DOI:10.12441/spyswjs.20241207002 [文章编号] 1673-1689(2025)12-0030-13

基于代谢工程和多酶级联策略促进大肠杆菌合成水杨酸

王 凯[1,2] 潘学玮[1] 杨套伟[1*] 饶志明[1,2]

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 2. 宜兴食品生物科技研究院有限公司,江苏 无锡 214200)

摘要:【目的】芳香族化合物水杨酸(SA)的产量受限于其对细胞能量代谢相关酶的抑制作用,为避免SA对细胞能量代谢相关酶的影响,需提升SA产量。**【方法】**通过优化代谢途径和酶系统,设计了高效的大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株来提高SA产量。**【结果】**根据GEMS1515基因组规模的代谢模型,预测了磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)途径和SA生物合成途径中的关键瓶颈,并通过靶向敲除*fbaA*和*dcuA*基因,成功将SA产量从834.82 mg/L提升至1 143.56 mg/L。通过结合柔性和刚性肽接头以及TRAP支架蛋白质(TRAP1、TRAP3)的多酶级联策略,提高了催化效率,最终优化菌株的SA产量最高达2 100.00 mg/L,比初始菌株提高了151%。**【结论】**将代谢工程、多酶级联策略和机器学习技术运用在高价值化合物的生物合成优化中具有较大应用潜力。

关键词:大肠杆菌;水杨酸;多酶级联策略;支架蛋白质

Promoting the Synthesis of Salicylic Acid in *Escherichia coli* Based on Metabolic Engineering and Multi-enzyme Cascade Strategy

WANG Kai[1,2] *PAN Xuewei*[1] *YANG Taowei*[1*] *RAO Zhiming*[1,2]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Yixing Institute of Food and Biotechnology Co., Ltd., Wuxi 214200, China)

Abstract: [**Objective**] The production of the aromatic compound salicylic acid (SA) is limited by its inhibitory effects on enzymes related to cellular energy metabolism. This study aims to develop a strategy for avoiding the impact of SA on enzymes related to cellular energy metabolism and increase the yield of SA. [**Method**] A highly efficient *Escherichia coli* strain was designed to improve SA production by optimizing metabolic pathways and enzyme systems. [**Result**] The genome-scale metabolic model GEMS1515 was employed to predict the key bottle necks in the phosphoenolpyruvic acid (PEP) pathway and SA biosynthesis pathways. The SA yield was successfully increased from 834.82 mg/L to 1 143.56 mg/L by targeted knockout of *fbaA* and *dcuA* genes. Furthermore, the enzyme fusion strategy, combining flexible and rigid peptide linkers with TRAP scaffold proteins (TRAP1 and TRAP3), further improved the catalytic efficiency. The optimized strain achieved a maximum SA yield of 2 100.00 mg/L, which represented an increase of 151% over that of the initial strain. [**Conclusion**] Integrating metabolic engineering, multi-enzyme cascade strategy, and machine learning

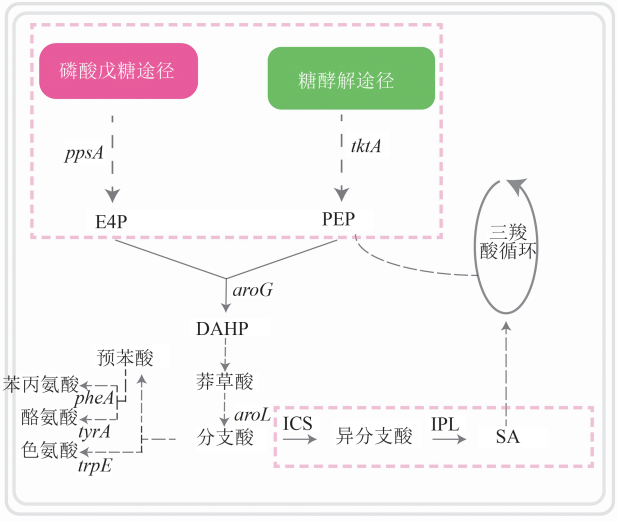
基金项目:国家自然科学基金面上项目(32370040,32100055);江苏省自然科学基金项目(BK20221537,BK20210464);江南大学学科人才引进计划项目(111-2-06)。

通信作者:杨套伟(1983—),男,博士,副教授,博士研究生导师,主要从事微生物代谢改造及酶分子改造研究。E-mail:ytw1228@163.com

收稿日期:2024-12-07 **修回日期:**2025-01-20

demonstrate great application potential in optimizing the biosynthesis of high-value compounds.
Keywords: *Escherichia coli*; salicylic acid; multi-enzyme cascade strategy; protein scaffold

SA是一种重要的芳香族化合物，在药品、农用化学品的加工中广泛应用[1-3]，是合成多种生物活性分子的重要前体。大肠杆菌中SA的生物合成涉及2条关键的生物合成途径：莽草酸盐途径和苯丙酸途径。其中异分支酸合酶（ICS，由*entC*基因编码）和丙酮酸-异分支酸裂解酶（IPL，由*pchB*基因编码）等关键酶催化前体物质转化为SA的关键步骤见图1。前期研究者采用质粒的系统过表达关键酶并敲除竞争途径来优化碳通量，从而提高前体可用性并提高通路效率[4]。但在大肠杆菌中，前体供应和酶催化效率仍是实现SA高水平生产的关键瓶颈。



E4P—赤藓糖-4-磷酸；DAHP—3-脱氧-*D*-七酮松酸酯-7-磷酸；*aroL*—该基因的翻译产物为莽草酸激酶；*ppsA*—该基因的翻译产物为磷酸烯醇式丙酮酸合酶；*tktA*—该基因的翻译产物为转酮醇酶I；*aroG*—该基因的翻译产物为3-脱氧-*D*-阿拉伯糖基-七酮糖酸盐-7-磷酸合酶；*pheA*—该基因的翻译产物为预苯酸脱水酶；*tyrA*—该基因的翻译产物为融合分支酸变位酶；*trpE*—该基因的翻译产物为邻氨基苯甲酸合酶亚基。

图1　大肠杆菌中SA代谢合成途径概况

Fig. 1　Overview of the pathways for SA biosynthesis in *Escherichia coli*

在植物中，SA的生物合成通常为2条主要途径：第1条途径是苯丙氨酸解氨酶（PAL）依赖性途径，涉及中央苯丙烷途径[5-6]；第2条途径为异分支酸途径。研究表明，当在拟南芥中喂食^{13}C标记的苯丙氨酸（$^{13}C_6$-Phe）时，代谢产物SA中并未发现标记物，而在SA的异构体4-羟基苯甲酸（4-HBA）中却发现了^{13}C，这一发现促使研究者对植物SA生物合成途径的传统理论进行重新审视[7]。2023年，在*Science*、*Molecular Plant*、*Journal of Integrative Plant Biology*等期刊上，研究者发表了多篇文章深入解析植物中SA的完整生物合成途径，揭示了过去30年关于该途径的研究误区[8-9]。这些研究突破了传统认知，重新揭示了植物SA生物合成途径的复杂性，特别是ICS和IPL途径的研究。基于这些发现，研究者通过机器学习的代谢通量控制设计，并结合初始菌株的改造，使得SA产量最高可达1 500.00 mg/L。

在这些研究的基础上，作者旨在通过优化前体通量、酶活性及多酶系统的整合来提高SA的产量。将编码关键生物合成酶和前体途径的基因整合到大肠杆菌中，优化了酶的共表达及前体的可用性。利用机器学习技术，通过增强前体代谢通量，重新引导碳流向SA生产。为进一步提高催化效率和代谢通量，探索了多酶融合和支架蛋白质的潜力。具体而言，在ICS和IPL这2种酶的一级结构不同位置插入连接多肽，采用柔性和刚性肽接头以及重复的支架蛋白质构建多酶复合物，通过多酶级联反应促进催化[10-11]。作者通过挖掘支架辅助酶工程在增强多酶级联反应中的潜力，为未来通过机器学习改进蛋白质设计提供启示，以进一步优化生物基化学品工业规模生产的代谢途径。本研究可为如何通过合成生物学策略提升SA等高价值化合物的生物合成效率和可扩展性提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

