



代谢工程改造大肠杆菌合成 L-苏氨酸研究进展

罗筱萍^{1,2}, 苏卜利², 邓名荣², 徐晓龙¹, 朱红惠^{2*}

1 五邑大学环境与化学工程学院, 广东 江门 529020

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室 农业农村部农业微生物组学重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070

罗筱萍, 苏卜利, 邓名荣, 徐晓龙, 朱红惠. 代谢工程改造大肠杆菌合成 L-苏氨酸研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2648-2660.

LUO Xiaoping, SU Buli, DENG Mingrong, XU Xiaolong, ZHU Honghui. Progress in the synthesis of L-threonine by metabolic engineering of *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2648-2660.

摘要: L-苏氨酸是一种人体自身无法合成, 必须从食物中摄取的 8 种必需氨基酸之一, 是蛋白质合成的重要组成成分, 广泛应用于食品、饲料、医药等多个领域。目前, 利用大肠杆菌发酵可获得更理想的苏氨酸产量, 是工业上用于苏氨酸生产的主要菌株。随着代谢工程技术的发展, 对菌株的改造不再局限于传统诱变育种, 菌株的定向改造极大地提高了菌株 L-苏氨酸的合成能力, 促进了 L-苏氨酸工业的发展。本文主要从 L-苏氨酸的理化性质、合成途径以及利用代谢工程技术在提高 L-苏氨酸产量研究中取得的一系列成果进行综述, 旨在为改造大肠杆菌高效合成苏氨酸的研究提供更全面的认识。

关键词: L-苏氨酸; 大肠杆菌; 代谢调控; 前体; 辅因子

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100900); 广东特支计划(2021JC06N628); 广东省科学院发展专项资金(2022GDASZH-2022010101)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100900), Guangdong Special Support Program (2021JC06N628), and the GDAS Project of Science and Technology Development (2022GDASZH-2022010101).

*Corresponding author. Tel: +86-20-87685699, E-mail: zhuhh_gdim@163.com

Received: 2024-01-31; Accepted: 2024-05-28; Published online: 2024-05-29

Progress in the synthesis of L-threonine by metabolic engineering of *Escherichia coli*

LUO Xiaoping^{1,2}, SU Buli², DENG Mingrong², XU Xiaolong¹, ZHU Honghui^{2*}

1 School of Environmental and Chemical Engineering, Wuyi University, Jiangmen 529020, Guangdong, China

2 State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application (MARA), Key Laboratory of Agricultural Microbiome (MARA), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

Abstract: L-threonine is one of the eight essential amino acids that cannot be synthesized by the human body and must be taken from food. It is an important component of protein synthesis and is widely used in food, feed, medicine and other fields. At present, *Escherichia coli* can achieve a high threonine yield in fermentation, being the main bacterium used for industrial production of threonine. With the development of metabolic engineering, the modification of strains is no longer limited to mutagenesis, and the directed modification of strains greatly improves the production of L-threonine, facilitating the development of the L-threonine industry. This paper introduces the physicochemical properties and synthesis pathway of L-threonine and reviews the achievements in improving L-threonine production by metabolic engineering, aiming to enrich the knowledge about the modification of *Escherichia coli* for efficient synthesis of threonine.

Keywords: L-threonine; *Escherichia coli*; metabolic regulation; precursor; cofactor

我国是 L-苏氨酸生产大国, 目前, 国内有多家 L-苏氨酸生产企业。2021 年, 全球 L-苏氨酸产量达 90.7 万 t, 我国 L-苏氨酸产量为 84.7 万 t, 占全球 L-苏氨酸产量的 93.4%; 2017 年至 2021 年, 全球苏氨酸需求量每年呈快速增长趋势, 五年间需求量增长 40% (图 1)^[1]。

L-苏氨酸虽然无法在动物体内合成, 但其可以在植物及微生物中合成。L-苏氨酸的制备方法包括微生物发酵法、化学合成法和蛋白质水解法。其中, 微生物发酵法因工艺更为简单、发酵周期短、所需投资少等优点, 逐渐成为最主要的生产方法。L-苏氨酸可以由谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、褪色沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)这 4 种微生物

发酵生产^[2-3], 其中, 大肠杆菌具有繁殖速度快、生理生化研究更为透彻等特性^[4], 而且利用大肠杆菌发酵得到的产量及糖酸转化率更理想^[5]。此外, 由于遗传背景清晰和遗传操作简便的优势,

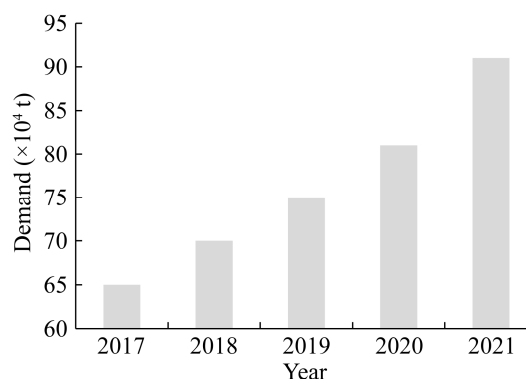


图 1 全球 L-苏氨酸需求量

Figure 1 Global requirement of L-threonine.

大肠杆菌还是分子生物学的模式细菌，广泛用于各类氨基酸的生物合成^[6-8]。

L-苏氨酸发酵工业发展早期主要利用诱变育种技术对菌株进行筛选，虽然可以提高菌株生产性能，但随机性较强，很难进一步提高菌株产量。随着代谢工程技术的发展，实现了对菌株的定向改造，菌株产 L-苏氨酸的能力得到了显著提升。然而，产量和糖酸转化率较低仍然是 L-苏氨酸发酵工业的最大瓶颈，因此，利用代谢工程技术改造大肠杆菌提高菌株 L-苏氨酸合成能力尤为关键^[9]。

1 L-苏氨酸的理化性质

L-苏氨酸(L-threonine, L-Thr)是 William C. Rose 于 1935 年从纤维蛋白水解物中分离和鉴定出来的^[10]，是一种有机化合物，化学名称是 α -氨基- β -羟基丁酸，化学式为 $C_4H_9NO_3$ ，结构式如图 2 所示。L-苏氨酸也是苏氨酸 4 种旋光异构体中唯一具有生物学活性的结构。

L-苏氨酸是一种人体自身无法合成的必需氨基酸，在人体内参与蛋白质合成^[11]，广泛应用于食品、饲料、医药等多个领域，在延缓衰老、提高免疫力、增强抵抗力和预防疾病中起着重要作用^[9]，是猪饲料中仅次于 L-赖氨酸(L-lysine, L-Lys)的第二大限制性氨基酸，也是家禽饲料中继 L-赖氨酸和 L-甲硫氨酸(L-methionine, L-Met)之后的第三大限制性氨基

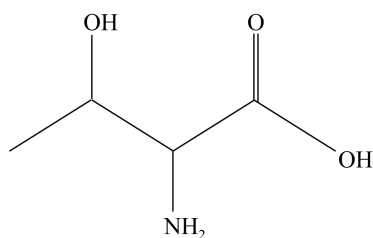


图 2 L-苏氨酸结构式

Figure 2 L-threonine structural formula.

