特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-047

生物传感器及其用于功能糖生物合成的研究进展

刘丹[1,2]，彭云柯[1]，江正强[1,2]
（[1] 中国农业大学食品科学与营养工程学院，中国轻工业食品生物工程重点实验室，北京 100083；[2] 中原食品实验室，河南 漯河 462300）

摘要：随着合成生物学与代谢工程的飞速发展，功能糖的生物合成取得显著突破。生物传感器在微生物细胞工厂合成过程动态调控及合成所需关键酶高通量筛选中作用突出，正逐渐成为提高功能糖生物合成效率的前沿技术。本文系统概述了生物传感器的核心组成模块，阐述了转录因子型生物传感器、RNA型生物传感器、双组分系统型生物传感器及荧光蛋白型生物传感器等的基本工作原理与性能评估指标，并总结了提升上述传感器特异性、灵敏度、动态响应范围等重要参数的主要方法。在此基础上，系统归纳了生物传感器在母乳寡糖、D-阿洛酮糖等功能糖高通量筛选与底盘动态调控中的最新研究进展。重点指出了生物传感器在代谢网络动态调控中的显著成效，部分目标产物（如2′-岩藻糖基乳糖、*N*-乙酰氨基葡萄糖）的发酵水平提升至百克级以上。最后，本文总结了生物传感器在功能糖生物合成中的核心作用，并展望了AI辅助智能化元件创制、真核底盘拓展、多信号逻辑门集成及自动化平台驱动等下一代智能化细胞工厂的生物传感器发展趋势。

关键词：生物传感器；功能糖；动态调控；高通量筛选；合成生物学

中图分类号：Q815　　**文献标志码：**A

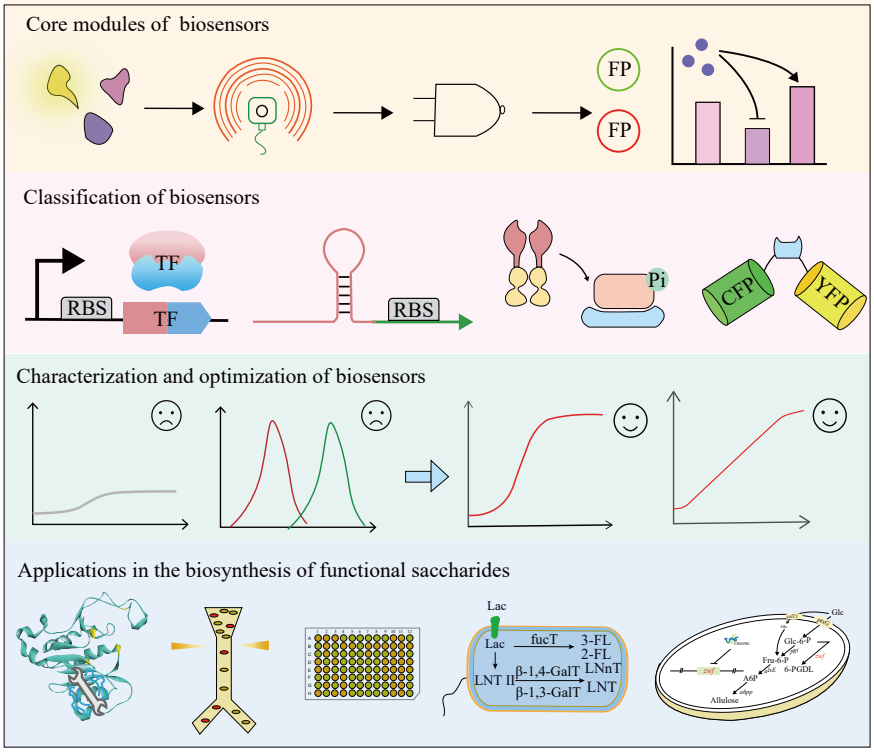
Biosensors and their advances in the applications of biosynthesis of functional saccharides

LIU Dan[1,2]，PENG Yunke[1]，JIANG Zhengqiang[1,2]
（[1]*Key Laboratory of Food Bioengineering of China National Light Industry*，*College of Food Science and Nutritional Engineering*，*China Agricultural University*，*Beijing 100083*，*China*；[2]*Food Laboratory of Zhongyuan*，*Luohe 462300*，*Henan*，*China*）

Abstract: The rapid development of synthetic biology and metabolic engineering has driven remarkable progress in the microbial biosynthesis of functional saccharides, including human milk oligosaccharides (HMOs), D-allulose, *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), and *N*-acetylneuraminic acid (NeuAc). Nevertheless, conventional static metabolic engineering strategies often grapple with inherent metabolic imbalances and resource allocation conflicts within chassis cells, and the bottleneck in high-throughput screening for key enzymes severely hinders further enhancements in

收稿日期：2026-05-26 修回日期：2026-07-09
基金项目：国家自然科学基金（22338013）
引用本文：刘丹，彭云柯，江正强. 生物传感器及其用于功能糖生物合成的研究进展[J]. 合成生物学，2026，7(4)：741-762
Citation：LIU Dan，PENG Yunke，JIANG Zhengqiang. Biosensors and their advances in the applications of biosynthesis of functional saccharides[J]. Synthetic Biology Journal，2026，7(4)：741-762

biosynthetic efficiency. Furthermore, the bottleneck in high-throughput screening for key enzymes severely hinders further enhancements in biosynthetic efficiency. To address these challenges, biosensors have risen as powerful tools, playing a pivotal role in the dynamic regulation of microbial cell factories and the high-throughput screening of key enzymes and high-yielding strains. This review provides a systematic overview of the core modules of genetically encoded biosensors and elucidates the fundamental working principles of various types, including transcription factor-based, RNA-based, two-component system-based, and fluorescent protein-based biosensors. Additionally, essential performance metrics of genetically encoded biosensors—such as specificity, dynamic range, sensitivity, basal leakage, response time, and orthogonality—are systematically discussed, and major strategies for optimizing these key parameters are comprehensively summarized. Furthermore, major strategies for optimizing key parameters such as specificity, sensitivity, and dynamic range are comprehensively summarized. Subsequently, we systematically review the latest studies of these biosensors in the biosynthesis of functional saccharides, including HMOs, D-allulose, GlcNAc, and NeuAc. Various biosensors (*e.g.*, lactose-, temperature-, quorum-sensing-, and metabolite-responsive) are employed to achieve precise dynamic regulation of metabolic pathways, successfully balancing precursor supply and pushing fermentation titers to more than hundred-gram scales. Through coupling biosensors with droplet microfluidics, fluorescence-activated cell sorting (FACS), and toxin-antitoxin systems, the directed evolution of key enzymes and high-throughput screening of overproducing strains are rapidly driven. Future biosensor engineering in functional saccharide biosynthesis centers on AI-assisted *de novo* design, diversified non-transcription-factor mechanisms, and host expansion into eukaryotic chassis. Crucially, integrating multi-signal logic gates will facilitate autonomous phase switching and metabolic balance. Concurrently, automation-platform-driven integration with biofoundries, droplet microfluidics, and machine learning will accelerate high-throughput iterative optimization. Together, these technological advancements will seamlessly propel functional saccharide production from empirical static optimization toward a new paradigm of highly intelligent, autonomous metabolic regulation. These cutting-edge advances will propel the biosynthesis of functional saccharides from static optimization towards intelligent, autonomous regulation.



Keywords: biosensors; functional saccharides; dynamic regulation; high-throughput screening; synthetic biology

生物传感器是合成生物学领域的核心技术元件之一，能够将胞内代谢物浓度、酶活性或环境信号等生物化学信息，实时转化为荧光、生长速率或基因表达等可定量输出的信号[1]。凭借响应快速、单细胞分辨率高、无损监测及高度可编程等优势，生物传感器广泛应用在生物制造高附加值产物中，大大推动了目标合成途径的动态调控，以及核心工具酶与菌株文库的超高通量筛选[2]。基于转录因子（如FadR）构建的动态传感器-调节器系统，成功克服了代谢途径中的生理失衡与中间体毒性，将脂肪酸乙酯产量提高3倍[3]；在工业底盘改造中，基于转录因子的单细胞级生物传感器偶联超高通量筛选技术，实现了每秒分析10^3个细胞的超高通量筛选，快速锁定了L-赖氨酸高产菌株[4]。随着生物传感器在生物制造领域的成功应用，生物传感器在功能糖［如母乳寡糖（human milk oligosaccharide，HMO）、D-阿洛酮糖、*N*-乙酰氨基葡萄糖（*N*-acetylglucosamine，GlcNAc）等］的生物合成中逐渐发挥重要作用，成为突破其生产瓶颈的前沿技术。

功能糖（functional saccharide）通常是指一类难以被人体消化吸收，但具有独特生理活性（如调节肠道微生态、低热量、抗炎或促进大脑发育等）或特殊工业用途的糖类及其衍生物[5]。根据分子聚合度、化学结构及核心功能基团的差异，功能糖主要分为以下四类：功能性单糖（稀有糖为主），以D-阿洛酮糖、D-塔格糖和L-阿拉伯糖为代表的低热量天然单糖；功能性低聚糖（寡糖），以HMO、低聚果糖和低聚半乳糖为代表的益生元类糖；功能多糖，以菊粉、香菇多糖为代表的天然多糖；以及功能糖衍生物，主要包括糖醇类（如赤藓糖醇、甘露糖醇）和单糖衍生物类［如*N*-乙酰氨基葡萄糖、*N*-乙酰神经氨酸［（*N*-acetylneuraminic acid，NeuAc）］等。尽管酶法与微生物发酵法等技术已成熟应用于功能糖的合成，但其合成仍存在技术瓶颈与共性挑战。许多功能糖的合成途径较长，需要大量消耗胞内的核苷酸糖前体或辅因子，常与底盘细胞生长产生强烈的资源竞争，导致代谢失衡以及碳转化率低等问题[6-7]。再者，功能糖生物合成所依赖的核心工具酶（如糖基转移酶、差向异构酶及合成酶等）存在催化活性低、底物亲和力弱或热稳定性差等不足，难以满足高效生产的需求[8-9]。

面对上述瓶颈问题，传统的基因工程手段，如启动子工程、核糖体结合位点（ribosome binding site，RBS）工程、质粒拷贝数优化、基因组整合、辅因子再生、基因敲除、外源诱导剂刚性诱导等已广泛应用于精细调控微生物底盘合成功能糖[10-13]。微生物底盘代谢网络复杂且微环境多变，上述静态调控策略往往导致细胞工厂代谢失衡、生长迟缓以及前体物质积累过度等问题[14]。例如，HMO合成过程需快速积累大量的前体物质（UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖或GDP-L-岩藻糖）满足产物合成，但该过程会消耗大量UDP和GDP，与细胞正常生长形成竞争，导致菌体生长受阻、质粒丢失以及碳转化受限[15-16]。相比之下，动态调控能够实时调整微生物代谢状态以适应微环境变化，及时平衡底盘细胞生长和产物合成，减少对外源诱导剂的依赖以及发酵过程中的人工干预需求[17-18]。

为获得理想的酶工具和底盘，常对分子定向进化的酶分子以及代谢工程改造的候选底盘进行筛选鉴定，但传统的分析检测技术（如HPLC、GC-MS）日处理通量仅为百至千级，耗时费力，不利于超大容量突变文库（规模通常达10^5～10^8级别）的高通量快速筛选，限制了酶进化的迭代效率与底盘重构[19]。生物传感器能够将胞内原本难以察觉的酶活性差异间接转化为单细胞水平的荧光或生长信号，再结合流式细胞分选（fluorescence-activated cell sorting，FACS）等超高通量分选平台，可在数小时内对上百万个突变体进行快速扫描与筛选[20]。这一策略不仅突破了色谱分析的通量制约，还能快速创制理想合成用酶和高效底盘。

本文从生物传感器的核心组成模块与信号转导机制出发，系统介绍不同类别生物传感器工作原理和性能特征，归纳提升生物传感器工作性能的优化策略；在此基础上，深入分析生物传感器在功能糖生物合成中的具体应用，最后总结生物传感器在功能糖生物合成中的核心作用，并对未来智能化细胞工厂的发展趋势进行展望，以期为深入推动功能糖的绿色、高效、智能化生物制造提供科学参考。

