHI F, JIANG J J, LI Y F, et al. Enhancement of  $\gamma$ -aminobutyric acid production in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by co-expressing two glutamate decarboxylase genes from *Lactobacillus brevis*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2013, 40(11): 1285-1296.
- [43] CHOI J W, YIM S S, LEE S H, et al. Enhanced production of gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by expressing glutamate decarboxylase active in expanded pH range[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 21.
- [44] BARITUGO K A, KIM H T, DAVID Y, et al. Enhanced production of gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* strains from empty fruit bunch biosugar solution[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 129.
- [45] SHI F, LUAN M Y, LI Y F. Ribosomal binding site sequences and promoters for expressing glutamate decarboxylase and

- producing  $\gamma$ -aminobutyrate in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *AMB Express*, 2018, 8(1): 61.
- [46] ZHAO Z, DING J Y, MA W H, et al. Identification and characterization of  $\gamma$ -aminobutyric acid uptake system GabPCg (NCgl0464) in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(8): 2596-2601.
- [47] OKAI N, TAKAHASHI C, HATADA K, et al. Disruption of *pknG* enhances production of gamma-aminobutyric acid by *Corynebacterium glutamicum* expressing glutamate decarboxylase[J]. *AMB Express*, 2014, 4: 20.
- [48] WANG C, ZHANG K, CHEN Z J, et al. Directed evolution and mutagenesis of lysine decarboxylase from *Hafnia alvei* AS1.1009 to improve its activity toward efficient cadaverine production[J]. *Biotechnology & Bioprocess Engineering*, 2015, 20(3): 439-446.
- [49] SHI F, ZHANG M, LI Y F. Overexpression of *ppc* or deletion of *mdh* for improving production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33(6): 122.
- [50] JORGE J M P, LEGGEWIE C, WENDISCH V F. A new metabolic route for the production of gamma-aminobutyric acid by *Corynebacterium glutamicum* from glucose[J]. *Amino Acids*, 2016, 48(11): 2519-2531.
- [51] ZHANG R Z, YANG T W, RAO Z M, et al. Efficient one-step preparation of  $\gamma$ -aminobutyric acid from glucose without an exogenous cofactor by the designed *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Green Chem*, 2014, 16(9): 4190-4197.
- [52] JORGE J M, NGUYEN A Q, PÉREZ-GARCÍA F, et al. Improved fermentative production of gamma-aminobutyric acid via the putrescine route: systems metabolic engineering for production from glucose, amino sugars, and xylose[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 862-873.
- [53] CHO J S, CHOI K R, PRABOWO C P S, et al. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 157-167.
- [54] ZHANG Y, ZHAO J, WANG X L, et al. Model-guided metabolic rewiring for gamma-aminobutyric acid and butyrolactam biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032[J]. *Biology*, 2022, 11(6): 846.
- [55] SON J, BARITUGO K A, SOHN Y J, et al. Production of  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by expression of glutamate decarboxylase active at neutral pH[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(33): 29106-29115.
- [56] LI H X, QIU T, HUANG G D, et al. Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 85.
- [57] WEI L, ZHAO J H, WANG Y R, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level  $\gamma$ -aminobutyric acid production from glycerol by dynamic metabolic control [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 69: 134-146.
- [58] JUN C H, JOO J C, LEE J H, et al. Thermostabilization of glutamate decarboxylase B from *Escherichia coli* by structure-guided design of its pH-responsive N-terminal interdomain[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 174: 22-28.
- [59] PENNACCHIETTI E, LAMMENS T M, CAPITANI G, et al. Mutation of His<sup>465</sup> alters the pH-dependent spectroscopic properties of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase and broadens the range of its activity toward more alkaline pH[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(46): 31587-31596.
- [60] SA H D, PARK J Y, JEONG S J, et al. Characterization of glutamate decarboxylase (GAD) from *Lactobacillus sakei* A156 isolated from *Jeot-gal*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(5): 696-703.
- [61] SHI F, XIE Y L, JIANG J J, et al. Directed evolution and mutagenesis of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* Lb85 to broaden the range of its activity toward a near-neutral pH[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 61-62: 35-43.
- [62] SEO M J, NAM Y D, LEE S Y, et al. Expression and characterization of a glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* 877G producing  $\gamma$ -aminobutyric acid[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(4): 853-856.
- [63] YU K, LIN L, HU S, et al. C-terminal truncation of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 extends its activity toward near-neutral pH[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 50(4-5): 263-269.
- [64] YANG S Y, LIN Q, LU Z X, et al. Characterization of a novel glutamate decarboxylase from *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* Y2[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2008, 83(6): 855-861.
- [65] LIU Q D, CHENG H J, MA X Q, et al. Expression, characterization and mutagenesis of a novel glutamate decarboxylase from *Bacillus megaterium*[J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(7): 1107-1113.
- [66] KIM H W, KASHIMA Y, ISHIKAWA K, et al. Purification and characterization of the first archaeal glutamate decarboxylase from *Pyrococcus horikoshii*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(1): 224-227.
- [67] HAO R, SCHMIT J C. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Neurospora crassa* conidia[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(8): 5135-5139.
- [68] CUI Y H, MIAO K, NIYAPHORN S, et al. Production of

- gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: a systematic review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 995.
- [69] LI H X, QIU T, GAO D D, et al. Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912[J]. *Amino Acids*, 2010, 38(5): 1439-1445.
- [70] HARTLINE C J, SCHMITZ A C, HAN Y C, et al. Dynamic control in metabolic engineering: theories, tools, and applications[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 63: 126-140.
- [71] CHAE T U, KO Y S, HWANG K S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of four-, five- and six-carbon lactams[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 82-91.
- [72] REVELLES O, WITTICH R M, RAMOS J L. Identification of the initial steps in D-lysine catabolism in *Pseudomonas putida* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(7): 2787-2792.
- [73] PARK S J, KIM E Y, NOH W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 5-aminovalerate and glutarate as C<sub>5</sub> platform chemicals[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 16: 42-47.
- [74] PARK S J, OH Y H, NOH W, et al. High-level conversion of L-lysine into 5-aminovalerate that can be used for nylon 6,5 synthesis[J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 9(10): 1322-1328.
- [75] CHENG J, LUO Q, DUAN H C, et al. Efficient whole-cell catalysis for 5-aminovalerate production from L-lysine by using engineered *Escherichia coli* with ethanol pretreatment[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 990.
- [76] SHIN J H, PARK S H, OH Y H, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for enhanced production of 5-aminovaleric acid[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 174.
- [77] ROHLES C M, GIEBELMANN G, KOHLSTEDT M, et al. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of the carbon-5 platform chemicals 5-aminovalerate and glutarate[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 154.
- [78] JOO J C, OH Y H, YU J H, et al. Production of 5-aminovaleric acid in recombinant *Corynebacterium glutamicum* strains from a *Miscanthus* hydrolysate solution prepared by a newly developed *Miscanthus* hydrolysis process[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1692-1700.
- [79] ROHLES C, PAULI S, GIEBELMANN G, et al. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* eliminates all by-products for selective and high-yield production of the platform chemical 5-aminovalerate[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 168-181.
- [80] 박시재, DAVID Y, BAYLON M G, et al. 바이오플라스틱 생산 미생물 플랫폼 제작을 위한 대사공학 전략 개발[J/OL]. *한국공업화학회*, 2014, 25(2): 134-141[2023-03-01]. <https://doi.org/10.14478/ace.2014.1031>.
- PARK S J, DAVID Y, BAYLON M G, et al. Development of metabolic engineering strategies for microbial platform to produce bioplastics[J/OL]. *Applied Chemistry for Engineering*, 2014, 25(2): 134-141[2023-03-01]. <https://doi.org/10.14478/ace.2014.1031>.
- [81] ADKINS J, JORDAN J, NIELSEN D R. Engineering *Escherichia coli* for renewable production of the 5-carbon polyamide building-blocks 5-aminovalerate and glutarate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(6): 1726-1734.
- [82] WANG X, CAI P P, CHEN K Q, et al. Efficient production of 5-aminovalerate from L-lysine by engineered *Escherichia coli* whole-cell biocatalysts[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 134: 115-121.
- [83] LI Z, XU J, JIANG T T, et al. Overexpression of transport proteins improves the production of 5-aminovalerate from L-lysine in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30884.
- [84] CHENG J, ZHANG Y N, HUANG M H, et al. Enhanced 5-aminovalerate production in *Escherichia coli* from L-lysine with ethanol and hydrogen peroxide addition[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2018, 93(12): 3492-3501.
- [85] CHENG J, TU W Y, LUO Z, et al. A high-efficiency artificial synthetic pathway for 5-aminovalerate production from biobased L-lysine in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 633028.
- [86] JORGE J M P, PÉREZ-GARCÍA F, WENDISCH V F. A new metabolic route for the fermentative production of 5-aminovalerate from glucose and alternative carbon sources [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1701-1709.
- [87] HAUPKA C, DELÉPINE B, IRLA M, et al. Flux enforcement for fermentative production of 5-aminovalerate and glutarate by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Catalysts*, 2020, 10(9): 1065.
- [88] HAN T, LEE S Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the high-level production of valerolactam, a nylon-5 monomer[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 79: 78-85.
- [89] THOMPSON M G, VALENCIA L E, BLAKE-HEDGES J M, et al. Omics-driven identification and elimination of valerolactam catabolism in *Pseudomonas putida* KT2440 for increased product titer[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2019, 9: e00098.
- [90] 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.
- [91] ZHANG J W, BARAJAS J F, BURDU M, et al. Development of a transcription factor-based lactam biosensor[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(3): 439-445.
- [92] ZHAO X X, WU Y L, FENG T Y, et al. Dynamic upregulation of the rate-limiting enzyme for valerolactam biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 77: 89-99.
- [93] YEOM S J, KIM M, KWON K K, et al. A synthetic microbial biosensor for high-throughput screening of lactam biocatalysts [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 5053.
- [94] LEE S Y, KIM H U. Systems strategies for developing industrial microbial strains[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33 (10): 1061-1072.
- [95] ZENG W Z, GUO L K, XU S, et al. High-throughput screening technology in industrial biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(8): 888-906.
- [96] 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.
- [97] STAVILA E, LOOS K. Synthesis of lactams using enzyme-catalyzed aminolysis[J]. *Tetrahedron Letters*, 2013, 54(5): 370-372.
- [98] ZHANG Z H, WANG Y, ZHENG P, et al. Promoting lignin valorization by coping with toxic C<sub>1</sub> byproducts[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(4): 331-335.
- [99] XIN B, ZHONG C, WANG Y. Integrating the marine carbon resource mannitol into biomanufacturing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(6): 745-749.
- [100] WANG Y, FAN L W, TUYISHIME P, et al. Synthetic methylotrophy: a practical solution for methanol-based biomanufacturing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(6): 650-666.



**通讯作者:** 王钰(1987—),男,博士,研究员,博士生导师。研究方向为工业微生物的基因编辑育种和一碳原料的生物转化利用研究。

E-mail: wang\_y@tib.cas.cn



**第一作者:** 刘益宁(1996—),女,硕士,科研助理。研究方向为系统代谢工程与合成生物学。

E-mail: liuyn@tib.cas.cn



**共同第一作者:** 蒲伟(1988—),男,博士,讲师。研究方向为系统代谢工程与合成生物学。

E-mail: puwei1988@outlook.com