

• 功能食品配料生物合成 •

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。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》等国内外生物工程类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。研究成果获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底物利用途径促进 L-赖氨酸生产

许雪晨¹，王浩淼¹，陈修来¹，吴静²，高聪¹，宋伟²，魏婉清²，刘佳¹，柳亚迪^{1*}，刘立明^{1*}

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室，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

许雪晨，王浩淼，陈修来，吴静，高聪，宋伟，魏婉清，刘佳，柳亚迪，刘立明. 代谢工程改造大肠杆菌底物利用途径促进 L-赖氨酸生产[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2513-2527.

XU Xuechen, WANG Haomiao, CHEN Xiulai, WU Jing, GAO Cong, SONG Wei, WEI Wanqing, LIU Jia, LIU Yadi, LIU Liming. Metabolic engineering of the substrate utilization pathway in *Escherichia coli* increases L-lysine production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2513-2527.

摘 要：L-赖氨酸作为一种必需氨基酸，广泛应用于饲料、食品、医药等领域。针对大肠杆菌(*Escherichia coli*)发酵生产 L-赖氨酸存在底物利用效率差、糖酸转化率低等问题，本研究通过敲除全局调控因子基因 *mhc*，异源表达来源于麦芽糖磷酸转移酶基因 *malAP*，提高菌株对二糖、三糖的利用效率，得到菌株 *E. coli* XC3，其 L-赖氨酸产量、产率和生产强度分别提高到 160.00 g/L、63.78% 和 4.44 g/(L·h)；在此基础上，在菌株 *E. coli* XC3 中过表达谷氨酸脱氢酶基因 *gdhA*、来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)硝酸盐还原酶基因 *BsnasBC* 和来源于 *E. coli* 的亚硝酸盐还原酶基因 *EcnirBD*，构建硝酸盐同化路径，获得工程菌 *E. coli* XC4，其 L-赖氨酸产量、产率和生产强度分别

资助项目：江苏省农业科技创新基金[CX(22)1012, CX(23)2005]；江苏省自然科学基金(BK20200614)

This work was supported by the Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX(22)1012, CX(23)2005) and the Provincial Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20200614).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Liming, mingll@jiangnan.edu.cn; LIU Yadi, Liuyadi@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-01-17; Accepted: 2024-03-16

提高到 188.00 g/L、69.44%和 5.22 g/(L·h)，进一步通过优化残糖浓度和碳氮比，在 5 L 发酵罐中将 L-赖氨酸产量、产率和生产强度分别提高到 204.00 g/L、72.32%、5.67 g/(L·h)，比出发菌株 XC1 分别提高了 40.69%、20.03%、40.69%。本研究通过强化菌株的底物利用途径，构建了 L-赖氨酸高产菌株，为 L-赖氨酸的工业化生产奠定了坚实基础。

关键词：大肠杆菌；L-赖氨酸；代谢工程；底物利用

Metabolic engineering of the substrate utilization pathway in *Escherichia coli* increases L-lysine production

XU Xuechen¹, WANG Haomiao¹, CHEN Xiulai¹, WU Jing², GAO Cong¹, SONG Wei², WEI Wanqing², LIU Jia¹, LIU Yadi^{1*}, LIU Liming^{1*}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

Abstract: L-lysine is an essential amino acid with broad applications in the animal feed, human food, and pharmaceutical industries. The fermentation production of L-lysine by *Escherichia coli* has limitations such as poor substrate utilization efficiency and low saccharide conversion rates. We deleted the global regulatory factor gene *mlc* and introduced heterologous genes, including the maltose phosphotransferase genes (*malAP*) from *Bacillus subtilis*, to enhance the use efficiency of disaccharides and trisaccharides. The engineered strain *E. coli* XC3 demonstrated improved L-lysine production, yield, and productivity, which reached 160.00 g/L, 63.78%, and 4.44 g/(L·h), respectively. Furthermore, we overexpressed the glutamate dehydrogenase gene (*gdhA*) and assimilated nitrate reductase genes (*BsnasBC*) from *B. subtilis*, along with nitrite reductase genes (*EcnirBD*) from *E. coli*, in strain *E. coli* XC3. This allowed the construction of *E. coli* XC4 with a nitrate assimilation pathway. The L-lysine production, yield, and productivity of *E. coli* XC4 were elevated to 188.00 g/L, 69.44%, and 5.22 g/(L·h), respectively. After optimization of the residual sugar concentration and carbon to nitrogen ratio, the L-lysine production, yield, and productivity were increased to 204.00 g/L, 72.32%, and 5.67 g/(L·h), respectively, in a 5 L fermenter. These values represented the increases of 40.69%, 20.03%, and 40.69%, respectively, compared with those of the starting strain XC1. By engineering the substrate utilization pathway, we successfully constructed a high-yield L-lysine producing strain, laying a solid foundation for the industrial production of L-lysine.

Keywords: *Escherichia coli*; L-lysine; metabolic engineering; substrate utilization

L-赖氨酸作为重要的工业原料，广泛应用于食品、医药、饲料等领域^[1]。近年来，随着应用研究的不断深入，对于 L-赖氨酸的需求量以

每年 10%–15% 的增长率持续增长，全球 L-赖氨酸的市场规模已超过 300 万 t^[2]。为了满足全球市场对 L-赖氨酸日益增长的需求，提高 L-赖氨酸的

生产能力成为了目前的研究热点。发酵法生产 L-赖氨酸的菌种主要包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[3-4]、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)^[5-6]、黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)^[7]等。其中,大肠杆菌由于其遗传背景清晰、基因编辑手段丰富、生长周期短等特点,已成为生产 L-赖氨酸的主要菌种。然而,利用大肠杆菌生产 L-赖氨酸仍然需要进一步强化代谢路径以提高 L-赖氨酸的底物转化率。研究人员为了进一步提高大肠杆菌中 L-赖氨酸的底物转化率,开发了一系列代谢工程策略:(1) 强化 L-赖氨酸合成路径基因。通过过表达 L-赖氨酸合成路径上的天冬氨酸激酶基因 *lysC*、天冬氨酸半醛脱氢酶基因 *asd*、二氢吡啶二羧酸还原酶基因 *dapB* 等路径酶基因,使 L-赖氨酸产量达到 125.6 g/L^[8]。(2) 增强前体草酰乙酸、天冬氨酸合成基因。通过敲除丙酮酸激酶基因 *pykF*,使天冬氨酸积累量达到 6.95 mmol/L,同时过表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 *ppc*,增强草酰乙酸合成,最终使 L-赖氨酸产量提高了 22.22%^[9-10]。(3) 关键酶蛋白质工程改造。为了解除 L-赖氨酸对天冬氨酸激酶 LysC 的反馈抑制,通过过表达抗反馈抑制突变体 LysC^{T344M},使 L-赖氨酸产量提高至 126.5 g/L,生产强度达到 3.14 g/(L·h)^[8,11]。(4) 辅因子工程。通过过表达 *E. coli* 吡啶核苷酸磷酸转移酶编码基因 *pntAB*,提高 NADPH 含量,将 L-赖氨酸产量提高至 134.9 g/L,转化率 45.4%^[3,6]。以上研究策略虽然在改善底物转化率的同时显著提高了大肠杆菌的 L-赖氨酸产量,但大肠杆菌仍存在对底物的摄取能力不足、底物利用不充分等问题^[12],限制了转化率的进一步提高。

为此,本研究测定了 *E. coli* XC1 对不同底物的利用能力,随后,通过敲除全局调控因子基因 *mlc*^[13]、表达 α -磷酸-葡萄糖苷酶基因 *malA*

和丙酮酸依赖型麦芽糖磷酸转移酶亚基基因 *malP*,得到了 *E. coli* XC3 菌株,显著提高了 L-赖氨酸生产菌株对二糖、三糖底物的利用效率。在此基础上,进一步改造 XC3 氮代谢路径,并引入硝酸盐同化路径,构建了 L-赖氨酸生产菌 *E. coli* XC4,显著提高了 L-赖氨酸生产菌的氮源利用效率。最终,通过优化发酵过程中残糖浓度和碳氮比,使 *E. coli* XC4 菌株 L-赖氨酸产量达到 204.00 g/L,转化率达到 72.32%,生产强度达到 5.67 g/(L·h),大幅提高了 L-赖氨酸生产菌株的生产性能,为 L-赖氨酸的工业化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

