

• 关键核心技术 •

王钰 博士，中国科学院天津工业生物技术研究所研究员。主要从事工业微生物的基因编辑育种和碳一原料的生物转化研究，以第一或通信作者在 *Nature Communication*、*Trends Biotechnology*、*Metabolic Engineering*、*ACS Synthetic Biology* 等期刊发表论文 30 余篇，申请专利 30 余项。入选国家优青、中科院特聘研究员、中科院青年创新促进会、《麻省理工科技评论》亚太区“35 岁以下科技创新 35 人”和“伦世仪教育基金”杰出青年学者等，曾获 DaSilva Award 和明治生命科学奖等荣誉。



氨基酸生物传感器的开发及应用研究进展

蒲伟^{1,2}，陈久洲^{1,2}，王钰^{1,2*}，郑平^{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

蒲伟，陈久洲，王钰，郑平，孙际宾. 氨基酸生物传感器的开发及应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2485-2501.
PU Wei, CHEN Jiuzhou, WANG Yu, ZHENG Ping, SUN Jibin. Advances of development and application amino acid biosensors[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2485-2501.

摘 要：氨基酸是蛋白质的基本组成单元，对人和动物的营养健康十分重要，广泛应用于饲料、食品、医药和日化等领域。目前，氨基酸主要通过微生物发酵可再生原料生产，氨基酸产业是我国生物制造的重要支柱产业之一。氨基酸菌株主要通过随机诱变和代谢工程改造结合筛选获得。菌株生产水平进一步提高的核心限制之一是缺乏高效、快速和准确的筛选方法，因此，发展氨基酸菌株的高通量筛选方法对关键功能元件挖掘及高产菌株的创制筛选至关重要。本文综述了氨基酸生物传感器的设计，及其在功能元件、高产菌株的高通量进化筛选和代谢途径动态调控中的应用研究进展，讨论了现有氨基酸生物传感器存在的问题和性能提升改造策略，并展望了开发氨基酸衍生物生物传感器的重要性。

关键词：氨基酸；生物传感器；高通量筛选；适应性进化；动态调控；高产菌株

资助项目：国家重点研发计划(2019YFA0904900)；中国科学院青年创新促进会(2021177)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904900) and the Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (2021177).

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

Received: 2022-12-14; Accepted: 2023-02-19; Published online: 2023-02-22

Advances of development and application amino acid biosensors

PU Wei^{1,2}, CHEN Jiuzhou^{1,2}, WANG Yu^{1,2*}, ZHENG Ping^{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: Amino acids are the basic building blocks of protein that are very important to the nutrition and health of humans and animals, and widely used in feed, food, medicine and daily chemicals. At present, amino acids are mainly produced from renewable raw materials by microbial fermentation, forming one of the important pillar industries of biomanufacturing in China. Amino acid-producing strains are mostly developed through random mutagenesis- and metabolic engineering-enabled strain breeding combined with strain screening. One of the key limitations to further improvement of production level is the lack of efficient, rapid, and accurate strain screening methods. Therefore, the development of high-throughput screening methods for amino acid strains is very important for the mining of key functional elements and the creation and screening of hyper-producing strains. This paper reviews the design of amino acid biosensors and their applications in the high-throughput evolution and screening of functional elements and hyper-producing strains, and the dynamic regulation of metabolic pathways. The challenges of existing amino acid biosensors and strategies for biosensor optimization are discussed. Finally, the importance of developing biosensors for amino acid derivatives is prospected.

Keywords: amino acid; biosensor; high-throughput screening; adaptive laboratory evolution; dynamic regulation; hyper-producing strain

氨基酸是蛋白质的基本组成单元，是一类具有重要应用价值的生物基产品。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%，食品氨基酸约占市场份额的 30%，药用、化妆品和其他用途氨基酸约占市场份额的 15%^[1]。2021 年全球氨基酸产量超过 1 000 万 t，其中我国氨基酸产量超过 600 万 t，2026 年全球氨基酸产值预计将达到 296 亿美元，年复合增长率将达 6%–8%^[2]。

高水平的工业菌株被认为是氨基酸生物制造的“芯片”。诱变筛选和代谢工程改造是创制氨基酸生产菌株，并持续提升菌株性能的常用

技术手段。但是，由于对工业菌株生理和代谢调控机制的理解有限，缺乏有效的高产改造靶点，菌种生产水平的进一步提高愈加困难，亟需新技术新方法。随着合成生物技术和代谢工程朝着标准化、自动化和系统化的方向发展，可以在短时间内设计构建大量的工程菌株^[3]，因此急需准确且高通量的检测方法评价工程菌株的性能并筛选高产菌株。

生物传感器(biosensor)是一种将化合物浓度转化为电信号、荧光信号等易于检测的信号装置，包含信号识别元件和信号输出元件，可实现特定化合物的精确和高通量检测^[4]。基于该优势，生物传感器可辅助菌株的适应性进

化(adaptive laboratory evolution, ALE), 用于功能元件和菌株的高通量筛选(high-throughput screening)、代谢途径的优化与动态调控(dynamic regulation)、细胞成像(cell imaging)等^[5-6]。近年来, 国内外的研究者在氨基酸生物传感器的设计构建、性能提升改造及应用开展了大量研究, 并取得了重要的进展。本文首先介绍了氨基酸生物传感器的种类和工作原理, 总结了近年来氨基酸传感器的挖掘、设计、构建、应用的研究进展, 并讨论了目前氨基酸生物传感器存在的问题及潜在解决方案, 展望了开发氨基酸衍生物生物传感器的重要性。

1 氨基酸生物传感器的分类及工作原理

氨基酸生物传感器是一类专一性识别氨基酸的生物传感器^[7], 可分为基于转录调控因子(transcription factor, TF)、核糖体开关(riboswitch)、蛋白质相互作用[例如荧光共振能量转移(förster resonance energy transfer, FRET)], 以及蛋白质翻译元件的生物传感器等几种类型, 其工作原理和机制如图1所示。

第一类是基于TF及其调控结合的启动子构建的生物传感器, 以L-赖氨酸等碱性氨基酸的生物传感器为例: 当细胞内的氨基酸浓度较低时, 转录调控因子LysG不能与L-赖氨酸结合, 其所调控的报告基因不能表达; 当胞内的L-赖氨酸达到一定的浓度时, LysG与L-赖氨酸结合, 导致LysG蛋白构象发生变化, 与其调控的启动子结合, 启动荧光蛋白等报告基因的转录, 从而产生荧光等信号, 是一种诱导激活型的生物传感器(图1A)^[9]。当然也存在阻遏型的生物传感器, 例如L-精氨酸的生物传感器, 当细胞内的L-精氨酸浓度较低时, 转录调控因子ArgR不能与L-精氨酸结合, 调控的报告基因表

达; 当细胞内的L-精氨酸浓度升高时, ArgR与L-精氨酸结合, 使ArgR构象发生变化, 进而结合到调控基因的启动子上, 阻遏报告基因表达^[10]。

第二类是基于mRNA 5'端非编码区的核糖开关(riboswitch)构建的生物传感器, 比如L-天冬氨酸激酶LysC的mRNA, 当胞内的L-赖氨酸较高时, mRNA 5'端的核糖体开关能够结合L-赖氨酸, 此时对应的核糖体结合位(ribosome binding site, RBS)形成颈环结构, 核糖体不能与之结合, 抑制下游基因表达; 当细胞内的L-赖氨酸较低时, 不能与核糖体开关结合, 核糖开关的构象发生变化, 释放出RBS, 进而核糖体与RBS结合, 启动下游报告基因表达^[11], 这是一种典型的抑制型核糖体开关(图1B)。当然, 也存在激活型的核糖体开关^[12-13]。

第三类是基于蛋白相互作用构建的生物传感器, 这种生物传感器一般由3个蛋白组分构成, 中间部分是效应物结合蛋白, 结合效应物小分子后能够发生构象变化, 从而使两端的两个荧光蛋白距离靠近, 其中一个荧光蛋白受到激发后将能量转移给另外一个荧光蛋白, 当两个荧光蛋白距离较远时能量无法传递, 从而可以根据荧光变化检测效应物小分子浓度(图1C)^[14]。