1 生物传感器

1.1 生物传感器的组成模块和分类

生物传感器由三个核心功能模块构成：信号识别模块（sensing module）、信号转换模块（computing module）和输出/执行模块（output actuating module）[21]。信号识别模块负责特异性识别目标代谢物、离子或物理化学信号。该模块通常由具有配体结合能力的生物大分子构成，例如别构转录因子（allosteric transcription factor，aTF）的配体结合结构域[22]、核糖开关的适配体结构域[23]、组氨酸激酶的胞外传感器结构域[24]或荧光蛋白型生物传感器中的代谢物结合蛋白[25]。信号识别导致识别模块的构象、寡聚状态或磷酸化状态改变，从而启动信号转导。信号转换模块将识别模块产生的分子信号转换为可调控输出模块的中间信号。该模块执行“计算”功能，可对输入信号进行放大、反转（激活转抑制）或逻辑整合（与/或门）[26]。输出/执行模块产生可测量的表型或对代谢网络进行调控。典型输出包括：荧光蛋白（如GFP、mCherry）用于高通量筛选[21]；抗生素抗性基因或毒素-抗毒素系统用于生长偶联选择[27]；代谢酶基因用于动态控制代谢通量[28]。此外，CRISPRi/dCas9系统常用于可编程的基因抑制/激活，输出信号的强度通常与目标代谢物浓度在一定范围内呈正相关或负相关[29]。

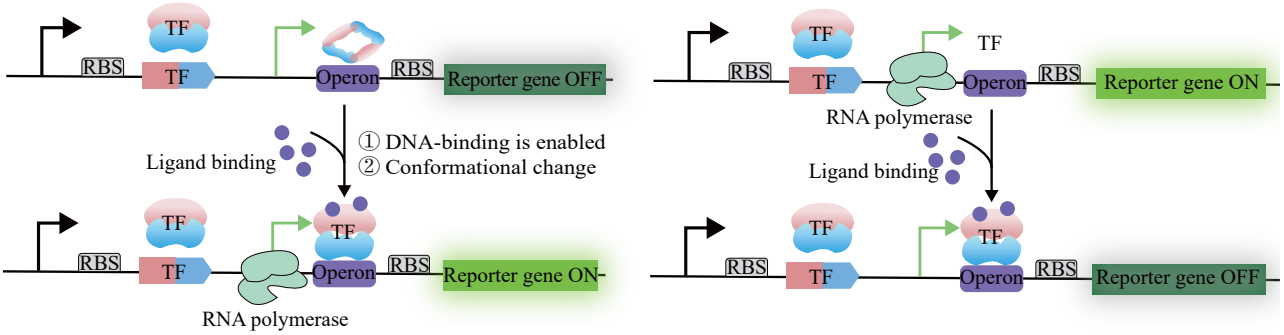
生物传感器主要以蛋白质或核酸等生物大分子作为信号识别与转导的基础。根据应用体系的不同，它既可应用于微生物体内构建全细胞生物传感器，亦可在无细胞或体外系统中发挥功能。其核心机制在于利用这些生物元件对目标配体的特异性结合及变构效应，将待测分子信息原位转化为可量化的信号输出（如调控下游报告基因表达、诱发荧光共振能量转移或改变发射光谱等）。根据生物传感器中模块的分子性质以及信号转导机制，生物传感器分为转录因子型生物传感器、RNA型生物传感器、双组分系统型生物传感器以及荧光蛋白型生物传感器等[30]。

1.1.1 转录因子型生物传感器

转录因子型生物传感器利用代谢物响应型转录因子（metabolite-responsive transcription factor，MRTF）调控下游基因表达，可分为激活型和阻遏型传感器。激活型传感器中，转录因子本身不具有DNA结合能力（或结合能力极弱），只有在结合配体后获得DNA结合能力，结合启动子并招募RNA聚合酶，激活报告基因转录［图1(a)］。例如，基于AraC的阿拉伯糖传感器是典型的激活型传感器，无阿拉伯糖时，AraC的DNA结合域与配体结合域发生相互作用，无法有效结合靶启动子；当阿拉伯糖存在时，与配体结合域结合并诱导构象变化，使DNA结合域暴露并识别启动子上的特定序列，招募RNA聚合酶启动下游基因转录[31-33]。此外，部分激活型转录因子（如LysR家族）在无配体时同样持续结合于启动子上游的特定序列（包括识别位点和激活位点），但其结合并不直接启动转录。配体结合后，转录因子发生构象重排，进而改变与RNA聚合酶之间的相互作用界面，或重塑靶启动子区域DNA的空间构象（如解离DNA弯曲），最终激活下游基因的转录[34]［图1(a)］。阻遏型传感器中，转录因子本身具有DNA结合能力，在无配体时结合启动子操作序列，抑制报告基因转录；当配体存在时，转录因子与之结合后发生变构，从DNA上解离，从而解除抑制，激活转录［图1(b)］。典型的阻遏型传感器如基于LacI的乳糖传感器和基于TetR的四环素传感器[32-33]。输出/执行模块将这种转录调控与荧光蛋白、抗生素抗性基因或代谢关键酶的表达偶联，实现实时监测、高通量筛选及动态通路调控[32, 35]。基于这一机制，转录因子型生物传感器已广泛应用于天然产物生物合成、代谢工程育种和自适应进化等领域[30]。迄今，一些经典元件及其突变体（如乳糖响应的LacI变体、D-阿洛酮糖响应的PsiR等）已成功应用于HMO和D-阿洛酮糖等功能糖的生物合成中，实现了代谢通路的动态调控与高产菌株的高通量筛选[36-37]。

1.1.2 RNA型生物传感器

RNA型生物传感器主要利用核糖开关（riboswitch）或核酶（ribozyme）结构，通过代谢物结合诱导RNA二级结构变化调控基因表达。核糖开关由配体结合域和基因表达调控域组成，广泛存在于细菌、真菌和古菌中[38-39]。配体结合促使



(a) 激活型生物传感器
(a) Activator-type biosensor

(b) 阻遏型生物传感器
(b) Repressor-type biosensor

图 1　转录因子型生物传感器工作原理示意图

（TF—转录因子；RBS—核糖体结合位点）

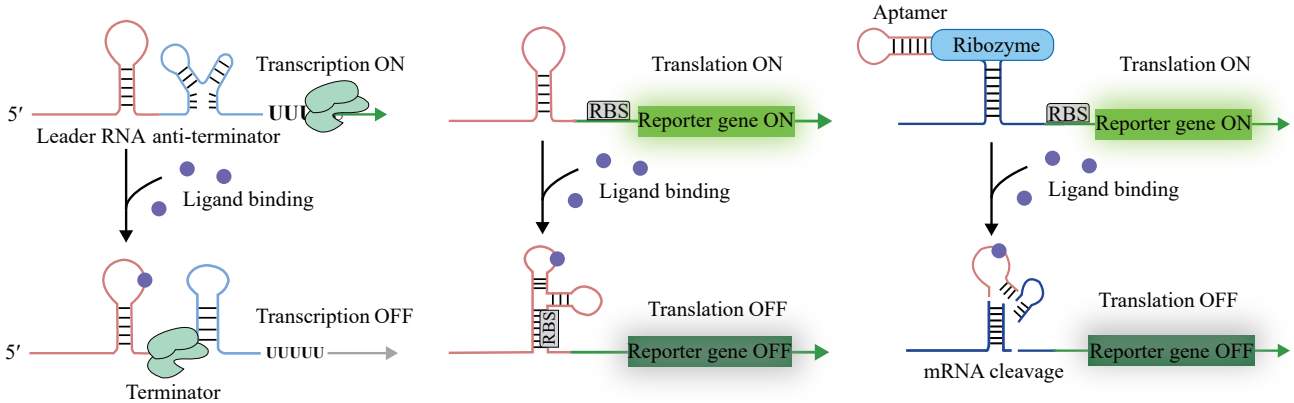
Fig. 1　Schematic diagram of transcription factors based biosensors

(TF—Transcription factor; RBS—Ribosome binding site)

前导 RNA 形成终止子或抗终止子以调控转录，或遮蔽或暴露 RBS 以调节翻译[40]［图 2（a）和（b）］。核酶作为催化 RNA 元件，与适配体融合成适体酶，通过代谢物变构调控其切割 mRNA 的活性，进而控制基因表达[41]［图 2（c）］。基于核糖开关与适体酶的可编程特性，将其与报告基因或荧光适配体偶联，开发出多种代谢物生物传感器，已广泛应用于食品安全检测、环境监测、代谢工程、活细胞成像、抗菌药物及基因治疗等领域[42]。目前，自然界中已发现至少 19 类天然核糖开关效应物，其感知的配体广泛涵盖了氨基酸、磷酸化糖、辅酶因子（如维生素 B_{12}、硫胺素焦磷酸）以及金属离子等，并成功应用于多种小分子代谢物及次级代谢产物的胞内监测与生物合成调控[43-44]。例如，在糖代谢调控中，自然界演化出了 glmS 核糖开关等经典元件，能够特异性感知胞内 6-磷酸氨基葡萄糖的浓度变化并启动自剪切，是天然糖代谢通量调控的典型代表[45]。然而，RNA 型生物传感器在 HMO、D-阿洛酮糖等功能糖的生物合成中尚未见相关报道，主要原因是功能糖适配体匮乏以及核糖开关鲁棒性不足。

1.1.3　双组分系统型生物传感器

双组分系统（two-component system，TCS）是细菌、古菌和少数真核生物中广泛存在的一类信号转导机制[46]。典型的 TCS 由膜结合的组氨酸激酶（histidine kinase，HK）和胞内的响应调节因



(a) 核糖开关对转录水平的调控
(a) Regulation of transcription by riboswitch

(b) 核糖开关对翻译水平的调控
(b) Regulation of translation by riboswitch

(c) 适体酶对RNA稳定性的调控
(c) Regulation of RNA stability by aptazyme

图 2　RNA 型生物传感器的工作原理示意图

Fig. 2　Schematic of RNA-based biosensors

子（response regulator，RR）组成。HK感知胞外信号后发生自磷酸化，经磷酸化信号传递至RR，激活后的RR通过C端效应结构域调控靶基因表达，实现胞外信号向转录输出的跨膜转导[47]（图3）。与转录因子或核糖开关依赖胞内配体不同，TCS凭借HK的跨膜结构，直接感知不能自由跨膜的胞外刺激，适用于检测细外和周质空间信号[48]。双组分系统型生物传感器的核心优势在于能够直接感知无法自由跨膜的胞外信号刺激，可开发为检测胞外信号的生物传感器，应用于环境监测、疾病诊断和生物制造等领域[49]。在微生物利用糖类原料或分泌功能糖的过程中，细胞主要利用HK来监测环境中的糖通量。在感知葡萄糖、木糖等碳源利用状态的经典双组分系统中，枯草芽孢杆菌的DegS-DegU系统能够响应胞外葡萄糖浓度，调控蛋白酶和糖代谢相关基因的表达[50]；大肠杆菌的UhpB-UhpA系统则可感应胞外葡萄糖-6-磷酸，动态调节碳源摄取与利用[51]。这些天然TCS为开发功能糖相关的胞外传感系统提供了元件基础与设计思路，但目前尚未见其在HMO等功能糖的生物合成中的相关报道，主要受限于功能糖相关配体的天然组氨酸激酶匮乏及与底盘内源系统的串扰问题[48]。

1.1.4 荧光蛋白型生物传感器

荧光蛋白型（fluorescence protein，FP）生物传感器基于“构象变化-信号输出”机制，由识别元件和荧光报告元件组成[52]。代谢物结合诱导构象变化，将浓度转化为荧光信号[53]。根据信号转导机制，该类传感器主要分为荧光共振能量转移（Förster resonance energy transfer，FRET）传感器、双分子荧光互补（bimolecular fluorescence complementation，BiFC）传感器和单荧光蛋白传感器（图4）。FRET传感器将配体结合肽嵌于供体与受体荧光蛋白间，代谢物结合引起距离变化，通过FRET效率比值定量[54-55]；FRET传感器中的周质结合蛋白家族是连接荧光蛋白的核心模块，例如葡萄糖结合蛋白（glucose-binding protein，GBP）和半乳糖结合蛋白。通过在GBP的两端分别融合供体和受体荧光蛋白，当GBP结合环境中的糖分子后发生铰链式闭合运动，直接改变两端荧光蛋白的空间距离，从而输出高时空分辨率的FRET信号[56]。这类“GBP-FRET”传感器已被广泛用于活细胞内葡萄糖等糖代谢流的动态实时监测，为糖代谢通量的原位解析提供了重要工具[56]。BiFC传感器将荧光蛋白拆分为两个无活性片段，分别融合于互作蛋白，代谢物促进片段重构恢复荧光[55]；单荧光蛋白传感器中代谢物直接改变荧光蛋白发射光谱（如pH-Lemon），无需荧光蛋白的互作即可输出信号[57]。FP传感器响应极快（毫秒至秒级），可视化强，可实现活细胞实时成像和亚细胞定位分析，用于活体代谢成像中时空动态解析、生物医学中体外快速诊断以及工程菌株的高通量筛选[58-60]。目前FP传感器尚未应用到HMO、D-阿洛酮糖等功能糖的生物合成中，主要原因是FP传感器无法调控代谢通路，难以实现生长偶联筛选。