实验所用重组菌株、质粒及引物见表 1 和表 2。

1.1.2 主要仪器和试剂

实验中所用的酶制剂均购自宝生物工程(大连)有限公司;实验中所用的试剂盒、一步同源重组酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。5 L 全自动发酵罐购自迪必尔生物工程(上海)有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 5.00。

发酵培养基: 葡萄糖 20.00 g/L, 甜菜糖蜜 30.00 g/L, 玉米浆干粉 10.00 g/L, 甜菜碱 3.00 g/L, MgSO₄ 1.50 g/L, FeSO₄ 20.00 mg/L, 苏氨酸 450.00 mg/L, 氯化钾 1.00 g/L, 甲硫氨酸 400.00 mg/L, 生物素 0.60 mg/L, 使用氨水调节 pH 至 7.20, 121 °C 灭菌 15 min。

表 1 本研究所用的质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Plasmids and strains	Relevant characteristics	Sources
Plasmids		
pTargetF	sgRNA	Lab store
pCas9	araBAD promoter, Kan ^R	Lab store
pEM	pBR322 ori, P _{T5} , Amp ^R	Lab store
pEM- <i>gdhA</i>	pBR322 ori, P _{T5} , Amp ^R , <i>gdhA</i>	This study
pEM- <i>glnA</i>	pBR322 ori, P _{T5} , Amp ^R , <i>glnA</i>	This study
pEM- <i>amtB</i>	pBR322 ori, P _{T5} , Amp ^R , <i>amtB</i>	This study
pEM- <i>gltBD</i>	pBR322 ori, P _{T5} , Amp ^R , <i>gltBD</i>	This study
pET28a	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R	This study
pET28a-1	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>KoNasAC</i>	This study
pET28a-2	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>PpNasB</i>	This study
pET28a-3	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>RcNasAC</i>	This study
pET28a-4	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>BsNasBC</i>	This study
pET28a-5	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>PsNasC</i>	This study
pET28a-6	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>BmNasBC</i>	This study
pET28a-7	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>RpNasA</i>	This study
pET28a-8	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>MgNasA</i>	This study
pET28a-9	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>AvNasC</i>	This study
pET28a-10	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>KoNirD</i>	This study
pET28a-11	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>PpNirBD</i>	This study
pET28a-12	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>RcNasB</i>	This study
pET28a-13	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>EcNirBD</i>	This study
pET28a-14	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>BsNasDE</i>	This study
pET28a-15	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>PsNirBD</i>	This study
pET28a-16	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>BmNasDE</i>	This study
pET28a-17	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>PdNasBG</i>	This study
pET28a-18	pBR322 ori, P _{T7} , Kan ^R , <i>KpNasD</i>	This study
Strains		
<i>Escherichia coli</i> JM109	General cloning host	TaKaRa Bio
<i>E. coli</i> M2019435	Derivative of <i>E. coli</i> MG1655 for producing L-lysine	Lab store
<i>E. coli</i> XC1	<i>E. coli</i> M2019435 <i>aspC-lysC-asd-dapA-dapB</i>	This study
<i>E. coli</i> XC2	<i>E. coli</i> XC1 Δmlc	This study
<i>E. coli</i> XC3	<i>E. coli</i> XC2 $\Delta cadA::malAP$	This study
<i>E. coli</i> XC4	<i>E. coli</i> XC3 $\Delta gntT::gdhA$	This study
<i>E. coli</i> XC3-1	<i>E. coli</i> XC3-pEM- <i>amtB</i>	This study
<i>E. coli</i> XC3-2	<i>E. coli</i> XC3-pEM- <i>gdhA</i>	This study
<i>E. coli</i> XC3-3	<i>E. coli</i> XC3-pEM- <i>gltBD</i>	This study
<i>E. coli</i> XC3-4	<i>E. coli</i> XC3-pEM- <i>glnA</i>	This study

表 2 本研究所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Size (bp)
<i>mlc</i> -up-F	CCTTCCTGAATACCGACAACCATCAAC	27
<i>mlc</i> -up-R	TGCTTCACCATAGCCTACAGAAGCATAACTTAGACTTTCAAGGT	44
<i>mlc</i> -down-F	TGAAAGTCTAAGTTATGCTTCTGTAGGCTATGGTGAAGCACTTC	44
<i>mlc</i> -down-R	CATGAACCGCTTATGGCGATGAT	23
<i>mlc</i> -N20-F	GGCGGAAACCAGACCGATGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	43
<i>mlc</i> -N20-R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCATCGGTCTGGTTTCCGCC	51
<i>cadA</i> -up-F	TGGGGCTGCGATAGAACCG	19
<i>cadA</i> -up-R	CCCATGTGTTGGGAGGGGCTGGCTTGCCACTTCCCTTTTTTGC	44
<i>cadA</i> -down-F	GGCCCCTCCCAACACATGGGAC	22
<i>cadA</i> -down-R	GGCTCCTGGATGATGTTGGTAGG	23
<i>cadA</i> -N20-F	GGATCTTCACGATACAGAGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	43
<i>cadA</i> -N20-R	TCTCTGTATCGTGAAGATCCACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTG	51
<i>malA</i> -1	TGAGCGTCTAGAGCCCCTG	19
<i>malA</i> -2	AAATGGGGGAATTTCAATTTATGATATGCGGGTTGGGCTTTG	41
<i>malP</i> -1	TTTCACACAAGGAGACTGCCATGATGCAAAAAATTCAGCGCTTTGGAA	48
<i>malP</i> -2	TCCCGAAAAGGAGGGCAGTCTTTATTGATTCAATATTTTTTCCACACGCTCCCG	54
<i>nirBD</i> -F	GCACTAGTAAAGAGGAGAAAGGATCCATGAGCAAAGTCAGACTCGCA	47
<i>nirBD</i> -R	CCTTTCTCCTCTTTACTAGTGCTAGCATTATACCTA	36
<i>BsnasB</i> -F	GTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCCATGAAGAAACAAAGATTAGTGTTAGCGGGA	56
<i>BsnasB</i> -R	GACGGGCGCATATAAGAAAGGATGACTCGAGCACCACCACCACCACTG	51
<i>BsnasC</i> -F	TGCCGCGCGGCAGCCATATGATGACTGAACGACTGCTTAGATATTTCCG	49
<i>BsnasC</i> -R	TGGATCCTTTCTCCTCTTTAATAAGCTTTTAAATAGGTATGATTTCGGACGGCGC	54
<i>gdhA</i> -F	CACCATCACCATCACGGATCCATGGATCAGACATATTCTCTGGAGTCATTCC	52
<i>gdhA</i> -R	AGGTCGACCCGGGGTACCGAGCTCTTAAATCACACCCTGCGCCAGC	46
<i>glnA</i> -F	GGTGCCGCGCGGCAGCCATATG ATGTCCGCTGAACACGTACTG	43
<i>glnA</i> -R	TTAGACGCTGTAGTACAGCTCAAACCTCTCTCGAGCACCACCACCACCA	48
<i>amtB</i> -F	TCACCATCACCATCACGGATCCATGAAGATAGCGACGATAAAAACTGGGC	50
<i>amtB</i> -R	TGCAGGTGACCCGGGGTACCGAGCTCTTACGCGTTATAGGCATTCTCGCC	51
<i>gltBD</i> -F	GCATCACCATCACCATCACGGATCCATGTTGTACGATAAATCCCTTGAGAGGG	53
<i>gltBD</i> -R	AGGTCGACCCGGGGTACCGAGCTCTTAAACTTCCAGCCAGTTCATAATACCGT	53
<i>gntT</i> -up-F	GTTACGCCATTCTGCAATTTGGC	23
<i>gntT</i> -up-R	GATTACCTGGCCTTTCATTGTTATGG	28
<i>gntT</i> -down-F	AAATGAAAGGCCAGGTAAATCTAACACTGACTGCCGGATGCG	42
<i>gntT</i> -down-R	CTGGGAGTGCGGGGATCTAA	20
<i>gntT</i> -N20-F	AGAGTACTTTAACCTGACTATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	44
<i>gntT</i> -N20-R	ATAGTCAGGTTAAAGTACTCTACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTG	52

