

谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组中性位点的计算机筛选及表征

丁晴^{1#}, 林海天^{3#}, 盛琦², 黄铭², 薛正莲¹, 赵欣雨², 邓赵红³, 刘立明^{1,2*}

1 安徽工程大学 生物与食品工程学院, 安徽省工业微生物分子育种工程实验室, 安徽 芜湖

2 江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡

3 江南大学 人工智能与计算机学院, 教育部工程中心, 江苏 无锡

丁晴, 林海天, 盛琦, 黄铭, 薛正莲, 赵欣雨, 邓赵红, 刘立明. 谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组中性位点的计算机筛选及表征[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 3809-3823.

DING Qing, LIN Haitian, SHENG Qi, HUANG Ming, XUE Zhenglian, ZHAO Xinyu, DENG Zhaohong, LIU Liming. Computed screening and characterization of genomic neutral sites in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(8): 3809-3823.

摘要: 【目的】针对谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 基因组 G+C 含量高、间隔序列短导致中性位点(neutral site, NS)资源匮乏的问题, 建立计算机辅助筛选平台, 筛选并表征适用于异源基因整合的高效中性位点, 为构建高效细胞工厂提供关键元件支撑。【方法】构建计算机筛选平台 CgNSFinder, 结合基因组注释、邻域特征、区域长度及 G+C 含量等启发式规则筛选候选中性位点; 通过报告基因 *mKate* 敲入实验, 从整合效率、细胞适应性、表达强度及稳定性等方面系统表征候选位点; 将淀粉酶基因、番茄红素合成基因簇及 L-赖氨酸合成关键基因整合至筛选位点, 验证其异源表达能力及应用效能。【结果】筛选获得 96 个候选中性位点, 经实验表征确定 24 个高效位点, 其中 19 个位点整合效率大于 50%, 22 个位点荧光表达强度在 2 400–3 500 a.u. 之间; NS3 位点表现最优, 多拷贝整合后番茄红素产量达 48.4 mg/L; 基于筛选位点构建的 L-赖氨酸生产菌株 D301 在 5 L 发酵罐中产量为 49.51 g/L, 转化率 14.25 g/g, 生产强度 1.53 g/(L·h)。【结论】本研究建立的中性位点筛选方法高效可行, 筛选获得的中性位点兼具高整合效率、低宿主干扰及稳定表达特性, 为谷氨酸棒杆菌代谢工程改造提供了重要工具。

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 中性位点; 异源基因整合; 细胞工厂; 代谢工程

资助项目: 国家自然科学基金(U25A20618)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U25A20618).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 2026-01-30; Accepted: 2026-03-11; Published online: 2026-04-03

Computed screening and characterization of genomic neutral sites in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

DING Qing^{1#}, LIN Haitian^{3#}, SHENG Qi², HUANG Ming², XUE Zhenglian¹, ZHAO Xinyu²,
DENG Zhaohong³, LIU Liming^{1,2*}

¹ Anhui Engineering Laboratory for Industrial Microbiology Molecular Breeding, School of Biology and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui, China

² Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

³ Engineering Center of the Ministry of Education, School of Artificial Intelligence and Computer Science, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To address the scarcity of neutral sites in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 caused by high G+C content and short intergenic sequences, we established a computer-aided screening platform to identify and characterize efficient neutral sites suitable for heterologous gene integration, aiming to provide key component support for constructing high-performance cell factories. **[Methods]** A computational screening platform CgNSFinder was constructed to screen candidate neutral sites by integrating heuristic rules such as genomic annotation, neighborhood characteristics, length, and G+C content. The candidate sites were systematically characterized in terms of integration efficiency, cell adaptability, expression intensity, and stability through reporter gene *mKate* knock-in experiments. We integrated the amylase gene, lycopene synthesis gene cluster, and key L-lysine synthesis genes into the screened sites to verify their heterologous expression ability and application efficiency. **[Results]** A total of 96 candidate neutral sites were screened out, from which 24 efficient sites were confirmed by experimental characterization. Among them, 19 sites had an integration efficiency greater than 50%, and 22 sites had a fluorescence expression intensity within the range of 2 400–3 500 a.u. The NS3 site showed the best performance, and the lycopene titer reached 48.4 mg/L after multi-copy integration. The L-lysine-producing strain D301 constructed based on the screened sites achieved a titer of 49.51 g/L, a yield of 14.25 g/g, and a productivity of 1.53 g/(L·h) in a 5-L fermenter. **[Conclusion]** The established neutral site screening method is efficient and feasible. The screened neutral sites are characterized by high integration efficiency, low host interference, and stable expression. This study provides an important tool for metabolic engineering of *C. glutamicum*.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; neutral site; heterologous gene integration; cell factory; metabolic engineering

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)作为一种已通过美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)公认安全(general

recognized as safe, GRAS)认证的细胞工厂^[1-2],具有遗传稳定性强、遗传操作工具丰富、产物合成效率高、易于规模化培养和蛋白分泌能力

高等优点, 而广泛应用于氨基酸、有机酸、生物燃料等高值化学品的工业化生产^[3-5]。为构建高生产性能的细胞工厂, 亟需启动子、核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)、酶元件、中性位点等元件, 为外源基因稳定表达和碳流的精准调控奠定坚实基础^[6-7]。

作为重要的基因表达调控元件, 中性位点是基因组中可容纳外源 DNA 插入, 且不影响宿主生长、代谢稳态及目标产物合成的“安全港”区域(safe harbor)^[8-9]。中性位点筛选的传统策略是结合比较基因组学、转录组动态分析和实验表征, 挖掘非必需且结构稳定的假基因区域或基因间区(intergenic regions, IGRs)^[10], 获得一系列潜在中性位点, 再通过构建报告基因(如 *Dasher*、*mKate*)插入株系、测定生长曲线、表征荧光表达强度等方式, 评估中性位点的稳定性与表达强度, 最终获得一系列中性位点^[11-12]。如通过理性筛选在大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) CCTCC M2019435 中发现并验证了 15 个中性位点用于无质粒戊二酸细胞工厂的构建^[13]; 通过搭建计算机筛选平台在 *Rhodotorula toruloides* 中发现并表征了 12 个整合效率>50% 的稳定的中性位点^[14]; 基于 CRISPR-COPIES pipeline 模型在 *Sulfolobus islandicus* 发现了 8 个中性位点并进行了表征^[15]。

由于谷氨酸棒杆菌基因组 G+C 含量高、基因间隔序列短的独特特征, 现有的中性位点的传统筛选方法难以兼顾筛选效率与准确性, 导致谷氨酸棒杆菌的中性位点资源有限且功能表征不充分, 难以满足高效细胞工厂构建的需求。为此, 本研究针对谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 基因组的结构特征与功能注释, 建立了一套基于基因组数据的计算机辅助分析流程, 系统性筛选适用于异源基因整合的候选中性位点; 通过实验表征量化评估候选位点整合后对宿主细胞生长速率、适应性及异源基因表达强度的影响, 期望最终建立一套可推广应用的微生物中性位点筛选方法, 为谷氨酸棒杆菌高效改造与工业

应用奠定坚实的元件基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

本研究以谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 为出发菌株(本实验室保藏), 使用 *E. coli* Top10 构建表达载体, 所使用的重组质粒、基因工程菌株、关键引物序列等原始数据存储在微生物科学数据中心(<http://nmec.cn>), CSTR 编号为 31253.11.sciencedb.j00231.00056。

1.2 主要试剂和仪器

α -淀粉酶标品、番茄红素标品、L-赖氨酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 同源重组酶, 武汉爱博泰克生物科技有限公司; 消化酶, 宝生物工程(大连)有限公司; 片段扩增酶 2 $\times$ Phanta Max Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、产物纯化试剂盒, 南京诺唯赞生物工程(上海)股份有限公司; 其他试剂, 国药集团化学试剂有限公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 仪、电穿孔仪、核酸电泳仪, 伯乐生命科学产品(上海)有限公司; (低温)离心机, Eppendorf 公司; 恒温培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司; 5 L 发酵罐, 迪必尔生物工程(上海)有限公司; 生物传感器, 深圳市希尔曼生物医疗科技有限公司; 高效液相色谱仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 分光光度计, 岛津企业管理(中国)有限公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