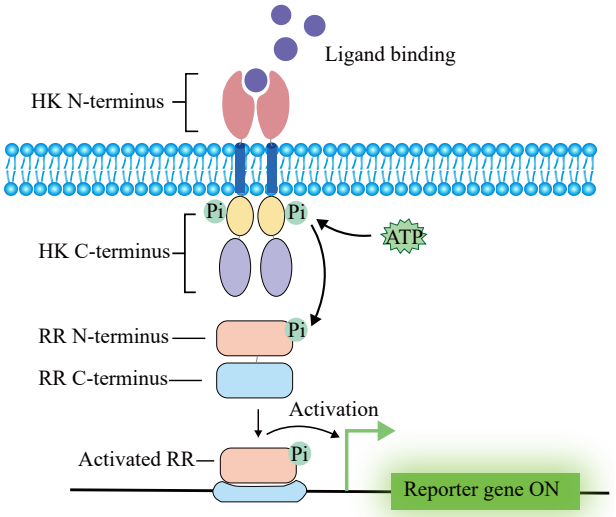


图3 双组分系统型生物传感器的工作原理示意图

（HK—组氨酸激酶；RR—响应调节因子）

Fig. 3 Mechanism of TCS-based biosensors

(HK—Histidine kinase; RR—Response regulator)

1.2 生物传感器的性能及优化策略

理想的生物传感器应具备高特异性、宽动态检测范围、高灵敏度、低本底泄漏、快速的响应时间以及良好的正交性[61-66]。上述四类生物传感器在参数特征上各有优劣势（表1）。转录因子型生物传感器特异性强、系统鲁棒性好，且输出信号的可设计性较高，但其天然可用元件数量有限，且受限于转录与翻译过程，响应延迟较大（通常为分钟至小时级）[22]。RNA型生物传感器在信号

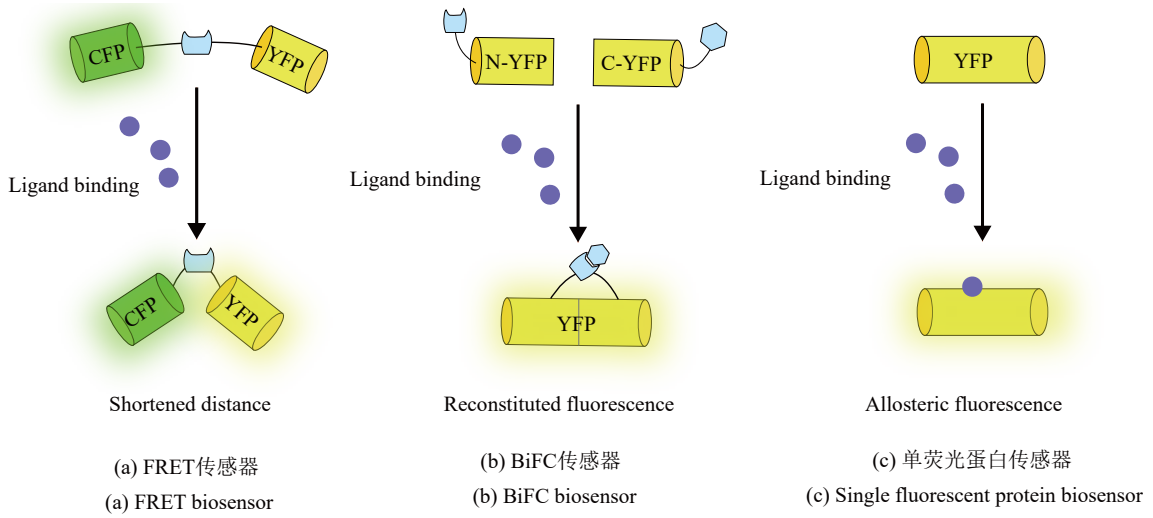


图 4　荧光蛋白型生物传感器的工作原理示意图

（N-YFP—黄色荧光蛋白的 N 端；C-YFP—黄色荧光蛋白的 C 端）

Fig. 4　Schematic representations of FP-based biosensors

(N-YFP—N-terminal of yellow fluorescent protein; C-YFP—C-terminal of yellow fluorescent protein)

表 1　四类生物传感器特征比较

Table 1　Comparison of characteristics among four classes of biosensors

项目	转录因子型	RNA 型	双组分系统型	荧光蛋白型
识别模块类型	代谢物响应型转录因子	核糖开关/适体酶	组氨酸激酶+RR	配体结合蛋白+荧光蛋白
输出类型	转录调控	转录/翻译调控	转录调控	光学信号
响应速度	慢（分钟~小时）	中（分钟）	慢	快（毫秒~秒）
可调控性	容易	中等	中等	难
特异性	高	中~高	中	高
胞外检测能力	低（需转运）	低	高	低
正交性	好	好	较差（串扰）	好

转导过程中无需蛋白质因子辅助，然而其核酸元件在胞内的稳定性易受限，在复杂底盘中实现正交性设计的难度较高[42, 67]。双组分系统型生物传感器能够直接感知无法自由跨膜的胞外信号，但目前几乎都在细菌中构建与运行，将其完整功能系统移植至真核生物并实现有效信号转导仍是重大挑战[49]。荧光蛋白型生物传感器响应速度快（毫秒至秒级），可视性强，但其应用多局限于代谢物浓度的实时监测，尚无法直接操控下游基因表达，且对微环境波动敏感、易受光漂白影响，限制了其在合成生物学动态调控中的广泛应用[52]。

天然生物传感器在灵敏度、特异性及动态范围等方面往往难以直接匹配复杂的实际应用需求，因此需要对其进行性能优化与定制化重构。在设计策略上，转录因子型生物传感器的性能调控主要聚焦于其两大核心功能模块：变构转录因子的蛋白质工程以及顺式作用元件的拓扑优化。在蛋白质工程层面，主要采用定向进化与理性设计策略来重塑 TF 的识别特异性。针对效应物结合域进行饱和突变，可有效调节其配体识别谱系与结合亲和力[36]。例如，基于 LacI-IPTG 晶体结构（PDB：1LBH），对结合口袋周围与配体形成氢键的 20 个关键残基进行饱和突变，借助基于 sfGFP 与致死基因（*hsvTK*）的双向选择平台和 FACS 筛选，成功获得配体特异性由 IPTG 转向乳糖的突变体 LacI-Q291F，其响应阈值拓宽至 0～3.4 g/L，最大激活倍数达 15.5 倍[36]。Bhat 等[68]将 AraC 的 LBD 替换为 IsoA，成功构建了新型异戊二烯生物传感器，显著增强了生物传感器的响应灵敏度和动态范围。在 DNA 调控元件层面，对启动子、操纵子及 RBS 的精细改造是调节生物传感器输出特性的关键。通过对 ArsR 调控启动子的序列演变，可将砷

离子的检测限从50 μg/L显著降低至9.38 μg/L，并有效拓宽其线性响应区间[69]。调节操纵子或启动子强度，能够对传感器的动态范围进行量化表征与大幅调节，进而优化细胞内的代谢通量分配[70]。此外，RBS的精准设计对翻译起始速率具有决定性作用；利用深度学习算法预测并设计最优RBS序列，已成为按需定制传感器响应阈值、实现性能程序化调控的有效手段[71]。

相比之下，其他三类生物传感器的性能优化则主要围绕其固有缺陷展开，在功能糖生物制造中的工程化应用仍受限。RNA型生物传感器的优化主要通过改造表达平台以改善其折叠动力学，或通过体外SELEX技术筛选高亲和力适配体构建新型人工核糖开关[72-75]；双组分系统型生物传感器的调控则侧重于平衡HK与RR的表达比例以抑制背景噪声，或通过定点突变调节HK的磷酸酶活性以扩大动态范围[76-77]；FP型生物传感器的重构则高度依赖蛋白质拓扑工程（如圆排列重构或拆分蛋白）与连接子序列优化，旨在提高配体结合域与荧光模块间的变构信号转导效率[78-81]。

2 生物传感器在功能糖生物合成中的应用

生物传感器作为连接代谢物浓度与可检测信号的“智能开关”，在动态调控代谢网络和高通量筛选中发挥重要作用。目前应用最广的是转录因子型传感器，RNA型、双组分系统型及荧光蛋白型传感器在功能糖体系中适配性与调控能力不足[43，48，52]。转录因子型传感器通过识别特定胞内代谢物或环境物理信号，发生构象改变，进而通过输出模块（如荧光蛋白、毒素-抗毒素系统、CRISPRi）实现信号可视化或代谢流重新分配，显著提升了HMO和D-阿洛酮糖等功能糖的生产效率。

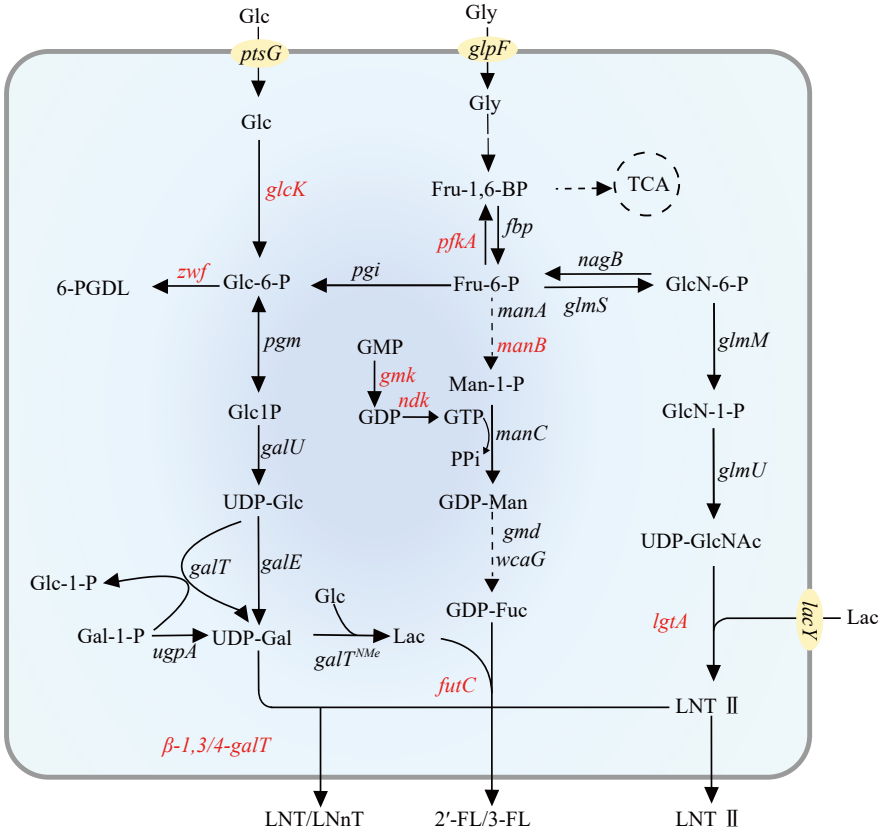
2.1 生物传感器驱动HMO生物合成

HMO是母乳中仅次于乳糖和脂类的第三大固体成分，初乳中含量高达22～24 g/L，目前已鉴定结构明确的HMO有200多种[82-83]。HMO具有调节肠道、提高免疫、促进大脑发育等功能，广泛应用于功能食品、药品及化妆品领域[84]。其规模化生产主要依赖微生物代谢工程，大肠杆菌是应用最成熟的底盘细胞，枯草芽孢杆菌和酿酒酵母等GRAS菌株也取得显著进展[85]。动态调控策略的核心在于传感器根据细胞内外环境变化自动调控通路基因表达，进而平衡细胞生长与HMO的合成，或者实现细胞生长和产物合成的解偶联［图5（a）］。在2′-岩藻糖基乳糖（2′-fucosyllactose，2′-FL）的微生物合成中，Zhang等[36]通过定向进化策略成功开发了一种特异性响应乳糖的转录因子型生物传感器，将$LacI^{Q291F}$用于动态调控关键节点葡萄糖激酶（glucokinase，GlcK）的表达。在发酵初期，细胞自合成乳糖含量低，LacI抑制*glcK*表达，促使葡萄糖流向乳糖合成模块；待乳糖积累后，抑制解除，*glcK*表达量提高，代谢流转向GDP-岩藻糖合成模块，从而实现了前体供应与产物合成间的自动代谢平衡［图5（b）］。这一动态调控策略显著缓解了代谢竞争与负担，在摇瓶中2′-FL产量提升了107%（达9.67 g/L），3 L发酵罐中产量达30.1 g/L，是枯草芽孢杆菌中以葡萄糖为唯一碳源合成2′-FL的首例报道（表2）。

