



DOI:10.14188/j.ajsh.20260010

食品级底盘细胞的特性、改造策略与生物制造应用进展

李玉珍¹, 肖怀秋^{2*}, 王斌³, 何彬²

- (1. 湖南化工职业技术学院 化学工程学院, 湖南 株洲 412000;
2. 湖南化工职业技术学院 食品与烹饪技术学院, 湖南 株洲 412000;
3. 湖南化工职业技术学院 制药与生物工程学院, 湖南 株洲 412000)

摘要: 面对人口激增、环境资源约束及营养健康和安全需求等多重挑战, 食品工业亟待从传统生产向系统化、可持续的生物制造转型。食品合成生物学通过设计构建高效底盘细胞工厂, 实现目标产物的精准合成, 为未来食品开发提供新的路径。系统综述了食品合成生物学中常用底盘细胞的特性与改造策略, 包括原核底盘细胞和真核底盘细胞, 并重点阐述其在替代蛋白、功能性食品添加剂、营养强化剂及风味物质等领域的合成应用新进展。同时, 还系统探讨了合成生物学在食品副产物高值转化、快速检测与溯源中的新兴应用。最后, 针对当前食品级底盘细胞存在的代谢通路不清、底盘细胞性能不足等技术瓶颈, 提出包括底盘细胞的理性设计、动态代谢调控、适应性进化、辅因子工程、蛋白质骨架技术、高通量筛选及人工多菌体系构建等系统策略, 以期为食品合成生物学应用创新与产业化发展提供理论与实践参考。

关键词: 食品合成生物学; 底盘细胞; 细胞工厂; 生物制造; 功能性食品; 代谢工程

中图分类号: Q503

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2026)03-0246-15

Characteristics, engineering strategies, and biomanufacturing advances of food-grade chassis cells

LI Yuzhen¹, XIAO Huaqiu^{2*}, WANG Bin³, HE Bing²

- (1. School of Chemical Engineering, Hunan Chemical Vocational University, Zhuzhou 412000, Hunan, China;
2. School of Food and Culinary Technology Hunan Chemical Vocational University, Zhuzhou 412000, Hunan, China;
3. School of Pharmaceutical and Bioengineering, Hunan Chemical Vocational University, Zhuzhou 412000, Hunan, China)

Abstract: Facing multiple challenges such as population surges, environmental resource constraints, and demands for nutrition, health, and safety, food industry urgently needs to transition from traditional production to systematic and sustainable biomanufacturing. Food synthetic biology provides a innovative pathway for future food production by designing and constructing efficient chassis cell factories to achieve precise synthesis of target products. This article systematically reviews the characteristics and engineering strategies of commonly used chassis cells in food synthetic biology, including prokaryotic chassis cells and eukaryotic chassis cells, and highlights recent advances in the synthesis of alternative proteins, functional food additives, nutritional fortifiers, and flavor compounds. Furthermore, the emerging applications of synthetic biology in the high-value conversion of food by-products, rapid detection, and traceability are discussed. Finally, in response to current technical bottlenecks such as unclear metabolic networks and insufficient chassis cell performance, this article proposes systematic strategies including rational design of chassis cells, dynamic metabolic regulation,

收稿日期: 2026-04-09 修回日期: 2026-05-14 接受日期: 2026-06-15

作者简介: 李玉珍(1981-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为食源性致病微生物生物控制, E-mail: yuzhenli@163.com

* 通信作者: 肖怀秋(1981-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为食品抗菌与保鲜, E-mail: xiaohuaiqiu@163.com

基金项目: 湖南省自然科学基金区域联合基金(2026JJ80062)

引用格式: 李玉珍, 肖怀秋, 王斌, 等. 食品级底盘细胞的特性、改造策略与生物制造应用进展[J]. 生物资源, 2026, 48(3): 246-260.

Li Y Z, Xiao H Q, Wang B, et al. Characteristics, engineering strategies, and biomanufacturing advances of food-grade chassis cells [J]. Biotic Resources, 2026, 48(3): 246-260.

adaptive evolution, cofactor engineering, protein scaffolding, high-throughput screening, and artificial multi-strain systems. This review aims to provide theoretical and practical references for innovative development and industrial translation of food synthetic biology.

Key words: food synthetic biology; chassis cells; cell factories; biomanufacturing; functional foods; metabolic engineering

0 引言

食品工业是国民经济的支柱产业,2025年,中国食品工业总产值达约18.1万亿元,占GDP的12.9%。FAO预测,2050年全球人口将激增至97亿,食品总需求预计增长50%以上。面对人口激增、资源枯竭、环境承压以及健康营养需求等多重挑战,传统食品制造急需由“单一生产”向“系统构建”跨越。打造生物制造新增长引擎,培育生物制造产业是未来食品工业重要发展方向。食品合成生物学是在传统食品制造技术基础上,采用合成生物学技术,特别是食品微生物基因组设计与组装、食品组分合成途径设计与构建等,构建具有特定合成能力的新菌种,生产人类所需未来食品,核心是构建能高效合成目标产物的细胞工厂,关键技术包括高性能底盘细胞构建、食品配料或组分合成途径挖掘与设计、途径酶高效组装、代谢调控网络重构与优化、高产菌株高通量筛选等^[1]。目前,合成生物学食品级底盘细胞主要有原核底盘细胞与真核底盘细胞两类。原核底盘细胞主要包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)等,酵母底盘细胞分为常规酵母,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等和非常规酵母,如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)等两类。此外,还包括莱茵衣藻等真核微藻。食品级底盘细胞是安全高效和可持续食品制造的关键核心平台,在替代蛋白、功能性食品添加剂、食用色素、氨基酸、维生素、食品快检以及食品溯源等领域应用广泛^[1]。本文从食品合成生物学常见底盘细胞及其在替代蛋白质、功能性食品添加剂、食品营养强化剂、食品风味物质等合成领域新应用进行系统综述,以期食品合成生物学高质量发展提供理论参考。

1 食品合成生物学常见底盘细胞

1.1 常见原核底盘细胞

大肠杆菌是第一个用于外源蛋白表达的原核底盘细胞,遗传背景清晰,易操作,成本低及抗污染能力强等优点,但缺失转录后加工、翻译后修饰等功能,存在易形成包涵体和产生内毒素等不足^[2]。基因组精简可提升产物合成稳定性,如用转座子介

导的随机缺失对大肠杆菌MG1655进行基因组精简能显著增强耐受性^[3]。利用动态调控微调基因可实现细胞生长和产物合成精微平衡,改变密码子偏好性和适应性策略能显著增强菌株稳定性和产物合成稳健性。枯草芽胞杆菌具有强大的蛋白表达系统,动态代谢调控、酶组装、基因精确编辑可提升其代谢水平,在枯草芽胞杆菌中创建自主双调节系统可显著提升N-乙酰氨基葡萄糖生产效率,通过多靶点动态控制实现合成途径间代谢平衡^[4]。谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)无毒且遗传背景清晰,遗传元件(如启动子)挖掘、基于同源重组的单/双交换、位点特异性重组是其重要改造策略,利用同源重组技术删除基因组3个噬菌体片段获得精简菌株MB001,其转化效率和质粒拷贝数、生长情况和环境适应性均有显著改善^[5]。动态调控策略能平衡细胞代谢流并有利于产物合成,如通过耦合生长依赖型启动子及蛋白降解标签设计双功能遗传开关,实现细胞生长与 γ -GABA代谢通量动态平衡^[6]。乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)遗传背景清晰、代谢途径简洁且符合GRAS标准。精简基因能提升代谢产物量,通过缺失原噬菌体和基因组岛使乳酸乳球菌N8基因组减少6.9%,Nisin产量和转化效率显著提升^[7]。通过基因组规模代谢网络模型构建可精准预测代谢通量分布、优化代谢途径并进行代谢工程改造,通过CRISPR-Cas系统可多位点基因编辑,结合温度敏感质粒可快速筛选无外源DNA残留工程菌株或构建生物传感器检测产物合成。

1.2 常见真核底盘细胞

1.2.1 常规酵母底盘细胞

常规酵母是生理和遗传特性清楚且应用较早的酵母,如酿酒酵母和粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。酿酒酵母表达系统是最重要的外源蛋白表达系统,对启动子、终止子等基因表达元件改造能增强细胞的遗传稳定性,增加基因拷贝数、优化密码子和动态调节代谢途径能显著增加目标产物产量。如通过基因敲除和融合不同短肽标签等消除限速步骤能使甜茶苷和莱鲍迪苷滴度分别达到1368.6 mg/L和132.7 mg/L,为高糖饮食引发的健

康问题提供糖替代品^[8]。辅因子改造能显著提升产量,对酿酒酵母系统设计3种辅助因子(FADH₂、S-adenosyl-L-methion和NADPH)的生物合成、区域化和循环,实现咖啡酸和阿魏酸高水平合成^[9]。粟酒裂殖酵母对维生素需求高,对氮源不敏感,对低水分活度(low water activity, Aw)、低pH、高温及SO₂具有较好耐受性,生长速率慢,但却是高发酵活力酵母。研究发现,粟酒裂殖酵母JM2-5不添加乙醇,30℃厌氧发酵9d能合成乙酸乙酯(631.0 mg/L)、乳酸乙酯(86.0 mg/L)、己酸乙酯(25.0 mg/L)等风味物质,其胞内酯酶可通过酯化反应产生风味物质^[10]。