谷氨酸棒杆菌生长培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 葡萄糖 5.0, 脑心浸液 18.5, NaCl 10.0。

谷氨酸棒杆菌电转化恢复培养基(g/L): 胰蛋白胨 5.0, 酵母提取物 2.5, 脑心浸液 18.5,

D-sorbitol 91.0, NaCl 10.0。

谷氨酸棒杆菌感受态制备培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 甘氨酸 25.0, NaCl 10, 吐温-80 1.0, 异烟肼 0.4。

可溶性淀粉培养基(g/L): 可溶性淀粉 10.0, 琼脂粉 20.0。

斜面培养基(g/L): Urea 2.5, 胰蛋白胨 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, 酵母提取物 1.8, 葡萄糖 36.0, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.004, VB_7 0.000 2, VB_1 0.000 2, 卡那霉素(kanamycin, Kan) 0.05, 琼脂粉 18.0。

一级种子培养基(g/L): Urea 2.5, 胰蛋白胨 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, 酵母提取物 1.8, 葡萄糖 36.0, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.004, VB_7 0.000 2, VB_1 0.000 2, Kan 0.05。

二级种子培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8.0, 酵母提取物 1.8, 葡萄糖 36.0, KH_2PO_4 0.8, K_2HPO_4 0.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.004, VB_7 0.000 02, VB_1 0.002, Kan 0.05。

发酵培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8, Angel 酵母提取物 FM90 21.8, 葡萄糖 90.0, KH_2PO_4 1.0, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.004, VB_7 0.000 02, VB_1 0.002, VB_3 0.03, Kan 0.05。

1.4 基因编辑方法

谷氨酸棒杆菌的基因编辑通过 pK18 mobsacB 质粒完成。以 *nsI* 敲入菌株的整合为例说明基因编辑过程: (1) 以谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 菌株基因组为模板, 利用引物 *nsI*-UP-F/*nsI*-UP-R、*nsI*-DW-F/*nsI*-DW-R 分别扩增上、下同源臂, 以 pECXK-99E-Ptuf-mKate-TrnB 质粒为模板, 利用引物 mKate-F/mKate-R 扩增 Ptuf-mKate-TrnB 片段; (2) 以 pK18 mobsacB 质粒为模板、pK18-*nsI*-F/pK18-*nsI*-R 为引物线性化载体, 4 片段同源重组构建质粒

pK18-*nsI*; (3) 将验证正确的 pK18-*nsI* 质粒电转入谷氨酸棒杆菌中, 电转后涂布于含有 0.05 g/L 卡那霉素的谷氨酸棒杆菌固体生长培养基上, 在 30 °C 培养条件下培养, 筛选获得第 1 次同源重组转化子; (4) 将转化子转接至液体谷氨酸棒杆菌生长培养基上在 30 °C、200 r/min 培养 3–4 h, 涂布于含 15% 蔗糖的谷氨酸棒杆菌固体生长培养基中并于 30 °C 培养 28 h, 因 pK18 mobsacB 质粒带有 *sacB* 致死基因, 未完成第 2 次同源重组的菌株在蔗糖培养基中无法正常生长。利用该特性筛选出完成 2 次同源重组的转化子, 最终在固体谷氨酸棒杆菌生长培养基上进行划线分离并挑取多个转化子; (5) 菌落 PCR 并测序验证, 获得重组菌株, 完成菌株构建。

1.5 培养方法

菌种活化: 蘸取甘油管中保藏的菌液, 按 1% 接种量转接至谷氨酸棒杆菌生长培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 8–10 h。

24 深孔板培养: 取活化菌液按 1.5% 接种量转接至装液量为 2 mL 的 24 孔深孔板, 30 °C、400 r/min 培养 22–24 h。

斜面培养: 蘸取甘油管中保藏的菌液均匀划至斜面培养基中, 30 °C 恒温培养 22–24 h。

种子培养: 用 8 mL 无菌水洗下斜面上的菌苔, 按 1% 接种量转接至 100 mL 一级种子培养基, 30 °C、120 r/min 温培养 5–7 h。接着, 按 2% 接种量将一级种子液转接至 100 mL 二级种子培养基中, 30 °C、120 r/min 培养 6–7 h。

5 L 发酵罐补料分批发酵: 5 L 发酵罐中初始装液量为 2.5 L, 将二级种子按装液量 10%–20% 的接种量接至发酵罐中, 调整初始转速为 320 r/min, 发酵温度为 30 °C, 使用氨水调控 pH 稳定在 7.5 ± 0.2 , 生长阶段溶氧控制在 20% 以上, 产酸阶段溶氧控制在 10% 以下, 溶氧降低时间为 6–10 h, 发酵过程采用分批补糖的方式, 在发酵 11–15 h 将葡萄糖补至 70–100 g/L, 21–25 h 将葡萄糖补至 40–70 g/L, 发酵 32 h。

1.6 分析方法

取 1 mL 菌液稀释 20 倍, 使用酶标仪在吸收光波长 600 nm 条件下测定细胞浓度; 取菌液稀释适当倍数, 使用酶标仪在激发光波长 588 nm, 发射波长 645 nm 条件下测定荧光强度。比荧光强度的计算公式如(1)所示。

$$\text{比荧光强度} = \text{荧光强度} / OD_{600} \quad (1)$$

α -淀粉酶产量定量分析: 为了确定细胞中的 α -淀粉酶含量, 通过 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定可溶性淀粉释放的还原糖量^[16]。以 14 000 r/min 离心 5 min 收集 10 mL 谷氨酸棒杆菌细胞, 并用 PBS 清洗 1 次。菌体沉淀悬浮于 1 mL PBS, 4 °C 下 200 W 功率连续超声破碎 10 min, 破碎液 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液即为胞内粗酶液。向试管中加入 1.8 mL 1% 可溶性淀粉底物, 40 °C 水浴预热 5 min; 加入 0.2 mL 稀释后酶液, 迅速摇匀, 40 °C 精确反应 10 min; 立即加入 1.5 mL DNS 试剂终止反应, 沸水浴 5 min, 冷却后定容至 10 mL, 测 540 nm 处吸光值。对照组加 0.2 mL 酶液和 1.5 mL DNS 试剂(灭活酶), 再加 1.8 mL 底物, 其余步骤同粗酶液测量步骤(消除酶液中还原糖的干扰)。通过标准曲线计算酶活。发酵液的粗酶活的计算如公式(2)所示。

$$\text{酶活(U/mL)} = [(A_{\text{发酵液}} - A_{\text{对照组}}) \times K \times N] / (t \times V) \quad (2)$$

式中: $A_{\text{发酵液}}$ 为发酵液吸光度; $A_{\text{对照组}}$ 为对照组吸光度; K 为标准曲线斜率的倒数(mg/A); N 为粗酶液稀释倍数; t 为反应时间(10 min); V 为反应体系中加入的酶液体积(0.2 mL)。

番茄红素产量的定量分析: 番茄红素通过热盐酸法从培养细胞中提取^[17]。通过离心法以 14 000 r/min 收集 10 mL 谷氨酸棒杆菌细胞用 1 mol/L HCl 重悬菌体, 并通过沸腾破碎。执行常规程序: 煮沸 7 min, 冰敷 3 min, 煮沸 7 min, 冰敷 5 min。冰上冷却后, 破损细胞再次用三蒸水洗涤, 并通过 4 °C、5 000 r/min 离心 3 min 收集。加入适量丙酮(HPLC 级)并进行漩涡 5 min, 随后样品以 14 000 r/min 离心 10 min, 使用分光

光度计测量上清液 475 nm 处的吸光值。与番茄红素标准溶液比较, 定量提取物中的番茄红素含量。发酵液的番茄红素的计算如公式(3)所示。

$$\text{番茄红素含量}(\mu\text{g/mL}) = [(A_{\text{发酵液}} - b) \times N \times V_{\text{提取液}}] / (k \times V_{\text{发酵液}}) \quad (3)$$

式中: $A_{\text{发酵液}}$ 为发酵液吸光度; b 为标准曲线截距; N 为发酵液稀释倍数; $V_{\text{提取液}}$ 为提取液总体积(1 mL); k 为标准曲线斜率; $V_{\text{发酵液}}$ 为发酵液初始取样体积(10 mL)。