酸^[12]，同时也是 3 种氨基酸中唯一主要使用大肠杆菌作为发酵菌株的氨基酸^[13]。

2 L-苏氨酸的生物合成途径

以葡萄糖为碳源，L-苏氨酸的生物合成主要涉及糖酵解途径(glycolytic pathway, EMP)、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)、磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)及 L-苏氨酸的生物合成途径(biosynthetic pathway of L-threonine)。葡萄糖经葡萄糖磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)进入细胞，PTS 系统由 EI、HPr、EIIGlc 以及 EIIBCglc (分别由 *ptsH*、*ptsI*、*crr*、*ptsG* 基因编码)构成，其关键基因 *ptsG* 和 *crr* 缺失可以弱化葡萄糖转运^[14]。

进入细胞的葡萄糖分子经过 EMP 途径生成磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvic acid, PEP)，PEP 在磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(*ppc* 基因编码)作用下生成草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA)，进入 TCA 循环^[15]，OAA 在天冬氨酸氨基转移酶(*aspC* 基因编码)催化下，生成 L-天冬氨酸(L-aspartate, L-Asp)，进入 L-苏氨酸的生物合成途径。

L-苏氨酸的生物合成由五步酶催化反应得到：(1) L-天冬氨酸由 3 种激酶同工酶(分别由 *thrA*、*metL* 和 *lysC* 基因编码)催化生成 L-天冬氨酸磷酸；(2) L-天冬氨酸磷酸由天冬氨酸半醛脱氢酶(*asd* 基因编码)催化生成 L-天冬氨酸- β -半醛；(3) L-天冬氨酸- β -半醛由高丝氨酸脱氢酶(分别由 *thrA*、*metL* 基因编码)催化生成 L-高丝氨酸；(4) L-高丝氨酸由高丝氨酸激酶(*thrB* 基因编码)催化生成高丝氨酸磷酸；(5) 高丝氨酸磷酸由苏氨酸合成酶(*thrC* 基因编码)催化生成 L-苏氨酸，并由 RhtABC 转运蛋白转运至胞外(图 3)。

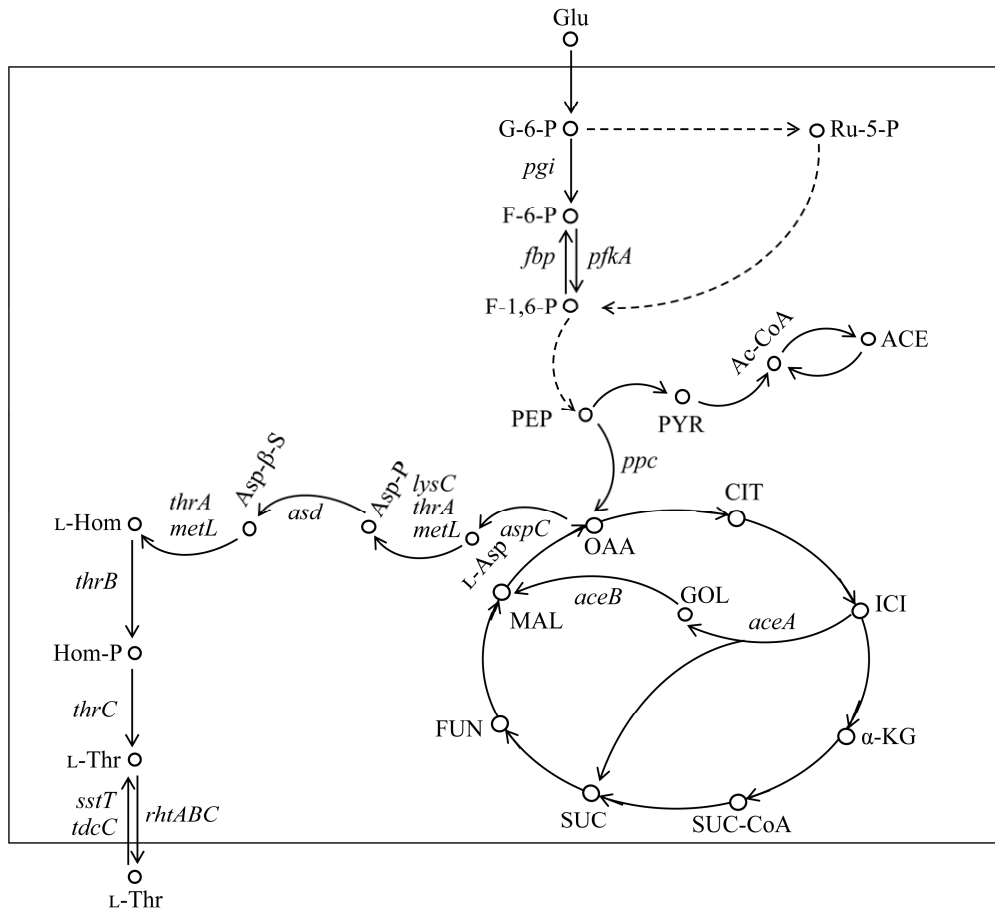


图 3 L-苏氨酸的合成途径

Figure 3 Biosynthetic pathway of L-threonine. Glu: Glucose; G-6-P: Glucose-6-phosphate; Ru-5-P: Ribulose 5-phosphate; F-6-P: Fructose-6-phosphate; F-1,6-P: Fructose-1,6-diphosphate; PEP: Phosphoenolpyruvic acid; PYR: Pyruvic; Ac-COA: Acetyl coenzyme A; ACE: Acetic acid; OAA: Oxaloacetic acid; CIT: Citric acid; ICI: Isocitric acid; α -KG: α -ketoglutaric acid; SUC-CoA: Succinyl-coenzyme A; SUC: Succinic acid; FUN: Fumaric acid; MAL: Malic acid; GOL: Glyoxylic acid; L-Asp: L-aspartic acid; Asp-P: Aspartate phosphate; Asp- β -S: Aspartic acid- β -semialdehyde; L-Hom: L-Homoserine; Hom-P: Homoserine phosphate; L-Thr: L-threonine.