1.2 方法

1.2.1 重组菌株构建

基因敲除与整合采用 CRISPR-Cas9 技术, 重组质粒的构建采用一步同源重组法进行, 基因 *gdhA*、*glnA*、*gltBD*、*amtB*、*nirB*、*nirD* 以

E. coli MG1655 基因组为模板, 通过 PCR 扩增获得。来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的基因 *nasC*、*nasB*、*malA*、*malP* 以 *B. subtilis* 168 基因组为模板, 通过 PCR 扩增获得。本研究所用其他基因均由苏州金唯智生物科技有限公司

进行密码子优化及合成。

1.2.2 培养方法

种子培养：于保藏甘油管中吸取 200 μ L 菌液，移入装有 50 mL LB 培养基的三角瓶中，37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养 8 h。

摇瓶发酵：将发酵培养基中初始糖浓度调整至 50 g/L，以 15%接种量将种子培养液接种于装有 70 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中，37 $^{\circ}$ C、190 r/min 培养 36 h，发酵过程中每 4 h 用氨水调整 pH。

发酵罐发酵：采用 5 L 全自动搅拌发酵罐进行发酵，发酵初始装液量为 2 L，将种子液以 15%接种量(体积分数)接种至发酵培养基中，发酵温度为 37 $^{\circ}$ C，调整初始转速 400 r/min，通入 100%无菌干燥空气进行发酵，过程中通过调整搅拌转速及通气速率维持溶解氧浓度 30%–40%，通过流加氨水将 pH 维持在 6.70–6.80 之间，通过调整硫酸铵流加速率控制氨氮浓度，通过调整葡萄糖流加速率控制残糖浓度，共发酵 36 h。

1.2.3 分析检测方法

转化率计算：转化率=总产酸(g)/总耗糖(g) \times 100%=[产酸浓度(g/L) \times 下罐体积(L)]/总耗糖(g) \times 100%。

L-赖氨酸检测：取发酵液 1 mL，12 000 r/min 离心 2 min 后取上清稀释至合理倍数，使用乙氧基亚甲基丙二酸二乙酯(diethyl ethoxymethylene malonate, DEEMM)衍生 L-赖氨酸，衍生体系包括 4.5 μ L DEEMM、70.5 μ L 蒸馏水、150 μ L 甲醇、450 μ L 硼酸缓冲液。衍生后混合物经 0.22 μ m 过滤，使用 HPLC 系统进行分析，使用 Agilent-C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)，柱温 35 $^{\circ}$ C，流速 1 mL/min，流动相由 100%乙腈(A)和 pH 4.80 的 25 mmol/L 乙酸钠(B)组成。

细胞浓度检测：取细胞培养液，稀释至 OD_{562} 为 0.20–0.80 之间，通过紫外分光光度计

检测其在波长 562 nm 下吸光度。

糖浓度检测：葡萄糖采用 SBA-40E 生物传感分析仪检测(深圳市希尔曼生物技术有限公司)，麦芽糖、潘糖、异麦芽糖采用 ICS-3000 离子色谱仪检测。 NH_4^+ 采用 E-10 离子分析仪检测。

有机酸检测：HPLC 法检测乙酸、乳酸、琥珀酸、酮戊二酸、柠檬酸，取发酵液 2 mL，12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，使用 Aminex HPX-87H (300 mm \times 7.8 mm, 9 μ m)色谱柱进行检测，检测波长 210 nm，柱温 52 $^{\circ}$ C，流动相为 5 mmol/L 稀硫酸。

2 结果与分析

2.1 L-赖氨酸生产菌 XC1 底物利用效率评估

为了得到 L-赖氨酸高产菌株，以实验室保藏的 L-赖氨酸生产菌株 *E. coli* M2019435 为底盘，借助 CRISPR 基因编辑技术在基因组上增加 *aspC*、*lysC*、*asd*、*dapA*、*dapB* 的拷贝数，增强 L-赖氨酸合成路径，得到突变菌株 XC1。如图 1E 所示，其在 5 L 发酵罐中菌体浓度、L-赖氨酸产量、产率和生产强度为 19.20 g/L、145.00 g/L、60.25%和 4.03 g/(L \cdot h)。

如表 3 所示，工业葡萄糖原料除了含有 97.498%葡萄糖外，还含有一定的麦芽糖、潘糖、异麦芽糖等二糖和三糖成分。甜菜糖蜜中则含有约 50%的蔗糖及约 1%的果糖^[14]。以不同二糖和三糖为唯一碳源，菌株 XC1 的生长性能和 L-赖氨酸产量如图 1A、1C 所示。菌株 XC1 在 2.00 g/L 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、潘糖、异麦芽糖、果糖为唯一碳源时的最大细胞干重(dry cell weight, DCW)分别为 0.91、0.38、0.15、0.05、0.05、0.35 g/L；L-赖氨酸产量分别为 1.17、0.75、0.33、0、0、0.32 g/L。这一结果表明：(1) 菌株 XC1 都能利用二糖和三糖进行生长；(2) 但与以葡萄糖为碳源进行比较，以蔗糖、麦芽糖、

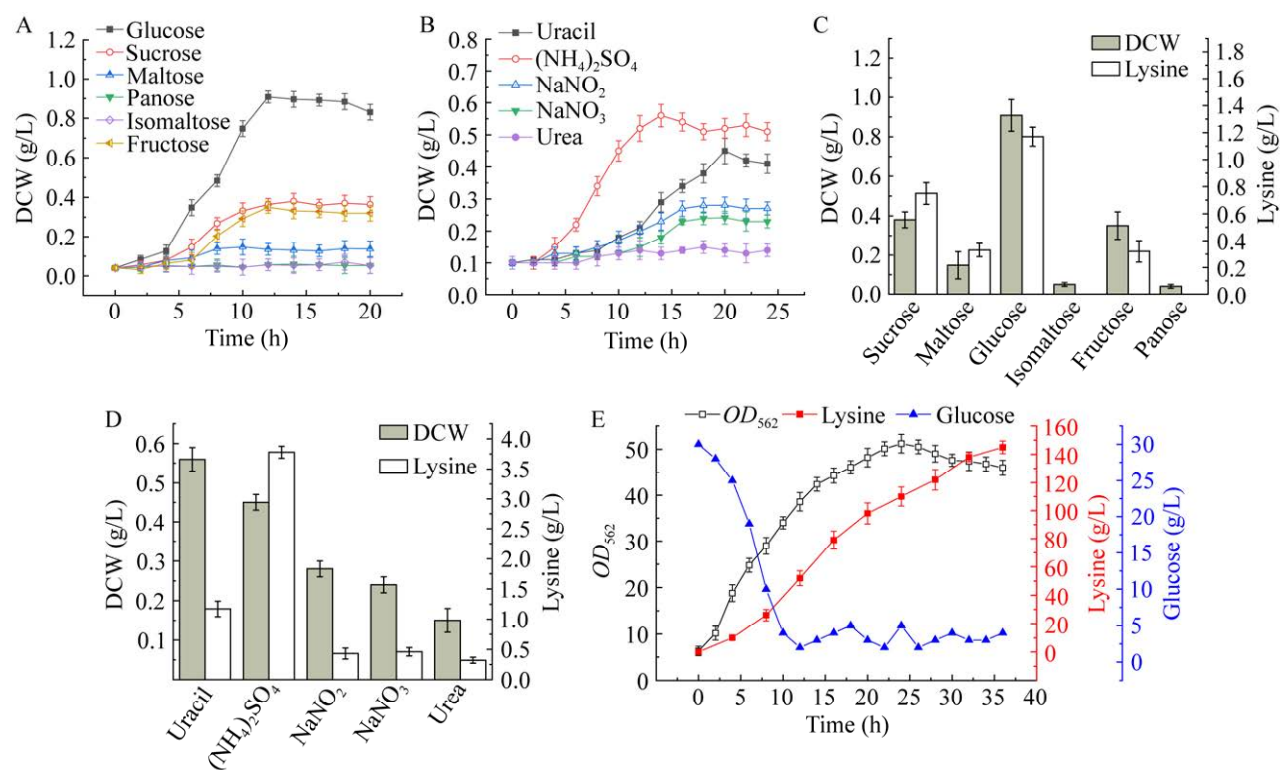


图 1 不同碳氮源对菌株 XC1 生长性能和 L-赖氨酸产量的影响 A: XC1 菌株在不同碳源上的生长情况. B: XC1 菌株在不同氮源上的生长情况. C: XC1 菌株在不同碳源上的 L-赖氨酸生产情况. D: XC1 菌株在不同氮源上的 L-赖氨酸生产情况. E: 5 L 发酵罐中 XC1 菌株的生产指标

Figure 1 Effect of different carbon and nitrogen sources on the growth performance and L-lysine production of strain XC1. A: Dry cell weight of XC1 on different carbon sources. B: Dry cell weight of XC1 on different nitrogen sources. C: L-lysine production of XC1 on different carbon sources. D: L-lysine production of XC1 on different nitrogen sources. E: Production performance of the XC1 in 5L fermentor.

