

• 核心技术创新 •

王钰 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员, 2009 年和 2016 年分别于山东大学和上海交通大学获得学士和博士学位。主要从事工业微生物的编辑育种和碳一原料的生物转化研究, 以第一或通讯作者在 *Nat Commun*、*Trends Biotechnol*、*Metab Eng*、*Biosens Bioelectron* 等期刊发表论文 30 余篇, 申请专利 30 余项; 获得国家自然科学基金优秀青年基金、科技部重点研发计划合成生物学专项等资助, 入选《MIT 科技评论》亚太区“35 岁以下科技创新 35 人”, 获得日本生物工学会 DaSilva Award、明治生命科学奖等荣誉。



发酵工业菌种的迭代创制

周文娟^{1,2#}, 付刚^{1,2#}, 齐显尼^{1,2}, 郑小梅^{1,2}, 房欢^{1,2}, 夏苗苗^{1,2}, 张大伟^{1,2}, 王钦宏^{1,2}, 郑平^{1,2}, 王钰^{1,2}, 孙际宾^{1,2}

1 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

周文娟, 付刚, 齐显尼, 郑小梅, 房欢, 夏苗苗, 张大伟, 王钦宏, 郑平, 王钰, 孙际宾. 发酵工业菌种的迭代创制. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4200-4218.

ZHOU WJ, FU G, QI XN, ZHENG XM, FANG H, XIA MM, ZHANG DW, WANG QH, ZHENG P, WANG Y, SUN JB. Upgrading microbial strains for fermentation industry. Chin J Biotech, 2022, 38(11): 4200-4218.

摘要: 生物发酵是以微生物菌种为生物催化剂, 以淀粉糖、生物质等可再生资源为原料发酵生产各种食品、化学品、燃料、材料等物质的生产过程, 具有绿色、低碳和可持续等特征。我国拥有全球规模最大的生物发酵产业, 尤其氨基酸、维生素等传统发酵产品占全球市场份额的 60%–80%。发展生物发酵产业对于我国实现“碳中和、碳达峰”的战略目标和生物经济发展具有重要的意义。微生物工业菌种是生物发酵产业的核心, 直接影响原料路线、产品种类和生产成本。创新发酵工业菌种, 提升其原料转化利用效率, 提高产物生产水平, 拓展产品种类, 是生物发酵产业高质量发展的关键。近年来, 合成生物学、系统生物学等学科的发展, 进一步加深了研究者对微生物底盘细胞生理代谢机制的理解, 加速了基因编辑等菌种设计创制使能技术的发展, 为发

Received: August 3, 2022; **Accepted:** September 6, 2022; **Published online:** September 8, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901400); Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (2021177)

Corresponding author: WANG Yu. E-mail: wang_y@tib.cas.cn

[#]These authors contributed equally to this study

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0901400); 中国科学院青年创新促进会 (2021177)

酵工业菌种改造提升提供了新动能。本文选取了具有代表性的大宗氨基酸、B族维生素、柠檬酸、燃料乙醇等发酵产业,从其工业微生物底盘的基础研究和技术开发角度,综述发酵工业菌种改造提升的最新进展,并展望人工智能、自动化与生命科学交叉融合将对工业菌种迭代产生的重要影响。

关键词: 氨基酸; 柠檬酸; 维生素; 燃料乙醇; 谷氨酸棒杆菌; 枯草芽孢杆菌; 黑曲霉; 酿酒酵母

Upgrading microbial strains for fermentation industry

ZHOU Wenjuan^{1,2#}, FU Gang^{1,2#}, QI Xianni^{1,2}, ZHENG Xiaomei^{1,2}, FANG Huan^{1,2}, XIA Miaomiao^{1,2}, ZHANG Dawei^{1,2}, WANG Qinhong^{1,2}, ZHENG Ping^{1,2}, WANG Yu^{1,2}, SUN Jibin^{1,2}

1 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

Abstract: Fermentation is a green, low-carbon and sustainable process for the production of food, chemicals, fuels, and materials by using microbial strains as biocatalysts and renewable resources such as starch and biomass as feedstocks. China has the world's largest fermentation industry, the scale of amino acids, vitamins, and some other fermentation products accounted for 60%–80% of the global market share. The development of fermentation industry is of great significance for the strategic goal of “carbon neutralization and carbon peak” and the development of bioeconomy. Microbial strains are the core of fermentation industry, which directly decide what kind of chemical can be produced from what kind of feedstock at what cost. Innovating industrial strains to improve the conversion efficiency of raw materials, increase the production level, and expand product portfolio is the key to the high-quality development of fermentation industry. In recent years, the development of synthetic biology and systems biology has further deepened the understanding of the physiological and metabolic mechanisms of microbial chassis and accelerated the development of gene editing and other enabling technologies for strain design and engineering. All these advances have provided new driving force for the upgrading of industrial strains. This review focused on the representative fermentation products including amino acids, B vitamins, citric acid, and bio-ethanol. The latest progress of strain development for fermentation industry was reviewed from the perspective of basic research and technology innovation for industrial microbial chassis. How the integration of artificial intelligence and automation with life science will reshape the upgrading of industrial strains was also discussed.

Keywords: amino acid; citric acid; vitamin; fuel ethanol; *Corynebacterium glutamicum*; *Bacillus subtilis*; *Aspergillus niger*; *Saccharomyces cerevisiae*

我国发酵产业规模全球第一, 各类发酵产品产量超过 7 000 万 t, 产值近万亿, 其中氨基

酸、有机酸、维生素等产品产量占全球总产量的 60%–80%。工业菌种被认为是发酵产业的“芯

片”，是产业竞争的焦点和关键。但是，我国部分发酵产业缺乏自主的高性能工业菌种及生产工艺，产业发展存在隐患。例如，我国 2021 年赖氨酸产量达 252 万 t，占世界总产量的 60%，但我国菌种知识产权在全球占比不超过 5%，自主菌种的生产水平距国际大公司先进菌种仍存在一定差距。因此，开展自主发酵工业菌种的设计创制研究，提升菌种生产性能，是保障我国发酵产业健康可持续发展的关键。

工业菌种通常以特定的微生物为底盘，通过诱变育种和基因工程育种等方式获得。对发酵工业菌种进行改造提升需要重点开展以下 3 个方面的研究，一是研发先进的基因编辑、基因表达调控、高通量筛选等菌种创制使能技术，提高对微生物底盘的遗传改造和代谢调控能力；二是开展系统生物学、微生物遗传学等基础研究，加深对微生物底盘遗传特性和生理代谢机制的理解；在此基础上，通过代谢途径设计重构、关键元件进化筛选、底盘形态和性能重塑等研究，提升发酵菌种的生产水平和工业应用性能，创制新一代的工业菌种。以此为基础，可通过多轮的设计-构建-测试-学习 (design-build-test-learn, DBTL) 循环，不断提升工业菌种的生产水平和工业应用性能，实现工业菌种的迭代。近年来，包括中国科学院天津工业生物技术研究所 (以下简称“天津工业生物所”) 在内的我国科研机构正加紧发酵工业菌种底盘改造技术的研发，并取得了一定的突破。本文选取了大宗氨基酸、B 族维生素、柠檬酸、燃料乙醇等我国生产规模大，且利用不同微生物底盘发酵生产的代表性发酵产品，从核心微生物底盘改造和理解技术的角度，综述这些产品的发酵工业菌种改造提升的研究进展，并展望“生物技术与信息技术” (biotechnology+information technology, BT+IT) 交叉融合在未来工业菌种设计创制中的应用潜力。

1 大宗氨基酸工业菌种的迭代创制技术

氨基酸是生命体蛋白质的基本组成单元，对人和动物的营养健康十分重要。氨基酸及其衍生物广泛应用于饲料、食品、医药等领域。其中，饲料氨基酸市场规模最大，占市场份额的 50%–60%，其次食品氨基酸约占市场份额的 30%。大宗氨基酸一般指市场需求大、产业规模大的氨基酸品种。L-谷氨酸和 L-赖氨酸是市场规模最大的 2 个氨基酸产品，分别作为重要的食品鲜味剂和饲料添加剂，目前主要通过谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) (L-谷氨酸和 L-赖氨酸) 或大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (L-赖氨酸) 发酵淀粉糖生产。谷氨酸棒杆菌是来源于土壤的革兰氏阳性细菌，被认为是生物安全微生物，是目前 L-谷氨酸和 L-赖氨酸的主力生产菌种，也被用于生产支链氨基酸等其他多种氨基酸，以及蛋白质等多种产品^[1-3]。由于谷氨酸棒杆菌在氨基酸发酵工业中的重要应用价值，近半个世纪以来，该菌株的遗传代谢机制等基础研究，以及育种技术开发等应用研究始终备受关注。近年来，基因编辑与调控、高通量进化与筛选技术的快速进步，显著加速了氨基酸工业菌种的改造提升与工业化应用。

1.1 谷氨酸棒杆菌的基因编辑与调控

基因编辑是改造微生物遗传信息，实现代谢途径重构或调控的底层技术。谷氨酸棒杆菌的细胞壁膜结构复杂，染色体 GC 含量高，稳定性高，导致外源 DNA 转化和遗传改造的效率较低，这成为氨基酸工业菌种迭代的主要限制因素。首先，研究者从感受态细胞制备和电转化流程，以及细胞壁合成途径改造两方面入手，提高谷氨酸棒杆菌的外源 DNA 转化效率。江南大学 Ruan 等对感受态细胞制备所需的培养基、

培养流程和电转化条件进行了系统优化,在最优条件下可获得 10^7 CFU/ μg DNA 的转化效率^[4]。天津工业生物所 Liu 等通过对工业菌种的比较基因组学分析,鉴定了可提高谷氨酸棒杆菌 DNA 电转化效率约 20 倍的 *ponA* 突变位点,且该突变不影响菌种生长和代谢^[5]。