发酵过程中葡萄糖浓度和细胞浓度测定: 发酵液 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清稀释适当倍数, 通过生物传感器测定发酵液中葡萄糖浓度; 取发酵液稀释适当倍数, 使用分光光度计在波长 572 nm 条件下测定。

氨基酸检测: 取发酵上清液稀释一定倍数至 L-赖氨酸浓度在 0–1.0 g/L 之间, 通过高效液相色谱(HPLC)检测其浓度。HPLC 检测使用 Agilent ZORBA XSB-Aq (250 mm×4.6 mm×5 μm) 色谱柱。流动相 A 相: 0.01 mol/L KH_2PO_4 , KOH 调 pH 至 5.3; 流动相 B 相: 乙腈、甲醇和 A 相以 5:3:1 的比例混合, 乙酸调 pH 至 5.3。紫外检测器波长 254 nm, 柱温 35 °C, 流速为 1.0 mL/min, 梯度洗脱。

有机酸检测: 发酵液 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液稀释一定倍数至有机酸浓度在 0–1.0 g/L 之间, 通过 HPLC 检测浓度。使用 Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm×5 μm) 色谱柱; 流动相为 5 mmol/L 稀硫酸; 紫外检测器波长 210 nm, 柱温 55 °C, 流速为 0.6 mL/min。转化率的计算如公式(4)所示。

$$\text{转化率} = \text{L-赖氨酸浓度} \times \text{下罐体积} / \text{总消耗葡萄糖} \times 100\% \quad (4)$$

2 结果与讨论

2.1 计算机编程辅助中性位点的筛选

为筛选谷氨酸棒杆菌基因组中适用于异源基因稳定、高效整合表达的候选中性位点, 建立了中性位点计算机筛选平台 CgNSFinder (代码及可复现实验材料已上传至 GitHub, 链接: <https://github.com/LANNXXX/CgNSFinder>; 需在

Python 解释器环境中完成相关包安装后, 调用解释器执行目标代码), 该平台整合了基因组序列解析、基因注释信息提取、启发式规则过滤及结果统计分析等功能。向 CgNSFinder 平台输入谷氨酸棒杆菌全基因组 FASTA 文件(GCF_000011325.1_ASM1132v1_genomic.fna), 该文件用于构建 contig 坐标系、提取候选位点的侧翼序列并计算其序列组成特征及 CDS 注释 FASTA 文件(cds_from_genomic.fna), 该文件用于解析基因的基因组位置、转录链方向及功能描述, 为邻域关系判断与候选条目标注提供支撑, 通过串行启发式规则逐层筛选收敛, 实现从基因组序列到候选中性位点的自动化筛选(图 1): (1) 筛选注释为假定蛋白(hypothetical protein)的基因区域, 锁定功能未知的非关键基因组区域; (2) 要求候选位点至少一侧相邻基因为假定蛋白, 规避整合位点顺式调控对功能基因表达的干扰, 降低整合引发的菌株表型偏移风险; (3) 设置区域筛选约束长度为 500–1 500 bp (默认阈值), 该阈值基于工业菌株整合位点相关研究数据归纳确定, 兼顾异源片段插入效率与基因组区域稳定性^[18-22]; (4) 要求候选位点侧翼 1 000 bp 序列的 G+C 含量为 40.0%–60.0%, 该阈值依据谷氨酸棒杆菌全基因组平均 G+C 含量(54.2±10)%的

波动范围设定。经上述多层过滤, 共获得 96 个能同时满足注释类型、邻域特征、长度及序列组成要求的候选中性整合位点, 输出信息包含基因组坐标、转录方向及侧翼序列 G+C 含量统计数据(已上传至 ScienceDB, 编号为 31253.11.sciencedb.j00231.00056)。以 *dnaA* 基因为基因组起始位点, 将候选中性位点按基因组位置等距离分区(图 2), 各区域筛选结果为: 1 区 8 个、2 区 5 个、3 区 8 个、4 区 56 个、5 区 13 个、6 区 6 个。

2.2 候选中性位点的实验表征与筛选

为对计算机预测的候选中性位点进行筛选与表征, 本研究构建了一个含 P_{uf} 、报告基因 *mKate* 及 T_{rnnB} 的报告基因表达盒(图 2A), 在候选中性位点敲入该表达盒后对敲入菌株的生长曲线、整合效率以及荧光信号强度进行测定, 以评估候选中性位点对菌株生长的影响、整合效率及敲入报告基因的表达活性。

为研究基因组位置对中性位点表达的影响, 根据 96 个候选位点在基因组 6 个分区的分布比例进行随机选取, 保证各分区被选位点占比与筛选结果一致(表 1), 以检测不同基因组位置候选中性位点的整合效率、细胞生长和表达强度的影响。如图 2C 所示, 在 24 个候选位点中,

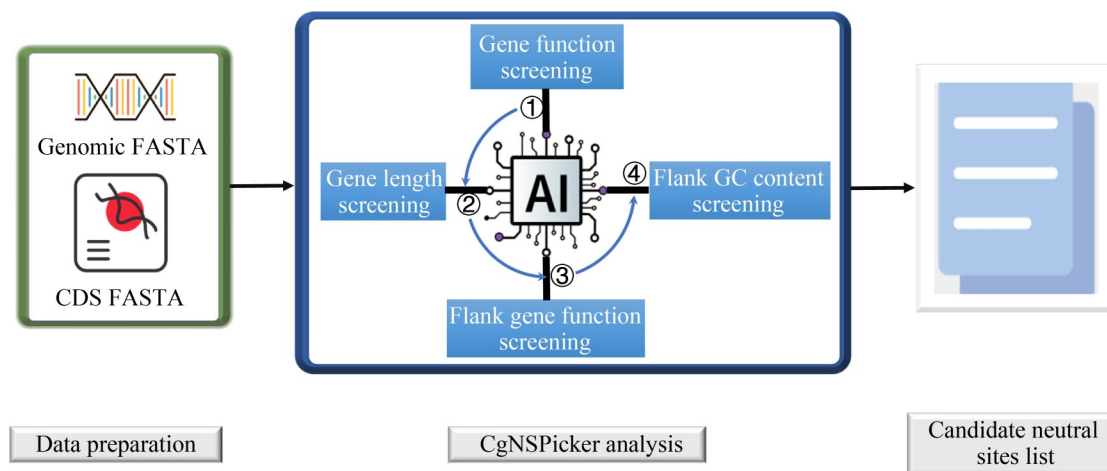


图1 基于计算机平台的谷氨酸棒杆菌中性位点的筛选流程

Figure 1 Screening workflow of neutral sites in *Corynebacterium glutamicum* based on computational platform.