1.2.2 非常规酵母底盘细胞

非常规酵母是生理和遗传性还未完全清楚或认识较晚的酵母,能利用更丰富碳源、代谢产物多样化,不受克雷布特效应影响,目前仅少数基因改造非常规酵母成功用于食品生物合成。毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)具有生长速度快、营养要求低、pH适应范围广、高密度发酵、异源蛋白表达高、胞外分泌能力强、可翻译后修饰和利用甲醇严格控制表达等优点,应用最广泛。通过人工改造获得序列更短、性能更强的启动子能实现其复杂代谢通路精准调控,目前有超过100种天然启动子和人工合成启动子,部分启动子(如 P_{ADH3} 、 P_{GI})表现出较高启动子活性。终止子研究起步晚且进展较少,常用终止子是内源 $AOX1$,基因终止子 $AOX1tt$ 、酿酒酵母终止子 $ScCYC1tt$ 被证明可应用于毕赤酵母表达系统, T_{DH3tt} 、 $RPS2tt$ 、 $RPP1Btt$ 、 $RPS17Btt$ 、 $IDP1tt$ 、 $RPS25Att$ 、 $RPS3tt$ 、 $RPL2Att$ 等新型终止子被证明效果较好^[11]。

解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是GRAS级底盘细胞,有高效乙酰CoA代谢通路和TCA循环大通量。当前针对该底盘细胞的代谢工程改造遗传手段有限,编辑效率低、操作烦琐,缺乏高效整合位点、稳定高拷贝表达载体及可用启动子,但通过菌株筛选、代谢路径优化、产物抑制及发酵条件优化等可增强异源蛋白表达。对组成型强启动子UAS序列、核心启动子序列等元件进行优化组合可获得高活性启动子^[12],诱导型启动子优选是重要策略,如 P_{POX2} 、 P_{POT1} 、 P_{LIP2} 、 P_{ALK1} 、 P_{EYK1} 等^[11]。应用较多的碱性胞外蛋白酶基因启动子 P_{XPR2} 属蛋白脲诱导型强启动子,另一个常用启动子是翻译延伸因子1- α 基因启动子 P_{TEF} ,属组成型强启动子。此外还有系列内源性启动子,如 P_{TDH1} 、 P_{GPM1} 、 P_{FBAIN} 、 P_{POX2} 、 P_{POT1} 、 P_{LIP2} 、 P_{ICL1} 、 P_{YAT} 、 P_{GAP} 、 P_{ICL} 和 P_{ACL2} 等。人工杂合启动子如

P_{hp4d} 是最常见组成型启动子,活性与 P_{XPR2} 相近,组成型强杂合启动子 $P_{UAS4B-TEF}$ 也有应用。终止子常使用酿酒酵母终止子 $ScCYC1tt$,其他内源终止子如 $XPRtt$ 、 $Lip2tt$ 应用也较为普遍^[11]。

乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)具有高密度发酵、生长快、异源蛋白分泌表达好、适度糖基化和杂蛋白少等优点,最常用的启动子是酿酒酵母组成型强启动子——磷酸甘油酸激酶基因启动子 P_{ScPGK} 和诱导型强启动子——半乳糖透性酶基因启动子 P_{ScGAL1} 。 P_{KIPHO5} 、 $P_{KLIADH3}$ 、 $P_{KLIADH4}$ 、 P_{KILAC4} 及 P_{KILAC4} 突变体 $P_{KILAC4-PBI}$ 等内源启动子也有应用^[11]。常用终止子是内源 $LAC4tt$ 和酿酒酵母终止子如 $GPD1tt$ 、 $ADH1tt$ 和 $ADH2tt$ 等^[11]。

多形汉逊酵母(*Ogataea polymorpha*)可高度发酵、异源蛋白分泌表达效率高、杂蛋白少和适度糖基化,但作为底盘细胞表达异源蛋白相对较少^[13]。最常见诱导型启动子是 P_{HpMOX} 、 P_{HpGAP} 和 P_{HpPMA1} 等组成型强启动子也有相应报道,毕赤酵母源 P_{PpAOX1} 启动子也可用于其异源蛋白表达^[11]。终止子主要有内源 $MOXtt$ 、 $AMOt$ 及酿酒酵母源 $ADH1tt$ ^[11]。酿酒酵母终止子可在毕赤酵母、解脂耶氏酵母、乳酸克鲁维酵母和多形汉逊酵母等非常规酵母系统应用,说明具有高度可转移性。

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)具有较强的工业鲁棒性,可高密度培养,底物利用范围广,其部分内源性启动子被表征,特别是组成型强启动子 P_{GAP1} 常被用于介导基因过表达,是最重要的木糖醇生产菌株。利用 P_{GAP1} 介导磷酸戊糖途径相关基因ZWF和GND过表达来增强菌株NADPH供应,木糖醇产量提升20%以上^[14]。内源诱导型启动子(如 P_{GAL1})可调控基因转录与表达,以 P_{GAL1} 介导的外源蛋白OsBG1表达时,半乳糖诱导后12h和24h后基因表达量分别提升7.9和1.5倍^[15]。季也蒙迈耶氏酵母的 $MgTEF1$ 和棉假囊酵母菌的 $AgTEF1$ 等外源启动子也能发挥作用。终止子主要有 $CYC1tt$ 、 $ENO1tt$ 、 $PGK1tt$ 、 $TEF1tt$ 和 $SYN7tt$ 等^[16],合成终止子较天然终止子序列更短、效果更好,还可降低天然终止子重复使用导致的同源重组几率。

1.2.3 藻类

蓝藻和真核微藻是潜在食品合成生物学底盘细胞。蓝藻可用于乙醇、丁醇、脂肪酸等合成,真核微藻更适合细胞储存特性重要产物(如蛋白质、脂质、淀粉)合成,真核藻类应用更多,如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)和微拟球藻(*Nannochloropsis*)。

莱茵衣藻遗传背景清晰且基因编辑工具成熟,被誉为“光合酵母”,是理想底盘细胞^[17]。雨生红球藻是目前已知最强天然强抗氧化剂虾青素的高产藻株,含量可达细胞干重5%,通过优化光照、培养条件及

提取工艺,可实现虾青素工业化生产^[18]。微拟球藻是工业产油微藻代表,可用于功能性油脂(如EPA)等生物合成^[19]。常见底盘细胞的优缺点如表1所示。

表1 常见底盘细胞的优缺点比较

Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of common chassis cells

细胞类别	底盘细胞	优点	缺点
原核底盘细胞	大肠杆菌 (<i>E. coli</i>)	遗传背景清晰且基因编辑技术成熟,有大量标准化元件,可高密度培养,蛋白合成能力强,代谢通量高,有高效翻译系统,适合外源蛋白高水平表达。	缺乏翻译后修饰,不能正确糖基化、磷酸化和形成复杂二硫键,易形成包涵体,表达蛋白活性恢复复杂,有内毒素,代谢副产物反馈,生产复杂天然产物受限。
	枯草芽胞杆菌 (<i>B. subtilis</i>)	有高效完整胞外蛋白Sec分泌系统,无包涵体形成,GRAS认证,无内毒素,遗传背景清晰,易遗传改造,代谢网络简单,能形成芽孢,便于开发生物传感器。	基因编辑技术不及大肠杆菌,表达产物有胞外降解风险,生长相对较慢,代谢调控复杂,质粒不稳定性,菌体中心代谢通量和前体供应不及大肠杆菌。
	谷氨酸棒杆菌 (<i>C. glutamicum</i>)	有高效氨基酸分泌能力,中心代谢通量大且可塑,工艺成熟,底物利用广,生产成本低,GRAS认证,无内毒素,基因组精简,代谢网络清晰,便于代谢改造。	生长慢,转化和同源重组效率低,编辑工具相对少,代谢流重编程难且触发全局扰动,存在限制性修饰,外源基因克隆难,不适合重组蛋白生产。
	乳酸乳球菌 (<i>L. lactis</i>)	GRAS认证,无内毒素,能高效分泌蛋白,能全细胞催化。遗传背景清晰,有多种可调控启动子、表达质粒和筛选标记,生长速度快,适合低成本规模化生产。	代谢能力简单,产物谱狭窄,代谢工程改造难。基因编辑效率低,同源重组效率低,细胞壁易裂解,稳定性不足,大规模工业化生产经验较少。
真核底盘细胞 (常规酵母)	酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i>)	有糖基化等翻译后修饰功能,遗传背景清晰,基因编辑技术成熟,基因编辑与回路构建容易,GRAS认证,无内毒素,耐受性好,有细胞区室,可合成复杂产物。	生长与发酵速度慢,有Crabtree效应,基因组庞大,存在大量非编码DNA和重复序列,代谢调控难,蛋白分泌效率较低,系统性改造与基因组精简难。
	粟酒裂殖酵母 (<i>S. pombe</i>)	能高效分泌外源蛋白,糖基化修饰简单且不过度,产物均一性优于酿酒酵母。背景清晰,产物谱独特,稳定性高,适合需高度一致的产物发酵。	遗传工具生态系统薄弱,生长缓慢,培养要求高,基因组注释与代谢模型不完善,理性设计难,工业应用历史与认知度低,鲁棒性和工艺放大经验严重不足。
真核底盘细胞 (非常规酵母)	毕赤酵母 (<i>K. phaffii</i>)	外源蛋白分泌能力强,可用甲醇作碳源和强效诱导剂,可极高密度培养,利用强启动子可驱动外源蛋白超高表达,宿主蛋白极少,可进行糖基化修饰。	最强表达高度依赖甲醇,有安全隐患,遗传操作复杂,同源重组效率低,生长速度相对较慢,糖基化虽比酿酒酵母优,但仍需进行糖基化工程改造。
	解脂耶氏酵母 (<i>Y. lipolytica</i>)	有良好脂质代谢与积累能力,底物谱广,代谢可塑性强,有高效蛋白分泌能力,耐受性强,基因组较小且精简,生长快于其他工业酵母,有利于规模化生产。	遗传操作工具成熟度较低,遗传操作体系标准化和效率落后,存在强效基因沉默现象,表达不稳定,转化难度大,代谢通路不清晰,理性设计和改造难度大。
	乳酸克鲁维酵母 (<i>K. lactis</i>)	能高效利用乳糖,是乳清资源转化理想底盘。有强大高效分泌途径,可高水平表达异源蛋白,背景蛋白分泌少,GRAS认定,遗传稳定性,耐胁迫性强。	遗传工具系统不成熟,基因编辑工具不足,基础研究与基因组注释薄弱,理性代谢工程改造难,生长与代谢速率慢,存在蛋白降解与修饰问题。
	多形汉逊酵母 (<i>O. polymorpha</i>)	糖基化效果好,诱导表达分泌强,耐受性好,生长速度快,可高密度培养,有成熟基因编辑工具和高效随机/位点特异性整合平台,外源基因表达稳定。	遗传操作复杂度与工具成熟度不足,系统改造困难。对甲醇有潜在依赖,有安全风险。代谢通路理解不足,理性设计受限,大规模培养经验相对欠缺。