在提高 DNA 转化效率的同时,研究者也积极改进谷氨酸棒杆菌的遗传改造技术,并在基于成簇的规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 的基因编辑技术开发中取得了突破(图 1),可高效实现大片段 DNA 的敲除和敲入、染色体的小幅改动,以及多位点的单碱基编辑等改造。目前,CRISPR/Cas12a 和 CRISPR/Cas9 系统都成功地应用于谷氨酸棒杆菌的基因编辑。2017 年,中国科学院植物生理生态研究所 Jiang 等首次在谷氨酸棒杆菌中开发了 CRISPR/

Cas12a 介导的基因编辑技术,该方法与单链 DNA 重组技术相结合,实现了谷氨酸棒杆菌染色体 DNA 的小幅改动,效率达到 86%–100%,但是基因敲除或敲入的效率较低 (<5%)^[6]。该团队进一步将基于 *sacB* 的自杀质粒系统与 CRISPR/Cpf1 系统相结合,将基因敲除、敲入效率提升至 60%–100%^[7]。2019 年,德国生物与地球科学研究所 Krumbach 等使用 CRISPR/Cas12a 系统对负责谷氨酸外排的机械敏感通道蛋白基因 *mscCG* 核心位点进行饱和突变,获得了谷氨酸外排能力显著增强的突变体^[8]。

由于 CRISPR/Cas9 系统识别 NGG 的前间区序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM),更加适用于染色体高 GC 含量的谷氨酸棒杆菌的基因编辑。因此,天津工业生物所、中国科学院微生物研究所、江南大学等的研究者还开发了适用于谷氨酸棒杆菌的 CRISPR/Cas9 系

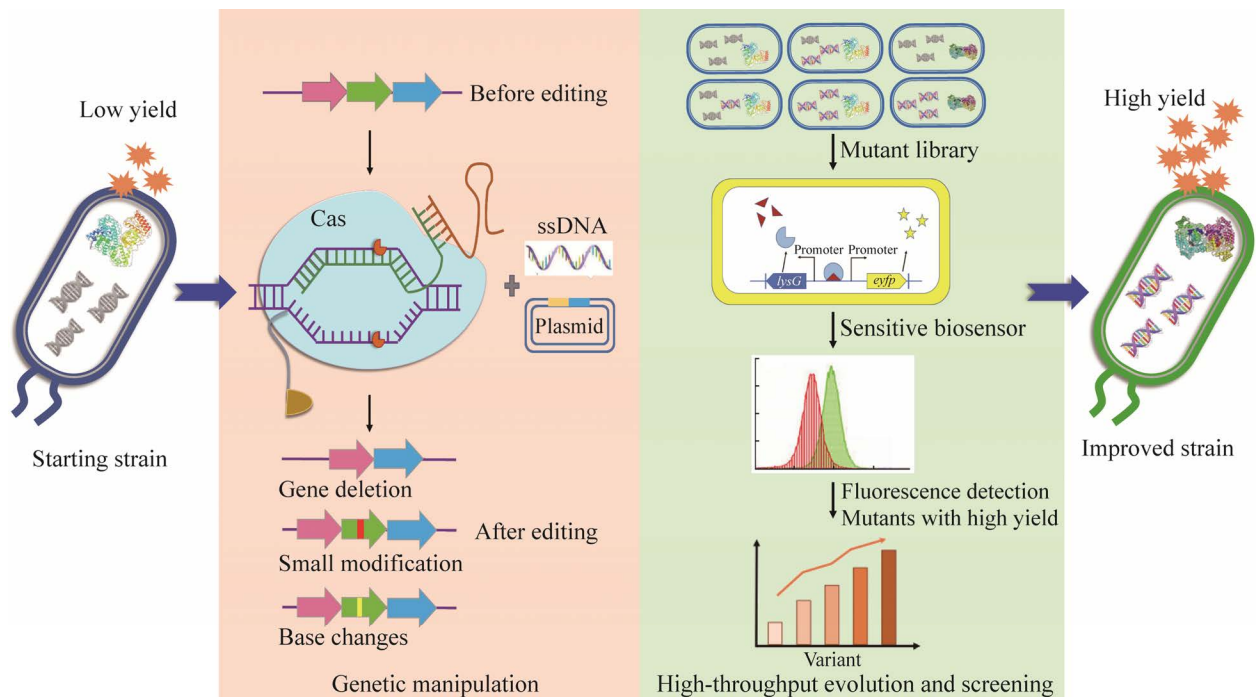


图 1 氨基酸工业菌种的遗传改造和高通量进化筛选

Figure 1 Genetic manipulation and high-throughput evolution and screening of industrial strains for amino acid production.

统。2017年,天津工业生物所Liu等通过优化重构Cas9和gRNA的表达盒解决了Cas9毒性和gRNA自身转录终止子无法终止的问题,首次实现了基因敲除和敲入;与单链DNA重组技术结合,能够实现两个位点的DNA小幅改动,双位点的编辑效率达40%^[9]。近期,该团队通过转录-翻译多级调控Cas9表达的严谨性和表达量,大幅提升了基于双链DNA模板的基因敲除和敲入,常规编辑效率超过90%,219 kb大片段敲除效率超过30%;优化后的系统操作简便,编辑周期短,为氨基酸工业菌种改造提升提供了高效的遗传改造技术^[10]。

此外,研究人员还将CRISPR/Cas9系统的定位功能和碱基脱氨酶催化的胞嘧啶/腺嘌呤脱氨功能相结合^[11-13],开发了适用于谷氨酸棒杆菌的多位点碱基编辑技术。天津工业生物所Wang等利用nCas9和胞嘧啶脱氨酶的融合蛋白,开发了多元自动化基因组编辑方法MACBETH,该方法不使用DNA模板,不依赖同源重组,不产生双链DNA断裂,可在染色体靶位点实现C→T的编辑,对单靶点、双靶点和三靶点的编辑效率可分别达到100.0%、87.2%和23.3%^[11]。随后,该团队利用识别不同PAM的Cas突变体,将PAM限制由NGG扩展为NG,使可编辑靶点数量提高了3.9倍;此外通过引入腺苷脱氨酶,实现了A→G的编辑^[12]。江南大学Deng等将上述两种碱基编辑器结合,构建了双碱基编辑工具TadA-dCas9-AID,可在靶位点同时实现C→T和A→G的编辑^[13]。

除基因编辑外,对基因的表达水平进行精细调控也是菌种创制的关键。目前最常用的基因表达调控方法是在离位(*ex-situ*)构建启动子或核糖体结合位点(ribosome binding sites, RBS)的质粒文库,转化进入菌株进行筛选,但是该方法严重受限于克隆效率和转化效率,

难以实现多基因同时的表达调控。天津工业生物所Wang等基于前期开发的碱基编辑技术,开发了一种新型的多基因精细表达调控技术,命名为BETTER(base editor-targeted and template-free expression regulation)。BETTER的工作原理是在需要调控的目的基因前插入特定的启动子、RBS等表达调控元件,然后使用CRISPR引导的碱基编辑器对表达调控元件进行编辑,产生遗传多样性,原位构建表达调控元件文库,从而调节目的基因的表达水平。该过程不需要合成和转化DNA文库,不依赖于外源DNA与染色体的同源重组,也不产生双链DNA断裂,因此具有高效、简便、宿主普适性强等优点。该技术在谷氨酸棒杆菌中成功实现了10个基因的同时表达调控,为代谢网络重编程提供了新的技术手段^[14]。

1.2 氨基酸菌种的高通量进化与筛选

基因编辑与调控技术的不断进步使得研究人员具备了对谷氨酸棒杆菌的理性改造能力。但是同时,非理性或半理性的突变技术仍然在菌种迭代中扮演着重要的作用。因此,高通量的菌种和元件进化筛选技术近年来也受到学术界和产业界的广泛关注。目前较为成熟的是基于氨基酸生物传感器的进化筛选技术。德国生物与地球科学研究所的研究团队在氨基酸生物传感器研究中做出了重要的工作。Mustafi等利用谷氨酸棒杆菌转录调控因子Lrp与荧光蛋白eYFP构建了可监测胞内L-缬氨酸浓度的生物传感器,利用该生物传感器从随机突变文库中筛选出胞外积累支链氨基酸(L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸)的突变株^[15-16]。Binder等以荧光蛋白eYFP作为报告系统,构建了基于转录调控因子LysG的碱性氨基酸(L-赖氨酸、L-精氨酸、L-组氨酸)生物传感器,并通过荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting,

FACS) 从随机突变文库中筛选获得了 L-赖氨酸生产菌株^[17]。随后, 该团队继续利用该生物传感器对碱性氨基酸合成关键酶 LysC、ArgB、HisG 以及四碳回补途径的丙酮酸羧化酶进行了进化筛选, 获得了解除反馈抑制和催化活性提升的突变体^[18-19]。

近期, 我国研究团队开发了基于蛋白质翻译元件的新型氨基酸生物传感器, 并成功应用于氨基酸生产菌种的进化筛选。北京理工大学 Zheng 等开发了一套基于稀有密码子的氨基酸生物传感器和筛选系统, 其工作原理是在荧光报告基因或抗生素抗性基因的编码序列中引入目标氨基酸的同义稀有密码子, 该氨基酸合成增强时, 菌种输出更高的荧光信号或更强的抗生素抗性, 利用该系统, 研究者成功筛选获得了高产 L-精氨酸、L-亮氨酸、L-丝氨酸的菌种^[20]。天津工业生物所 Sun 等利用氨基酸底物亲和性改变的氨酰 tRNA 合成酶突变体, 开发了通用型氨基酸生物传感器, 可有效实现异亮氨酸高产菌种的进化筛选, 并为其他氨基酸生物传感器的开发提供了新的思路^[21]。