菌株和质粒：江南大学应用微生物学与代谢工程研究室保藏，见表1~2。

Luria-Bertani（LB）培养基：胰蛋白胨10 g/L、酵母提取物5 g/L、NaCl 10 g/L，用于重组菌株培养。

M9A培养基：葡萄糖20 g/L、Na_2HPO_4 6 g/L、NaCl 0.5 g/L、KH_2PO_4 3 g/L、NH_4Cl 2 g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 246.5 mg/L、$CaCl_2$ 14.7 mg/L、甘油10 g/L、酵母提取物2 g/L、3-吗啉丙磺酸2 g/L，用于SA生产菌株

的发酵培养，敲除 *trpE* 基因后，M9A 培养基需添加 10 mg/L 色氨酸。向培养基中添加卡那霉素、氨苄西林和氯霉素，使终质量浓度分别为 50、100、34 mg/L。

胰蛋白胨、酵母提取物：分析纯，舜友（上海）生物技术有限公司；抗生素：分析纯，生工生物工程（上海）股份有限公司；SA、甲醇、甲酸、葡萄糖、Na_2HPO_4、NaCl、KH_2PO_4、NH_4Cl、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、$CaCl_2$ 和色氨酸：分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

梯度 PCR 仪：Nexus GX2 型，德国艾本德股份公司；电泳槽：VE-180 型，上海天能科技有限公司；电泳仪：EPS-300 型，上海天能科技有限公

表 1 工程菌株

Table 1 Engineered strains

大肠杆菌编号	宿主大肠杆菌编号	描述	来源
W3110			作者所在实验室
K-01	W3110	pTrc-Ptrc-*entC-pchB*	本研究
K-02	K-01	Δ*pykA/F*	本研究
K-03	K-02	Δ*pheA*	本研究
K-04	K-03	Δ*tyrA*	本研究
W3110K-1	K-04	pACYCD-Ptrc-*aroG*^{S180F}-*ppsA-tktA-aroL*	本研究
K-05	K-04	*yjiV*∷Ptrc-lao-*ppsA*	本研究
K-06	K-05	*ygaY*∷Ptrc-lao-*tktA*	本研究
K-07	K-06	*yeeP*∷Ptrc-lao-*aroL*	本研究
W3110K-2	K-06	*yneU*∷Ptrc-lao-*aroG*^{S180F}	本研究
W3110K-201	W3110K-2	Δ*fbaA*	本研究
W3110K-202	W3110K-2	Δ*tpiA*	本研究
W3110K-203	W3110K-2	Δ*dcuA*	本研究
W3110K-204	W3110K-2	Δ*adhP*	本研究
W3110K-205	W3110K-2	Δ*wcaF*	本研究
W3110K-206	W3110K-2	Δ*yhfL*	本研究
W3110K-207	W3110K-201	Δ*adhP*	本研究
W3110K-3	W3110K-201	Δ*dcuA*	本研究
W3110K-209	W3110K-201	Δ*wcaF*	本研究
W3110K-210	W3110K-201	Δ*yhfL*	本研究
W3110K-211	W3110K-207	Δ*yhfL*	本研究
W3110K-212	W3110K-207	Δ*wcaF*	本研究
W3110K-213	W3110K-207	Δ*adhP*	本研究
W3110K-214	W3110K-204	Δ*wcaF*	本研究
W3110K-215	W3110K-3	Δ*tpiA*	本研究
W3110K-216	W3110K-3	Δ*yhfL*	本研究
W3110K-218	K-01	Δ*fbaA*，Δ*dcuA*	本研究
K（GS）2	W3110K-3	*entC*-GS2-*pchB*	本研究
K（GS）3	W3110K-3	*entC*-GS3-*pchB*	本研究
K（EK）2	W3110K-3	*entC*-EK2-*pchB*	本研究
W3110K-4	W3110K-3	*entC*-EK3-*pchB*	本研究
W3110K-41	W3110K-4	ΔyedS∷*6-His-TRAP1-3*	本研究
W3110K-42	W3110K-4	*entC*+MEEVV，*pchB*+MRRVW	本研究
W3110K-5	W3110K-4	*entC*+MRRVW，*pchB*+MEEVV	本研究
W3110K-6	W3110K-5	*entC*+MRRVW，*pchB*^{94}+MEEVV	本研究
W3110K-7	W3110K-6	Δ*trpE*	本研究

表2　构建的质粒

Table 2　Constructed plasmids

质粒	描述	来源
pTrc99A	Amp，大肠杆菌穿梭载体	作者所在实验室
pACYCDuet	Chl，大肠杆菌穿梭载体	作者所在实验室
pTrc-Ptrc-*entC-pchB*	pTrc与Ptrc控制下的*entC*和*pchB*基因簇	本研究
pACYCDuet-Ptrc-*aroG*^{S180F}-*ppsA-tktA-aroL*	pACYC在Ptrc控制下的*aroG*^{S180F}、*ppsA*、*tktA*和*aroL*基因簇	本研究
pTrc-Ptrc-*entC-EK3-pchB*	pTrc与Ptrc控制下的*entC-EK3-pchB*基因簇	本研究
pTrc-Ptrc-*entC3-pchB1*	pTrc与Ptrc控制下的*entC*3-*pchB1*基因簇	本研究
pTrc-Ptrc-*entC3-pchB*^{94}*1*	pTrc与Ptrc控制下的*entC*3-*pchB*^{94}*1*基因簇	本研究

司；凝胶图像分析系统：Tanon MINI Space型，上海天能科技有限公司；小型台式高速离心机：5425型，德国艾本德股份公司；高速冷冻离心机：5804R型，德国艾本德股份公司；医用冷藏箱：MPC-5V1006型，安徽中科都菱商用电器股份有限公司；pH计：AB23PH-F型，奥豪斯国际贸易（上海）有限公司；超声波细胞破碎仪：SCIENTZ-IID型，宁波新芝生物科技股份有限公司；紫外-可见分光光度计：UV-1200型，翱艺仪器（上海）有限公司；生物传感分析仪：SBA-40E型，济南延和生物科技有限公司；全波长酶标仪：Infinite M nano型，瑞士Tecan Group AG公司；高效液相色谱仪（HPLC）（配紫外和示差检测器）：1260 InfinityII型，安捷伦科技（中国）有限公司；水浴锅：HWS-24型，上海一恒科学仪器有限公司。

1.3　方法

1.3.1　重组菌株的构建

以大肠杆菌W3110为宿主菌株，通过途径改造实现SA的生产。首先，使用大肠杆菌JM109作为克隆宿主构建质粒，并通过CRISPR/Cas9系统对工程菌株基因组进行精准编辑。将目标基因序列克隆至pTargetF质粒中，构建靶向载体。通过电穿孔共转化pTargetF和pCas9质粒，利用N20序列引导切割并定位目标基因。采用500 bp上下游同源臂进行基因的敲入和敲除，利用同源重组原理连接目的基因及上下游片段，形成敲入盒。利用CRISPR/Cas9系统诱导基因组切割，并通过同源臂促进修复，最终完成基因组修改。为消除pTargetF质粒，转化菌株在含*L*-阿拉伯糖的培养基中于30 ℃培养12 h，随后于42 ℃培养12 h，以获得无质粒的工程菌株。质粒构建和基因编辑工作通过Gibson组装和分子克隆方法完成，蛋白质序列和引物信息见表3。

基因敲除的方法与基因过表达方法相似，主要区别在于敲除过程需要扩增目标基因两侧的上下游序列（约500 bp）。首先，从大肠杆菌基因组中扩增目标基因的上下游同源区域。通过双重融合PCR将这2个片段连接，形成能够精确靶向目标基因的重组序列。该序列随后被克隆至pTargetF质粒中，并与pCas9质粒共同转化至大肠杆菌宿主中。

