核苷产生菌代谢工程改造的研究进展

周 璐[1]，闫更轩[1]，张云志[2]，刘春燕[2]，刘禹彤[3]，
任洪发[4]，张淑梅[1]，于 冲[1]，田 缘[1*]

（1. 黑龙江省科学院 微生物研究所，黑龙江 哈尔滨 150010；2. 黑龙江省科学院，黑龙江 哈尔滨 150001；
3. 黑龙江农业工程职业学院，黑龙江 哈尔滨 150088；4. 肇东星湖生物科技有限公司，黑龙江 绥化 151199）

摘 要 核苷作为核酸分子的基本结构单元和重要的生物调控因子，在医药、食品和化工等多个领域展现出广泛的应用价值。核苷的生物合成途径主要包括从头合成途径和补救合成途径。近年来，随着合成生物学和代谢工程技术的飞速发展，通过对核苷产生菌进行代谢调控解除、关键酶表达强化以及竞争与降解途径阻断等策略的应用，显著提升了核苷的生产效率。然而，核苷的高效生物合成仍面临前体供应不足、反馈抑制、代谢流分配不均以及潜在毒性产物积累等多重挑战。本文系统综述了核苷的生物合成途径，重点梳理了代谢工程技术在改造嘌呤核苷（腺苷、鸟苷、肌苷）和嘧啶核苷（胞苷、尿苷、胸苷）产生菌方面的最新研究进展，深入探讨了基因编辑（如 CRISPR/Cas 系统）、动态调控、启动子工程和外排蛋白改造等先进策略，以及优化核苷合成途径、提升代谢通量、增强产物积累所取得的最新成果。同时对核苷生物合成的调控机制进行了剖析，并针对当前面临的瓶颈问题，提出了未来的研究方向和技术展望，旨在为高效核苷工程菌株的开发提供理论指导和策略参考，以期加速其工业化进程，满足日益增长的多元化产业需求。

关键词 嘌呤核苷；嘧啶核苷；合成途径；代谢调控；菌株改造

中图分类号 Q939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1005－7021(2026)04－0103－12

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2026.04.009

Research Progress on the Metabolic Engineering Modification of Nucleoside-Producing Bacteria

ZHOU Lu[1], YAN Geng-xuan[1], ZHANG Yun-zhi[2], LIU Chun-yan[2], LIU Yu-tong[3], REN Hong-fa[4], ZHANG Shu-mei[1], YU Chong[1], TIAN Yuan[1*]

(1. *Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin* 150010;
2. *Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin* 150001; 3. *Heilongjiang Agricultural Engineering Vocational College, Harbin* 150088;
4. *Zhaodong Xinghu Biotechnology Co., Ltd., Suihua* 151199)

Abstract Nucleosides, as the basic structural units of nucleic acid molecules and important biological regulatory factors, have demonstrated extensive application value in multiple fields such as medicine, food, and chemical engineering. Nucleosides' biosynthesis mainly take place through two pathways of *de novo* synthesis and salvage synthesis. In recent years, with the rapid development of synthetic biology and metabolic engineering technologies, the production efficiency of nucleosides has been significantly improved through strategies such as relief the metabolic regulation of nucleoside-producing bacteria, enhancement of key enzyme expression, and blocking of competitive and degradation pathways. However, the efficient biosynthesis of nucleosides still faces multiple challenges such as insufficient supply of precursors, feedback inhibition, uneven distribution of metabolic flow, and accumulation of potentially toxic products. This article systematically reviews the biosynthetic pathways of nucleosides and focuses on sorting out the latest

基金项目：黑龙江省重点研发计划项目（2022ZX02C10）

作者简介：周璐 女，研究实习员，硕士。研究方向为生物学。E-mail：154399341@qq.com

* 通讯作者。女，助理研究员，硕士。研究方向为微生物源功能食品。E-mail：1850851708@qq.com

收稿日期：2025-11-17

research progress on metabolic engineering technology in modifying purine nucleoside (adenosine, guanosine, inosine) and pyrimidine nucleoside (cytidine, uridine, thymidine)-producing bacteria. The article delves deeply into the latest achievements in optimizing nucleoside synthesis pathways, enhancing metabolic fluxes, and increasing product accumulation through advanced strategies such as gene editing (like CRISPR/Cas systems), dynamic regulation, promoter engineering, and efflux protein modification. In addition, this paper also analyzes the regulatory mechanism of nucleosides biosynthesis, and in response to the current bottleneck problems, proposes future research directions and technical prospects, aiming to provide theoretical guidance and strategic references for the development of efficient nucleoside engineering strains, with the expectation of accelerating their industrialization process and meeting the increasingly diversified industrial demands.