除了基于生物传感器的高通量进化筛选体系, 天津工业生物所 Chen 等提出了一种基于人工营养缺陷型菌株的蛋白质元件高通量进化筛选技术。由于蛋白质功能往往与细胞生长密切相关, 因此可以通过设计人工营养缺陷型菌株, 建立细胞生长和蛋白质特性之间的联系, 实现生长偶联的蛋白质突变体高通量筛选^[22]。该思路已经成功指导乙酰 CoA 营养缺陷型谷氨酸棒杆菌的构建, 以及非氧化糖酵解 (non-oxidative glycolysis, NOG) 途径关键酶磷酸转酮酶的定向进化, 为高原子经济性氨基酸合成途径的构建提供了优秀的催化元件^[23]。

基于以上使能技术的创新, 天津工业生物所团队对 L-赖氨酸、L-谷氨酸等大宗氨基酸工

业菌种进行了改造提升。赖氨酸新菌种在十万吨级生产线实现工业化应用, 成果获得中国产学研合作促进会“产学研创新成果奖”、中国科学院科技促进发展奖等奖励。谷氨酸新菌种在百万吨级生产线上推广应用, 产酸浓度达到 230 g/L, 发酵强度达到 6.8 g/(L·h), 尤其是影响生产成本的关键技术指标糖酸转化率较出发菌株提高 5%, 达到 73%, 实现平均节粮 10%, 节能 15%, 成果获得 2020 年内蒙古自治区科学技术进步一等奖。

2 B 族维生素工业菌种的迭代创制技术

维生素是所有生物必需的有机化合物, 经常作为关键代谢反应的辅酶。植物和微生物可以天然合成维生素, 而人类和动物需要通过食物获得维生素。B 族维生素是一类重要的维生素, 如人们熟知的维生素 B₁ (硫胺素)、维生素 B₂ (核黄素)、维生素 B₅ (泛酸)、维生素 B₇ (生物素)、维生素 B₉ (叶酸)、维生素 B₁₂ (氰钴胺) 等。B 族维生素对于维护人体健康、预防及治疗多种疾病都有着重要的作用, 是重要的生物发酵产品。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌、苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 等多种微生物都在工业上用于维生素的生产。枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性细菌, 可形成内生抗逆芽孢, 被认为是生物安全微生物, 具有生长快, 易于培养等优势, 目前广泛应用于多种维生素和工业酶的发醇生产。但是, 相比于大肠杆菌等模式菌种, 枯草芽孢杆菌的基因表达调控系统较为缺乏, 限制了基于枯草芽孢杆菌的工业菌种的改造提升。

2.1 枯草芽孢杆菌的新型基因表达调控系统

基因精细表达调控可以有效平衡细胞生长与产物合成模块的代谢流竞争, 缓解胞内代谢压力, 最大化微生物的产物合成能力。然而现

有枯草芽孢杆菌的基因表达调控系统都存在着一些限制性因素,例如启动强度不足、诱导物价格昂贵、抗菌素或抗生素等诱导物对细胞有毒害作用等,限制了其在扩大化生产中的实际应用潜力。

为了解决上述问题,天津工业生物所 Fu 等在枯草芽孢杆菌中开发了具有自主知识产权的基于麦芽糖转录激活因子操纵子 (MalO) 的基因表达调控系统 MATE (maltose-inducible expression system, MATE), 实现了目标基因的高强度、高严谨表达与调控^[24] (图 2)。通过对麦芽糖启动子 P_{malA} 的操纵子序列 (MalO) 进行鉴定、突变和高通量筛选,获得了一系列具有不同强度的启动子突变体,并对 MalO 序列在启动子中的位置和序列进行调整,构建出在单细胞内能够兼容的诱导激活型/抑制型系统

MATE-ON/OFF, 并运用流式细胞仪证明 MATE 诱导系统具有高均一性和高重复性;加入激活型核糖开关整合转录-翻译调控元件,进一步提高了系统严谨性,在保持表达强度的条件下实现 790 倍的诱导倍数,实现了系统强度和系统严谨性的兼得;分析了 MalO 在不同数量和距离下对启动子强度的影响,通过改变 MalO 在启动子中的数量或位置可实现对启动子强度的减弱或增强。利用构建的 MATE-ON/OFF 系统,调控枯草芽孢杆菌的细胞分裂和形态,可高效调控合成途径,实现了高产维生素 B₂ 等营养化学品。

除上述 MATE 系统外,最近国内研究者还报道了多个不同功能的枯草芽孢杆菌基因表达调控系统。例如,江南大学 Yu 等在枯草芽孢杆菌中创制了温敏型多模块时序双向调控系统。该系统利用大肠杆菌噬菌体中温敏型转录因子

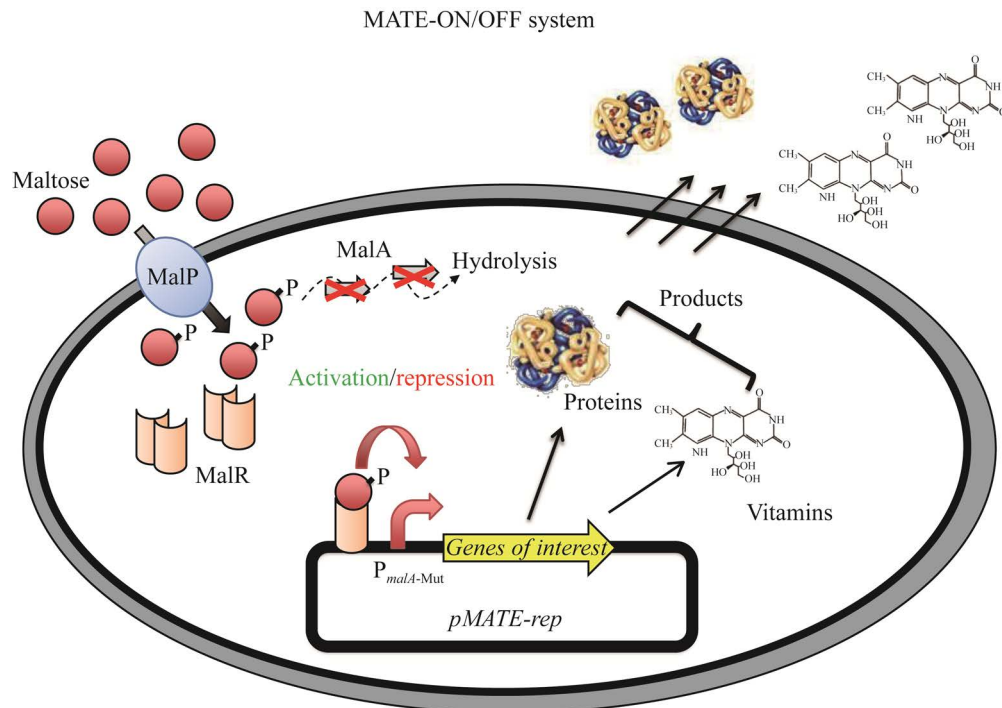


图 2 MATE 基因表达调控系统的开发及在维生素合成中的应用^[24]

Figure 2 Development of gene expression regulation system MATE and its application in vitamin biosynthesis^[24].

突变体 CI⁸⁵⁷ 设计创制了不同激活温度的表达系统,并结合 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 系统,实现温度诱导的双向表达调控^[25];江南大学 Xu 等基于枯草芽孢杆菌内源的群体感应系统 ComQXPA,开发了一系列兼具诱导起始范围宽和转录强度高枯草芽孢杆菌自诱导表达系统^[26];天津工业生物所 Ye 等在枯草芽孢杆菌中开发了基于 T7 RNA 聚合酶的高效表达系统,实现了多种目标蛋白的高水平表达^[27]。这些基因表达调控系统的开发,极大地丰富了枯草芽孢杆菌的代谢调控工具箱,为维生素等工业菌种改造提升奠定了技术基础。

2.2 B 族维生素合成途径设计与组装

近几年基因合成成本降低, DNA 组装技术快速发展,使得设计重构维生素等复杂化合物的合成途径成为可能。维生素 B₁₂ 结构复杂,合成途径很长,涉及基因多。在重构复杂长合成途径时,多采用多元模块工程,按代谢节点对途径进行模块式划分,以降低途径的复杂程度。通过建立并优化模块功能以及调节模块之间的表达强度,实现模块与模块之间的组合设计和迭代适配^[28]。天津工业生物所 Fang 等通过对维生素 B₁₂ 合成途径的分析,将其分解成 5 个模块,采用“自下而上”的多基因组组装表达策略,将荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)、马尔他布鲁氏菌 (*Brucella melitensis*)、苜蓿中华根瘤菌等 5 株细菌中的 28 个异源基因分配到大肠杆菌染色体与 3 个质粒上,使用 IPTG 诱导的 P_{T7}、P_{lac}、P_{trc} 等启动子控制基因表达 (图 3)。进一步通过解除核糖开关抑制,优化合成模块表达元件, sRNA 抑制竞争途径等策略,解决了多基因的组装与适配机制问题,最终实现了大肠杆菌中从头合成维生素 B₁₂^[29]。

但是,上述第一代工程菌种在质粒维持、异源基因表达、菌种生长、产物生产等方面不

协调,菌种不稳定问题突出。该团队通过 RBS 文库组合调控前体合成模块,精准弱化血红素和西罗血红素竞争途径,提高了维生素 B₁₂ 中间体氢咕啉酸的产量^[30]。进一步,通过解除维生素 B₁₂ 合成途径的代谢瓶颈,将关键合成模块重新排列、整合,降低异源途径对宿主的代谢负担,获得了第二代维生素 B₁₂ 工程菌种,结合发酵工艺优化,进一步提升了大肠杆菌合成维生素 B₁₂ 的产量,达到 530.29 μg/(g DCW)^[31]。鉴于前两代菌种都使用质粒表达外源基因,影响菌种的生物量和维生素 B₁₂ 产量,因此,该团队建立了染色体位点和多基因模块重排策略,通过 CRISPR 介导的基因大片段整合技术,将 28 个异源基因全部整合在染色体上,得到了无质粒、稳定性进一步提升的维生素 B₁₂ 第三代工程菌种。维生素 B₁₂ 产量和生物量较之前菌种提高 2 倍,发酵周期比工业应用菌种缩短约 140 h。以上 B 族维生素工业菌种迭代创制的相关成果获得 2020 年天津市科学技术进步一等奖和 2020 年中国轻工联合会科技进步二等奖。