1.3.2　代谢通量和酶催化成本预测

通量平衡分析（FBA）用于评估模拟模型在不同生长条件下的表现。模型的输入条件根据文献进行调整，特别是将底物吸收率限制在5~10 mmol/（g·h），其中g为细胞干质量单位。在SA生物合成反应中，通过最小化算法计算酶成本，通过OptMDFpathway函数评估热力学驱动力。

1.3.3　TRAP1-3蛋白质设计

TRAP1-3（即TRAP1和TRAP3）蛋白质由2个四肽重复亲和蛋白质模块组成，每个TRAP模块设计的特异性配体分别对应TRAP1和TRAP3的结合肽标签MEEVV和MRRVW。TRAP1、TRAP3由苏州金唯智生物科技有限公司提供，克隆在pET-28a（+）载体上，pET-28a（+）作为标准表达载体用于表达蛋白质。

1.3.4　TRAP支架蛋白质融合策略

通过特异性生物分子识别相互作用进行TRAP支架蛋白质（TRAP1、TRAP3）与标记酶的融合。含TRAP1、TRAP3和标记酶的菌株在M9A培养基中于37 ℃、200 r/min培养2 h，加入体积分数0.1%的IPTG，使得终浓度为0.4 mmol/L。在

表 3 蛋白质序列和引物信息

Table 3 Protein sequence and primer information

蛋白质/引物	序列（5′—3′）
TRAP1-3	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGSALKEKELGNDAYKKKDFDTALKHYDKAKELDPTNMYILNQAAVYFEKGDYNK CRELCEKAIEVGRENREDYRLIAIAYARIGNSYFKEEKYKDAIHFYNKSLAEHRTPKVLKKCQQAEKILKEQGGSGLQ ALKEKELGNDAYKKKDFDTALKHYDKAKELDPTNMYIMNQAAVYFEKGDYNKCRELCEKAIEVGRENREDYRMIA YAYADIGDSYFKEEKYKDAIHFYNKSLAEHRTPKVLKKCQQAEKILKEQLE
entC+MRRVW	MDTSLAEEVQQTMATLAPNRFFFMSPYRSFTTSGCFARFDEPAVNGDSPDSPFQQKLAALFADAKAQGIKNPVMVGAIPFDP RQPSSLYIPESWQSFSRQEKQASARRFTRSQSLNVVERQAIPEQTTFEQMVARAAALTATPQVDKVVLSRLIDITTDAAIDSGV LLERLIAQNPVSYNFHVPLADGGVLLGASPELLLRKDGERFSSIPLAGSARRQPDEVLDREAGNRLLASEKDRHEHELVTQA MKEVLRERSSELHVPSSPQLITTPTLWHLATPFEGKANSQENALTLACLLHPTPALSGFPHQAATQVIAELEPFDRELFGGIVG WCDSEGNGEWVVTIRCAKLRENQVRLFAGAGIVPASSPLGEWRETGVKLSTMLNVFGLHMRRVW
pchB^{94}+MEEVV	MNFPLVDPDMKTPEQCSGLDDVRCGIDAMDQQIIQALGRRLAYVKAAAQFKPTEDSIAAPERVAAMLPQRRQWAEQ ASLDPMFVVPLFAQIIHWMEEVVNIAQQVRHWRRQHGLDQGAQDE
yjiv-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTTTGTCCCGTGCCAGAAGATGGTTTTAGAGCTAGAA
yjiv-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTTCGCCAACAGCGAAGAGAGTGTTTTAGAGCTAGAA
ygaY-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTGACATCAGCACGATCAGCGCGTTTTAGAGCTAGAA
ygaY-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTTGGTTAACTTACTGGTCTGGGTTTTAGAGCTAGAA
yeeP-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTGCCCTGCCATGAATGGGATAGTTTTAGAGCTAGAA
yeeP-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTAAATATCCGGTCCACCGCACGTTTTAGAGCTAGAA
yneU-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTGCGCAGGATCGCTGGCATCT GTTTTAGAGCTAGAA
yneU-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTCGGAATCGTTGTTAAGAGTCGTTTTAGAGCTAGA
pykF-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTCATAAATAGGCAGTCCAAAG GTTTTAGAGCTAGAA
pykF-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTTCTGGTGCACTGGTACCGAGGTTTTAGAGCTAGAA
pykA-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTACAAAAATCGTTACCACGTTGTTTTAGAGCTAGAA
pykA-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTGGGCGACGTGATGAGTACCGGTTTTAGAGCTAGAA
trpE-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTCTCGAACTGCTAACCTGCGAGTTTTAGAGCTAGAA
trpE-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTCGGCAACGGCGAAGCCCTCCGTTTTAGAGCTAGAA
tyrA-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTCATAAATAGGCAGTCCAAAG GTTTTAGAGCTAGAA
tyrA-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTGTTTCCGCAAGGTGGAGCAC GTTTTAGAGCTAGAA
pheA-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTCAAACTGCTCTCGCATCGCCGTTTTAGAGCTAGAA
pheA-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTACAGGCACTACGTTCTCACT GTTTTAGAGCTAGAA
yedS-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTGGTAATAAACTGGATTTGTAGTTTTAGAGCTAGAA
yedS-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTTTTAGATTGCAGGTAAGCGAGTTTTAGAGCTAGAA
fbaA-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTCCGCGCGTATGGCTGCGTGCGTTTTAGAGCTAGAA
fbaA-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTTTGGAGAACTGAACGATAACGTTTTAGAGCTAGAA
dcuA-sgRNA-F1	AGTCCTAGGTATAATACTAGTCAGCACGAAGCCGAAGCAAAGTTTTAGAGCTAGAA
dcuA-sgRNA-F2	AGTCCTAGGTATAATACTAGTCATGCAGGTTGCTGGCGGTCGTTTTAGAGCTAGAA
sgRNA-R	TTCTAGCTCTAAAACGTAAATCCTGACCGAATTCGACTAGTATTATACCTAGGACT
aroG^{S180F}-F	GCGAACTGGCATCAGGGCTTTTCTGTCCGGTCGGCTTCAAAAATGG
aroG^{S180F}-R	TTGAAGCCGACCGGACAGAAAAGCCCTGATGCCAGTTCG

16 ℃下孵育 12 h，以确保 TRAP1、TRAP3 和标记酶正确折叠并成功组装。培养结束后，在 37 ℃、200 r/min 条件下继续培养 48 h，观察 SA 产量变化。

1.3.5 蛋白质表达与纯化

TRAP1-3 蛋白质在大肠杆菌 W3110 中以 N 端 6-His 标签融合蛋白的形式进行表达。在 200 mL 自诱导培养基中加入 2 mL 发酵液，并在 16 ℃下诱导培养约 24 h。通过离心收集大肠杆菌 W3110 细胞，用 PBS 悬浮并洗涤 2 次。在冰浴条件下超声破碎细胞，设置破碎周期为：超声 1 s，停顿 3 s，总时长 20 min。裂解液经离心分离后，

使用含20 mmol/L咪唑的缓冲液A（50 mmol/L、pH 7.4的Tris与150 mmol/L的NaCl混合）洗涤镍-NTA树脂2次，然后将裂解液加入树脂中，于4 ℃摇匀并结合3 h。结合后，使用缓冲液A清洗树脂，再用缓冲液B（50 mmol/L、pH 7.4的Tris与300 mmol/L的NaCl混合）洗涤5次，最后用含250 mmol/L咪唑的缓冲液B洗脱目标蛋白质，并通过透析（4 ℃、13 h）去除咪唑，透析液为50 mmol/L Tris（pH 8.0）、300 mmol/L NaCl和5 mmol/L 2-巯基乙醇混合液[12]。