Keywords purine nucleoside; pyrimidine nucleoside; synthesis pathway; metabolic regulation; strain modification

核苷是核酸的基本组成单位,由碱基和五碳糖通过糖苷键连接而成。根据碱基结构的差异,核苷主要分为嘌呤核苷(腺苷、鸟苷、肌苷)和嘧啶核苷(胞苷、尿苷和胸苷)两大类。其中,嘌呤核苷的碱基为双环结构的嘌呤,而嘧啶核苷的碱基为单环结构的嘧啶。作为生命活动中不可或缺的关键分子,核苷在自然界中广泛存在,不仅参与遗传信息的存储与传递,还在能量代谢、信号转导以及辅酶合成等生理过程中发挥重要作用[1-2]。因此,核苷不仅在基础生命活动中至关重要,作为食品增味剂和医药中间体,在食品和医药化工等领域也展现出重要的应用价值[3]。传统的核苷生产主要依赖化学合成法和酶解法,但两者均存在一定缺陷。化学合成法通常需要在高温、高压等苛刻条件下进行,并消耗大量有机溶剂和重金属催化剂,不仅能耗高,还会产生有毒副产物,对环境和生产安全构成威胁[4]。酶解法虽然具有反应条件温和的优势,却面临成本高昂、稳定性差以及副产物复杂等技术瓶颈,制约其工业化应用[5]。相比之下,微生物发酵法兼具高效、可控与经济等多重优势。如典型发酵法可在 24 ~ 48 h 内完成核苷合成,较化学法缩短 50% ~ 70% 的生产周期,且能显著降低原料成本,已成为现代核苷生产的主流方法,展现出广阔的应用前景[6]。近年来,合成生物学和代谢工程技术的快速发展,为核苷生产开辟了全新路径。然而,代谢流分配失衡仍是限制核苷高效积累的关键瓶颈。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中仅 38% 的 5-磷酸核糖流向肌苷酸(Inosinic acid,IMP),62% 被组氨酸与色氨酸旁路分流。静态敲除旁路基因虽使 IMP 通量提高 28%,但菌体生长受到抑制(OD_{600}下降 52%)。通过构建三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate,ATP)响应型 CRISPRi,动态抑制编码嘌呤合成阻遏蛋白的基因 *purR* 与编码色氨酸合成酶的基因 *trpE*,可在 48 h 内将 IMP 通量提升 40%,旁路占比降至 19%[4]。通过对微生物代谢网络的理性设计与系统改造,实现了核苷的高效生物合成与绿色制造,有力推动了核苷产业的可持续发展。本文系统梳理了核苷的生物合成途径,除特别注明外,均统称其为核糖及脱氧核糖形式,分类依据嘌呤与嘧啶碱基类型展开。重点探讨了代谢工程技术在改造核苷产生菌中的研究进展,旨在为核苷相关的基础研究与产业应用提供依据。通过系统剖析代谢通路优化、关键酶改造和合成途径重构等策略的应用效果,本文针对当前存在的技术瓶颈和挑战,提出了未来的发展方向,为推动核苷生物合成的创新发展提供参考。

1 核苷的生物合成途径

微生物合成嘌呤核苷与嘧啶核苷主要依赖两种途径。其一为从头合成途径,该途径以核糖磷酸、特定氨基酸、CO_2 和 NH_3 等小分子为前体,通过一系列酶促反应直接生成核苷,整个过程不依赖游离碱基中间体。其二为补救合成途径,该途径利用细胞内游离的碱基重新合成核苷。研究表明,从头合成途径易受环境因素影响,环境胁迫可能导致该途径中关键酶活性缺失,致使核苷合成速率不足以满足细胞快速增殖的需求[1],在此情况下,补救合成途径便发挥关键的补偿作用,对维持细胞正常生理功能不可或缺。

