

• 材料单体生物合成 •

刘立明 江南大学教授、博士生导师，教育部长江学者计划特聘教授。主要从事微生物发酵工程的研究与教学工作。主要研究领域为合成生物学和蛋白质工程。作为负责人先后负责国家重点研发计划、国家自然科学基金(重点、优青、面上)项目、江苏省前沿科技引领等国家或省部级项目 20 余项。在 *Nature Catalysis*、*Nature Communications*、*Chemical Reviews*、*Metabolic Engineering*、*Green Chemistry*、《微生物学报》《生物工程学报》等国内外主流学术期刊上发表学术论文 260 余篇,其中 SCI 论文 190 余篇(最高 IF=70),授权发明专利 70 余项,出版科技著作 4 部。主要研究成果包括国家技术发明二等奖(第三)、教育部科技进步一等奖(第一)、江苏省自然科学一等奖(第三)、中国石油与化学工业技术发明一等奖(第二)等。



代谢工程改造大肠杆菌生产尸胺

刘存萍¹, 高聪¹, 李晓敏¹, 陈修来¹, 吴静², 宋伟², 魏婉清¹, 刘立明^{1*}

1 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

刘存萍, 高聪, 李晓敏, 陈修来, 吴静, 宋伟, 魏婉清, 刘立明. 代谢工程改造大肠杆菌生产尸胺[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2403-2417.

LIU Cunping, GAO Cong, LI Xiaomin, CHEN Xiulai, WU Jing, SONG Wei, WEI Wanqing, LIU Liming. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2403-2417.

摘 要: 尸胺是聚酰胺生产中的关键 C5 单体。由于细胞内 5'-磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate, PLP)再生效率有限, 导致目前发酵法生产尸胺效率较低。本研究选择一株实验室保藏的赖氨酸高产大肠杆菌 LY-4 为研究对象, 首先通过引入尸胺合成关键酶-赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, LDC), 成功构建了菌株 L01, 摇瓶发酵尸胺产量达 1.07 g/L; 随后开发了一种双代谢通路强化策略, 协同增强内源和异源 PLP 合成模块, 从而改善胞内 PLP 的合成, 最优菌株 L11 摇瓶生产尸胺产量提升至 9.23 g/L; 最后在 5 L 发酵罐中对菌株 L11 生产尸胺的发酵工艺进行优化。工程菌株经 48 h 分批补料发酵, 尸胺产量、得率、生产强度分别为 54.43 g/L、0.22 g/g 和 1.13 g/(L·h), 具备一定的应用潜力。本研究可为构建包括尸胺在内的多种生物胺类细胞工厂提供理论依据和技术基础。

关键词: 大肠杆菌; 代谢工程; 尸胺; 5'-磷酸吡哆醛; 发酵优化

资助项目: 江苏省农业科技自主创新资金[CX(23)2005, CX(22)1012]

This work was supported by the Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX(23)2005, CX(22)1012).

*Corresponding author. E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-02-26; Accepted: 2024-03-27; Published online: 2024-05-29

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine

LIU Cunping¹, GAO Cong¹, LI Xiaomin¹, CHEN Xiulai¹, WU Jing², SONG Wei², WEI Wanqing¹, LIU Liming^{1*}

¹ School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Cadaverine is a fundamental C5 building block in the production of polyamides. Due to the limited regeneration efficiency of intracellular pyridoxal 5'-phosphate (PLP), the current fermentation-based production of cadaverine exhibits low efficiency. In this study, we developed an *Escherichia coli* strain L01 by introducing lysine decarboxylase (lysine decarboxylase, LDC, a key enzyme in the synthesis of cadaverine) into a lysine-producing strain *E. coli* LY-4, achieving a cadaverine titer of 1.07 g/L in shake flask fermentation. Subsequently, a dual metabolic pathway enhancement strategy was proposed to synergistically strengthen both endogenous and exogenous PLP synthesis modules, thereby improving intracellular PLP synthesis. The optimized strain L11 achieved a cadaverine titer of 9.23 g/L in shake flask fermentation. Finally, the fermentation process for cadaverine production by strain L11 was optimized in a 5 L fermenter. After 48 h of fed-batch fermentation, the engineered strain L11 achieved the cadaverine titer, yield, and productivity of 54.43 g/L, 0.22 g/g, and 1.13 g/(L·h), respectively. This study provides a theoretical and technical foundation for establishing microbial cell factories for bioamine production.

Keywords: *Escherichia coli*; metabolic engineering; cadaverine; pyridoxal 5'-phosphate; fermentation optimization

尸胺, 也被称为 1,5-戊二胺, 是一种普遍存在于原核生物和真核生物中的生物胺^[1]。它可用于开发多种高附加值产品, 并在农业、医学和工业等领域有着广泛的应用^[2]。在农业领域中, 尸胺参与植物的生长调节、信号传递、抗逆反应和昆虫防御机制^[3]。医学领域中, 尸胺被用来合成具有生物活性的药物成分^[4], 具有治疗诸如乳腺癌^[5]和痢疾^[6]等疾病的潜力。在工业领域, 尸胺作为合成高分子材料如聚酰胺和聚氨酯的基本单元, 尤其在合成新型尼龙 5X 等高性能聚合物方面发挥着重要作用^[7]。

利用微生物生产尸胺提供了一种环保且可持续的传统石化工艺替代方法。目前, 尸胺的

生物合成主要通过生物转化和发酵两种方法实现。在生物转化法中, 研究者们通常将 L-赖氨酸作为底物, 赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, LDC) (诱导型 CadA 或组成型 LdcC) 作为生物催化剂, 通过单步酶促反应直接合成尸胺^[8]。例如, 研究人员通过理性工程改造开发了一种 pH 稳定的 *EcCadA*^{V12C/D41C} 突变体, 所构建的 M3 菌株实现了 418 g/L 的尸胺生产^[9], 这是迄今为止报道的生物转化的最高产量。然而, 这种方法面临的主要挑战包括生物催化剂稳定性不佳以及催化活性不足^[10]。在微生物发酵法中, 研究者们通常采用系统代谢工程策略对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium*

glutamicum)进行改造, 以实现利用低成本的碳源例如葡萄糖、甘油和纤维素合成尸胺, 这些策略包括: 关键酶 LDC 的过表达以及性能的优化^[11]、强化前体供应^[12]、阻断产物降解^[13]、转运体工程^[9]和细胞毒性耐受工程^[11]等。基于以上策略改造的大肠杆菌 *E. coli* NT1005/CadA-lysA-dapA-cadB 通过分批补料发酵可以产生 58.7 g/L 的尸胺, 得率为 0.396 g/g, 是迄今为止 *E. coli* 中报道的最高水平^[11]。此外, *C. glutamicum* 在工业上已广泛应用于氨基酸生产, 特别是作为 L-赖氨酸的高效生产菌株, 而 L-赖氨酸正是尸胺的直接前体。基于此, 该菌株也被视为尸胺生产的理想宿主^[8]。例如, 通过将蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*)的 LDC 基因整合到高产 L-赖氨酸 PKC 菌株的 *lysE* 位点, 构建了重组菌株 GH30HaLDC, 并且该菌株在分批补料发酵条件下实现了高达 125.0 g/L 的尸胺产量, 彰显了其在生物工程领域的巨大应用价值^[14]。尽管如此, 生物转化法需要外源添加辅酶 5'-磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate, PLP), 而发酵法则通常需要使用价格较高的复杂培养基, 这两个因素都限制了尸胺的工业化生产。