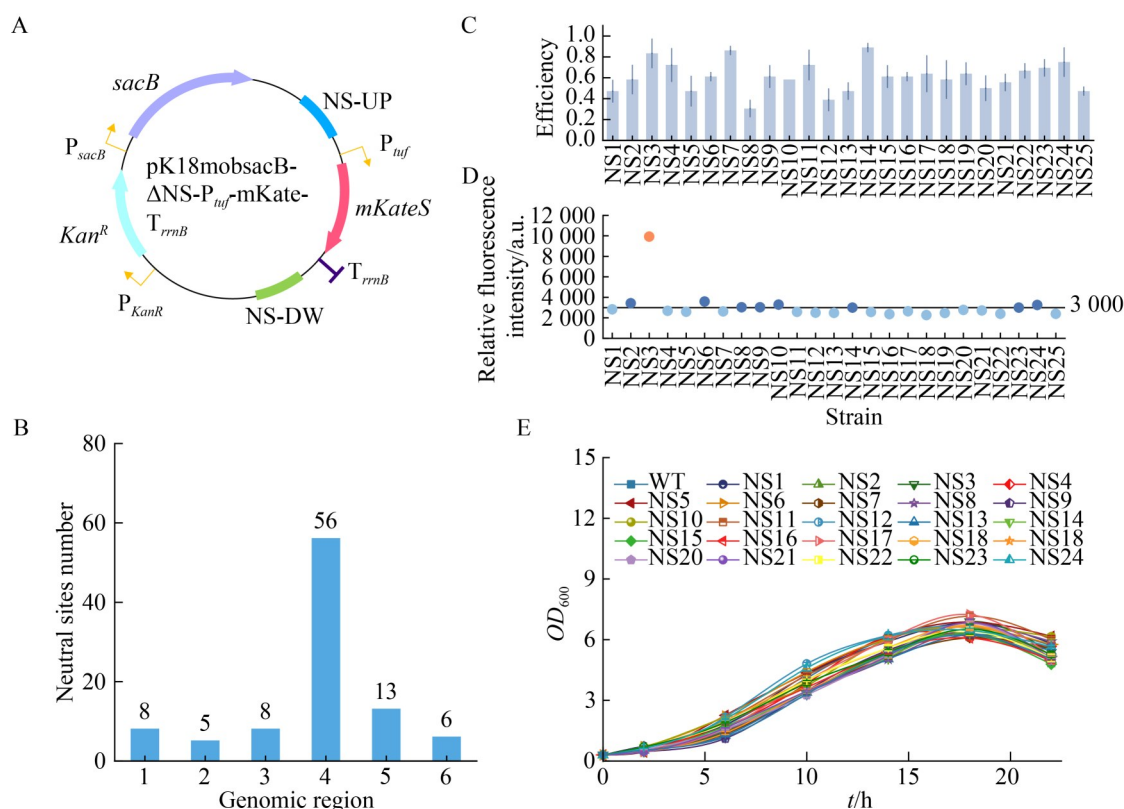


图2 候选中性位点的基因组分布及敲入菌株构建示意图

Figure 2 Genomic distribution of candidate neutral sites and schematic diagram of knock-in strain construction. A: Schematic diagram of reporter gene expression cassette; B: Genomic distribution of 24 candidate neutral sites; C: Double exchange positive rate of candidate neutral sites ($n=3$, SEM/SD); D: Relative fluorescence intensity of reporter gene expression at different candidate neutral sites in *Corynebacterium glutamicum* ($n=3$, SEM/SD); E: Maximum bacterial concentration (OD_{600}) of knock-in strains and wild-type strain ($n=3$, SEM/SD).

19 个双交换阳性率 $>50\%$ ，其中 6 个超过 75%，这个结果表明多数候选位点具备较高的整合适用性。所有敲入菌株均培养至 22 h (稳定期)，测定最大菌体浓度(OD_{600})。野生型菌株的 $OD_{600}=6.63\pm0.14$ ，所有敲入菌株 OD_{600} 均在 6.0–7.25 之间，所有敲入菌株与野生型菌株的生长差异小于 10% (图 2E)。因此所选中性位点对菌株的生长不构成影响，同时排除了生长相关因素对荧光测量的干扰。

通过对报告基因荧光强度测定进行分析(图 3C)，24 个位点中位于第三区域的 NS3 位点比荧光强度最高为($9\,922\pm217$) a.u.，位于第二区域 NS18 位点最低为($2\,269\pm86$) a.u.，荧光表达强度差

异达到 4.37 倍，其余位点均介于 2 400–3 500 a.u. 之间。虽然不同位点之间的表达强度存在差异，但大多数中性位点的表达强度相对一致，这个结果表明不同基因组位置对中性位点的表达活性影响较小。

在培养基中分别添加 1 $\mu\text{g/mL}$ 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (半抑制浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$) 的新生霉素，研究不同 DNA 负超螺旋程度对中性位点荧光表达强度和最大菌体浓度(22 h)的影响。以整合位点 *cgl1787* 作为阳性对照，野生型菌株(WT)作为阴性对照。通过荧光表达强度对中性位点插入基因的表达活性进行分析发现，DNA 负超螺旋程度降低通常会提高大多数中性位点的比荧光强度^[23]。所

表1 实验表征候选中性位点信息

Table 1 Experimental characterization of candidate neutral site information ($n=3$, SEM/SD)

Neutral site	Serial number	Integration efficiency/%	Fluorescence signal intensity/a.u.
CGL RS15570	NS1	83.33	2 828±79
CGL RS01760	NS2	58.33	3 416±59
CGL RS03085	NS3	88.89	9 921±117
CGL RS06795	NS4	69.44	2 675±126
CGL RS07375	NS5	63.89	2 592±90
CGL RS08395	NS6	61.11	3 594±152
CGL RS08425	NS7	72.22	2 627±141
CGL RS08555	NS8	30.56	3 023±22
CGL RS08770	NS9	61.11	3 032±209
CGL RS08775	NS10	58.33	3 286±190
CGL RS08920	NS11	86.11	2 579±98
CGL RS08965	NS12	91.67	2 506±41
CGL RS09045	NS13	72.22	2 478±163
CGL RS09110	NS14	58.33	2 991±101
CGL RS15680	NS15	47.22	2 570±56
CGL RS09215	NS16	38.89	2 353±139
CGL RS09220	NS17	77.78	2 635±26
CGL RS09255	NS18	47.22	2 269±86
CGL RS09260	NS19	36.11	2 464±23
CGL RS10525	NS20	50.00	2 765±77
CGL RS11375	NS21	55.56	2 710±86
CGL RS12030	NS22	61.11	2 389±32
CGL RS12035	NS23	69.44	2 989±91
CGL RS13560	NS24	75.00	3 257±63

有中性位点敲入菌株(如 NS1、NS3、NS9)在 1 $\mu\text{g/mL}$ 新生霉素时荧光强度均显著增加, 荧光表达强度相较于无新生霉素组提高了 32%; 在 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 新生霉素时, 部分菌株的荧光强度开始呈下降趋势(如 NS1、NS8、NS9), 与无新生霉素组相比, 荧光表达强度上升了 17.72%; 与 1 $\mu\text{g/mL}$ 新生霉素组相比则下降了 46.00% (图 3A、3B)。上述结果表明谷氨酸棒杆菌的中性位点表达水平与染色体超螺旋程度相关: 低浓度新生霉素使部分 DNA 处于松弛结构但对菌株的生长造成较小的影响, 从而增强这些位点的表达活性; 随着新生霉素浓度的提高, 负超螺旋程度进一步降低, 菌株生长受到明显抑制, 需

要消耗更多的资源以维持细胞生长, 因此中性位点的表达量开始出现明显的下降。

添加新生霉素显著降低了所有敲入菌株的 OD_{600} (图 3C), 如 NS1 和 NS6 位点, 在 1 $\mu\text{g/mL}$ 新生霉素条件下菌株 OD_{600} 下降了 20.3% 和 40.3%; 在 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 新生霉素条件下菌株 OD_{600} 分别下降了 18.2% 和 30.1%, 这与 DNA 旋转酶在维持染色体结构以实现正常复制和调控生长中的关键作用一致。同时发现这一生长抑制呈剂量依赖性, 在 1 $\mu\text{g/mL}$ 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 新生霉素条件下菌株 22 h 时的平均 OD_{600} 值分别由 5.71 ± 0.06 下降到 4.47 ± 0.04 和 3.79 ± 0.04 , 进一步证实了即使低于 IC_{50} 浓度的新生霉素也会