续表			
细胞类别	底盘细胞	优点	缺点
真核底盘细胞 (微藻)	热带假丝酵母 (<i>C. tropicalis</i>)	有独特 ω -氧化途径,是长链二元酸核心宿主,有强大油脂/烷烃利用能力,底物适应性广,胁迫耐受性强,有清晰基因组与代谢基础。	基因编辑工具有限,同源重组效率低,多基因操作困难,有复杂代谢副反应与降解途径,缺乏成熟蛋白表达与分泌系统,不适用于重组蛋白高效生产。
	莱茵衣藻 (<i>C. reinhardtii</i>)	是光合生物研究模式生物,遗传背景清晰,编辑工具成熟,蛋白含量高且富含多种氨基酸,是优质未来食品蛋白源,异养发酵技术成熟,可实现规模化生产	规模化培养细胞密度受限光穿透深度,遗传转化效率相对较低,基因操作周期较长。部分高值产物合成通路尚未完全解析,代谢调控路径仍需进一步优化。
	雨生红球藻 (<i>H. pluvialis</i>)	是天然虾青素超级合成器,含量可达细胞干重3%~5%,是工业首选底盘细胞,它具备成熟两步法工艺,先快速增殖,再通过胁迫诱导大量积累,调控路径清晰。	生长速度极慢,成本高。遗传操作效率低且难,基因编辑较难,诱导虾青素积累胁迫条件与生物质增长相矛盾,难以实现“高产率”与“高含量”同步优化。
	微拟球藻 (<i>Nannochloropsis</i> spp.)	基因组小且为单倍体,遗传操作灵活,基因编辑效率高,油脂含量可超干重30%,生长速度快、CO ₂ 耐受能力强,可利用海水或淡水室外大规模培养。	低光条件生长好,高光强度会限制生长,细胞微小,规模化采收较难。作为底盘细胞的遗传资源库和工程藻株积累尚不够丰富,仍需进一步开发。

2 食品合成生物学应用研究新进展

2.1 替代蛋白质的生物合成

替代蛋白质指非传统动植物来源的蛋白质,如酵母蛋白、植物蛋白肉及细胞培养肉等。

2.1.1 酵母蛋白的生物合成

酵母蛋白氨基酸均衡,是理想的单细胞蛋白。对酵母蛋白理性设计或借助适应性实验室进化结合关键代谢通路改造可获得高产菌株,通过基因编辑、模块化基因元件组装和启动子优选等还可实现蛋白精准调控与代谢通路重构,优化代谢流和能量分配,实现代谢通路全局优化。还可基因改造蛋白质合成后修饰系统,或与功能多肽融合表达赋予酵母蛋白新功能,如在强化食品及特医食品中应用^[20]。

2.1.2 人造肉的生物合成

人造肉分为植物蛋白肉和细胞培养肉两类,前者已成功开发并商业化生产,后者还处于实验室阶段。人造肉需进行风味调和质构模拟才能获得“仿真”度高的肉制品。研究发现,通过增加拷贝数、改造合成分解途径和增强蛋白分泌,大豆血红蛋白在毕赤酵母中表达量可达3.5 g/L^[21]。采用优化蛋白表达方式、增加5-氨基乙酰丙酸合成和解除合成限速步骤等首次实现牛和猪血红蛋白在酿酒酵母中高效表达,表达量分别达到68.9 mg/L和85.9 mg/L^[22]。

2.2 功能性食品添加剂的生物合成

2.2.1 母乳寡糖的生物合成

母乳寡糖(human milk oligosaccharides,

HMOs)是一类以乳糖为核心,经岩藻糖等多种单糖修饰形成的寡糖,母乳含量最高、研究最广的HMOs是2'-FL,大肠杆菌是其生物合成的首选宿主。在大肠杆菌MG1655菌株基因组中整合幽门螺杆菌NCTC 11639的 α 1,2-岩藻糖基转移酶实现以甘油为碳源从头合成2'-FL^[23];通过多策略构建以葡萄糖为唯一碳源合成2'-FL的工程菌株,2'-FL合成量达(2.53±0.07)g/L,引入外源非磷酸化转运系统提升胞内非磷酸化葡萄糖供给量,产量提升至(4.94±0.35)g/L^[24]。团队还设计转录因子筛选平台并将转录因子*LacI*诱导物由IPTG替换为乳糖,构建乳糖响应型基因回路实现合成模块间代谢流动态调控,摇瓶发酵产量达到(9.67±0.65)g/L。在底盘细胞,整合从头合成或回补合成途径可实现2'-FL生物合成,利用模块化工程组合异源合成途径搭建出从头合成途径,实现以廉价蔗糖和乳糖为底物合成2'-FL^[25]。

2.2.2 乳蛋白的生物合成

乳蛋白传统提取法制备成本高、工艺难度大,微生物发酵法存在表达量不高、糖基化修饰不足等问题,合成生物学可实现乳蛋白异源高效表达。研究发现,基于T₇表达系统在枯草芽胞杆菌中可实现 α S1酪蛋白和乳铁蛋白异源高效表达^[26]。通过优化启动子、构建分泌信号肽和共表达二硫键异构酶A3使 α -乳白蛋白在毕赤酵母中异源高效表达,产量可达6 mg/L,发酵条件优化后表达量达56.3 mg/L^[27]。以甲醇为诱导剂,通过优选毕赤酵母分子伴侣、构建促溶标签及杂合信号肽,乳蛋白异

源表达量达 5.38 g/L^[28]。

2.2.3 麦角硫因的生物合成

氧化剂是指能氧化其他物质而自身被还原的物质,麦角硫因(ergothioneine, EGT)是由真菌和部分细菌合成的稀有含硫氨基酸衍生物的水溶性抗氧化剂,人体仅能通过肉碱/有机阳离子转运蛋白摄取并转运,并发挥抗氧化活性,EGT 可促进 Nrf2 与 Keap1 解离并激活下游抗氧化基因表达并调节 NAD⁺水平增强抗氧化活性^[29]。采用构建融合表达标签并截短结构域系统改造 *L*-Lys、*L*-Met 和 *L*-His 3 个前体供应网络,解除反馈抑制和增强合成通量,大肠杆菌优化发酵条件后 EGT 产量达 10 g/L^[30]。通过鉴定米曲霉内源 EGT 合成基因 *AoEgt1* 和 *AoEgt2*,过表达内源和粗糙脉孢菌等异源 EGT 基因,以葡萄糖为碳源和补充 Met 前体,共表达结合 0.4% Met 补充产量达 20.03 mg/g 干细胞,较野生型提升 8 倍^[31]。

2.2.4 低热量新型甜味剂的生物合成

低热量新型甜味剂是指利用先进生物技术或化学合成等方法开发的,能提供甜味但几乎不产生热量的糖替代品,如 *D*-阿洛酮糖热量仅为蔗糖 1/10,按来源属性可分为天然甜味剂和人工合成甜味剂,按结构分类可分为单糖、低聚糖、多元糖醇等。*D*-塔格糖是一种功能性稀有糖,热量低、具有降血糖、抗龋齿和改善肠道菌群功能的功效。以 pET28a 为载体,优化启动子并将最优突变体基因(*Lfara-A*^{D390V/V468L})和大肠杆菌源 β -半乳糖苷酶基因(*EclacZ*)在大肠杆菌 BL21(DE3)串联表达,建立双酶偶联全细胞体系,500 g/L 乳糖转化获得 115.21 g/L *D*-塔格糖,转化率为 23.09%^[32]。构建一株共表达 5 种嗜热酶的大肠杆菌工程菌株,以麦芽糊精为原料全细胞催化合成塔格糖(3.38 g/L),转化率达到 33.8%,产率达 1.13 g/L/h^[33]。以酿酒酵母为底盘细胞,通过敲除半乳糖激酶基因 *GAL1*,异源表达木糖还原酶和半乳糖脱氢酶,表达条件优化后塔格糖产量高达 37.69 g/L^[34]。甜味蛋白是当前食品甜味剂重要方向,如 Thaumatin 等。消除负电荷残基、突变为不带电荷氨基酸或增加正电荷残基可提升甜度和稳定性,将负电荷 Asp₂₁(D)突变为天冬酰胺(N)获得突变体 D21N,甜度提升约 1.65 倍,Thaumatin 突变体 D21N 和单链 Monellin 突变体 Y65R 是目前已知最甜的 2 种甜味蛋白^[35]。采用蛋白质语言模型设计可提升热稳定性和甜度,Amai-Proteins 公司通过 Pro-Design AI-CPD、Pro-Planet 精确发酵和 Pro-Taste 技术获得 110 °C 处理 10 min