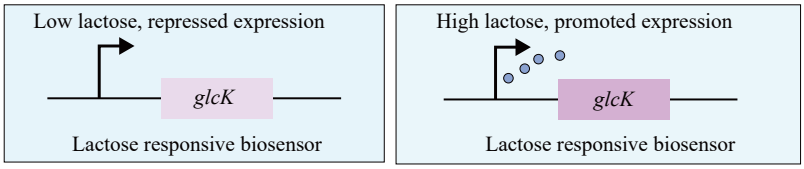
温度作为一种正交性强、无需外源诱导剂的信号，同样用于动态调控。Yu等[86]在枯草芽孢杆菌中基于噬菌体λ的温度敏感阻遏蛋白CI^{857}构建了响应不同温度梯度（30 ℃、32 ℃、34 ℃、37 ℃）的传感器。通过将CI^{857}结合位点插入组成型启动子P_{veg}的不同位置，获得了低温泄漏极低、动态范围高达39.5 ℃的温度响应启动子P_{veg5}（表2）。随后将该系统应用于2′-FL合成中，采用“先长菌（30 ℃，0～12 h），再激活合成模块基因*futC*、*manB*、*gmk*和*ndk*（34 ℃，12～18 h），后抑制竞争途径基因*pfkA*、*zwf*和细胞自溶基因*lytC*（37 ℃，18～60 h）”的时序控制策略，2′-FL摇瓶产量从0.36 g/L提升至1.84 g/L，5 L发酵罐中产量达28.2 g/L［图5（c）］。

在细菌群体感应（quorum sensing，QS）系统中，LuxI/LuxR和EsaI/EsaR是典型的转录因子型生物传感器[91-92]。高细胞密度下，LuxR与LuxI合成的酰基高丝氨酸内酯（acyl-homoserine lactone，AHL）结合，激活P_{LuxI}启动子下游基因表达[82]。

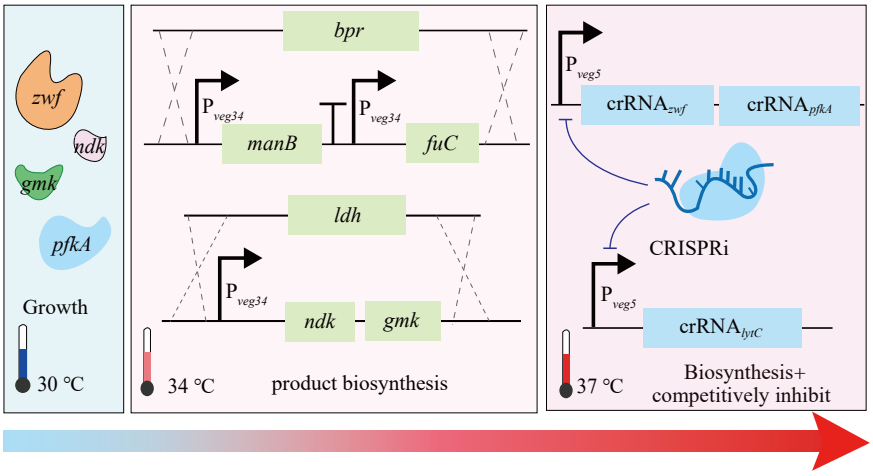
EsaI/EsaR 系统同样响应 AHL 信号分子，但调控蛋白 EsaR 通常为阻遏型[87]。QS 系统的优势在于基因表达与细胞密度自动耦合，无需额外使用诱导剂。Tao 等[87] 在大肠杆菌 MG1655 中构建 Lux 型 QS 系统用于动态调控乳糖-*N*-新四糖（lacto-*N*-neotetraose，LNnT）的合成。将关键酶基因β-1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶基因 *lgtA* 和β-1,4-半乳糖基转移酶基因 *cpsIaJ* 置于 QS 启动子控制下，实现了产物合成的时序激活［图 5(d)］。LNnT 摇瓶产量达 3.05 g/L，较对照提高 2 倍以上。进一步替换了触发不同 OD_{600} 的 QS 启动子突变体，摇瓶产量提升至 4.64 g/L，在 5 L 发酵罐中无需 IPTG 诱导，LNnT 产量达 20.33 g/L（表 2）。在大肠杆菌中，全局转录因子 Cra（catabolite repressor activator）是调控糖酵解与糖异生代谢流的关键节点。当胞内果糖-1,6-二磷酸（fructose-1,6-bisphosphate，FBP）浓度低时，Cra 结合在靶基因启动子（如 P_{pam}）的特定序列上，激活下游基因表达；而当糖酵解通



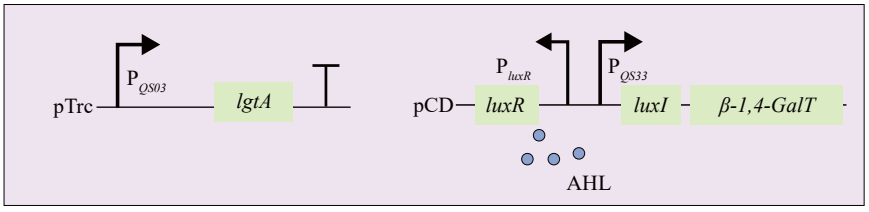
(a) 微生物底盘合成HMO路线图
(图中红色基因和虚线代表受传感器动态调控的关键节点)
(a) Biosynthesis scheme of HMOs in microbial chassises
(Genes and dashed lines marked in red indicate those dynamically regulated by biosensors)



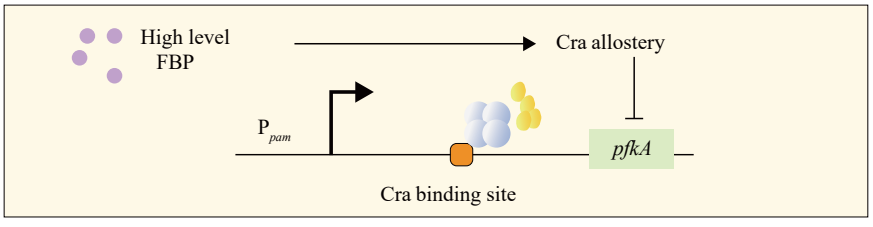
(b) 基于乳糖传感器调控*glcK*促进2′-FL合成
（通过感知前体乳糖浓度时序调节葡萄糖激酶表达，平衡前体供应与产物合成通量）
(b) Regulation of *glcK* using a lactose biosensor to promote 2′-FL synthesis
(Balancing precursor supply and product synthesis flux by temporally tuning glucokinase expression based on intracellular lactose levels)



(c) 基于温度传感器调控2′-FL合成基因和细胞生长基因
(通过外部温度切换实现细胞生长阶段与产物合成阶段的时序解偶联)
(c) Regulation of 2′-FL synthesis genes and cell growth genes using a temperature biosensor
(Achieving temporal decoupling of growth and product synthesis *via* external temperature shift)



(d) 基于QS传感器调控LNnT合成
(利用群体感应自主感知细胞密度，实现发酵中后期合成途径的自发启动)
(d) Regulation of LNnT synthesis using a QS biosensor
(Utilizing QS to autonomously sense cell density, enabling spontaneous initiation of the biosynthetic pathway at mid-to-late fermentation stages)



(e) 基于FBP响应传感器调控*pfkA*促进LNFP Ⅰ合成
(基于胞内糖酵解中间体FBP浓度动态调节磷酸果糖激酶表达，
维持中心碳代谢与外源合成途径的稳态)
(e) Regulation of *pfkA* using a FBP-responsive biosensor to promote LNFP Ⅰ biosynthesis
(Dynamically adjusting phosphofructokinase expression based on intracellular FBP levels to maintain homeostasis between central metabolism and heterologous pathways)

图5 基于生物传感器动态调控微生物细胞工厂合成HMO

Fig. 5 Dynamic regulation of microbial cell factories for HMOs biosynthesis using biosensors

量过高导致FBP积累时，FBP与Cra结合使其从DNA上解离，从而抑制下游基因表达[93]。基于这一机制，FBP响应型生物传感器应用到动态调控大肠杆菌合成LNFP Ⅰ路径中*pfkA*的表达［图5(e)］。引入FBP传感器，当糖酵解过强、FBP积累时，Cra解离，抑制*pfkA*表达，从而减弱糖酵解通量，使代谢流转向产物合成，最终菌株合成LNFP Ⅰ产量较对照组提高8.12%（2.53 g/L），在5 L发酵罐

表2 生物传感器在HMO合成中的应用

Table 2 Applications of biosensors in the biosynthesis of HMO

传感器名称	工作原理	传感器改造及优化效果	应用	底盘	目标产物及发酵产量	参考文献
LacI	结合乳糖/IPTG后发生变构并从操纵子上解离，解除转录抑制	定向进化改变传感器底物特异性	动态调控*glcK*	枯草芽孢杆菌	30.1 g/L 2′-FL（3 L发酵罐）	[36]
CI^{857}温度传感器	低温结合DNA抑制转录，高温变构解离	启动子工程改变温度触发点，低温泄露极低	时序控制2′-FL合成基因与竞争途径	枯草芽孢杆菌	28.2 g/L 2′-FL（5 L发酵罐）	[86]
LuxI/LuxR群体感应	高细胞密度下AHL结合LuxR，激活P_{LuxI}	启动子工程改变OD_{600}触发点	动态调控LNnT合成基因	大肠杆菌	20.33 g/L LNnT（5 L发酵罐）	[87]
FBP-Cra	低浓度FBP时，Cra结合启动子激活基因表达；高浓度FBP与Cra结合使其从DNA解离，从而抑制表达	未改造	动态调控*pfkA*，使代谢流转向LNFP Ⅰ合成	大肠杆菌	48.50 g/L LNFP Ⅰ（5 L发酵罐）	[88]
BgaR乳糖传感器	乳糖结合BgaR，激活下游基因	定向进化和RBS工程改造BgaR；动态范围从1.47倍提高到5.19倍，检测范围从5～10 g/L提高到0～12 g/L	筛选2′-FL高产菌株	大肠杆菌	78.21 g/L 2′-FL（5 L发酵罐）	[89]
L-岩藻糖传感器(FcsR)	岩藻糖结合FcsR，构象改变激活转录	启动子替换以及质粒拷贝数优化，消除传感器本底泄漏增加动态范围	筛选高活性α-1,2-岩藻糖基转移酶突变体	大肠杆菌	124.25 g/L 2′-FL（3 L发酵罐）	[90]

中产量达48.50 g/L[88]（表2）。

乳糖是HMO合成的通用底物，因此基于转录因子的乳糖响应型生物传感器应用最广。基于BgaR构建的乳糖传感器能够有效响应胞内乳糖浓度变化，为HMO高产菌株的筛选提供了关键支撑。由于生物传感器在低底物浓度下面临较高的背景噪声干扰，通过引入LacI作为“信号转换器”，可以将原有的信号转导模式优化为正向的生长-产量偶联机制。RBS序列精细调控后有效提高了传感器的动态范围和有效检测范围，并成功应用于LNT Ⅱ及2′-FL等高产菌株筛选，5 L发酵罐中合成2′-FL产量达78.21 g/L[89]（表2）。此外，将BgaR生物传感器与覆盖大肠杆菌全基因组的CRISPRi文库偶联，基于“代谢物消耗与荧光信号输出呈反向相关”的逻辑，从约8000个克隆中鉴定出8个有益靶基因（如*pcnB*、*ihfB*等），组合抑制后LNnT产量达47.41 g/L[94]。

除了常规的转录因子型传感器外，基于代谢的生长偶联型传感策略展现出了独特的优势。该类传感器是不依赖大分子元件（如蛋白质或RNA）变构效应的传统分子级生物传感器，其通过酶促水解将目标产物转化为细胞生长必需的碳源，使细胞生长速率直接反映产物产量，从而筛选出高产菌株。针对3-FL缺乏天然转录因子识别元件的瓶颈，α-L-岩藻糖苷酶AfcB能够将3-FL水解为L-岩藻糖，从而建立了“底物转化-生长偶联”的传感策略，并成功筛选出3-FL高产菌株，在5 L发酵罐中产量达42.05 g/L[95]。除菌株筛选外，基于肺炎链球菌FcsR-P_{fcsK}系统的L-岩藻糖响应型传感器也用于HMO合成关键酶的筛选。通过启动子替换及质粒拷贝数优化，有效消除了传感器的本底泄漏，并拓宽了动态范围，为高效α-1,2-岩藻糖基转移酶的筛选提供了有力工具，2′-FL在3 L发酵罐中产量达124.25 g/L[90]（表2）。

目前，HMO生物合成的动态调控与高通量筛选研究均基于大肠杆菌或枯草芽孢杆菌等原核底盘细胞，而在翻译后修饰能力更强、更具食品安全潜力的真核底盘（如酿酒酵母、解脂耶氏酵母）中，生物传感器驱动的HMO合成尚未见报道。

2.2 生物传感器驱动D-阿洛酮糖生物合成

D-阿洛酮糖（D-allulose）是一种低热量稀有糖，存在于少数植物和特定细菌中[96]。它作为D-果糖的差向异构体，具有甜度高、溶解度高、热量极低以及引起的血糖反应低等特点[97]。因其特殊的生理功能，D-阿洛酮糖在降血糖、抗氧化