PLP, 作为维生素 B6 (vitamin B6, VB6)的活性形式, 在关键代谢途径如氨基酸代谢、生物胺合成以及糖酵解中至关重要^[15]。近期研究揭示了 PLP 的胞内浓度直接影响尸胺的生产效率^[16]。微生物中合成 PLP 的路径包括: 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(deoxyxylulose-5-phosphate, DXP)依赖途径、DXP 非依赖途径以及挽救途径。其中, DXP 非依赖途径, 始于赤藓糖-4-磷酸, 主要存在于 VB6 自养生物中, 是自然界主导的 PLP 合成途径。DXP 依赖途径仅存在于少数细菌如 *E. coli* 中。挽救途径普遍存在于 VB6 自养生物中, 能够实现 VB6 不同形态间的相互转换。为了提高 PLP 依赖性酶的催化效率, 研究者们已经开发

出数种方法提升细胞内 PLP 的水平, 例如在外源提供吡哆醛(pyridoxal, PL)和再生腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的条件下, 在 *E. coli* 中过表达挽救途径酶 PdxY 合成 PLP, 使得工程菌株在 6 h 内完全转化 1 mol/L 赖氨酸^[17]; 或者在 *C. glutamicum* 中共表达 DXP 非依赖性途径基因 *pdxS/pdxT*, 使得胞内 PLP 含量以及尸胺产量分别提高了 2.4 倍和 2.9 倍^[18]。

为了实现尸胺的发酵生产, 本研究首先在一株产赖氨酸的工程 *E. coli* 中引入 LDC 实现尸胺的合成; 其次, 通过体外以及体内实验评估了尸胺的生产瓶颈步骤; 接着开发了一种双路径协同优化的辅酶合成系统, 提高辅酶 PLP 的供应, 进而提高 LDC 催化赖氨酸合成尸胺的能力; 随后在 5 L 发酵罐中分别从诱导起始时间、pH 和接种量这 3 个方面对发酵工艺进行优化。最终, 重组菌株 L11 在 5 L 发酵罐中, 经 48 h 分批补料发酵, 尸胺产量、得率、生产强度分别为 54.43 g/L、0.22 g/g、1.13 g/(L·h)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

详细的菌株、质粒及引物信息请参见表 1-3。

1.1.2 试剂

供本研究所用试剂盒和酶制剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 尸胺(标准品)购自 Sigma-Aldrich 公司, 其他试剂均购自阿拉丁(上海)生化科技股份有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。

斜面培养基(g/L): 胰蛋白胨(Oxoid) 10.0, 氯化钠 10.0, 丙酮酸钠 0.4, 酵母抽提物(Oxoid) 5.0, 琼脂粉 20.0。

表 1 本研究所使用的菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Relevant characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i> JM109	Cloning host	TaKaRa Bio
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expression host	Novagen
LY-4	<i>E. coli</i> CCTCC M2019435 hns:FRT, AGU- <i>arcA</i>	[19]
L01	LY-4 carrying pEM-01	This study
L02	LY-4 carrying pEM-02	This study
L03	LY-4 carrying pEM-03	This study
L04	LY-4 carrying pEM-04	This study
L05	LY-4 carrying pEM-05	This study
L06	LY-4 carrying pEM-06	This study
L07	LY-4 carrying pEM-07	This study
L08	LY-4 carrying pEM-08	This study
L09	LY-4 carrying pEM-09	This study
L10	LY-4 carrying pEM-10	This study
L11	LY-4 carrying pEM-11	This study

表 2 本研究所使用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Sequences (5'→3')	Sources
pEM	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , Trc promoter	Laboratory storage
pET28a	F1 ori, Kan ^R , P _{lac} - <i>lacI</i> , P _{T7} - <i>lac</i> operator, 6×His	Laboratory storage
pET28a-AsC	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>AscadA</i>	This study
pET28a-ScL	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>ScldcC</i>	This study
pET28a-KqC	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>KqcadIA</i>	This study
pET28a-KqL	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>KqldcIC</i>	This study
pET28a-SmC	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>SmcadA</i>	This study
pET28a-VuL	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>VuldcC</i>	This study
pET28a-GbT	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>GbpdxT</i>	This study
pET28a-MtbT	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>MtbpdxT</i>	This study
pET28a-BsT	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>BspdxT</i>	This study
pET28a-PfT	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>PfpdxT</i>	This study
pET28a-BsS	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>BspdxS</i>	This study
pET28a-GbS	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>GbpdxS</i>	This study
pET28a-MtbS	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>MtbpdxS</i>	This study
pET28a-PfS	pMB1 ori, Kan ^R , P _{T7} - <i>PfpdxS</i>	This study
pEM-01	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i>	This study
pEM-02	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i> -P _{Tac} -Epd	This study
pEM-03	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i> -P _{Tac} -Dxs	This study
pEM-04	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i> -P _{Tac} -PdxH	This study
pEM-05	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i> -P _{Tac} -PdxJ	This study
pEM-06	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i> -P _{Tac} -PdxA	This study
pEM-07	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i> -P _{T5} - <i>GbPdxS</i> / <i>BsPdxT</i>	This study
pEM-08	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i> -P _{T5} - <i>GbPdxS</i> / <i>MyPdxT</i>	This study
pEM-09	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i> -P _{T5} - <i>BsPdxS</i> / <i>BsPdxT</i>	This study
pEM-10	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i> -P _{T5} - <i>BsPdxS</i> / <i>MyPdxT</i>	This study
pEM-11	<i>lac</i> operator, <i>lacI</i> , Amp ^R , pEM-P _{T5} - <i>AsCadA</i> -P _{T5} - <i>PdxA</i> -P _{T5} - <i>BsPdxS</i> / <i>MyPdxT</i>	This study

CuSO₄ 0.02。

发酵罐补料培养基(g/L): 葡萄糖 900.0, 硫酸铵 500.0。

1.2 方法

1.2.1 培养条件

种子培养: 将菌液以 Z 字形方式接种于斜面固体培养基, 37 °C 恒温培养 24 h。培养完成后, 用 10 mL 无菌水轻柔冲洗斜面以收集菌苔, 取 2.5 mL 的菌悬液转移到装有 100 mL 一级种子培养基的摇瓶中, 于 37 °C 在复式摇床上以 190 r/min 的频率培养 8 h。接着, 将 5 mL 的一级种子液接种至含有 42 mL 二级种子培养基的摇瓶中, 在相同的条件下继续培养 8–9 h。

发酵培养: 将活化的种子液以 15%–16% (体积比) 接种至 5 L 发酵罐中。发酵条件设定为: 温度 37 °C, pH 6.6–6.7, 氨氮含量控制在 0.05%–0.08%, 残糖控制在 10 g/L 左右。pH 值通过纯氨水来调节。发酵起始 3 h 时, 加入 0.1 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导酶的表达。

1.2.2 酶活以及动力学参数测定

LDC 酶活测定方法: 反应体系由 5 mmol/L L-赖氨酸、0.1 mmol/L PLP、0.1 mol/L Na₂HPO₄-柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)及 20 g/L LDC 全细胞湿菌体(或 0.5 mg/L 纯酶)组成。在 37 °C 下反应 15 min 后, 100 °C 沸水浴 3 min 终止反应。随后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 根据 1.2.3 节中所述高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)方法检测 L-赖氨酸和尸胺含量。酶活定义: 在 37 °C 条件下, 每 min 催化生成 1 μmol 尸胺所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

