

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-068

L-精氨酸的微生物合成研究进展

王倩^{1,2}, 果士婷², 辛波¹, 钟成¹, 王钰²

(¹ 天津科技大学生物工程学院, 天津 300222; ² 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)

摘要: L-精氨酸是一种碱性氨基酸, 是护肤产品中常用的中和剂、保湿剂和抗氧化剂, 此外, L-精氨酸还广泛应用于饲料、医药、食品等领域。以工程化的谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌等微生物为催化剂, 以可再生的淀粉糖为原料, 通过微生物发酵的方法生产L-精氨酸是目前该产品最主要的生产方法。为创制高效的工程微生物菌种, 早期研究者通常采用诱变筛选的方法, 但由于突变的不确定性和非定向性, 育种效率较低。随着合成生物学的发展, 人工设计L-精氨酸的合成途径和调控机制, 并通过基因编辑理性创制工程微生物菌种成为研究的主流。本文综述了不同微生物中发现的L-精氨酸合成途径及调控机制, 以谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌为主, 介绍了设计创制L-精氨酸高产菌种的合成生物学代谢改造策略, 以及基于生物传感器的高通量筛选在L-精氨酸高产菌种筛选中的应用。最后, 展望了进一步提高L-精氨酸生物合成水平的潜在策略, 以及一碳原料等新型非粮碳资源在未来L-精氨酸生产中的应用前景。

关键词: L-精氨酸; 代谢工程; 合成生物学; 一碳原料; 谷氨酸棒杆菌; 大肠杆菌

中图分类号: Q816 文献标志码: A

Advances in biosynthesis of L-arginine using engineered microorganisms

WANG Qian^{1,2}, GUO Shiting², XIN Bo¹, ZHONG Cheng¹, WANG Yu²

(¹ College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China; ² Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: L-arginine is an alkaline amino acid that has been used as a neutralizer, moisturizer, and antioxidant in skin care products. In addition, L-arginine is also widely used in feed, medicine, and food industries. The wide range of applications for L-arginine has garnered significant attention for its robust production. L-arginine can be produced through protein hydrolysis and microbial fermentation. However, protein hydrolysis has drawbacks, including complicated operation, high purification cost, low recovery efficiency, and environmental pollution. In contrast, the microbial fermentation can use renewable and cheap feedstock. Besides, the process is performed under mild

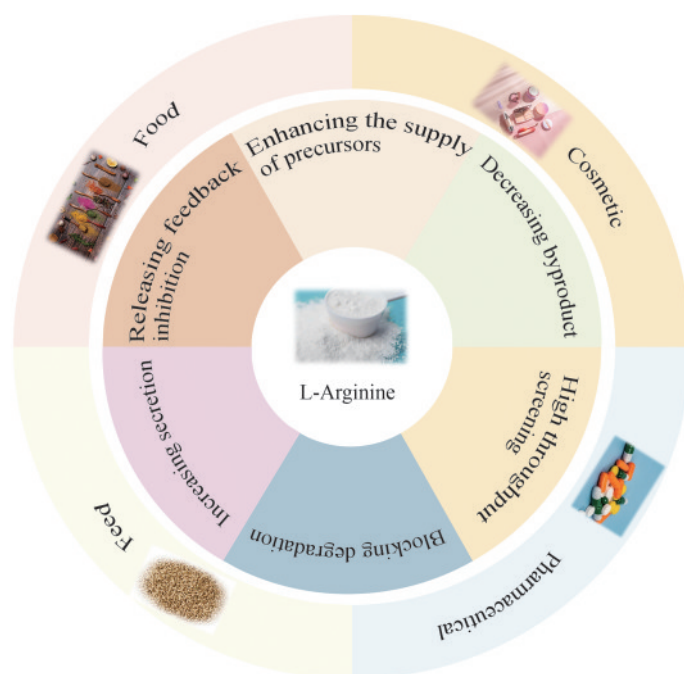
收稿日期: 2024-08-28 修回日期: 2024-10-31

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFD1300700)

引用本文: 王倩, 果士婷, 辛波, 钟成, 王钰. L-精氨酸的微生物合成研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6(2): 290-305

Citation: WANG Qian, GUO Shiting, XIN Bo, ZHONG Cheng, WANG Yu. Advances in biosynthesis of L-arginine using engineered microorganisms [J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(2): 290-305

conditions, and thus is more environmentally friendly. At present, engineered microorganisms such as *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* are major producers of L-arginine, and design and construction of microbial strains is the robust production of L-arginine through microbial fermentation. Random mutagenesis and screening strategies are used to develop L-arginine producing microbial strains, which are random with uncertainties, resulting in a low-efficiency for the breeding. With the development of synthetic biotechnology, development of L-arginine producing strains is empowered by the rational design of artificial synthetic pathways and regulatory machineries, taking advantages of advanced genome editing technologies. This paper reviews the progress in the studies of the synthetic pathways and regulatory mechanisms of L-arginine production that have been discovered in different microorganisms. Synthetic biology-guided metabolic engineering strategies for improving L-arginine production in *C. glutamicum* and *E. coli* are summarized. Besides, the application of the biosensor-based high-throughput screening strategy for selecting L-arginine producing strains is introduced. Finally, potential strategies to enhancing L-arginine production and the possibility of using new carbon resources such as non-food biomass and one-carbon feedstock for L-arginine production are discussed. It is envisioned that synthetic biology-guided strain engineering will further enhance the production of L-arginine, particularly using non-food feedstock in the near future.



Keywords: L-arginine; metabolic engineering; synthetic biology; one-carbon feedstocks; *Corynebacterium glutamicum*; *Escherichia coli*

1886年, Schlus首次从植物羽扁豆的幼苗中发现并分离出L-精氨酸^[1]。1896年, Kossel发现其在鱼精蛋白中大量存在, 故将其命名为L-精氨酸^[2-3]。L-精氨酸是一种条件必需氨基酸, 正常情况下, 人体自身合成的L-精氨酸可以满足日常生理需求, 但处于特殊阶段或病理状态下时, L-精氨酸合成不足, 需要从外界补充摄取^[4]。L-精氨酸在

食品、医药、饲料和化妆品等行业有广泛应用。在食品行业中, L-精氨酸常被用作食品调味剂和饮料添加剂; 在医药行业中, L-精氨酸被用于生产多种药物, 用于治疗高氨血症、口服氨基酸补充剂、缓解疲劳、改善肝功能以及调节内分泌等^[5]。此外, 在动物饲料中添加L-精氨酸可以促进动物的生长发育, 修复肠道损伤, 提高机体免疫力并且

预防各种疾病的发生^[6]。作为一种碱性氨基酸，L-精氨酸也被广泛用作化妆品的中和剂和保湿剂^[5]。美国环境组织（Environmental Working Group, EWG）制定了EWG化妆品成分安全等级标准，其中L-精氨酸为绿色等级，安全系数高，对人体健康影响较小，可替代三乙醇胺、氨甲基丙醇和氢氧化钠等作为化妆品的中和剂^[5]。此外，L-精氨酸与共轭亚油酸结合而形成的抗氧化剂，能够有效消除皮肤表面的超氧阴离子自由基、羟自由基及二苯代苦味肼基自由基等有害物质，有助于减缓皮肤老化^[7]。

L-精氨酸主要通过蛋白水解法和微生物发酵法制得^[8]。其中，蛋白水解法通过水解毛发、猪皮等富含蛋白质的原料，并进一步分离提纯来制备L-精氨酸，但该方法存在操作烦琐、提纯成本高、回收效率低以及污染环境等缺点^[9]。近年来微生物发酵成为生产L-精氨酸的主流方法^[10]。与蛋白水解法相比，微生物发酵法原料同样廉价易得，且生产工艺更为简单，反应条件更为温和，更加环境友好。微生物发酵法生产L-精氨酸的关键是发酵菌种的获得。诱变育种和代谢工程改造是获取高产L-精氨酸菌株的两种常见方法^[11]。传统诱变技术存在突变位点随机、筛选工作量大和遗传表型不稳定等缺点，而代谢工程改造能够通过人工理性设计和构建获得遗传表型较为稳定的L-精氨酸生产菌株^[12-14]。

本文主要综述了不同微生物中L-精氨酸合成途径及调控机制，并以谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌为主，介绍了设计创制L-精氨酸生产菌株的代谢工程改造方法，以及基于生物传感器的高通量筛选方法在获得L-精氨酸高产菌种中的应用，最后进一步展望了提高L-精氨酸生物合成水平的潜在策略，以及开发非粮一碳原料在解决传统L-精氨酸发酵生产中碳源限制问题的应用前景。

1 L-精氨酸的生物合成及调控机制

1.1 L-精氨酸的主要生产底盘

微生物发酵生产L-精氨酸的底盘主要包括谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌^[15]。谷氨酸棒杆菌作为重

要的L-精氨酸生产底盘具有多个显著的优势^[16-17]。一是拥有完整的L-精氨酸代谢途径，无需外源导入基因；二是适应性强，能够利用己糖和戊糖等多种碳源来满足自身生长和氨基酸生产；三是具有成熟的基因编辑工具，便于进行基因的精确改造和代谢通路优化^[18-23]。大肠杆菌因其生长繁殖速度快、遗传背景清晰、发酵生产工艺成熟等优势，也被广泛用作L-精氨酸生产底盘^[24-25]。此外，钝齿棒杆菌是谷氨酸棒杆菌的亚种，与谷氨酸棒杆菌具有高达99%的基因组同源性，具备与谷氨酸棒杆菌类似的优良性能和L-精氨酸生产潜力^[26]，因此也被用作L-精氨酸的生产底盘^[27-28]。