第四类是近年来新发展的基于蛋白质翻译元件的生物传感器, 主要有基于稀有密码子、氨酰tRNA合成酶和tRNA等3类。基于稀有密码子的传感器工作原理为: 在荧光蛋白基因或抗生素抗性基因序列中增加稀有密码子的数量, 稀有密码子的翻译受到稀有的氨酰tRNA量的限制, 当胞内的氨基酸浓度较低时, 氨酰tRNA合成受限, 导致荧光或抗性报告基因低水平表达; 外源添加氨基酸或增强内源氨基酸合成, 可提高稀有密码子的翻译速度, 从而提高报告基因的表达水平, 使细胞输出更强的荧光信号或具有更强的抗生素抗性^[15]。基于氨酰

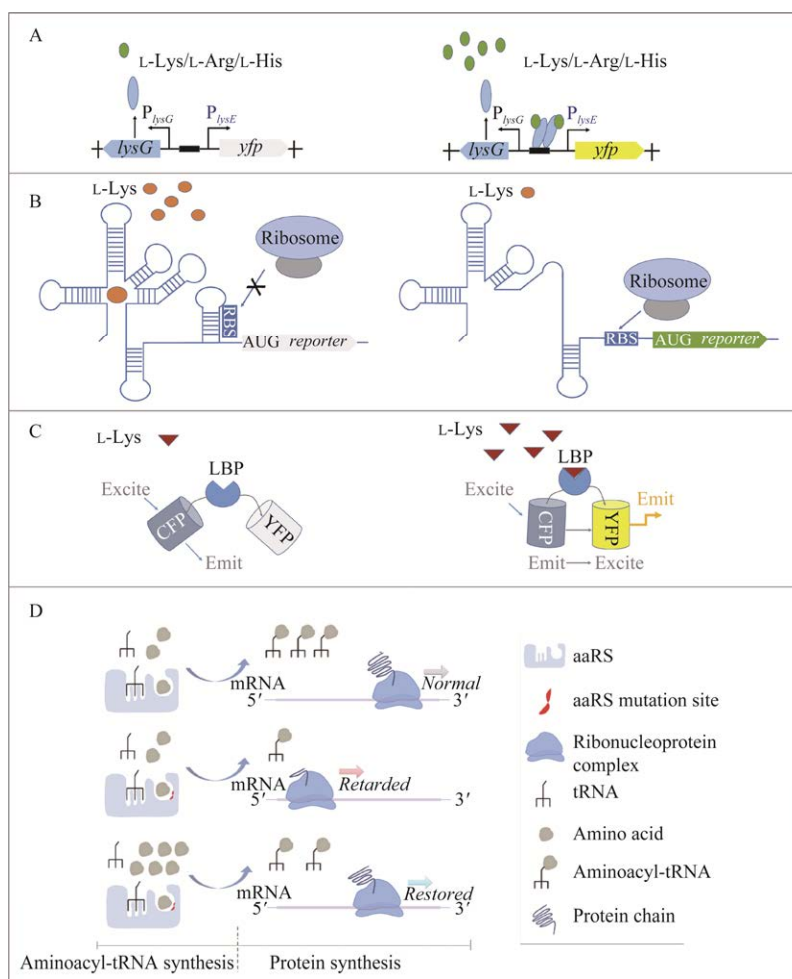


图1 氨基酸生物传感器及其工作原理 A: 基于转录调控因子的生物传感器. B: 基于核糖体开关的生物传感器. C: 基于荧光共振能量转移系统的生物传感器. D: 基于蛋白质翻译元件的生物传感器^[8]

Figure 1 The working principles of different types of amino acid biosensors. A: The biosensor based on transcription factor (TF). When the intracellular concentration of effectors such as the alkaline amino acids is elevated, the TF LysG binds to the effector L-Lys and the complex binds to the *lysE* promoter to initiate the transcription of downstream gene. B: The biosensor based on riboswitch. When the intracellular concentration of effectors such as L-Lys is elevated, the aptamer of riboswitch binds to the effector L-Lys and undergoes structural change. The ribosome binding site (RBS) forms senior structure and the transcript of downstream gene cannot be translated. C: The biosensor based on Förster resonance energy transfer (FRET). FRET-based biosensors consist of a donor domain (cyan fluorescent protein, CFP) and an acceptor domain (yellow fluorescent protein, YFP) which links to the N- and C-termini of the ligand-binding protein (LBP), respectively. When the effector L-Lys binds to the LBP, a conformation change shortens the distance between the donor and acceptor domains. The wavelength emitted by the donor domain excites the acceptor domain and produces detectable fluorescent signals. D: The biosensor based on translation machinery. Aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS) specifically recognizes its corresponding amino acid and tRNA to generate corresponding aminoacyl-tRNA. Certain mutations in the amino acid-binding domain of aaRS can reduce the affinity to its corresponding amino acid and slow down the translation process and hinder cell growth. When the intracellular concentration of corresponding amino acid is elevated, the aaRS variant with poor affinity can synthesize enough aminoacyl-tRNAs and cell growth can be compensated. Figure 1D was adopted from the paper by Sun, et al^[8].

tRNA 合成酶和 tRNA 构建的传感器工作原理与基于稀有密码子的类似,通过突变氨酰 tRNA 合成酶,使其对氨基酸的亲合力大幅降低,影响蛋白质的合成速度,进而与细胞的生长速度关联起来(图 1D)^[8];同样也可以修饰改造 tRNA 的反密码子区域,使其与氨基酸之间氨酰化反应速度降低,影响蛋白质合成和细胞生长,从而将胞内氨基酸浓度信号转化为易于检测的细胞生长速度信号^[16]。

2 氨基酸生物传感器及其应用

由于氨基酸市场需求日益增长,开发高效、准确、快速的菌株筛选方法对加快氨基酸工业菌株的设计构建和迭代升级尤为重要,氨基酸生物传感器在其中发挥了重要的作用(表 1)。根据氨基酸的结构和性质,氨基酸可分为支链氨基酸、芳香族氨基酸、碱性氨基酸等。同类型的氨基酸因为具有相似的结构和性质,通常共用一种生物传感器。为了方便比较一类氨基酸的各类型生物传感器的应用效果,下面将分类介绍支链氨基酸、芳香族氨基酸、碱性氨基酸及其他氨基酸的生物传感器的开发和应用案例。

2.1 支链氨基酸的生物传感器

支链氨基酸包括 L-缬氨酸、L-亮氨酸和 L-异亮氨酸。Lrp 是谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中响应支链氨基酸和 L-甲硫氨酸的转录调控因子,并根据氨基酸浓度变化激活外排蛋白 BrnFE 的表达,以维持胞内正常的氨基酸浓度^[40]。Mustafi 等^[21]以 Lrp 为感应蛋白(sensory protein),以增强的黄色荧光蛋白(enhanced yellow fluorescent protein, eYFP)作为报告系统,构建了可监测胞内 L-缬氨酸浓度的生物传感器。之后,研究者将该生物传感器应用于从随机突变文库中筛选可胞外积累支链氨基酸的突变菌株^[18-21],以及在单细胞水平监测

细胞的 L-缬氨酸合成能力差异^[20]。Mahr 等^[19]使用该生物传感器将胞内的 L-缬氨酸浓度转化为 eYFP 的表达量,在 ALE 中,通过荧光激活的细胞分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)筛选荧光信号较高的细胞,通过 5 代进化和筛选,获得了 L-缬氨酸产量提升一倍的突变菌株,并鉴定到脲酶辅助蛋白 UreD 的关键突变位点。Stella 等^[41]在谷氨酸棒杆菌中利用 P_{brnFE} 启动子调控生长必需基因的表达,建立了菌株的生长速度与胞内的 L-缬氨酸浓度的正向关联,并对该菌株进行 ALE,经过多次的传代后,作者发现生长速率提高菌株的氨基酸产量并没有提高,测序发现传感器的启动子发生了突变,导致了假阳性菌株的出现;为了减少假阳性,作者利用 P_{brnFE} 启动子同时调控生长必需基因和 *eyfp* 基因的表达,结合 FACS 和平板生长筛选,获得了若干 L-缬氨酸产量提高的菌株,并通过基因组测序发现了关键的突变基因。Lai 等^[42]进一步对 Lrp 调控的 P_{brnFE} 启动子进行突变,获得了对 L-异亮氨酸响应增强的启动子突变体,用于动态调控胞内 L-异亮氨酸的浓度,从而提高 4-羟基-L-异亮氨酸的合成。由于感应蛋白 Lrp 可以同时响应 3 种结构类似的支链氨基酸,在特定支链氨基酸菌株高通量筛选过程中,容易引入假阳性菌株,未来可以借助蛋白质工程和高通量筛选方法对转录因子 Lrp 的响应特异性进行改造,获得可以专一性响应某一种支链氨基酸的 Lrp 突变体。