3 代谢工程改造大肠杆菌合成 L-苏氨酸研究现状

代谢工程是对负责细胞内酶催化反应的基因进行遗传操作^[16]，主要目标是通过基因工程技术手段增加目标产物的合成^[17]。L-苏氨酸在大肠杆菌中生物合成过程极其复杂，受到许多胞内和胞外因素的影响^[14,18]，如细胞生长与产物合成之间的竞争、副产物积累、辅因子[adenosine

triphosphate (ATP), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and triphosphopyridine nucleotide (NADPH)]供应不足等因素会影响 L-苏氨酸产量的进一步提高，因此，产 L-苏氨酸的大肠杆菌菌株通常生长缓慢。产量和生产效率对于生物合成的经济性和可行性至关重要，L-苏氨酸作为大宗氨基酸产品，提高菌株发酵产量和糖酸转化率可使生产成本大幅度降低，增加经济效益^[6,19-21]。

3.1 代谢途径改造

随着代谢工程技术的发展,尤其是 CRISPR 基因编辑技术开始应用于菌株的定向改造,利用代谢工程手段改造代谢途径,对关键代谢节点进行精准调控,成为提高目标产物产量的重要手段^[22]。目前,对 L-苏氨酸合成菌株的改造主要通过增加前体供应、关键合成基因改造、减少副产物生成、增加辅因子供应、增强 L-苏氨酸的胞外转运及敲除降解途径。

3.1.1 增加前体供应,促进 L-苏氨酸的生物合成

前体物质(precursor)指某一代谢中间体前一阶段的物质,前体充足是生物合成的关键^[23-24],其可以将碳流引入 L-苏氨酸生物合成途径,减少碳流失。草酰乙酸、L-天冬氨酸及 L-高丝氨酸是 L-苏氨酸的前体物质。因此,增强草酰乙酸-天冬氨酸节点的碳通量可以促进细胞生长和 L-苏氨酸的生成^[20]。在 TCA 循环中,异柠檬酸裂解酶(*aceA* 基因编码)可将异柠檬酸(isocitric acid, ICT)裂解成乙醛酸(glyoxylic acid, GOL),乙醛酸在苹果酸合成酶(*aceB* 基因编码)作用下生成苹果酸(malic acid, MAL),重新参与 TCA 循环,构成乙醛酸循环(glyoxylate cycle)。乙醛酸循环是草酰乙酸的回补途径,可以有效避免碳源以 CO₂ 的形式流失。*aceK* 基因调控异柠檬酸进入三羧酸循环或乙醛酸循环,在微生物碳代谢调控中起着关键作用^[15],乙醛酸主要通过 TCA 循环代谢产生能量和生物合成前体^[25],因此,强化乙醛酸循环可以有效地促进草酰乙酸生成,有利于 L-苏氨酸的生物合成。磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(*ppc* 基因编码)可以直接将碳通量从 EMP 途径引入 TCA 循环,在菌株中敲除 *ppc* 基因,与对照菌株 TH07 (pBR⁺ThrABC)相比,菌株的苏氨酸产量降低 87%;用强启动子 *trc* 调控 *ppc* 基因表达, L-苏氨酸产量增加了 27.7%^[26]。

3.1.2 关键合成基因改造

L-苏氨酸的生物合成过程中存在一些关键基因,敲除、过表达或者动态调控这些关键基因可以有效地增加 L-苏氨酸的产量。例如,敲除代谢途径中非必需基因可以有效地减少副产物的生成,增加基因组的稳定性,并在不损害其生长的情况下简化代谢;敲除细胞生长非必需基因可以减轻细胞代谢负担,提高细胞代谢效率^[27];过表达 L-苏氨酸合成途径关键酶基因可以将碳通量指向合成途径,有效减少副产物的生成^[9]。

ThrABC 操纵子在 L-苏氨酸的生物合成中起着重要的调节作用,*thrABC* 的改造是增加大肠杆菌中 L-苏氨酸产量的最常用策略^[15]。在 MG442 菌株中表达突变操纵子 *thrA₄₄₂BC* 后产量提高 130%^[28]。在菌株 D8 中过表达 *thrA^{thr}BC* 基因簇,同时敲除 *iclR* 与参与 L-苏氨酸降解的 *itaE* 基因, L-苏氨酸产量增加 19.3%^[29]。Hao 等^[19]对 *thrABC* 表达进行动态调控,促进了细胞的生长,缩短了发酵时间,在敲除 *ptsG* 基因后,菌株分批补料发酵产生 121.05 g/L 的 L-苏氨酸。本课题组 Su 等^[30]前期基于 L-苏氨酸存在的“类诱导剂”效应,结合 L-苏氨酸核糖开关构建了一种新型 L-苏氨酸生物传感器;以此生物传感器为表征手段,通过对 *thrA* 酶中与 L-苏氨酸结合的 ACT 结构域的保守序列进行分析,对保守位点进行饱和突变,构建 *thrA* 突变文库,导入含有生物传感器的苏氨酸合成菌株 WS00 (苏氨酸合成基础菌株);选择绿色荧光蛋白变得更加明亮的菌落进行发酵,并测定 L-苏氨酸产量,与对照菌株相比, L-苏氨酸产量最高可提高 7 倍,该突变体(S353F/S354W) L-苏氨酸产量高于文献中应用较多的 *thrAC1034T* 突变体^[15]。

ProVWX 是甘氨酸甜菜碱 ABC 转运蛋白 ATP 结合亚基,大肠杆菌蛋白 ProP 既是一种渗透传感器,也是一种渗透保护剂转运体。在 TWF001

中敲除 *proP* 后, L-苏氨酸产量增加 33.3%; 敲除 *proVWX* 后, L-苏氨酸产量增加 40.0%, 进一步缺失 PTS 系统关键基因 *ptsG*, 最终菌株的摇瓶发酵产量为 26 g/L, 在对照菌株的基础上提高了 116%^[3]。聚羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)在大肠杆菌中积累不仅能抑制乙酸和丙酮酸生成, 还能促进琥珀酸的产生^[31], 在 TWF001 菌株中过表达 *phaCAB* 基因簇可显著提高 L-苏氨酸的产量, 最终菌株分批补料发酵产生 133.5 g/L 的 L-苏氨酸^[32]。Sun 等^[21]构建了缺乏蓝光感应蛋白(Δ *ycgF*)的菌株, 大大降低了蓝光信号对生物膜的抑制作用, 并构建了一种高效的生物膜形成系统 Magnet, 最终菌株 L-苏氨酸摇瓶发酵产量提高 65%。

在有氧条件下, DNA 结合转录阻遏蛋白 IclR (*iclR* 基因调控)负向调控编码异柠檬酸水解酶(*aceK* 基因编码)和苹果酸合成酶(*aceAB* 基因编码)的表达, 因此, 敲除 *iclR* 基因可以激活乙醛酸循环, 使得更多的草酰乙酸生成 L-苏氨酸, 并减少副产物的积累^[33]。在 TWF001 菌株中缺失 *iclR* 基因, L-苏氨酸产量可在出发菌株基础上提高 26%^[34]; *lysC* 碱基序列中的第 1 055 个碱基 C 替换为 T 可以解除 L-苏氨酸对天冬氨酸激酶 III 的反馈抑制^[35]。同时, 过表达 *lysC* 基因也会将碳通量引入 L-苏氨酸的合成, Zhang 等^[36]在菌株中过表达 *lysC* 基因, L-苏氨酸产量提高 30%, 葡萄糖转化率提高 20%。