后热稳定性极好的甜味蛋白 sweetlin。毕赤酵母有诱导型和组成型启动子库,可高密度培养,复杂甜味蛋白折叠、二硫键形成和糖基化修饰较好且融合蛋白表达量高,可在 Thaumatin、Brazzein 和 Monellin 等应用,但甲醇诱导存在潜在安全隐患。非常规酵母有潜在应用前景,研究发现,Brazzein 可作为表达蛋白并利用毕赤酵母系统进行生产,评估不同启动子和信号肽后确定最优组合,通过增加基因拷贝数并调控可溶蛋白质翻译、折叠与降解过程,产量分别提升至 113.24 mg/L 和 166.54 mg/L,补料分批发酵产量可高达 639.11 mg/L,是当前微生物生产 Brazzein 的最高水平^[36];优选启动子也能显著提升蛋白表达量,如 *P*_{AOXI} 和 *P*_{GAP} 广泛用于 Thaumatin、Brazzein 和 Monellin 高效表达。构建信号肽也可显著提升目标蛋白表达水平,如来源于红原鸡的 Lysozyme 信号肽能显著增强 Brazzein 表达水平(345 mg/L)^[37]。发酵过程精准控制及参数优化能提升表达水平,如优化培养温度和 pH 后 Thaumatin II 产量可达到 62.79 mg/L,培养基中添加维生素,产量提升至 68.60 mg/L^[38]。

2.2.5 食用天然色素的生物合成

天然色素是指从动植物、微生物及矿物等天然资源中,通过物理或化学方法提取、纯化获得的有机着色剂,根据结构不同可分为类黄酮类、类胡萝卜素类、卟啉类、酮类、醌类等。部分食用天然色素可以工程菌株为底盘细胞生物合成,如番茄红素、辣椒红、甜菜红、胭脂红酸和红曲红等。

(1) 番茄红素异源生物合成。原核底盘细胞可通过 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸途径合成番茄红素,大肠杆菌可利用 EMP 途径产生 3-磷酸-甘油醛和丙酮酸,在胞内代谢酶作用下得到 3,3-二甲基烯丙基焦磷酸,并在法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)合酶基因 *ispA* 作用下合成香叶酰二磷酸(GPP)和 FPP 作为前体,通过表达外源基因 *crtE*、*crtB* 和 *crtI* 逐级催化合成番茄红素。乳酸菌有完整内源甲羟戊酸 MVA 途径,将穿梭质粒 pNZ44 与 *crtEIB* 通过无缝克隆构建重组质粒 pGZQ01 并转化到乳酸乳球菌 NZ9000 获得重组菌株 GZQ01,敲除乳酸脱氢酶 *ldh* 基因使更多丙酮酸进入番茄红素前体乙酰 CoA 合成途径,过表达 MVA 途径基因 *mvaA* 后,产量提升 154%,发酵条件优化后产量达到 1.44 mg/L,是原始菌株的 3 倍。真核底盘细胞也用于番茄红素生物合成。以解脂耶氏酵母 PO1h 为底盘细胞,引入外源基因 *crtE*、*crtB* 和 *crtI* 和纤维素降解酶基因构建重组菌株 Y-32,以纤维素或半纤维

素为碳源,番茄红素摇瓶发酵产量为24.1 mg/L^[39];将谷氨酸棒杆菌异源基因 *crtE*、*crtB*、*crtI* 表达至毕赤酵母 G115,筛选不同物种番茄红素合成途径关键基因发现,红法夫酵母源基因(*crtE*、*crtB*、*crtI*)组合产量最佳(20.59 mg/g_{干细胞}),过表达 NADH 激酶 *pos5* 和增加 NADPH 供给产量达 33.19 mg/g_{干细胞},阻断合成 FPP 和角鲨烯旁支途径,对固醇调节元件基因 *Sre* 过表达,产量高达 43.23 mg/g,高密度发酵产量达 79.05 mg/g^[40]。

(2)辣椒红异源生物合成。辣椒红素原核异源生物合成较少。利用大肠杆菌 BL21(DE3)为底盘细胞,通过 pACCRT、pACLAC、pACHP 等载体表达 *crtE*、*crtB*、*crtI*、*crtY*、*crtZ* 基因生成玉米黄质素,表达绿藻 IPP 异构酶 *idi*、辣椒红素合酶 CCS 及玉米黄质环氧化酶 ZEP,成功合成辣椒红(0.5 mg/L),但无法规模化生产^[41]。目前,辣椒红真核异源表达未见成功报道。

(3)甜菜红异源生物合成。甜菜红生物合成关键是甜菜醛氨酸。甜菜醛氨酸经过氧化或糖基化能转化为甜菜红。以大肠杆菌 BAK10(DE3)为底盘细胞,采用 pHYN1 载体共表达 *hpaBC* 和 *MjDODA* 基因,构建工程菌 BTA6,甜菜醛氨酸产量很高,甜菜醛氨酸可与环多巴结合生成甜菜红^[42]。以酿酒酵母为底盘细胞表达酪氨酸羟化酶、L-多巴双加氧酶、葡萄糖基转移酶等酶基因,以葡萄糖为底物,甜菜红产量达(30.80±0.14) mg/L^[43]。

(4)胭脂红酸异源生物合成。原核与真核底盘细胞均可表达胭脂红酸。通过 pDS00 和 pCDF 载体表达 II 型聚酮合成酶 *OKS*、环化酶 *zhuI* 和芳香化酶 *zhuJ*、单加氧酶 *dnrF*、C-葡萄糖基转移酶 *GtCGT* 并构建大肠杆菌 BAP1 重组菌,分批补料发酵产量达(0.63±0.02) mg/L^[44]。将 *npaA* 基因整合到酿酒酵母 *ady2* 转座子位点,采用 pY26 载体表达 *OKS*、*zhuI*、*zhuJ*、*UGT2* 和 *aptC* 并将其整合到基因组多拷贝转座子位点 Ty2,过表达 *OKS*,构建基于葡萄糖底物的重组菌株,加入维生素后,胭脂红产量可达 7.6 mg/L^[45]。目前未见在酿酒酵母构建完整胭脂红酸合成途径的研究报道。

(5)红曲红异源生物合成。目前未见原核细胞合成红曲红色素的报道,真核细胞有报道,红曲霉 M9 细胞壁结构对胞外红曲色素分泌的影响,敲除了 UDP-吡喃半乳糖变位酶基因,胞内基于半乳糖呋喃的多糖含量显著降低,显著增强色素分泌量,6 种胞外红曲色素分泌量较野生菌株分别提高 1.33、1.59、0.8、2.45、2.89 和 4.03 倍^[46]。红曲色素生物

合成基因簇分析发现,*MpDLDH* 基因编码二氢硫辛酰胺脱氢酶(丙酮酸脱氢酶复合体 E3 亚基)负责乙酰 CoA 合成,过表达该基因能显著提升色素产量和乙酰 CoA 水平^[47]。

2.3 食品营养强化剂的生物合成

2.3.1 功能蛋白(活性肽)的生物合成

人源胶原蛋白等结构性蛋白、凝乳酶等功能性蛋白、抗氧化肽和抗菌肽等活性多肽是重要食品营养分子。优化由 *P_{AOXI}* 启动子驱动的转录过程并提升翻译效率,成功构建能高效表达 III 型人源胶原蛋白的毕赤酵母工程菌,5 升发酵罐产量达 10.3 g/L^[48]。通过 CRISPR-Cas9 平台靶向整合不同拷贝数的凝乳酶原表达盒构建多种生产菌株,表达盒拷贝数为 3 时酶产量最高,最优菌株 CP3i 凝乳酶摇瓶发酵产量约 1 200 SU/mL,分批式发酵酶产量约 28 000 SU/mL^[49]。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对酿酒酵母工程化改造使其细胞表面展示一种融合酸性和碱性植酸酶的融合植酸酶,该酶通过 α -凝集素-GPI 系统锚定在两个无标记菌株上,即 BY4743: :GAP-mGEB 和 BY4743: :GAP-aGEB,分别采用 MF α 和 Aga2p 信号肽,表达的植酸酶具有较宽 pH 适应性,在 pH 2.0 和 pH 5.0~6.0 处具有双重最适 pH, Aga2p 信号肽菌株表现出最高催化效率^[50]。采用基因工程异源融合表达策略构建了抗菌肽 LL-37 大肠杆菌原核异源表达系统,并基于启动子、融合蛋白、诱导条件及培养基组分多策略优化实现规模化生产,生产成本降至 2.07 元/mg^[51]。

2.3.2 氨基酸的生物合成

研究开发出一套针对枯草芽胞杆菌的合成生物学技术,突破一碳生物制造潜力底盘的技术瓶颈,首次实现以甲醇为唯一碳源生产 L-精氨酸^[52]。将大肠杆菌源谷氨酸脱羧酶导入地衣芽胞杆菌 DW2 菌株成功构建人工 γ -GABA 合成途径。通过中心代谢途径优化、L-Glu 合成通路强化和改善 NADPH 供给,工程菌 G35/pHY-P_{r_{5u12}}-gadB^{E89Q/H465A} 5 升生物反应器实现 62.9 g/L 产量^[53]。利用 pK18mobsacB 技术敲除谷氨酸棒杆菌 K020 的 *ldh*、*poxB*、*pyc* 等竞争基因,减少丙酮酸向乳酸和乙酸分流,优化磷酸烯醇式丙酮酸-磷酸转移酶系统,平衡葡萄糖吸收与代谢负荷,并调整接种量及阶段转换时机,5 L 发酵罐 L-Val 产量达 88.7 g/L^[54]。

2.3.3 维生素的生物合成

(1)维生素 B₁₂。只有部分原核生物可从头合成,部分原核生物还可采取补救途径从胞外转运钴啉醇酰胺等钴啉化合物催化合成维生素 B₁₂。研究

发现,在粘着剑菌 A 中敲除及弱化西罗血红素合成途径基因可提高维生素 B₁₂ 产量 45.1%^[55]。在天然菌株根瘤菌中引入基于 Cas12k 的碱基编辑技术 C12KGET 对底盘细胞基因组序列进行改造并整合表达荚膜红细菌源 *cobA* 基因,产量提升 25%^[56]。无细胞催化合成系统在维生素 B₁₂ 合成方面前景广阔,将天然维生素 B₁₂ 合成途径中 24 步催化反应细分为 5 个模块并逐个模块构建,通过组装 36 个酶的无细胞催化体系可实现以 5-氨基乙酰丙酸和氢胆酸盐为底物合成维生素 B₁₂^[57]。