除了基于 Lrp 的支链氨基酸生物传感器,近期, Sun 等^[8]利用氨基酸底物亲和性改变的 L-异亮氨酰 tRNA 合成酶突变体,偶联胞内 L-异亮氨酸浓度与细胞的生长速度,开发了新型的特有的 L-异亮氨酸生物传感器,可有效实现 L-异亮氨酸高产菌种的进化筛选。相比于基于 Lrp 的生物传感器,该生物传感器仅识别 L-异

表 1 氨基酸生物传感器及其应用案例^aTable 1 Summary of amino acid biosensors and their applications^a

Sensor	Type	Source	Effector	Signal	Application	References
Lrp	TF	<i>C. glutamicum</i>	L-valine, L-isoleucine, L-leucine, L-methionine	eYFP, GFP, TetA	HTS, ALE, dynamic regulation	[17-21]
TyrR	TF	<i>E. coli</i>	L-phenylalanine, L-tryptophan, L-tyrosine	GFP	HTS	[22-23]
TrpR1 ^{V58E}	TF	<i>E. coli</i>	L-tryptophan	GFP	No	[24]
TrpR1 ^{V58K}	TF	<i>E. coli</i>	5-hydroxytryptophan	GFP	No	[24]
LysG	TF	<i>C. glutamicum</i>	L-lysine, L-arginine, L-histidine	eYFP	HTS, dynamic regulation	[9,25-28]
LysG ^{A219L}	TF	<i>C. glutamicum</i>	L-histidine	eYFP	HTS	[29]
LysG ^{E123Y/E125A}	TF	<i>C. glutamicum</i>	L-lysine	Red pigment	HTS	[30]
LysG ^{E58V}	TF	<i>C. glutamicum</i>	L-lysine, L-arginine, L-histidine	eYFP	HTS, dynamic regulation	[31]
ArgP	TF	<i>E. coli</i>	L-arginine, L-canavanine	eYFP	No	[32]
ArgP	TF	<i>E. coli</i>	L-arginine	Kan ^R	HTS	[33]
ArgR	TF	<i>C. crenatum</i>	L-arginine	SacB	HTS	[10]
NCgl0581	TF	<i>C. glutamicum</i>	L-serine	eYFP	HTS	[34]
CcdR	TF	<i>P. ananatis</i>	L-cysteine	GFP	HTS	[35]
Ribo-Gly	Riboswitch	<i>C. pasteurianum</i>	glycine	HemB	Dynamic regulation	[36]
Ribo-Lys	Riboswitch	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i>	L-lysine	GltA, LysE	Dynamic regulation	[11-12]
Ribo-Trp	Riboswitch	Artificial construction	L-tryptophan	eYFP	HTS	[37]
LAO-BP	FRET	<i>E. coli</i>	L-lysine	CFP, YFP	Detection	[14]
iGlusnFr	FRET	Artificial construction	L-glutamate	cpGFP	HTS	[38]
Rare codon	Translation	<i>C. glutamicum</i> , <i>E. coli</i>	L-arginine, L-leucine, L-serine, L-proline	Kan ^R	HTS	[15,39]
aaRS	Translation	<i>E. coli</i>	L-isoleucine	Cell growth	HTS	[8]
tRNA	Translation	<i>C. glutamicum</i> , <i>E. coli</i>	L-tryptophan, L-cysteine, L-lysine, L-glutamate, and glycine	Kan ^R , GFP	HTS	[16]

^aHTS: High-throughput screening; ALE: Adaptive laboratory evolution; aaRS: Aminoacyl-tRNA synthetase.

亮氨酸，不响应 L-缬氨酸和 L-亮氨酸，具有特异性高的优势。考虑到 20 种蛋白质氨基酸都具有特异的氨酰 tRNA 合成酶，该工作为其他氨基酸生物传感器的开发提供了一种通用策略。

2.2 芳香族氨基酸的生物传感器

芳香族氨基酸是一类含苯环类的氨基酸，包括 L-苯丙氨酸、L-色氨酸和 L-酪氨酸。TyrR 是大肠杆菌(*Escherichia coli*)中响应芳香族氨基酸的转录调控因子，当胞内的芳香族氨基酸浓度升高时，TyrR 激活相应的外排蛋白表达，

维持胞内芳香族氨基酸的稳态^[43]。Mahr 等^[23]通过在大肠杆菌中构建 2 000 个基因的启动子文库，结合 FACS 的高通量筛选方法，筛选到一个可以响应 L-苯丙氨酸的启动子 P_{mt} ，利用其调控因子 TyrR 作为信号感应蛋白，绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)作为报告系统，构建了 L-苯丙氨酸的生物传感器，并成功应用于 L-苯丙氨酸高产菌株的高通量筛选。Liu 等^[22]利用 TyrR 及其调控的启动子 P_{tyrP} 控制黄色荧光蛋白 YFP 的表达，构建了 L-苯丙氨酸的

生物传感器,应用于 L-苯丙氨酸合成途径关键酶的进化筛选。Gong 等^[24]在大肠杆菌中构建了基于转录调控因子 TrpR1 和 P_{trpO1} 启动子的生物传感器,并通过定向进化技术对 TrpR1 进行改造,获得了响应 L-色氨酸及其衍生物 5-羟基-L-色氨酸的突变体 TrpR1^{V58E} 和 TrpR1^{V58K},并进一步通过对 TrpR1 的 DNA 结合位点 *trpO* 进行序列改造,获得了对效应物响应浓度范围变宽的传感器。

除了以上基于转录调控因子构建的芳香族氨基酸传感器外,Liu 等^[37]在大肠杆菌中以 YFP 作为报告系统,构建了 L-色氨酸的核糖体开关,并成功应用于 L-色氨酸高产菌株的高通量筛选,获得一株产量提高 166%的菌株,并通过基因组测序鉴定了相应的高产靶点。最近 Guo 等^[16]对 tRNA 关键结构进行修饰,降低氨酰基-tRNA 合成酶催化 tRNA 的氨酰化水平,开发了基于蛋白质翻译元件的新型氨基酸生物传感器。作者通过在荧光蛋白基因或抗生素抗性基因序列中加入密码子 UAG,与正常的 tRNA 相比,相应的氨酰基-tRNA 合成酶对修饰后的 tRNA_{CAU} 的识别催化能力大幅降低,当胞内的氨基酸浓度较低时,氨酰 tRNA 合成受限,导致荧光或抗性报告基因低水平表达。外源添加氨基酸或增强内源氨基酸合成,可提高蛋白质的翻译速度,从而提高报告基因的表达水平,使细胞输出更强的荧光信号或具有更强的抗生素抗性。利用该原理,作者设计了 L-色氨酸、L-半胱氨酸、L-谷氨酸、L-赖氨酸和甘氨酸等 5 种氨基酸的生物传感器,通过基于生长和/或 FACS 的筛选,分别从大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌的随机突变库中筛选出相应氨基酸的高产菌。该研究提供了一种蛋白质氨基酸生物传感器构建的通用策略,结合密码子拓展策略,有望设计构建非天然氨基酸(non-canonical amino acids, ncAA)

的生物传感器。

2.3 碱性氨基酸的生物传感器

碱性氨基酸包括 L-组氨酸、L-精氨酸和 L-赖氨酸。LysG 是谷氨酸棒杆菌中响应碱性氨基酸的转录调控因子,当胞内碱性氨基酸浓度升高时,LysG 可激活外排蛋白 LysE 的表达,启动相应氨基酸外排,以维持胞内碱性氨基酸的稳态^[28]。Binder 等^[9]使用 LysG 和 eYFP 构建了 L-赖氨酸生物传感器,鉴定了其对胞内 L-赖氨酸的线性响应范围为 5–25 mmol/L,并通过 FACS 从随机突变文库中筛选获得了 L-赖氨酸产生菌株,通过基因组测序鉴定了关键突变位点。该生物传感器还被用于筛选 L-赖氨酸、L-精氨酸和 L-组氨酸合成关键酶的突变体文库,获得了解除反馈抑制和催化活性提升的突变体^[26–27]。Stella 等^[25]将基于 LysG 和 eYFP 构建的生物传感器应用于需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)中,通过 FACS 从随机突变文库中筛选到 L-赖氨酸、L-精氨酸和 L-组氨酸产生菌株。