1.2 L-精氨酸的生物合成途径

在微生物中存在3种不同的L-精氨酸合成途径，根据乙酰鸟氨酸代谢方式的不同可分为以大肠杆菌为代表的L-精氨酸合成途径、以谷氨酸棒杆菌为代表的L-精氨酸合成途径和以黄单胞菌为代表的L-精氨酸合成途径（图1）^[29-32]。

1.2.1 大肠杆菌中L-精氨酸合成途径

在大肠杆菌中L-精氨酸是以L-谷氨酸为前体物质，经乙酰谷氨酸合成酶ArgA、乙酰谷氨酸激酶ArgB、乙酰谷氨酰磷酸还原酶ArgC、乙酰鸟氨酸转氨酶ArgD、乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶ArgE、鸟氨酸氨基甲酰转移酶ArgF、精氨酸琥珀酸合成酶ArgG和精氨酸琥珀酸裂解酶ArgH这8种酶催化生成。其中ArgA催化前体L-谷氨酸合成乙酰谷氨酸，是L-精氨酸合成途径的关键限速酶，受到终产物L-精氨酸的反馈抑制^[24]。除此之外，L-精氨酸合成途径中的*argA*、*argB*、*argC*、*argD*、*argE*、*argF*、*argG*、*argH*基因均受到阻遏蛋白ArgR的转录负调控，当细胞中L-精氨酸浓度上升时，ArgR阻遏L-精氨酸合成相关基因的转录^[33]。

1.2.2 谷氨酸棒杆菌中L-精氨酸合成途径

谷氨酸棒杆菌与大肠杆菌中L-精氨酸合成途径主要区别在于不同的酶参与了乙酰鸟氨酸转化^[29]。在大肠杆菌中，乙酰鸟氨酸由ArgE催化脱乙酰基形成鸟氨酸。而在谷氨酸棒杆菌中，乙酰鸟氨酸通过鸟氨酸乙酰转移酶ArgJ催化成鸟氨酸。

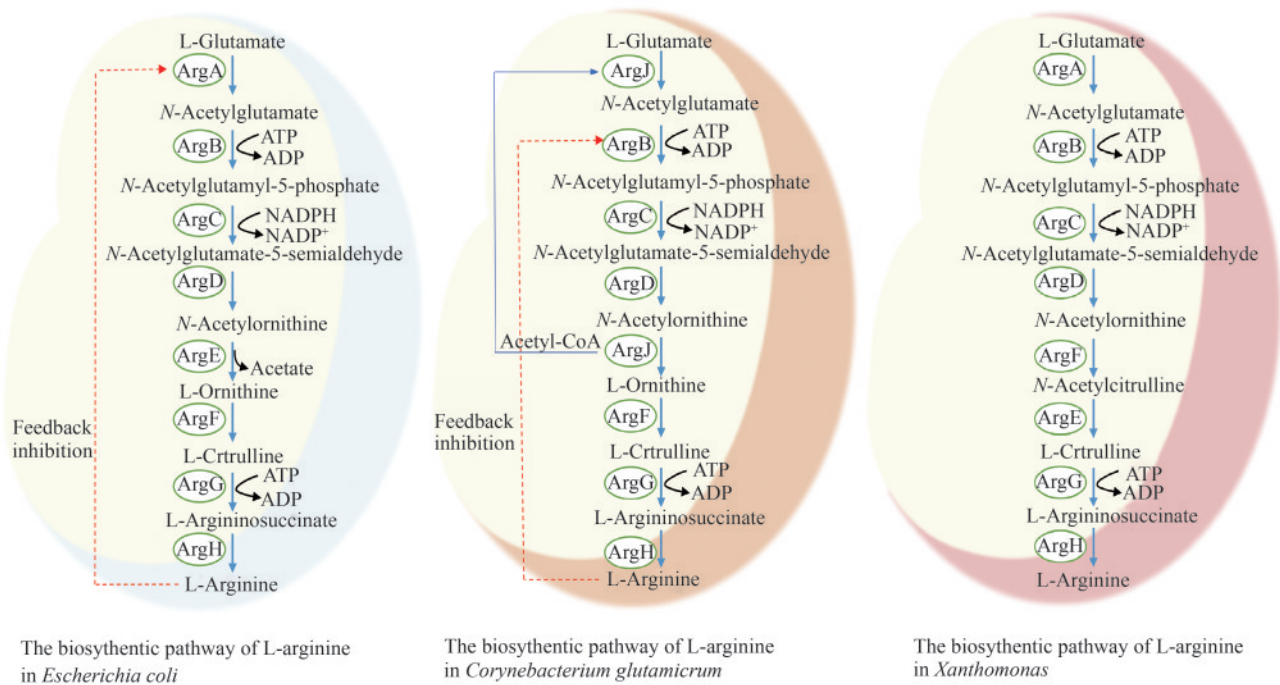


图1 微生物中L-精氨酸生物合成途径

(ArgA—乙酰谷氨酸合成酶; ArgB—乙酰谷氨酸激酶; ArgC—乙酰谷氨酰磷酸还原酶; ArgD—乙酰鸟氨酸转氨酶; ArgE—乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶; ArgF—鸟氨酸甲酰转移酶; ArgG—精氨酸琥珀酸合成酶; ArgH—精氨酸琥珀酸裂解酶; ArgF—乙酰鸟氨酸甲酰转移酶; ArgJ—鸟氨酸乙酰转移酶)

Fig. 1 Biosynthetic pathways of L-arginine in microorganisms

(ArgA—acetylglutamate synthase; ArgB—acetylglutamate kinase; ArgC—acetyl-glutamyl-phosphate reductase; ArgD—acetylornithine aminotransferase; ArgE—acetylornithine deacetylase; ArgF—ornithine carbamoyltransferase; ArgG—argininosuccinate synthase; ArgH—argininosuccinate lyase; ArgF—acetylornithine carbamoyltransferase; ArgJ—ornithine acetyltransferase)

ArgJ具有双重功能,它能够同时催化合成途径中的第1、5步反应,即将乙酰鸟氨酸的乙酰基团转移至L-谷氨酸分子上,并形成鸟氨酸和乙酰谷氨酸。在谷氨酸棒杆菌中,L-精氨酸合成基因形成 $argCJBDFR$ 和 $argGH$ 两簇操纵子^[34]。其中,ArgB受终产物L-精氨酸反馈抑制,是L-精氨酸合成的关键限速酶^[15, 35-36]。此外,L-精氨酸操纵子的转录受到阻遏蛋白ArgR和FarR的反馈抑制,FarR可以结合在 $argC$ 、 $argB$ 、 $argF$ 、 $argG$ 等基因的上游,而ArgR结合在 $argC$ 和 $argG$ 上游的启动子区域,二者通过调控L-精氨酸合成基因的转录调节L-精氨酸的合成^[15]。

1.2.3 黄单胞菌中L-精氨酸合成途径

在黄单胞菌中L-精氨酸合成途径与前两种合成途径的主要区别在于,乙酰鸟氨酸并非先被转化为鸟氨酸再进行下一步代谢,而是在ArgF催化下转化为乙酰瓜氨酸,后者在ArgE催化下生成瓜氨酸,并最终转化为L-精氨酸。在L-精氨酸合成新途径中,多个基因的转录也受到ArgR阻遏蛋白的调控^[24]。

2 L-精氨酸生产菌种的设计创制策略

代谢途径理性设计和代谢工程改造在L-精氨酸生产菌株设计创制中的应用越来越广泛,其主要策略包括解除终产物L-精氨酸对关键限速酶的反馈抑制、解除或减弱阻遏蛋白对L-精氨酸操纵子的转录抑制、切断或减弱L-精氨酸的降解以及强化胞内辅因子NADPH和ATP的供应等^[24, 37]。表1总结了谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌等微生物合成L-精氨酸的代谢改造策略。