1.1 嘌呤核苷的从头合成途径

嘌呤核苷的合成起始于 5-磷酸核糖焦磷酸(Phosphoribosyl pyrophosphate,PRPP)的生成,首先由磷酸核糖焦磷酸激酶催化核糖-5-磷酸(Ri-

bose 5-phosphate, R5P) 与 ATP 反应生成 PRPP, PRPP 与谷氨酰胺(Glutamine, Gln)在谷氨酰胺-5-磷酸核糖焦磷生成生成 PRPP, PRPP 酰胺基转移酶作用下发生构型转变生成核糖胺-5-磷酸(Ribosylamine-5P)。在 ATP 供能下, 核糖胺-5-磷酸与甘氨酸结合生成甘胺酰胺核苷酸(Glycinamide ribonucleotide, GAR), GAR 经甲酰基转移酶催化(以甲酰基为供体)转化为甲酰甘胺酰胺核苷酸(Formylglycinamide ribonucleotide, FGAR), FGAR 进一步在甲酰甘胺脒核苷酸(Formylglycinamidine ribonucleotide, FGAM)合酶作用下(引入 Gln 的氨基)生成 FGAM。FGAM 脱水闭环生成 5-氨基咪唑核苷酸(5-aminoimidazole ribotide, AIR), AIR 在羧化酶作用下利用 CO_2 生成 5-氨基咪唑-4-羧酸核苷酸(5-aminoimidazole-4-carboxylate ribotide, CAIR), CAIR 与天冬氨酸缩合, 生成琥珀酰甲酰胺核苷酸(5-aminoimidazole-4-(N-succino)-carboxamide ribotide, SAICAR), SAICAR 经裂解脱去延胡索酸, 生成甲酰胺核苷酸(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide, AICAR)。最终, AICAR 通过甲酰化及闭环反应生成肌苷酸, 完成嘌呤核心结构合成(图 1)。

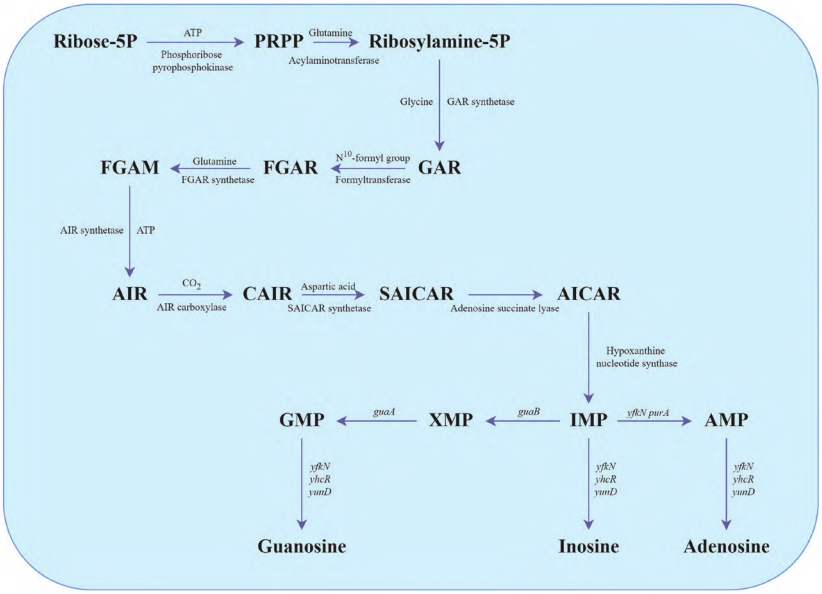


图 1 嘌呤核苷的从头合成途径

Fig. 1 The *de novo* synthesis pathway of purine nucleosides

IMP 作为关键分支点, 通过两条分支途径分别生成腺苷酸(Adenylic acid, AMP)和鸟苷酸(Guanylic acid, GMP)。AMP 合成途径: IMP 与天冬氨酸在腺苷琥珀酸合成酶作用下消耗鸟苷三磷酸(Guanosine triphosphate, GTP)供能生成腺苷琥珀酸, 腺苷琥珀酸经裂解酶分解为 AMP; GMP 合成途径: IMP 首先由 GMP 催化氧化生成黄嘌呤核苷酸(Xanthylic acid, XMP), XMP 在鸟苷酸合成酶催化下, 利用谷氨酰胺提供氨基, 生成 GMP。AMP 和 GMP 进一步脱磷酸化转化为对应的核苷[7-8]。整个嘌呤核苷的合成通路涉及 10 余种酶、多种辅因子(ATP、GTP、Mg^{2+} 等)及前体物质(天冬氨酸、谷氨酰胺等)的协同作用。其中, 反馈抑制是主要的调控方式, 终产物(AMP 和 GMP)能够抑制途径中关键酶的活性, 从而动态维持细胞内嘌呤代谢通量的平衡。最近的研究进一步揭示了磷酸核糖焦磷酸合成酶(Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase, PRPSs)作为核苷酸生物合成途径中的限速酶, 其活性受到多种因素的精细调控, 这对于理解和优化核苷合成的瓶颈至关重要[3]。