3.1.3 减少副产物生成, 降低碳流失

在 L-苏氨酸合成过程中, 乙酸、乳酸、乙醇等副产物会随之产生。其中, 乙酸(acetic acid, ACE)是大肠杆菌以葡萄糖为碳源时的典型副产物^[37-38], 乙酸大量积累会抑制菌株生长, 影响 L-苏氨酸的合成^[2]。丙酮酸可在丙酮酸氧化酶(*poxB* 基因编码)作用下催化生成乙酸, 导致碳流失。因此, 将碳流引入磷酸烯醇式丙酮酸-草

酰乙酸-天冬氨酸节点, 而不是作为乙酸流失是提高 L-苏氨酸产量的重要途径^[18,39]。

在 THRD 菌株中分别敲除糖酵解途径相关基因 *pykF*、*pykA* 和 *pfkAB*, 将碳通量引向戊糖磷酸途径, 乙酸含量分别降低了 52%、80%、65%, 菌株 THRD Δ *pykF* 和 THRD Δ *pykA* 的 L-苏氨酸产量分别提高了 11.5%和 5.35%^[40]。乳酸的存在对菌株的影响相对较小, 少量的乳酸存在时可以为菌株提供碳源, 但是浓度过高时, 其对 L-苏氨酸合成及代谢有明显的抑制作用, 充足的氧气和合适的葡萄糖补给可以有效降低乳酸生成^[41]。

3.1.4 增加辅因子(NADPH)供应

L-苏氨酸合成的同时, 伴随着多种辅因子的生成与消耗(图 4)。其中, NADPH (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)是代谢网络中的关键辅助因子之一, 参与细胞内多种反应, 对氧化还原平衡和细胞代谢产生重要影响^[42]。NADPH 在 L-苏氨酸生物合成中不可缺少, 1 分子 L-苏氨酸生成需消耗 3 分子 NADPH, 辅因子工程是实现目标产物高产的重要代谢工程策略^[9,43]。

影响 NADPH 生成的基因有: PPP 途径中 NADP(+)依赖性葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*zwf* 基因编码)和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(*gnd* 基因编码); TCA 循环中异柠檬酸脱氢酶(由 *icd* 基因编码), 所以, 将糖酵解通量转向 PPP 途径和 TCA 循环可以增加 NADPH 供应, 在菌株中敲除 *pgi* 基因, 将碳通量引向 PPP 途径, 菌株 NADPH/NADP⁺ 比值可提高 7 倍左右^[44]。然而, 过表达合成途径中 NADPH 合成相关基因可能会影响菌株的生长, 因此, Liu 等^[20]引入了额外的 NADPH 再生途径, 同时过表达甲酸脱氢酶(FDH)和吡啶核苷酸脱氢酶(*pntAB* 基因编码), 强化 NADH 与 NADPH 的相互转化^[45], 菌株 L-苏氨酸产量提高了 1.21 倍。

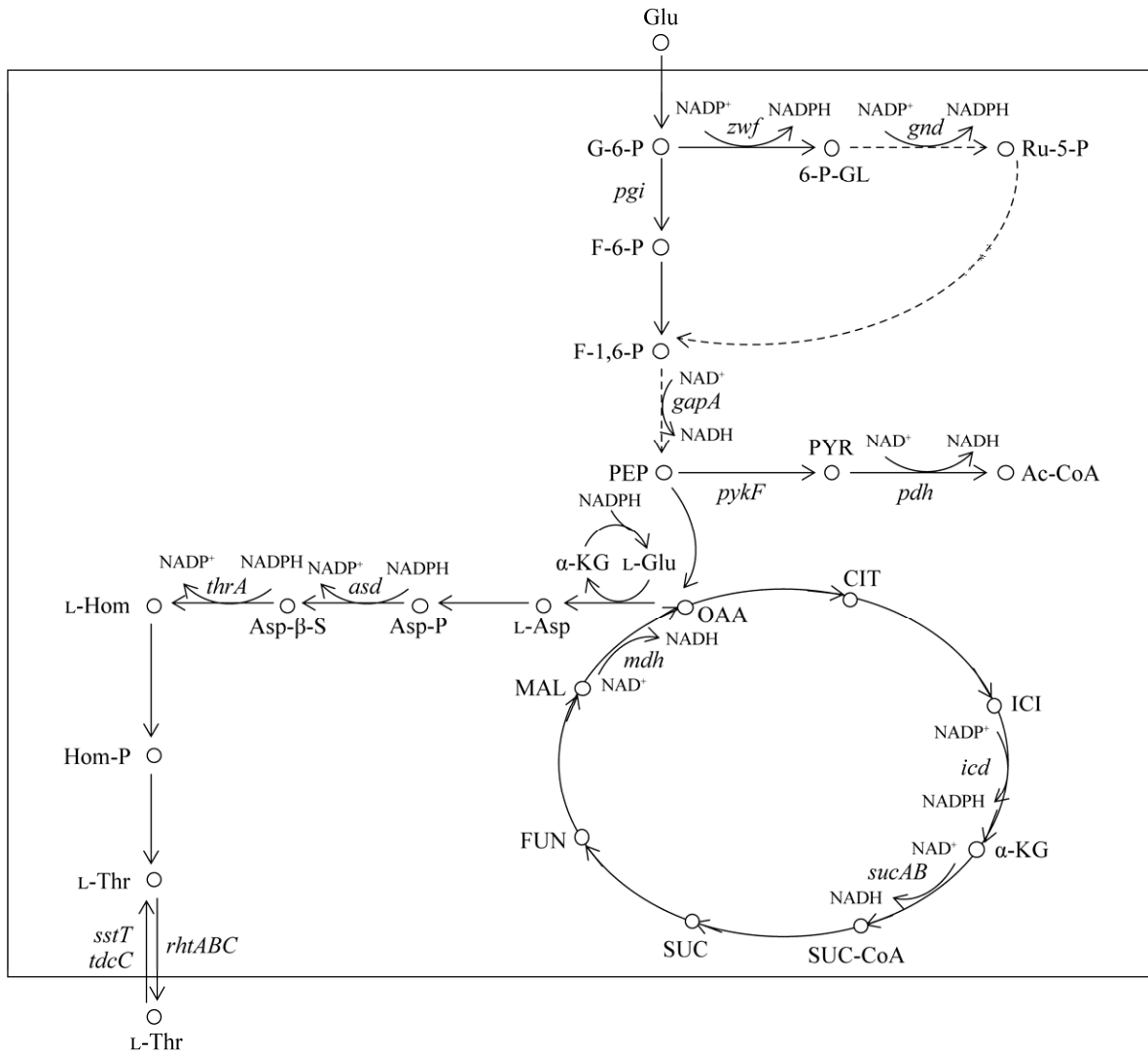


图 4 L-苏氨酸合成途径辅因子生成与消耗

Figure 4 The cofactor generation and consumption of L-threonine biosynthetic pathway. 6-P-GL: Gluconolactone-6-phosphate; L-Glu: Glutamic acid.