近期,Pu 等^[31]为了进一步提升 L-赖氨酸生物传感器的性能,对 LysG 进行了改造。通过对效应物结合域(effector binding domain, EBD)和 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)间的柔性铰链区(linker helix, LH)进行定向进化,筛选获得了效应物特异性不变,但响应输出信号更强和操作范围更宽的 LysG 突变体。利用 LysG 突变体构建的 L-赖氨酸生物传感器,在 L-赖氨酸合成关键酶的高通量筛选和代谢途径的动态调控中展示出更佳的应用效果。该研究为 TF 型氨基酸生物传感器的性能提升提供了一种新的策略。

由于 LysG 同时响应 3 种碱性氨基酸,效应物特异性较差,且 LysG 对 3 种碱性氨基酸的响应亲和力差别较大,对 L-组氨酸的亲和力比 L-精氨酸和 L-赖氨酸的亲和力高两个数量级^[29],难

以应用于某一种碱性氨基酸高产菌株的精准筛选。针对该问题, Della Corte 等^[29]解析了 LysG 及其与 L-精氨酸复合体的晶体结构;通过分子对接,分别计算模拟出 LysG 与 3 种碱性氨基酸的结合位点,进一步通过组合定点突变文库构建结合 FACS 高通量筛选方法,经过 3 轮正筛和反筛后,获得了一个只响应 L-组氨酸,而不响应 L-赖氨酸和 L-精氨酸的突变体 LysG^{A219L},并利用该突变体构建了 L-组氨酸生物传感器,筛选到若干可以提高 L-组氨酸产量的关键酶突变体。最近 Liu 等^[30]利用类似的策略,筛选到一个只响应 L-赖氨酸,而不响应 L-精氨酸和 L-组氨酸的突变体 LysG^{E123Y/E125A},利用该突变体及其调控的启动子 P_{lysE} 表达番茄红素合成关键基因 *crtI*,构建了专一响应 L-赖氨酸的生物传感器,将谷氨酸棒杆菌胞内的 L-赖氨酸浓度转化成有颜色的番茄红素浓度;进一步通过对 P_{lysE} 启动子的改造和表达 L-赖氨酸转运蛋白 LysE,将该生物传感器对 L-赖氨酸的响应浓度范围提高至 320 mmol/L,最终利用改造后的 L-赖氨酸生物传感器筛选到一株 L-赖氨酸的高产菌株。未来也可通过同样的策略获得更多专一性响应某一种氨基酸的生物传感器。

Nandineni 等^[32]发现来源于大肠杆菌的转录调控因子 ArgP,以 eYFP 作为报告系统,通过胞外添加二肽实验证明了该传感器可响应胞内 L-精氨酸及其类似物 L-刀豆氨酸的浓度变化,进而调控 L-精氨酸外排蛋白 ArgO 的表达,维持胞内 L-精氨酸的稳态。近期 Jiang 等^[33]利用该 TF,以卡那霉素抗性基因作为报告系统,将大肠杆菌胞内的精氨酸浓度转化为细胞的生长信号,结合常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变,筛选到一株产量提高 18.9%的 L-精氨酸高产菌株。Xu 等^[10]利用来源于钝齿棒杆菌(*Corynebacterium*

crenatum)响应 L-精氨酸的转录调控因子 ArgR 及其调控的启动子 P_{argC} ,阻遏调控蔗糖果聚糖酶基因 *sacB* (蔗糖致死基因)的表达,构建了 L-精氨酸的生物传感器,当细胞内的 L-精氨酸浓度较低时,ArgR 不能与 L-精氨酸结合,*sacB* 基因表达,细胞不能在含有蔗糖的培养基上生长;当细胞内的 L-精氨酸浓度升高时,ArgR 与 L-精氨酸结合,使 ArgR 构象发生变化,进而结合到调控的启动子上,阻遏 *sacB* 基因的表达,此时细胞能够在含有蔗糖的培养基上生长。经过菌株突变和蔗糖筛选,获得了 L-精氨酸产量提高 35.0%的菌株。Zheng 等^[15]创新地开发了基于稀有密码子的新型氨基酸生物传感器,以 L-精氨酸为例,在荧光蛋白基因或抗生素抗性基因等报告基因序列中增加大肠杆菌中 L-精氨酸稀有密码子 AGG 的数量,该稀有密码子的翻译受到稀有的 L-精氨酰 tRNA 量的限制,当胞内 L-精氨酸浓度较低时,L-精氨酰 tRNA 合成受限,导致报告基因低水平表达;当添加外源 L-精氨酸或增强内源 L-精氨酸合成时,可提高 L-精氨酰 tRNA 的量,提高稀有密码子的翻译速度,从而提高报告基因的表达水平,使细胞输出更强的荧光信号或具有更强的抗生素抗性。该生物传感器被用于筛选 L-精氨酸、L-亮氨酸、L-丝氨酸和 L-脯氨酸等的合成能力增强的大肠杆菌或谷氨酸棒杆菌,在其他氨基酸生产菌株的筛选中也具有应用前景^[15,39]。

氨基酸生物传感器除了直接应用于相应氨基酸生产菌株的高通量筛选,还可以间接应用于其他化合物合成菌株的进化筛选。例如,Yu 等^[44]构建了高产 4-羟基-L-异亮氨酸的谷氨酸棒杆菌,发现有大量的副产物 L-赖氨酸积累。为了提高目标产物产量,同时减少副产物 L-赖氨酸积累,作者利用 LysG 及其调控的启动子 P_{lysE} 同时调控突变器基因 *cdd* 和荧光蛋

白基因 *eyfp* 的表达, 当细胞内的 L-赖氨酸积累到一定浓度时, 启动突变器基因的表达, 从而使菌株发生随机突变, 同时检测到荧光信号; 相反, 当胞内的 L-赖氨酸浓度降低时, 突变器基因不表达, 同时荧光蛋白信号减弱; 经过多轮的传代和进化筛选后, 作者最终筛选到一株 4-羟基-L-异亮氨酸产量提高了 28.4% 的菌株, 并通过基因组测序, 解析了菌株的高产靶点。

除了上述基于转录调控因子构建的碱性氨基酸生物传感器外, Zhou 等^[11-12]利用来源于大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的调控元件构建了专一性响应 L-赖氨酸的核糖体开关, 应用于 L-赖氨酸合成的竞争途径和转运途径的动态调控, 提高了 L-赖氨酸的产量和糖酸转化率。

2.4 其他氨基酸的生物传感器

除了上述氨基酸生物传感器外, 目前发现的氨基酸生物传感器还有甘氨酸、L-丝氨酸、L-甲硫氨酸、L-半胱氨酸和 L-谷氨酸的传感器。甘氨酸是合成 5-氨基乙酰丙酸的前体化合物之一, Zhou 等^[36]利用来源于巴氏梭状芽孢杆菌(*Clostridium pasteurianum*)的甘氨酸核糖体开关对 5-氨基乙酰丙酸的合成途径进行动态调控, 显著性地提高了 5-氨基乙酰丙酸的产量。Hong 等^[45]利用来源于枯草芽孢杆菌的甘氨酸核糖体开关对甘氨酸合成的关键酶丙氨酸-乙醛酸氨基转移酶进行了进化筛选, 成功筛选到酶活提高的突变体。Zhang 等^[34]利用来源于谷氨酸棒杆菌的转录调控因子 NCgl0581、启动子 $P_{NCgl0580}$ 和 eYFP 构建了 L-丝氨酸生物传感器, 并应用于从随机突变菌株文库中筛选高产 L-丝氨酸的突变株, 最优突变株的产量和转化率较出发菌株分别提高了 35.9% 和 66.7%。Mustafi