1.2 嘧啶核苷的从头合成途径

微生物嘧啶核苷(尿苷、胞苷、胸苷)的生物合成展现出显著的代谢特异性, 其从头合成途径起始于核苷酸前体的生成, 最终通过核苷酸的去磷酸化形成相应核苷。该途径的核心是尿苷一磷酸(Uridylic acid, UMP)的合成, 首先 Gln 和 CO_2/HCO_3^- 在受 UMP 反馈抑制的氨甲酰磷酸合成酶

(Carbamoyl-phosphate synthetase, CPS, 通常为单一多功能酶)催化下,消耗 2 分子 ATP 生成氨甲酰磷酸。氨甲酰磷酸与天冬氨酸经天冬氨酸转氨甲酰酶(Aspartate transcarbamylase, ATCase)作用缩合为氨甲酰天冬氨酸,后者再由二氢乳清酸酶环化脱水生成二氢乳清酸(Dihydroorotate, DHO)。二氢乳清酸脱氢酶(Dihydroorotate dehydrogenase, DHODH)利用醌类电子受体(如泛醌)氧化 DHO 生成乳清酸。乳清酸与 PRPP 在乳清酸磷酸核糖转移酶(Orotate phosphoribosyl transferase, OPRT)作用下生成乳清苷酸(Orotidine monophosphate, OMP),OMP 脱羧酶催化 OMP 脱羧生成 UMP。由 UMP 经 5′-核苷酸酶直接去磷酸化生成尿苷(Uridine)。UMP 经激酶磷酸化生成三磷酸尿苷(Uridine triphosphate, UTP),UTP 在胞苷三磷酸(Cytidine triphosphate, CTP)合成酶作用下,经氨基化生成 CTP,CTP 经磷酸酶逐步去磷酸化最终形成胞苷(Cytidine)。胸苷(Thymidine)的合成路径与胞苷显著不同且效率较低,UMP 经磷酸化生成二磷酸尿苷(Uridine diphosphate, UDP),由核糖核苷酸还原酶(Ribonucleotide reductase, RNR)还原 UDP 生成脱氧二磷酸尿苷(Deoxyuridine diphosphate, dUDP),dUDP 去磷酸化生成氧二磷酸尿苷(Deoxyuridine monophosphate, dUMP),*ThyA* 编码的胸苷酸合酶以 N^5, N^{10}-亚甲基四氢叶酸(CH_2-THF)为甲基供体,催化 dUMP 甲基化生成脱氧胸苷一磷酸(Deoxythymidine monophosphate, dTMP),dTMP 去磷酸化生成胸苷(图 2)。与胸苷合成路径相比,胞苷及其脱氧衍生物的从头合成表现出更高的代谢效率与途径直接性。在胞苷三磷酸的生物合成中,并非通过单磷酸核苷的还原途径,而是由胞苷三磷酸合酶(CTP synthetase)直接催化尿苷三磷酸(UTP)发生氨基化反应生成。微生物中,游离胞苷和胸苷主要通过核苷酸补救或降解途径产生,其从头合成通量相对有限,且胸苷合成严格依赖叶酸代谢[9]。