3.1.5 增强 L-苏氨酸的胞外转运

L-苏氨酸的合成受到细胞代谢和转运蛋白的影响，随着 L-苏氨酸逐渐积累和菌株合成速率的提高，胞内 L-苏氨酸浓度始终高于胞外，无法及时将 L-苏氨酸转运至胞外是限制 L-苏氨酸生产的重要因素^[7]。目前，大肠杆菌中存在 RhtA、RhtB、RhtC 和 YecC (分别由 *rhtA*、*rhtB*、*rhtC* 和 *yecC* 基因编码) 4 种转运蛋白可将 L-苏氨酸

转运至胞外，改造转运蛋白也是提高菌株 L-苏氨酸生产性能的重要手段。Xu 等^[46]在 THR 菌株中分别敲除 *rhtA* 和 *rhtBC* 基因，L-苏氨酸产量分别下降 25.7% 及 15.7%，而缺失 *rhtABC* 后，L-苏氨酸的产率下降了 54.2%；YecC 蛋白也可以转运 L-苏氨酸，但与 *rhtABC* 相比，*yecC* 与 L-苏氨酸的亲和力不高，可能参与细胞内 L-苏氨酸的微调或紧急调节。在 THR120 ($\Delta rhtBC$) 菌株中过

表达 *yecC* 基因, L-苏氨酸产量提高 40.6%。在菌株中过表达 *rhtAB*, 菌株 L-苏氨酸产量仅略微增加, 但过表达 *rhtC* 基因后菌株 L-苏氨酸产量提高了 50.2%, 这可能和 RhtAB 蛋白与 L-苏氨酸特异性较低有关^[26]。

大肠杆菌细胞内还存在 SstT (Na⁺依赖性, *sstT* 基因编码)和 TdcC (H⁺依赖性, *tdcC* 基因编码) 2 种可以将胞外 L-苏氨酸转运至胞内的特异性载体蛋白, 它们将 L-苏氨酸转运至胞内后, 胞内 L-苏氨酸浓度增加, 促进 L-苏氨酸的生物降解, 导致苏氨酸产量降低; 在 W3110 菌株中敲除 *tdcC* 或 *sstT* 基因, L-苏氨酸产量分别提高了 82.5%和 112.5%, 同时敲除 *tdcC* 和 *sstT* 基因的 L-苏氨酸产量提高 172.5%^[47]。因此, 在大肠杆菌中敲除 *tdcC* 或 *sstT* 基因可以有效降低 L-苏氨酸的胞内转运, 有利于 L-苏氨酸的合成。

3.1.6 敲除降解途径, 减少 L-苏氨酸胞内消耗

作为必需氨基酸 L-异亮氨酸(L-isoleucine, L-Iso)和非必需氨基酸 L-甘氨酸(L-glycine, L-Glu)的重要前体物质, 苏氨酸的胞内降解主要用于异亮氨酸和甘氨酸的生物合成, 参与 L-苏氨酸降解的基因有 *tdh*、*tdg*、*ltaE*、*tdcB*、*sstT*、*ilvA*、*tdcC* 等^[48]。

L-苏氨酸在苏氨酸脱水酶(*tdcB* 基因编码)和苏氨酸脱氨酶(*tdg* 基因编码)作用下, 生成 L-异亮氨酸; 当细胞甘氨酸缺乏时, 苏氨酸在苏氨酸脱氨酶(*tdh* 基因编码)和苏氨酸醛缩酶(*ltaE* 基因编码)作用下转化为乙醛和甘氨酸^[11-12,49-50]。苏氨酸脱氨酶(*ilvA* 基因编码)也参与 L-苏氨酸胞内分解代谢, 生成 L-异亮氨酸的前体物质 α -酮基丁酸^[51]。闫继爱等^[52]敲除 *ilvA* 基因后, L-苏氨酸产量从(5.55±0.51) g/L 提升至(8.65±1.42) g/L, 进一步敲除 *metA* 基因, L-苏氨酸产量提高至(13.6±1.14) g/L。因此, 通过阻断 L-苏氨酸的降解途径可以有效地降低 L-苏氨酸消耗, 促进 L-苏氨酸积累。

3.2 发酵工艺优化

发酵工艺优化主要集中于优化培养基成分(碳氮源、无机盐、生长因子)和调控环境因素(渗透压、pH 值、温度、溶氧量), 发酵培养基为菌种生长及代谢产物合成提供营养物质及能量, 是影响发酵效率的重要因素; 提供适宜的生长环境是提高产量的重要方法^[53], L-苏氨酸发酵通常采用可以有效控制生长速度、避免高底物浓度抑制作用的分批补料发酵进行大规模发酵^[6]。

3.2.1 平衡渗透压, 维持发酵

渗透压是指溶液中溶质分子通过半透膜吸收水分子的能力。在发酵生产过程中, 可能出现渗透压不平衡导致菌株生长受限和 L-苏氨酸生物合成受阻的情况, 因此, 平衡渗透压对维持发酵至关重要。甜菜碱(betaine)是一种具有渗透保护作用的相容溶质, 可以用于提高工程大肠杆菌的 L-苏氨酸生产效率。补充甜菜碱不仅能提高糖酵解酶活性, 还能上调葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*zwf* 基因编码)的表达^[3,54]。

运用单因素试验策略在培养基中分别添加 0.5、1.0、1.5 和 2.0 g/L 含甜菜碱的葡萄糖溶液, L-苏氨酸的产量分别为 115.7、118.9、123.6 和 127.3 g/L, 在对照菌株基础上分别提高 4.05%、6.92%、11.20%和 14.50%; 糖酸转化率分别为 55.24%、56.57%、57.41%和 58.12%, 均高于对照组^[55]。Li 等^[56]添加 1 g/L 甜菜碱, 最终菌株发酵 L-苏氨酸产量为(126.1±3.0) g/L, 与对照菌株相比提高了 17.6%。

3.2.2 优化发酵工艺, 降低成本

L-苏氨酸的生产成本主要取决于培养基的成本, 优化发酵工艺不仅能提高菌株生产性能, 还能有效降低生产成本^[57], 在生产过程中保持最佳的发酵条件对菌株生产非常重要^[58]。在优化 L-苏氨酸发酵工艺时, 优先考虑优化碳源和

氮源的浓度,与其他因素相比,碳氮源对 L-苏氨酸生产的影响更加明显^[57-58]。发酵时可用玉米浆代替酵母提取物作为氮源以降低成本^[59];在 MT201 菌株中添加生物素作为生长因子,L-苏氨酸的产量由 15.9 g/L 提高至 52.0 g/L,提高 227.00%^[57];当氧气供应不足时,可将培养基 pH 下调至 6.5,虽然菌株生长受到影响,但产量可小幅度提高^[41];在培养基中分别添加 30–60 g/L 葡萄糖,以 30 g/L 葡萄糖为对照,当葡萄糖浓度为 40 g/L 时,糖酸转化率略微降低的同时,菌株产量提高 24.88%;当培养基中葡萄糖浓度为 50–60 g/L 时,产量略微增加,但葡萄糖转化