谷氨酰胺酶(glutaminase, PdxT)酶活测定方法为偶联酶法: 通过与谷氨酸脱氢酶的偶联反应测定 PdxT 活性。反应在 37 °C、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中进行, 体系中包含

0.5 mmol/L 3-乙酰吡啶腺嘌呤二核苷酸(3-acetylpyridine adenine dinucleotide, APAD)、7 U 谷氨酸脱氢酶以及 10 mmol/L 谷氨酰胺。动力学参数的测定中 PdxT 和 PdxS 浓度控制在 4 μmol/L。使用 SpectraMax M3 酶标仪(上海)在 363 nm 处测定吸光度。

PLP 合酶(PLP synthase, PdxS)酶活测定方法: 通过紫外-可见分光光度法监测 PdxS 在 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中的活性来测定, 反应温度为 37 °C, 反应体系包含 40 μmol/L PdxS 和 0.5 mmol/L 底物核糖-5-磷酸(ribose 5-phosphate, R5P)及 1 mmol/L DL-甘油醛 3-磷酸(DL-glyceraldehyde 3-phosphate, G3P), 并加入 10 mmol/L 硫酸铵作为氮源。动力学参数的测定中 PdxS 浓度控制在 4 μmol/L。使用 SpectraMax M3 酶标仪在 414 nm 处测定吸光度^[20]。

1.2.3 HPLC 检测方法

L-赖氨酸和尸胺测定方法: 首先采用乙氧基亚甲基丙二酸二乙酯(diethyl ethoxymethylene malonate, DEEMM)对样品进行衍生处理^[21]。衍生化后, 12 000 r/min 离心 5 min, 并用 0.22 μm 滤膜过滤。利用配备安捷伦 SB-C18 色谱柱的 HPLC-20A (岛津公司)进行分析。色谱柱温度控制在 35 °C, 流动相由纯乙腈(A)和 25 mmol/L 乙酸钠溶液(pH 4.8) (B)构成, 流速设置为 1.0 mL/min。梯度洗脱程序设置为: 0–2 min, 20%–25% A; 2–20 min, 25%–60% A; 20–25 min, 60%–20% A。

胞内外 PLP 测定方法: 细胞浓度调整至生物量(*OD*₆₀₀)为 20 后, 重悬于 0.9% NaCl 溶液中至终体积为 1.5 mL, 并采用超声破碎法进行细胞破碎。随后加入 10% (体积分数)的 100% 三氯乙酸进行蛋白沉淀, 样品在冰上孵育 15 min 后, 12 °C、12 000 r/min 离心 10 min。使用安捷伦 SB-C18 色谱柱进行 HPLC 分析。流动相为 0.1 mol/L KH₂PO₄ (pH 6.6), 洗脱时间为 0–15 min, 流速为

1.0 mL/min。色谱柱温度维持在 35 °C^[22]。

2 结果与分析

2.1 尸胺生物合成路径的构建与评估

在尸胺的合成中，L-赖氨酸的脱羧反应是最后一步。因此，选择适当的 LDC 至关重要。以酶活和 K_m 、 k_{cat} 等酶动力学参数为指标，确定来源于克雷伯氏菌(*KqLdc1C*、*KqCad1A*)^[23]、天蓝色链霉菌(*ScLdcC*)^[14]、粘质沙雷氏菌(*SmCadA*)^[24]、创伤弧菌(*VuLdcC*)^[24]、鲑鱼弧菌(*AsCadA*)^[25]等 6 种候选 LDCs。然后，将上述酶进行异源表达和纯化，以酶活、转化率为指标进行体外测评，结果如表 4 所示，*AsCadA* 具有最高的比酶活(637.46 U/mg)，摩尔转化率达到 93.58%，因此作为最优 LDC 进行后续研究。

为了在体内构建尸胺的合成路径，考虑到赖氨酸是尸胺合成的直接前体，所以选择本研究室保藏的赖氨酸生产菌株 LY-4 为底盘菌株，将 *AscadA* 基因以质粒 pEM-P_{T5}-*AscadA* 的形式

导入菌株 LY-4，获得重组菌株 L01。为了验证尸胺合成路径的可行性，通过摇瓶发酵的初步实验表明，菌株 L01 在 48 h 的发酵后，其尸胺产量、生产强度和得率分别为 1.07 g/L、0.02 g/(L·h)和 0.03 g/g (图 1A)。随后，为了测试重组菌株 L01 的工业化应用潜力，在 5 L 发酵罐中进行了放大实验，通过补料分批发酵 48 h，菌株 L01 的尸胺产量、生产强度以及得率分别提高到 13.39 g/L、0.28 g/(L·h)和 0.08 g/g (图 1B)。综上所述，重组菌株 L01 可以利用葡萄糖为底物直接合成尸胺。

表 4 不同生物来源的 LDCs 酶活参数
Table 4 Parameters of LDCs from different microorganisms

Enzyme	Specific activity (U/mg)	Conversion rate (%)
<i>AsCadA</i>	637.46±1.47	93.58±0.47
<i>ScLdcC</i>	71.43±0.36	10.49±0.84
<i>KqCad1A</i>	588.82±2.94	86.44±6.92
<i>KqLdc1C</i>	14.28±0.07	2.10±0.17
<i>SmCadA</i>	485.10±1.90	71.20±0.21
<i>VuLdcC</i>	6.10±0.03	0.90±0.04

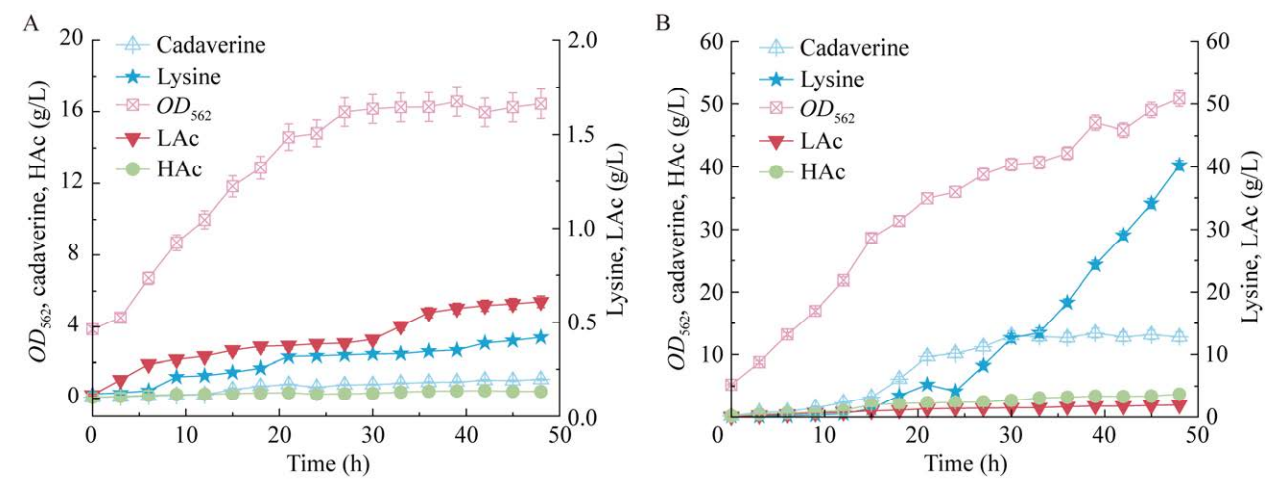


图 1 尸胺生物合成路径的构建与评价

Figure 1 Constructing and evaluating the pathway for cadaverine production. A: Fermentation parameters of strain L01 in a shake flask. B: Fermentation parameters of strain L01 in a 5 L fermenter. LAc: Lactic acid; HAc: Acetic acid.