以及预防肥胖和慢性病等方面发挥重要作用[97-98]。D-阿洛酮糖的规模化生产主要有酶法和微生物发酵法[99]。在生物合成路径中，最核心的反应是利用D-阿洛酮糖3-差向异构酶（D-allulose 3-epimerase，DAEase）催化D-果糖生成D-阿洛酮糖[99]。除大肠杆菌外，利用枯草芽孢杆菌等安全菌株合成D-阿洛酮糖也表现出良好的应用前景[99]。基于根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）的转录因子PsiR及其同源启动子P_{psiA}是目前常用的D-阿洛酮糖生物传感器[37, 100]。无D-阿洛酮糖时，PsiR结合P_{psiA}并抑制下游基因（如荧光蛋白或抗性基因）转录；D-阿洛酮糖存在时与PsiR结合，使其构象改变并从DNA上解离，从而激活表达[100]。

天津科技大学秦慧民团队针对DAEase催化效率低且缺乏高效筛选手段的瓶颈，开展了系统性的生物传感器构建与酶定向进化研究。该团队基于转录调节因子PsiR重新设计并优化了D-阿洛酮糖响应型生物传感器。采用微孔板筛选策略对转录因子PsiR进行定向进化，提高了传感器的灵敏度。优化后的PsiR荧光偶联系统与液滴微流控技术结合，构建了筛选效率达10^5个液滴/小时的超高通量平台[37]（表3）。利用该平台对费氏中华根瘤菌（*Sinorhizobium fredii*）来源的差向异构酶（*Sf*DAE）进行定向进化，筛选获得突变体M3-2（S11G/L42T/L96M/I109E/E152N/P247G/F242Y/A254C），其催化活性提高了17倍。还通过启动子工程调节PsiR的表达水平，大幅提升了传感器动态响应范围，进一步开发了生长-荧光双信号偶联的体内筛选平台[100]（表3）。利用该平台对农杆菌属（*Agrobacterium* sp.）SUL3来源差向异构酶进行定向进化，筛选获得突变体M42（P38N/V102A/Y201L/S207N/I251R），其催化活性提高了6.28倍，同时热稳定性也显著提高，60 ℃下的半衰期延长了2.5倍。为克服传统抗生素筛选压力易衰减的局限，开发了基于毒素-抗毒素系统的转录因子型生物传感器（toxin-antitoxin-based high-throughput screening platform，TASP）平台[101]（表3）。TASP平台利用细胞自主产生的可持续选择压力，将差向异构酶催化活性与细胞生长及mCherry荧光信号精确偶联。基于此平台对锡瓦斯假单胞菌（*Pseudomonas sivasensis*）来源的差向异构酶进行定向进化，筛选出的突变体M4-2（W14C/G67A/L151Y/F245K）在60 ℃下催化活性提高5.2倍，半衰期延长3.5倍。一系列基于传感器的筛选策略不仅成功获得了高性能异构酶，显著提升了D-阿洛酮糖的生物合成效率，也为工业酶的快速演化与高通量鉴定提供了有效借鉴。此

表3 基于PsiR的生物传感器在D-阿洛酮糖合成中的应用

Table 3 Applications of PsiR-based biosensors in the biosynthesis of D-allulose

传感器名称	传感器改造及优化效果	应用	酶改造效果	底盘	D-阿洛酮糖产量及规模	参考文献
PsiR-荧光系统	定向进化PsiR（G133D/Y233R）提高灵敏度；响应阈值从50 mmol/L降至10 mmol/L	高通量筛选DAEase突变体	酶活提高17倍，热稳定性未损失	大肠杆菌	30%转化率（1.5 h），500 g/L D-果糖合成150 g/L（体外酶法）	[37]
PsiR	启动子工程优化PsiR表达水平；生长动态范围扩大约30倍，信噪比由1.52降低至0.05	高通量筛选DAEase突变体	酶活提高6.28倍，60 ℃下的半衰期延长2.5倍	大肠杆菌	32.2%转化率（3 h），500 g/L D-果糖合成161 g/L（体外酶法）	[100]
基于毒素-抗毒素系统的D-阿洛酮糖响应型生物传感器	启动子工程优化P_{psiA}（−10区饱和突变+双PsiR结合位点）；动态范围扩至150 mmol/L，信噪比提高14.2倍	高通量筛选DAEase突变体	酶活提高5.2倍，60 ℃下半衰期延长3.5倍	大肠杆菌	—	[101]
PsiR	未改造	高通量筛选DAEase突变体	较野生型提高14.7%，65 ℃下半衰期延长17.23倍	枯草芽孢杆菌	168 g/L（33.6%转化率，1 h），全细胞催化	[102]
PsiR	替换报告基因为TetA（四环素外排泵）；启动子+拷贝数优化，实现酶活-抗性正耦合	连续传代富集AldO突变体	AldO酶活未直接测定	大肠杆菌	1.82 g/L，较野生型产量提高19.97%，全细胞催化	[103]

注：“—”代表产量未知。

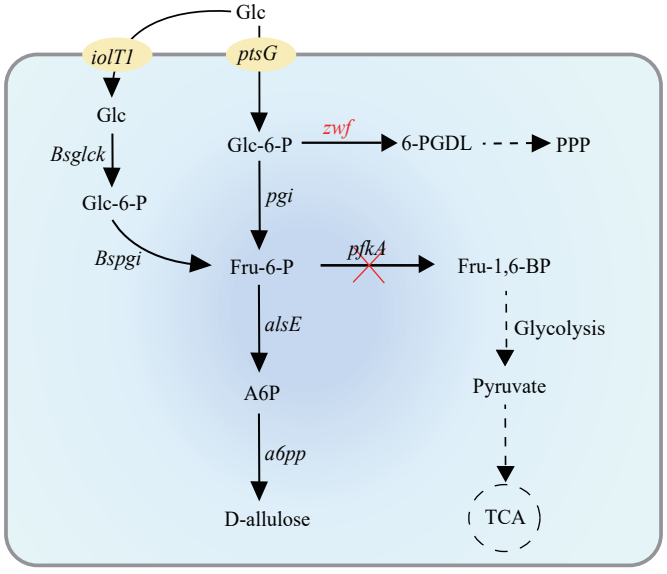
外，Li 等[102]基于 PsiR 构建 D-阿洛酮糖响应型生物传感器，用于 *Caballeronia insecticola* 来源 DAEase 的半理性改造，获得双突变体 S37N/F157Y（催化活性提高 14.7%，65 ℃半衰期达 27.56 h）。突变体在枯草芽孢杆菌 WB800 中表达，全细胞催化 500 g/L D-果糖 1 h 转化率达 33.6%，固定化细胞重复 7 批次后仍保持 80% 以上活性（表 3）。

醛醇氧化酶（alditol oxidase，AldO）是甘油合成 D-阿洛酮糖途径中的限速酶之一。在 D-阿洛酮糖的生物合成中，AldO 是甘油利用途径的关键限速酶。为突破其催化活性瓶颈，可将阿洛酮糖响应回路（PsiR/P_{psiA}）与抗性筛选机制（如四环素外排泵 TetA）相结合，构建基于抗生素选择压力的生存偶联系统。通过精细调控 PsiR 的启动子强度及质粒拷贝数，能够实现目标酶活力与细胞抗药性的精准正向偶联。利用该系统对 AldO 突变体文库进行选择性连续传代演化，有效富集高活性突变体，最终使 D-阿洛酮糖的合成产量提升 19.97%[103]（表 3）。基于 PsiR 的传感器也用于微生物底盘合成 D-阿洛酮糖的动态调控中。针对天然传感器响应性能受限的问题，借助基于蛋白质结构的计算设计策略，可对 PsiR 的底物进入通道、配体结合口袋及变构传导进行精准改造。获得的 D-阿洛酮糖生物传感器灵敏度提升约 20 倍，对 D-阿洛酮糖的检测范围拓宽到 10 μmol/L 至 100 mmol/L[104]。优化后的 PsiR 传感器与由 *alsE* 和 *yniC* 编码的 D-阿洛酮糖合成途径在谷氨酸棒杆菌中进行共表达，胞内自合成的 D-阿洛酮糖可自动激活目标蛋白（如甘露糖异构酶）的表达，实现了生长依赖的自诱导，避免了添加 IPTG 等昂贵诱导剂。进一步，优化后的传感器与 dCpf1 偶联构建 D-阿洛酮糖触发的 CRISPRi 系统，动态抑制磷酸戊糖途径的 *zwf* 基因表达，使碳代谢流从细胞生长转向 D-阿洛酮糖合成，最终 D-阿洛酮糖产量提高 68%，转化率达 0.43 g/g 葡萄糖（图 6）。

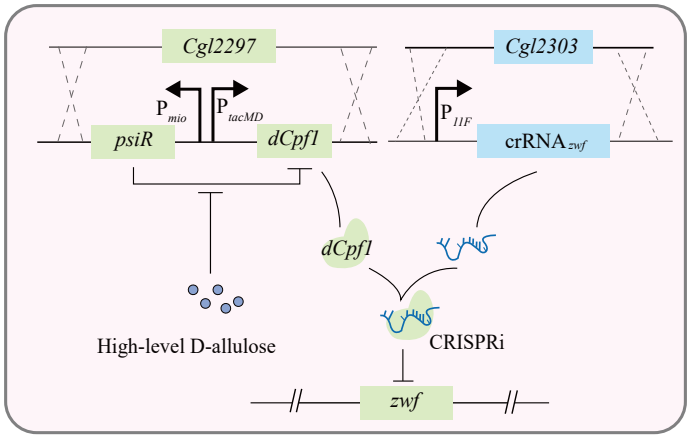
D-阿洛酮糖生物合成中生物传感器目前多用于关键酶的高通量筛选，而用于胞内代谢通量动态调控的研究尚在起步阶段，整体成熟度远低于 HMO 合成中已建立的动态调控体系[86, 89-90]。未来，亟需将这些传感器拓展至前体供给与竞争途径的动态平衡，以实现 D-阿洛酮糖高效智能化细胞工厂的关键。

2.3　生物传感器驱动其他功能糖的生物合成

GlcNAc 是葡萄糖的氨基衍生物，广泛存在于甲壳素、细胞壁肽聚糖及糖胺聚糖中[105]。GlcNAc 具有抗炎、保护关节软骨、改善肠道屏障及保湿



(a) 谷氨酸棒杆菌合成D-阿洛酮糖路线图
（图中标红基因代表受传感器动态调控的基因）
(a) Synthetic pathway diagram of D-allulose synthesis in *C. glutamicum*
(Genes marked in red indicate those dynamically regulated by biosensors)



(b) D-阿洛酮糖响应传感器调控*zwf*促进D-阿洛酮糖合成
(b) Regulation of *zwf* using D-allulose-responsive biosensor to enhance D-allulose biosynthesis

图6 生物传感器动态调控谷氨酸棒杆菌合成D-阿洛酮糖

Fig. 6 Dynamic regulation of D-allulose biosynthesis in *C. glutamicum* using biosensors

等功能，广泛应用于医药、功能食品及化妆品领域[106]。*N*-乙酰氨基葡萄糖的规模化生产正逐步由传统的几丁质酸解法向绿色、可持续的微生物发酵法转变[105]。

在GlcNAc的生物合成路径中，最核心的反应是利用葡萄糖胺-6-磷酸合酶（glucosamine-6-phosphate synthase，GlmS）和氨基葡萄糖-6-磷酸乙酰转移酶（glucosamine 6-phosphate *N*-acetyltransferase，Gna1）等关键酶催化前体代谢物转化生成GlcNAc[105]。为解决合成过程中极易出现的代谢失衡与副产物溢出问题，生物传感器与CRISPRi技术深度融合的动态调控策略展现出了显著的技术优势（表4）。一方面，利用GntR家族转录因子GamR对关键中间体氨基葡萄糖-6-磷酸（glucosamine-6-phosphate，GlcN6P）的特异性响应机制，构建高灵敏度的传感系统，启动子工程改造后动态范围提升13.4倍[107]。将该传感器与CRISPRi系统偶联，构建了自动双向控制系统：当胞内GlcN6P积累时，传感器激活合成关键酶氨基葡萄糖-6-磷酸*N*-乙酰转移酶基因*GNA1*的表达，同时解除对竞争途径基因（*zwf*、*pfkA*、*glmM*）的CRISPRi抑制，实现了代谢流的自主平衡。最终，无需外源诱导剂，工程菌株在15 L发酵罐中合成GlcNAc产量达131.6 g/L（表4）。另外，为减少乙酸等副产物生成，基于代谢物与诱导剂双输入的时序调控策略提供了新的解决思路。通过整合丙酮酸响应转录因子PdhR与乳糖操纵子LacI，构建出双重输入逻辑的动态调控回路。该系统能够借助CRISPRi时序抑制糖代谢关键节点基因（*pfkA*与*zwf*），从而有效阻断乙酸过量积累，最终工程菌株在30 L发酵罐中合成GlcNAc产量达143.8 g/L[108]（表4）。