2.1 解除L-精氨酸合成途径关键酶的抑制

2.1.1 解除阻遏蛋白对L-精氨酸操纵子的转录抑制

在谷氨酸棒杆菌中,参与L-精氨酸合成代谢的多个基因均受到阻遏蛋白ArgR和FarR的调控。当细胞内L-精氨酸浓度达到一定阈值时,ArgR会

表1 代谢改造微生物合成L-精氨酸

Table 1 Production of L-arginine by metabolically engineered microorganisms

| 菌种 | 代谢改造策略 | 原料 | 产量 /(g/L) | 转化率 /(g/g) | 生产强度 /[g/(L·h)] | 发酵方式 | 参考文献 |
|--------|--|---------------|--------------|---------------|--------------------|------------|------|
| 谷氨酸棒杆菌 | 增强辅因子NADPH的供应;过表达 <i>pntAB</i> 和 <i>ppnk</i> ;解除阻遏蛋白对L-精氨酸操纵子的转录抑制;敲除 <i>argR</i> 和 <i>farR</i> ;阻断副产物合成途径:敲除 <i>ldh</i> (编码乳酸脱氢酶) | 葡萄糖 | 67.01 | 0.35 | 0.89 | 补料分批 发酵 | [38] |
| 谷氨酸棒杆菌 | 诱变育种;增强辅因子NADPH的供应;下调 <i>pgi</i> 的表达,过表达 <i>tkt</i> 、 <i>tal</i> 、 <i>zwf</i> 、 <i>opcA</i> 、 <i>pgl</i> ;强化L-精氨酸合成途径:过表达 <i>argGH</i> 、 <i>carAB</i> ;解除阻遏蛋白对L-精氨酸操纵子的转录抑制;敲除 <i>argR</i> 和 <i>farR</i> ;增强前体物质L-谷氨酸的供应:敲除 <i>ncgl1221</i> | 葡萄糖; 蔗糖 | 92.50 | 0.40 | 1.28 | 补料分批 发酵 | [39] |
| 钝齿棒杆菌 | 解除终产物对L-精氨酸合成关键酶的反馈抑制:定点突变 ArgB ^{E19Y/I74V/F91H/K234T} | 葡萄糖 | 61.20 | 0.43 | 0.64 | 补料分批 发酵 | [40] |
| 大肠杆菌 | 解除阻遏蛋白对L-精氨酸操纵子的转录抑制;敲除 <i>argR</i> ;解除终产物对L-精氨酸合成关键酶的反馈抑制;外源表达 <i>argJ</i> ;强化L-精氨酸合成途径:外源表达 <i>argCJBDF</i> | 葡萄糖 | 70.10 | 0.33 | 1.17 | 补料分批 发酵 | [41] |
| 钝齿棒杆菌 | 增强前体物质L-谷氨酸的供应:过表达 <i>iolTI</i> 、 <i>ptsG</i> 、 <i>ppgk</i> 、 <i>pyc</i> 、 <i>gltA</i> 、 <i>gdh</i> ,下调 <i>odhA</i> 的表达;强化L-精氨酸合成途径:过表达 <i>argCJBDF</i> 、 <i>argGH</i> ;阻断副产物合成途径:敲除 <i>proB</i> ,下调 <i>lysC</i> 的表达;增强辅因子NADPH的供应:下调 <i>pgi</i> 的表达 | 葡萄糖 | 87.30 | 0.43 | 1.21 | 补料分批 发酵 | [42] |
| 钝齿棒杆菌 | 增强辅因子ATP的供应:过表达 <i>pyk</i> 、 <i>pgk</i> ,敲除 <i>frd12</i> 、 <i>nox</i> 、 <i>amn</i> | 葡萄糖 | 57.30 | 0.33 | 0.58 | 补料分批 发酵 | [43] |
| 钝齿棒杆菌 | 阻断副产物合成途径:敲除 <i>proB</i> ;解除终产物对L-精氨酸合成关键酶的反馈抑制:定点突变 ArgB ^{E19R,H26E,D311,D312R} | 葡萄糖 | 16.50 | 0.39 | 0.15 | 摇瓶发酵 | [44] |
| 钝齿棒杆菌 | 增强前体物质L-谷氨酸的供应:敲除 <i>putP</i> 、 <i>pta</i> 、 <i>ncgl2310</i> 、 <i>ncgl1221</i> ;增强L-精氨酸转运:过表达 <i>lysE</i> | 葡萄糖 | 24.85 | 0.57 | 0.23 | 摇瓶发酵 | [45] |
| 钝齿棒杆菌 | 增强氮源供应:过表达 <i>glnA</i> 、 <i>aspA</i> 、 <i>gdh</i> | 葡萄糖 | 53.20 | 0.32 | 0.55 | 补料分批 发酵 | [46] |
| 钝齿棒杆菌 | 增强氮源供应:敲除 <i>amtR</i> ,过表达 <i>amtB2</i> | 葡萄糖 | 60.90 | 0.36 | 0.63 | 补料分批 发酵 | [47] |
| 大肠杆菌 | 阻断L-精氨酸降解途径:敲除 <i>adiA</i> 、 <i>speC</i> 、 <i>speF</i> ;解除阻遏蛋白对L-精氨酸操纵子的转录抑制;敲除 <i>argR</i> ;解除终产物对L-精氨酸合成关键酶的反馈抑制:过表达 ArgA ^{H15Y} ;增强L-精氨酸转运:过表达 <i>argO</i> | 葡萄糖 | 11.64 | 1.18 | 0.24 | 补料分批 发酵 | [48] |
| 钝齿棒杆菌 | 增强L-精氨酸转运:过表达 <i>lysE</i> | 葡萄糖 | 35.91 | — | 0.37 | 摇瓶发酵 | [49] |
| 钝齿棒杆菌 | 解除终产物对L-精氨酸合成关键酶的反馈抑制:过表达 <i>glnK</i> | 葡萄糖 | 49.98 | 0.34 | 0.52 | 补料分批 发酵 | [50] |
| 大肠杆菌 | 解除终产物对L-精氨酸合成关键酶的反馈抑制:敲除 <i>argA</i> ;阻断副产物合成途径:敲除 <i>pflB</i> (编码丙酮酸-甲酸裂解酶)、 <i>ldhA</i> (编码乳酸脱氢酶)、 <i>poxB</i> (编码丙酮酸氧化酶)、 <i>adhE</i> (编码乙醇脱氢酶)、 <i>aceE</i> (编码丙酮酸脱氢酶)、 <i>speF</i> ;阻断L-精氨酸降解途径:敲除 <i>speB</i> 、 <i>astA</i> ;解除阻遏蛋白对L-精氨酸操纵子的转录抑制:敲除 <i>argR</i> ;强化L-精氨酸合成途径:过表达 <i>argCBI</i> 、 <i>argD</i> 、 <i>argG</i> 、 <i>argH</i> 、 <i>carAB</i> | 葡萄糖; 乙酰谷氨酸 | 4.00 | — | — | 摇瓶发酵 | [51] |

结合在L-精氨酸合成操纵子 *argCJBDFR* 和 *argGH* 的操纵序列上,抑制结构基因的转录,从而调节胞内L-精氨酸浓度,使其维持在适当的水平^[39, 52-53]。除了 ArgR 之外, FarR 也可结合在 *argC*、*argB*、

argF、*argG* 等基因上游,调控胞内L-精氨酸的浓度^[54-55]。在大肠杆菌中,L-精氨酸合成途径中多个基因的转录水平也受到 ArgR 的抑制,且抑制程度随着L-精氨酸或其类似物的浓度增加而增强^[24]。

解除阻遏蛋白对L-精氨酸合成关键基因的转录负调控是提高L-精氨酸产量的关键策略^[15]。Park等^[39]以谷氨酸棒杆菌ATCC 21831为出发菌株,利用随机诱变筛选出L-精氨酸结构类似物刀豆氨酸和精氨酸羟肟酸的抗性菌株AR1,进一步在该菌株中敲除精氨酸阻遏蛋白编码基因 $argR$ 和 $farR$,补料分批发酵结果显示,敲除菌的L-精氨酸累积量达到61.90 g/L。Zhan等^[38]在谷氨酸棒杆菌SNK118中敲除 $argR$ 和 $farR$ 基因,解除了阻遏蛋白对L-精氨酸合成基因的反馈抑制,通过补料分批发酵,L-精氨酸产量达到了51.96 g/L,较出发菌株增加28.4%。此外,利用定向进化或理性设计等手段,获得不与L-精氨酸合成基因的操纵序列结合的阻遏蛋白突变体,也是消除阻遏蛋白对L-精氨酸操纵子的转录抑制的手段之一。Chen等发现大肠杆菌的ArgR突变体ArgR^{L107K}和ArgR^{NV107K}以三聚体而非与野生型相同的六聚体形式存在,这两种突变体与L-精氨酸合成基因的结合能力不再受L-精氨酸调控^[56-57]。敲除L-精氨酸合成途径的阻遏蛋白编码基因,或者蛋白质工程改变阻遏蛋白与DNA的相互作用,是提高L-精氨酸产量的有效策略^[24]。

2.1.2 解除终产物对L-精氨酸合成关键酶的反馈抑制

微生物的L-精氨酸合成关键酶往往受到终产物L-精氨酸的反馈抑制。在谷氨酸棒杆菌中, $argB$ 基因编码的乙酰谷氨酸激酶催化乙酰谷氨酸转化为乙酰谷氨酸磷酸,是L-精氨酸合成的关键限速酶^[55]。ArgB是典型的由同源二聚体组成的六聚体结构^[24]。ArgB对L-精氨酸较为敏感,其活性受到L-精氨酸的反馈抑制。当胞内L-精氨酸浓度小于1 mmol/L时,L-精氨酸便会结合在ArgB的羧基端,使得其构象转变为不利于催化反应进行的形式,从而抑制L-精氨酸的合成^[15, 24]。为了解除L-精氨酸对ArgB的反馈抑制,通常利用定点突变来降低ArgB对L-精氨酸的敏感性或者异源表达不受L-精氨酸反馈抑制的基因来减弱L-精氨酸对ArgB的反馈抑制作用,增加L-谷氨酸向L-精氨酸的代谢通量^[15]。Ikeda等^[58]在谷氨酸棒杆菌RB中外源表达不受L-精氨酸反馈抑制的大肠杆菌来源的 $argB$ 基因,使得L-精氨酸的产量提高了3倍。

Zhang等^[40]发现钝齿棒杆菌SYPA5-5 ArgB^{E19Y}突变能够很大程度上缓解反馈抑制,另外还发现引入I74V、F91H和K234T突变能够提高ArgB的催化活性和热稳定。在此基础上,在钝齿棒杆菌SYPA5-5引入ArgB的E19Y、I74V、F91H和K234T这四个组合突变,在5 L发酵罐中的培养96 h后,L-精氨酸的积累量达到61.20 g/L,比出发菌株提高了41.8%。Xu等^[50]发现P II信号转导蛋白GlnK(由 $glnK$ 编码)能够缓解L-精氨酸对ArgB的反馈抑制,在钝齿棒杆菌SYPA5-5过表达 $glnK$ 后,ArgB的L-精氨酸半抑制常数增加1.4倍,L-精氨酸产量达到了49.78 g/L,相比于出发菌株L-精氨酸产量提高了22.61%。在大肠杆菌中, $argA$ 编码的乙酰谷氨酸合成酶会受到终产物L-精氨酸的反馈抑制^[24]。Wang等^[41]采用随机诱变的方法,筛选到一株大肠杆菌MG1655的L-精氨酸生产菌株,之后通过两种改造策略提高L-精氨酸产量。其中一种为在敲除 $argR$ 的基础上引入定点突变ArgA^{H15Y}以解除L-精氨酸对ArgA的反馈抑制,L-精氨酸产量提高到4.20 g/L。另一种为在敲除 $argR$ 的基础上导入来源于谷氨酸棒杆菌中不受L-精氨酸反馈抑制的 $argJ$ 基因,使得L-精氨酸产量有了显著提高,达到了12.80 g/L。Nie等^[51]以大肠杆菌BW25113为起始菌株,通过敲除 $argA$,随后经过进一步的工程改造,该菌株摇瓶发酵可消耗40 g/L的葡萄糖和5 g/L乙酰谷氨酸,产生4 g/L的L-精氨酸和11.3 g/L的丙酮酸。