2.2 尸胺合成路径限速瓶颈的鉴定

图 1B 的结果显示,菌株 L01 虽然能够利用葡萄糖生产尸胺,但同时在发酵终点积累了 40.23 g/L 的前体 L-赖氨酸。针对前体大量积累的问题,通过文献分析得出两个可能的原因:(1) 酶活性低;(2) 辅酶(PLP)供应不足。在发酵过程中对 AsCadA 的评估显示,酶活性并未受到极端条件的影响,如 L-赖氨酸的前体抑制超过 400 g/L、极端的 pH 值以及尸胺的产物抑制超过 100 g/L(图 2A–2C)。然而,如图 2D 所示,在发酵 12 h 后,胞内 PLP 含量急剧下降至 0 h 的 35.03%,并在发酵结束时持续下降至 24.62%,这表明 PLP 的持续短缺是限制尸胺生产的一个因素。

为了验证这一假设,进行了体外和体内两部分实验。首先,以 L-赖氨酸为底物,在体外纯酶反应条件下,添加不同浓度的 PLP (0–0.4 mmol/L),结果如图 2E 所示,添加 0.1 mmol/L PLP 相较于对照组(0 mmol/L) AsCadA 的活性提高了 1.56 倍;其次,在摇瓶发酵中研究了一次性补加 PLP 对菌株 L01 合成尸胺的影响,结果如图 2F 所示,额外添加 PLP 的实验组在合成尸胺方面均优于不添加 PLP 的对照组,当 PLP 添加量为 1.0 mmol/L 时,其尸胺产量、生产强度和产率达到最大,分别为 6.56 g/L、0.14 g/(L·h)和 0.22 g/g,相较于对照组分别提高了 513.08%、513.08%和 647.06%;值得注意的是,随着 PLP 添加量从 0 mmol/L 增加至 0.2 mmol/L 再增加至 1.5 mmol/L,菌体生长最大 OD_{562} 先提高 33.1%随后降低 31.09%(图 2F),这说明适量供应 PLP 有利于尸胺的生产和菌体生长,但是过量 PLP 对细胞存在明显的毒害作用。综上所述,胞内 PLP 的短缺是限制尸胺高效生产的关键,并且 PLP 需要适量供应。

2.3 辅酶 PLP 供给模块的构建与评估

微生物中存在 3 种合成 PLP 的天然路径(图 3A),包括两条从头合成途径:DXP 依赖性途径(DXP-dependent pathway)和 DXP 非依赖性途径(DXP-independent pathway),以及一条挽救途径(salvage pathway)。这两条从头合成途径作为细胞内 PLP 合成的主要来源,避免了对昂贵外源底物的需求,并且考虑到 DXP 非依赖性途径不需要还原力或 ATP,具有更短的合成路径。基于此,菌株 L01 实施了双途径策略,即同时加强内源 DXP 依赖性途径和引入外源 DXP 非依赖性途径。

在 DXP 依赖途径中,根据文献[26–27],以酶活为指标,初步筛选出 DXP 依赖途径中 5 个潜在限速酶: Epd、Dxs、PdxH、PdxJ 和 PdxA。将上述酶分别在菌株 LY-4 中过表达,获得菌株 L02–L06。经摇瓶发酵 48 h,结果如图 3B 所示,最优菌株 L06 胞内 PLP 含量达到 2 085.36 nmol/g 细胞干重(dry cell weight, DCW),比对照菌株 L01 提高了 138.67%,尸胺产量、得率和最大 OD_{562} 分别为 6.44 g/L、0.22 g/g 和 26.66,较对照菌株 L01 分别提高 6.02 倍、6.47 倍和 1.64 倍。以上结果表明, PdxA 是 DXP 依赖途径中的限速酶,增加 PLP 的胞内供应有利于代谢流流入尸胺的生产,并促进菌体的生长。

DXP 非依赖性途径包括两个步骤:(1) 由谷氨酰胺酶亚基(PdxT)将谷氨酰胺转化为谷氨酸和铵;(2) 由 PdxS 将氨与核酮糖-5-磷酸(ribulose 5-phosphate, Ru5P)或 R5P 以及 G3P 或磷酸二羟丙酮转化为 PLP。为了确定 DXP 非依赖性途径中最佳的酶,通过搜索 UniProtKB 和 BRANDA 数据库,以酶活为指标,初步筛选出 4 个 PdxT 和 4 个 PdxS 候选酶。首先,将上述酶基因分别在 *E. coli* BL21(DE3)菌株中过表达,并