3 柠檬酸工业菌种的迭代创制技术

柠檬酸是一种三羧酸类化合物,主要用于食品工业,如酸味剂、增溶剂、缓冲剂等。柠檬酸是世界上用生物法生产的产量最大的有机酸,也是我国发酵行业的支柱产品之一,全球产量达 200 万 t,并以每年 5% 的速度递增^[32]。黑曲霉为子囊菌属的丝状真菌,是重要的工业发酵微生物,在有机酸与酶制剂领域具有广泛应用^[33-34],自 1923 年首次被用于柠檬酸生产,是目前柠檬酸生产的主力菌种。黑曲霉作为柠檬酸等有机酸的发酵工业菌种,具有一系列独特优势,例如在极端低 pH 值条件下可保持旺盛的代谢活力,对复杂原料的转化利用能力强,

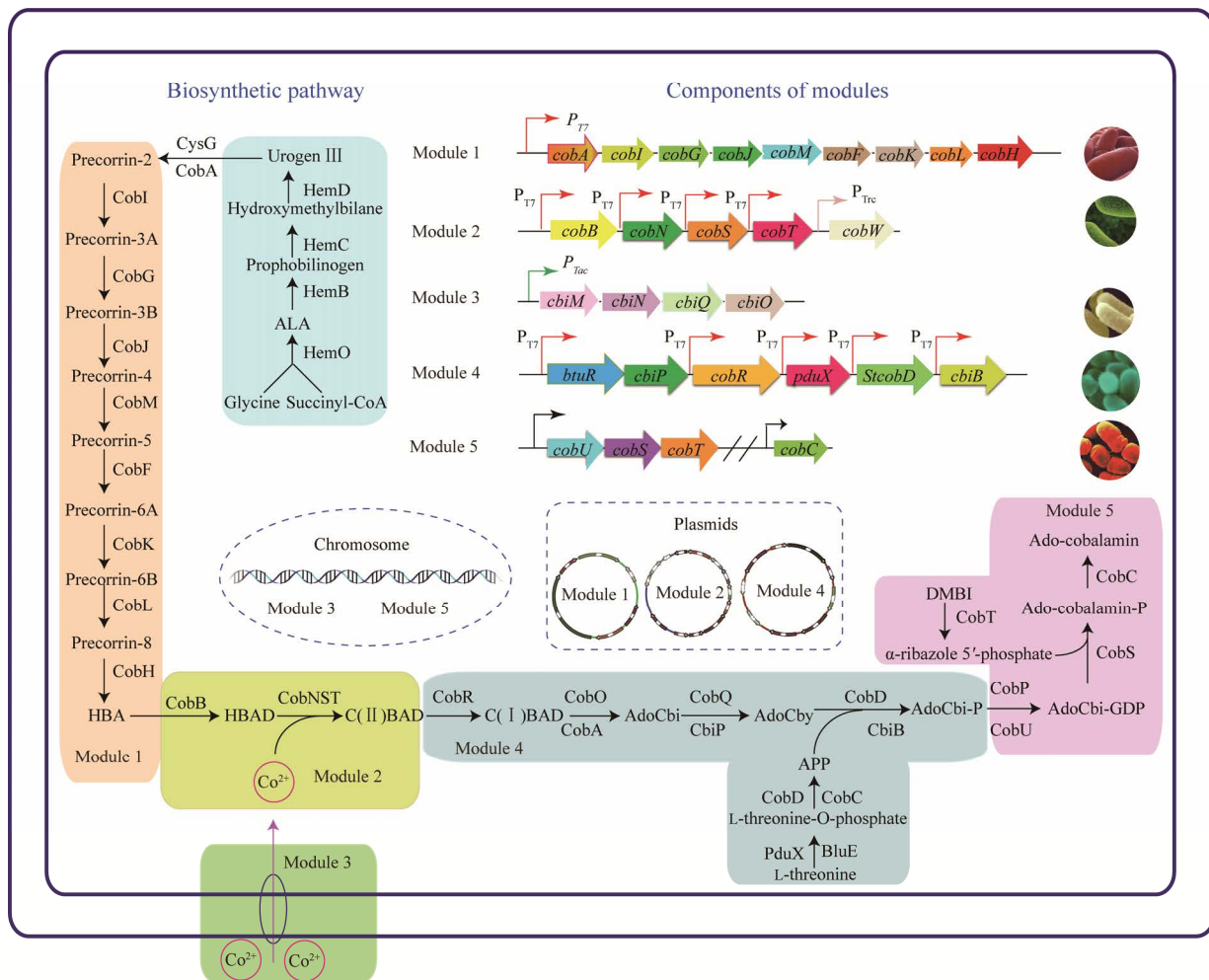


图3 维生素 B₁₂ 合成途径与模块组装^[29]

Figure 3 The biosynthesis pathway and modules of vitamin B₁₂^[29].

具有较强的发酵鲁棒性与高生产强度，能够很好地适应粗放的工业发酵条件。但是，黑曲霉遗传调控复杂，分子操作难度大，传统工业发酵菌种的选育多通过随机诱变筛选获得。近年来，基因编辑技术与系统生物学的快速发展将黑曲霉研究推入后基因组时代，使我们能够从基因组水平上更加全面系统地认识与改造黑曲霉底盘细胞，为柠檬酸等有机酸的工业菌种改造提升提供了新动能（图4）。

3.1 黑曲霉的基因编辑与调控

黑曲霉遗传背景复杂，DNA 同源重组频率

非常低，导致黑曲霉分子操作难度较大。因此，基因组编辑技术是黑曲霉细胞工厂构建与优化的关键技术。黑曲霉传统基因操作往往需要较长的同源臂与大量转化子的筛选，存在操作繁琐，费时费力等问题。基于 CRISPR 的基因组编辑技术，以操作简单、靶向特异、编辑高效、通用性广等优势得到广泛应用^[35]。但由于黑曲霉等丝状真菌中小 RNA 的研究较缺乏，sgRNA 的表达成为建立 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的首要问题。芬兰国家技术研究中心 Kuivanen 等利用 T7 启动子在体外转录合成 sgRNA，然

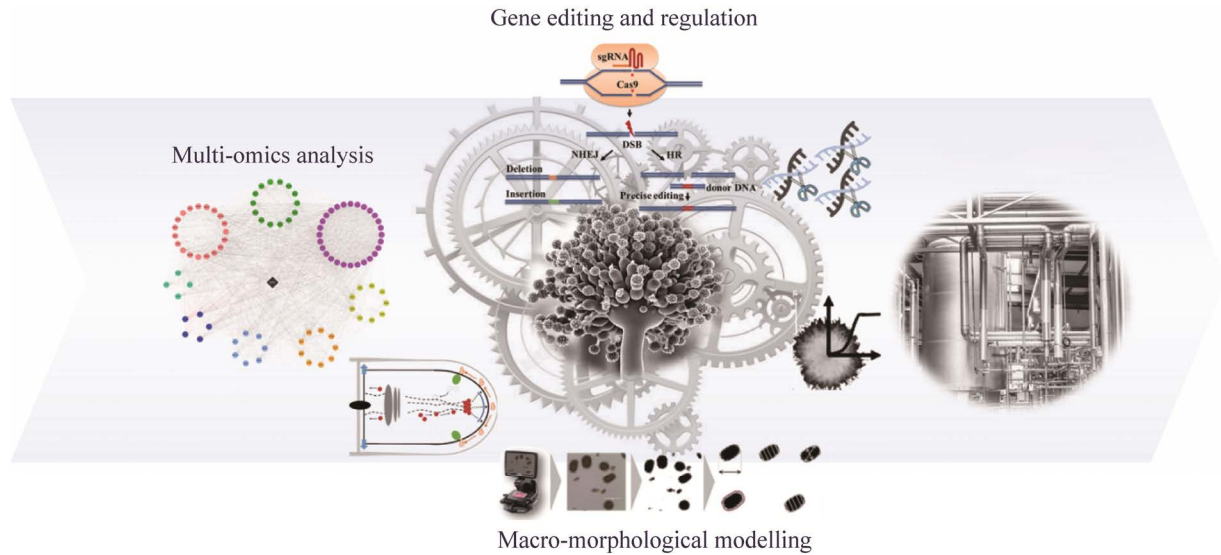


图 4 产柠檬酸黑曲霉工业菌株的系统代谢与形态工程

Figure 4 Systems metabolic and morphological engineering of citric acid producing *Aspergillus niger* cell factory.