表 3 葡萄糖原料成分及占比情况

Table 3 Components and proportions of glucose raw materials

Component	Proportion (%)
Glucose	97.498
Maltose	0.939
Panose	0.550
Isomaltose	0.944
Other	0.069

果糖为碳源时菌株 XC1 生长性能分别降低了 58.20%、83.50%、61.50%，而 L-赖氨酸产量分别降低了 35.80%、71.70%和 72.60%，表明菌株 XC1 利用蔗糖、麦芽糖、果糖的能力相对较

差；(3) 以潘糖、异麦芽糖为碳源时，菌株 XC1 生长停滞，几乎不产 L-赖氨酸，表明菌株 XC1 不能利用异麦芽糖和潘糖。

菌株 XC1 对不同氮源的利用能力如图 1B、1D 所示，在分别以 5.00 g/L 尿嘧啶、(NH₄)₂SO₄、NaNO₂、NaNO₃、尿素为唯一氮源时，菌株 XC1 的 DCW 分别为 0.56、0.45、0.28、0.24、0.15 g/L；L-赖氨酸产量分别为 1.17、3.78、0.43、0.46、0.32 g/L。其中，以(NH₄)₂SO₄为氮源时，菌株 XC1 的 DCW 分别比以尿嘧啶、NaNO₂、NaNO₃、尿素为氮源低 24.44%、高 96.00%、高 133.33%和高 273.33%，L-赖氨酸产量高 223.08%、778.34%、

720.32%和1 071.25%。这一结果表明,菌株XC1对 NH_4^+ 形式的氮源具有较高的利用效率,而对 NO_2^- 和 NO_3^- 形式的氮源利用效率较差。

2.2 代谢工程改造菌株XC1提高碳源利用效率

为了提高菌株XC1对麦芽糖的利用能力,

通过敲除转录抑制因子基因*mhc*,解除*mhc*对麦芽糖操纵子的阻遏调控^[15],获得工程菌株XC2(XC1- Δmhc)。如图2A、2D所示,与菌株XC1相比,工程菌株XC2最大DCW、麦芽糖消耗速率比菌株XC1分别提高了73.33%(0.15 g/L提高到0.26 g/L)和4.43倍[15.50 mg/(L·h)提高

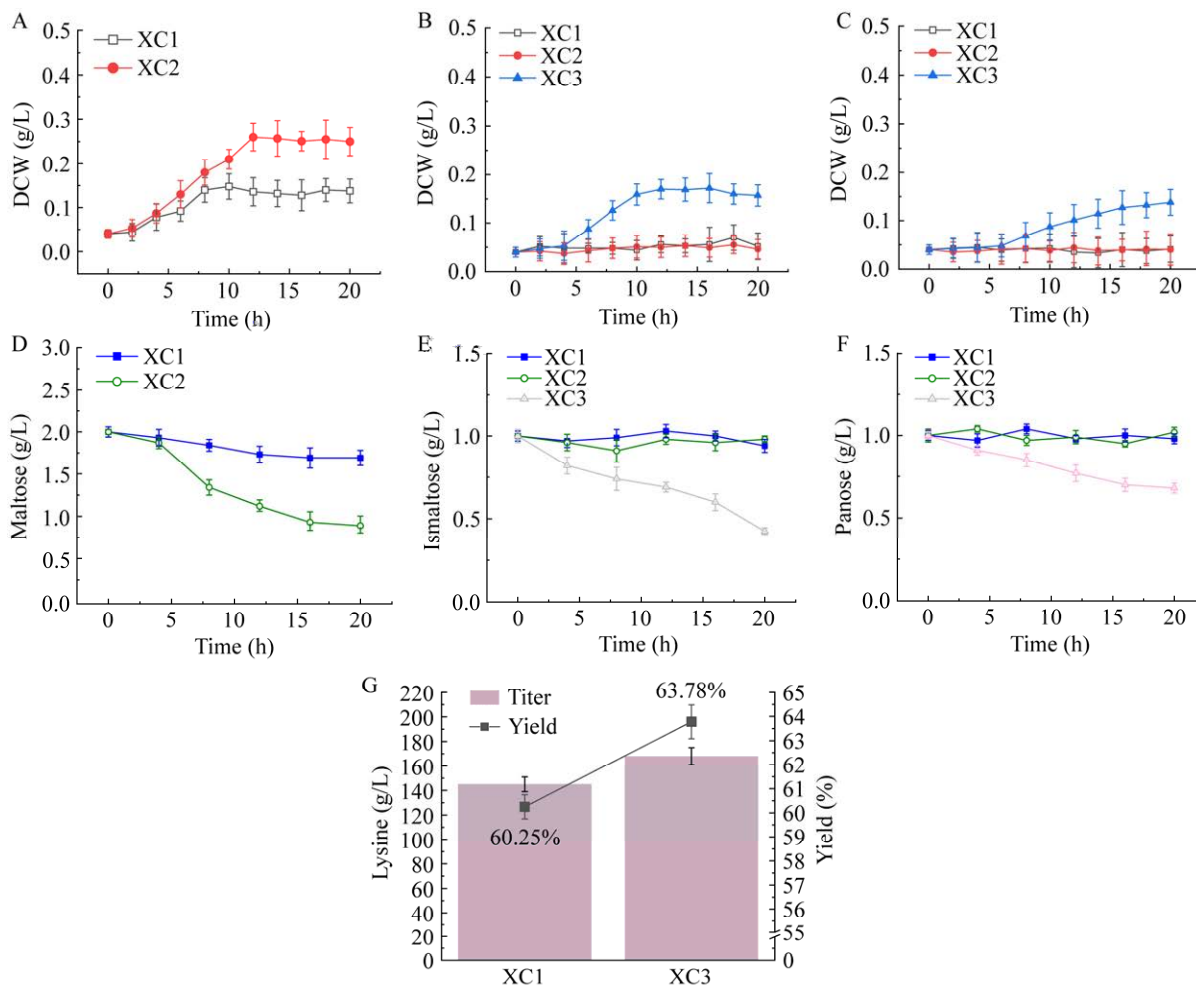


图2 不同菌株对麦芽糖、异麦芽糖、潘糖的利用能力比较 A: XC1 和 XC2 菌株在麦芽糖培养基上的生长情况. B: XC1、XC2 和 XC3 菌株在异麦芽糖培养基上的生长情况. C: XC1、XC2 和 XC3 菌株在潘糖培养基上的生长情况. D: 各重组菌株的麦芽糖消耗速率. E: 各重组菌株的异麦芽糖消耗速率. F: 各重组菌株的潘糖消耗速率. G: 重组菌株间 L-赖氨酸产量及转化率比较

Figure 2 Comparison of the utilization abilities of maltose, isomaltose and panose by different strains. A: Growth of XC1 and XC2 on maltose culture medium. B: Growth of XC1, XC2 and XC3 on isomaltose culture medium. C: Growth of XC1, XC2 and XC3 on panose culture medium. D: Maltose consumption rate of recombinant strains. E: Isomaltose consumption rate of recombinant strains. F: Panose consumption rate of recombinant strains. G: Comparison of L-lysine production and yield in recombinant strains.