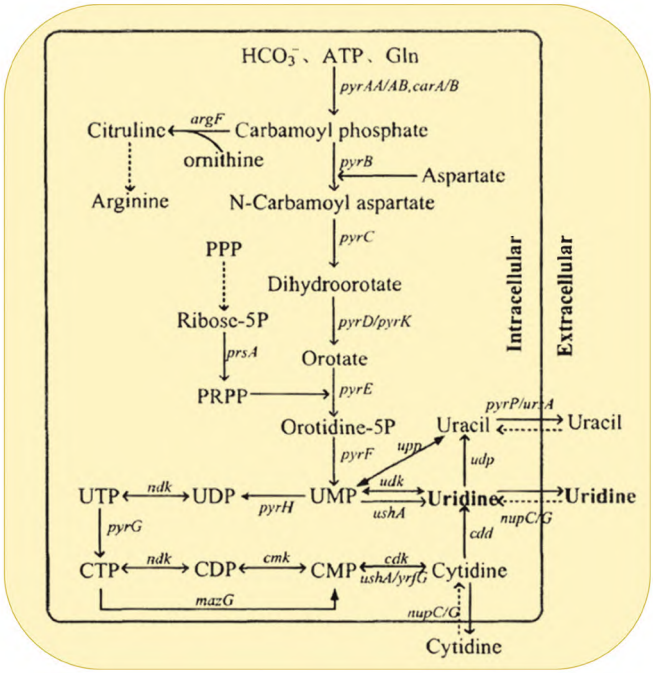


图 2　嘧啶核苷的从头合成途径

Fig. 2　*De novo* synthesis of pyrimidine nucleosides

1.3　核苷的补救途径

当微生物的核苷酸从头合成途径受阻时,补救途径被激活。该途径通过高效回收核酸降解产物并利用外源前体,维持细胞代谢稳态。嘌呤核苷补救途径主要依赖两种核心机制。首先,嘌呤碱基(如腺嘌呤、次黄嘌呤)在特异性转移酶催化下,直接与 PRPP 反应生成相应的核苷一磷酸。其中,腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Adenine phosphoribosyltransferase, APRT)催化腺嘌呤生成 AMP;次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Hypoxanthine-

guanine phosphoribosyltransferase, HGPRT) 则催化次黄嘌呤生成 IMP 或鸟嘌呤生成 GMP; 然后, 碱基与核糖-1-磷酸结合形成核苷。相较于从头合成, 补救合成途径显著降低了能量消耗并简化了代谢步骤。研究表明不同的微生物演化出独特的策略, 大肠埃希菌(*Escherichia coli*)可利用外源腺嘌呤经 APRT 途径合成 AMP, 以弥补腺嘌呤营养缺陷; 而芽孢杆菌属(*Bacillus*)则形成独特的嘌呤环形代谢网络, IMP 可经 XMP→GMP 或 SAMP→AMP 两条路径转化, 再分别通过 GMP 还原酶或 AMP 脱氨酶重新生成 IMP, 实现嘌呤核苷的动态循环利用(图 3)[5]。

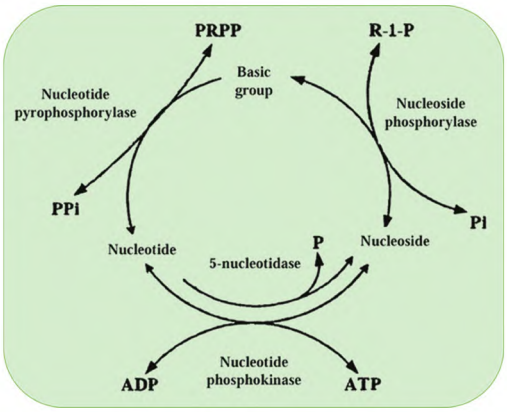


图 3 嘌呤碱基、核苷和核苷酸相互转变的补救途径

Fig. 3 Salvage synthesis pathway for the interconversion of purine bases, nucleosides and nucleotides

嘧啶核苷补救合成途径主要依赖于嘧啶磷酸核糖转移酶或核苷磷酸化酶系统, 首先, 嘧啶碱基在嘧啶核苷磷酸化酶(Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase, PNP)的作用下, 与 1-磷酸核糖发生转糖基反应, 生成相应的嘧啶核苷(如尿苷、胸苷)。特定的微生物中存在更专一的酶, 如大肠埃希菌的尿苷磷酸化酶和胸苷磷酸化酶, 分别催化尿嘧啶→尿苷和胸腺嘧啶 + 脱氧核糖-1-磷酸→脱氧胸苷。这些嘧啶核苷在相应的嘧啶核苷激酶的催化下, 利用 ATP 提供磷酸基团, 被磷酸化生成相应的嘧啶核苷一磷酸(如 UMP、dTMP)。值得注意的是, 微生物中催化磷酸化步骤的激酶底物特异性存在显著差别, 一些激酶高度专一, 如大肠埃希菌的脱氧胸苷激酶仅磷酸化脱氧胸苷生成 dTMP, 其尿苷激酶专一催化尿苷生成 UMP。而另一些激酶则具有较宽的底物谱, 如许多微生物如大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtills*)的胞苷激酶, 不仅能利用胞苷, 也能利用脱氧胞苷甚至尿苷作为底物进行磷酸化反应, 这种底物识别机制的多样性反映了微生物在利用不同嘧啶前体时的代谢灵活性。