2.2 L-精氨酸代谢途径的重编程

2.2.1 增强辅因子NADPH的供应

L-精氨酸的合成代谢除了需要特定的酶参与外还依赖于多种辅因子。NADPH作为L-精氨酸合成代谢的关键辅因子之一,不仅参与细胞内的多种代谢过程,还通过提供还原力,为细胞提供有利的生长环境^[59-60]。在L-精氨酸的合成过程中, α -酮戊二酸经还原胺化反应合成L-谷氨酸时需要消耗1 mol NADPH,随后由ArgC催化的还原脱磷酸反应也消耗1 mol NADPH,而每合成1 mol L-精氨酸需要3 mol L-谷氨酸,因此合成1 mol精氨酸共需消耗4 mol NADPH,故强化辅酶NADPH的供应对

于L-精氨酸的合成十分重要。在微生物中，NADPH的合成途径主要分为三种：一是通过戊糖磷酸途径（pentose phosphate pathway, PPP）和乙酸途径再生^[61]；二是通过NAD⁺激酶/NADH激酶催化下再生；三是吡啶核苷酸转氢酶途径，由膜结合转氢酶（如PntAB）催化合成NADPH^[24, 62-64]。Park等^[39]将谷氨酸棒杆菌AR2中编码葡萄糖-6-磷酸异构酶基因*pgi*的起始密码子由ATG更改为GTG，下调了*pgi*的表达水平，迫使代谢流重定向到PPP途径，补料分批发酵结果表明L-精氨酸产量由61.90 g/L提高到80.20 g/L。Man等^[42]将钝齿棒杆菌Cc1中*pgi*的RBS替换为强度更弱的元件，从翻译水平下调*pgi*的表达，提高了胞内的NADPH水平，补料分批发酵测得L-精氨酸产量从53.20 g/L提高到66.40 g/L，产率为0.33 g/g的葡萄糖。Zhan等^[38]在谷氨酸棒杆菌SNK118中过表达*pntAB*（编码NADP⁺依赖的氧化还原酶）和*ppnK*（编码NAD⁺激酶）基因，将胞内NADPH的浓度从182 μmol/g增加到280 μmol/g，L-精氨酸积累量从41.50 g/L增加到61.00 g/L。

2.2.2 增强辅因子ATP的供应

辅因子ATP对细胞的生长代谢和L-精氨酸合成至关重要^[65-67]。ATP参与胞内大多数酶促反应，也参与维持细胞内物质的转运和代谢。当细胞内ATP供应不足时，L-精氨酸的合成和转运也会受到影响，因此增加胞内ATP的供应是提高L-精氨酸产量的另一策略^[24]。微生物中ATP水平的调控方式主要有两种。一是通过调控ATP合成或消耗途径相关的酶来调控ATP的合成^[68]。糖酵解途径中的3-磷酸甘油酸激酶（由*pgk*基因编码）和丙酮酸激酶（由*pyk*基因编码）催化去磷酸化反应发生时伴随着ATP的生成，通过调控这两种酶的表达水平来实现胞内ATP水平的调控。二是通过调控氧化磷酸化的水平来调控ATP的合成，在有氧条件下，NADH作为递氢体通过电子传递链氧化，并以氧气为电子受体生成大量ATP，因此可以通过调控胞内NADH水平，来调节氧化磷酸化水平，并进一步实现ATP水平的调控^[69]。Man等^[43]在钝齿棒杆菌SYPA5-5中靶向敲除了编码黄素还原酶的基因*frd1*和*frd2*，降低了胞外H₂O₂和胞内活性氧浓度，提高了胞内NADH和ATP水平；之后敲除*noxA*（编码NADH氧化酶）和*amn*（编码AMP核

苷酶）基因，阻断了细胞内NADH的非能量氧化以及AMP水解途径；最后通过过表达*pgk*和*pyk*进一步提高ATP水平；补料分批发酵结果显示，L-精氨酸产量为57.30 g/L，较钝齿棒杆菌SYPA5-5提高了49.21%。

2.2.3 增强前体物质L-谷氨酸的供应

L-谷氨酸是L-精氨酸合成的直接前体物质^[70]。通过增强L-谷氨酸的供应可以提高L-精氨酸产量，其改造策略可大致分为三种：一是最大程度减少副产物的产生，使得L-谷氨酸更多流向L-精氨酸合成的方向；二是加强L-谷氨酸的合成；三是阻断L-谷氨酸由细胞内向细胞外的转运^[39, 42]。

L-谷氨酸除参与L-精氨酸合成外，也是L-脯氨酸合成的前体物质^[71]。L-谷氨酸经γ-谷氨酰激酶ProB、谷氨酸半醛脱氢酶ProA、吡咯啉-5-羧酸还原酶ProC催化产生L-脯氨酸，且每生成1 mol的L-脯氨酸需要消耗2 mol的NADPH^[72]。因此，L-脯氨酸的合成会与L-精氨酸竞争前体物质以及辅因子^[73]。通过敲除或弱化L-脯氨酸合成关键基因以及L-脯氨酸转运蛋白编码基因可以降低胞内L-脯氨酸的合成，从而提高L-精氨酸的合成效率。Zhang等^[44]在钝齿棒杆菌MT-M4敲除了*proB*基因，阻断了L-脯氨酸合成途径，摇瓶发酵108 h产生了14.60 g/L L-精氨酸，与钝齿棒杆菌MT-M4相比L-精氨酸产量提高了52.1%。Man等^[42]在钝齿棒杆菌Cc5lysC-30中敲除了*proB*基因，对该菌株进行补料分批发酵，L-精氨酸产量达到87.30 g/L，转化率为0.43 g/g葡萄糖。但是L-脯氨酸合成途径的敲除会影响细胞的生长，因此发酵过程中需要额外添加L-脯氨酸来维持细胞的正常生长代谢，这也增加了发酵成本^[59]。除了合成代谢关键基因的敲除，L-脯氨酸转运蛋白的编码基因的敲除也是减少其合成的有效途径。Huang等^[45]在钝齿棒杆菌MT中敲除L-脯氨酸转运蛋白的编码基因*putP*，L-精氨酸产量达到了14.20 g/L，比出发菌株提高了18.1%。除了L-脯氨酸，其他大多数氨基酸的合成也依赖于葡萄糖分解代谢，这也与L-精氨酸的合成竞争碳源，因此阻断其他氨基酸向胞外的转运或减弱其合成代谢，也是增强L-精氨酸积累的策略之一。Huang等^[45]敲除了钝齿棒杆菌MT编码支链氨基酸转运蛋白的基因*cgl2310*，使得L-精

氨酸的产量提高了27.5%。

除了减少副产物的生成，加强前体物质L-谷氨酸的合成也是提高L-精氨酸产量的有效策略之一。三羧酸循环（tricarboxylic acid cycle, TCA）中间产物 α -酮戊二酸是L-谷氨酸合成的关键前体，也是连接TCA循环和L-精氨酸合成的关键节点，引导 α -酮戊二酸更多流向L-谷氨酸，是增强L-谷氨酸合成通量的方式之一^[15]。在谷氨酸棒杆菌中，常常通过调控异柠檬酸脱氢酶（ICD）、异柠檬酸裂解酶（AceA）、谷氨酸脱氢酶（GDH）和 α -酮戊二酸脱氢酶（ α -KGDH）的表达，来促进L-谷氨酸的合成^[15]。Man等^[42]在钝齿棒杆菌Cc4菌株中，过表达ICD和GDH，同时减弱 α -KGDH的活性，补料分批发酵结果显示L-精氨酸的产量为76.8 g/L，转化率为0.372 g/g葡萄糖。适当调节糖酵解和TCA循环的通量是增强L-谷氨酸合成通量的方式之一^[24]。Man等^[42]通过将*pyc*基因（编码丙酮酸脱羧酶）的起始密码子GTG替换成ATG以增强其表达强度，在此基础上过表达*gltA*基因（编码柠檬酸合酶），将代谢流引入TCA循环，L-精氨酸产量达到了68.60 g/L，转化率为0.34 g/g的葡萄糖。

此外，阻断L-谷氨酸由细胞内向细胞外的转运也是增强L-谷氨酸积累的策略之一。Park等^[39]在谷氨酸棒杆菌AR4中敲除*ncgl1221*编码的L-谷氨酸转运蛋白，阻断了L-谷氨酸向胞外的转运，L-精氨酸产量显著提高。

2.2.4 增强氮源供应

氮在L-精氨酸的合成中发挥着重要作用^[47]。氨甲酰磷酸和天冬氨酸是L-精氨酸合成的重要氮源^[24]。其中，氨甲酰磷酸参与L-精氨酸合成的第6步反应。在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中，氨甲酰磷酸由谷氨酰胺合成酶（*glnA*基因编码）和氨甲酰磷酸合酶（*carAB*基因编码）催化合成^[24, 46]。Park等^[39]在*carAB*基因和*argGH*基因上游分别添加启动子 P_{sod} 和 P_{eftu} 提高了其表达水平，补料分批发酵结果显示L-精氨酸产量达到了92.50 g/L。天冬氨酸则参与L-精氨酸合成的第7步反应，并为L-精氨酸提供第4个氮原子。在谷氨酸棒杆菌中，天冬氨酸主要是以L-谷氨酸和草酰乙酸为前体物质，在天冬氨酸转氨酶（*aspB*编码）的催化下生成。