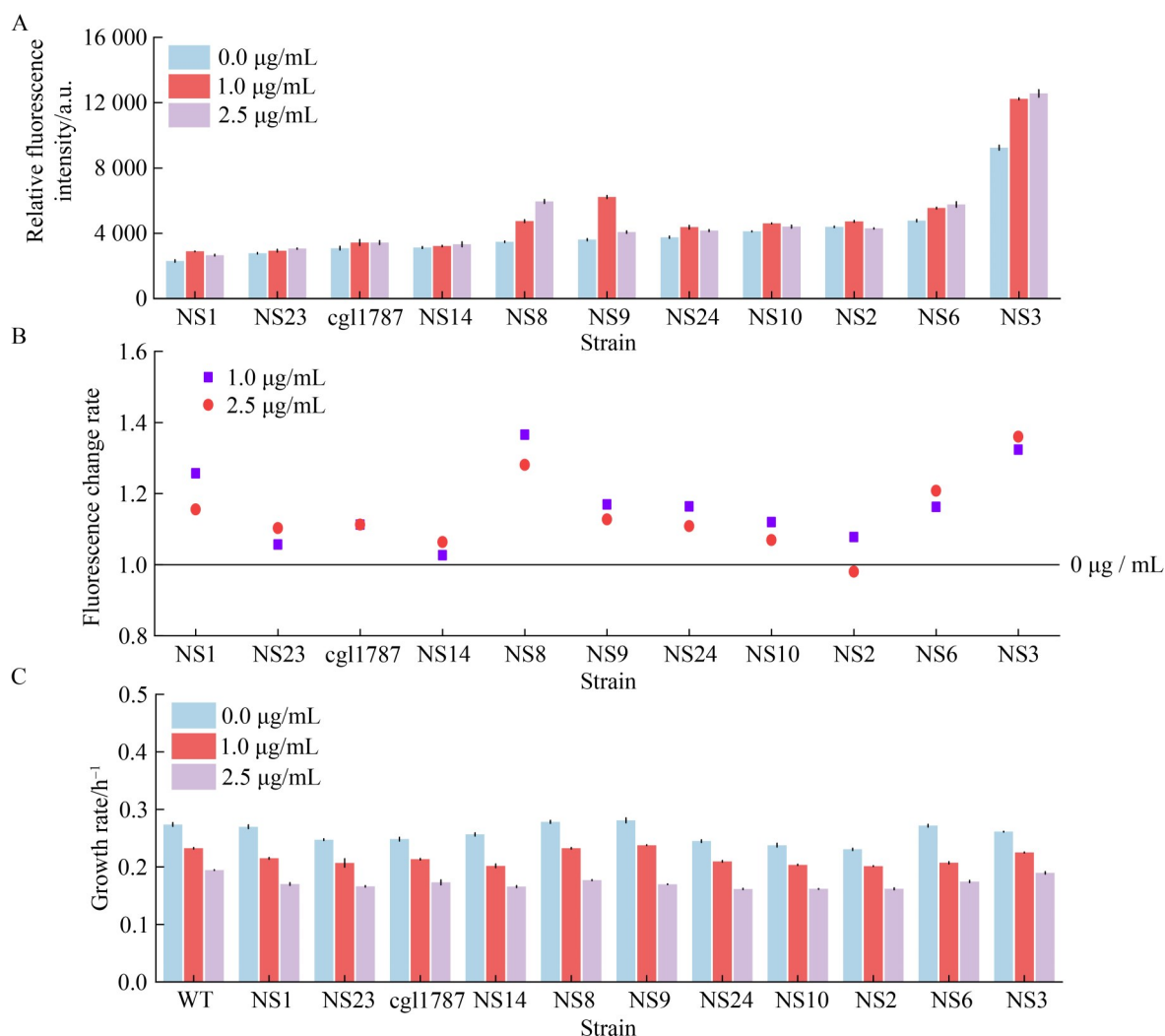


图3 基因组结构对中性位点报告基因的表达强度及生长速率的影响

Figure 3 Effects of genomic architecture on the expression activity of reporter gene at neutral sites and bacterial growth rate. A: Specific fluorescence intensity of candidate neutral locus knock-in strains treated with different concentrations of novobiocin (22 h) ($n=3$, SEM/SD); B: Fold change in specific fluorescence intensity of candidate neutral locus knock-in strains cultured with different concentrations of novobiocin (22 h); C: Growth rate of candidate neutral locus knock-in strains under different novobiocin concentration culture conditions (22 h) ($n=3$, SEM/SD).

给谷氨酸棒杆菌带来生长负担。重要的是，在2种新生霉素浓度下，报告基因整合保持良好的稳定性，表明尽管存在拓扑压力，中性位点整合仍具有良好的遗传稳定性。

为了研究代谢压力对插入候选中性位点的基因表达活性和稳定性影响，将高拷贝质粒

pECXK-99E 导入候选中性位点敲入菌株中，并测定了含质粒和不含质粒条件下的细胞生长速率和荧光表达强度(图4)，以野生型菌株(WT)作为阴性对照，*cgl1787* 敲入菌株作为阳性对照。在不导入负担质粒的培养条件下所有菌株生长速率均在 $0.3\text{--}0.37\text{ h}^{-1}$ 之间；而在导入负担质粒

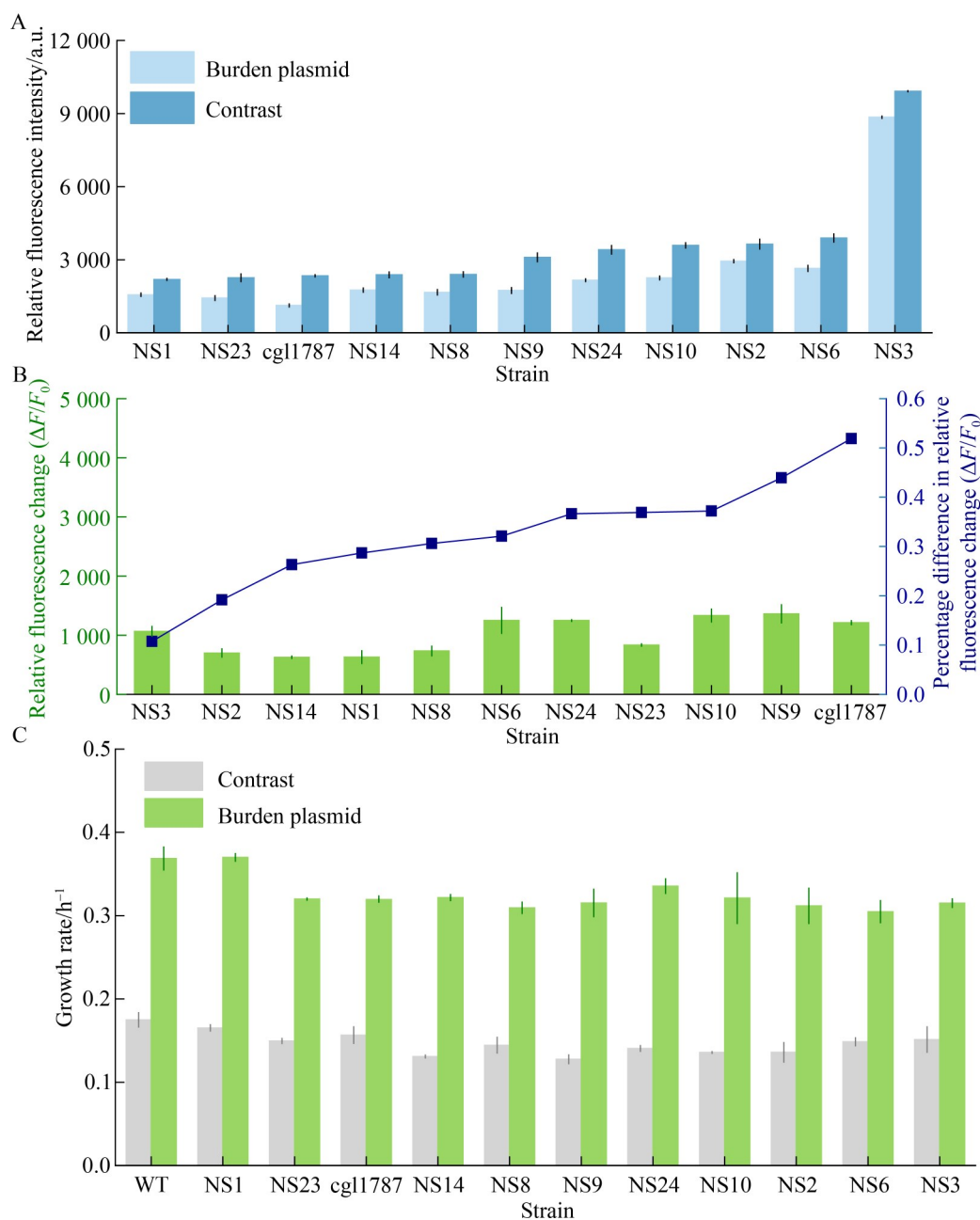


图4 代谢压力对中性位点报告基因的表达活性及生长速率的影响

Figure 4 Metabolic stress modulates reporter gene expression activity and growth rate at neutral integration sites. A: Fluorescence expression intensity of strains with reporter gene knock-in at candidate neutral sites following introduction of the burden plasmid pECXK-99E ($n=3$, SEM/SD); B: Fold change and percentage change in fluorescence intensity of the above strains cultured with the burden plasmid pECXK-99E ($n=3$, SEM/SD); C: Growth rates of the above strains in the blank control group and the plasmid-introduced group ($n=3$, SEM/SD).