2 核苷产生菌代谢工程改造研究进展

随着合成生物学和代谢工程技术的不断发展, 对核苷产生菌进行精准高效地改造已成为提升核苷产量的主要策略。本节将重点阐述在嘌呤核苷和嘧啶核苷生产菌株改造方面的最新进展。

2.1 嘌呤核苷产生菌代谢工程改造

嘌呤核苷(腺苷、鸟苷、肌苷)作为重要的生物分子, 其高效生物合成一直是代谢工程领域的研究热点。通过解除反馈抑制、强化关键酶表达、阻断竞争与降解途径以及优化前体供应等策略的应用, 显著提升了嘌呤核苷的产量。

2.1.1 腺苷产生菌代谢工程改造 腺苷作为一种重要的嘌呤核苷, 其高效生物合成是代谢工程的研究热点。主要通过解除反馈抑制、强化关键酶表达、阻断竞争或降解途径等策略提高腺苷产量。其中解除嘌呤合成途径的反馈抑制是最常用的方法。嘌呤操纵子受 *purR* 编码蛋白的转录阻遏调控, 而 *purF* 编码的酰胺基转移酶和 *purA* 编码的腺苷酸琥珀酸合成酶分别受到嘌呤核苷酸的反馈抑制, 因此, 敲除 *purR* 或对 *purF*、*purA* 进行定点突变以解除抑制, 可显著增强嘌呤合成的整体代谢通量[10]。此外, 强化 *prs* 编码的 PRPP 合成酶的表达或使用抗反馈抑制的突变体, 可以增加关键前体 PRPP 的供应, 进一步促进腺苷合成。腺苷合成的关键在于增强 IMP 向 AMP 转化的代谢通量, 这通常通过过表达 *purA* 和 *purB* 编码的腺苷酸琥珀酸裂解酶来实现。梅漫莉[11]将枯草芽孢杆菌的嘌呤合成操纵子及其下游基因簇 *purA*、*purB* 异源表达至大肠埃希菌 W3110, 同时敲除竞争性分支代谢通路及产物降解途径基因, 最终使腺苷摇瓶产量达 4.9 g/L。对枯草芽孢杆菌的核苷代谢通量分析显示, IMP 节点处流向 AMP 的代谢通量占比高达 87.5%, 这从代谢层面佐证了 *purA* 与 *purB* 在该菌株中的高催化特性。阻断竞争途径和降解途径是促进腺苷积累的关键策略。作为合成 AMP 和 GMP 的共同前体, IMP 的

代谢流向决定了核苷酸的产量分布。为了提高AMP的比例,可通过削弱IMP向GMP的代谢流,即敲低/敲除次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶(Inosine 5′-mono-phosphate dehydrogenase, IMPDH),从而实现代谢流向的重定向。研究发现腺苷或腺苷酸容易被细胞内的核苷酶或磷酸化酶降解,例如,*add*编码的腺苷脱氨酶催化腺苷脱氨生成肌苷,*deoD*编码的嘌呤核苷磷酸化酶催化腺苷磷酸化裂解生成腺嘌呤[12],因此,敲除*add*、*deoD*、*udp*等降解途径相关基因是阻断产物流失、提高腺苷积累的必要手段。优化中心碳代谢网络、保障前体供应是提高腺苷产量的另一关键。强化磷酸戊糖途径(Pentose phosphate pathway, PPP)可增加PRPP前体的生成。例如,敲除*pgi*编码的磷酸葡萄糖异构酶可强制碳流进入PPP途径[13]。此外,宿主细胞的整体代谢状态优化也至关重要,如辅因子ATP、GTP的平衡供给及NAD(P)H或NAD(P)$^+$氧化还原状态调控,对腺苷高效合成也具有促进作用。腺苷产生菌的改造现状见表1。