(2)7-脱氢胆固醇的生物合成。酿酒酵母本身不存在 7-HDC 合成路径,但有天然甾醇合成途径,是合成 7-HDC 理想底盘细胞。脂滴会大量隔离 7-HDC 前体物质——角鲨烯并阻碍其进入下游代谢通路,研究团队在脂滴上重构角鲨烯下游代谢通路,7-HDC 产量达 684.1 mg/L,角鲨烯产量下降约 97%,团队还通过弱化三酰甘油降解通路、降低 NADH/NAD⁺ 比值,使 7-HDC 在 3 升生物反应器产量高达 5.1 g/L^[58]。在具有强大麦角固醇合成能力的酿酒酵母中异源表达 24-脱氢胆固醇还原酶,实现 7-DHC 生物合成量达到 44.1 mg/L,麦角固醇滴度下降 40.5%^[59],团队通过敲除 *ERG6* 和 *ERG5* 基因完全阻断麦角固醇合成途径,产量提高 4.2 倍,强化甲羟戊酸途径和后角鲨烯途径并消除转录抑制因子,摇瓶发酵产量达 738.5 mg/L,50 L 发酵罐发酵 24 h,产量达 3.80 g/L。

2.3.4 功能脂肪酸的生物合成

改造底盘细胞代谢途径可实现脂肪酸定向合成,如敲除 β -氧化途径并过表达硫酯酶可提升具有特殊功能的中链脂肪酸表达量。奇链脂肪酸(odd-chain fatty acids, OCFA)具有抗炎症、降血脂、降低血管疾病等作用,调控关键酶表达和优化代谢途径等能促进 OCFA 合成。研究发现,通过关键酶、代谢途径和细胞维度对酿酒酵母基因改造,中链脂肪酸产量提升 250 倍^[60]。重构解脂耶氏酵母脂肪酸和甘油三酯合成与降解途径能显著提升油酸生物合成量(56 g/L)^[61]。

2.4 食品风味物质的生物合成

借助合成基因回路与多模态调控策略,或基于底盘细胞工程可实现食品风味物质生物合成。在酿酒酵母中重建甲羟戊酸途径和苯丙烯酸代谢途径,辅以关键酶活性优化及产物定向进化可实现乙偶姻生物合成。通过代谢路径重构与整合位点优化,在强化内源莽草酸途径基础上以分支酸为中间体,仅通过 4 步反应即实现 363.0 mg/L 香兰素生产,进一

步通过启动子优化实现代谢模块适配和香兰素糖基化修饰解除反馈抑制,多底物共转化实现 1 745.5 mg/L 葡萄糖香兰素产量^[62]。在构建的高产香茅醇菌株基础上,通过整合额外拷贝的甲羟戊酸途径基因及过氧化物酶体定位基因簇,产量提升 1.5 倍,过表达磷酸戊糖途径非氧化支路基因和促进 NADPH 供给、筛选内源性转运蛋白并整合转录调控因子 PDR1 后,产量提升至 3.38 g/L,采用补料分批工艺实现 10.556 g/L 香茅醇产量,是目前酵母体系报道的最高水平^[63]。

2.5 在副产物高值转化、食品快检和溯源中的应用

合成生物学技术可实现乳清中乳糖等副产物高值转化、致病因子和有毒有害物质快测、食品生物安全与溯源分析。针对金黄色葡萄球菌等致病菌特异性基因序列设计相应的“标签”crRNA,若存在目标致病菌,等温扩增后激活 Cas12a 或 Cas13a 蛋白“附属切割”活性,切割报告分子产生荧光或试纸条显色,实现致病菌快检^[64]。细胞传感技术为食品快检提供新型检测方法,传感感应元件主要有转录因子、核糖开关等,报告元件主要有荧光素酶、荧光蛋白、荧光适配体、色素报告元件等。利用荧光标记适配体与淬灭基团 DNA 互补特异性杂交原理进行黄曲霉毒素 B₁ 快速检测^[65]。转录因子感知特定信号可增(减)相关基因表达量并指示致病因子或毒素变化。核糖开关也可被设计为能感知潜在风险的相关分子,若存在致病菌 DNA 或有毒有害物质时,核糖开关可与风险源发生构象变化,激活报告元件并产生可测定信号^[66]。荧光报告元件可与绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白耦合,感应元件受到刺激或接收信号时,可使荧光淬灭或恢复从而实现定性/量检测,如针对母乳寡糖开发的糖苷酶耦合传感器能高通量筛选高产菌株,色氨酸生物传感器高灵敏检测色氨酸^[67]。合成生物学还可用于食品溯源,如将人工设计且具有唯一性和高稳定性的 DNA 序列(DNA Barcode)以安全方式添加到食品及原辅料中,消费者或监管机构可通过试剂盒(条)或简易 PCR 辨别食品真伪或追溯食品来源。

3 食品合成生物学发展策略

3.1 微生物底盘细胞的改造

野生菌株不宜直接作为底盘细胞,去除非必需基因和潜在风险基因能提高遗传稳定性和代谢效率,插入外源基因或调控内源通路能增强目标产物合成能力。基因精简是构建底盘细胞重要策略。

Champie^[68]为研究基因组简化对大肠杆菌 DGF-298 (约 36% 基因组被删除)的影响,重建菌株特异性代谢模型 iAC1061,并基于 iModulon 转录组分析研究了基因表达调控并进行适应性实验室进化,菌株代谢通路得到优化,代谢稳定性较好。将原有启动子替换成其他启动子能改变受控基因表达谱,启动子可以是自身或相近种属的启动子,也可是外源启动子。对启动子核心区间隔序列进行随机突变或饱和突变可获得具有 310 倍转录活性差异的启动子库^[69]。分析补氮条件下地衣芽孢杆菌 CBBD302 全基因组转录变化,分析氨诱导型启动子核苷酸序列对编码 α -淀粉酶的 *amyL* 基因功能介导表达能力时发现,筛选的几个启动子均能介导 *amyL* 表达并能被氨显著诱导,以 *Pplp* 启动子介导的酶表达水平最高^[70]。串联双启动子组合策略近年受到重视,研究发现, *P43* 启动子在对数期能有效转录,而 σB 型启动子在稳定期表现出活性,为构建高效双启动子,可将 σB 型启动子与 *P43* 偶联构建若干双启动子。其中,双启动子 *PykzA-P43* 与公认强启动子 *P43* 相比,分别使绿色荧光强度、红色荧光强度和 α -淀粉酶活性提高了 1.72 倍、3.46 倍和 1.85 倍^[71]。利用组学数据和生物信息学工具进行启动子序列识别与改造、强度预测与 RBS 序列优选并指导新启动子发现,高强度新组成型或诱导型启动子改造以及目标基因的高效表达等是当前启动子研究重点。目前,终止子优化研究相对较少。对地衣芽孢杆菌内源 α -淀粉酶基因终止子 *T1* 进行功能表征发现,终止效率为 87.81%,从终止密码子与终止子间隔距离、茎结构底部 GC 含量、环区长度及 U-序列长度 4 个维度对终止强度进行组合优化并获得最优终止子 *T24*,终止效率提升至 97.97%^[72],优于目前广泛使用的 *T7* 终止子。

3.2 代谢通路动态调控

动态调控是通过合理设计代谢通路基因实现精确调控细胞生长和目标物生产的代谢平衡,是重要调控策略。在枯草芽孢杆菌中创建可编程和双功能丙酮酸响应遗传回路用于动态激活和抑制中心代谢通路,依靠胞内丙酮酸浓度平衡生长和葡萄糖酸合成,使葡萄糖酸滴度从 207 mg/L 增加到 802 mg/L。开关型回路能精确控制底盘细胞群体活动,生态开关能确保底盘细胞生物安全^[73]。研究者设计了一种可编程的双功能传感器,可同时响应温度与丙酮酸信号,将构建的基于温度传感器与丙酮酸生物传感器的分层级联调控电路用于异丁胺合成,发酵罐产量达 46.24 g/L (提升 3.31 倍)^[74]。设计开发了一款

快速光遗传反向调控回路 OptoINVRT7 用于调控酿酒酵母基因表达,该调控回路响应速度是同类 OptoINVRT 光遗传回路的 6 倍,团队将 OptoINVRT7 与诱导型 *GAL1* 启动子 (P_{GAL1-S}) 联用实现高强度且受光照精准调控的基因表达,黑暗条件基因表达诱导达 (132.9 ± 22.6) 倍,乳酸和异丁醇产量分别提升 50% 和 15% 以上^[75]。合适信号肽能指导新生肽正确折叠并引导跨膜分泌,通过吉布森组装技术利用两条含高比例简并核苷酸的重叠合成寡核苷酸链,实现天然信号肽 XPR2-pre 快速进化,以纳米荧光素酶为报告基因对 447 个信号肽突变体表征筛选出若干新型信号肽,其介导 *Nluc* 荧光素酶分泌性能优于 XPR2-pre,上清液酶活性最高提升至原来的 2.91 倍^[76]。这些信息肽具有跨蛋白通用性,能实现 β -半乳糖苷酶、 α -淀粉酶及 PET 水解酶的分泌表达。利用人工智能算法、机器学习模型和多组学数据深度融合可实现从基因到代谢流再到产物谱的多尺度预测与反馈控制,使底盘细胞具备更高自适应性和可预测性。通过卷积神经网络机器学习方法解析了启动子序列与功能的构效关系,并成功预测了大肠杆菌 $\sigma 70$ 启动子转录起始速率、17nt 启动子间隔区序列以及枯草芽孢杆菌 3 种不同 σ 因子特异性启动子序列^[77]。