后与 Cas9 蛋白形成复合体后,转化至细胞内进行瞬时编辑^[36-37],但编辑效率受 sgRNA 稳定性与转化效率的影响较大^[38]。丹麦技术大学 Nødvig 等以构巢曲霉的 P_{gpdA} 启动子起始 sgRNA 的表达在曲霉中建立了基因组编辑技术,但由于 RNA 聚合酶 II 用于小 RNA 转录时,往往引起通读,而严重影响 sgRNA 的构象^[39],需在 sgRNA 的 5'-端与 3'-端添加自我切割的核酶,分子操作较为繁琐。天津工业生物所 Zheng 等测试发现来源于人类、酵母及黑曲霉内源的 *U6 snRNA* 启动子均可实现黑曲霉中 sgRNA 的表达,但基因失活效率相对较低^[40]。后续 Zheng 等发现内源 5S rRNA 启动子可显著提高 sgRNA 的表达水平,使基因靶向失活效率达 100%。进一步搭建了黑曲霉高效基因组编辑工具包,以 40 bp 的短同源臂供体 DNA 可以简便地实现单位点、多位点的基因敲入以及长至 48 kb 的大片段 DNA 敲除等基因组精准编辑^[41]。

除基因编辑外,基因表达调控也是细胞工

厂构建与优化的重要使能技术。启动子是基因表达调控的重要元件,不同强度的启动子可以用于优化代谢流量。黑曲霉的强启动子元件相对较少,构巢曲霉组成型启动子 P_{gpdA} ^[42]与黑曲霉自身诱导型启动子 P_{glaA} ^[43]较为常用。传统启动子挖掘多以 β -葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase, GUS) 为报告蛋白,奥地利维也纳应用科学大学 Blumhoff 等以 GUS 为报告蛋白评估了 6 个黑曲霉内源启动子,发现在 CBS513.88 与 ATCC 1015 中组成型启动子 P_{mbfA} 表现出较强转录活性^[44],其用于过表达柠檬酸外排蛋白时,柠檬酸产量由出发菌株 ATCC 1015 的 24 g/L 提升至 33 g/L,提升 37%。启动子评估时需考虑菌体量的影响,因此需要以单位菌体的酶活来表征启动子的活性,同时,启动子挖掘评估需要考虑启动子驱动的表达盒在基因组上的整合位点与拷贝数,操作较为复杂繁琐。天津工业生物所 Lu 等利用高效 CRISPR/Cas9 系统建立了荧光蛋白与筛选标记的联合双筛启动子评估系

统,可准确地定量评估启动子的转录强度。通过筛选发现黑曲霉内源甘油醛-3-磷酸脱氢酶 P_{gpdAg} 启动子报告菌株的荧光表达强度最强,为常用的构巢曲霉 P_{gpdAd} 启动子的 2.27 倍。采用该启动子过表达柠檬酸转运蛋白后,柠檬酸产量较出发菌株提高 2.48 倍^[45]。除组成型启动子外,诱导型启动子也是重要的调控元件。基因表达调控首先可通过利用基于 CRISPR/Cas9 系统的高效基因精准编辑将目标基因的天然启动子替换为诱导启动子,从而实现基因表达优化与基因功能定量分析。天津工业生物所 Zhang 等将黑曲霉 *pyrG* 基因的启动子原位替换为 Tet-on 诱导启动子^[46-47],利用不同诱导剂的添加获得 *pyrG* 不同表达水平,并进一步分析其与柠檬酸发酵的定量关系,发现 *pyrG* 的表达水平与柠檬酸发酵水平呈负相关。

3.2 柠檬酸菌种的系统生物学与形态工程

系统生物学通过基因组、转录组、蛋白质组、代谢组与代谢流组等多组学数据,全局分析细胞在 RNA、蛋白与代谢物等不同层面上的变化规律,进而通过数据驱动的基因组规模的模型化来模拟和认识工业细胞工厂。基因组是生命体遗传信息的载体,是认识生命过程的基础。2007 年工业酶生产菌株黑曲霉 CBS513.88 基因组公布后^[48],天津工业生物所 Sun 等通过高质量的基因组注释与比较基因组研究,重构了第一个黑曲霉基因组规模的代谢模型,并发现黑曲霉在糖酵解、三羧酸循环及 NADH 再生等途径中存在丰富的冗余基因,首次从基因组水平上预测了黑曲霉柠檬酸高产机制,这为功能基因组学的深入研究奠定了基础^[49]。随后,转录组、蛋白质组与代谢组检测与分析技术也陆续建立。德国柏林工业大学 Schäpe 等建立了转录组数据的斯皮尔曼相关性分析方法,通过 155 组不同条件下的黑曲霉转录组数据的整合

分析,构建了 9 500 个基因共表达子网络与基因组规模的转录调控网络^[50]。与转录组相比,代谢组数据更能反映细胞代谢的真实状态。但由于大多数代谢物的半衰期较短,因此代谢物样品制备与检测是获得准确代谢组数据的关键^[51-52]。天津工业生物所 Zheng 等建立了基于液质联用的胞内代谢组样品制备检测的标准化流程,并系统解析了柠檬酸工业发酵过程的动态胞内代谢谱,发现丙酮酸、草酰乙酸与苹果酸等前体供给是柠檬酸快速积累的关键^[52]。系统生物学尤其是针对工业发酵过程的多组学分析,为黑曲霉细胞工厂设计与系统代谢工程改造提升工业生产菌株的发酵性能提供了新的研发思路。

除系统生物学与合成生物学外,定量合成生物学也成为新兴的研究方向。定量分析细胞工厂内在的规律是提升细胞工厂的定量设计能力的关键。在定量合成生物学中,如何将复杂的表型进行数字化定量是首要解决的问题。与单细胞微生物不同,黑曲霉是复杂的丝状真菌,具有极性生长的特性,因此在液体深层发酵中会形成复杂的形态,如分散的菌丝体、疏松的菌丝团或相对紧实的菌丝球等不同的菌体形态。不同菌体形态直接影响发酵生产中的流变特性与传质传热,从而决定工业生产的成败。近年来,定量表征黑曲霉形态特征的新工具新方法的出现也在不断推进我们对黑曲霉形态调控的认识,为黑曲霉细胞工厂人工菌体形态的设计控制奠定基础^[53-54]。天津工业生物所与德国柏林工业大学的研究团队联合开发了一种基于 ImageJ 的高通量菌球形态定量分析软件^[55],可实现每人每天 2.5 万个菌球形态检测,获得菌球的面积、直径、纵横比、粗糙度以及菌体形态综合表征参数,将黑曲霉形态从定性描述推进为定量化刻画。借助这一形态定量分析方法,结合基因共表达网络、高效 CRISPR/Cas9

基因组编辑技术与 Tet-on 基因诱导表达系统, 该团队利用形态定量数据与基因定量表达的关联分析, 鉴定出 cAMP 信号转导通路蛋白激酶 PkaC^[56]、ADP 核糖基化因子及其调控蛋白^[57]、内吞作用 γ -衔接蛋白 AplD^[55]与蛋白激酶 PhkA^[58] 等是细胞生长、形态发育、蛋白分泌、有机酸生产的关键调控枢纽蛋白。

黑曲霉生理代谢与分子调控的系统解析与各种使能技术的不断完善, 进一步推进了基于黑曲霉的柠檬酸生产菌株的改造优化。天津工业生物所与中粮生物化学股份有限公司合作研发, 结合高效诱变定向筛选育种策略, 获得了具有自主知识产权的柠檬酸高产新菌株, 产酸水平提高了 11.8%, 糖酸转化率提高 11.63%, 相关研究成果获中国粮油协会科技进步特等奖。

4 燃料乙醇工业菌种的迭代创制技术

燃料乙醇是燃烧清洁的高辛烷值燃料, 也是优良的燃油品改善剂。因燃料乙醇可利用秸

秆、淀粉等可再生资源生产, 因此使用生物燃料乙醇可有效减少石化资源消耗, 降低碳排放。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是重要的工业发酵菌种, 在酿酒、食品及生物燃料生产中有广泛应用。在工业生产过程中, 酿酒酵母经常会面对多种环境因素的胁迫作用, 包括高温、高渗透压和乙醇胁迫等。这些胁迫会诱导基因表达调控, 改变细胞的多种重要生理功能, 从而影响生物发酵过程的效率。因此, 开展适应进化与先进的基因组分析研究, 发展基因组水平编辑进化改造技术, 进行多重胁迫耐受性重编程, 选育高性能生产菌种, 是满足燃料乙醇发酵工业需求的重要策略 (图 5)。

4.1 基于基因组编辑的底盘耐受性工程

自然诱变筛选、基因组重排 (genome shuffling)、适应性进化等传统育种技术在改善微生物胁迫耐受性方面取得重要进展^[59], 但是通过这类技术获得的突变菌株由于许多相关基因突变及表达水平变化难以准确定量, 从而给耐性机理的揭

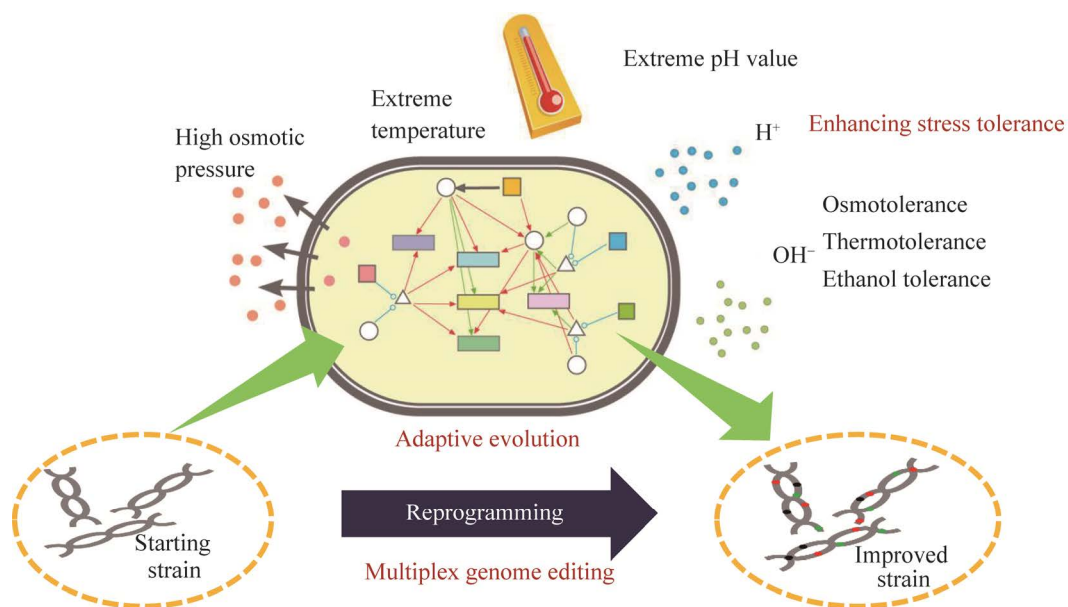


图 5 酿酒酵母面临的不同胁迫及多重胁迫耐受性重编程

Figure 5 Different stresses that *Saccharomyces cerevisiae* encounters and reprogramming of *S. cerevisiae* for improved multiple-stress tolerance.