NeuAc是一种广泛存在于脊椎动物及特定微生物中的天然九碳糖醛酸，在促进婴儿大脑发育、提高免疫力、抗病毒及调节肠道等方面发挥着重要的生理功能[108]。NeuAc的规模化生产主要有生物酶法和微生物发酵法[115]。在生物合成路径中，最核心的反应是利用*N*-乙酰氨基葡萄糖-2-差向异构酶（*N*-acetylglucosamine-2-epimerase，AGE）和*N*-乙酰神经氨酸合成酶（*N*-acetylneuraminic acid synthase，NeuB）等关键酶催化前体代谢物生成NeuAc[116]。在NeuAc的生物合成中，针对特定底盘（如枯草芽孢杆菌）天然传感元件匮乏的瓶颈，引入异源传感系统是有效途径之一。通过引入外源转运蛋白及异源转录因子（如Bbr_NanR），并结合大容量的杂合启动子文库筛选与表达元件优化，能够从头构建具备高灵敏度与宽动态范围的NeuAc响应型生物传感器[117]。该类传感器可进一步开发为可诱导的群体质量控制系统（inducible population quality control system，iPopQC）。通过将传感信号与细胞生长必需基因（如*folB*或*ftsW*）

表4 生物传感器在其他功能糖合成中的应用

Table 4 Applications of biosensors in the biosynthesis of other functional oligosaccharides

传感器名称	工作原理	传感器改造及优化效果	应用	底盘	目标产物产量	参考文献
GlcN6P响应型传感器	GlcN6P浓度低时，GamR结合启动子P_{gamA}上特定序列，抑制下游基因转录；GlcN6P浓度高时，GamR与之结合后从启动子上解离，从而激活下游基因表达	启动子优化，动态范围提高13.4倍	与CRISPRi偶联构建双向控制系统：激活*GNA1*、抑制竞争途径（*zwf*, *pfkA*, *glmM*）	枯草芽孢杆菌	131.6 g/L GlcNAc（15 L发酵罐）	[107]
丙酮酸响应转录因子(PdhR)+乳糖操纵子(LacI)双输入系统	丙酮酸浓度较低时，PdhR结合到其特异性DNA序列上，抑制下游基因（如dCas9）的转录；当丙酮酸积累时，丙酮酸与PdhR结合，使其从DNA上解离，从而解除抑制，开启下游基因表达	启动子工程优化动态范围	构建双输入动态调控系统，结合CRISPRi时序抑制糖酵解关键基因（*pfkA*、*zwf*），减少副产物乙酸积累	大肠杆菌	143.8 g/L GlcNAc（30 L发酵罐）	[108]
NeuAc响应型传感器+iPopQC（可诱导群体质量控制）	无NeuAc时，NanR结合P_{veg105}，抑制下游基因转录；当NeuAc存在时，NanR与之结合，构象改变后从启动子上解离，从而激活基因表达	优化RBS和N端编码序列减少传感器序列表达泄露	构建可诱导群体质量控制系统（iPopQC），调控生长必需基因（*folB*或*ftsW*），动态富集生产亚群	枯草芽孢杆菌	4.23 g/L Neu5Ac（3 L发酵罐）	[109]
NeuAc响应型传感器(Bbr_NanR)	NeuAc浓度较低时，NanR蛋白结合到启动子上的特异性识别序列，抑制下游基因的转录；当NeuAc存在时，NeuAc与NanR结合，诱导其构象改变，从启动子上解离，从而解除抑制，下游基因得以表达	优化启动子强度并引入RiboJ增强转录稳定性；优化后最大激活倍数达10.62倍	高通量筛选*glmS-glmM-SeglmU*多基因文库	大肠杆菌	58.26 g/L NeuAc（3 L发酵罐）	[110]
丙酮酸响应型传感器；NeuAc响应型传感器+流式分选	无丙酮酸时，PdhR结合启动子上特定序列，抑制下游基因转录；丙酮酸存在时，与之结合后构象改变，从启动子上解离，从而解除抑制，激活基因表达	启动子工程提高NeuAc传感器灵敏度和动态响应范围；最大激活倍数10.62倍，检测范围0～15 g/L	高通量筛选CsiR	大肠杆菌	28.17 g/L NeuAc（摇瓶发酵）	[111]
转录因子EryD型传感器	无赤藓糖醇时，EryD形成四聚体，结合到操纵子序列上，抑制下游基因转录；当赤藓糖醇存在时，赤藓糖醇与EryD结合，诱导其构象变化，四聚体解离为二聚体，从DNA上解离，从而解除抑制，激活下游基因表达	启动子和RBS工程优化传感器灵敏度和动态响应范围	高通量筛选突变菌株	解脂耶氏酵母	148 g/L 赤藓糖醇（3 L发酵罐）	[112]
MtlR响应型传感器	甘露醇与MtlR结合，改变其构象，MtlR结合PmtlE并激活转录，导致红色荧光强度上升	启动子和RBS工程优化传感器	筛选不同来源的甘露糖醇1-磷酸脱氢酶/磷酸酶，鉴定最优酶组合	钩虫贪铜菌H16	3.9 g/L甘露醇（3 L发酵罐）	[113]
CdaR响应型传感器	GA结合转录因子CdaR后激活P_{cda}启动子，驱动GFP表达	构建“一锅双菌”共培养系统，产物合成与信号传感空间解偶联，结合FACS进行定向进化	构建“一锅双菌”共培养系统，产物合成与信号传感空间解偶联，结合FACS进行定向进化	大肠杆菌、酿酒酵母	筛选到D82Y等突变体，共表达NADH氧化酶使GA产量提高58%	[114]

的表达相偶联，系统能够自发将细胞生长与产物合成绑定。这种动态富集高产亚群的策略，不仅提升了NeuAc产量，还增强了发酵过程的鲁棒性[109]（表4）。除了群体层面的调控，生物传感器结合超高通量分选技术（FACS），在多节点途径协同优化与全局网络重塑中发挥了决定性作用。为

了克服复杂多基因途径的适配难题，通过引入绝缘子序列（如RiboJ）强化转录稳定性并优化启动子强度，获得最大激活倍数高达10.62倍的高性能NeuAc传感器。利用该传感器对多基因靶点文库（如*glmS-glmM-SeglmU*）进行超高通量筛选，成功实现了多个关键基因翻译效率的协同适配，最终菌株在3 L发酵罐中以葡萄糖为唯一碳源合成NeuAc产量达58.26 g/L，为目前报道最高水平[110]（表4）。此外，多维生物传感器的联合应用策略为挖掘底盘潜能提供了新路径。例如，通过在合成通路中同时采用丙酮酸响应型传感器与NeuAc响应型传感器：将前者插入*ptsG*基因3′-UTR区域动态抑制葡萄糖摄取，减少PEP消耗；后者则结合流式细胞术，对碳饥饿调控因子（carbon starvation regulator，CsiR）的易错PCR突变文库进行高通量筛选，获得突变体CsiR*（T19S/V173M），最终菌株在摇瓶中合成NeuAc产量达28.17 g/L[111]（表4）。

生物传感器在赤藓糖醇和甘露糖醇的生物合成中也有一定应用，但尚未广泛开发（表4）。赤藓糖醇是一种零热量的四碳糖醇，甘露糖醇则具有低升糖指数和良好的化学稳定性，两者在食品与医药领域应用广泛[118-119]。在赤藓糖醇生产中，构建了基于赤藓糖醇响应型转录因子EryD的生物传感器，通过截短DNA结合序列、优化启动子强度及RBS，实现了赤藓糖醇浓度与GFP荧光信号的正向偶联。结合紫外线-常压室温等离子体（atmospheric and room temperature plasma，ARTP）诱变与微流控筛选，成功获得赤藓糖醇高产菌株，在3 L发酵罐中合成赤藓糖醇产量达148 g/L[112]。在甘露糖醇合成方面，Hanko等[113]构建了MtlR响应型生物传感器，以红色荧光蛋白为输出信号，通过启动子工程降低本底泄漏，利用该传感器对不同来源的甘露糖醇1-磷酸脱氢酶/磷酸酶进行快速筛选，鉴定出最优酶组合，并用于钩虫贪铜菌（*Cupriavidus necator* H16）自养合成甘露糖醇，产量达3.9 g/L。除了传统的单菌株传感系统，生物传感器还为其功能性糖酸的生物合成开辟了高效筛选路径。在常规“一锅一菌”体系中，荧光信号受细胞密度干扰严重，造成假阳性。为解决产物毒性及胞内代谢背景干扰的问题，Zheng等[114]开发了一种基于葡萄糖二酸（D-glucaric acid，GA）响应传感器（CdaR转录因子）的“一锅双菌”共培养高通量筛选系统，将产物合成与信号传感在空间上解偶联：生产菌（*E. coli* EA31）负责合成GA，传感菌（*E. coli* EASH）仅含CdaR-GFP系统，负责检测GA浓度。筛选时取无细胞上清液转移至传感菌孵育，由于传感菌密度均一，荧光信号仅反映GA浓度，偏差显著低于单菌体系。利用该系统对肌醇加氧酶（GA合成酶）随机突变库进行两轮筛选，获得9个产量提升15%以上的突变体，其中D82Y和S173N的k_{cat}/K_m分别提升至野生型的2.6倍和2.2倍。该策略避免了对昂贵微流控设备的依赖，为功能糖高产菌株的快速迭代提供了简便、高效的通用平台。

3 结论与展望

生物传感器作为连接微生物胞内代谢物浓度与可检测信号的“智能开关”，已成为突破功能糖高效生物制造瓶颈的核心工具。转录因子型生物传感器具有分子变构机制明确、通用性强以及易于工程化改造等优势，是目前功能糖生物合成领域应用最广泛、最成熟的传感器类型。该类型生物传感器在功能糖生物制造的动态调控与高通量筛选两大核心环节中发挥重要作用。传统静态调控（如组成型过表达或基因敲除）常引发中间体毒性积累或严重的资源分配冲突，而动态调控系统在功能糖生产中展现出不可替代的优势。首先，生物传感器能够将细胞生长与产物合成进行时空解偶联。功能糖（如HMO）的合成通常大量消耗UDP-核苷酸或GDP-核苷酸糖前体，与细胞正常生长竞争激烈。动态调控（如群体感应或温度敏感系统）能自主执行“先生长积累生物量，后开启产物合成”的时序策略，大幅降低代谢负担。其次，生物传感器能够实时、自主分配碳代谢流。生物传感器（如响应FBP或GlcN6P的传感器）可根据胞内代谢物浓度实时上调合成基因并下调竞争途径（如偶联CRISPRi），使碳转化率逼近理论最大值。此外，以胞内代谢物驱动的自诱导方式规避了传统发酵对IPTG等昂贵外源诱导剂的依赖，提升了经济性。该策略的广泛应用仍受限于高特异性、宽动态范围天然传感器的匮乏，且复

杂基因回路在放大发酵过程中易受细胞状态波动影响而产生信号失真或响应延迟。大多数功能糖不具备内源性光学信号或生长表型，难以直接筛选。传统筛选方法（HPLC、GC-MS）日检测量仅为10^2～10^3数量级，无法匹配定向进化所需的庞大突变库（10^5～10^8）。生物传感器将代谢物浓度原位转化为高信噪比荧光或细胞生长表型，与FACS或液滴微流控联用后，筛选通量达10^3细胞/秒或10^5液滴/小时，较传统方法提升数个数量级，显著加速定向进化进程。然而，荧光信号易受宿主细胞自身代谢背景干扰而产生假阳性，非生长偶联的筛选体系在长期传代中易丧失进化压力。该策略高度适用于天然活性极低、底物特异性弱的关键合成酶（如糖基转移酶、差向异构酶）的体外定向进化，以及超大规模菌株文库的表型快速初筛。

未来，生物传感器在功能糖生物合成领域的发展将聚焦于以下方向（图7）。①智能化元件创制：借助AlphaFold、RoseTTAFold等蛋白质结构预测工具及生成式AI算法，实现高灵敏度、超低本底泄漏、正交性优异的定制化传感元件的“从头设计”，突破天然元件匮乏的瓶颈。②非转录因子型传感器的潜力挖掘与协同应用：尽管转录因子型传感器目前占据主导，但RNA型、双组分系统型及荧光蛋白型传感器在未来同样具备广阔的发展前景与不可替代的互补优势。未来，RNA型传感器将借助计算生物学实现对核糖开关的从头设计，发挥其不依赖蛋白质表达、无翻译滞后的超快调控优势；双组分系统将聚焦于周质空间受体的工程化嵌合，强化对胞外无法自由跨膜的功能糖前体或胞外高糖胁迫环境的远程感知；荧光蛋白型传感器（如FRET探针）则将结合非破坏性活细胞成像技术，实现对胞内特定细胞器中瞬态糖代谢流的微观、原位及实时追踪。③真核底盘拓展：基于真核内源转录因子或嵌合设计，构建适用于酿酒酵母、解脂耶氏酵母等安全宿主的生物传感器，克服原核元件在真核系统中功能表达差、信号传导不兼容的障碍，填补部分功能糖的动态调控在真核体系中的空白。④多信号逻辑门集成：整合前体流、辅因子水平、细胞密度、环境因子等多维代谢信号，构建具备AND、OR、NOT等复杂逻辑运算能力的基因电路，实现“先生长、后生产”的自主时序切换与代谢平衡。⑤自动化平台驱动：将生物传感器元件标准化、模块化，与生物铸造厂设计-构建-测试-学习自动化管线深度融合，结合液滴微流控、FACS及机器学习反馈优化，实现对数百万突变体的并行表征与快速收敛，加速功能糖高产菌株的迭代创制。通过上述前沿策略的协同推进，生物传感器将助