的条件下, 菌株的生长速率下降到 $0.13\text{--}0.18\text{ h}^{-1}$ 之间, 下降幅度大于 50% (图 4C), 这一结果证

实了高拷贝质粒给细胞生长带来严重的代谢负担^[24], 这种影响也体现在菌株荧光表达强度的

变化中;当存在负担质粒时,阳性对照菌株比荧光强度下降了 39.5% [从(7 087±42) a.u. 降至 (5 131±62) a.u.],中性位点敲入菌株的比荧光强度波动值均在 12%–37% 之间,小于阳性对照菌株中观察到的波动(图 4A、4B)。上述结果表明,在面临极大的代谢负担压力下虽然所选的中性位点不会破坏宿主的基础代谢,但其转录活性仍受全局基因组调控网络和细胞代谢状态的间接调控。

为研究不同碳源对中性位点敲入菌株生长和荧光强度的影响,根据 24 个已表征位点的整合效率、表达强度差异,选取高、中、低表达水平且分布于不同基因组分区的 10 个中性位点敲入菌株分别在以葡萄糖、蔗糖和 D-山梨醇为碳源的培养基中进行培养,结果如图 5 所示。在不同碳源条件下,所有敲入菌株与野生型(WT)的生长速率无显著差异(图 5C)。其中 6 个敲入菌株在蔗糖中的生长速率最高为 0.23–0.3 h⁻¹、葡萄糖中的生长速率在 0.23–0.28 h⁻¹之间、山梨醇中的生长速率为 0.19–0.25 h⁻¹。以山梨醇为单一碳源时,所有菌株的比荧光强度普遍较高,为 6 000–12 000 a.u. (图 5A),最高为(11 450±270) a.u. (NS3),且不同菌株间差异相对较小。以葡萄糖为单一碳源时比荧光强度与山梨醇接近,在 6 000–12 000 a.u. 之间;而在以蔗糖为单一碳源时比荧光强度最低,在 4 000–8 000 a.u. 之间。以葡萄糖组的比荧光强度值为对照,进行归一化处理比较(图 5B),其中 7 个敲入菌株在山梨醇中具有最高的比荧光强度,在蔗糖中则相反,但菌株之间的差异在不同碳源条件下未现显著波动。这一结果表明葡萄糖作为偏好碳源能使报告基因表达和细胞适应性均达到最优状态。

2.3 功能性基因/基因簇的基因组整合及基因容量测试

本研究选择了枯草芽孢杆菌来源的淀粉酶合成基因以及草生欧文氏杆菌来源的番茄红素

合成基因簇以系统评估中性位点的异源表达能力和基因容量^[25–27]。以谷氨酸棒杆菌野生型为出发菌株,在转化效率高的中性位点 NS3、NS12、NS19 和 NS24 上利用 *P_{uff}* 调控 *Amy* 基因表达,构建出菌株 c-Amy1–4。测定这些菌株的酶活,发现 4 个重组菌株的淀粉酶活性存在位点差异,其中 NS3 位点(菌株 c-Amy1)淀粉酶活性为 1.37 IU/mL,其余位点的淀粉酶活性分别为 0.88、0.65、0.45 IU/mL;为进一步挖掘中性位点的表达潜力,以 c-Amy1–4 为基础,在各菌株的原中性位点处通过同源重组依次增加 2 个拷贝的 *P_{uff}-Amy* 表达单元,构建得到多拷贝重组菌株 c-Amy5–12。酶活测定结果显示,多拷贝整合后淀粉酶活性显著提升,其中最高酶活达到 2.14 IU/mL,比单拷贝菌株 c-Amy1 提高了 51.1%。

选取番茄红素编码基因簇 *crtBIE* 评估异源功能基因簇在谷氨酸棒杆菌中的表达情况,结果如图 6B 所示,(1)选择 *P_{uff}* 在菌株 cgl-13032 的 NS3、NS12、NS19 和 NS24 位点表达番茄红素编码基因簇 *crtBIE*,得到菌株 c-Ly1–4;(2) 4 个菌株的番茄红素产量分别为 18.4、16.7、10.2、9.9 mg/L;(3)进一步选择 *P_{uff}* 在菌株 cgl-13032 的 NS3、NS6、NS2 和 NS10 位点依次增加 2 个拷贝的番茄红素合成基因簇 *crtBIE*,构建菌株 c-Ly5–12,番茄红素产量最高达到 48.4 mg/L。上述结果表明,随机选择的中性位点能有效用于异源功能基因簇的表达。

2.4 谷氨酸棒杆菌赖氨酸细胞工厂的构建

为系统评估中性位点在 L-赖氨酸细胞工厂构建中的应用效能,本研究以谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 为底盘菌株,采用代谢工程逐步改造 L-赖氨酸合成代谢途径^[28],构建系列重组菌株。如图 7 所示,(1)主合成路径强化:在菌株 cgl-13032 的 NS1 和 NS2 位点分别增加一个拷贝 *lysC*^{T311L-G1A} 和 *hom*^{V59A} 突变基因,构建菌株