率持续大幅度降低,导致成本增加,可能是因为高葡萄糖浓度下,渗透压升高导致乙酸大量积累,大肠杆菌细胞生长受到抑制^[33,59]。

4 总结与展望

L-苏氨酸是一种必需氨基酸,哺乳动物需要 L-苏氨酸及其代谢物才能维持正常的生理功能^[60-61],因此,饲料行业的高速发展使得 L-苏氨酸需求不断增加,这是 L-苏氨酸产业的挑战也是机遇。目前,利用代谢工程手段改造大肠杆菌已经取得了一系列成果(表 1)。其中,实验室发酵 L-苏氨酸最高产量为 160.3 g/L^[62],其与

表 1 代谢工程改造大肠杆菌合成 L-苏氨酸

Table 1 Metabolic engineering of *Escherichia coli* to synthesize L-threonine

Strains	Strategy	Titer (g/L)	Productivity (g/(L·h))	Yield (g/g)	Fermentation method	References
TSW009	Adding betaine and deleting transporters <i>ProP</i> and <i>ProVWX</i>	26.00	0.54	0.65	Shake-flask	[3]
TWK021	Deleting the <i>Sfm</i> operon	15.75	0.32	0.39	Shake-flask	[11]
TWF044	Deleting <i>fadR</i> , <i>fabR</i> , and <i>iclR</i> genes	103.89	2.16	NP	Fed-batch	[18]
P2.1-2901Δ <i>ptsG</i>	Dynamic and balanced regulation of the <i>thrABC</i> operon gene	121.05	2.52	0.60	Fed-batch	[19]
THPE5	Adjusting carbon distribution and promoting cofactor generation	70.80	1.77	0.40	Fed-batch	[20]
Δ <i>ycgF</i> nMagHigh and Δ <i>ycgF</i> pMagHigh	Blue light signal regulation	16.57	0.61	NP	Shake-flask	[21]
MDS-205	Deleting <i>tdh</i> , <i>tdcC</i> and <i>sstT</i> genes	40.10	1.37	0.40	Fed-batch	[27]
TWF001/pFW01- <i>phaCAB</i>	Overexpressing the gene cluster <i>phaCAB</i>	133.50	3.71	0.50	Fed-batch	[32]
TWF018	Deleting <i>arcA</i> , <i>iclR</i> , and <i>tdcC</i> genes	26.00	0.72	NP	Shake-flask	[33]
JLTHR	Optimizing medium	127.30	NP	0.58	Fed-batch	[55]
THPZ	Adding betaine	126.10±3.00	5.26±0.12	0.54±0.02	Fed-batch	[56]
TRFC	Optimizing medium	118.00	3.10	0.46	Fed-batch	[58]
TH-103Z	Creating polyploid <i>Escherichia coli</i> by regulating <i>ftsZ</i> gene	160.30	0.55	1.66	Fed-batch	[62]
TWF083	Expressing <i>iclR</i> , <i>aspC</i> , <i>arcA</i> , <i>cpxR</i> , <i>gadE</i> , <i>pykF</i> , <i>fadR</i> , and <i>aspC</i> genes	116.62	2.43	0.49	Fed-batch	[63]
Tm-JB	Dynamic regulation of biosensors	26.78	0.63	0.74	Shake-flask	[64]
TWF106/pFT24rp	Rebalancing microbial carbon distribution	23.29	1.57	0.78	Shake-flask	[65]
WMZ016/pFW01- <i>thrA*BC-rhtC</i>	Deleting <i>crr</i> and <i>iclR</i> and enhancing the expression of <i>gltA</i>	17.98	0.50	0.35	Shake-flask	[66]

NP: Not provide.

L-苏氨酸在 25 °C 下 205 g/L 的溶解度相比, 还有较大的提升空间^[48]。

谷氨酸棒状杆菌也可用于 L-苏氨酸的生物合成, 它是谷氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸等多种氨基酸的生产模式菌^[67]。然而, 谷氨酸棒状杆菌中仅有 ThrE (*thrE* 基因编码) 及 SerE (*serE* 基因编码) 2 种特异性不强的转运蛋白可以用于 L-苏氨酸的转运^[68-69], 其 L-苏氨酸产量一直低于大肠杆菌。因此, 利用代谢工程技术改造代谢途径和优化发酵工艺, 提高大肠杆菌 L-苏氨酸合成能力, 对促进 L-苏氨酸发酵产业的发展具有重要意义。

参考文献

- [1] 华经产业研究院: 2022 年全球及中国氨基酸产业规模、需求量及进出口情况分析[OL]. [2023-08-16]. <https://caifuhao.eastmoney.com/news/20221126095619445727920>.
- [2] Hua Jing Industrial Research Institute: Analysis of global and Chinese amino acid industry scale, demand, import and export in 2022[OL]. [2023-08-16]. <https://caifuhao.eastmoney.com/news/20221126095619445727920> (in Chinese).
- [3] WANG J, CHENG LK, CHEN N. High-level production of L-threonine by recombinant *Escherichia coli* with combined feeding strategies[J]. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 2014, 28(3): 495-501.
- [4] WANG SW, FANG Y, WANG Z, ZHANG SY, WANG LJ, GUO Y, WANG XY. Improving L-threonine production in *Escherichia coli* by elimination of transporters ProP and ProVWX[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 58.
- [5] 刘旭峰, 王宁, 郝亚男, 李英滋, 范晓光, 谢希贤. CRISPRi 干扰中心代谢基因转录对苏氨酸合成的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(8): 1-7. LIU XF, WANG N, HAO YN, LI YZ, FAN XG, XIE XX. Threonine synthesis under interfered transcriptions of genes involved in central metabolic pathway by CRISPRi[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(8): 1-7 (in Chinese).
- [6] YANG Q, CAI DB, CHEN WS, CHEN HY, LUO W. Combined metabolic analyses for the biosynthesis pathway of L-threonine in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 1010931.
- [7] GU PF, YANG F, SU TY, LI FF, LI YK, QI QS. Construction of an L-serine producing *Escherichia coli* via metabolic engineering[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(9): 1443-1450.
- [8] KRUSE D, KRÄMER R, EGGELING L, RIEPING M, PFEFFERLE W, TCHIEU J, CHUNG Y, SAIER M, BURKOVSKI A. Influence of threonine exporters on threonine production in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(2): 205-210.
- [9] KIM SH, SCHNEIDER BL, REITZER L. Genetics and regulation of the major enzymes of alanine synthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(20): 5304-5311.
- [10] DUAN M, CHEN S, LIU XL, LIU JH, ZHU DQ. The application of *Corynebacterium glutamicum* in L-threonine biosynthesis[J]. *Fermentation*, 2023, 9(9): 822.
- [11] MCCOY RH, MEYER CE, ROSE WC. Feeding experiments with mixtures of highly purified amino acids viii. Isolation and identification of a new essential amino acid[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1935, 112: 283-302.
- [12] GONG DK, QIAO J, LI HD, LI Y, HUANG DY, WANG Z, HU XQ, WANG XY. Deleting chaperone-usher fimbriae operons to improve L-threonine production in *Escherichia coli*[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2024, 4(1): 175-187.
- [13] DONG XY, QUINN PJ, WANG XY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(1): 11-23.
- [14] LI YJ, WEI HB, WANG T, XU QY, ZHANG CL, FAN XG, MA Q, CHEN N, XIE XX. Current status on metabolic engineering for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245(Pt B): 1588-1602.
- [15] ZHAO L, ZHANG HL, WANG XY, HAN GQ, MA WJ, HU XQ, LI Y. Transcriptomic analysis of an L-threonine-producing *Escherichia coli* TWF001[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2020, 67(3): 414-429.
- [16] LEE JH, LEE DE, LEE BU, KIM HS. Global analyses of transcriptomes and proteomes of a parent strain and an L-threonine-overproducing mutant strain[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(18): 5442-5451.
- [17] HOLTZ WJ, KEASLING JD. Engineering static and dynamic control of synthetic pathways[J]. *Cell*, 2010, 140(1): 19-23.