到 68.75 mg/(L·h)]。为了进一步提高菌株对异麦芽糖及潘糖的利用,在工程菌株 XC2 的赖氨酸脱羧酶 2 的 *cadA* 位点上整合表达来源于 *B. subtilis* 的 α -磷酸-葡萄糖苷酶基因 *malA* 和丙酮酸依赖型麦芽糖磷酸转移酶亚基基因 *malP*^[16], 获得菌株 XC3 (XC2- $\Delta cadA::malAP$)。在以异麦芽糖为唯一碳源时(图 2B、2E), 工程菌株 XC3 最大 DCW 和异麦芽糖消耗速率分别提高到 0.18 g/L 和 28.75 mg/(L·h)。以潘糖为唯一碳源时(图 2C、2F), 工程菌株 XC3 最大 DCW 和潘糖消耗速率分别提高到 0.13 g/L 和 15.04 mg/(L·h)。将工程菌株 XC3 于 5 L 发酵罐中进行 L-赖氨酸发酵生产, 结果如图 2G 所示, 工程菌株 XC3 的 L-赖氨酸产量、转化率和生产强度为 160.00 g/L、63.78%和 4.44 g/(L·h), 比菌株 XC1 提高了 10.34%、5.86%和 10.17%。上述结果表明, 通过改造菌株 XC1 的碳底物利用途径, L-赖氨酸生产菌株对麦芽糖、异麦芽糖、潘糖等二糖和三糖的利用效率显著提高, 同时也提高了 L-赖氨酸糖酸转化率和生产强度。

2.3 代谢工程改造大肠杆菌提高无机氮利用效率

L-赖氨酸分子结构中含有 2 个氨基, 每生成 1 mol 赖氨酸需要 2 mol NH_4^+ 参与^[3], 因此, 氮源供应对进一步提高 L-赖氨酸合成效率具有重要意义。为了提高工程菌株 XC3 对 NH_4^+ 的利用效率, 在菌株 XC3 中分别过表达铵转运蛋白 AmtB (*amtB* 编码)、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH) (*gdhA* 编码)、谷氨酸合成酶 GOGAT (*gltBD* 编码)和谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) (*glnA* 编码)^[17-19], 得到重组菌株 XC3-1、XC3-2、XC3-3、XC3-4, 实验结果如图 3B 所示: (1) 在菌株 XC3 中过表达 4 种氮代谢基因均能提升菌株生长性能, 其中菌株 XC3-2 (过表达 *gdhA*) 的 DCW 达到

13.20 g/L, 比菌株 XC3、XC3-1 (过表达 *amtB*)、XC3-3 (过表达 *gltBD*)和 XC3-4 (过表达 *glnA*)分别提高 17.80%、17.60%、11.40%和 6.40%; (2) 摇瓶发酵中菌株 XC3-2 L-赖氨酸产量达到 38.20 g/L, 比菌株 XC3、XC3-1、XC3-3 和 XC3-4 分别提高了 47.50%、25.00%、48.02%和 10.96%。这一结果表明, 通过强化谷氨酸脱氢酶增强 NH_4^+ 进入大肠杆菌代谢路径的效率, 能有效地提高菌株的生长性能和 L-赖氨酸合成能力。

甜菜糖蜜作为 L-赖氨酸发酵的重要原料, 含有 3%–6%硝酸盐, 是潜在的可利用氮源^[20]。为了提高 L-赖氨酸生产菌株对硝酸盐的利用率, 在菌株 XC3-2 中构建硝酸盐同化路径^[21], 促使硝酸盐经亚硝酸盐转化成 NH_4^+ 而被菌株所利用(图 3A)。这一硝酸盐利用途径需要硝酸盐还原酶(nitrate reductase, NAS)和亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, NIR)^[22], 借助 BRENDA 数据库(<https://www.brenda-enzymes.org/>)和 KEGG 数据库(<https://www.kegg.jp/>), 发现来源于 *B. subtilis* 的 *BsNasBC* 和 *E. coli* 的 *EcNirBD* 比酶活最高, 为 2.160 U/mg 和 3.540 U/mg (表 4、表 5, 图 3C、3D)。将催化两步反应的酶进行两两组合, 通过测定 NH_4^+ 生成量评估催化能力。结果表明, *BsNasBC* 和 *EcNirBD* 与 2 mmol/L NaNO_3 共反应, 共生成 215 $\mu\text{mol/L}$ NH_4^+ (图 3E), 分别比其他组合高 19.40%、667.00%、438.00%、467.00%、448.00%和 382.00%, 是构建硝酸盐同化路径的最优组合。将 *BsNasBC*、*EcNirBD* 导入 XC3-2 菌株, 得到突变菌株 XC4, 检测菌株在 0、10、25、50、100 mmol/L NaNO_3 为唯一氮源时的生长情况, 结果如图 3F 所示。菌株 XC4 能够在 10、25 和 50 mmol/L 的硝酸盐培养基上生长, 最大 DCW 分别为 0.57、0.55 和 0.37 g/L; 但无法在 0 mmol/L 以及 100 mmol/L 的硝酸盐培养基上进行生长。上述结果表明, 成功构建了一株氮源利用效率提

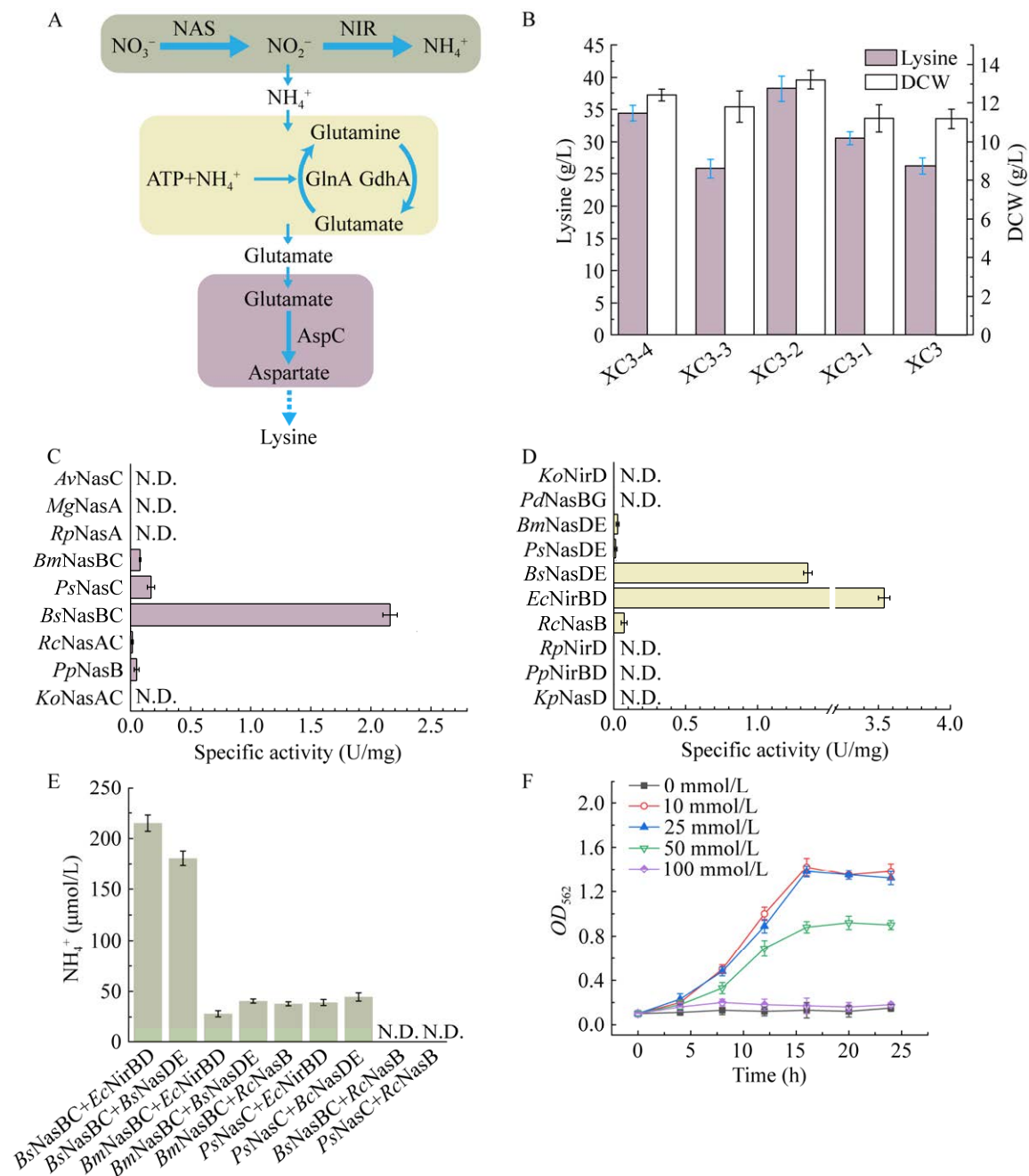


图3 强化无机氮源利用路径的构建与评估 A: 硝酸盐同化路径示意图. B: 重组菌株生产性能比较. C: 硝酸盐还原酶酶活比较. D: 亚硝酸盐还原酶酶活比较. E: 不同硝酸盐同化路径酶组合的 NH_4^+ 生产情况. F: XC4 菌株在不同浓度硝酸盐中的生长情况