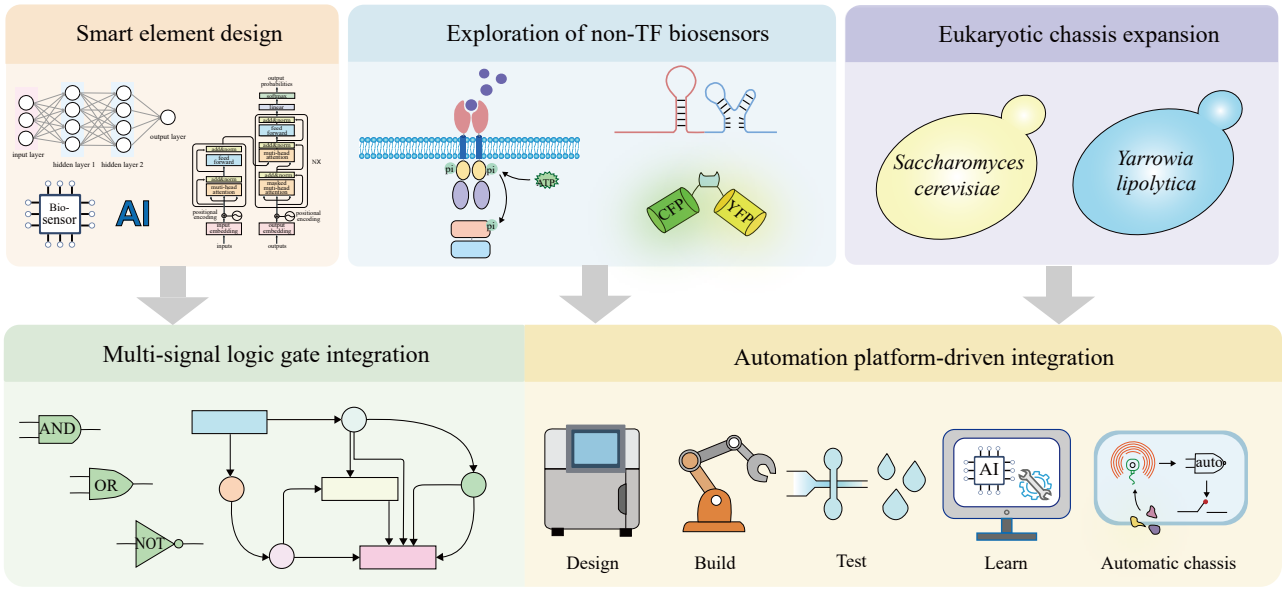


图7　生物传感器在功能糖生物合成中的未来发展方向

Fig. 7　Future directions of biosensors in functional saccharides biosynthesis

力功能糖生物制造从静态优化迈向智能、动态调控的下一代模式。

参 考 文 献

[1] VAN THILLO T, VAN DEUREN V, DEDECKER P. Smart genetically-encoded biosensors for the chemical monitoring of living systems[J]. Chemical Communications, 2023, 59(5): 520-534.

[2] TENG Y X, ZHANG J L, JIANG T, et al. Biosensor-enabled pathway optimization in metabolic engineering[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2022, 75: 102696.

[3] ZHANG F Z, CAROTHERS J M, KEASLING J D. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(4): 354-359.

[4] 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.

[5] PATEL S, GOYAL A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(5): 1119-1128.

[6] PRESSLEY S R, MCGILL A S, LUU B, et al. Recent advances in the microbial production of human milk oligosaccharides[J]. Current Opinion in Food Science, 2024, 57: 101154.

[7] ZHU Y Y, CAO H Z, WANG H, et al. Biosynthesis of human milk oligosaccharides *via* metabolic engineering approaches: current advances and challenges[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2022, 78: 102841.

[8] 刘丹, 王建宇, 江正强. 中性核心母乳寡糖生物合成的研究进展和发展趋势[J]. 合成生物学, 2025, 6(5): 1126-1144.
LIU D, WANG J Y, JIANG Z Q. Research progress and development trends in the biosynthesis of neutral core human milk oligosaccharides[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6 (5): 1126-1144.

[9] 秦慧民, 岳世强, 叶伟江, 等. D-阿洛酮糖的高效生物催化合成研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2025, 43(2): 19-28.
QIN H M, YUE S Q, YE W J, et al. Research progress on efficient biocatalytic synthesis of D-allulose[J]. Journal of Food Science and Technology, 2025, 43(2): 19-28.

[10] ALPER H, FISCHER C, NEVOIGT E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(36): 12678-12683.

[11] PFLEGER B F, PITERA D J, SMOLKE C D, et al. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(8): 1027-1032.

[12] SALIS H M, MIRSKY E A, VOIGT C A. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression [J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(10): 946-950.

[13] LV X Y, CHEN X S, LIU Y F, et al. Efficient production of 3′-sialyllactose using *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(49): 27314-27325.

[14] HOLTZ W J, KEASLING J D. Engineering static and dynamic control of synthetic pathways[J]. Cell, 2010, 140(1): 19-23.

[15] WAN L, ZHU Y Y, LI W, et al. Combinatorial modular pathway engineering for guanosine 5′-diphosphate-L-fucose production in recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(20): 5668-5675.

[16] XIA Z H, LAO C W, WU J Y, et al. Optimization of *l*-fucose biosynthesis in *Escherichia coli* through pathway engineering and mixed carbon source strategy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(10): 6102-6112.

[17] WU J J, BAO M J, DUAN X G, et al. Developing a pathway-independent and full-autonomous global resource allocation strategy to dynamically switching phenotypic states[J]. Nature Communications, 2020, 11: 5521.

[18] DING D Q, ZHU Y R, BAI D Y, et al. Monitoring and dynamically controlling glucose uptake rate and central metabolism[J]. Nature Chemical Engineering, 2025, 2(1): 50-62.

[19] BOZKURT E U, ØRSTED E C, VOLKE D C, et al. Accelerating enzyme discovery and engineering with high-throughput screening[J]. Natural Product Reports, 2026, 43(2): 313-334.

[20] ZHANG J Y, ZHENG D, CHAN S N, et al. Emerging biosensor and assay-enabled high-throughput screening solutions for enzyme and strain engineering[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2026, 98: 103439.

[21] 杨璐, 吴楠, 白茸茸, 等. 基因回路型全细胞微生物传感器的设计、优化与应用[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1061-1080.
YANG L, WU N, BAI R R, et al. Design, optimization and application of whole-cell microbial biosensors with engineered genetic circuits[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1061-1080.

[22] MAHR R, FRUNZKE J. Transcription factor-based biosensors in biotechnology: current state and future prospects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(1): 79-90.

[23] FINDEIß S, ETZEL M, WILL S, et al. Design of artificial riboswitches as biosensors[J]. Sensors, 2017, 17(9): 1990.

[24] CAO W Y, HUANG C, ZHOU X, et al. Engineering two-component systems for advanced biosensing: from architecture to applications in biotechnology[J]. Biotechnology Advances, 2024, 75: 108404.

[25] VERMA A K, NOUMANI A, YADAV A K, et al. FRET based

biosensor: principle applications recent advances and challenges[J]. Diagnostics, 2023, 13(8): 1375.

[26] ZHOU S H, ALPER H S, ZHOU J W, et al. Intracellular biosensor-based dynamic regulation to manipulate gene expression at the spatiotemporal level[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2023, 43(4): 646-663.

[27] JURĖNAS D, FRAIKIN N, GOORMAGHTIGH F, et al. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(6): 335-350.

[28] ZHU Y, LI Y, XU Y, et al. Development of bifunctional biosensors for sensing and dynamic control of glycolysis flux in metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2021, 68: 142-151.

[29] ZHAO M, LI Y T, WANG F Q, et al. A CRISPRi mediated self-inducible system for dynamic regulation of TCA cycle and improvement of itaconic acid production in *Escherichia coli* [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 7(3): 982-988.

[30] ZHANG X H, WU X P, CHEN H, et al. Advances in transcription factor-based biosensors for natural product biosynthesis: Optimization, emerging technologies, and future prospects[J]. Biotechnology Advances, 2026, 87: 108765.

[31] HUTTANUS H M, TRIOLA E H, VELASQUEZ-GUZMAN J C, et al. Targeted mutagenesis and high-throughput screening of diversified gene and promoter libraries for isolating gain-of-function mutations[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1202388.

[32] TELLECHEA-LUZARDO J, STIEBRITZ M T, CARBONELL P. Transcription factor-based biosensors for screening and dynamic regulation[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1118702.

[33] LIBIS V, DELÉPINE B, FAULON J L. Sensing new chemicals with bacterial transcription factors[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 33: 105-112.

[34] MADDOCKS S E, OYSTON P C F. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins [J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 12): 3609-3623.

[35] SONG K S, JI H K, LEE J W, et al. Microbial transcription factor-based biosensors: innovations from design to applications in synthetic biology[J]. Biosensors, 2025, 15 (4): 221.

[36] ZHANG Q W, XU X H, ZHANG W, et al. *De novo* 2′-fucosyllactose biosynthesis using glucose as the sole carbon source by multiple engineered *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2025, 88: 85-93.

[37] LI C, GAO X, QI H B, et al. Substantial improvement of an epimerase for the synthesis of D-allulose by biosensor-based high-throughput microdroplet screening[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2023, 62(10): e202216721.

[38] PARK S V, YANG J S, JO H, et al. Catalytic RNA, ribozyme, and its applications in synthetic biology[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(8): 107452.

[39] PAVLOVA N, KALOUDAS D, PENCHOVSKY R. Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria[J]. Gene, 2019, 708: 38-48.

[40] LEE M H, SHIN S H, KIM S J, et al. Recent advances in biological applications of aptamer-based fluorescent biosensors [J]. Molecules, 2023, 28(21): 7327.

[41] GAMBILL L, STAUBUS A, MO K W, et al. A split ribozyme that links detection of a native RNA to orthogonal protein outputs[J]. Nature Communications, 2023, 14: 543.

[42] WU Y F, ZHU L J, LI S T, et al. High content design of riboswitch biosensors: all-around rational module-by-module design[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 220: 114887.

[43] XU J D, HOU J Y, DING M N, et al. Riboswitches, from cognition to transformation[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2023, 8(3): 357-370.

[44] KAVITA K, BREAKER R R. Discovering riboswitches: the past and the future[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2023, 48(2): 119-141.

[45] MCCOWN P J, WINKLER W C, BREAKER R R. Mechanism and distribution of *glmS* ribozymes[M]//Ribozymes: methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2012: 113-129.

[46] JI S X, LI C G, LIU M L, et al. Targeting new functions and applications of bacterial two-component systems[J]. ChemBioChem, 2024, 25(20): e202400392.

[47] STOCK A M, ROBINSON V L, GOUDREAU P N. Two-component signal transduction[J]. Annual Review of Biochemistry, 2000, 69: 183-215.

[48] 赵静宇, 张健, 祁庆生, 等. 基于细菌双组分系统的生物传感器的研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(1): 38-52.
ZHAO J Y, ZHANG J, QI Q S, et al. Research progress in biosensors based on bacterial two-component systems[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(1): 38-52.

[49] YU W W, XU X H, JIN K, et al. Genetically encoded biosensors for microbial synthetic biology: from conceptual frameworks to practical applications[J]. Biotechnology Advances, 2023, 62: 108077.

[50] MSADEK T, KUNST F, KLIER A, et al. DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene degQ[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(7): 2366-2377.

[51] VERHAMME D T, ARENTS J C, POSTMA P W, et al. Glucose-6-phosphate-dependent phosphoryl flow through the Uhp two-component regulatory system[J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 12): 3345-3352.

[52] RASNIK I, MCKINNEY S A, HA T. Surfaces and orientations: much to FRET about?[J]. Accounts of Chemical Research, 2005, 38(7): 542-548.

[53] CALLEJA V, AMEER-BEG S M, VOJNOVIC B, et al. Monitoring conformational changes of proteins in cells by fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. The Biochemical Journal, 2003, 372(Pt 1): 33-40.