1.3.6　培养条件

为了生产SA，将所有转化子接种到10 mL含适量氨苄西林的LB培养基中，在37 ℃、200 r/min的摇床上培养过夜。随后，将0.3 mL的培养液转移至500 mL挡板摇瓶中，加入含适量抗生素的M9A培养基，在37 ℃、200 r/min条件下培养2 h。然后加入体积分数0.1%的IPTG，并在16 ℃下孵育12 h，接着于37 ℃继续培养48 h，培养过程中的pH保持在6~7[13]。通过紫外-可见分光光度计测定OD_{600}值。样品在12 000 r/min下离心10 min，取1 mL上清液，使用0.22 μm聚醚砜（PES）针头式过滤器过滤，进行HPLC分析。

1.3.7　HPLC分析

通过HPLC分析样品和标准品的SA质量浓度。采用Diamonsil C18反相色谱柱（5 μm×250 mm×4.6 mm），流动相A为体积分数100%甲醇，流动相B为体积分数0.1%甲酸水溶液，柱温30 ℃，进样量10 μL，流量1 mL/min。梯度洗脱条件为：体积分数15%~75%的流动相B持续25 min，体积分数75%~90%的流动相B持续1 min，体积分数90%的流动相B持续4 min。通过计算300 nm处的紫外吸收峰的峰面积进行SA定量分析[14]。

1.4　统计分析

所有试验均独立进行至少3次，结果以平均值±标准差表示。

2　结果与讨论

2.1　大肠杆菌中SA代谢路径的重构与验证

以往的研究通常通过双质粒系统增强分支酸前体（SA生物合成前体）的表达，同时敲除替代的分支酸转化途径，并持续表达*entC*基因和*pchB*外源基因，从而将分支酸转化为SA，见图1。这些策略有助于提升SA的合成效率，大肠杆菌产SA的产量最高达1 200.00 mg/L。然而，双质粒系统的使用可能限制了细胞工厂的生产潜力，因此作者旨在通过将前体质粒的过表达部分整合至大肠杆菌基因组中，进一步提高其产SA的能力，并为后续研究奠定基础，见图2（a）。

在大肠杆菌W3110中，分别表达了*entC*基因（来自大肠杆菌）和*pchB*基因（来自荧光假单胞菌Pf-5）。此外，还将多个前体物质生物合成基因（如*aroL*、*tktA*、$aroG^{S180F}$和*ppsA*）分别整合到基因组的*yeeP*、*ygaY*、*yneU*和*yjiV*假基因位点。这些基因的整合旨在提高前体物质的合成，从而增强SA的合成能力[4,14-15]。

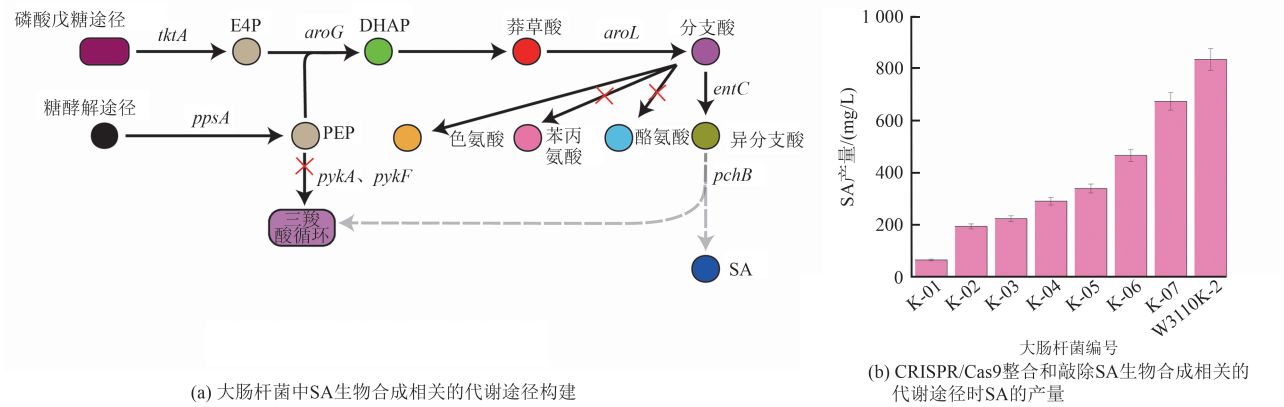
为了进一步优化SA的生产，作者还敲除了*pykA*基因和*pykF*基因（翻译产物分别为丙酮酸激酶1和丙酮酸激酶2），将碳通量重新定向输送至莽草酸盐途径。此外，通过敲除*pheA*和*tyrA*基因（翻译产物分别为预苯酸脱水酶和融合分支酸变位酶），成功阻断了预苯酸生物合成途径，从而进一步优化了SA的合成路径。

使用上述策略构建的大肠杆菌W3110K-2（初始菌株）在LB培养基中培养后，SA产量达到了834.82 mg/L，见图2（b）。结果表明，基因整合显著提高了SA产量。虽然对基因组进行了整合和敲除，但SA产量却未超过通过质粒表达系统获得的水平，这可能是由于在SA生物合成的整个途径中，仍有其他基因在某些步骤起到限速作用，导致SA产量未能大幅度增加。

2.2　基于GEMS1515模型优化SA生物合成途径

为了解决前体供应有限的问题，假设PEP途径是关键瓶颈。为验证这一假设，在培养基中补充了不同浓度的E4P和PEP。补充PEP后，SA产量显著增加，说明PEP途径在SA生物合成中具有关键作用。结果表明，提高SA产量的关键在于进一步优化PEP途径。

为优化代谢通量并提高SA产量，采用基因组规模代谢模型GEMS1515预测了PEP途径和SA生物合成途径中的通量分布及相关蛋白质成本[16]。尽管*ppsA*基因的表达增强，但模型显示，与SA生物合成通路相比，PEP途径的通量仍较低。先前研究表明，这一差异可能源于PEP生产相关酶的成本较高[17-19]，与本研究结果一致，表明



(a) 大肠杆菌中SA生物合成相关的代谢途径构建

(b) CRISPR/Cas9整合和敲除SA生物合成相关的代谢途径时SA的产量

图 2　大肠杆菌中 SA 生物合成相关的代谢途径构建时对 SA 产量的影响

Fig. 2　Impact of metabolic pathway construction for SA biosynthesis on the SA yield in *Escherichia coli*

尽管 E4P 供应充足，PEP 生产仍然是限制 SA 产量的关键因素。

为进一步优化代谢通量，根据模型预测选择 6 个基因（*fbaA*、*tpiA*、*dcuA*、*adhP*、*wcaF*、*yhfL*）进行靶向敲除，结果见图 3（a）~（b）。*fbaA* 和 *dcuA* 基因的联合敲除导致大肠杆菌 W3110K-3 的 SA 产量达到 1 143.56 mg/L，比大肠杆菌 W3110K-2 增加了约 40%，大肠杆菌 W3110K-3 的生长速率和对底物葡萄糖的利用速率均优于大肠杆菌 W3110K-2，见图 3（c）~（d）。值得注意的是，*fbaA* 和 *dcuA* 基因的缺失也提升了糖酵解途径和三羧酸循环的通量，从而增加了 SA 生物合成所需的关键辅助因子（PEP、E4P、ATP）的供应。在大肠杆菌 K-01 中，*fbaA* 和 *dcuA* 基因的缺失也使 SA 产量从 65.01 mg/L 增加到 133.31 mg/L，进一步证明了这些基因的敲除对 SA 产量的积极影响。