- [17] ANESIADIS N, CLUETT WR, MAHADEVAN R. Dynamic metabolic engineering for increasing bioprocess productivity[J]. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(5): 255-266.
- [18] YANG J, FANG Y, WANG JL, WANG CH, ZHAO L, WANG XY. Deletion of regulator-encoding genes *fadR*, *fabR* and *iclR* to increase L-threonine production in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(11): 4549-4564.
- [19] HAO RX, WANG SM, JIN X, YANG XY, QI QS, LIANG QF. Dynamic and balanced regulation of the *thrABC* operon gene for efficient synthesis of L-threonine[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1118948.
- [20] LIU JH, LI HL, XIONG H, XIE XX, CHEN N, ZHAO GR, CAIYIN Q, ZHU HJ, QIAO JJ. Two-stage carbon distribution and cofactor generation for improving L-threonine production of *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(1): 110-120.
- [21] SUN WJ, SHI SQ, CHEN J, ZHAO W, CHEN TP, LI GX, ZHANG KJ, YU B, LIU D, CHEN Y, YING HJ, OUYANG PK. Blue light signaling regulates *Escherichia coli* W1688 biofilm formation and L-threonine production[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(5): e0246022.
- [22] 胥健萍, 王颖, 李春, 周晓宏. 微生物细胞工厂中代谢途径动态调控策略与网络构建[J]. *化工进展*, 2022, 41(12): 6511-6521.
- XU JP, WANG Y, LI C, ZHOU XH. Dynamic regulation strategies and regulation network construction of metabolic pathways in microbial cell factories[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2022, 41(12): 6511-6521 (in Chinese).
- [23] KIM YH, PARK JS, CHO JY, CHO KM, PARK YH, LEE J. Proteomic response analysis of a threonine-overproducing mutant of *Escherichia coli*[J]. *The Biochemical Journal*, 2004, 381(Pt 3): 823-829.
- [24] TSUGE Y, MATSUZAWA H. Recent progress in production of amino acid-derived chemicals using *Corynebacterium glutamicum*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2021, 37(3): 49.
- [25] KIM D, SEO SW, GAO Y, NAM H, GUZMAN GI, CHO BK, PALSSON BO. Systems assessment of transcriptional regulation on central carbon metabolism by Cra and CRP[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(6): 2901-2917.
- [26] LEE KH, PARK JH, KIM TY, KIM HU, LEE SY. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3: 149.
- [27] LEE JH, SUNG BH, KIM MS, BLATTNER FR, YOON BH, KIM JH, KIM SC. Metabolic engineering of a reduced-genome strain of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8: 2.
- [28] LIVSHITS VA, ZAKATAEVA NP, ALESHIN VV, VITUSHKINA MV. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*[J]. *Research in Microbiology*, 2003, 154(2): 123-135.
- [29] ZENG MX, WU H, HAN ZL, DU ZY, YU XB, LUO W. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2,5-dimethylpyrazine[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(8): 4267-4276.
- [30] SU BL, LAI PX, DENG MR, ZHU HH. Design of a dual-responding genetic circuit for high-throughput identification of L-threonine-overproducing *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 395: 130407.
- [31] KANG Z, GAO CJ, WANG Q, LIU HM, QI QS. A novel strategy for succinate and polyhydroxybutyrate co-production in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(19): 7675-7678.
- [32] WANG JL, MA WJ, FANG Y, YANG J, ZHAN J, CHEN SW, WANG XY. Increasing L-threonine production in *Escherichia coli* by overexpressing the gene cluster *phaCAB*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2019, 46(11): 1557-1568.
- [33] DING ZX, FANG Y, ZHU LF, WANG JL, WANG XY. Deletion of *arcA*, *iclR*, and *tdcC* in *Escherichia coli* to improve L-threonine production[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(5): 794-807.
- [34] 赵慧. 代谢工程改造大肠杆菌生产 L-苏氨酸[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2018.
- ZHAO H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- [35] OGAWA-MIYATA Y, KOJIMA H, SANO K. Mutation analysis of the feedback inhibition site of aspartokinase III of *Escherichia coli* K-12 and its use in L-threonine production[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, 65(5): 1149-1154.
- [36] ZHANG YF, MENG QL, MA HW, LIU YF, CAO GQ, ZHANG XR, ZHENG P, SUN JB, ZHANG DW, JIANG WX, MA YH. Determination of key enzymes for