Figure 3 Contruction and evaluation for enhancing the utilization of inorganic nitrogen sources. A: Schematic diagram of nitrate assimilation pathway. B: Growth and production situation of recombinant strains. C: Comparison of nitrate reductase activities. D: Comparison of nitrite reductase activities. E: Comparison of NH_4^+ production by various enzyme combinations. F: Comparison of growth of XC4 in culture media with different concentrations of nitrate. N.D. represents not detected.

表 4 硝酸盐还原酶表达情况及比酶活参数

Table 4 Expression status and specific enzyme activity parameters of nitrate reductases

Designation	Expression status	Specific activity (U/mg)
<i>KoNasAC</i>	Insoluble	Inactive
<i>PpNasB</i>	Insoluble	0.051
<i>RcNasAC</i>	Insoluble	0.015
<i>BsNasBC</i>	Soluble	2.160
<i>PsNasC</i>	Soluble	0.170
<i>BmNasBC</i>	Soluble	0.080
<i>RpNasA</i>	Non-expression	Inactive
<i>MgNasA</i>	Non-expression	Inactive
<i>AvNasC</i>	Non-expression	Inactive

表 5 亚硝酸盐还原酶表达情况及比酶活参数

Table 5 Expression status and specific enzyme activity parameters of nitrite reductases

Designation	Expression status	Specific activity (U/(mg))
<i>KoNirD</i>	Insoluble	Inactive
<i>PpNirBD</i>	Insoluble	Inactive
<i>RpNirD</i>	Insoluble	Inactive
<i>RcNasB</i>	Insoluble	0.072
<i>EcNirBD</i>	Soluble	3.540
<i>BsNasDE</i>	Soluble	1.350
<i>PsNirBD</i>	Soluble	0.012
<i>BmNasDE</i>	Soluble	0.027
<i>PdNasBG</i>	Non-expression	Inactive
<i>KpNasD</i>	Non-expression	Inactive

表 6 不同残糖条件下 L-赖氨酸发酵参数的比较

Table 6 Comparison of L-lysine fermentation parameters under varying residual sugar conditions

Parameter	Glucose (g/L)				(D/A-1)×100%	(D/B-1)×100%	(D/C-1)×100%
	10.00	5.00	2.00	0.50			
	(A)	(B)	(C)	(D)			
Culture time (h)	36.00	36.00	36.00	36.00	0.00	0.00	0.00
Maximum DCW (g/L)	19.30	20.00	18.80	18.40	-4.66	-8.00	-2.12
Titer of lysine (g/L)	175.00	172.00	177.00	188.00	7.42	9.30	6.21
Yield of lysine on glucose (%)	64.46	65.61	68.32	69.44	1.70	0.52	1.02
Productivity (g/(L·h))	4.86	4.78	4.92	5.22	8.50	13.80	10.30
Titer of lysine on DCW	9.07	8.60	9.41	10.22	13.70	23.80	12.60
Consumption of glucose (g)	684.00	655.00	647.00	676.00	-1.16	3.20	4.48
Consumption of glucose on DCW	35.44	32.75	34.41	36.70	3.55	12.06	6.65

高且能利用硝酸盐为氮源的 L-赖氨酸生产菌株 XC4。通过初始添加甜菜糖蜜及流加硫酸铵的方式供给氮源,在 5 L 发酵罐上评估了菌株 XC4 的生产性能, L-赖氨酸产量、产率和生产强度分别达到 175.00 g/L、68.32%和 4.86 g/(L·h),比出发菌株 XC1 提高了 20.69%、13.39%和 20.60%。

2.4 优化发酵过程碳氮比提高 L-赖氨酸产量

发酵过程中残糖浓度对发酵过程中副产物的生成具有重要影响,残糖过高会导致乳酸、乙酸等副产物积累,从而降低转化率;残糖过低,则会导致细胞生长受限,降低生产强度^[23]。在 5 L 发酵罐上研究了不同残糖浓度(10.00、5.00、2.00、0.50 g/L)对菌株 XC4 发酵生产 L-赖氨酸的影响,结果如表 6、图 4 所示。将残糖控制在 0.50 g/L 时, L-赖氨酸产量达到 188.00 g/L,比控制在 10.00、5.00、2.00 g/L 分别提高了 7.43%、9.30%、6.21%。转化率达到 69.44%,比控制在 10.00、5.00、2.00 g/L 分别提高了 7.73%、5.84%、1.64%。而此时发酵液中的副产物乙酸、柠檬酸、丙氨酸、酮戊二酸、乳酸等显著降低。从上述结果可知,控制残糖处于 0.50 g/L 时,菌株的 L-赖氨酸生产效率最高。