3.3 适应性实验室进化

适应性实验室进化能模拟自然进化,可构建遗传多样性基因突变库,经过筛选可获得稳定遗传的底盘细胞。通过基因组重排与实验室适应性进化技术成功构建一株合成甲基营养型酿酒酵母,能以甲醇为唯一碳源实现稳健生长,该菌株可通过 *Adh2-Sfa1-rGly* (*ASrG*) 途径完成甲醇同化,同时介导甲酸与二氧化碳协同同化,引入电子转移材料 C3N4 量子点后,菌株甲醇依赖型生长能力显著增强^[78];该研究创新性地发现了一条全新的 C_1 化合物利用途径并彰显酿酒酵母代谢网络的非凡适应性与自我进化能力。基因组规模多位点快速进化工具结合计算机辅助进化能增强适应性进化选择效果,如基于酿酒酵母底盘细胞开发的基因组重排进化技术 (SCRaMbLE) 可在单一细胞实现多个不同性状同时改造,显著提升底盘细胞生长速度和耐受性^[79]。

3.4 辅酶因子工程

辅酶因子 $NADH/NAD^+$ 和 $NADPH/NADP^+$ 比例影响产物生物合成和代谢流方向,主要策略有重构辅酶因子代谢途径、增强胞内辅酶因子代谢强度、平衡辅酶因子稳态及提高酶辅因子偏好性等。构建双通道 EMP 途径以平衡 $NADPH$ 和 $NADH$ 供

应,通过改造磷酸戊糖途径引入来自不同菌的编码 NADH 依赖性天冬氨酸脱氢酶 *aspB* 基因,将 NADPH 消耗过程转化为消耗 NADH,改造启动子和引入可利用 NADP⁺作为辅因子的 *gap* 基因等策略以提高谷氨酸棒杆菌高丝氨酸产量和 NADPH^[80];当 NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺比例达到一定阈值后,可通过调节 EMP 路径和 GapN 通道通量维持辅因子平衡,保证高 EMP 速率促进产物合成。

3.5 蛋白质骨架技术

蛋白质骨架技术可通过改变酶与底物邻近距离使酶以最优催化空间锚定在蛋白质骨架并调控催化效率。人工设计 CipA 基因,该基因编码 9 个不同黏附模块与 2 个纤维素结合结构域(DCipA2B9C),将 9 种不同真菌纤维素酶分别与 9 种不同粘连结构域融合使酶能在 DCipA2B9C 上实现精准定位并发挥酶邻近效应^[81],团队构建的骨架蛋白宿主(SH)可表达 DCipA2B9C,与酶宿主(EH)共培养体系乙醇量达到 14.29 g/L,比此前已构建的所有酵母纤维小体系统产量提升了 4 倍及以上。利用四肽重复亲和蛋白(TRAPs)作为酶催化骨架,构建纳米级多酶组装体系并对 TRAPs 进行编程来识别与酶融合的肽标签,该支架蛋白还可选择性隔离反应中辅因子并增加局部辅因子浓度,将多酶进行近距离排列触发底物通道效应实现辅因子高效利用和级联催化^[82]。

3.6 高通量筛选

引入荧光、质谱和基因组测序等多重检测技术可为底盘细胞构建提供高特异性、高灵敏度的高通量筛选,如荧光激活细胞分选技术、液滴微流控分选技术和生物传感器筛选策略等。酵母蛋白质水平与

细胞 RNA 含量具有相关性,基于该原理建立了一种基于 RNA 荧光标记与流式细胞术的高通量筛选方法筛选高蛋白突变株 B1,45 L 生物反应器补料分批发酵并控制乙醇<1.5 g/L 时,菌株蛋白质含量达 70.3 g/100g 干细胞,是目前已报道最高水平^[23]。开发了一套基于液滴微流控分选技术高通量筛选系统并将其用于高产乳酸菌株筛选,采用荧光激活细胞分选技术以高灵敏度、高通量方式完成目标菌株分选,突变株乳酸产量达 76 g/L(提升 52%)^[83]。利用核糖开关构建赖氨酸生物传感器并开发出高通量筛选技术,能增强嵌合天冬氨酸激酶在大肠杆菌中的性能,大幅提升 *L*-Thr 产量^[84];利用转录调控因子 *CcdR* 开发 *L*-Cys 生物传感器并将其与流式细胞分选技术耦联,构建的高通量筛选平台能显著提升 *L*-Cys 产量^[85]。

3.7 人工多菌体系设计与应用

纯培养单菌体系代谢网络和遗传背景清晰,但面对复杂目标产物生物合成时,存在胞内资源分布失衡,底物转化率低,稳健性不足,产物累积造成细胞过氧化和细胞应激等问题,人工多菌体系能通过有效分配细胞代谢负担增加产物合成。以植物发酵梭菌为初级碳源专一性菌株,大肠杆菌为次级碳源专一性菌株,通过构建初级碳源与次级碳源菌株协作模式,借助交叉互养正反馈机制、代谢分工策略以及死菌体分解代谢介导营养与能量传递实现高效共生,当该合成菌群以生物膜形式培养时展现出生物量积累增强的特性,形成高细胞密度群落结构且菌群中不同菌株沿垂直方向呈现物种梯度分布。合成菌群具有较好环境耐受性,生物量积累量较各菌株纯培养生物膜总和提升约 250%^[86]。

常见底盘细胞改造策略及其应用如表 2 所示。

表 2 常见底盘细胞改造策略及其应用
Table 2 Common chassis cell engineering strategies and their applications

策略类型	改造策略	具体措施	改造策略应用
底盘细胞改造	基因组精简、启动子优化、终止子改造等	精简基因组非必需/不稳定基因	精简大肠杆菌 MG1655 基因组,利用转座子介导随机缺失增强遗传稳定性 ^[3] 。精简谷氨酸棒杆菌基因组改善转化效率、质粒拷贝数、生长情况和环境适应性 ^[5] ;精简乳酸乳球菌 N8 基因组约 6.9%,Nisin 产量和转化效率显著提升 ^[7] 。
		基因编辑实现精准调控	利用 CRISPR-Cas9 精准编辑酿酒酵母基因,甜茶苷和莱鲍迪苷合成量显著增加 ^[8] ;通过 CRISPR-Cas9 对毕赤酵母基因编辑,获得凝乳酶原高表达菌株 ^[49] 。
		启动子、终止子、信号肽、伴侣、融合标签等优化	优化启动子和信号肽组合,Brazzein 产量显著增加 ^[36] 。优化分子伴侣、杂合信号肽及促溶标签,蛋白表达量高达 5.38 g/L ^[87] ;全基因组转录分析获高效氨诱导型启动子 <i>PpIp</i> ,显著增强 α -淀粉酶产量 ^[70] ;优化内源终止子获超高效终止子 T24,终止效率达 97.97% ^[71] 。

续表			
策略类型	改造策略	具体措施	改造策略应用
代谢通路 动态调控	构建可响应代谢物信号的动态调控回路	构建感应开关实现生长与生产平衡	构建可编程和双功能丙酮酸响应遗传回路动态激活和抑制中心代谢通路,葡萄糖酸滴度从 207 mg/L 增加至 802 mg/L ^[73] 。
		构建光、温度等外源信号调控元件	设计可同时响应温度与丙酮酸信号双功能传感器,显著增强代谢物分层级联调控 ^[74] ;开发快速光遗传反向调控回路 OptoINVRT7,实现光照对基因表达精准时空调控 ^[75] 。
适应性实 验室进化	模拟自然进化增强耐受性和底物利用率	提升胁迫耐受性	通过基因组重排与实验室适应性进化,成功增强菌株耐受性并发现全新 C ₁ 化合物利用途径 (Adh2-Sfa1-rGly 途径) ^[78] 。
		基因组重排进化技术增强适应性	应用基因组重排进化技术 (SCRaMbLE) 实现酿酒酵母多性状同时改造,显著提升生长速度和适应性 ^[88] 。
辅酶因子 工程	优化辅因子代谢通路和供给	平衡辅因子消长实现辅因子供应平衡	构建 <i>C. glutamicum</i> 双通道 EMP 途径、改造磷酸戊糖途径等策略平衡 NADPH 和 NADH 供应,显著增强高丝氨酸产量 ^[80] 。
		增强辅因子供给	利用强启动子 <i>PGAP1</i> 过表达磷酸戊糖途径基因,精准增强 NADPH 供应,木糖醇产量提升 20% 以上 ^[14] 。
蛋白质骨 架技术	重构代谢酶与底物空间分布	基于骨架蛋白增强酶-底物邻近效应,提高级联反应速率	应用蛋白质骨架技术人工设计编码 9 个不同黏附模块与 2 个纤维素结合结构域骨架蛋白基因 DCipA2B9C,将 9 种真菌纤维素酶精准定位,乙醇产量提升 4 倍以上 ^[81] 。
高通量筛 选	结合荧光标记、微流控、传感器等技术实现菌株或元件筛选	目标性状与荧光信号关联高通量筛选	构建基于 RNA 荧光标记与流式细胞术的高通量筛选方法,高蛋白突变株蛋白质含量达 70.3 g/100 g 干细胞 ^[20] 。
		流式细胞术高通量分选目标细胞	开发基于液滴微流控高通量分选系统用于筛选高产菌株,突变株乳酸产量比出发菌株提升 52% ^[83] 。
		生物传感器耦合筛选高产菌株	利用核糖开关构建传感器筛选高产菌株或快速检测 ^[84] ,或利用转录因子 CcdR 构建生物传感器高通量筛选高产菌 ^[85] 。
人工多菌 体系构建	构建多菌群落,实现代谢分担	通过中间代谢物交换解除单菌过载	构建由初级碳源专一性菌株与次级碳源专一性菌株组成的多菌菌群,生物膜总和提升约 250%,并形成具有物种梯度分布的高密度群落结构 ^[86] 。