示带来较大的困难,无法有效地指导下一轮的多重胁迫耐性改造和优化。近来,不断发展的锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 和 CRISPR 等基因组编辑技术取得突破性进展,这些颠覆性技术具有简便高效、模块化、易于扩展、可进行多位点定点修饰等优点,为酿酒酵母育种带来了新的机遇^[60-61]。2010年,明尼苏达大学的 Christian 等首次报道了利用 TALENs 技术实现酵母基因组编辑^[62]。2013年,波士顿大学的 DiCarlo 等首次将 CRISPR/Cas9 系统应用于酿酒酵母中,分别将单链和双链外源片段介导的同源重组效率提高了 5 倍和 130 倍^[63]。在国内外相关研究进展的基础上,天津工业生物所团队先后发展了适应性进化和基因组编辑辅助胁迫抗性重编程技术体系,建立了应对复杂表型的高效育种手段,可以进行酿酒酵母从非理性、半理性到理性的改造,实现全基因组水平的随机突变,靶向特定启动子及调控区的随机突变,以及靶向特定调控基因的基因组原位突变,使得酿酒酵母耐温、耐醇、耐渗等胁迫耐性得到提升,从而加速了酵母遗传与表型性状的进化改造,为进一步的高性能菌种选育、鲁棒性提

升奠定了基础 (图 6)。

4.1.1 TALENs 介导基因组多位点编辑提高酵母胁迫耐性

酿酒酵母的胁迫耐性往往需要不同基因的协同作用,包括多层次的转录与调控网络。其中,转录调控元件可以通过整合不同信号,调节相关基因的协同表达,形成转录组合调控,应对复杂的外界环境。因此,构建大规模、可协同、多位点的转录元件调控平台,有利于形成表型的多样性,对于实现菌种高效选育与改造具有重要意义。天津工业生物所的 Zhang 等基于 TALENs 编辑技术,开发了 TALENs 介导的多位点基因组编辑 (TALENs-assisted multiplex editing, TAME) 技术^[64]。该技术主要基于 TALENs 特异性识别修饰真核启动子区保守序列 TATA 框与 GC 框之间的关键区域,引起不同基因的差异表达,形成多性状突变菌库。将 TAME 技术应用于酿酒酵母改造中,实现了快速多位点编辑与进化,有效提高了工业酿酒酵母的胁迫耐性,筛选获得耐高渗菌株、耐高温菌株,乙醇生产能力提高了 1.3 倍^[65]。基因组学分析发现,突变菌株通过相关基因突变从而形成了更加抗逆的细胞膜和细胞壁结构,使细胞获得更加强健的抗胁迫性能。TAME 技术可

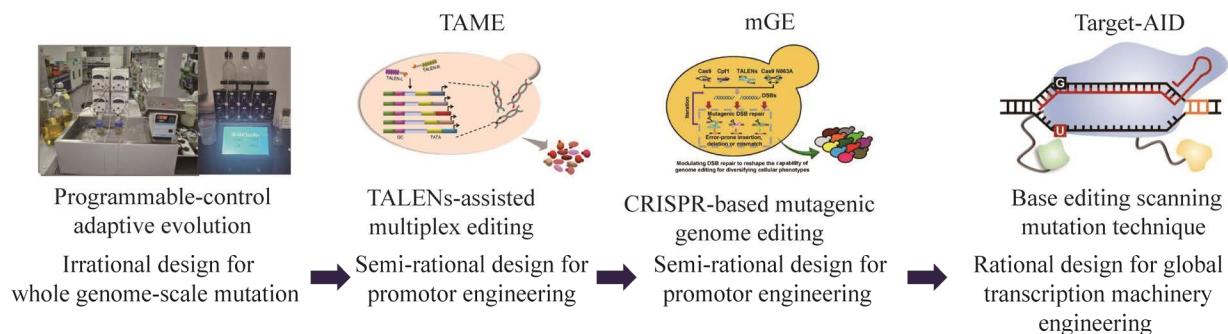


图 6 酿酒酵母适应性进化和基因组编辑辅助胁迫抗性育种

Figure 6 Adaptive evolution and genome editing for improving the stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*.

以作为通用性的平台技术为酵母基因组工程改造提供新的策略和手段^[66-67]。

4.1.2 mGE 介导基因组编辑提高酵母胁迫耐性

基因组编辑技术的发展为加快酿酒酵母菌种选育和优化改造提供强有力的使能技术。由于受限于酿酒酵母非同源性末端接合 (non-homologous end joining, NHEJ) 修复引入突变能力较差, 在酿酒酵母中难以利用基因编辑技术进行 NHEJ 介导的基因组多样性突变和可遗传转录调控。最近, 天津工业生物所的 Wang 等基于 CRISPR 编辑技术, 通过改造酿酒酵母内源的 DNA 双链断裂修复途径, 建立了不依赖模板的 CRISPR 高效致突变基因组 (mutagenic genome editing, mGE) 技术, 并实现靶向基因的可遗传多样性调控表达^[68]。通过评价和比较 DNA 修复途径中 9 个关键基因的敲除、过表达或氨基酸突变等 16 个改造对 4 种常用编辑工具 (CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1、TALENs、CRISPR/Cas9-N863A) 在没有外源 DNA 模板的情况下引入随机突变能力的影响, 发现调节 DNA 修复蛋白, 特别是 Mre11、Sae2 和 Exo1 等 DSB 末端切除蛋白可以显著增强不同基因组编辑工具引入突变的效率和多样性。将此技术应用于酿酒酵母菌株改造, 利用 MRE11-H125N (MRE11 核酸酶活性失活的等位基因) 和 CRISPR/Cpf1 组合形成基因组多样性编辑策略, 并通过调节水甘油通道蛋白基因 *FPS1* 和甘油-3-磷酸脱氢酶基因 *GPD1* 的表达使甘油生成能力不同程度下降, 并使乙醇产量最高提高 10%。研究成果将扩大基因组编辑在基因表达多样化和增强基因组进化中的应用。

4.1.3 碱基编辑转录因子全局扰动

基于 CRISPR/Cas 等的基因组编辑技术为拓展酿酒酵母遗传改造和性能提升提供了前所未有的有力工具, 可以进行基因敲除或整合以

及转录激活或失活。然而, 这些工具大多用于产生插入和删除而不是核苷酸替换, 并且通常需要外部供体 DNA。在高等生物中建立的胞嘧啶/腺嘌呤碱基编辑器, 可以在基因组上引入原位基因突变, 为蛋白质工程和细胞性能改造提供了新的定向进化策略^[69]。天津工业生物所的 Liu 等在酿酒酵母中采用 Target-AID 胞嘧啶碱基编辑器, 靶向全局转录调控基因 *SPT15* 进行原位扫描核苷酸突变, 从而在细胞中引入蛋白质点突变, 共获得 36 个胁迫耐受性存在差异的 Spt15 点突变菌株^[70]。其中, 有 18 个突变株可以同时耐受高渗、高温和乙醇胁迫, 其发酵能力提高了 1.5 倍以上, 这些胁迫耐受的点突变主要位于 Spt15 蛋白的 N 端和马鞍形三级结构的凸面。对胁迫耐受性最高的 3 个点突变 (A140G、P169A 和 R238K) 和胁迫最敏感的 2 个点突变 (S118L 和 L214V) 进行比较转录组分析, 揭示了这些点突变菌株在应对胁迫时所共同的和特有的全局转录重编程以及转录调控中心。根据蛋白质结构比对分析, 这 5 种氨基酸的变化对 RNA 聚合酶 II 转录机器中 Spt15 与 DNA 以及其他蛋白质的相互作用产生了不同的影响。这些结果表明, Target-AID 碱基编辑器为酿酒酵母靶向原位扫描突变提供了强有力的工具, 同时为酵母胁迫耐受性改进提供了更多潜在靶点。

4.2 基于多组学的抗胁迫机理解析及底盘改造

酿酒酵母作为一种重要的工业微生物和模式生物, 研究人员对其开展了大量的组学研究, 以便加速性状优良菌株的选育和阐明其遗传背景。天津工业生物所研究团队针对选育到的一系列胁迫抗性菌株, 以及自然和工业上用的菌株, 进行了胁迫抗性和发酵性能的组学分析, 挖掘与复杂性状关联的有益突变, 解析胁迫抗

性机理及调控机制。陆续解析了突变菌与野生菌的两两比较、系列菌株的多重比较,以及群体基因组比较,挖掘了一些有益突变和机理(图7)。通过对一株高温适应性进化工业菌株和出发菌株进行长时间高温压力条件下的全细胞蛋白质组定量分析,并与经典的热激应答相关蛋白质组学研究结果进行比较,揭示了该进化菌株在长期高温胁迫下的蛋白质组响应与实验室菌株受到短暂热激引起的蛋白质组响应虽然有相似之处,但也存在明显的不同^[71-73]。通过对可能调控蛋白组全局扰动的上游转录因子进行研究,挖掘并阐明了分子伴侣 Mdj1 和代谢酶 Adh1 在工业菌株的耐热生长和乙醇合成中所起的作用,并通过对关键转录因子敲除菌株的转录组分析,进一步揭示了与工业酵母长时间耐热性相关的转录水平的层级调控网络^[74]。从124株酿酒酵母菌株中筛选到一株耐热的工业菌株和一株温敏的自然界菌株作为亲本,经杂交和孢子分离并评价表型后得到优势、劣势和随机3个孢子池,进行孢子池全基因组测序和数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)定位分析,高效挖掘了与工业酵母高温发酵性能相关的遗传变异,揭示了海藻糖积累和膜流动性降低有利于工业酵母的高温发酵性能分子基础,为改造和选育适用于高温浓醪发酵的工业酵母菌种提供了理论依据^[75]。对122株酿