L-赖氨酸($C_6H_{14}N_2O_2$)合成不同于丙氨酸、苏氨酸、色氨酸等氨基酸的合成:每合成 1 分

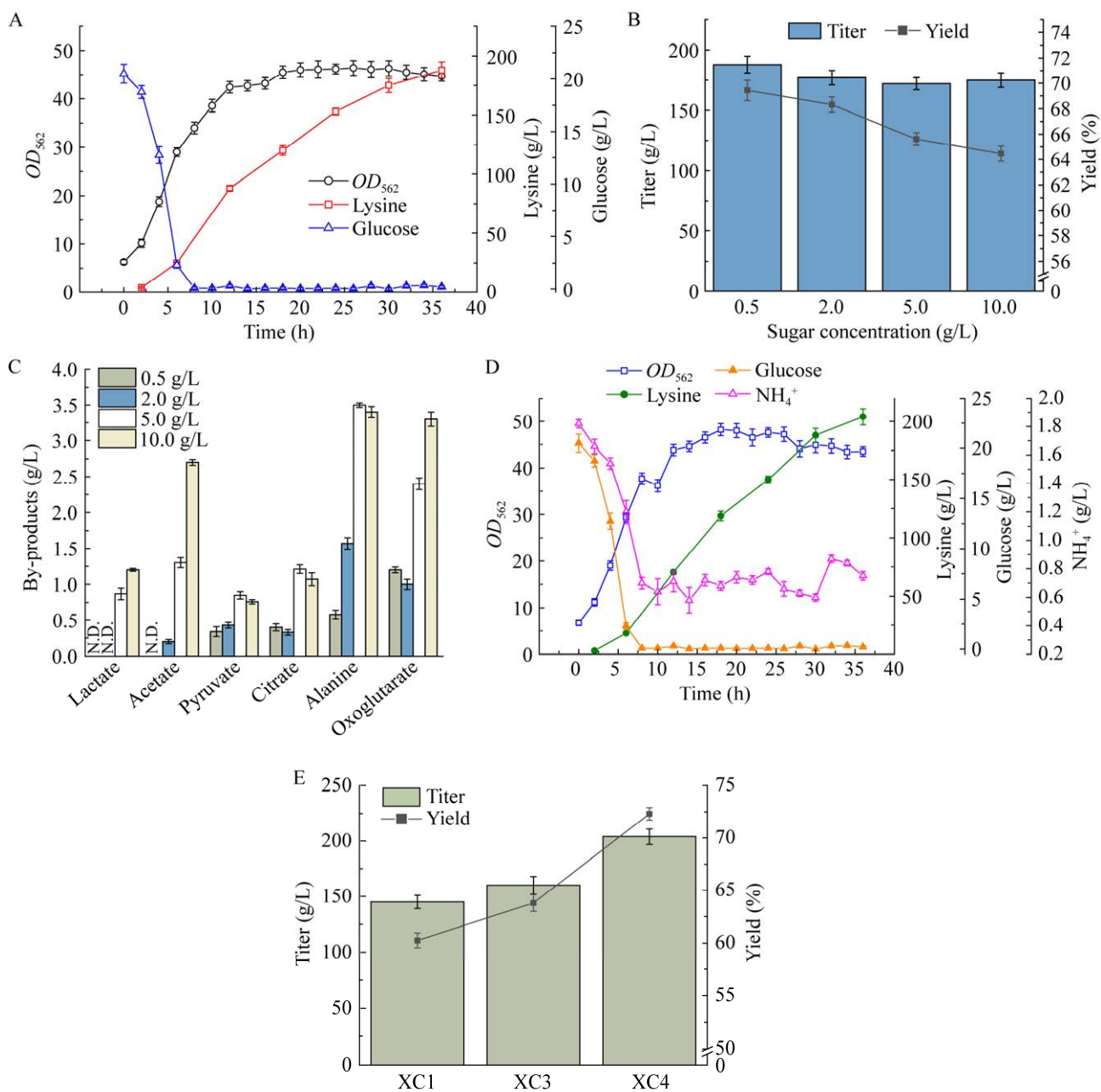


图4 XC4菌株在5 L发酵罐中的生长和L-赖氨酸生产情况 A: XC4在5 L发酵罐中的发酵过程曲线. B: XC4在不同糖浓度下的L-赖氨酸产量和转化率比较. C: XC4在不同糖浓度下的副产物积累情况. D: 碳氮比优化后的XC4发酵过程曲线. E: 各重组菌株最大产量及转化率

Figure 4 Growth characteristics and L-lysine production of strain XC4 in a 5 L fermenter. A: Fermentation process curve of strain XC4 in a 5 L fermentation tank. B: Comparison of yield and titer of XC4 under different sugar concentrations. C: Accumulation of by-products of XC4 under different sugar concentrations. D: Fermentation process curve of optimized XC4. E: Maximum titer and yield of each recombinant strain. N.D. represents not detected.

子 L-赖氨酸需要 1 分子葡萄糖及 2 分子 NH_4^+ 参与, 这一特点表明控制发酵液中碳氮比十分重要, 因此, 在确定最优糖浓度 0.50 g/L 的基础上, 通过维持不同氨氮浓度(0.25–0.50、0.50–1.00、1.00–1.50、1.50–2.00 g/L), 使发酵过程中碳氮比分别处于 2:1–1:1、1:1–1:2、1:2–1:3、1:3–1:4, 研究了不同碳氮比对菌株 XC4 生产 L-赖氨酸的影响, 结果如图 4C–4E 和表 7 所示: (1) 控制碳氮比 1:1–1:2 之间时, L-赖氨酸产量由 188.00 g/L 提高至 204.00 g/L, 提高了 8.51%。(2) 转化率由 69.44%提高至 72.32%, 提高了 4.18%。(3) 单位细胞 L-赖氨酸生产能力提高至 11.20, 提高了 9.80%。(4) 生产强度由 5.22 g/(L·h)提高至 5.67 g/(L·h), 提高了 8.62%。(5) 乳酸、乙酸、丙酮酸、柠檬酸、酮戊二酸等积累量均降至 1.50 g/L 以下。上述结果表明, 通过优化补料策略维持碳氮比在 1:1–1:2 之间, 实现碳氮源的适量供应, 能够有效提升 XC4 菌株的 L-赖氨酸产量及转化率, 降低副产物积累, 从而提高 L-赖氨酸生产效率。

3 讨论与展望

大肠杆菌利用碳源底物的途径主要有: (1) 磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)将葡萄糖转运至胞内进行利用。(2) 通过激活麦芽糖操纵子(*malATQ*)表达, 将麦芽糖转

运至胞内并进一步分解为单糖进行利用。但上述 2 个碳源利用途径都受到全局调控因子 Mlc 调控^[13], PTS 系统葡萄糖转运酶 EIICB 在转运葡萄糖时会螯合 Mlc 蛋白而失活, 抑制葡萄糖转运效率^[14]; 同时, Mlc 还会通过结合麦芽糖操纵子转录激活因子 MalT, 抑制麦芽糖操纵子的表达^[15], 限制大肠杆菌对麦芽糖的高效利用。本研究以实验室保藏菌株为底盘细胞, 首次在 L-赖氨酸生产菌株中敲除了转录调控因子基因 *mlc*, 弱化 Mlc 蛋白对 EIIBC 和麦芽糖操纵子的阻遏作用, 得到的突变菌株 *E. coli* XC2 麦芽糖消耗速率提高了 4.43 倍。进一步通过引入来源于 *B. subtilis* 的 *malAP*^[24], 强化 *E. coli* XC2 对异麦芽糖、潘糖等三糖的利用, 得到了菌株 *E. coli* XC3, *E. coli* XC3 L-赖氨酸产量提升至 160.00 g/L, 转化率提升至 63.78%。

L-赖氨酸和 L-精氨酸的高效合成都需要充足的氮源供应。在 L-精氨酸高产菌株构建中, 通过代谢工程改造氮源供应是一个有效的策略, 如在 L-精氨酸生产菌 *C. glutamicum* SDNN403 中过表达谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 使精氨酸产量提高了 41.50%^[25]; 在 *C. crenatum* 中强化铵转运蛋白基因 *amtB* 表达, 将精氨酸产量提高了 35.14%^[26]。在本研究中, 为了进一步提高 L-赖氨酸生产菌的氮代谢路径效率, 通过过表达谷氨酸脱氢酶基因 *gdhA*, 得到了 *E. coli*

表 7 不同碳氮比条件下 L-赖氨酸发酵参数比较

Table 7 Comparison of L-lysine fermentation parameters under different carbon to nitrogen ratios

Parameter	Carbon nitrogen ratio				(B/A–1)×100%	(B/C–1)×100%	(B/D–1)×100%
	2:1–1:1 (A)	1:1–1:2 (B)	1:2–1:3 (C)	1:3–1:4 (D)			
Maximum DCW (g/L)	19.80	18.20	18.40	21.10	–7.07	–1.09	–12.70
Titer of lysine (g/L)	175.00	204.00	188.00	170.00	16.50	8.51	20.00
Yield of lysine on glucose (%)	68.71	72.32	69.44	66.11	5.28	4.17	9.42
Productivity (g/(L·h))	4.86	5.67	5.22	4.72	16.67	8.62	20.12
Titer of lysine on DCW	8.83	11.20	10.20	8.05	26.80	9.80	39.13

XC3-2, 此菌株在摇瓶发酵上的 L-赖氨酸产量比出发菌株提高了 55.10%。为了提高 *E. coli* XC3-2 对其他氮源(硝态氮)的利用, 首次在大肠杆菌中构建了硝酸盐同化路径^[27-28], 得到菌株 *E. coli* XC4 能够利用 NO_3^- 、 NO_2^- 为氮源, 最终, 在 5 L 发酵罐上经过残糖浓度优化和碳氮比优化, *E. coli* XC4 生产强度达到 5.67 g/(L·h), L-赖氨酸产量达 204.00 g/L, 糖酸转化率达到 72.32%。

虽然通过改造碳源、氮源代谢路径得到的 *E. coli* XC4 菌株相比菌株 XC1 的 L-赖氨酸产量和转化率分别提高了 40.69% 和 20.03%, 但仍与理论转化率(81.00%)存在较大差距。因此, 在传统代谢工程改造的基础上, 亟须开发全新策略, 例如: (1) 构建谷氨酸棒杆菌-大肠杆菌混合发酵体系以蔗糖为碳源生产 L-赖氨酸^[29]; (2) 通过 DNA 复制工程加速 DNA 突变频率, 缩短实验室适应性进化周期^[30-31], 同时结合高通量菌株筛选方法^[32-33], 提高高产菌株筛选效率; (3) 针对发酵后期发酵液中渗透压高、产物毒性等问题, 开发抗逆元件提高菌株抗逆性能^[34], 都能进一步提高 L-赖氨酸的产量和转化率。