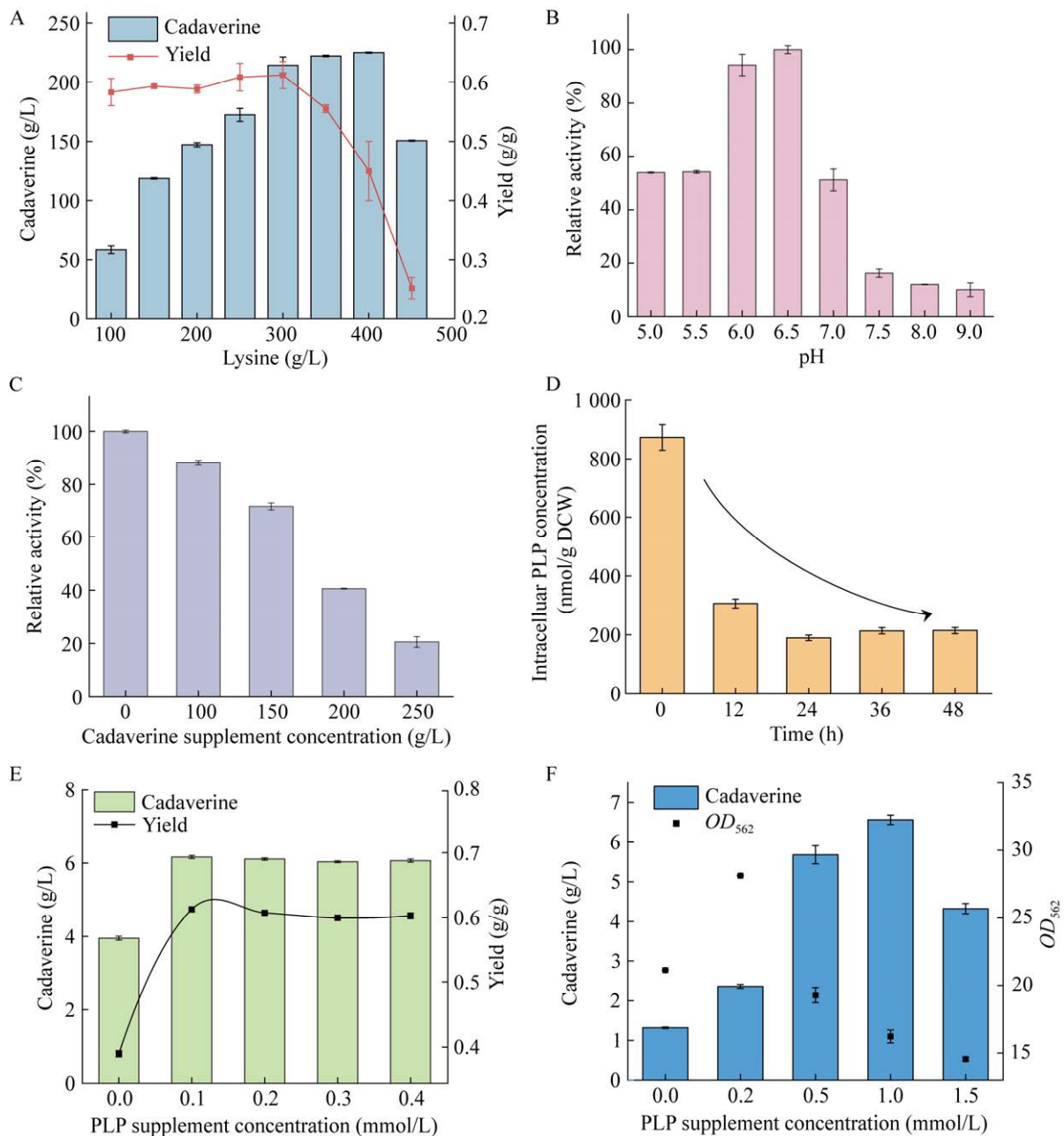


图2 尸胺合成路径限速瓶颈的鉴定与验证

Figure 2 Identification of bottlenecks in the cadaverine synthesis pathway. A: Effect of exogenous lysine addition (ranging from 100–450 g/L) on the whole-cell catalysis of lysine to cadaverine. B: Effect of different pH values on the whole-cell catalysis of lysine to cadaverine. Maximum activity is observed at pH 6.5, serving as the reference point with 100% activity. C: Effect of initial addition of various concentrations of cadaverine (0–250 g/L) on the whole-cell catalysis of lysine to cadaverine. The catalytic activity of whole cells without added cadaverine is set as the benchmark at 100%. D: Changes in intracellular PLP content during the fermentation process. E: Effect of exogenous PLP addition (ranging from 0–0.4 mmol/L) on pure enzyme reaction of lysine to cadaverine. F: Shake flask fermentation curves of strain L01 with exogenous addition of PLP (ranging from 0–1.5 mmol/L).

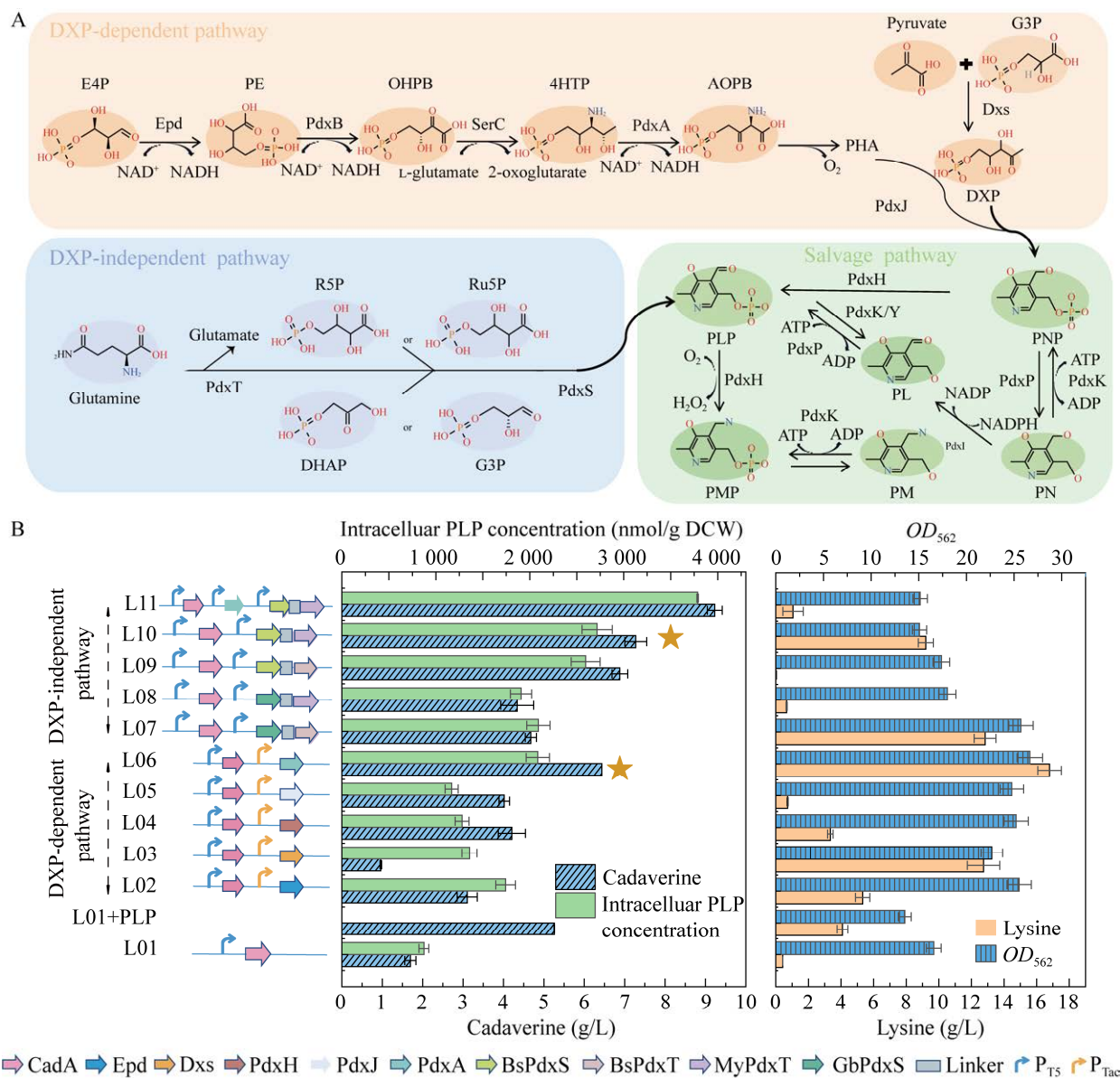


图3 PLP 本源和异源合成路径的摇瓶评价

Figure 3 Shake-flask evaluation of endogenous and exogenous PLP synthesis pathways. A: Pathway diagram of PLP synthesis: DXP-dependent pathway (in yellow), DXP-independent pathway (in blue), salvage pathway (in green). B: OD₅₆₂ variation, lysine accumulation, cadaverine production, and intracellular PLP accumulation in shake flask fermentation of different PLP-enhanced strains. Epd: Erythrose-4-phosphate dehydrogenase; PdxB/PdxR: 4-phosphoerythronate dehydrogenase; SerC: Phosphoserine aminotransferase; PdxA: 4-phosphohydroxy-L-threonine dehydrogenase; PdxJ: PLP synthase; Dxs: DXP synthase; PdxH: PLP oxidase; PdxS and PdxT form the PLP synthase complex; PdxK: PL kinase present in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*; PdxY: PL kinase present in *E. coli*; the PdxK from *B. subtilis* has activities of PN, PL, and PM kinase. E4P: Erythrose 4-phosphate; PE: Phosphoerythronate; OHPB: 2-hydroxy-3-oxo-4-phosphobutyrate; 4HTP: 4-hydroxy-L-threonine phosphate; AOPB: 2-amino-3-ketobutyric acid phosphate; PHA: 3-phosphohydroxypyruvate; G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate; PL: Pyridoxal; PM: Pyridoxamine; PN: Pyridoxine; PMP: Pyridoxamine phosphate; PNP: Pyridoxine phosphate.