然而在大肠杆菌中，天冬氨酸也能以富马酸和氨离子（ NH_4^+ ）为前体物质，在*aspA*基因编码的天冬氨酸裂解酶催化下生成^[42, 46, 74]。Guo等^[46]发现在钝齿棒杆菌SDNN403的发酵液中添加天冬氨酸和L-谷氨酰胺可以显著提高L-精氨酸的产量，因此为了促进胞内天冬氨酸和L-谷氨酰胺的合成，在该菌株中表达大肠杆菌来源的*glnA*和*aspA*基因。同时过表达内源*gdh*促进了L-谷氨酸的合成，并进一步将L-精氨酸的产量从37.60 g/L提高到53.20 g/L。在谷氨酸棒杆菌中，AmtR是调控氮代谢的全局转录因子。敲除*amtR*基因能够解除其对*glnA*和*gdh*的转录抑制，从而提高胞内氨的同化，有利于L-精氨酸产量的提高^[15]。Xu等^[47]在钝齿棒杆菌SYPA5-5菌株中敲除了*amtR*基因，并在*amtR*基因位点插入*amtB*基因（编码 NH_4^+ 转运蛋白），促进了 NH_4^+ 向胞内的摄取，使得L-精氨酸产量增加到60.90 g/L，与钝齿棒杆菌SYPA5-5相比提高了35.14%。

2.2.5 L-精氨酸降解途径及其调控策略

大肠杆菌中存在三条L-精氨酸降解途径^[75]：一是L-精氨酸在*speA*编码的生物合成精氨酸脱羧酶催化下生成胍丁烷、腐胺和亚精胺等多胺^[48, 76]；二是L-精氨酸在*adiA*编码的精氨酸脱羧酶催化下生成胍丁烷，用于细菌适应极端酸性环境^[75]；三是L-精氨酸在*astA*编码的N-琥珀酰转移酶催化下生成N2-琥珀酰-L-精氨酸，随后被琥珀酰精氨酸二氢酶催化生成N2-琥珀酰-L-鸟氨酸，最终生成L-谷氨酸和琥珀酸，该途径为细胞生长提供氮源物质^[77]。L-精氨酸降解途径的存在会影响L-精氨酸的积累。Ginesy等^[48]通过在大肠杆菌C600⁺中敲除L-精氨酸降解相关的*adiA*、*speC*、*speF*基因以及阻遏蛋白编码基因*argR*，构建了C600⁺ Δ 4菌株，在该菌株中引入解反馈抑制的ArgA^{H15Y}或者ArgA^{V19C}，L-精氨酸积累量分别达到了1.94 g/L和3.03 g/L。与大肠杆菌不同的是，谷氨酸棒杆菌缺乏L-精氨酸降解途径，在L-精氨酸生产中无需考虑阻断L-精氨酸降解的问题^[39]。L-精氨酸降解途径的调控策略目前仅限于关键基因的敲除，然而过多基因的缺失会影响菌体生长状态^[78]。随着CRISPR干扰技术的兴起，在不破坏基因的情况下同时抑制多个基因的表达水平成为可能，通过

CRISPR 干扰技术下调 L-精氨酸降解途径是未来值得探索的方向, 但还需克服脱靶效应等问题^[24]。

2.2.6 L-精氨酸转运系统及其调控策略

L-精氨酸的外排效率也是影响 L-精氨酸高产的因素之一^[49, 79]。在大肠杆菌中, L-精氨酸的转运主要通过 ArgP-ArgO 系统进行, 且该系统专一性转运 L-精氨酸^[80-82]。其中, ArgP 是 LysR 型转录调节因子, ArgO 是氨基酸转运蛋白。当胞内仅存在 L-精氨酸时, ArgP 会激活 ArgO 表达; 当胞内同时存在 L-精氨酸和赖氨酸时, 赖氨酸会与 ArgP 结合并抑制 *argO* 基因的转录, 从而抑制 L-精氨酸外排^[75]。在 ArgP 中引入 V216A 突变能够减弱 ArgP 对 L-精氨酸的依赖性, ArgP 激活 ArgO 表达不再依赖于 L-精氨酸和 L-赖氨酸^[75, 81-83]。谷氨酸棒杆菌中的 L-精氨酸转运依赖于 LysG-LysE 系统。在 L-精氨酸、赖氨酸、瓜氨酸和组氨酸存在时会激活 *lysE* 基因的转录, 从而转运赖氨酸、瓜氨酸和 L-精氨酸, 但不转运组氨酸^[82]。来源于谷氨酸棒杆菌中的 LysE 和来源于大肠杆菌中的 ArgO 具有同源性, 但 ArgO 和 LysE 具有不同的蛋白质拓扑结构, 使其转运性质存在差异^[84-85]。目前已有多位研究者通过调控 L-精氨酸转运系统, 提高了菌株的 L-精氨酸产量^[48, 78]。Xu 等^[49]在钝齿棒杆菌 SYPA 中过表达 *lysE*, 改善了 L-精氨酸的转运, L-精氨酸产量达到了 35.91 g/L, 与出发菌株相比提高了 13.6%。Jiang 等^[86]的研究表明, 在大肠杆菌基因组上整合 *lysE* 并在其上游添加强启动子可以将瓜氨酸的产量提高 34.8%, 可尝试利用该策略增强 L-精氨酸的转运。Chen 等^[87]在钝齿棒杆菌中添加表面活性剂吐温 40, 通过改变细胞膜或细胞壁的通透性, 将 L-精氨酸的产量提高了 16.5%, 尽管这一策略尚未在大肠杆菌中得到应用, 但它为未来改造大肠杆菌生产 L-精氨酸提供了一个有前景的方向。

3 基于生物传感器的高通量筛选

生物传感器是一种专门用于检测化合物浓度的装置, 可以把化合物浓度转换为易于检测的电信号或荧光信号。生物传感器通常由两个部分组成: 一个负责特异性识别待测化合物的信号识别模块; 另一个负责将识别到的化合物浓度转化为

电信号或荧光信号的信号转化模块^[88]。根据识别元件的不同, 生物传感器可分为基于转录因子 (transcription factor, TF) 的生物传感器、基于稀有密码子的生物传感器、基于蛋白翻译元件的生物传感器、基于核糖体开关的生物传感器等^[89]。其中, 基于 TF 和稀有密码子的生物传感器被广泛应用于 L-精氨酸高产菌株的筛选^[90]。

基于 TF 的生物传感器的原理是当胞内代谢物达到一定浓度时, 代谢物与转录因子形成复合物并结合在调控基因的启动子区域, 从而诱导或者阻遏下游报告基因的转录 (图 2)^[91]。转录因子往往具有相似的蛋白结构, 包括 C 端效应物结合域和 N 端保守的 DNA 结合域, 当效应物与 C 端结合后会导致蛋白 N 端构象变化, 进一步影响转录因子与调控基因的启动子区域的结合, 激活或阻遏报告基因的转录^[92]。在谷氨酸棒杆菌中, 基于 LysG 转录因子的生物传感器常用来筛选碱性氨基酸高产菌株^[93]。该生物传感器是一种诱导激活型的生物传感器, 即在碱性氨基酸达到一定浓度时, LysG 转录因子与 L-精氨酸等碱性氨基酸结合, 导致蛋白构象变化, 并进一步与其调控的启动子结合, 激活下游报告基因或其他基因的转录。Binder 等^[94]利用谷氨酸棒杆菌的 LysG 和黄色荧光蛋白 eYFP 构建了生物传感器, 将其应用于受 L-精氨酸反馈抑制的 ArgB 突变体文库的筛选, 并获得了解除 L-精氨酸反馈抑制的 ArgB^{K47H/V65A} 突变蛋白。在 *argR* 缺失的谷氨酸棒杆菌中过表达 ArgB^{K47H/V65A} 突变体, L-精氨酸的积累量达到了 34 mmol/L^[95]。Stella 等^[96]构建了基于 LysG 和 eYFP 的生物传感器, 将其应用于需钠弧菌 L-精氨酸高产菌株的筛选, 将出发菌株进行随机诱变后利用流式细胞荧光分选技术 (FACS) 进行分选, 并筛选出 L-精氨酸产量为 22.30 mg/L 的菌株。Jiang 等^[97]利用 ArgP 转录因子, 以氯霉素抗性基因作为报告基因构建了生物传感器, 将大肠杆菌胞内 L-精氨酸的浓度转变为在氯霉素抗性下的细胞生长情况。在利用常压室温等离子体对 AR12 菌株进行随机诱变后, 利用该生物传感器筛选到了一株 L-精氨酸产量提高了 18.9% 的高产菌株。