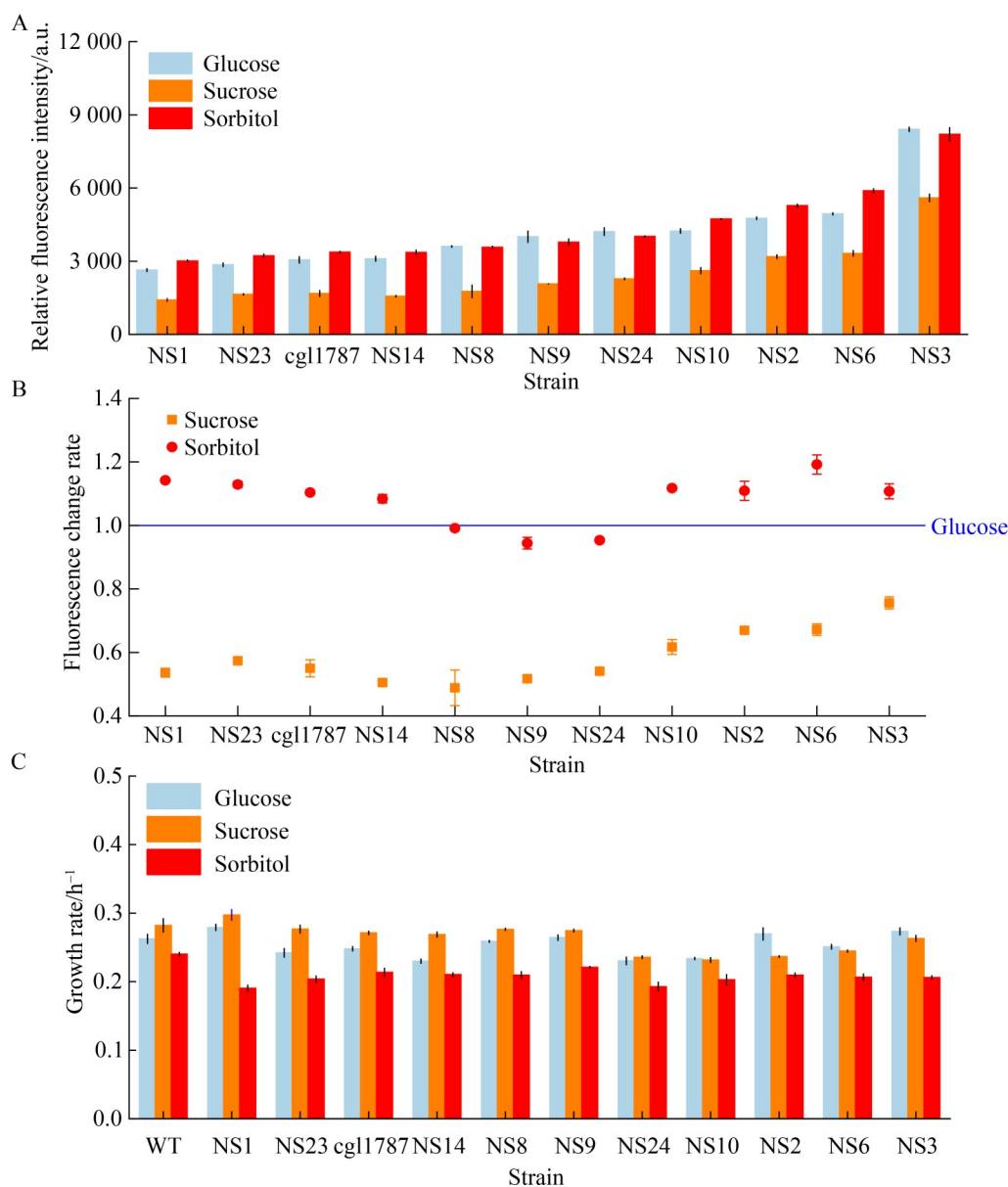


图5 不同碳源对中性位点敲入菌株的表达活性及生长速率的影响

Figure 5 Effects of different carbon sources on the expression activity and growth rate of neutral site-knockin strains. A: Specific fluorescence intensity of candidate neutral site-knockin strains cultured under different carbon source conditions (22 h) ($n=3$, SEM/SD); B: Relative percentage of specific fluorescence intensity normalized with sucrose and sorbitol as carbon sources, with the specific fluorescence intensity of candidate neutral site-knockin strains using glucose as carbon source set as 100% ($n=3$, SEM/SD); C: Growth rate of candidate neutral site-knockin strains cultured under different carbon source conditions (22 h) ($n=3$, SEM/SD).

D101; 在菌株 D101 的 NS5 和 NS12 位点分别增加一个拷贝的 *lysC*^{T311I-G1A}-*asd-aspB* 基因簇和

dapA-dapB 基因簇^[29], 构建菌株 D102; 在菌株 D102 的 NS10 位点增加一个拷贝的 *ddh* 基因,

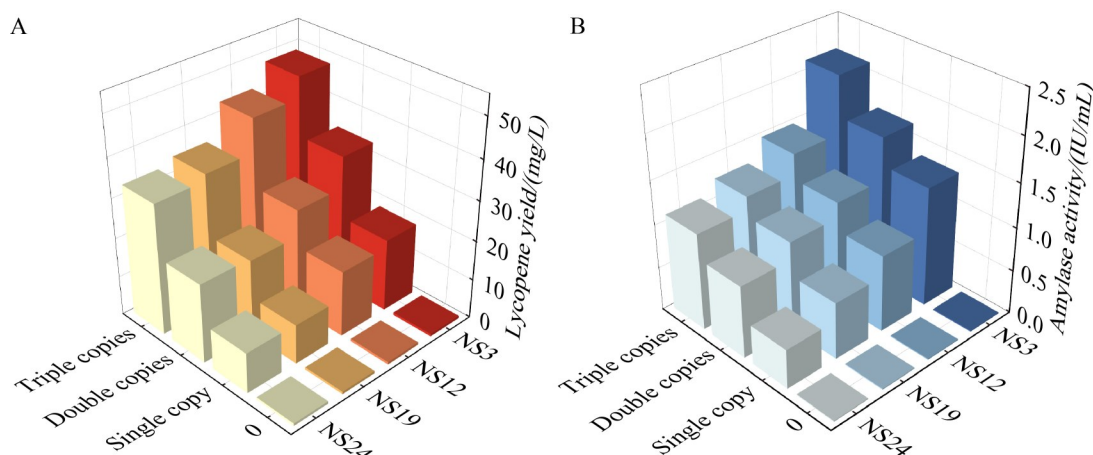


图6 中性位点功能基因表达情况及基因容量测试

Figure 6 Functional gene expression and gene capacity test at neutral sites. A: Expression of amylase gene knocked in at neutral sites with different copy numbers; B: Expression of lycopene synthesis gene cluster knocked in at neutral sites with different copy numbers.

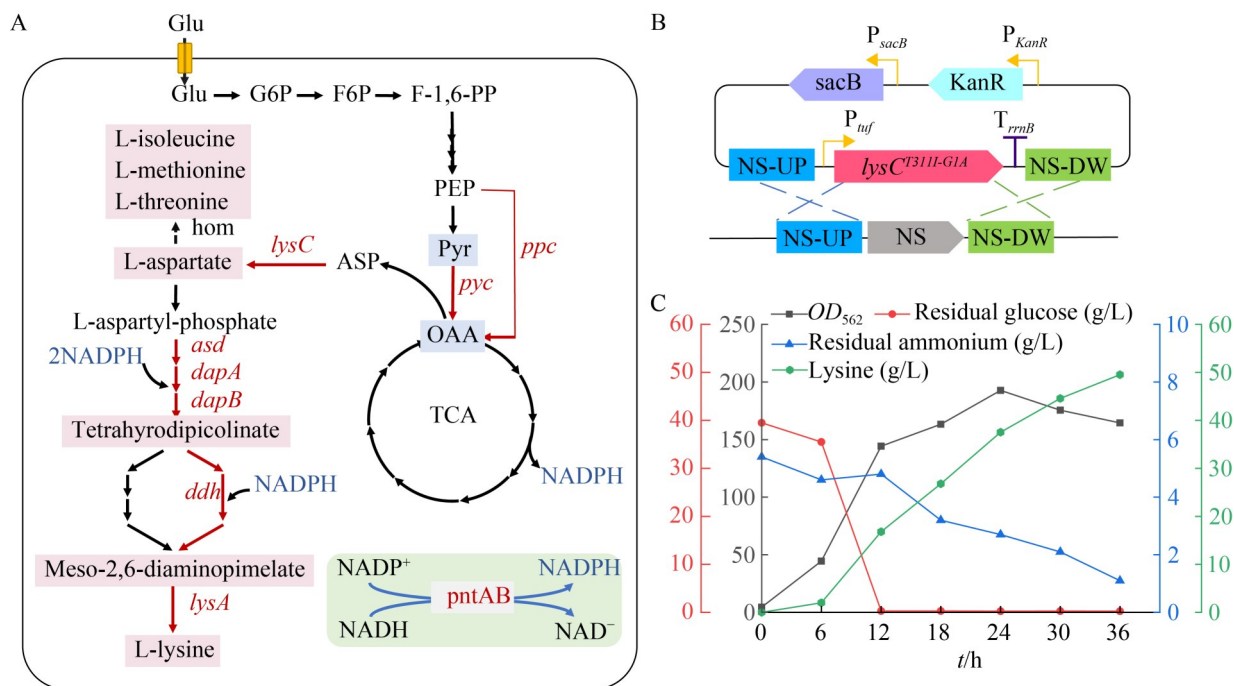


图7 谷氨酸棒杆菌L-赖氨酸细胞工厂的构建

Figure 7 Construction of *Corynebacterium glutamicum* L-lysine cell factory. A: Metabolic pathway diagram of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*; B: Schematic diagram of L-lysine-producing strain construction; C: Lysine production data from 5 L fermenter fermentation.

并且在 NS6 位点增加一个拷贝的 *lysA* 基因^[30], 构建菌株 D103。(2) 前体供应强化: 在菌株

D103 的 NS8 位点增加一个拷贝的 *ppc*^{A482V} 基因, 构建菌株 D201; 在菌株 D201 的 NS9 位点

增加一个拷贝的 *pyc*^{P458S-G1A} 基因, 构建菌株 D202。(3) 辅因子供应强化: 在菌株 D202 的基础上在 NS7 位点整合大肠杆菌来源的 *pntAB* 基因簇^[31], 构建菌株 D301。在 5 L 发酵罐中, 菌株 D301 中 L-赖氨酸产量、转化率及生产强度分别为 49.51 g/L、14.25 g/g 和 1.53 g/(L·h) (图 7)。上述结果表明, 通过中性位点定向整合策略实现了 L-赖氨酸合成路径关键基因、前体供应基因及辅因子再生基因的精准调控与稳定表达, 成功构建了高效稳定的 L-赖氨酸生产菌株 D301。