酒酵母菌株进行了17个胁迫条件下的表型检测和基因组重测序,通过全基因组关联分析,揭示了与酿酒酵母胁迫抗性相关联的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),这些相关基因分布在信号转导、转录调控、功能基因等层面。这些工业菌株耐热性、工业菌株长时间胁迫响应机制等工业复杂性状基因型与表型研究引起了国内外同行专家的关注,为进一步的机理解析和高性能菌种选育奠定重要基础^[76-78]。

在上述研究基础上,天津工业生物所团队经过十年的努力,通过利用模拟工业发酵条件,使用搭建的快速半自动传代驯化系统(图6),结合新型基因组编辑与适应性进化技术的开发,培育出了具有耐高温、高浓醪、高乙醇积累和工业水抑制物等多重胁迫抗性的新一代工业酵母菌株,有效解决了高温浓醪发酵生产乙醇时酵母细胞耐性不足的缺陷,使得发酵后期的菌株细胞存活率限制提升,并且提高了出酒率和原料转化利用效率。与市场同类产品相比,同等条件下出酒率提高0.3-0.5个百分点,并且可实现玉米乙醇浓醪高温发酵,产醇水平达20%(V/V),利用该菌种技术生产了高活性干酵母,在内蒙古百业成(16万t)、大庆博润生物(7万t)等公司乙醇发酵生产线进行了工业测试,为进一步产业推广应用奠定了重要基础。

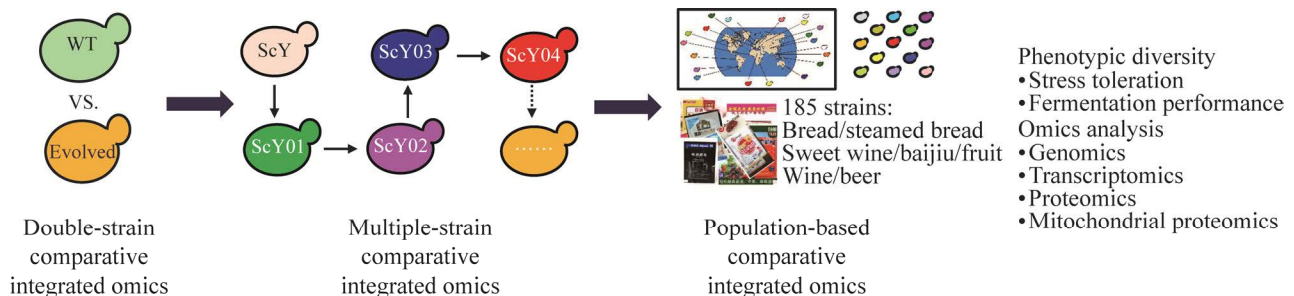


图7 酿酒酵母全基因组水平的组学解析

Figure 7 Genome-wide omics analyses of *Saccharomyces cerevisiae*.

5 总结与展望

系统与合成生物技术的发展极大地提升了研究者对工业发酵菌种生理代谢机制的理解以及代谢调控网络的重塑能力,加快了氨基酸、维生素、有机酸、生物燃料在内的多种工业发酵菌种的改造提升,为生物发酵产业向生产效率更高、生产过程碳足迹更低的方向发展提供了菌种支撑。但是,目前的菌种设计创制技术方法仍存在一些局限,需要进一步提升。例如,目前对合成途径或改造靶点的设计主要基于研究者的经验,仍缺乏可高精度模拟菌种生理代谢过程的数字细胞模型,为菌种创制提供精准的设计蓝图。此外,虽然常用的工业微生物底盘都已经具有基因组编辑技术,但是通常一次只能编辑一个靶点,主要依赖人力,大部分技术未实现自动化和高通量化,对于需要改造大量靶点的菌种创制研究,菌种迭代编辑周期仍然较长。因此,菌种设计创制研究的通量与效率上仍有大量的提升空间,当下的研究范式亟需变革。

近年来,自动化、人工智能等学科正与生命科学交叉融合,“BT+IT”的融合模式将对工业菌种设计创制的研究范式产生深刻影响。一些生物发酵产业传统巨头和合成生物学新兴企业,例如希杰生物、Ginkgo Bioworks、Zymergen、恩和生物等,都大力布局自动化——数字化的菌种开发技术体系。可以预见,自动化基因编辑和检测技术将大幅提升菌种创制和评价的通量,天津工业生物所的 Biofoundry 平台已经可以实现大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌等常用工业底盘 3 000 个/月通量的菌种构建,并结合高通量质谱设备实现 1 s 1 个样品的定量检测。这将产生包含多种组学数据的工业菌种生物大数据,人工智能算法有望将这些生物大数据整理利

用,帮助指导下一轮的菌种设计改造,从而进一步加快工业发酵菌种迭代升级的速度,获得综合性能提升的新一代工业菌种,推动生物发酵产业的高质量发展。

REFERENCES

- [1] Ikeda M, Nakagawa S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62: 99-109.
- [2] Zhao NN, Qian L, Luo GJ, et al. Synthetic biology approaches to access renewable carbon source utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(22): 9517-9529.
- [3] Becker J, Rohles CM, Wittmann C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. *Metab Eng*, 2018, 50: 122-141.
- [4] Ruan YL, Zhu LJ, Li Q. Improving the electrotransformation efficiency of *Corynebacterium glutamicum* by weakening its cell wall and increasing the cytoplasmic membrane fluidity. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(12): 2445-2452.
- [5] Liu J, Wang Y, Lu YJ, et al. Mutations in peptidoglycan synthesis gene *ponA* improve electrotransformation efficiency of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(24): e02225-18.
- [6] Jiang Y, Qian FH, Yang JJ, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun*, 2017, 8: 15179.
- [7] Zhang J, Qian FH, Dong F, et al. *De novo* engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-proline production. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(7): 1897-1906.
- [8] Krumbach K, Sonntag CK, Eggeling L, et al. CRISPR/Cas12a mediated genome editing to introduce amino acid substitutions into the mechanosensitive channel MscCG of *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(12): 2726-2734.
- [9] Liu J, Wang Y, Lu YJ, et al. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 205.
- [10] Liu J, Liu MS, Shi T, et al. CRISPR-assisted rational flux-tuning and arrayed CRISPRi screening of an L-proline exporter for L-proline hyperproduction. *Nat*

- Commun, 2022, 13: 891.
- [11] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metab Eng*, 2018, 47: 200-210.
- [12] Wang Y, Liu Y, Li JW, et al. Expanding targeting scope, editing window, and base transition capability of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(11): 3016-3029.
- [13] Deng C, Lv XQ, Li JH, et al. Development of a DNA double-strand break-free base editing tool in *Corynebacterium glutamicum* for genome editing and metabolic engineering. *Metab Eng Commun*, 2020, 11: e00135.
- [14] Wang Y, Cheng HJ, Liu Y, et al. *In-situ* generation of large numbers of genetic combinations for metabolic reprogramming via CRISPR-guided base editing. *Nat Commun*, 2021, 12: 678.
- [15] Mustafi N, Grünberger A, Kohlheyer D, et al. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids. *Metab Eng*, 2012, 14(4): 449-457.
- [16] Mustafi N, Grünberger A, Mahr R, et al. Application of a genetically encoded biosensor for live cell imaging of L-valine production in pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85731.
- [17] [Binder S, Schendzielorz G, Stähler N, et al. A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. *Genome Biol*, 2012, 13(5): R40.
- [18] Schendzielorz G, Dippong 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. *ACS Synth Biol*, 2014, 3(1): 21-29.
- [19] Maike K, Christina M, Meike B, et al. Pyruvate carboxylase variants enabling improved lysine production from glucose identified by biosensor-based high-throughput fluorescence-activated cell sorting screening. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(2): 274-281.
- [20] Zheng B, Ma XY, Wang N, et al. Utilization of rare codon-rich markers for screening amino acid overproducers. *Nat Commun*, 2018, 9: 3616.
- [21] Sun X, Li QG, Wang Y, et al. Isoleucyl-tRNA synthetase mutant based whole-cell biosensor for high-throughput selection of isoleucine overproducers. *Biosens Bioelectron*, 2021, 172: 112783.
- [22] Chen JZ, Wang Y, Zheng P, et al. Engineering synthetic auxotrophs for growth-coupled directed protein evolution. *Trends Biotechnol*, 2022, 40(7): 773-776.
- [23] Dele-Osibanjo T, Li QJ, Zhang XL, et al. Growth-coupled evolution of phosphoketolase to improve L-glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(20): 8413-8425.
- [24] Fu G, Yue J, Li DD, et al. An operator-based expression toolkit for *Bacillus subtilis* enables fine-tuning of gene expression and biosynthetic pathway regulation. *PNAS*, 2022, 119(11): e2119980119.
- [25] Yu WW, Jin K, Wu YK, et al. A pathway independent multi-modular ordered control system based on thermosensors and CRISPRi improves bioproduction in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(11): 6587-6600.
- [26] Xu KD, Tong Y, Li Y, et al. Efficient, flexible autoinduction expression systems with broad initiation in *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(11): 3084-3093.
- [27] Ye J, Li YJ, Bai YQ, et al. A facile and robust T7-promoter-based high-expression of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Bioresour Bioprocess*, 2022, 9(1): 1-12.
- [28] 丁明珠, 李炳志, 王颖, 等. 合成生物学重要研究方向进展. *合成生物学*, 2020, 1(1): 7-28.
Ding MZ, Li BZ, Wang Y, et al. Significant research progress in synthetic biology. *Synth Biol J*, 2020, 1(1): 7-28 (in Chinese).
- [29] Fang H, Li D, Kang J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* biosynthesis of vitamin B₁₂. *Nat Commun*, 2018, 9: 4917.
- [30] Jiang PT, Fang H, Zhao J, et al. Optimization of hydrogenobyrinic acid biosynthesis in *Escherichia coli* using multi-level metabolic engineering strategies. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 118.
- [31] Li D, Fang H, Gai YM, et al. Metabolic engineering and optimization of the fermentation medium for vitamin B₁₂ production in *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2020, 43(10): 1735-1745.
- [32] Tong ZY, Zheng XM, Tong Y, et al. Systems metabolic engineering for citric acid production by *Aspergillus niger* in the post-genomic era. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 28.
- [33] Meyer V, Fiedler M, Nitsche B, et al. The cell factory *Aspergillus* enters the big data era: opportunities and challenges for optimising product formation. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2015, 149: 91-132.