基于稀有密码子生物传感器的原理是将报告基因 (如荧光蛋白基因或抗生素抗性基因) 中常

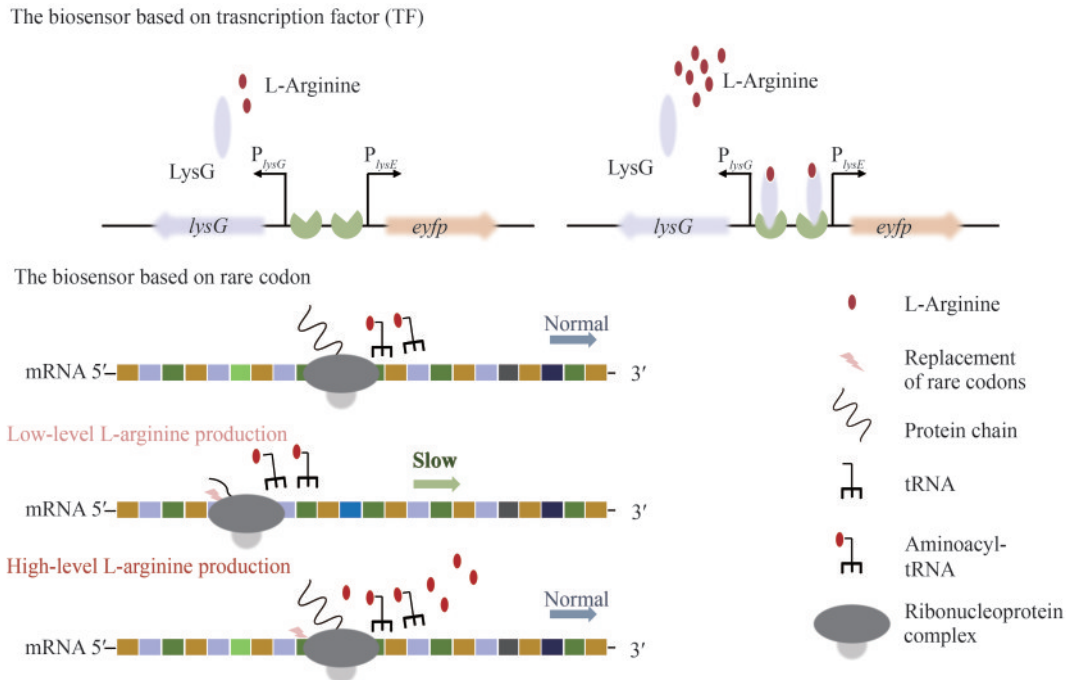


图2 基于转录因子和稀有密码子的L-精氨酸生物传感器

Fig. 2 L-arginine biosensors developed with the transcription factors and rare codons

见密码子替换为稀有密码子，稀有密码子的翻译受稀有氨酰-tRNA的供应限制，当细胞内氨基酸浓度降低到一定阈值以下时，氨酰-tRNA的合成会受到限制，稀有密码子的翻译速度降低，从而导致报告基因的表达水平降低（图2）。通过外源氨基酸的添加或者内源氨基酸的合成，可以增强稀有密码子的翻译，从而提高报告基因的表达水平，促使细胞输出更强的荧光信号或更强的抗生素抗性^[90]。Zheng等^[98]开发了一种基于稀有密码子的生物传感器，将荧光蛋白基因或抗性基因中的L-精氨酸密码子替换为稀有密码子，并结合常压室温等离子体技术，将其应用于谷氨酸棒杆菌筛选到了L-精氨酸产量为2.742 mg/g生物质的生产菌株。

4 挑战与展望

代谢工程在L-精氨酸高产菌株选育中的应用已越来越广泛，成为传统诱变育种方法的有力补充^[99]。目前微生物发酵法生产L-精氨酸的最高产量为92.50 g/L，底盘菌株为谷氨酸棒杆菌，底物葡萄糖的转化率为0.40 g/g。然而，该产量和转化

率与多种大宗氨基酸相比仍然存在较大差距，如L-赖氨酸最高产量可达到223.40 g/L，葡萄糖转化率为0.68 g/g^[100-101]。因此，L-精氨酸的发酵生产存在较大优化空间。首先，工程化改造的L-精氨酸生产菌株往往需要引入重组质粒来实现基因的表达，这也导致其存在质粒丢失或菌株生长代谢不稳定的问题，使得L-精氨酸产量不稳定。为了维持质粒在工程菌株中的稳定复制，需要在细菌培养时添加一定浓度的抗生素来增加筛选压力，但是抗生素的使用不仅增加了生产成本，也为生态安全造成了隐患。可利用CRISPR等基因编辑工具将待表达基因整合到基因组上，获得不带筛选编辑且遗传表型更加稳定的工程菌株^[39, 42]。此外，可将传统代谢工程与生物信息分析相结合，通过组学分析和代谢网络建模等手段设计开发更有工业应用价值的L-精氨酸高产菌株^[102]。L-精氨酸的合成是以TCA中间代谢物 α -酮戊二酸为前体物质，因此如何平衡细胞生长和L-精氨酸的合成的碳通量也是L-精氨酸微生物合成中的关键问题。可利用生长依赖型启动子设计生长偶联型生物传感器，动态调控 α -酮戊二酸流向TCA循环和L-精氨酸合成的通量平衡，如在指数生长阶段碳源流向TCA循环，保证细胞的正常生长，在稳定期调控碳源

流向L-精氨酸合成方向。

传统的L-精氨酸发酵均以葡萄糖为原料，存在“与人争粮”的风险。目前已有研究者以秸秆、玉米芯、糖蜜等非粮原料生产L-精氨酸。Wen等^[103]改造谷氨酸棒杆菌利用玉米秸秆作为碳源生产L-精氨酸的前体物质L-谷氨酸，产量达到65.20 g/L。另外，一碳原料在自然界中广泛存在，其中甲烷和甲醇是两种最重要的一碳化合物。甲醇作为一种非粮一碳原料，具有来源丰富、价格低廉、能量密度高等优势，已逐步成为生物制造的优选原料。受限于缺乏高效转化一碳原料合成L-精氨酸的底盘细胞等原因，目前尚无以甲醇等一碳原料生产L-精氨酸的工作报道。大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌等常用的工业模式菌株无法天然利用甲醇、甲烷等一碳化合物作为碳源，但随着对微生物甲醇利用机制研究的逐步深入，有研究者通过在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌等菌株中构建甲醇同化途径，使其具备了甲醇利用能力^[104-105]。Bennett等^[106]在大肠杆菌中外源表达RuMP途径的关键基因，改造后的菌株能同时利用葡萄糖和甲醇为原料生产丙酮和丁醇。Chen等^[107]在大肠杆菌BW25113 Δ rpiAB基因组整合了甲醇脱氢酶和RuMP途径的关键酶，结合适应性进化，实现甲醇依赖性生长和最大化代谢通量平衡。随后通过工程改造结合实验室进化实现菌株能以甲醇为唯一碳源，最终进化菌株倍增时间达到8.5 h，光密度达到2。Reiter等^[108]采用连续恒化培养和连续稀释进化获得一株能以甲醇为唯一碳源，倍增时间为4.3 h的菌株Mecoli-ref-2。随后经工程改造后，以甲醇为碳源可生产乳酸、聚 β -羟基丁酸（PHB）、衣康酸以及对氨基苯甲酸（PABA）。Tuyishime等^[109]在谷氨酸棒杆菌中引入外源甲醇脱氢酶、木糖异构酶和RuMP途径的关键酶，赋予该菌株甲醇利用能力，结合适应性进化，该菌株可共利用甲醇和木糖生产谷氨酸，但产量仅为230 mg/L。上述研究为构建转化一碳原料生产L-精氨酸的合成甲基营养菌提供了参考。然而，尽管合成甲基营养菌在甲醇利用方面取得了一些进展，但大部分研究仍需要提供葡萄糖、木糖等辅助碳源，且甲醇等一碳原料利用效率低。开发可高效利用甲醇等一碳原料进行生长和代谢的天然甲基营养菌作为底盘菌株，是构建L-精氨酸

高产菌株的另一策略^[110]。甲醇芽孢杆菌是一种革兰氏阳性、嗜热的兼性天然甲基营养菌，通过NAD依赖型甲醇脱氢酶和核酮糖单磷酸循环同化甲醇，能够在50 °C条件下利用甲醇为唯一碳源快速生长并高效合成前体L-谷氨酸，从而具备L-精氨酸的生产潜力，成为生物转化甲醇生产L-精氨酸的优选底盘^[111-112]。然而目前没有研究表明甲醇芽孢杆菌可以用来产L-精氨酸，同时该菌还缺乏完整的基因编辑工具，阻碍了代谢工程改造其产L-精氨酸。基于此，开发新型原料以及与之匹配的底盘菌种为未来通过代谢改造获得高产L-精氨酸的工程菌种提供了重要的研究方向。

参 考 文 献

- [1] 范玉洁. 精氨酸水平对离乳期梅花鹿生长性能、瘤胃发酵和菌群结构的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
FAN Y J. Effects of arginine level on growth performance, rumen fermentation and flora structure of sika deer during weaning period[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [2] 宁诚. 三种外源性氨基酸对乳化香肠色泽影响的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019.
NING C. Study on the effect of three exogenous amino acids on the color of emulsion sausage[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019.
- [3] 张豪. 基于辅因子及全局转录因子代谢工程改造钝齿棒杆菌对产L-精氨酸影响[D]. 南昌: 江西师范大学, 2023.
ZHANG H. Effects of cofactor and global transcription factor metabolic engineering modified *Corynebacterium crenatum* on L-arginine production[D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2023.
- [4] 李宜静. 孕妇血和脐血L-精氨酸水平与婴儿体格发育关系的前瞻性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
LI Y J. Maternal and cord blood L-arginine level in relation to the body size in infants in the first year of life: a prospective study[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2019.
- [5] 温伟红, 崔龙生. 一种精氨酸在化妆品中的研究应用[J]. 广东化工, 2019, 46(3): 51-52.
WEN W H, CUI L S. The application research of the arginine in cosmetics[J]. Guangdong Chemical Industry, 2019, 46(3): 51-52.
- [6] WU M M, XIAO H, SHAO F Y, et al. Arginine accelerates intestinal health through cytokines and intestinal microbiota[J]. International Immunopharmacology, 2020, 81: 106029.
- [7] 刘晓华, 曹郁生, 陈燕. 精氨酸-共轭亚油酸抗氧化活性研究