- threonine synthesis through *in vitro* metabolic pathway analysis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 86.
- [37] SCHÜTZE A, BENNDORF D, PÜTTKER S, KOHRS F, BETTENBROCK K. The impact of *ackA*, *pta*, and *ackA-pta* mutations on growth, gene expression and protein acetylation in *Escherichia coli* K-12[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 233.
- [38] de MEY M, de MAESENEIRE S, SOETAERT W, VANDAMME E. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2007, 34(11): 689-700.
- [39] DONG XY, ZHAO Y, HU JY, LI Y, WANG XY. Attenuating L-lysine production by deletion of *ddh* and *lysE* and their effect on L-threonine and L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 93/94: 70-78.
- [40] XIE XX, LIANG Y, LIU HL, LIU Y, XU QY, ZHANG CL, CHEN N. Modification of glycolysis and its effect on the production of L-threonine in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(6): 1007-1015.
- [41] 冯志彬, 徐庆阳, 陈宁. 代谢副产物对 L-苏氨酸发酵的影响及应对措施[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(6): 32-36.
- FENG ZB, XU QY, CHEN N. The effects of byproducts on L-threonine fermentation and resolved schemes[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(6): 32-36 (in Chinese).
- [42] WANG M, CHEN BQ, FANG YM, TAN TW. Cofactor engineering for more efficient production of chemicals and biofuels[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(8): 1032-1039.
- [43] SHEN CR, LIAO JC. Synergy as design principle for metabolic engineering of 1-propanol production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 17: 12-22.
- [44] SATOWA D, FUJIWARA R, UCHIO S, NAKANO M, OTOMO C, HIRATA Y, MATSUMOTO T, NODA S, TANAKA T, KONDO A. Metabolic engineering of *E. coli* for improving mevalonate production to promote NADPH regeneration and enhance acetyl-CoA supply[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(7): 2153-2164.
- [45] 马倩, 夏利, 谭淼, 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[J]. *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).
- [46] XU YR, LIU YF, LI FR, CAO GQ, ZHENG P, SUN JB, WEN JP, ZHANG DW. Identification of a new gene *yecC* involved in threonine export in *Escherichia coli*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(17): fnx174.
- [47] 杨冬美, 李华, 李由然, 张梁, 丁重阳, 李赢, 顾正华, 石贵阳. 大肠杆菌 TdcC、SstT 和 LIV-1 系统缺失对胞外 L-苏氨酸积累的影响[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(1): 20-29.
- YANG DM, LI H, LI YR, ZHANG L, DING ZY, LI Y, GU ZH, SHI GY. Effects of TdcC, SstT, and LIV-1 systems deletion of *Escherichia coli* on extracellular L-threonine accumulation[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(1): 20-29 (in Chinese).
- [48] 赵磊. 大肠杆菌 L-苏氨酸生产菌代谢工程改造优化[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2020.
- ZHAO L. Metabolic engineering modification of an *Escherichia coli* L-threonine production strain[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [49] QIAO J, TAN X, REN HY, WU Z, HU XQ, WANG XY. Construction of an *Escherichia coli* strain lacking fimbriae by deleting 64 genes and its application for efficient production of poly(3-hydroxybutyrate) and L-threonine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(12): e0038121.
- [50] LI YX, HAO GX, GALVANI CD, MENG YZ, FUENTE L, HOCH HC, BURR TJ. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation[J]. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 3): 719-726.
- [51] 于海波, 徐建中, 刘立明, 张伟国. 重组大肠杆菌全细胞催化 L-苏氨酸合成 2,5-二甲基吡嗪[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 228-241.
- YU HB, XU JZ, LIU LM, ZHANG WG. Biosynthesis of 2,5-dimethylpyrazine from L-threonine by whole-cell biocatalyst of recombinant *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(1): 228-241 (in Chinese).
- [52] 闫继爱, 张雪, 张芸, 左佃光, 陈宁, 温廷益. 利用 Red 同源重组技术构建产 L-苏氨酸的基因工程菌[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(3): 79-84.
- YAN JA, ZHANG X, ZHANG Y, ZUO DG, CHEN N, WEN TY. Construction of genetic engineering strains for L-threonine production by red recombination[J]. *China Biotechnology*, 2010, 30(3): 79-84 (in Chinese).

- [53] 朱向东. 微生物发酵工艺优化研究进展[J]. 化工管理, 2019(16): 202, 205.
ZHU XD. Research progress on optimization of microbial fermentation process[J]. *Chemical Enterprise Management*, 2019(16): 202, 205 (in Chinese).
- [54] JEONG JY, KIM YJ, CHO N, SHIN D, NAM TW, RYU S, SEOK YJ. Expression of *ptsG* encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(37): 38513-38518.
- [55] SU YW, GUO QQ, WANG S, ZHANG X, WANG J. Effects of betaine supplementation on L-threonine fed-batch fermentation by *Escherichia coli*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2018, 41(10): 1509-1518.
- [56] LI YJ, ZHANG DZ, CAI NY, HAN C, MAO Q, WANG T, ZHOU Q, CHEN N, XIE XX. Betaine supplementation improved L-threonine fermentation of *Escherichia coli* THRD by upregulating *zwf* (glucose-6-phosphate dehydrogenase) expression[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2019, 39: 67-73.
- [57] LEE MH, LEE HW, PARK JH, AHN JO, JUNG JK, HWANG YI. Improved L-threonine production of *Escherichia coli* mutant by optimization of culture conditions[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(2): 127-130.
- [58] CHEN N, HUANG J, FENG ZB, YU L, XU QY, WEN TY. Optimization of fermentation conditions for the biosynthesis of L-threonine by *Escherichia coli*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 158(3): 595-604.
- [59] OKAMOTO K, IKEDA M. Development of an industrially stable process for L-threonine fermentation by an L-methionine-auxotrophic mutant of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89(1): 87-89.
- [60] AZZAM MM, CHEN W, XIA WG, WANG S, ZHANG YN, EL-SENOUSEY HK, ZHENG CT. The impact of *Bacillus subtilis* DSM32315 and L-Threonine supplementation on the amino acid composition of eggs and early post-hatch performance of ducklings[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 1238070.
- [61] CHALVON-DEMERSAY T, LUISE D, le FLOC'H N, TESSERAUD S, LAMBERT W, BOSI P, TREVISI P, BEAUMONT M, CORRENT E. Functional amino acids in pigs and chickens: implication for gut health[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 663727.
- [62] WANG SM, CHEN XM, JIN X, GU F, JIANG W, QI QS, LIANG QF. Creating polyploid *Escherichia coli* and its application in efficient L-threonine production[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(31): e2302417.
- [63] ZHAO L, LU Y, YANG J, FANG Y, ZHU LF, DING ZX, WANG CH, MA WJ, HU XQ, WANG XY. Expression regulation of multiple key genes to improve L-threonine in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 46.
- [64] WANG SM, HAO RX, JIN X, LI XM, QI QS, LIANG QF. Dynamic regulation of transporter expression to increase L-threonine production using L-threonine biosensors[J]. *Fermentation*, 2022, 8(6): 250.
- [65] FANG Y, WANG JL, MA WJ, YANG J, ZHANG HL, ZHAO L, CHEN SS, ZHANG SY, HU XQ, LI Y, WANG XY. Rebalancing microbial carbon distribution for L-threonine maximization using a thermal switch system[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 33-46.
- [66] ZHU LF, FANG Y, DING ZX, ZHANG SY, WANG XY. Developing an L-threonine-producing strain from wild-type *Escherichia coli* by modifying the glucose uptake, glyoxylate shunt, and L-threonine biosynthetic pathway[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(6): 962-976.
- [67] 王钰, 郑平, 孙际宾. 谷氨酸棒杆菌的代谢工程使能技术研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1603-1618.
WANG Y, ZHENG P, SUN JB. Recent advances in developing enabling technologies for *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(5): 1603-1618 (in Chinese).
- [68] WANG YS, BAI YL, ZENG Q, JIANG ZY, LIU YZ, WANG XY, LIU XT, LIU CL, MIN WH. Recent advances in the metabolic engineering and physiological opportunities for microbial synthesis of L-aspartic acid family amino acids: a review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253(Pt 3): 126916.
- [69] ZHANG XM, GAO YJ, CHEN ZW, XU GQ, ZHANG XJ, LI H, SHI JS, KOFFAS MAG, XU ZH. High-yield production of L-serine through a novel identified exporter combined with synthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 115.