4 结语与展望

食品合成生物学的规模化和产业化中面临技术、安全及产业生态等多重挑战。随着智能化与大数据深度融合,可构建“设计-构建-测试-学习”全闭环智能平台,实现从基因组编辑到发酵调控的全流程预测与自适应优化,尤其在启动子设计、蛋白结构预测及代谢网络建模等方面,将显著提升底盘细胞改造效率。当前底盘细胞普遍存在代谢负担重、耐受性不足、产物分泌效率低等问题,未来可通过多组学分析揭示代谢调控网络,开展合成基因组学与最小基因组研究,构建精简高效的底盘细胞,并建设模块化元件库。安全性方面,需建立涵盖基因编辑稳定性、副产物及致敏性的风险评估框架,推动国内外法规协调,明确产品分类与审批路径,加强科普与伦理讨论。产业化需跨学科协同,加强产学研联动,推进中试验证与规模化示范,培育专业人才,构建开放

创新平台。通过技术创新、系统设计、安全规范与生态协同,食品合成生物学有望为未来食品提供安全、营养、可持续的个性化方案,推动食品工业向绿色化、智能化和精准化转型升级。

参考文献

[1] Chen R P, Ren S Y, Li S, et al. Synthetic biology for the food industry: advances and challenges[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2025, 45(1): 23-47.

[2] 李玉珍, 肖怀秋, 王斌, 等. 抗菌肽微生物异源表达系统和表达策略优化研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(22): 411-419.

Li Y Z, Xiao H Q, Wang B, et al. Research advances on heterologous expression systems and expression strategies optimization for antimicrobial peptides [J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51 (22) : 411-419.

[3] Ma S, Su T Y, Liu J M, et al. Reduction of the bacte-

- rial genome by transposon-mediated random deletion [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(2): 668-677.
- [4] Wu Y K, Chen T C, Liu Y F, et al. Design of a programmable biosensor-CRISPRi genetic circuits for dynamic and autonomous dual-control of metabolic flux in *Bacillus subtilis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(2): 996-1009.
- [5] Baumgart M, Unthan S, Rückert C, et al. Construction of a prophage-free variant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 for use as a platform strain for basic research and industrial biotechnology[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 6006-6015.
- [6] Wei L, Zhao J H, wang Y R, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level γ -aminobutyric acid production from glycerol by dynamic metabolic control [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 69: 134-146.
- [7] Qiao W J, Liu F L, Wan X, et al. Genomic features and construction of streamlined genome chassis of nisin Z producer *Lactococcus lactis* N8[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(1): 47.
- [8] Xu Y M, Wang X L, Zhang C Y, et al. *De novo* biosynthesis of rubusoside and rebaudiosides in engineered yeasts[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 3040.
- [9] Chen R B, Gao J Q, Yu W, et al. Engineering cofactor supply and recycling to drive phenolic acid biosynthesis in yeast[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18(5): 520-529.
- [10] 罗浩,但俊林,蔡岭舛,等. 产酯酶和酯类化合物的粟酒裂殖酵母筛选及应用[J]. *食品研究与开发*, 2025, 46(6): 152-160.
- Luo H, Dan J L, Cai L X, et al. Screening and application of *Schizosaccharomyces pombe* with production esterases and ester compounds [J]. *Food Research and Development*, 2025, 46(6): 152-160.
- [11] Villarreal P, Molinet J, Braun-Galleani S, et al. Non-conventional yeasts as a source of genetic diversity and biotechnological potential[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2025, 79: 595-614.
- [12] Lee S, Lee J H, Park H J, et al. *Yarrowia lipolytica* as a promising cell factory for microbial production of value-added nutraceuticals [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2025, 13: 1673169.
- [13] Jia N, Ni X, Wang H Y, et al. Reconstructing an inducible homologous recombination system in *Ogataea polymorpha*[J]. *Biotechnology Journal*, 2025, 20(6): e70040.
- [14] Ahmad I, Shim W Y, Jeon W Y, et al. Enhancement of xylitol production in *Candida tropicalis* by co-expression of two genes involved in pentose phosphate pathway [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(1): 199-204.
- [15] Ekta, Biswas D, Mukherjee G, et al. Rice *Big Grain1* enhances biomass and plant growth-promoting traits in rhizospheric yeast *Candida tropicalis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(21): 6553-6571.
- [16] Xu J, Xia Y Y, Shi Y B, et al. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the *de novo* synthesis of β -ionone[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(8): 2533-2544.
- [17] Wijffels R H, Kruse O, Hellingwerf K J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(3): 405-413.
- [18] 周强,周大伟,孙敬翔,等. 微生物发酵法合成虾青素的研究进展[J]. *合成生物学*, 2024, 5(1): 126-143.
- Zhou Q, Zhou D W, Sun J X, et al. Research progress in synthesis of astaxanthin by microbial fermentation [J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(1): 126-143.
- [19] Canini D, Ceschi E, Perozeni F. Toward the exploitation of sustainable green factory: biotechnology use of *Nannochloropsis* spp[J]. *Biology*, 2024, 13(5): 292.
- [20] Liu Y, Wu Y K, Lü X Q, et al. Improving cellular protein content of *Saccharomyces cerevisiae* based on adaptive evolution and flow cytometry-aided high throughput screening[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(1): 706-717.
- [21] Shao Y R, Xue C L, Liu W Q, et al. High-level secretory production of leghemoglobin in *Pichia pastoris* through enhanced globin expression and heme biosynthesis[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 127884.
- [22] Xue J K, Zhou J W, Li J H, et al. Systematic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient synthesis of hemoglobins and myoglobins [J]. *Bioresource Technology*, 2023, 370: 128556.
- [23] 彭麟惠,于文文,邓洁莹,等. 组合代谢工程策略改造大肠杆菌从头合成2'-岩藻糖基乳糖[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(24): 9-17.
- Peng L H, Yu W W, Deng J Y, et al. *De novo* synthesis of 2'-fucosyllactose through combinatorial metabolic engineering strategies in *Escherichia coli*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2025, 51(24): 9-17.
- [24] Zhang Q W, Xu X H, Zhang W, et al. *De novo* 2'-fucosyllactose biosynthesis using glucose as the sole carbon source by multiple engineered *Bacillus subtilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2025, 88: 85-93.

- [25] Zhang Q W, Liu Z M, Xia H Z, et al. Engineered *Bacillus subtilis* for the *de novo* production of 2'-fucosyl-lactose [J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21 (1): 110.
- [26] Wu Y K, Li Y, Zhang Y T, et al. Efficient protein expression and biosynthetic gene cluster regulation in *Bacillus subtilis* driven by a T7-BOOST system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(11): 3328-3339.
- [27] Deng M T, Lü X Q, Liu L, et al. Efficient bioproduction of human milk alpha-lactalbumin in *Komagataella phaffii* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(8): 2664-2672.
- [28] Lü X Q, Cui S X, Chen J, et al. Cascaded *de novo* biosynthesis of lacto-proteins from CO₂ by engineered *Pichia pastoris* [J]. *Green Chemistry*, 2023, 25 (14) : 5460-5469.
- [29] Zhang H J, Liu Z, Wang Z, et al. A review of novel antioxidant ergothioneine: biosynthesis pathways, production, function and food applications[J]. *Foods*, 2025, 14(9): 1588.
- [30] Kang X Y, Wang Y, Luo W. Enhancing ergothioneine production by combined protein and metabolic engineering strategies[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(15): 9234-9245.
- [31] Wang L H, Tian X Q, Xue P H, et al. Enhanced production of ergothioneine in *Aspergillus oryzae* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2025, 109 (1): 143.
- [32] 刘芸, 乔郅钠, 张恒维, 等. 重组大肠杆菌全细胞一步法催化乳糖合成D-塔格糖[J]. *生物工程学报*, 2025, 41(5): 1974-1993.
Liu Y, Qiao Z N, Zhang H W, et al. One-step whole-cell synthesis of D-tagatose from lactose catalyzed by recombinant *Escherichia coli* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2025, 41(5): 1974-1993.
- [33] Dai Y W, Li C C, Zheng L H, et al. Enhanced biosynthesis of d-tagatose from maltodextrin through modular pathway engineering of recombinant *Escherichia coli* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 178: 108303.
- [34] Liu J J, Zhang G C, Kwak S, et al. Overcoming the thermodynamic equilibrium of an isomerization reaction through oxidoreductive reactions for biotransformation [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1356.
- [35] Masuda T, Ohta K, Ojio N, et al. A hypersweet protein: removal of the specific negative charge at Asp21 enhances thaumatin sweetness[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20255.
- [36] Rong W H, Wang X R, Shi Z H, et al. Systematic engineering of *Komagataella phaffii* for efficient production of sweet-tasting protein brazzein[J]. *Biotechnology Journal*, 2025, 20(6): e70046.
- [37] Neiers F, Belloir C, Poirier N, et al. Comparison of different signal peptides for the efficient secretion of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Pichia pastoris* [J]. *Life*, 2021, 11(1): 46.
- [38] Joseph J A, Akkermans S, Van Impe J F M. Effects of temperature and pH on recombinant thaumatin II production by *Pichia pastoris* [J]. *Foods*, 2022, 11(10): 1438.
- [39] 朱家瑞. 以纤维素为碳源的解脂耶氏酵母从头生物合成对香豆酸及番茄红素[D]. 武汉: 华中科技大学, 2023.
Zhu J R. *De novo* biosynthesis of p-coumaric acid and lycopene by *Yarrowia lipolytica* using cellulose as carbon source [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2023.
- [40] 张新颖. 毕赤酵母合成番茄红素代谢重构及CRISPR-Cpf1系统开发应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2022.
Zhang X Y. Metabolic reconstitution of *Pichia pastoris* for lycopene biosynthesis and the development and application of CRISPR-Cpf1 system [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022.
- [41] Furubayashi M, Kubo A, Takemura M, et al. Capsanthin production in *Escherichia coli* by overexpression of capsanthin/capsorubin synthase from *Capsicum annum* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(17): 5076-5085.
- [42] 侯亚男. 工程大肠杆菌共培养系统从头合成甜菜素[D]. 天津: 天津大学, 2020.
Hou Y N. Engineering *Escherichia coli* coculture system for *de novo* biosynthesis of betalains [D]. Tianjin: Tianjin University, 2020.
- [43] Babaei M, Thomsen P T, Dyekjær J D, et al. Combinatorial engineering of betalain biosynthesis pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 128.
- [44] Yang D, Jang W D, Lee S Y. Production of carminic acid by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143 (14): 5364-5377.
- [45] Zhang Q, Wang X L, Zeng W Z, et al. *De novo* biosynthesis of carminic acid in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 76: 50-62.
- [46] Wang X F, Li L, Ding C F, et al. Disruption of UDP-galactopyranose mutase expression: a novel strategy for regulation of galactomannan biosynthesis and *Monascus* pigments secretion in *Monascus purpureus* M9[J]. *Inter-*