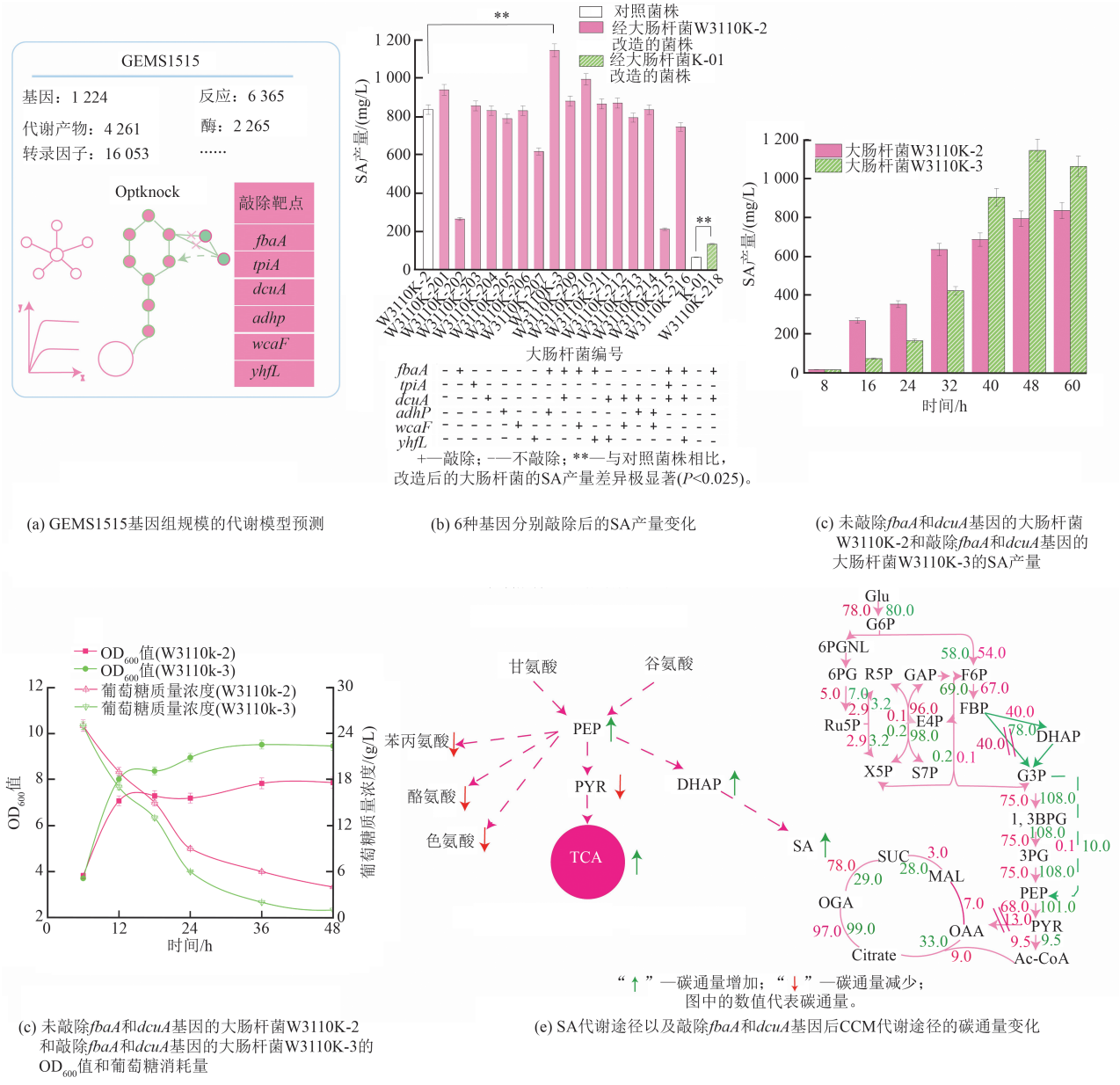
为研究菌株中敲除 *fbaA* 和 *dcuA* 基因后的 SA 产量提升的机制，使用 GEMS1515 模型预测了大肠杆菌 W3110K-2 中 SA 生物合成途径的通量分布。如图 3（e）所示，NADH 依赖性反应的通量显著增加，这可能是因为 NADH 在生物合成过程中具有重要作用。与敲除基因前的菌株相比，糖酵解途径和三羧酸循环中的大多数反应的代谢通量也显著增加，表明敲除这些关键基因优化了中枢代谢途径，改善了 SA 生物合成所需前体（PEP 和 E4P）和 ATP 的供应。NADH 作为关键电子载体，可将氧还原为水，在电子传递链中起着至关重要的作用[20]。研究表明，SA 产量的增加伴随着 NADH 的积累，导致细胞的氧化还原状态不平衡[21-22]。推测尽管在 SA 生物合成过程中积累了多余的 NADH，但 *fbaA* 和 *dcuA* 基因的缺失可能增强了某些 NADH 依赖性反应的通量，从而维持了氧化还原平衡。

fbaA 和 *dcuA* 基因的缺失可增加流向关键前体的碳通量、提供必要的辅助因子和维持细胞氧化还原稳态，因此促进 SA 的产生。结合使用 GEMS1515 模型的计算机代谢预测与基因敲除试验，成功确定了显著增强大肠杆菌中 SA 产量的关键代谢靶标——*fbaA* 和 *dcuA* 基因。这些结果表明了优化中央代谢通量以提高复杂生物合成途径效率的重要性，并证明了在代谢工程策略中维持细胞氧化还原平衡对提升产品产量的关键作用。*fbaA* 和 *dcuA* 基因的敲除增强了流向 SA 前体的代谢流，使菌体在基因整合状态下的 SA 产量接近通过质粒介导的 SA 产量。

2.3　利用柔性/刚性肽接头优化 SA 生物合成相关酶的共表达

在研究前体供应对 SA 生产的影响时，向培养基中添加不同浓度的莽草酸（SA 生物合成途径的上游中间代谢物）。摇瓶发酵结果表明，莽草酸浓度增加并未提升 SA 产量，反而导致 SA 产量下降。这表明在当前试验条件下，莽草酸途径并非 SA 生物合成的瓶颈，该上游前体供应已不再是限制因素。

鉴于前体供应充足，进一步提高 SA 产量的重点转向了对 EntC 酶和 PchB 酶的改造。现有研究表明，*entC* 基因的保守区域突变通常不会显著影响酶活性[23]。然而，氨基酸位置 303（A→T）、



(a) GEMS1515基因组规模的代谢模型预测

(b) 6种基因分别敲除后的SA产量变化

(c) 未敲除*fbaA*和*dcuA*基因的大肠杆菌W3110K-2和敲除*fbaA*和*dcuA*基因的大肠杆菌W3110K-3的SA产量

(c) 未敲除*fbaA*和*dcuA*基因的大肠杆菌W3110K-2和敲除*fbaA*和*dcuA*基因的大肠杆菌W3110K-3的OD_{600}值和葡萄糖消耗量

(e) SA代谢途径以及敲除*fbaA*和*dcuA*基因后CCM代谢途径的碳通量变化

图 3　利用GEMS1515模型进行基因组规模的代谢预测对SA产量的影响

Fig. 3　Impact of genome-scale metabolic prediction using the GEMS1515 model on SA production

304（L→A）、305-306（SG→TA）[24]、327（F→Y）、346（I→L）和359（F→Q）的突变对酶活性或功能有一定影响[25]。此外，关于*pchB*基因突变的研究相对较少，且PchB蛋白质结构较为紧凑，保守区域在整个蛋白质中的占比也较多。通过分子对接和动力学模拟设计了EntC酶和PchB酶的突变，但结果显示这些突变导致酶活性显著下降，甚至无法有效催化底物转化。这一现象可能与PchB酶的紧凑折叠结构有关，这也可能是以往研究中PchB酶突变位点较为匮乏的原因。结合以上现象，EntC酶的活性位点、金属结合位点及底物结合位点的突变均可能导致酶失活，而PchB酶的结构特征也使其难以进行有效的结构功能研究。因此，作者在分子对接设计中将PchB酶作为EntC酶的配体。通过多酶级联策略优化SA前体分支酸和关键催化酶之间的相互作用，EntC酶和PchB酶的相对分子质量（分别为42 900、13 200）与融合蛋白理论相对分子质量（56 100）一致，见图4（a）。