表1 腺苷产生菌的改造

Table 1 Modification of adenosine-producing bacteria

菌株	关键改造	产量/(g·L^{-1})
Escherichia coli W3110	异源表达*purA*、*purB*,敲除分支代谢通路及产物降解途径	4.90
Escherichia coli MG1655	引入操纵子,敲除分解、分支途径以及解除相关酶的反馈抑制	4.50
Bacillus subtilis ATCC6051	ARTP与5-溴尿嘧啶复合诱变,结合抗性筛选	11.94
Bacillus subtilis XW210	N$^+$离子束注入和二乙基硫酸复合诱变	16.37

2.1.2 鸟苷产生菌代谢工程改造 鸟苷及其衍生物(如GMP)是重要的食品增味剂和药物前体。多轮诱变(物理诱变或化学诱变)结合抗性标记筛选是传统改造鸟苷产生菌的方法。其中,两种关键抗性筛选策略被广泛应用[14]。甲硫氨酸亚砜(Methionine sulfoxide, MSO)抗性筛选:该策略一方面通过降低谷氨酰胺合成酶活性破坏GMP合成所需的谷氨酰胺(氮源)供应,另一方面通过诱导*guaB*突变或改变调控网络,削弱GMP对IMPDH的反馈抑制,从而解除代谢限制,增强GMP合成通量。例如,Hiroshi等对枯草芽孢杆菌No. 1411进行MSO筛选获得突变株No. 14119,其IMPDH活性显著增强,核苷酸酶活性受到抑制,鸟苷产量达9.6 g/L。磺胺胍(Sulfaguanidine, SG)抗性筛选:该策略通过改变受SG抑制的二氢叶酸合成酶(影响嘌呤甲酰基转移反应),或促使GMP合成酶发生活性提升或调控解除的突变,从而协同增强嘌呤合成代谢通量。该研究进一步筛选获得的SG抗性突变株,其GMP合成酶与IMPDH活力显著提高,鸟苷产量提升至11.0 g/L[15]。近年来,代谢工程和合成生物学技术为鸟苷高效合成提供了精准、高效的改造策略。首先,解除反馈抑制与强化主干途径。通过敲除*purR*编码的全局调控因子,或对*guaB*和*purF*进行抗反馈抑制的定点突变,解除代谢抑制从而提升基础通量[16],并在此基础上,过表达*guaB*和*guaA*编码的GMP合成酶,强化IMP至GMP的代谢流,同时增强上游*prs*及嘌呤途径基因表达,保障前体供应。Asahi等[17]在枯草芽孢杆菌AJI/GMP-6中,通过敲除全局调控因子*purR*解除嘌呤操纵子阻遏,并引入*guaB* G206D和*purF* G216R的定点突变,使IMP向GMP转换的通量较Δ*purR*菌株提高3.8倍。其次,阻断竞争与降解途径。为获得最大化代谢定向效率,需敲除竞争途径基因(如IMP向AMP分支中*purA*编码的关键酶)和降解回流途径基因,如*deoD*、*gsk*编码的鸟苷降解酶,*nupG*、*nupC*编码的转运蛋白,以及*guaC*编码的GMP,消除副反应与产物流失[18-19]。最后,优化前体与辅因子供应,进一步通过中心碳代谢改造(如强化PPP)提升PRPP水平,并确保关键辅因子(如供GMP合成的ATP、供IMP脱氢的NAD$^+$)的充足供应与再生能力[20]。此外,先进工具的整合也显著提升了调控精度与效率,如利用CRISPR/Cas9实现高效多基因编辑,开发动态调控系统平衡生长与生产,应用启动子工程优化关键酶的表达强度与时机,以及过表达如*yggU*编码的外排蛋白来强化产物分泌[21]。鸟苷产生菌的改造现状见表2。

表 2 鸟苷产生菌的改造

Table 2 Modification of guanosine-producing bacteria

菌株	关键改造	产量/(g·L^{-1})
Bacillus subtilis No. 14119	MSO 筛选	9.60
Bacillus subtilis No. 14119	MSO + SG 筛选	11.00
Escherichia coli W3110	缺失 *deoD*、*xapA*、*gsk*、*purR*，过表达 *guaB*、*guaA*、*surE*、*prsA*，异源表达 *purF*、*purM* 等	35.00
Bacillus subtilis AJI	敲除 *purA*，过表达 *prs*、*purF* 和 *guaB*	42.00
Bacillus subtilis AJ2066	优化发酵条件，添加谷氨酸钠和次黄嘌呤	33.24