- national Journal of Biological Macromolecules, 2024, 259: 129369.
- [47] Liao F, Hu Z C, Zeng L Q, et al. *MpDLDH* gene is crucial for regulating growth and pigment biosynthesis through acetyl-CoA modulation in *Monascus purpureus* [J]. Food Bioscience, 2024, 62: 105215.
- [48] Wang J, Xiang Z X, Luan M F, et al. High-level secretory expression of recombinant type III human-like collagen $\alpha 1$ in *Pichia pastoris* via multilevel systematic optimization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 313: 144270.
- [49] Zheng Y L, Wang S Q, Deng Y H, et al. Enhanced production of recombinant calf chymosin in *Kluyveromyces lactis* via CRISPR-Cas9 engineering [J]. Biore-source Technology, 2025, 419: 132116.
- [50] Thanh L M, Lan V T H, Cuong C Q, et al. Development of CRISPR/Cas9-mediated *Saccharomyces cerevisiae* strains for the cell-surface display of a novel fusion acid-alkaline phytase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(14): 8458-8468.
- [51] 李云露. 抗菌肽 LL-37 大肠杆菌表达系统的构建、优化及其应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2024.
- Li Y L. Antimicrobial peptide LL-37 *E. coli* expression system construction, optimisation and application [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2024.
- [52] Liu P, Yuan Q Q, Yang X T, et al. A synthetic biology toolkit for the plasmid-dependent and thermophilic methylotroph *Bacillus methanolicus* [J]. Cell Reports, 2026, 45(1): 116788.
- [53] Wang S Y, Zhu J, Zhao Y W, et al. Developing a *Bacillus licheniformis* platform for *de novo* production of γ -aminobutyric acid and other glutamate-derived chemicals[J]. Metabolic Engineering, 2025, 88: 124-136.
- [54] 于海浪. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产 L-缬氨酸 [D]. 无锡: 江南大学, 2025.
- Yu H L. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-valine production [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2025.
- [55] Liu Y H, Chang Y Y, Wang Q, et al. Effect of blocking the haem synthesis pathway and weakening the haem synthesis pathway for sirohaem on the growth of and vitamin B₁₂ synthesis in *Ensifer adhaerens* Casida A [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2023, 46(12): 1825-1835.
- [56] Cui Y L, Dong H N, Tong B S, et al. A versatile Cas12k-based genetic engineering toolkit (C12KGET) for metabolic engineering in genetic manipulation-deprived strains [J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(15): 8961-8973.
- [57] Kang Q, Fang H, Xiang M J, et al. A synthetic cell-free 36-enzyme reaction system for vitamin B₁₂ production[J]. Nature Communications, 2023, 14: 5177.
- [58] Xiu X, Xu X H, Wu Y K, et al. Hyperproduction of 7-dehydrocholesterol by rewiring the post-squalene module in lipid droplets of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metabolic Engineering, 2024, 86: 147-156.
- [59] Ye Z Q, Xu X H, Wu Y K, et al. Efficient 7-dehydrocholesterol production by multiple metabolic engineering of diploid *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(45): 25186-25196.
- [60] Zhu Z W, Hu Y T, Teixeira P G, et al. Multidimensional engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient synthesis of medium-chain fatty acids [J]. Nature Catalysis, 2020, 3(1): 64-74.
- [61] Wang K F, Shi T Q, Wang J P, et al. Engineering the lipid and fatty acid metabolism in *Yarrowia lipolytica* for sustainable production of high oleic oils [J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(4): 1542-1554.
- [62] Xin X, Liu D F, Liu S C, et al. Redesigned pathway for *de novo* synthesis of vanillin and co-conversion of multiple renewable substrates in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. JACS Au, 2025, 5(3): 1133-1145.
- [63] Gao Q, Wang H R, Shan M Y, et al. Systematic engineering to enhance citronellol production in yeast [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(24): 15189-15198.
- [64] Wang H H, Zhou X R, Liu Q, et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(5): 1497-1507.
- [65] Chen L, Wen F, Li M, et al. A simple aptamer-based fluorescent assay for the detection of aflatoxin B1 in infant rice cereal [J]. Food Chemistry, 2017, 215: 377-382.
- [66] Jin J, den Besten H M W, Rietjens I M C M, et al. Chemical and microbiological hazards arising from new plant-based foods, including precision fermentation-produced food ingredients [J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2025, 16: 171-194.
- [67] 韩熠然, 周梦凯, 韩静, 等. 色氨酸生物传感器在合成生物学中的研究进展及应用 [J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 1720-1735.
- Han Y R, Zhou M K, Han J, et al. Research progress and application of L-tryptophan biosensors in synthetic biology [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 1720-1735.
- [68] Champie A, Lachance J C, Sastry A, et al. Diagnosis

- and mitigation of the systemic impact of genome reduction in *Escherichia coli* DGF-298[J]. *mBio*, 2024, 15(10): e00873-e00824.
- [69] Jin L Y, Nawab S, Xia M L, et al. Context-dependency of synthetic minimal promoters in driving gene expression: a case study [J]. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12(6): 1476-1486.
- [70] Shen P L, Niu D D, Permaul K, et al. Exploitation of ammonia-inducible promoters for enzyme overexpression in *Bacillus licheniformis* [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2021, 48(5/6): kuab037.
- [71] Rao Y, Cai D B, Wang H, et al. Construction and application of a dual promoter system for efficient protein production and metabolic pathway enhancement in *Bacillus licheniformis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 312: 1-10.
- [72] Rao Y, Yang J Y, Wang J Q, et al. Minimization and optimization of α -amylase *Terminator* for heterologous protein production in *Bacillus licheniformis* [J]. *Biore-sources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 108.
- [73] Xu X H, Li X L, Liu Y F, et al. Pyruvate-responsive genetic circuits for dynamic control of central metabolism [J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(11): 1261-1268.
- [74] Li Y, Liu M X, Yang C Y, et al. Engineering temperature-powered synthetic multilayer molecular bioswitch for high-level pyruvate derivative production in *Escherichia coli* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2025, 14(8): 3127-3141.
- [75] Zhao E M, Lalwani M A, Lovelett R J, et al. Design and characterization of rapid optogenetic circuits for dynamic control in yeast metabolic engineering [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(12): 3254-3266.
- [76] Wu Z Z, Chen W H, Hong Y X, et al. Machine learning-assisted rational design and evolution of novel signal peptides in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2025, 10(4): 1275-1283.
- [77] Van Bremp M, Clauwaert J, Mey F, et al. Predictive design of sigma factor-specific promoters [J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5822.
- [78] Guo F, Liu K, Qiao Y Y, et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: crafting a synthetic methylotroph via self-reprogramming [J]. *Science Advances*, 2024, 10(51): eadq3484.
- [79] Cheng L, Li J L, Chen Y J, et al. SCRaMbLE: a versatile tool for genome manipulation [J]. *Physiology*, 2025, 40(5): 398-407.
- [80] Li N, Li L H, Yu S Q, et al. Dual-channel glycolysis balances cofactor supply for l-homoserine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Bioresource Technology*, 2023, 369: 128473.
- [81] Khatoon Z, Anandharaj M, Chen T H, et al. Creating a large designer cellulosome in yeast to boost ethanol production [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2025, 122(45): e2517490122.
- [82] 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.
- [83] Zhu X D, Shi X, Wang S W, et al. High-throughput screening of high lactic acid-producing *Bacillus coagulans* by droplet microfluidic based flow cytometry with fluorescence activated cell sorting [J]. *RSC Advances*, 2019, 9(8): 4507-4513.
- [84] Su B L, Lai P X, Deng M R, et al. Design of a dual-responding genetic circuit for high-throughput identification of L-threonine-overproducing *Escherichia coli* [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 395: 130407.
- [85] Gao J S, Du M H, Zhao J H, et al. Design of a genetically encoded biosensor to establish a high-throughput screening platform for L-cysteine overproduction [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 144-157.
- [86] Park H, Patel A, Hunt K A, et al. Artificial consortium demonstrates emergent properties of enhanced cellulosic-sugar degradation and biofuel synthesis [J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2020, 6: 59.
- [87] Lü X Q, Cui S X, Chen J, et al. Cascaded de novo biosynthesis of lacto-proteins from CO₂ by engineered *Pichiapastoris* [J]. *Green Chemistry*, 2023, 25(14): 10.
- [88] Cheng L, Li J, Chen Y, et al. SCRaMbLE: a versatile tool for genome manipulation [J]. *Physiology*, 2025, 40(5): 398-407.