- [J]. 食品与发酵工业, 2008, 36(8): 69-71.
- LIU X H, CAO Y S, CHEN Y. Antioxidant activity of arginine-conjugated linoleic acid complex [J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 36(8): 69-71.
- [8] 王霞, 陶文沂, 孙志浩, 等. L-精氨酸发酵研究进展[J]. 工业微生物, 2000, 30(4): 50-54.
- WANG X, TAO W Y, SUN Z H, et al. The progress of L-arginine fermentation[J]. Industrial Microbiology, 2000, 30(4): 50-54.
- [9] 尹刚明, 李冰, 蔡妙颜, 等. 从头发中提取L-精氨酸的研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(9): 921-923, 906.
- YIN G M, LI B, CAI M Y, et al. Extraction of L-arginine from human hair[J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(9): 921-923, 906.
- [10] UTAGAWA T. Production of arginine by fermentation[J]. The Journal of Nutrition, 2004, 134(10): 2854S-2857S.
- [11] 龙梦飞, 徐美娟, 张显, 等. 合成生物学与代谢工程在谷氨酸棒杆菌产氨基酸中的应用[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(5): 541-552.
- LONG M F, XU M J, ZHANG X, et al. Synthetic biology and metabolic engineering for amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Scientia Sinica (Vita), 2019, 49(5): 541-552.
- [12] CHENG G, XU J Z, XIA X H, et al. Breeding L-arginine-producing strains by a novel mutagenesis method: atmospheric and room temperature plasma (ARTP) [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2016, 46(5): 509-516.
- [13] 雷庆子, 王博, 堵国成, 等. 诱变育种提高嗜盐四联球菌精氨酸和瓜氨酸利用能力[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(6): 30-36.
- LEI Q Z, WANG B, DU G C, et al. Enhancement of arginine and citrulline utilization ability of *Tetragenococcus halophilus* by mutation breeding[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(6): 30-36.
- [14] 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.
- [15] JIANG Y, SHENG Q, WU X Y, et al. L-arginine production in *Corynebacterium glutamicum*: manipulation and optimization of the metabolic process[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2021, 41(2): 172-185.
- [16] JORGE J M P, NGUYEN A Q D, 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.
- [17] MEISWINKEL T M, RITTMANN D, LINDNER S N, et al. Crude glycerol-based production of amino acids and putrescine by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Bioresource Technology, 2013, 145: 254-258.
- [18] ZHANG B, YU M, ZHOU Y, et al. Improvement of L-ornithine production by attenuation of *argF* in engineered *Corynebacterium glutamicum* S9114[J]. AMB Express, 2018, 8(1): 26.
- [19] BECKER J, WITTMANN C. A field of dreams: lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(6): 107360.
- [20] JEANDET P, SOBARZO-SÁNCHEZ E, CLÉMENT C, et al. Engineering stilbene metabolic pathways in microbial cells[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(8): 2264-2283.
- [21] KIM H T, KHANG T U, BARITUGO K A, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of glutaric acid, a C₅ dicarboxylic acid platform chemical[J]. Metabolic Engineering, 2019, 51: 99-109.
- [22] DUPERRAY F, JEZEQUEL D, GHAZI A, et al. Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1992, 1103(2): 250-258.
- [23] SCHNEIDER J, NIERMANN K, WENDISCH V F. Production of the amino acids L-glutamate, L-lysine, L-ornithine and L-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 154(2/3): 191-198.
- [24] WANG H D, LIU S, WANG B B, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of L-arginine [M/OL]// Advances in applied microbiology, 2023, 122: 127-150[2024-03-01]. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2022.11.002>.
- [25] SGOBBA E, STUMPF A K, VORTMANN M, et al. Synthetic *Escherichia coli-Corynebacterium glutamicum* consortia for L-lysine production from starch and sucrose[J]. Bioresource Technology, 2018, 260: 302-310.
- [26] 孙聪, 陈鑫, 上官春雨, 等. 钝齿棒杆菌黄素血红蛋白Hmp在L-精氨酸合成中的作用[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28(3): 561-568.
- SUN C, CHEN X, SHANGGUAN C Y, et al. Role of *Corynebacterium crenatum* flavohemoglobin Hmp in the synthesis of L-arginine[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2022, 28(3): 561-568.
- [27] 宋卓琳. 改造钝齿棒杆菌糖代谢途径提高L-精氨酸的产量[D]. 南昌: 江西师范大学, 2023.
- SONG Z L. Modifying the glycometabolic pathway of *Corynebacterium crenatum* to increase L-arginine production [D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2023.
- [28] BECKER J, WITTMANN C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels-*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(4): 631-640.

- [29] SHIN J H, LEE S Y. Metabolic engineering of microorganisms for the production of L-arginine and its derivatives[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 166.
- [30] LI Y, CONG H, LIU B N, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for methionine production by removing feedback inhibition and increasing NADPH level[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2016, 109(9): 1185-1197.
- [31] MORIZONO H, CABRERA-LUQUE J, SHI D S, et al. Acetylornithine transcarbamylase: a novel enzyme in arginine biosynthesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(8): 2974-2982.
- [32] CUNIN R, GLANSDORFF N, PIÉRARD A, et al. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria[J]. *Microbiological Reviews*, 1986, 50(3): 314-352.
- [33] PIETTE J, CUNIN R, VAN VLIET F, et al. Homologous control sites and DNA transcription starts in the related *argF* and *argI* genes of *Escherichia coli* K12[J]. *The EMBO Journal*, 1982, 1(7): 853-857.
- [34] SAKANYAN V, PETROSYAN P, LECOCQ M, et al. Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway[J]. *Microbiology*, 1996, 142(Pt 1): 99-108.
- [35] HUANG Y Y, ZHANG H, TIAN H M, et al. Mutational analysis to identify the residues essential for the inhibition of *N*-acetyl glutamate kinase of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(18): 7527-7537.
- [36] RAMÓN-MAIQUES S, FERNÁNDEZ-MURGA M L, GIL-ORTIZ F, et al. Structural bases of feed-back control of arginine biosynthesis, revealed by the structures of two hexameric *N*-acetylglutamate kinases, from *Thermotoga maritima* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 356(3): 695-713.
- [37] SHENG Q, WU X Y, XU X Y, et al. Production of L-glutamate family amino acids in *Corynebacterium glutamicum*: physiological mechanism, genetic modulation, and prospects [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2021, 6(4): 302-325.
- [38] ZHAN M L, KAN B J, DONG J J, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for improved L-arginine synthesis by enhancing NADPH supply[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(1): 45-54.
- [39] PARK S H, KIM H U, KIM T Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4618.
- [40] ZHANG J J, XU M J, GE X X, et al. Reengineering of the feedback-inhibition enzyme *N*-acetyl-L-glutamate kinase to enhance L-arginine production in *Corynebacterium crenatum* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(2): 271-283.
- [41] WANG H D, XU J Z, ZHANG W G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of L-arginine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(17): 5603-5613.
- [42] MAN Z W, XU M J, RAO Z M, et al. Systems pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* for improved L-arginine production[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28629.
- [43] MAN Z W, RAO Z M, XU M J, et al. Improvement of the intracellular environment for enhancing L-arginine production of *Corynebacterium glutamicum* by inactivation of H₂O₂-forming flavin reductases and optimization of ATP supply[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 310-321.
- [44] ZHANG B, WAN F, QIU Y L, et al. Increased L-arginine production by site-directed mutagenesis of *N*-acetyl-L-glutamate kinase and *proB* gene deletion in *Corynebacterium crenatum*[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2015, 28(12): 864-874.
- [45] HUANG M Z, ZHAO Y, LI R, et al. Improvement of L-arginine production by *in silico* genome-scale metabolic network model guided genetic engineering[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(3): 126.
- [46] GUO J, MAN Z W, RAO Z M, et al. Improvement of the ammonia assimilation for enhancing L-arginine production of *Corynebacterium crenatum*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(3): 443-451.
- [47] XU M J, LI J, SHU Q F, et al. Enhancement of L-arginine production by increasing ammonium uptake in an AmtR-deficient *Corynebacterium crenatum* mutant[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(8): 1155-1166.
- [48] GINESY M, BELOTSEKOVSKY J, ENMAN J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced arginine biosynthesis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 29.
- [49] XU M J, RAO Z M, YANG J, et al. The effect of a LYSE exporter overexpression on L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*[J]. *Current Microbiology*, 2013, 67(3): 271-278.
- [50] XU M J, TANG M, CHEN J M, et al. PII signal transduction protein GlnK alleviates feedback inhibition of *N*-acetyl-L-glutamate kinase by L-arginine in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(8): e00039-20.
- [51] NIE M Z, WANG J Y, ZHANG K C. A novel strategy for L-arginine production in engineered *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 138.
- [52] YIM S H, JUNG S, LEE S K, et al. Purification and characterization of an arginine regulatory protein, ArgR, in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Industrial*

- Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(12): 1911-1920.
- [53] XU M J, RAO Z M, DOU W F, et al. The role of ARG R repressor regulation on L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(3): 587-597.
- [54] HÄNSSLER E, MÜLLER T, JESSBERGER N, et al. FarR, a putative regulator of amino acid metabolism in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(3): 625-632.
- [55] LEE S Y, PARK J M, LEE J H, et al. Interaction of transcriptional repressor ArgR with transcriptional regulator FarR at the *argB* promoter region in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(3): 711-718.
- [56] CHEN X L, ZHANG B, TANG L, et al. Expression and characterization of ArgR, an arginine regulatory protein in *Corynebacterium crenatum*[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2014, 27(6): 436-443.
- [57] CHEN S H, MERICAN A F, SHERRATT D J. DNA binding of *Escherichia coli* arginine repressor mutants altered in oligomeric state[J]. Molecular Microbiology, 1997, 24(6): 1143-1156.
- [58] IKEDA M, MITSUHASHI S, TANAKA K, et al. Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-arginine and L-citrulline producer[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(6): 1635-1641.
- [59] 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.
- [60] CHEMLER J A, FOWLER Z L, MCHUGH K P, et al. Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(2): 96-104.
- [61] BECKER J, ZELDER O, HÄFNER S, et al. From zero to hero: design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(2): 159-168.
- [62] TAKENO S, MURATA R, KOBAYASHI R, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* with an NADPH-generating glycolytic pathway for L-lysine production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(21): 7154-7160.
- [63] YUAN L, QIN Y L, ZOU Z C, et al. Enhancing intracellular NADPH bioavailability through improving pentose phosphate pathway flux and its application in biocatalysis asymmetric reduction reaction[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 134(6): 528-533.
- [64] LINDNER S N, NIEDERHOLTMEYER H, SCHMITZ K, et al. Polyphosphate/ATP-dependent NAD kinase of *Corynebacterium glutamicum*: biochemical properties and impact of *ppnK* overexpression on lysine production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 583-593.
- [65] EL SHAFEY H M, GHANEM S, MERKAMM M, et al. *Corynebacterium glutamicum* superoxide dismutase is a manganese-strict non-cambialistic enzyme *in vitro*[J]. Microbiological Research, 2008, 163(1): 80-86.
- [66] ELLIS R J. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2001, 11(1): 114-119.
- [67] ZHOU J W, LIU L M, SHI Z P, et al. ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(1): 94-101.
- [68] HARA K Y, KONDO A. ATP regulation in bioproduction[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 198.
- [69] LIU L M, LI Y, DU G C, et al. Increasing glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by redirecting ATP production from oxidative phosphorylation to substrate-level phosphorylation [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(5): 1043-1053.
- [70] MAJUMDAR R, BARCHI B, TURLAPATI S A, et al. Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: the pathway is regulated at the post-transcriptional level[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 78.
- [71] LONG M F, XU M J, MA Z F, et al. Significantly enhancing production of *trans*-4-hydroxy-L-proline by integrated system engineering in *Escherichia coli*[J]. Science Advances, 2020, 6(21): eaba2383.
- [72] LEE S Y, CHO J Y, LEE H J, et al. Enhancement of ornithine production in proline-supplemented *Corynebacterium glutamicum* by ornithine cyclodeaminase[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(1): 127-131.
- [73] WENDISCH V F, JORGE J M P, PÉREZ-GARCÍA F, et al. Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 32(6): 105.
- [74] WANG Q, JIANG A, TANG J B, et al. Enhanced production of L-arginine by improving carbamoyl phosphate supply in metabolically engineered *Corynebacterium crenatum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(8): 3265-3276.
- [75] CHARLIER D, BERVOETS I. Regulation of arginine biosynthesis, catabolism and transport in *Escherichia coli*[J]. Amino Acids, 2019, 51(8): 1103-1127.
- [76] APPLEBAUM D M, DUNLAP J C, MORRIS D R. Comparison of the biosynthetic and biodegradative ornithine decarboxylases of *Escherichia coli*[J]. Biochemistry, 1977, 16(8): 1580-1584.
- [77] SHIRAI H, MIZUGUCHI K. Prediction of the structure and function of AstA and AstB, the first two enzymes of the

- arginine succinyltransferase pathway of arginine catabolism[J]. FEBS Letters, 2003, 555(3): 505-510.
- [78] 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.
- [79] NAKAMURA J, HIRANO S, ITO H, et al. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14): 4491-4498.
- [80] BOUVIER J, STRAGIER P, MORALES V, et al. Lysine represses transcription of the *Escherichia coli* *dapB* gene by preventing its activation by the ArgP activator[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(15): 5224-5229.
- [81] CELIS R T. Repression and activation of arginine transport genes in *Escherichia coli* K12 by the ArgP protein[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294(5): 1087-1095.
- [82] MARBANIANG C N, GOWRISHANKAR J. Transcriptional cross-regulation between Gram-negative and gram-positive bacteria, demonstrated using ArgP-*argO* of *Escherichia coli* and LysG-*lysE* of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(20): 5657-5666.
- [83] 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.
- [84] PATHANIA A, SARDESAI A A. Distinct paths for basic amino acid export in *Escherichia coli*: YbjE (LysO) mediates export of L-lysine[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(12): 2036-2047.
- [85] PATHANIA A, GUPTA A K, DUBEY S, et al. The topology of the L-arginine exporter ArgO conforms to an N_{in}-C_{out} configuration in *Escherichia coli*: requirement for the cytoplasmic N-terminal domain, functional helical interactions, and an aspartate pair for ArgO function[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(23): 3186-3199.
- [86] JIANG S, WANG D H, WANG R R, et al. Reconstructing a recycling and nonauxotroph biosynthetic pathway in *Escherichia coli* toward highly efficient production of L-citrulline[J]. Metabolic Engineering, 2021, 68: 220-231.
- [87] CHEN M L, CHEN X L, WAN F, et al. Effect of Tween 40 and DtsR1 on L-arginine overproduction in *Corynebacterium crenatum*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 119.
- [88] NARESH V, LEE N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors [J]. Sensors, 2021, 21(4): 1109.
- [89] LIN J L, WAGNER J M, ALPER H S. Enabling tools for high-throughput detection of metabolites: Metabolic engineering and directed evolution applications[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(8): 950-970.
- [90] 蒲伟, 陈久洲, 王钰, 等. 氨基酸生物传感器的开发及应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2485-2501.
- PU W, CHEN J Z, WANG Y, et al. Advances of development and application amino acid biosensors[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2485-2501.
- [91] XU M J, LIU P P, CHEN J M, et al. Development of a novel biosensor-driven mutation and selection system *via in situ* growth of *Corynebacterium crenatum* for the production of L-arginine[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 175.
- [92] TUO J K, NAWAB S, MA X Y, et al. Recent advances in screening amino acid overproducers[J]. Engineering Microbiology, 2023, 3(1): 100066.
- [93] BELLMANN A, VRLJIĆ M, PÁTEK M, et al. Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology, 2001, 147 (Pt 7): 1765-1774.
- [94] BINDER S, SCHENDZIELORZ G, STÄBLER N, et al. A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level[J]. Genome Biology, 2012, 13(5): R40.
- [95] SCHENDZIELORZ G, DIPONG M, GRÜNBERGER A, et al. Taking control over control: use of product sensing in single cells to remove flux control at key enzymes in biosynthesis pathways[J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(1): 21-29.
- [96] STELLA R G, BAUMANN P, LORKE S, et al. Biosensor-based isolation of amino acid-producing *Vibrio natriegens* strains[J]. Metabolic Engineering Communications, 2021, 13: e00187.
- [97] JIANG S, WANG R R, WANG D H, et al. Metabolic reprogramming and biosensor-assisted mutagenesis screening for high-level production of L-arginine in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2023, 76: 146-157.
- [98] ZHENG B, MA X Y, WANG N, et al. Utilization of rare codon-rich markers for screening amino acid overproducers[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3616.
- [99] 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.
- [100] LIU J, OU Y, XU J Z, et al. L-lysine production by systems metabolic engineering of an NADPH auto-regulated *Corynebacterium glutamicum*[J]. Bioresource Technology, 2023, 387: 129701.
- [101] LI Y J, WEI H B, WANG T, et al. Current status on metabolic

- engineering for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245(Pt B): 1588-1602.
- [102] ZHAO Z Q, CAI M M, LIU Y R, et al. Genomics and transcriptomics-guided metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 128054.
- [103] WEN J B, XIAO Y Q, LIU T, et al. Rich biotin content in lignocellulose biomass plays the key role in determining cellulosic glutamic acid accumulation by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 132.
- [104] WITTHOFF S, SCHMITZ K, NIEDENFÜHR S, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for methanol metabolism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(6): 2215-2225.
- [105] WHITAKER W B, JONES J A, BENNETT R K, et al. Engineering the biological conversion of methanol to specialty chemicals in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 49-59.
- [106] BENNETT R K, GONZALEZ J E, WHITAKER W B, et al. Expression of heterologous non-oxidative pentose phosphate pathway from *Bacillus methanolicus* and phosphoglucose isomerase deletion improves methanol assimilation and metabolite production by a synthetic *Escherichia coli* methylotroph[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 45: 75-85.
- [107] CHEN F Y H, JUNG H W, TSUEI C Y, et al. Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 933-946. e14.
- [108] REITER M A, BRADLEY T, BÜCHEL L A, et al. A synthetic methylotrophic *Escherichia coli* as a chassis for bioproduction from methanol[J]. *Nature Catalysis*, 2024, 7(5): 560-573.
- [109] TUYISHIME P, WANG Y, FAN L W, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for methanol-dependent growth and glutamate production[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 220-231.
- [110] GREGORY G J, BENNETT R K, PAPOUTSAKIS E T. Recent advances toward the bioconversion of methane and methanol in synthetic methylotrophs[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 71: 99-116.
- [111] BRAUTASET T, JAKOBSEN Ø M, JOSEFSEN K D, et al. *Bacillus methanolicus*: a candidate for industrial production of amino acids from methanol at 50 °C[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(1): 22-34.
- [112] BRAUTASET T, JAKOBSEN Ø M, DEGNE S K F, et al. *Bacillus methanolicus* pyruvate carboxylase and homoserine dehydrogenase I and II and their roles for L-lysine production from methanol at 50 °C [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(3): 951-964.



通讯作者: 钟成(1979—),男,博士,教授,博士生导师。研究方向为微生物发酵合成生物纳米材料,纤维素的生物合成代谢与降解,固体废弃物资源综合利用等。

E-mail: czhong@tust.edu.cn



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: 王倩(1998—),女,硕士研究生。研究方向为甲醇合成氨基酸菌种选育和合成调控机制。

E-mail: wangqian23@tib.cas.cn