REFERENCES

- [1] WENDISCH VF. Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 58: 17-34.
- [2] DO CARMO FÉLIX FK, LETTI LAJ, de MELO PEREIRA GV, BONFIM PGB, SOCCOL VT, SOCCOL CR. L-lysine production improvement: a review of the state of the art and patent landscape focusing on strain development and fermentation technologies[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(8): 1031-1055.
- [3] YING HX, HE X, LI Y, CHEN KQ, OUYANG PK. Optimization of culture conditions for enhanced lysine production using engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(8): 3835-3843.
- [4] YE C, LUO QL, GUO L, GAO C, XU N, ZHANG L, LIU LM, CHEN XL. Improving lysine production through construction of an *Escherichia coli* enzyme-constrained model[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(11): 3533-3544.
- [5] LIU J, OU Y, XU JZ, RAO ZM, ZHANG WG. L-lysine production by systems metabolic engineering of an NADPH auto-regulated *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 387: 129701.
- [6] WU WJ, ZHANG Y, LIU DH, CHEN Z. Efficient mining of natural NADH-utilizing dehydrogenases enables systematic cofactor engineering of lysine synthesis pathway of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 77-86.
- [7] KAJSIKOVA M, KAJSIK M, DRAHOVSKA H, BUKOVSKA G. Complete genome sequence of the industrial L-lysine production strain [*Brevibacterium*] *flavum* CCM 251[J]. *Biologia*, 2022, 77(5): 1423-1428.
- [8] XU JZ, HAN M, REN XD, ZHANG WG. Modification of aspartokinase III and dihydrodipicolinate synthetase increases the production of L-lysine in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 114: 79-86.
- [9] PIAO XY, WANG L, LIN BX, CHEN H, LIU WF, TAO Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of L-aspartate and its derivative β -alanine with high stoichiometric yield[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 244-254.
- [10] 郭亮, 高聪, 柳亚迪, 陈修来, 刘立明. 大肠杆菌生产饲用氨基酸的研究进展[J]. *合成生物学*, 2021, 2(6): 964-981.
- [11] GUO L, GAO C, LIU YD, CHEN XL, LIU LM. Advances in bioproduction of feed amino acid by *Escherichia coli*[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(6): 964-981 (in Chinese).
- [12] KIKUCHI Y, KOJIMA H, TANAKA T. Mutational analysis of the feedback sites of lysine-sensitive aspartokinase of *Escherichia coli*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 173(1): 211-215.
- [13] D'ESTE M, ALVARADO-MORALES M, ANGELIDAKI I. Amino acids production focusing on fermentation technologies-a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 14-25.
- [14] KIM SY, NAM TW, SHIN D, KOO BM, SEOK YJ, RYU S. Purification of Mlc and analysis of its effects on the *pts* expression in *Escherichia coli*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(36): 25398-25402.
- [15] ROCHA S, MARZIALETTI T, KOPP M, CEA M. Reaction mechanism of the microwave-assisted synthesis of 5-hydroxymethylfurfural from sucrose in sugar beet molasses[J]. *Catalysts*, 2021, 11(12): 1458.
- [16] LENGSELD C, SCHÖNERT S, DIPPEL R, BOOS W. Glucose- and glucokinase-controlled *mal* gene expression in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009,

- 191(3): 701-712.
- [16] YAMAMOTO H, SERIZAWA M, THOMPSON J, SEKIGUCHI J. Regulation of the *glv* operon in *Bacillus subtilis*: YfiA (GlvR) is a positive regulator of the operon that is repressed through CcpA and cre[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(17): 5110-5121.
- [17] MIYAKOSHI M. Multilayered regulation of amino acid metabolism in *Escherichia coli*[J]. Current Opinion in Microbiology, 2024, 77: 102406.
- [18] YANG ZM, HAN YL, MA Y, CHEN QH, ZHAN YH, LU W, CAI L, HOU MS, CHEN SF, YAN YL, LIN M. Global investigation of an engineered nitrogen-fixing *Escherichia coli* strain reveals regulatory coupling between host and heterologous nitrogen-fixation genes[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 10928.
- [19] KUMAR R, SHIMIZU K. Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *gdhA*, *glnL*, *gltB*, *gdhD* mutants under different carbon and nitrogen limitations in the continuous culture[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9: 8.
- [20] BIRKE RR, CAUSON T, TURETSCHKE R, EMERSTORFER F, KARNER T, DOMIG KJ, HANN S. Requirements for accurate quantification of nitrate and nitrite in molasses: insights from an interlaboratory comparison[J]. Food Control, 2022, 134: 108712.
- [21] SHI WW, LU W, LIU QL, ZHI YE, ZHOU P. The identification of the nitrate assimilation related genes in the novel *Bacillus megaterium* NCT-2 accounts for its ability to use nitrate as its only source of nitrogen[J]. Functional & Integrative Genomics, 2014, 14(1): 219-227.
- [22] CHEN X, LIU CM, ZHU BL, WEI WX, SHENG R. The contribution of nitrate dissimilation to nitrate consumption in *narG*- and *napA*-containing nitrate reducers with various oxygen and nitrate supplies[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(6): e0069522.
- [23] XU JZ, YU HB, HAN M, LIU LM, ZHANG WG. Metabolic engineering of glucose uptake systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(7): 937-949.
- [24] ABE K, KURODA A, TAKESHITA R. Engineering of *Escherichia coli* to facilitate efficient utilization of isomaltose and panose in industrial glucose feedstock[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(5): 2057-2066.
- [25] GUO J, MAN ZW, RAO ZM, XU MJ, YANG TW, ZHANG X, XU ZH. Improvement of the ammonia assimilation for enhancing L-arginine production of *Corynebacterium crenatum*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(3): 443-451.
- [26] XU MJ, LI J, SHU QF, TANG M, ZHANG X, YANG TW, XU ZH, RAO ZM. Enhancement of L-arginine production by increasing ammonium uptake in an AmtR-deficient *Corynebacterium crenatum* mutant[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(8): 1155-1166.
- [27] LUQUE-ALMAGRO VM, GATES AJ, MORENO-VIVIÁN C, FERGUSON SJ, RICHARDSON DJ, ROLDÁN MD. Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation[J]. Biochemical Society Transactions, 2011, 39(6): 1838-1843.
- [28] SPARACINO-WATKINS C, STOLZ JF, BASU P. Nitrate and periplasmic nitrate reductases[J]. Chemical Society Reviews, 2014, 43(2): 676-706.
- [29] SGOBBA E, STUMPF AK, VORTMANN M, JAGMANN N, KREHENBRINK M, DIRKS-HOFMEISTER ME, MOERSCHBACHER B, PHILIPP B, WENDISCH VF. Synthetic *Escherichia coli*-*Corynebacterium glutamicum* consortia for L-lysine production from starch and sucrose[J]. Bioresource Technology, 2018, 260: 302-310.
- [30] WANG XW, LI QG, SUN CM, CAI Z, ZHENG XM, GUO X, NI XM, ZHOU WJ, GUO YM, ZHENG P, CHEN N, SUN JB, LI Y, MA YH. GREACE-assisted adaptive laboratory evolution in endpoint fermentation broth enhances lysine production by *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 106.
- [31] 刘佳, 郭亮, 罗秋玲, 陈修来, 高聪, 宋伟, 刘立明. 细胞寿命在大肠杆菌细胞工厂构建中的应用[J]. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1277-1286.
- LIU J, GUO L, LUO QL, CHEN XL, GAO C, SONG W, LIU LM. Application of chronological lifespan in the construction cell factories[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(4): 1277-1286 (in Chinese).
- [32] WANG Y, LI QG, ZHENG P, GUO YM, WANG LX, ZHANG TC, SUN JB, MA YH. Evolving the L-lysine high-producing strain of *Escherichia coli* using a newly developed high-throughput screening method[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2016, 43(9): 1227-1286.
- [33] 丁爽, 陈修来, 高聪, 宋伟, 吴静, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 模块化工程改造大肠杆菌生产 L-色氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2359-2374.
- DING S, CHEN XL, GAO C, SONG W, WU J, WEI WQ, LIU J, LIU LM. Modular engineering of *Escherichia coli* for high-level production of L-tryptophan[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2359-2374 (in Chinese).
- [34] SÉVIN DC, SAUER U. Ubiquinone accumulation improves osmotic-stress tolerance in *Escherichia coli*[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10: 266-272.

(本文责编 陈宏宇)