3 结论

针对谷氨酸棒杆菌基因组高 G+C 含量及基因间隔区较短的结构特点, 本研究开发了计算机辅助筛选工具 CgNSFinder, 旨在系统性地识别基因组中可用于异源基因整合的中性位点^[32], 以解决传统遗传工程中整合位点资源稀缺及随机整合效率低下的关键问题。通过该工具, 本研究成功筛选出 96 个候选中性位点, 并对其中的 24 个进行了实验验证, 最终获得 19 个整合效率超过 50% 的位点。在此基础上, 将淀粉酶基因、番茄红素合成基因簇及赖氨酸合成关键基因分别整合至上述中性位点, 均实现了目标产物的高效合成。特别是构建的 L-赖氨酸生产菌株 D301, 在 5 L 发酵罐中经 36 h 发酵, 产量达到 49.51 g/L, 底物转化率为 14.25 g/g, 生产强度为 1.53 g/(L·h), 充分证明了这些中性位点在工业菌株构建中的巨大潜力。

作者贡献声明

丁晴: 研究构思、实验设计、实验执行、数据采集与分析、论文初稿撰写; 林海天: 数据处理, 统计分析, 生物信息学分析、论文审阅; 盛琦: 指导实验、审核方案、监督研究进展; 黄铭: 实验验证、结果验证; 薛正莲: 方案审核、指导实验; 赵欣雨: 实验执行、调研、数据采集; 邓赵红: 项目管理、协调; 刘立明: 研究指导、方案审核、论文修订与定

稿、项目管理与经费获取。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Wendisch VF, Jorge JMP, Pérez-García F, Sgobba E. Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 32(6): 105.
- [2] Lee JY, Na YA, Kim E, Lee HS, Kim P. The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(5): 807-822.
- [3] Wang MM, Shi Z, Gao N, Zhou YY, Ni XM, Chen JZ, Liu J, Zhou WJ, Guo X, Xin B, Shen YB, Wang Y, Zheng P, Sun JB. Sustainable and high-level microbial production of plant hemoglobin in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 80.
- [4] Becker J, Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production-the heartbeat of industrial strain development[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(5): 718-726.
- [5] Becker J, Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels-*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(4): 631-640.
- [6] Li N, Zeng WZ, Xu S, Zhou JW. Obtaining a series of native gradient promoter-5'-UTR sequences in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 120.
- [7] Zhang MY, Song J, Xiao J, Jin JJ, Nomura CT, Chen SW, Wang Q. Engineered multiple translation initiation sites: a novel tool to enhance protein production in *Bacillus licheniformis* and other industrially relevant bacteria[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(20): 11979-11990.
- [8] Ng AH, Berla BM, Pakrasi HB. Fine-tuning of photoautotrophic protein production by combining promoters and neutral sites in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. strain PCC 6803[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(19): 6857-6863.
- [9] Shrestha D, Bag A, Wu RQ, Zhang YT, Tang X, Qi Q, Xing JC, Cheng Y. Genomics and epigenetics guided identification of tissue-specific genomic safe harbors[J]. Genome Biology, 2022, 23(1): 199.
- [10] Babaei M, Sartori L, Karpukhin A, Abashkin D, Matrosova E, Borodina I. Expansion of EasyClone-MarkerFree toolkit for *Saccharomyces cerevisiae* genome with new integration sites[J]. FEMS Yeast Research, 2021, 21(4): foab027.
- [11] Goormans AR, Snoeck N, Decadt H, Vermeulen K, Peters G, Coussement P, Van Herpe D, Beauprez JJ, De Maeseneire SL, Soetaert WK. Comprehensive study on *Escherichia coli* genomic expression: Does position

- really matter?[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 10-19.
- [12] Zhou X, Feng RX, Ding NN, Cao WY, Liu Y, Zhou SH, Deng Y. Deep learning guided programmable design of *Escherichia coli* core promoters from sequence architecture to strength control[J]. *Nucleic Acids Research*, 2025, 53(16): gkaf863.
- [13] Chu RY, Wang ZH, Liu J, Hu GP, Liu LM, Li XM, Gao C. Metabolic engineering of plasmid-free *Escherichia coli* for enhanced glutarate biosynthesis from glucose[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 513: 163077.
- [14] Xu H, Shi LY, Boob AG, Park W, Tan SI, Tran VG, Schultz JC, Zhao HM. Discovery, characterization, and application of chromosomal integration sites for stable heterologous gene expression in *Rhodotorula toruloides*[J]. *Metabolic Engineering*, 2025, 89: 22-32.
- [15] Köbbing S, Lechtenberg T, Wynands B, Blank LM, Wierckx N. Reliable genomic integration sites in *Pseudomonas putida* identified by two-dimensional transcriptome analysis[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(7): 2060-2072.
- [16] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [17] Hong J, Park SH, Kim S, Kim SW, Hahn JS. Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by enzyme engineering and increasing membrane flexibility and NADPH production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(1): 211-223.
- [18] Ghiffary MR, Prabowo CPS, Adidjaja JJ, Lee SY, Kim HU. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the efficient production of β -alanine[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 74: 121-129.
- [19] Kallscheuer N, Marienhagen J. *Corynebacterium glutamicum* as platform for the production of hydroxybenzoic acids[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 70.
- [20] Ma YC, Chen QX, Cui Y, Du LH, Shi T, Xu QY, Ma Q, Xie XX, Chen N. Comparative genomic and genetic functional analysis of industrial L-leucine- and L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum* strains[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 28(11): 1916-1927.
- [21] Schwarzmann LS, Wu T, Dransfeld AK, Lindner SN, Wendisch VF. Formamide-based production of amines by metabolically engineering *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(13): 4245-4260.
- [22] Zhang J, Qian FH, Dong F, Wang QZ, Yang JJ, Jiang Y, Yang S. *De novo* engineering of *Corynebacterium glutamicum* for l-proline production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(7): 1897-1906.
- [23] Bryant JA, Sellars LE, Busby SJ, Lee DJ. Chromosome position effects on gene expression in *Escherichia coli* K-12[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(18): 11383-11392.
- [24] Mao JW, Zhang HY, Chen Y, Wei L, Liu J, Nielsen J, Chen Y, Xu N. Relieving metabolic burden to improve robustness and bioproduction by industrial microorganisms[J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 74: 108401.
- [25] 姚文娟, 范文俊, 许小乐, 张伟, 邓小昭. 基于谷氨酸棒杆菌 NCg11221 蛋白的新型细菌表面展示系统[J]. *微生物学报*, 2012, 52(2): 177-183.
- Yao WJ, Fan WJ, Xu XL, Zhang W, Deng XZ. A novel bacterial cell-surface display system based on NCg11221 from *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(2): 177-183 (in Chinese).
- [26] 张悦, 张继伟, 吴硕, 徐宁, 刘君, 魏亮. 谷氨酸棒杆菌人工核糖体结合位点(RBS)文库的建立与应用[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(23): 25-32.
- Zhang Y, Zhang JW, Wu S, Xu N, Liu J, Wei L. Construction and application of an artificial ribosomal binding site (RBS) library in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(23): 25-32 (in Chinese).
- [27] Zhan ZM, Chen X, Ye ZF, Zhao M, Li C, Gao SP, Sinskey AJ, Yao L, Dai J, Jiang YM, Zheng XY. Expanding the CRISPR toolbox for engineering lycopene biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(4): 803.
- [28] Xu JZ, Zhang JL, Guo YF, Zhang WG. Genetically modifying aspartate aminotransferase and aspartate ammonia-lyase affects metabolite accumulation in l-lysine producing strain derived from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 113: 82-89.
- [29] Xu JZ, Wu ZH, Gao SJ, Zhang WG. Rational modification of tricarboxylic acid cycle for improving L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 105.
- [30] Hoffmann SL, Kohlstedt M, Jungmann L, Hutter M, Poblete-Castro I, Becker J, Wittmann C. Cascaded valorization of brown seaweed to produce l-lysine and value-added products using *Corynebacterium glutamicum* streamlined by systems metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67: 293-307.
- [31] Xu JZ, Ruan HZ, Chen XL, Zhang F, Zhang WG. Equilibrium of the intracellular redox state for improving cell growth and l-lysine yield of *Corynebacterium glutamicum* by optimal cofactor swapping[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 65.
- [32] Kong SJ, Yu W, Gao N, Zhai XX, Zhou YJ. Expanding the neutral sites for integrated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2022, 369(1): fnac081.