等^[21]发现来源于谷氨酸棒杆菌的转录因子 Lrp 除了响应 L-亮氨酸、L-异亮氨酸和 L-缬氨酸外, 同时还响应 L-甲硫氨酸, 且对 L-甲硫氨酸的响应亲和力最高, 未来可以利用其构建 L-甲硫氨酸的生物传感器, 应用于 L-甲硫氨酸高产菌株的高通量筛选。近期 Gao 等^[35]从菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*)中克隆到一个响应 L-半胱氨酸的转录因子 CcdR, 利用其调控的启动子 P_{ccdA} 表达 *gfp*, 构建了 L-半胱氨酸的生物传感器; 对转录因子 CcdR 进行定向进化改造, 获得了对 L-半胱氨酸响应动态范围大幅提高的突变体生物传感器, 最后成功地应用到 L-半胱氨酸合成途径关键酶和高产菌株的高通量筛选, 获得若干可以提高 L-半胱氨酸积累的关键酶突变体和高产菌株。最近, Jian 等^[38]利用一个特殊的 L-谷氨酸结合蛋白 GluBP 连接上一个 GFP 构建了 L-谷氨酸的生物传感器, 其工作原理与前面提到的 FRET 类似, 当谷氨酸达到一定浓度后, 与 GluBP 结合, 进而 GluBP 的构象发生变化, 激发 GFP 发出荧光信号; 最后将该传感器应用到 L-谷氨酸菌株的高通量筛选中, 获得了谷氨酸产量提高 55.4% 的高产菌株。

3 氨基酸前体化合物的生物传感器及其应用

除了直接响应和检测氨基酸的生物传感器, 开发氨基酸合成前体化合物的生物传感器, 也可间接地实现特定氨基酸的检测, 对氨基酸菌株的构建和筛选同样具有重要的意义。如图 2 所示, 20 种蛋白质氨基酸的前体主要位于糖酵解途径(Embden Meyerhof Parnas pathway, EMP)、磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)和三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)等中心代谢途径。PPP 中间

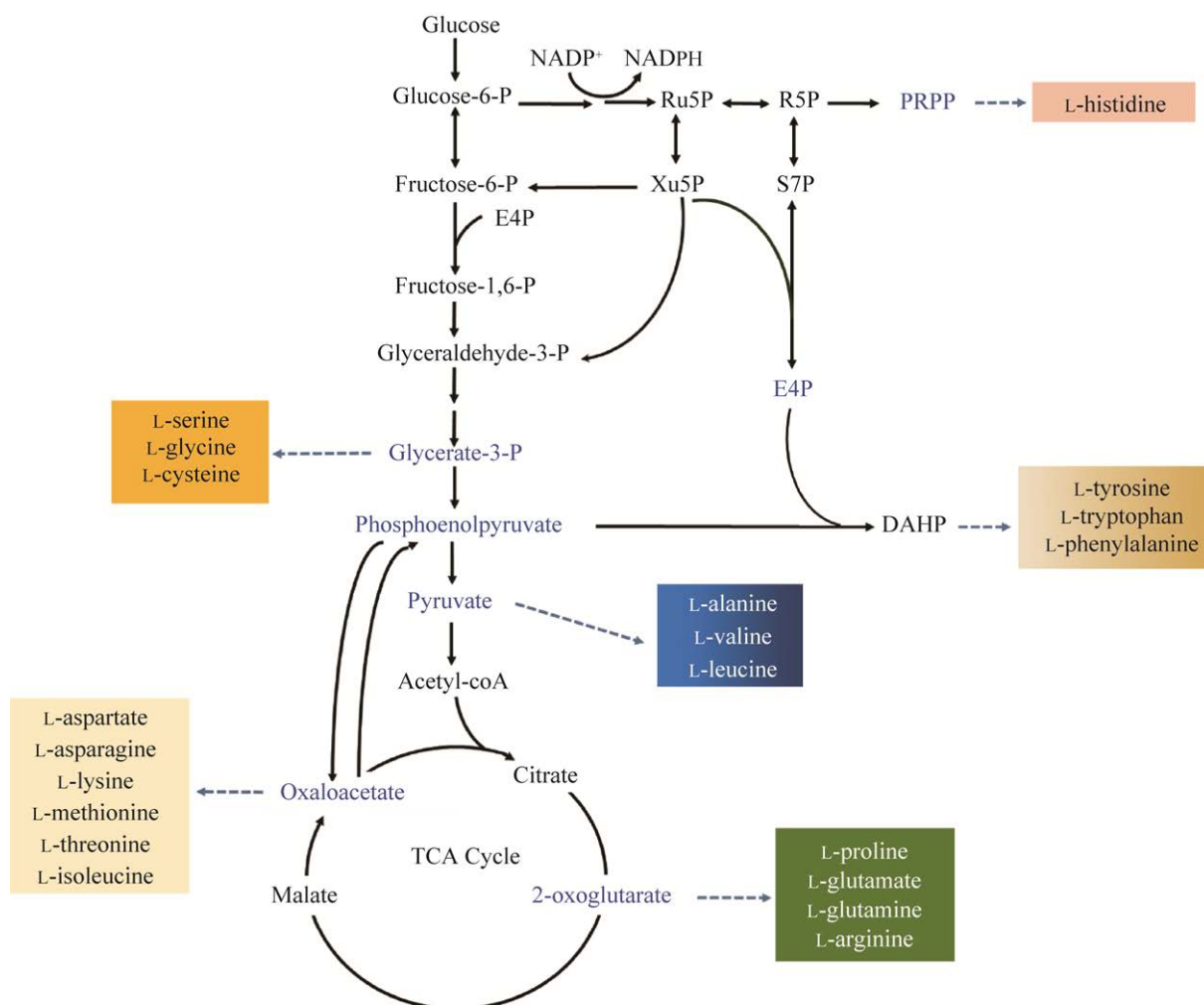


图2 氨基酸及其前体化合物的生物合成途径

Figure 2 Biosynthetic pathway of amino acids and their precursors. The precursors of 20 proteinogenic amino acids are highlighted in blue.

物核糖-5-磷酸(ribose-5-phosphate, R5P)的衍生物 5-磷酸核糖-1-焦磷酸(5-phospho- α -D-ribose-1-diphosphate, PRPP)是 L-组氨酸的合成前体; 以 3-磷酸-甘油酸(glycerate-3-phosphate, 3PG)为前体的氨基酸包括甘氨酸、L-丝氨酸和 L-半胱氨酸; 以磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)和 D-赤藓糖-4-磷酸(D-erythrose-4-phosphate, E4P)为共同前体的氨基酸包括 L-酪氨酸、L-色氨酸和 L-苯丙氨酸; 以丙酮酸(pyruvate)为前体

的氨基酸包括 L-丙氨酸、L-缬氨酸和 L-亮氨酸; 以 TCA 循环中的 2-酮戊二酸(2-oxoglutarate)为前体的氨基酸包括 L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-精氨酸和 L-脯氨酸; 以草酰乙酸(oxaloacetate)为前体的氨基酸包括 L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和 L-异亮氨酸。

近些年, 研究人员设计和构建了上述中心代谢途径中的一些关键化合物的生物传感器, 并成功应用到高产菌株的筛选和代谢途径的动

态调控。例如, Ding 等^[46]基于蛋白配体结构域的稳定性, 构建了 PRPP 的生物传感器。该传感器以人源的次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HGPRT)为配体结合域, 以荧光蛋白为信号输出域, 两者之间通过一段多肽连接。其工作原理是当没有配体小分子 PRPP 时, HGPRT 的配体结合域因没有结合小分子, 结构不稳定导致连接的荧光蛋白降解; 而当小分子 PRPP 存在时, 配体结合域与小分子结合, 结构稳定, 荧光蛋白表达。作者进一步以 HGPRT 蛋白作为模板, 根据配体结合位置重新理性设计活性口袋, 获得可识别 E4P 和 3PG 的突变体; 最后, 结合 FACS 筛选提高了 E4P 生物传感器的响应强度, 并成功应用于筛选高产 L-苯丙氨酸的菌株。未来 3PG 的生物传感器可应用于 3PG 下游氨基酸(甘氨酸、L-丝氨酸和 L-半胱氨酸)合成碳代谢流的动态调控, 以期平衡菌株生长和氨基酸合成所需的碳流, 使更多碳流流向氨基酸合成, 提高氨基酸合成的转化率。这项研究中 3 个化合物的生物传感器均基于同一个蛋白设计而成, 为小分子生物传感器的设计及开发提供了一种策略, 特别是对于无转录调控因子、无合适或未知结合蛋白的分子而言, 提供了一种构建其生物传感元件的方法, 为实时动态监测 EMP 和 PPP 代谢提供了有效方法。

Xu 等^[47]利用大肠杆菌来源的丙酮酸响应转录因子 PdhR, 在枯草芽孢杆菌中设计构建了丙酮酸生物传感器, 进一步通过突变以及改变 PdhR 在启动子上的结合序列与位置, 优化了丙酮酸响应基因回路的动态范围, 获得丙酮酸激活型的基因回路。随后, 研究人员结合反义转录以及高通量筛选技术, 成功获得丙酮酸抑制型的基因回路, 从而获得响应胞内丙酮酸的双功能基因调控回路。最后, 研究人员利用双功