进行分离纯化，通过体外纯酶反应，以比酶活和酶动力学参数为依据进行复筛，其中来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的 PdxT 最优，比酶活分别为 63.68 U/mg 和 65.06 U/mg (表 5)；来自 *B. subtilis* 和地热芽孢杆菌(*Geobacillus*)的 PdxS 最优，比酶活分别为 978.82 U/mg 和 971.46 U/mg (表 6)，因此将上述 PdxT 和 PdxS 作为构建完整 DXP 非依赖性途径的候选酶。

将筛选得到的异源合成模块两步候选酶在 pEM-P_{T5}-AsCadA 质粒上进行组合表达，构建得到 4 种组合质粒，导入菌株 LY-4 中获得菌株 L07-L10。通过摇瓶发酵 48 h，最优组合菌株 L10 的胞内 PLP 含量最高，达到 2716.94 nmol/g DCW，相较于对照组菌株 L01 增加了 3.09 倍，其

表 5 不同生物来源的 PdxT 的动力学参数
Table 5 Kinetic parameters of PdxT from different microorganisms

Microorganisms	Specific activity (U/mg)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
<i>Bacillus subtilis</i>	63.68	5.60	0.110	0.019
<i>Geobacillus</i>	32.09	1.84	0.034	0.019
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	65.06	9.68	0.160	0.016
<i>Plasmodium falciparum</i>	8.42	1.31	0.022	0.017

表 6 不同生物来源的 PdxS 的动力学参数
Table 6 Kinetic parameters of PdxS from different microorganisms

Microorganisms	Specific activity (U/mg)	DL-glyceraldehyde 3-phosphate		
		K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
<i>Bacillus subtilis</i>	978.83	0.38	2.60	6.84
<i>Geobacillus</i>	971.46	0.28	0.36	1.29
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	161.47	0.29	0.41	1.41
<i>Plasmodium falciparum</i>	276.68	0.33	0.77	2.33

尸胺产量、生产强度和得率分别达到 7.27 g/L、0.15 g/(L·h)和 0.16 g/g，较对照菌株 L01 分别提高 6.79 倍、6.79 倍和 4.71 倍(图 3B)。综上所述，*BspdxS/MypdxT* 的组合表达模块是 PLP 异源合成最优模块。

以上结果表明尸胺产量随着 PLP 的增加而增加，所以本研究尝试将 PLP 的本源与异源供应路径以及 AsCadA，同时在质粒 pEM 上进行组合表达，构建菌株 L11 (图 3B)。通过摇瓶发酵 48 h，菌株 L11 胞内的 PLP 含量、尸胺产量以及产率分别达到 3 786.52 nmol/g DCW、9.23 g/L 和 0.21 g/g，相较于对照菌株 L01 分别增加了 4.33 倍、8.63 倍和 6.18 倍(图 3B)。为评估菌株的鲁棒性菌株 L11 在 5 L 发酵罐中通过分批补料发酵 48 h，尸胺的产量达到 36.32 g/L，生产强度分别为 0.76 g/(L·h)，产率为 0.14 g/g。

2.4 尸胺的发酵工艺优化

为探究工程菌株 L11 在 5 L 发酵罐水平生产尸胺的最优条件，本研究分别从诱导时间、pH 和初始接种量 3 个方面对发酵工艺进行优化，以提高尸胺产量。

首先，研究了不同诱导时间(3、6、12、21 h)对尸胺发酵生产的影响。如图 4A 所示，在细胞生长方面，随着诱导时间增加，细胞最大 OD₅₆₂ 呈现出先增加后下降的趋势，分别为 50.88、56.01、45.14 和 42.34；在尸胺合成方面，当诱导时间为 6 h 时，尸胺的产量最高，达到 43.90 g/L。

其次，研究了不同 pH 区间(5.5–6.0、6.0–6.5、6.5–7.0、7.0–7.5)对尸胺生产的影响。如图 4B 所示，在细胞生长方面，随着 pH 的升高，细胞最大 OD₅₆₂ 先增加后下降，分别为 39.5、50.88、58.1 和 54.1；在尸胺合成方面，当 pH 在 6.5–7.0 范围内时，尸胺产量达到 49.67 g/L，相比于优化前提高了 36.76%。然而，当 pH 高

于 7.0 时,尸胺的产量下降至 21.69 g/L,较优化前降低了 40.28%。

另外,还研究了不同初始接种量[10%、15%、20%、25% (体积分数)]对尸胺生产的影响。如图 4C 所示,在细胞生长方面,随着接种量的提高,细胞最大 OD_{562} 逐渐增加,分别为 45.10、50.88、55.5 和 56.01;在尸胺合成方面,当初始接种量为 20%时,尸胺产量最高,达到 40.12 g/L,相比于优化前提高 10.46%。然而,当接种量继续提高至 25%时,尸胺的产量下降至 38.20 g/L。

综上所述,最佳的尸胺发酵工艺条件为:诱导时间 6 h、pH 6.5–7.0、初始接种量 20%。

最后,基于以上最优发酵条件,重组菌株 L11 在 5 L 发酵罐中分批补料发酵 48 h,尸胺的产量、得率和最大 OD_{562} 分别达到 54.43 g/L、0.22 g/g 和 58.0,比未优化前分别提高了 1.50 倍、1.57 倍和 1.14 倍(图 4D)。

3 讨论与结论

本研究首先将新筛选到的 LDC 引入实验室前期开发的赖氨酸生产工程 *E. coli* 中,实现了尸胺的从头合成。随后,通过一系列体外及体内实验,确定了尸胺生产的限制因素为辅酶 PLP 持续短缺。在此基础上,开发了一种双途