在多酶级联策略实施的初期阶段，采用了肽接头融合策略，将柔性和刚性肽接头用于*entC*基

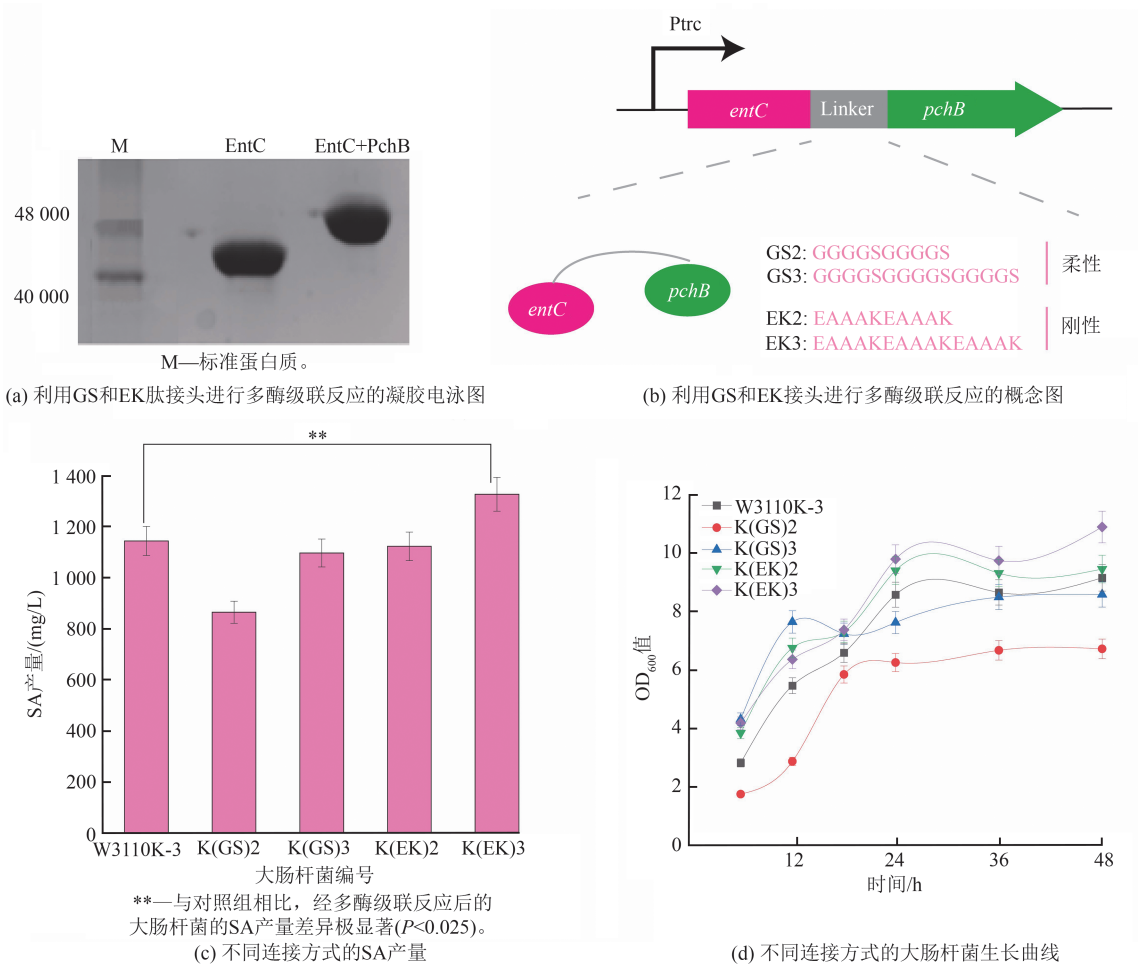
因和*pchB*基因的多酶级联。该策略旨在催化生物合成途径中的连续步骤，肽接头在酶融合中的应用证明在异戊二烯、抗西妥昔单抗蛋白质及其他相关化合物的生产中非常有效[10,26]。

在进一步的研究中，使用了4种不同的肽接头（2个柔性肽接头GS2和GS3、2个刚性螺旋肽接头EK2和EK3）对EntC酶和PchB酶进行了融合，所得菌株命名为K（GS）2（*entC*-GS2-*pchB*）、K（GS）3（*entC*-GS3-*pchB*）、K（EK）2（*entC*-EK2-*pchB*）和K（EK）3（*entC*-EK3-*pchB*），见图4（b）。如图4（c）所示，表现最好的菌株是大肠杆菌W3110K-4，即K（EK）3，其SA产量为1 326.60 mg/L，比菌株W3110K-3增加了20%。如图4（d）所示，与刚性肽接头融合也导致了菌株OD_{600}值的增加，进一步提高了SA产量。通过最小化酶之间的空间距离，优化了底物与催化位点之间的相互作用，酶复合物的稳定性增强，减少了催化过程中的不必要损耗，提高了系统的整体效能，从而提高了反应速率。这些结果表明，通过优化多酶级联策略设计，能够显著提高SA产量。

2.4　TRAP作为支架蛋白质进一步提高SA产量

2.4.1　多酶级联策略和TRAP作为蛋白质支架促进SA生产

在成功将关键基因*entC*和*pchB*进行多酶级联后，代谢流引导至SA生物合成途径。在此过程中，SA副产物丙酮酸的增加对细菌生长有促进作用。EK3接头作为刚性、固定型连接体，有效优化2种酶的空间方向，提高了催化活性。这种结构设计的特点类似于非膜结合的细胞器或反应塔，因此通过进一步探索利用化学生物材料作为支持物来促进多酶复合物的形成，从而实现类似于电化学系统的催化通道来进一步提高催化效率，见图5。



M—标准蛋白质。

(a) 利用GS和EK肽接头进行多酶级联反应的凝胶电泳图

(b) 利用GS和EK接头进行多酶级联反应的概念图

**—与对照组相比，经多酶级联反应后的大肠杆菌的SA产量差异极显著（$P<0.025$）。

(c) 不同连接方式的SA产量

(d) 不同连接方式的大肠杆菌生长曲线

图4　多酶级联策略对SA产量和大肠杆菌生长曲线的影响

Fig. 4　Impact of a multi-enzyme cascade strategy on SA production and *Escherichia coli* growth curves

TRAP1和TRAP3的蛋白质相对分子质量为32 600，研究团队采用了工程支架蛋白质（TRAP）将多个酶组织成空间底座的多酶复合物，见图5（a）。具体做法是将肽标签（MRRVW和MEEVV）分别集成到*entC*和*pchB*基因上[27]，见图5（b）。TRAP1、TRAP3通过静电相互作用选择性地隔离反应中间体（如辅因子），从而增加其局部浓度，提升催化效率，见图5（c）。在这些构建体中，作者在*yedS*位点整合6-His-TRAP1-3，将K（EK）3中EK3刚性肽接头替换为肽标签，组合成（*entC*+MEEVV，*pchB*+MRRVW）、（*entC*+MRRVW，*pchB*+MEEVV）。蛋白质的理论相对分子质量为88 700，见图5（d），重组菌株W3110K-5的SA产量为1 488.60 mg/L，比W3110K-4增加了12%，见图5（e）。在这些构建体中，（*entC*+MRRVW，*pchB*+MEEVV）组合表现出最佳性能，携带（*entC*+MRRVW，*pchB*+MEEVV）的大肠杆菌W3110K-5在24 h前的