能的丙酮酸生物传感器设计反馈控制系统, 该系统使细胞能够自发地响应胞内丙酮酸浓度, 动态优化中心碳代谢途径的代谢流, 从而将葡萄糖二酸的产量提高了 154%。丙酮酸是连接 EMP 与 TCA 的关键中心代谢物, 其一方面为多种化合物的合成提供碳骨架, 另一方面进入 TCA 为细胞生长提供能量与还原力。因此, 构建响应胞内丙酮酸浓度的生物传感器, 不仅有助于丙酮酸高产菌株以及丙酮酸为前体的高产菌株筛选, 还有助于构建基因回路实现碳中心代谢流的动态控制, 促进中心代谢衍生产物的高效合成。未来可以利用丙酮酸生物传感器对 L-丙氨酸、L-缬氨酸和 L-亮氨酸等合成途径进行动态调控, 驱动代谢流更多地流向目标氨基酸的合成。

Hu 等^[48]利用来源于集胞藻(*Synechocystis*)的转录调控因子 NdhR, 以 GFP 为信号输出, 在大肠杆菌中构建了 2-酮戊二酸的生物传感器, 并对传感器的性能进行了优化改造, 最后利用该生物传感器设计了分子开关对 TCA 循环关键节点柠檬酸合酶 GltA 进行动态调控, 提高了 L-苹果酸合成的转化率。2-酮戊二酸是谷氨酸家族氨基酸合成的共同前体, 将来可进一步利用 2-酮戊二酸生物传感器对 TCA 循环进行动态调控, 以期平衡菌株生长和氨基酸合成所需的碳流, 使更多碳流流向氨基酸合成, 提高氨基酸合成的转化率。最近也有研究人员构建了 EMP 途径另一关键代谢物果糖-1,6-二磷酸(fructose 1,6-bisphosphate, FBP)的生物传感器, 成功应用于胞内 FBP 浓度的监测^[49]及代谢途径的动态调控, 实现了甲羟戊酸的高效合成^[50]。目前还没有关于 PEP 和草酰乙酸生物传感器的报道, 未来可通过数据库挖掘和定向进化改造等手段构建相应的生物传感器, 对 PEP 节点代谢流的动态调控, 以及天冬氨酸家族氨基酸生

产菌株的高通量筛选具有重要的研究意义和应用价值。

4 总结与展望

氨基酸及其前体化合物的生物传感器在功能元件和高产菌株的高通量筛选、适应性进化和代谢途径动态调控中展示出了重要的应用,因此近年来受到越来越多的关注。各种氨基酸生物传感器,由于其工作原理不尽相同,在实际应用中也具有不同的优势和限制。目前研究和应用比较多的一类是基于转录调控因子构建的生物传感器,由于可响应的氨基酸种类多,响应的动态范围、操作范围、响应阈值等性能优异,且较容易实现进一步的改造提升,所以被广泛应用。然而,该类生物传感器对氨基酸的响应特异性较差,筛选中容易引入假阳性。基于核糖体开关的生物传感器对氨基酸的响应灵敏度和响应特异性高,但是操作范围和动态范围较小,难以应用于代谢途径的动态调控;且目前仅发现少数几种氨基酸的核糖体开关,其特异性改造和传感性能提升的难度较大。基于蛋白相互作用的氨基酸生物传感器种类有限,其信号调节和输出的范围有待优化,此类传感器仅可用于检测,无法用于动态调控。近年来发展起来的基于蛋白翻译元件的氨基酸生物传感器,在效应物特异性及通用性上展示出了独特的优势,并在高产菌种进化筛选中取得了很好的应用效果,后期通过进一步的优化改造,有望构建获得全部 20 种氨基酸的生物传感器。针对现有氨基酸生物传感器存在的问题,未来可以从以下几个方面进一步地开展研究。

第一,一些重要氨基酸的生物传感器仍有待开发。尽管目前大部分的蛋白质氨基酸已有相应生物传感器的报道,但是部分氨基酸,例如 L-天冬氨酸、L-苏氨酸、L-脯氨酸、L-谷氨酰

胺和 L-天冬酰胺,它们的生物传感器仍未见报道,对其高产菌株的筛选产生了一定的影响。近年来,研究者们发展了多种挖掘和改造可响应特定化合物的转录调控因子的有效策略。(1) 从组学数据挖掘:例如 Li 等^[51]通过 3-脱氢莽草酸高产和低产菌株的比较转录组分析,挖掘到一个能特异性感应 3-脱氢莽草酸的转录调控因子 CusR,构建了生物传感器,应用于高产菌株的高通量筛选。(2) 从一些生长代谢能力强、富含转录调控因子的菌株中挖掘:例如 Hanks 等^[52]从一株化学无机自养型细菌钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)基因组中挖掘到 16 个潜在响应不同化合物的 LysR 家族转录调控因子(LysR-type transcritonal regulator, LTTR),其中包含可响应 L-苯丙氨酸、L-酪氨酸、 γ -氨基丁酸、 β -丙氨酸,以及芳香族化合物(苯甲酸和水杨酸)等氨基酸和衍生物的 LTTR。(3) 通过理性设计和定向进化改变转录调控因子的可识别效应物:例如 Snoek 等^[53]对响应粘康酸的转录调控因子 BenM 进行了定向进化,结合 FACS 高通量筛选方法,获得了可响应己二酸的突变体。未来可以通过以上策略挖掘和构建更多种类的氨基酸生物传感器。

第二,部分氨基酸生物传感器的性能仍需提升以满足实际应用的需求。部分氨基酸生物传感器对目标化合物的响应特异性(specificity)、灵敏度(sensitivity)、操作范围(operational range)、动态范围(dynamic range)和响应阈值(threshold)等性能有限,难以满足高水平工业菌株的高通量筛选和代谢途径动态调控等需求,需要进一步地提升改造^[54-55]。不同于野生菌株或低水平生产菌株,一些氨基酸工业菌株已经具备高效的产物合成能力,其胞内的氨基酸浓度已经达到较高的水平。因此,生物传感器在工业菌株中应用时其响应强度很容易饱和,难以应用于

高产菌株的进一步改造提升。另一方面,部分氨基酸生物传感器的响应特异性较差,可同时响应多种氨基酸,在实际筛选过程中容易引入大量的假阳性菌株,干扰目标菌株的筛选。因此,构建专一性响应某一种氨基酸的生物传感,同时提高其对效应物的综合响应性能是未来氨基酸及其衍生物生物传感器研究的一个重要方向。

第三,开发氨基酸衍生物的生物传感器。

大宗氨基酸如 L-谷氨酸和 L-赖氨酸的市场日渐饱和,而高附加值的小品种氨基酸和一些新型的氨基酸衍生物市场逐渐崛起,例如以 L-谷氨酸为前体的衍生物(L-茶氨酸^[56]、1,4-二氨基丁烷^[57]、4-氨基-1-丁醇^[58]、 γ -氨基丁酸^[59]、2-吡咯烷酮^[60]、L-瓜氨酸^[61]、L-鸟苷酸^[62]、5-氨基乙酰丙酸^[63]、腐胺^[64]和尿苷^[65])、以 L-赖氨酸为前体的衍生物(1,5-戊二胺^[66]、1,5-二氨基戊烷、L-哌啶酸^[67]、戊二酸^[68]和 1,5-戊二醇^[69])、环化氨基酸(依克多因,又名四氢嘧啶^[70])和羟基化氨基酸(4-羟基-L-异亮氨酸^[71]和羟基依克多因^[72])等。开发这些氨基酸衍生物的生物传感器,并应用于合成途径关键功能元件和高产菌株的筛选,对提升这些化合物的生产水平,促进大宗氨基酸的高值化具有重要的意义。