- [34] 郭艳梅, 郑平, 孙际宾. 黑曲霉作为细胞工厂: 知识准备与技术基础. 生物工程学报, 2010, 26(10): 1410-1418.
Guo YM, Zheng P, Sun JB. *Aspergillus niger* as a potential cellular factory: prior knowledge and key technology. Chin J Biotech, 2010, 26(10): 1410-1418 (in Chinese).
- [35] 郑小梅, 郑平, 孙际宾. 基于 CRISPR/Cas 系统的黑曲霉基因组编辑技术. 生物工程学报, 2021, 37(3): 980-990.
Zheng XM, Zheng P, Sun JB. CRISPR/Cas-based genome editing in *Aspergillus niger*. Chin J Biotech, 2021, 37(3): 980-990 (in Chinese).
- [36] Kuivainen J, Arvas M, Richard P. Clustered genes encoding 2-keto-L-gulonate reductase and L-idonate 5-dehydrogenase in the novel fungal D-glucuronic acid pathway. Front Microbiol, 2017, 8: 225.
- [37] Kuivainen J, Wang YMJ, Richard P. Engineering *Aspergillus niger* for galactaric acid production: elimination of galactaric acid catabolism by using RNA sequencing and CRISPR/Cas9. Microb Cell Fact, 2016, 15(1): 1-9.
- [38] Pohl C, Kiel JAKW, Driessen AJM, et al. CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*. ACS Synth Biol, 2016, 5(7): 754-764.
- [39] Nødvig CS, Nielsen JB, Kogle ME, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. PLoS One, 2015, 10(7): e0133085.
- [40] Zheng XM, Zheng P, Sun JB, et al. Heterologous and endogenous *U6* snRNA promoters enable CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Aspergillus niger*. Fungal Biol Biotechnol, 2018, 5: 2.
- [41] Zheng XM, Zheng P, Zhang K, et al. 5S rRNA promoter for guide RNA expression enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger*. ACS Synth Biol, 2019, 8(7): 1568-1574.
- [42] Punt PJ, Dingemans MA, Kuyvenhoven A, et al. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Gene, 1990, 93(1): 101-109.
- [43] Ganzlin M, Rinas U. In-depth analysis of the *Aspergillus niger* glucoamylase (*glaA*) promoter performance using high-throughput screening and controlled bioreactor cultivation techniques. J Biotechnol, 2008, 135(3): 266-271.
- [44] Blumhoff M, Steiger MG, Marx H, et al. Six novel constitutive promoters for metabolic engineering of *Aspergillus niger*. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(1): 259-267.
- [45] Lu YD, Zheng XM, Wang Y, et al. Evaluation of *Aspergillus niger* six constitutive strong promoters by fluorescent-auxotrophic selection coupled with flow cytometry: a case for citric acid production. J Fungi, 2022, 8(6): 568.
- [46] Zhang LH, Zheng XM, Cairns TC, et al. Disruption or reduced expression of the orotidine-5'-decarboxylase gene *pyrG* increases citric acid production: a new discovery during recyclable genome editing in *Aspergillus niger*. Microb Cell Fact, 2020, 19(1): 76.
- [47] Meyer V, Wanka F, Van Gent J, et al. Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(9): 2975-2983.
- [48] Pel HJ, De Winde JH, Archer DB, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. Nat Biotechnol, 2007, 25: 221-231.
- [49] Sun JB, Lu X, Rinas U, et al. Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. Genome Biol, 2007, 8(9): R182.
- [50] Schäpe P, Kwon MJ, Baumann B, et al. Updating genome annotation for the microbial cell factory *Aspergillus niger* using gene co-expression networks. Nucleic Acids Res, 2019, 47(2): 559-569.
- [51] Zhang QQ, Zheng XM, Wang Y, et al. Comprehensive optimization of the metabolomic methodology for metabolite profiling of *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(16): 7113-7121.
- [52] Zheng XM, Yu JD, Cairns TC, et al. Comprehensive improvement of sample preparation methodologies facilitates dynamic metabolomics of *Aspergillus niger*. Biotechnol J, 2019, 14(3): 1800315.
- [53] Cairns TC, Zheng XM, Zheng P, et al. Moulding the mould: understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 77.
- [54] Cairns TC, Zheng XM, Zheng P, et al. Turning inside out: filamentous fungal secretion and its applications in biotechnology, agriculture, and the clinic. J Fungi (Basel), 2021, 7(7): 535.
- [55] Cairns TC, Feurstein C, Zheng XM, et al. A quantitative image analysis pipeline for the characterization of filamentous fungal morphologies as a tool to uncover targets for morphology engineering: a

- case study using *aplD* in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 149.
- [56] Zheng XM, Cairns TC, Ni XM, et al. Comprehensively dissecting the hub regulation of PkaC on high-productivity and pellet macromorphology in citric acid producing *Aspergillus niger*. *Microb Biotechnol*, 2022, 15(6): 1867-1882.
- [57] Cairns TC, Feurstein C, Zheng XM, et al. Functional exploration of co-expression networks identifies a nexus for modulating protein and citric acid titres in *Aspergillus niger* submerged culture. *Fungal Biol Biotechnol*, 2019, 6: 18.
- [58] Cairns TC, Zheng XM, Feurstein C, et al. A library of *Aspergillus niger* chassis strains for morphology engineering connects strain fitness and filamentous growth with submerged macromorphology. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 9: 820088.
- [59] 齐显尼, 甘雨满, 王钦宏. 耐高温酿酒酵母的选育及其在乙醇发酵生产中的应用. *生物产业技术*, 2018(4): 84-89.
- Qi XN, Gan YM, Wang QH. Development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* and its application in ethanol fermentation at high temperature. *Biotechnol Bus*, 2018(4): 84-89 (in Chinese).
- [60] Yao Z, Wang QH, Dai ZJ. Recent advances in directed yeast genome evolution. *J Fungi (Basel)*, 2022, 8(6): 635.
- [61] Fraczek MG, Naseeb S, Delneri D. History of genome editing in yeast. *Yeast*, 2018, 35(5): 361-368.
- [62] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757-761.
- [63] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): 4336-4343.
- [64] Zhang GQ, Lin YP, Qi XN, et al. TALENs-assisted multiplex editing for accelerated genome evolution to improve yeast phenotypes. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(10): 1101-1111.
- [65] Gan YM, Lin YP, Guo YF, et al. Metabolic and genomic characterisation of stress-tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains from TALENs-assisted multiplex editing. *FEMS Yeast Res*, 2018, 18(5): foy045.
- [66] Vervoort Y, Linares AG, Roncoroni M, et al. High-throughput system-wide engineering and screening for microbial biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 46: 120-125.
- [67] Yang ZL, Blenner M. Genome editing systems across yeast species. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 66: 255-266.
- [68] Wang Z, Lin YP, Dai ZJ, et al. Modulating DNA repair pathways to diversify genomic alterations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(2): e0232621.
- [69] Tan J, Forner J, Karcher D, et al. DNA base editing in nuclear and organellar genomes. *Trends Genet*, 2022: S0168-9525(22)00176-7.
- [70] Liu YF, Lin YP, Guo YF, et al. Stress tolerance enhancement via SPT15 base editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 2021, 14(1): 155.
- [71] Shui WQ, Xiong Y, Xiao WD, et al. Understanding the mechanism of thermotolerance distinct from heat shock response through proteomic analysis of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(7): 1885-1897.
- [72] Xiao WD, Duan XX, Lin YP, et al. Distinct proteome remodeling of industrial *Saccharomyces cerevisiae* in response to prolonged thermal stress or transient heat shock. *J Proteome Res*, 2018, 17(5): 1812-1825.
- [73] Xiong Y, Guo YF, Xiao WD, et al. An NGS-independent strategy for proteome-wide identification of single amino acid polymorphisms by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2016, 88(5): 2784-2791.
- [74] Gan YM, Qi XN, Lin YP, et al. A hierarchical transcriptional regulatory network required for long-term thermal stress tolerance in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 9: 826238.
- [75] Wang Z, Qi Q, Lin YP, et al. QTL analysis reveals genomic variants linked to high-temperature fermentation performance in the industrial yeast. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 59.
- [76] Dzialo MC, Park R, Steensels J, et al. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41(Supp_1): S95-S128.
- [77] Liu GD, Chen Y, Færgeman NJ, et al. Elimination of the last reactions in ergosterol biosynthesis alters the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple stresses. *FEMS Yeast Res*, 2017, 17(6): fox063.
- [78] Becker J, Wittmann C. From systems biology to metabolically engineered cells—an omics perspective on the development of industrial microbes. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 45: 180-188.

(本文责编 陈宏宇)