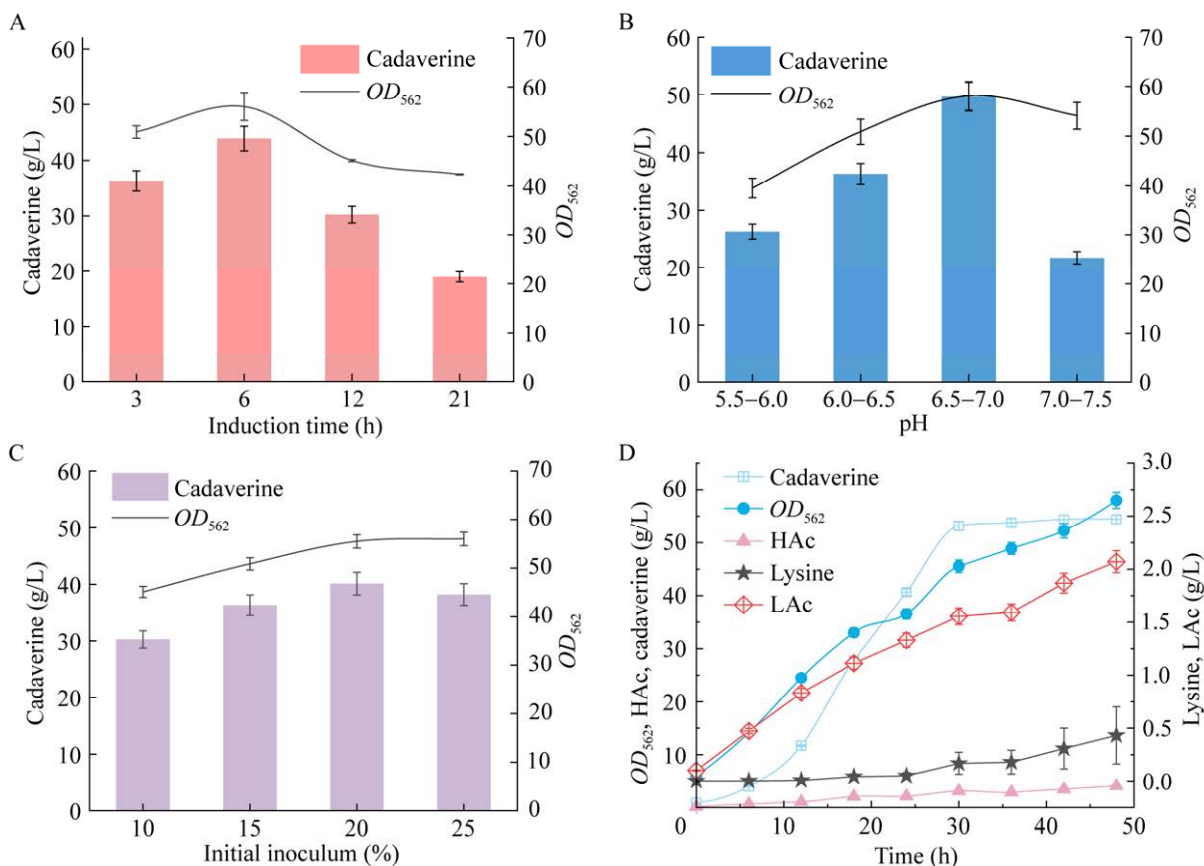


图 4 尸胺的罐上发酵优化

Figure 4 Fermentation optimization for cadaverine production in fermenter. A: Effect of different induction time on cadaverine production and OD_{562} . B: Effect of different pH on cadaverine production and OD_{562} . C: Effect of different initial inoculum on cadaverine production and OD_{562} . D: Variation curves of strain L11 on a 5 L fermenter under optimal fermentation conditions.

径策略,以增强 PLP 的胞内供应,得到重组菌株 L11。进一步地,在 5 L 发酵罐中,从诱导起始时间、pH 值和接种量 3 个方面对发酵工艺进行了优化。最终,通过 48 h 的分批补料发酵,菌株 L11 在 5 L 发酵罐中尸胺产量、得率和生产强度分别达到 54.43 g/L、0.22 g/g 和 1.13 g/(L·h)。尽管目前报道的 *E. coli* 发酵法合成尸胺的最高产量为 58.70 g/L^[1],但其生产强度仅为本研究的 79.65%。在工业化生产领域,生产强度是衡量发酵系统单位时间产出效率的重要指标。因此,实现较高的生产强度对于工业化规模的生产至关重要。

通过组合不同 PLP 合成途径,可以有效强化 PLP 生物合成效率。PLP 的充足供应对于尸胺的合成是至关重要的^[28]。但是外源补充 PLP 会导致生产成本较高,利用生物合成的方式更具经济性。目前,共开发出 4 种利用微生物合成 PLP 的方法:(1) 引入挽救途径。例如,通过过表达挽救途径的关键酶 *pdxY*,使得 5-氨基乙酰丙酸产量提高了 4.33 倍^[29]。(2) 强化和/或引入单个或多个从头合成途径,包括 DXP 依赖性途径和 DXP 非依赖性途径^[27]。(3) 开发新途径。例如通过实验室进化和酶的混杂性,挖掘出一条截短非天然 DXP 依赖途径^[30]。(4) 多维度强化途径。例如通过增加前体供应/增强 NADH 再生,进而促进 PLP 合成^[31]。本研究对 PLP 生物合成的 DXP 依赖和 DXP 非依赖途径进行了工程化改造。采用协同强化 DXP 依赖途径以及引入 DXP 非依赖途径的双途径策略,成功将细胞内 PLP 浓度提高了 4.33 倍。最终,最优生产菌株 L11 在摇瓶水平的尸胺产量达到 9.23 g/L,较优化前提高 8.63 倍。其中,DXP 非依赖途径中的 *BspdxS/MypdxT* 组合,结合了来自不同生物物的 *pdxS* 和 *pdxT*,相较于 *BspdxS/BspdxT* 这样的原生组合,尸胺生产效率更高,为解决尸胺合

成中辅酶短缺的问题提供了新的思路。

尽管取得了一些进展,但是目前工程菌株的尸胺生产指标与行业领先菌株及工业生产标准相比,仍存在显著差异,导致这一结果可能的原因有 4 个:(1) PLP 可用性。PLP 作为 LDC 的辅酶,其浓度不足或过量都可能影响酶活性,甚至影响细胞生长,进而成为影响尸胺生产的瓶颈。(2) 菌株上游路径的改造。已报道最高产量的工程菌株对上游路径进行了改造,进一步强化了前体供应,减少了碳代谢流的损失。目前重组菌株 L11 并未对上游路径进行改造,可能导致尸胺生产效率受限。(3) 尸胺胞外转运效率低。已报道的工程菌株过表达了赖氨酸-尸胺逆转运蛋白 *CadB*,以促进赖氨酸的胞内运输以及尸胺的胞外转运。(4) 尸胺耐受性低。已报道最高产量的工程菌株采用尸胺耐受菌株 *E. coli* NT1005 为底盘菌株,与之相比,本研究采用的 *E. coli* LY-4 仅作为赖氨酸的生产菌,未进行耐受实验,致使尸胺合成路径与底盘菌株的适配性降低。

为了进一步提高重组菌株 L11 的尸胺的产量,在后续的研究中可以从以下 4 个方面进行探索:(1) 提高 PLP 的合成。可以进一步运用优化表达系统、调控代谢流分布、蛋白质改造等策略,增加 PLP 的合成效率。(2) 强化尸胺的合成路径。为了进一步提高路径的合成效率,通过强化路径中关键酶表达可使尸胺的产量得以提高。(3) 强化尸胺的外运能力。通过转录组学分析技术可以筛选出新的尸胺的外运蛋白,将有助于提高尸胺的产量。(4) 提高底盘耐受性。耐受性强的底盘可以更好地抵抗环境压力,从而提高生产过程的效率和产物的产量,可以通过适应性进化、代谢工程、细胞膜工程等策略开发耐受菌株,从而改善工厂菌株的尸胺生产性能。