REFERENCES

- [1] 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[J]. 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[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(11): 4200-4218 (in Chinese).
- [2] R S. Amino acids global market trajectory & analytics MCP-1691[EB/OL]. [2022-12-14]. <https://www.strategy.com/market-report-amino-acids-forecasts-globalindustry-analysts-inc.asp>.
- [3] WANG Y, LIU Y, LIU J, GUO YM, FAN LW, NI XM, ZHENG XM, WANG M, ZHENG P, SUN JB, MA YH. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 200-210.
- [4] TURNER AP. Biosensors[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1994, 5(1): 49-53.
- [5] YU WW, XU XH, JIN K, LIU YF, LI JH, DU GC, LV XQ, LIU L. Genetically encoded biosensors for microbial synthetic biology: from conceptual frameworks to practical applications[J]. Biotechnology Advances, 2023, 62: 108077.
- [6] ZENG WZ, GUO LK, XU S, CHEN J, ZHOU JW. High-throughput screening technology in industrial biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(8): 888-906.
- [7] 马倩,夏利,谭森,孙全伟,杨蒙雅,张颖,陈宁. 氨基酸生产的代谢工程研究进展与发展趋势. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1677-1696. MA Q, XIA L, TAN M, SUN QW, YANG MY, ZHANG Y, CHEN N. Advances and prospects in metabolic engineering for the production of amino acids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1677-1696 (in Chinese).
- [8] SUN X, LI QG, WANG Y, ZHOU WJ, GUO YM, CHEN JZ, ZHENG P, SUN JB, MA YH. Isoleucyl-tRNA synthetase mutant based whole-cell biosensor for high-throughput selection of isoleucine overproducers[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 172: 112783.
- [9] BINDER S, SCHENDZIELORZ G, STÄBLER N, KRUMBACH K, HOFFMANN K, BOTT M, EGGELING L. A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level[J]. Genome Biology, 2012, 13(5): R40.
- [10] XU MJ, LIU PP, CHEN JM, PENG AQ, YANG TW, ZHANG X, XU ZH, RAO ZM. Development of a novel biosensor-driven mutation and selection system via *in situ* growth of *Corynebacterium crenatum* for the production of L-arginine[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 175.
- [11] ZHOU LB, ZENG AP. Exploring L-lysine riboswitch for metabolic flux control and improvement of L-lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(6): 729-734.
- [12] ZHOU LB, ZENG AP. Engineering a L-lysine-ON riboswitch for metabolic control of L-lysine production

- in *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(12): 1335-1340.
- [13] SUDARSAN N, WICKISER JK, NAKAMURA S, EBERT MS, BREAKER RR. An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine[J]. Genes & Development, 2003, 17(21): 2688-2697.
- [14] FROMMER WB, DAVIDSON MW, CAMPBELL RE. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins[J]. Chemical Society Reviews, 2009, 38(10): 2833-2841.
- [15] ZHENG B, MA XY, WANG N, DING TT, GUO LW, ZHANG XR, YANG Y, LI C, HUO YX. Utilization of rare codon-rich markers for screening amino acid overproducers[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3616.
- [16] GUO H, MA X, WANG N, DING T, ZHENG B, GUO L, HUANG C, ZHANG W, SUN L, HUO YX. A tRNA modification-based strategy for identifying amino acid overproducers(AMINO)[J]. bioRxiv, 2022, DOI: 10.1101/2022.11.21.517450.
- [17] TAN SY, SHI F, LIU HY, YU XP, WEI SY, FAN ZY, LI YF. Dynamic control of 4-hydroxyisoleucine biosynthesis by modified L-isoleucine biosensor in recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(9): 2378-2389.
- [18] HAN GQ, XU N, SUN XP, CHEN JZ, CHEN C, WANG Q. Improvement of L-valine production by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening in *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Omega, 2020, 5(10): 4751-4758.
- [19] MAHR R, GÄTGENS C, GÄTGENS J, POLEN T, KALINOWSKI J, FRUNZKE J. Biosensor-driven adaptive laboratory evolution of L-valine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metabolic Engineering, 2015, 32: 184-194.
- [20] MUSTAFI N, GRÜNBERGER A, MAHR R, HELFRICH S, NÖH K, BLOMBACH B, KOHLHEYER D, FRUNZKE J. Application of a genetically encoded biosensor for live cell imaging of L-valine production in pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85731.
- [21] MUSTAFI N, GRÜNBERGER A, KOHLHEYER D, BOTT M, FRUNZKE J. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(4): 449-457.
- [22] LIU Y, ZHUANG Y, DING D, XU Y, SUN J, ZHANG D. Biosensor-based evolution and elucidation of a biosynthetic pathway in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(5): 837-848.
- [23] MAHR R, von BOESELAGER RF, WIECHERT J, FRUNZKE J. Screening of an *Escherichia coli* promoter library for a L-phenylalanine biosensor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(15): 6739-6753.
- [24] GONG XY, ZHANG RH, WANG J, YAN YJ. Engineering of a TrpR-based biosensor for altered dynamic range and ligand preference[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(6): 2175-2183.
- [25] STELLA RG, BAUMANN P, LORKE S, MÜNSTERMANN F, WIRTZ A, WIECHERT J, MARIENHAGEN J, FRUNZKE J. Biosensor-based isolation of amino acid-producing *Vibrio natriegens* strains[J]. Metabolic Engineering Communications, 2021, 13: e00187.
- [26] KORTMANN M, MACK C, BAUMGART M, BOTT M. Pyruvate carboxylase variants enabling improved lysine production from glucose identified by biosensor-based high-throughput fluorescence-activated cell sorting screening[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(2): 274-281.
- [27] SCHENDZIELORZ G, DIPPONG M, GRÜNBERGER A, KOHLHEYER D, YOSHIDA A, BINDER S, NISHIYAMA C, NISHIYAMA M, BOTT M, EGGELING L. Taking control over control: use of product sensing in single cells to remove flux control at key enzymes in biosynthesis pathways[J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(1): 21-29.
- [28] BELLMANN A, VRLJIĆ M, PÁTEK M, SAHM H, KRÄMER R, EGGELING L. Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology, 2001, 147(7): 1765-1774.
- [29] DELLA CORTE D, van BEEK HL, SYBERG F, SCHALLMEY M, TOBOLA F, CORMANN KU, SCHLICKER C, BAUMANN PT, KRUMBACH K, SOKOLOWSKY S, MORRIS CJ, GRÜNBERGER A, HOFMANN E, SCHRÖDER GF, MARIENHAGEN J. Engineering and application of a biosensor with focused ligand specificity[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4851.
- [30] LIU J, XU JZ, RAO ZM, ZHANG WG. An enzymatic

- colorimetric whole-cell biosensor for high-throughput identification of lysine overproducers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 216: 114681.
- [31] PU W, CHEN JZ, LIU P, SHEN J, CAI NY, LIU BY, LEI Y, WANG LX, NI XM, ZHANG J, LIU J, ZHOU YY, ZHOU WJ, MA HW, WANG Y, ZHENG P, SUN JB. Directed evolution of linker helix as an efficient strategy for engineering LysR-type transcriptional regulators as whole-cell biosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 222: 115004.
- [32] NANDINENI MR, GOWRISHANKAR J. Evidence for an L-arginine exporter encoded by *yggA* (ArgO) that is regulated by the LysR-type transcriptional regulator ArgP in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11): 3539-3546.
- [33] JIANG S, WANG RR, WANG DH, ZHAO CG, MA Q, WU HY, XIE XX. Metabolic reprogramming and biosensor-assisted mutagenesis screening for high-level production of L-arginine in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 76: 146-157.
- [34] ZHANG X, ZHANG XM, XU GQ, ZHANG XJ, SHI JS, XU ZH. Integration of ARTP mutagenesis with biosensor-mediated high-throughput screening to improve L-serine yield in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(14): 5939-5951.
- [35] GAO JS, DU MH, ZHAO JH, ZHANG Y, XU N, DU HM, JU JS, WEI L, LIU J. Design of a genetically encoded biosensor to establish a high-throughput screening platform for L-cysteine overproduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 144-157.
- [36] ZHOU LB, REN J, LI ZD, NIE JL, WANG C, ZENG AP. Characterization and engineering of a *Clostridium glycine* riboswitch and its use to control a novel metabolic pathway for 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2327-2335.
- [37] LIU YF, YUAN HL, DING DQ, DONG HN, WANG QH, ZHANG DW. Establishment of a biosensor-based high-throughput screening platform for tryptophan overproduction[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(6): 1373-1383.
- [38] JIAN XJ, GUO XJ, CAI ZS, WEI LF, WANG LY, XING XH, ZHANG C. Single-cell microliter-droplet screening system (MISS cell): an integrated platform for automated high-throughput microbial monoclonal cultivation and picking[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, 120(3): 778-792.
- [39] LONG MF, XU MJ, MA ZF, PAN XW, YOU JJ, HU MK, SHAO Y, YANG TW, ZHANG X, RAO ZM. Significantly enhancing production of *trans*-4-hydroxy-L-proline by integrated system engineering in *Escherichia coli*[J]. *Science Advances*, 2020, 6(21): eaba2383.
- [40] LANGE C, MUSTAFI N, FRUNZKE J, KENNERKNECHT N, WESSEL M, BOTT M, WENDISCH VF. Lrp of *Corynebacterium glutamicum* controls expression of the *brnFE* operon encoding the export system for L-methionine and branched-chain amino acids[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 158(4): 231-241.
- [41] STELLA RG, GERTZEN CGW, SMITS SHJ, GÄTGENS C, POLEN T, NOACK S, FRUNZKE J. Biosensor-based growth-coupling and spatial separation as an evolution strategy to improve small molecule production of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 162-173.
- [42] LAI WM, SHI F, TAN SY, LIU HY, LI YF, XIANG YH. Dynamic control of 4-hydroxyisoleucine biosynthesis by multi-biosensor in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(13-16): 5105-5121.
- [43] PITTARD J, CAMAKARIS H, YANG J. The TyrR regulon[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 55(1): 16-26.
- [44] YU XP, SHI F, LIU HY, TAN SY, LI YF. Programming adaptive laboratory evolution of 4-hydroxyisoleucine production driven by a lysine biosensor in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 1-14.
- [45] HONG KQ, ZHANG J, JIN B, CHEN T, WANG ZW. Development and characterization of a glycine biosensor system for fine-tuned metabolic regulation in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 1-17.
- [46] DING DQ, LI JL, BAI DY, FANG H, LIN JP, ZHANG DW. Biosensor-based monitoring of the central metabolic pathway metabolites[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 167: 112456.
- [47] XU XH, LI XL, LIU YF, ZHU YL, LI JH, DU GC, CHEN J, LEDESMA-AMARO R, LIU L. Pyruvate-responsive genetic circuits for dynamic control of central metabolism[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(11): 1261-1268.