[54] MIYAWAKI A, LLOPIS J, HEIM R, et al. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin[J]. Nature, 1997, 388(6645): 882-887.

[55] KIM H, JU J, LEE H N, et al. Genetically encoded biosensors based on fluorescent proteins[J]. Sensors, 2021, 21(3): 795.

[56] FEHR M, FROMMER W B, LALONDE S. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(15): 9846-9851.

[57] HU H Y, WEI Y F, WANG D C, et al. Glucose monitoring in living cells with single fluorescent protein-based sensors[J]. RSC Advances, 2018, 8(5): 2485-2489.

[58] PÉREZ-CHÁVEZ I, GILGLIONI E H, EZERIŅA D, et al. Single-cell imaging of liver metabolic dynamics using fluorescent biosensors[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2026, 37(7): 667-683.

[59] HAN Z L, YANG C Y, XIAO D, et al. A rapid, fluorescence switch-on biosensor for early diagnosis of sorghum mosaic virus[J]. Biosensors, 2022, 12(11): 1034.

[60] CHAI F, CHENG D Z, NASU Y, et al. Maximizing the performance of protein-based fluorescent biosensors[J]. Biochemical Society Transactions, 2023, 51(4): 1585-1595.

[61] DING N N, ZHOU S H, DENG Y. Transcription-factor-based biosensor engineering for applications in synthetic biology[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(5): 911-922.

[62] MENDOZA A S G, ACOSTA M F M, SÁNCHEZ J A M, et al. Principles and challenges of whole cell microbial biosensors in the food industry[J]. Journal of Food Science, 2024, 89(9): 5255-5269.

[63] XIANG Y Y, DALCHAU N, WANG B J. Scaling up genetic circuit design for cellular computing: advances and prospects [J]. Natural Computing, 2018, 17(4): 833-853.

[64] MANNAN A, LIU D, ZHANG F Z, et al. Fundamental design principles for transcription-factor-based metabolite biosensors [J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(10): 1851-1859.

[65] KURGANOV B I, LOBANOV A V, BORISOV I A, et al. Criterion for Hill equation validity for description of biosensor calibration curves[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 427(1): 11-19.

[66] GEROSA L, SAUER U. Regulation and control of metabolic fluxes in microbes[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22(4): 566-575.

[67] BREAKER R R. Riboswitches and the RNA world[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012, 4(2): a003566.

[68] BHAT S, BANERJEE A, ALAGESAN S. AraC-based biosensor for the detection of isoprene in *E. coli*[J]. ACS Omega, 2023, 8(30): 26806-26815.

[69] CHEN S Y, ZHANG Y, LI R J, et al. *De novo* design of the ArsR regulated pars promoter enables a highly sensitive whole-cell biosensor for arsenic contamination[J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(20): 7210-7218.

[70] TANG M, PAN Z H, JIN M H, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for the high-level production of deoxyviolacein, a natural colorant[J]. Bioresource Technology, 2025, 431: 132584.

[71] DING N N, YUAN Z Q, ZHANG X J, et al. Programmable cross-ribosome-binding sites to fine-tune the dynamic range of transcription factor-based biosensor[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(18): 10602-10613.

[72] BUSHHOUSE D Z, FU J Y, LUCKS J B. RNA folding kinetics control riboswitch sensitivity *in vivo*[J]. Nature Communications, 2025, 16: 953.

[73] MANNA S, KIMOTO M, TRUONG J, et al. Systematic mutation and unnatural base pair incorporation improves riboswitch-based biosensor response time[J]. ACS Sensors, 2023, 8(12): 4468-4472.

[74] JANG S, JANG S, XIU Y, et al. Development of artificial riboswitches for monitoring of naringenin *in vivo*[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(11): 2077-2085.

[75] BOUSSEBAYLE A, TORKA D, OLLIVAUD S, et al. Next-level riboswitch development-implementation of Capture-SELEX facilitates identification of a new synthetic riboswitch [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(9): 4883-4895.

[76] SCHMIDL S R, EKNESS F, SOFJAN K, et al. Rewiring bacterial two-component systems by modular DNA-binding domain swapping[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(7): 690-698.

[77] LANDRY B P, PALANKI R, DYULGYAROV N, et al. Phosphatase activity tunes two-component system sensor detection threshold[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1433.

[78] ZHANG Y, RÓZSA M, LIANG Y J, et al. Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations[J]. Nature, 2023, 615(7954): 884-891.

[79] KOVEAL D, ROSEN P C, MEYER D J, et al. A high-throughput multiparameter screen for accelerated development and optimization of soluble genetically encoded fluorescent biosensors[J]. Nature Communications, 2022, 13: 2919.

[80] VAN DER LINDEN F H, MAHLANDT E K, ARTS J J G, et al. A turquoise fluorescence lifetime-based biosensor for quantitative imaging of intracellular calcium[J]. Nature Communications, 2021, 12: 7159.

[81] BINDELS D S, POSTMA M, HAARBOSCH L, et al. Multiparameter screening method for developing optimized red-fluorescent proteins[J]. Nature Protocols, 2020, 15(2):

450-478.

[82] URRUTIA-BACA V H, ÁLVAREZ-BUYLLA J R, GUEIMONDE M, et al. Comparative study of the oligosaccharide profile in goat, bovine, sheep, and human milk whey[J]. Food Chemistry, 2025, 463: 141123.

[83] BENSIMON J, LU X N. Human milk oligosaccharides produced by synthetic biology[J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2024, 18: 101361.

[84] BODE L. Human milk oligosaccharides: next-generation functions and questions[J]. Nestle Nutrition Institute Workshop Series, 2019, 90: 191-201.

[85] LIN S, JIANG X L, HUANG J M, et al. Next-generation biosynthesis of human milk oligosaccharides[J/OL]. Trends in Biotechnology, 2026. (2026-01-21) [2026-07-01]. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2025.11.023.

[86] YU W W, JIN K, WU Y K, et al. A pathway independent multi-modular ordered control system based on thermosensors and CRISPRi improves bioproduction in *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(11): 6587-6600.

[87] TAO M T, YANG L H, ZHAO C H, et al. Implementation of a quorum-sensing system for highly efficient biosynthesis of lacto-*N*-neotetraose in engineered *Escherichia coli* MG1655 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(13): 7179-7186.

[88] WANG J, LAO C W, CHEN X S, et al. Dynamic regulation coupled with metabolic pathway optimization enables high-efficiency lacto-*N*-fucopentaose Ⅰ biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2026, 74 (16): 13031-13042.

[89] LI J Z, HE T Y, REN S D, et al. Construction and optimization of a BgaR-based lactose biosensor for high-throughput selection of human milk oligosaccharide producers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(27): 17138-17146.

[90] WANG L Y, ZHANG Z L, ZHANG B R, et al. A combinatorial strategy of semirational screening and rational design for engineering an α-1,2-fucosyltransferase toward efficient 2′-fucosyllactose biosynthesis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2026, 74(16): 13100-13111.

[91] STEVENS A M, DOLAN K M, GREENBERG E P. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(26): 12619-12623.

[92] VON BODMAN S B, MAJERCZAK D R, COPLIN D L. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(13): 7687-7692.

[93] SAIER M H JR, RAMSEIER T M. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(12): 3411-3417.

[94] ZHANG M W, TAO W, HOU M L, et al. Rational pathway engineering and genome-scale CRISPRi screening combinatorially enhance lacto-*N*-neotetraose biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Chemical Engineering Journal, 2026, 534: 175289.

[95] LI Q G, LIU C, HE J H, et al. Construction and application of 3-fucosyllactose whole-cell biosensor for high-throughput screening of overproducers[J]. Bioresource Technology, 2024, 402: 130798.

[96] HOSSAIN A, YAMAGUCHI F, MATSUO T, et al. Rare sugar D-allulose: potential role and therapeutic monitoring in maintaining obesity and type 2 diabetes mellitus[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2015, 155: 49-59.

[97] HU M Y, LI M L, JIANG B, et al. Bioproduction of D-allulose: properties, applications, purification, and future perspectives [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(6): 6012-6026.

[98] ZHANG W L, CHEN D, CHEN J J, et al. D-allulose, a versatile rare sugar: recent biotechnological advances and challenges[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(22): 5661-5679.

[99] ZHANG Y, ZHOU Z S, LUAN H N, et al. Advances in the biosynthesis of D-allulose[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(12): 375.

[100] LI C, GAO X, LI H M, et al. Growth-coupled evolutionary pressure improving epimerases for D-allulose biosynthesis using a biosensor-assisted *in vivo* selection platform[J]. Advanced Science, 2024, 11(14): e2306478.

[101] HAN Y Y, LI J Q, HE Y X, et al. A toxin-antitoxin-driven biosensor platform for the directed evolution of D-allulose 3-epimerase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2026, 74(9): 7692-7703.

[102] LI Z J, HU Y F, YU C, et al. Semi-rational engineering of D-allulose 3-epimerase for simultaneously improving the catalytic activity and thermostability based on D-allulose biosensor[J]. Biotechnology Journal, 2024, 19(8): 2400280.

[103] LV Y K, CHEN S, ZHU L J, et al. Improving D-allulose production *via* alditol oxidase-directed evolution assisted by an artificial genetic circuit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(22): 13676-13683.

[104] DONG Q Z, CHEN P, GUO Z R, et al. Computational design of allulose-responsive biosensor toolbox for auto-inducible protein expression and CRISPRi mediated dynamic metabolic regulation[J]. Nature Communications, 2025, 16: 11562.

[105] LIU L, LIU Y F, SHIN H D, et al. Microbial production of glucosamine and *N*-acetylglucosamine: advances and

perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(14): 6149-6158.

[106] CHEN J K, SHEN C R, LIU C L. *N*-acetylglucosamine: production and applications[J]. Marine Drugs, 2010, 8(9): 2493-2516.

[107] WU Y K, CHEN T C, LIU Y F, et al. Design of a programmable biosensor-CRISPRi genetic circuits for dynamic and autonomous dual-control of metabolic flux in *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(2): 996-1009.

[108] LU J G, WU Y K, DENG C, et al. Model-based dynamic engineering of *Escherichia coli* for *N*-acetylglucosamine overproduction[J]. Biotechnology Notes, 2022, 3: 15-24.

[109] CAO Y T, TIAN R Z, LV X Q, et al. Inducible population quality control of engineered *Bacillus subtilis* for improved *N*-acetylneuraminic acid biosynthesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(9): 2197-2209.

[110] QI B, ZHANG J N, MA W L, et al. Biosensor-assisted multitarget gene fine-tuning for *N*-acetylneuraminic acid production in *Escherichia coli* with sole carbon source glucose [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(16): 9793-9806.

[111] JIA M J, YANG S H, XU Y, et al. Synergistic use of multiple regulatory strategies for efficient *N*-acetylneuraminic acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2026, 74(8): 6930-6941.

[112] QIU X L, XU P, ZHAO X R, et al. Combining genetically-encoded biosensors with high throughput strain screening to maximize erythritol production in *Yarrowia lipolytica*[J]. Metabolic Engineering, 2020, 60: 66-76.

[113] HANKO E K R, SHERLOCK G, MINTON N P, et al. Biosensor-informed engineering of *Cupriavidus necator* H16 for autotrophic D-mannitol production[J]. Metabolic Engineering, 2022, 72: 24-34.

[114] ZHENG S, HOU J, ZHOU Y, et al. One-pot two-strain system based on glucaric acid biosensor for rapid screening of myo-inositol oxygenase mutations and glucaric acid production in recombinant cells[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 212-219.

[115] ZHAO M L, ZHU Y Y, WANG H, et al. Recent advances on *N*-acetylneuraminic acid: physiological roles, applications, and biosynthesis[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2023, 8 (3): 509-519.

[116] LIN Q, LIU Y L, ZHANG W B, et al. High-efficiency *N*-acetylneuraminic acid biosynthesis in plasmid-free *Escherichia coli* MG1655[J]. Bioresource Technology, 2026, 452: 134585.

[117] 孙佳琦, 曹燕亭, 吕雪芹, 等. 枯草芽孢杆菌中高效响应*N*-乙酰神经氨酸生物传感器的构建[J]. 生物工程学报, 2023, 39 (6): 2502-2516.
SUN J Q, CAO Y T, LÜ X Q, et al. Development of biosensors highly responsive to *N*-acetylneuraminic acid in *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2502-2516.

[118] LI M, NI Z F, LI Z Z, et al. Research progress on biosynthesis of erythritol and multi-dimensional optimization of production strategies[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(8): 240.

[119] CHEN M, ZHANG W L, WU H, et al. Mannitol: physiological functionalities, determination methods, biotechnological production, and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(16): 6941-6951.



通讯作者：江正强（1971—），男，教授，博士生导师。研究方向为食品酶工程等。
E-mail：zhqjiang@cau.edu.cn



第一作者：刘丹（1995—），女，博士研究生。研究方向为食品生物技术。
E-mail：liudan379@163.com