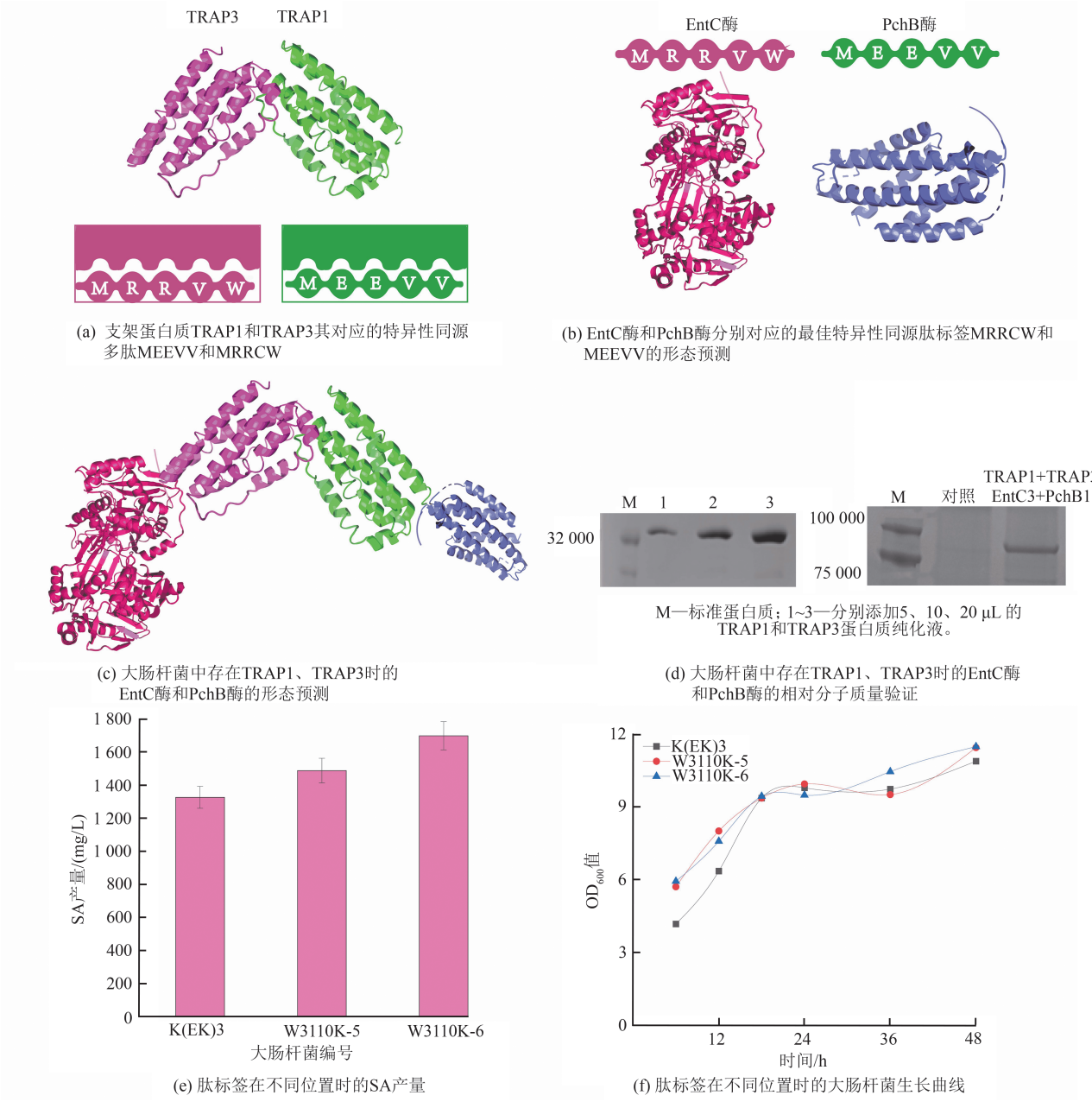


图5　TRAP1和TRAP3作为支架蛋白质时的SA产量和菌株生长发育情况

Fig. 5　SA yields and strain growth with TRAP1 and TRAP3 as protein scaffolds

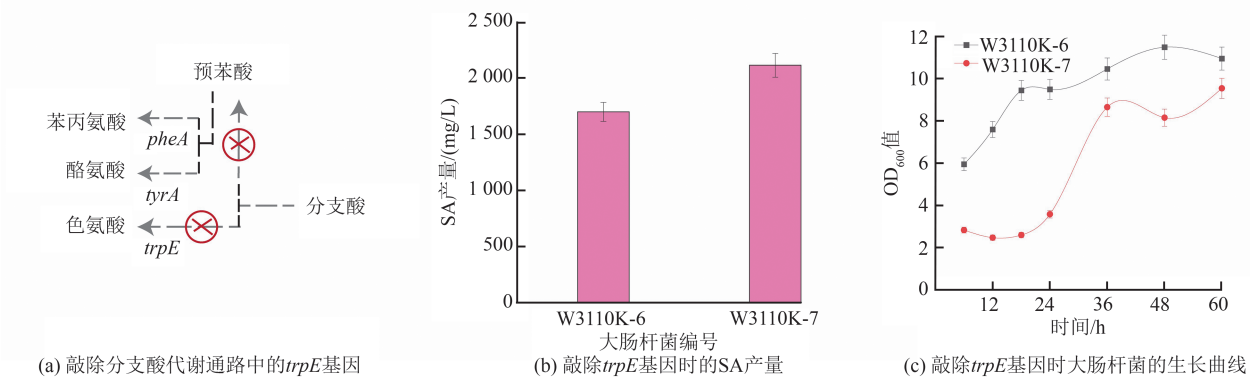
OD_{600}值高于大肠杆菌 W3110K-4，即 K（EK）3，见图 5（f）。这一结果表明，肽标签通过优化酶的空间布局，促进了底物的转移和催化效率的提升。

晶体结构分析表明，无论是使用 EK3 刚性肽接头还是通过 TRAP1、TRAP3 将 EntC 酶与 PchB 酶的活性位点拉近，酶的催化位点都呈现出更紧密的空间排布。这种设计显著提高了酶活性，有助于提高整体催化效率。

此外，通过结合 AlphaFold3 的高级算法与蛋白质折叠模拟，优化了多酶系统的结构。为了确保肽标签的引入不会破坏酶的功能，并保持其稳定性，使用 AlphaFold3 的发散模型和交叉蒸馏模型，将肽标签 MRRVW 引入到 EntC 酶的 C 端，而肽标签 MEEVV 则被引入到 PchB 酶的 C 端残基附近的 3 个位置，特别是在 41（F）、51（K）和 94（W）[28-29]。在这些构建体中，MEEVV 的引入对 SA 产量产生了显著影响，特别是在 41（F）和 51（K）位点。同期发酵试验发现，含有该肽标签菌株的 SA 产量较低，且波动较大。在显色反应中，在 41（F）和 51（K）位点发酵液显色试验与同期药瓶发酵也存在差异。相比之下，表现最优的突变体 $pchB^{94}$ 的 SA 产量达到了 1 698.80 mg/L，较 W3110K-5 提高了约 15%。表明肽标签能有效地将 EntC 酶和 PchB 酶的活性位点定位紧密，促进了底物的转移并提高了催化效率。此外，肽标签的引入可能导致了酶表面某些区域的构象变化，使得底物更容易被引导到催化位点，从而提高了催化反应的速率。通过这些结构优化，酶的稳定性和酶活性得到了平衡，确保其在多酶级联反应中的高效催化作用。

2.4.2 前体可用性对 SA 产量的影响

作者在培养基中加入不同浓度的莽草酸进行摇瓶发酵，结果表明，随着莽草酸浓度的增加，SA 产量也在增长，说明前体的可用性确实影响了 SA 产量。在此基础上，对 *trpE* 基因进行敲除以优化碳流[13,30-31]，但会导致细菌生长速率减缓。将 W3110K-7 菌株在加入色氨酸的 M9A 培养基中进行培养，其 SA 产量最高可达 2 100.00 mg/L，比初始菌株的 SA 产量（834.82 mg/L）提高了 151%，且相比其他菌株有所提高，见图 6。这些结果表明，在特定条件下，莽草酸的碳流能够完全转向 SA 生产，进一步提高 SA 产量。这些结果表明 TRAP1、TRAP3 在提高生物催化效率方面的潜力，为 SA 等芳香族化合物的工业生产提供了理论依据。



(a) 敲除分支酸代谢通路中的*trpE*基因　(b) 敲除*trpE*基因时的SA产量　(c) 敲除*trpE*基因时大肠杆菌的生长曲线

图 6　敲除分支酸代谢通路中 *trpE* 基因的大肠杆菌的 SA 产量和生长发育情况

Fig. 6　SA yield and strain growth with knockout of *trpE* gene for tryptophan in chorismic acid metabolic pathway