REFERENCES

- [1] WANG X, GUO X, WANG J, LI H, HE F, XU S, CHEN KQ, OUYANG PK. Ameliorating end-product inhibition to improve cadaverine production in engineered *Escherichia coli* and its application in the synthesis of bio-based diisocyanates[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2021, 6(4): 243-253.
- [2] HUANG YH, JI XL, MA ZL, ŁĘŻYK M, XUE YJ, ZHAO H. Green chemical and biological synthesis of cadaverine: recent development and challenges[J]. RSC Advances, 2021, 11(39): 23922-23942.
- [3] JANCEWICZ AL, GIBBS NM, MASSON PH. Cadaverine's functional role in plant development and environmental response[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 870.
- [4] CHENG J, CHEN P, SONG AD, WANG D, WANG QH. Expanding lysine industry: industrial biomanufacturing of lysine and its derivatives[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(8): 719-734.
- [5] TeSLAA T, RALSER M, FAN J, RABINOWITZ JD. The pentose phosphate pathway in health and disease[J]. Nature Metabolism, 2023, 5: 1275-1289.
- [6] TUNCA S, BARREIRO C, SOLA-LANDA A, COQUE JJR, MARTÍN JF. Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the *desA* gene[J]. The FEBS Journal, 2007, 274(4): 1110-1122.
- [7] MA ZL, QIN SJ, YAO Y, XIN ZW, LUAN LK, ZHANG YQ, HUANG YH. Directed synthesis of nylon 5X key monomer cadaverine with alkaline metal modified Ru@FAU catalysts[J]. Applied Catalysis A: General, 2023, 658: 119172.
- [8] ZHAO CH, ZHENG TR, FENG YH, WANG X, ZHANG LZ, HU QT, CHEN JC, WU FQ, CHEN GQ. Engineered *Halomonas* spp. for production of L-lysine and cadaverine[J]. Bioresource Technology, 2022, 349: 126865.
- [9] GAO SY, ZHANG AL, MA D, ZHANG K, WANG J, WANG X, CHEN KQ. Enhancing pH stability of lysine decarboxylase *via* rational engineering and its application in cadaverine industrial production[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 186: 108548.
- [10] DU Y, PU ZJ, KANG H, MI JL, LIU SM, QI HS, ZHANG L. Zwitterionic peptides encircling-assisted enhanced catalytic performance of lysine decarboxylase for cadaverine biotransformation and mechanism analyses[J]. Chemical Engineering Science, 2022, 251: 117447.
- [11] TING WW, YU JY, LIN YC, NG IS. Enhanced recombinant carbonic anhydrase in T7RNAP-equipped *Escherichia coli* W3110 for carbon capture storage and utilization (CCSU)[J]. Bioresource Technology, 2022, 363: 128010.
- [12] LI WN, MA L, SHEN XL, WANG J, FENG Q, LIU LX, ZHENG GJ, YAN YJ, SUN XX, YUAN QP. Targeting metabolic driving and intermediate influx in lysine catabolism for high-level glutarate production[J]. Nature Communications, 2019, 10: 3337.
- [13] QIAN ZG, XIA XX, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine: a five carbon diamine[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(1): 93-103.
- [14] KIM HT, BARITUGO KA, HYUN SM, KHANG TU, SOHN YJ, KANG KH, JO SY, SONG BK, PARK K, KIM IK, HWANG YT, LEE SY, PARK SJ, JOO JC. Development of metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for enhanced production of cadaverine and its use for the synthesis of bio-polyamide 510[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8(1): 129-138.
- [15] DĄJNOWICZ S, JOHNSTON RC, PARKS JM, BLAKELEY MP, KEEN DA, WEISS KL, GERLITS O, KOVALEVSKY A, MUESER TC. Direct visualization of critical hydrogen atoms in a pyridoxal 5'-phosphate enzyme[J]. Nature Communications, 2017, 8: 955.
- [16] WEI GG, CHEN Y, ZHOU N, LU QH, XU S, ZHANG AL, CHEN KQ, OUYANG PK. Chitin biopolymer mediates self-sufficient biocatalyst of pyridoxal 5'-phosphate and L-lysine decarboxylase[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 427: 132030.
- [17] MOON YM, YANG SY, CHOI TR, JUNG HR, SONG HS, HAN YH, PARK HY, BHATIA SK, GURAV R, PARK K, KIM JS, YANG YH. Enhanced production of cadaverine by the addition of hexadecyltrimethylammonium bromide to whole cell system with regeneration of pyridoxal-5'-phosphate and ATP[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 127: 58-64.
- [18] MA WC, CAO WJ, ZHANG BW, CHEN KQ, LIU QZ, LI Y, OUYANG PK. Engineering a pyridoxal 5'-phosphate supply for cadaverine production by using *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15630.
- [19] GUO L, QI MY, GAO C, YE C, HU GP, SONG W, WU J, LIU LM, CHEN XL. Engineering microbial cell

- viability for enhancing chemical production by second codon engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 235-246.
- [20] XIE F, LI G, WANG YL, ZHANG YH, ZHOU L, WANG CC, LIU SH, LIU SG, WANG CL. Pyridoxal phosphate synthases PdxS/PdxT are required for *Actinobacillus pleuropneumoniae* viability, stress tolerance and virulence[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0176374.
- [21] KIM YH, KIM HJ, SHIN JH, BHATIA SK, SEO HM, KIM YG, LEE YK, YANG YH, PARK K. Application of diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) derivatization for monitoring of lysine decarboxylase activity[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 115: 151-154.
- [22] XUE CF, NG IS. A direct enzymatic evaluation platform (DEEP) to fine-tuning pyridoxal 5'-phosphate-dependent proteins for cadaverine production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, 120(1): 272-283.
- [23] 邓洁. 用于生物合成戊二胺的新的 L-赖氨酸脱羧酶基因的功能鉴定和突变研究[D]. 南宁: 广西大学博士学位论文, 2019.
DENG J. Functional identification and site-directed mutagenesis of novel L-lysine decarboxylase genes for the biosynthesis of pentanediamine from the subtropical soil microorganisms[D]. Nanning: Doctoral Dissertation of Guangxi University, 2019 (in Chinese).
- [24] OSIRE T, QIAO ZN, YANG TW, XU MJ, ZHANG X, RAO ZM. Biochemical characterization and structural insight into interaction and conformation mechanisms of *Serratia marcescens* lysine decarboxylase (*SmcadA*)[J]. *Molecules*, 2021, 26(3): 697.
- [25] KOU FY, ZHAO J, LIU J, SHEN J, YE Q, ZHENG P, LI ZM, SUN JB, MA YH. Characterization of a new lysine decarboxylase from *Aliivibrio salmonicida* for cadaverine production at alkaline pH[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 133: S88-S94.
- [26] ROSENBERG J, ISCHEBECK T, COMMICHAU FM. Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(1): 31-40.
- [27] LIU LX, LI JL, GAI YM, TIAN ZZ, WANG YY, WANG TH, LIU P, YUAN QQ, MA HW, LEE SY, ZHANG DW. Protein engineering and iterative multimodule optimization for vitamin B6 production in *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 530.
- [28] KANJEE U, GUTSCHE I, ALEXOPOULOS E, ZHAO BY, EL BAKKOURI M, THIBAUT G, LIU KY, RAMACHANDRAN S, SNIDER J, PAI EF, HOURY WA. Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase[J]. *The EMBO Journal*, 2011, 30(5): 931-944.
- [29] XUE CF, YU TH, NG IS. Engineering pyridoxal kinase PdxY-integrated *Escherichia coli* strain and optimization for high-level 5-aminolevulinic acid production[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2021, 120: 49-58.
- [30] ROSENBERG J, YEAK KC, COMMICHAU FM. A two-step evolutionary process establishes a non-native vitamin B6 pathway in *Bacillus subtilis*[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(1): 156-168.
- [31] GE JW, YANG XH, YU HW, YE LD. High-yield whole cell biosynthesis of nylon 12 monomer with self-sufficient supply of multiple cofactors[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 172-185.

(本文责编 郝丽芳)