- [48] HU GP, LI ZH, MA DL, YE C, ZHANG LP, GAO C, LIU LM, CHEN XL. Light-driven CO₂ sequestration in *Escherichia coli* to achieve theoretical yield of chemicals[J]. *Nature Catalysis*, 2021, 4(5): 395-406.
- [49] KOBERSTEIN JN, STEWART ML, SMITH CB, TARASOV AI, ASHCROFT FM, STORK PJS, GOODMAN RH. Monitoring glycolytic dynamics in single cells using a fluorescent biosensor for fructose 1,6-bisphosphate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 2022, 119(31): e2204407119.
- [50] ZHU Y, LI Y, XU Y, ZHANG J, MA LL, QI QS, WANG Q. Development of bifunctional biosensors for sensing and dynamic control of glycolysis flux in metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 142-151.
- [51] LI LP, TU R, SONG GT, CHENG J, CHEN WJ, LI L, WANG LX, WANG QH. Development of a synthetic 3-dehydroshikimate biosensor in *Escherichia coli* for metabolite monitoring and genetic screening[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(2): 297-306.
- [52] HANKO EKR, PAIVA AC, JONCZYK M, ABBOTT M, MINTON NP, MALYS N. A genome-wide approach for identification and characterisation of metabolite-inducible systems[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1213.
- [53] SNOEK T, CHABERSKI EK, AMBRI F, KOL S, BJØRN SP, PANG B, BARAJAS JF, WELNER DH, JENSEN MK, KEASLING JD. Evolution-guided engineering of small-molecule biosensors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(1): e3.
- [54] MAHR R, FRUNZKE J. Transcription factor-based biosensors in biotechnology: current state and future prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(1): 79-90.
- [55] ZHANG J, PANG QX, WANG Q, QI QS, WANG Q. Modular tuning engineering and versatile applications of genetically encoded biosensors[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022, 42(7): 1010-1027.
- [56] MA HK, FAN XG, CAI NY, ZHANG DZ, ZHAO GH, WANG T, SU R, YUAN M, MA Q, ZHANG CL, XU QY, XIE XX, CHEN N, LI YJ. Efficient fermentative production of L-theanine by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 119-130.
- [57] TSUGE Y, MATSUZAWA H. Recent progress in production of amino acid-derived chemicals using *Corynebacterium glutamicum*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(3): 1-13.
- [58] PRABOWO CPS, SHIN JH, CHO JS, CHAE TU, LEE SY. Microbial production of 4-amino-1-butanol, a four-carbon amino alcohol[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(9): 2771-2780.
- [59] WEI L, ZHAO JH, WANG YR, GAO JS, DU MH, ZHANG Y, XU N, DU HM, JU JS, LIU QD, LIU J. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level γ -aminobutyric acid production from glycerol by dynamic metabolic control[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 69: 134-146.
- [60] XU MJ, GAO H, MA ZF, HAN J, ZHENG KY, SHAO ML, RAO ZM. Development of a 2-pyrrolidone biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by engineering an acetyl-CoA balance route[J]. *Amino Acids*, 2022, 54(11): 1437-1450.
- [61] JIANG S, WANG DH, WANG RR, ZHAO CG, MA Q, WU HY, XIE XY. Reconstructing a recycling and nonauxotroph biosynthetic pathway in *Escherichia coli* toward highly efficient production of L-citrulline[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 220-231.
- [62] NIE LB, HE YT, HU LR, ZHU XD, WU XY, ZHANG B. Improvement in L-ornithine production from mannitol via transcriptome-guided genetic engineering in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 1-13.
- [63] CHEN JZ, WANG Y, GUO X, RAO DM, ZHOU WJ, ZHENG P, SUN JB, MA YH. Efficient bioproduction of 5-aminolevulinic acid, a promising biostimulant and nutrient, from renewable bioresources by engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 1-13.
- [64] LI Z, SHEN YP, JIANG XL, FENG LS, LIU JZ. Metabolic evolution and a comparative omics analysis of *Corynebacterium glutamicum* for putrescine production[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2018, 45(2): 123-139.
- [65] WU HY, LI YJ, MA Q, LI Q, JIA ZF, YANG B, XU QY, FAN XG, ZHANG CL, CHEN N, XIE XX. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield uridine production[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 248-256.
- [66] KIM HT, BARITUGO KA, OH YH, HYUN SM, KHANG TU, KANG KH, JUNG SH, SONG BK, PARK K, KIM IK, LEE MO, KAM Y, HWANG YT, PARK SJ, JOO JC. Metabolic engineering of

- Corynebacterium glutamicum* for the high-level production of cadaverine that can be used for the synthesis of biopolyamide 510[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2018, 6(4): 5296-5305.
- [67] ZHANG Y, AN N, ZHAO Y, LI XQ, SHEN XL, WANG J, SUN XX, YUAN QP. Efficient biosynthesis of α -aminoadipic acid *via* lysine catabolism in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2023, 120(1): 312-317.
- [68] HAN T, KIM GB, LEE SY. Glutaric acid production by systems metabolic engineering of an L-lysine-overproducing *Corynebacterium glutamicum*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 2020, 117(48): 30328-30334.
- [69] CEN XC, LIU YJ, ZHU FH, LIU DH, CHEN Z. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high production of 1,5-pentanediol *via* a cadaverine-derived pathway[J]. Metabolic Engineering, 2022, 74: 168-177.
- [70] JIANG A, SONG YH, YOU J, ZHANG X, XU MJ, RAO ZM. High-yield ectoine production in engineered *Corynebacterium glutamicum* by fine metabolic regulation *via* plug-in repressor library[J]. Bioresource Technology, 2022, 362: 127802.
- [71] WEI MH, LI GR, XIE HX, YANG WJ, XU HR, HAN SB, WANG JZ, MENG Y, XU QY, LI YJ, CHEN N, ZHANG CL. Sustainable production of 4-hydroxyisoleucine with minimised carbon loss by simultaneously utilising glucose and xylose in engineered *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2022, 354: 127196.
- [72] MA Q, XIA L, WU HY, ZHUO MY, YANG MY, ZHANG Y, TAN M, ZHAO KX, SUN QW, XU QY, CHEN N, XIE XX. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient osmotic stress-free production of compatible solute hydroxyectoine[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(1): 89-101.

(本文责编 陈宏宇)