3　结论

作者通过代谢工程与多酶级联策略，显著提升了大肠杆菌生物合成 SA 的产量。结果表明，通过联合 GEMS1515 基因组规模代谢模型的预测与基因敲除策略，成功克服了 PEP 途径的瓶颈，促使碳流向 SA 生物合成途径的供应。具体而言，*fbaA* 和 *dcuA* 基因的联合敲除使得大肠杆菌 W3110K-3 的 SA 产量达到了 1 143.56 mg/L，相较于初始菌株 W3110K-2 提高了约 40%。此外，基于多酶融合和 TRAP1、TRAP3 蛋白质的优化策略，大肠杆菌

W3110K-7的SA产量达到2 100.00 mg/L，较其他研究中的SA产量（1 500.00 mg/L）提升了40%。与其他关于SA生物合成途径的研究相比，作者提出了新的代谢优化策略，特别是在PEP途径的瓶颈分析与优化方面，填补了相关研究的空白。研究表明，通过调整关键基因的表达以及优化代谢流，可有效提升复杂生物合成途径的产量，验证了代谢工程和酶共定位策略在提升芳香族化合物生产中的应用潜力。

尽管本研究取得了显著的成果，但仍存在一些局限。首先，SA产量尚未达到工业化生产的要求，尤其是在培养基成分和反应条件优化方面仍有待进一步提升。其次，尽管通过多酶级联策略提高了催化效率，但酶的稳定性以及酶与底物之间的相互作用仍需进一步优化。因此，未来的研究可以聚焦于提升酶的稳定性、优化反应条件以及开发新的代谢工程策略以提高生产效率。这些研究为SA及其他高价值化合物的工业化生产提供了新的思路，尤其是在代谢工程与酶共定位的结合方面具有应用潜力。

参考文献

[1] CALVEY C H，SÀNCHEZ I NOGUÉ V，WHITE A M，et al. Improving growth of *Cupriavidus necator* H16 on formate using adaptive laboratory evolution-informed engineering[J]. Metabolic Engineering，2023，75：78-90.

[2] HOMMA K，FUKUCHI S，KAWABATA T，et al. A systematic investigation identifies a significant number of probable *Pseudogenes* in the *Escherichia coli* genome[J]. Gene，2002，294（1/2）：25-33.

[3] MISHRA A K，BAEK K H. Salicylic acid biosynthesis and metabolism：a divergent pathway for plants and bacteria[J]. Biomolecules，2021，11（5）：705.

[4] LIN Y H，SUN X X，YUAN Q P，et al. Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli*［J］. Metabolic Engineering，2014，23：62-69.

[5] JANDA T，SZALAI G，PÁL M. Salicylic acid signalling in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences，2020，21（7）：2655.

[6] ZHONG Q L，HU H L，FAN B F，et al. Biosynthesis and roles of salicylic acid in balancing stress response and growth in plants［J］. International Journal of Molecular Sciences，2021，22（21）：11672.

[7] WU J，ZHU W T，ZHAO Q. Salicylic acid biosynthesis is not from phenylalanine in *Arabidopsis*［J］. Journal of Integrative Plant Biology，2023，65（4）：881-887.

[8] REKHTER D，LÜDKE D，DING Y L，et al. Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid［J］. Science，2019，365（6452）：498-502.

[9] TORRENS-SPENCE M P，BOBOKALONOVA A，CARBALLO V，et al. PBS3 and EPS1 complete salicylic acid biosynthesis from isochorismate in *Arabidopsis*［J］. Molecular Plant，2019，12（12）：1577-1586.

[10] VARTAK R，DEORE B，SANHUEZA C A，et al. Cetuximab-based PROteolysis targeting *Chimera* for effectual downregulation of NSCLC with varied EGFR mutations［J］. International Journal of Biological Macromolecules，2023，252：126413.

[11] XIONG Y，ZHONG Y，YIM H，et al. Bridged proteolysis targeting chimera（PROTAC）enables degradation of undruggable targets［J］. Journal of the American Chemical Society，2022，144（49）：22622-22632.

[12] ZHOU J M，TRIFA Y，SILVA H，et al. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions，2000，13（2）：191-202.

[13] NODA S，SHIRAI T，OYAMA S，et al. Metabolic design of a platform *Escherichia coli* strain producing various chorismate derivatives[J]. Metabolic Engineering，2016，33：119-129.

[14] LIN Y H，SHEN X L，YUAN Q P，et al. Microbial biosynthesis of the anticoagulant precursor 4-hydroxycoumarin［J］. Nature Communications，2013，4：2603.

[15] LI Z D，GAO C，YE C，et al. Systems engineering of *Escherichia coli* for high-level shikimate production[J]. Metabolic Engineering，2023，75：1-11.

[16] NOOR E，FLAMHOLZ A，BAR-EVEN A，et al. The protein cost of metabolic fluxes：prediction from enzymatic rate laws and cost minimization［J］. PLoS Computational Biology，2016，12（11）：e1005167.

[17] DEUTSCHER J，AKÉ F M D，DERKAOUI M，et al. The bacterial phosphoenolpyruvate：carbohydrate phosphotransferase system：regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions［J］. Microbiology and Molecular Biology Reviews，2014，78（2）：231-256.

[18] GERSHANOVICH V N. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system and its role in physiology of gram-negative bacteria[J]. Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiia and Virusologiia, 1998(3): 8-15.

[19] SIEBOLD C, FLÜKIGER K, BEUTLER R, et al. Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS)[J]. FEBS Letters, 2001, 504(3): 104-111.

[20] BERENJIAN A, MAHANAMA R, TALBOT A, et al. Efficient media for high menaquinone-7 production: response surface methodology approach [J]. New Biotechnology, 2011, 28(6): 665-672.

[21] ANDERSON K A, MADSEN A S, OLSEN C A, et al. Metabolic control by sirtuins and other enzymes that sense NAD^+, NADH, or their ratio[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2017, 1858(12): 991-998.

[22] SHIMIZU M. NAD^+/NADH homeostasis affects metabolic adaptation to hypoxia and secondary metabolite production in filamentous fungi [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2018, 82(2): 216-224.

[23] GAO Y, BANG I, SEIF Y, et al. The *Escherichia coli* Fur pan-regulon has few conserved but many unique regulatory targets[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(8): 3618-3630.

[24] HE Z, TONEY M D. Direct detection and kinetic analysis of covalent intermediate formation in the 4-amino-4-deoxychorismate synthase catalyzed reaction [J]. Biochemistry, 2006, 45(15): 5019-5028.

[25] BABA T, ARA T, HASEGAWA M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection [J]. Molecular Systems Biology, 2006, 2: 2006.0008.

[26] CHEN X Y, ZARO J L, SHEN W C. Fusion protein linkers: property, design and functionality[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013, 65(10): 1357-1369.

[27] LEDESMA-FERNANDEZ A, VELASCO-LOZANO S, SANTIAGO-ARCOS J, et al. Engineered repeat proteins as scaffolds to assemble multi-enzyme systems for efficient cell-free biosynthesis[J]. Nature Communications, 2023, 14: 2587.

[28] SPELTZ E B, NATHAN A, REGAN L. Design of protein-peptide interaction modules for assembling supramolecular structures *in vivo* and *in vitro*[J]. ACS Chemical Biology, 2015, 10(9): 2108-2115.

[29] ZHANG G Q, JOHNSTON T, QUIN M B, et al. Developing a protein scaffolding system for rapid enzyme immobilization and optimization of enzyme functions for biocatalysis[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(8): 1867-1876.

[30] SUN L, ZHANG Q W, KONG X, et al. Highly efficient neutralizer-free *L*-malic acid production using engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technology, 2023, 370: 128580.

[31] ZENG J, HONG Y Z, ZHAO N Q, et al. A broadly applicable, stress-mediated bacterial death pathway regulated by the phosphotransferase system (PTS) and the cAMP-Crp cascade [J]. PNAS, 2022, 119(23): e2118566119.

（责任编辑：张馨文）