2.1.3 肌苷产生菌代谢工程改造 肌苷及其磷酸化形式 IMP 作为嘌呤合成途径的核心中间体和重要的食品鲜味剂，与 GMP 协同，其高效生产主要依赖于解除反馈抑制、增强前体供应及阻断下游分支等代谢工程策略[22]。其中，解除嘌呤合成途径的调控限制是基础，敲除 *purR* 可解除对嘌呤操纵子的转录抑制，显著增强 IMP 合成相关酶的表达水平。Asahara 等[23]通过敲除枯草芽孢杆菌 KMBS292 的 *purR*，解除了对嘌呤操纵子的转录抑制，嘌呤操纵子表达水平提高了近 4 倍。刘铁重[24]在大肠埃希菌 W3110 中采用类似策略，敲除 *purR* 后，48 h 发酵次黄嘌呤产量较原始菌株增加了 1 倍以上，解除 *purF* 的反馈抑制也至关重要，对谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的 *purF* 进行定点突变，引入 K348Q 突变后，肌苷产量提升了 2.9 倍。强化前体 PRPP 的供应是提升肌苷产量的核心策略。*prs* 受到 ADP 和 GDP 的反馈抑制，Zakataeva 等[25]通过理性设计改造解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）的 *prs*，筛选出 N120S 与 L135I 双突变体，使肌苷积累量增加了 81%，证实过表达抗反馈抑制的 *prs* 突变体是提高 PRPP 供应的有效手段。优化中心碳代谢以提供充足的 R5P 也是提高肌苷产量的有效途径。R5P 是 PRPP 合成的直接前体，主要由 PPP 提供。通过阻断糖酵解途径（Embden-Meyerhof-Parnas pathway，EMP）或 Entner-Doudoroff（ED）途径，可以将更多的碳流导入 PPP 途径。Shimaoka 等[26]通过阻断大肠埃希菌 FADRadd/pMWKQ 的 ED 途径（敲除 *edd*），将肌苷产量从 1.1 g/L 提升至 1.4 g/L，进一步敲除 *pgi* 以增强 PPP 的碳通量分配后，肌苷产量显著提升至 3.7 g/L。阻断 IMP 下游分支及降解途径是促进 IMP 积累的必要条件。敲除 *purA* 和 *guaB* 可阻断 IMP 向 AMP 或 GMP 的分流，敲除 *deoD* 可以防止肌苷降解为次黄嘌呤，敲除相关的 *nupG*、*nupC* 编码的核苷转运蛋白可以减少肌苷的再摄取和代谢，敲除 *add* 可避免腺苷合成途径的产物转化干扰[27]。此外，需注意 IMP 或肌苷对上游酶的潜在反馈抑制，其解除策略仍需进一步研究。肌苷产生菌的改造现状见表 3。

表 3 肌苷产生菌的改造

Table 3 Modification of inosin-producing bacteria

菌株	关键改造	产量/(g·L^{-1})
Bacillus subtilis KMBS292	敲除 *purR*	5.60
Escherichia coli W3110	敲除 *purR*	0.83
Bacillus amyloliquefaciens BA-5	*prs* N120S/L135I 定点突变	1.81
Escherichia coli AJI	敲除 *edd*	1.40
Escherichia coli AJI	敲除 *edd*、*pgi*	3.70
Bacillus subtilis ISW122	敲除 *purA*、*guaB*、*deoD*、*purR*，过表达 *prs*、*purF*，优化核糖供应	45.20
Escherichia coli INO003	敲除 *purA*、*guaB*、*deoD*、*add*、*nupC*、*nupG*、*purR*，过表达 *prs*、*purF*，优化核糖供应，过表达转运蛋白	61.50

2.2 嘧啶产生菌代谢工程改造

嘧啶核苷（胞苷、尿苷、胸苷）是核酸合成和多种生理功能必需的分子。嘧啶产生菌代谢工程改造主要围绕解除反馈抑制、强化关键酶表达、优化前体供应和阻断降解途径展开。

2.2.1 胞苷产生菌代谢工程改造 胞苷作为

RNA、辅酶及抗病毒药物的重要前体,其生物合成较尿苷更为复杂(需 UTP 氨化为 CTP)且受严格调控。提升胞苷产量的核心策略在于解除嘧啶核苷酸合成途径上游关键节点的反馈抑制,主要体现在 CPS(由 *carAB* 编码)和 ATCase(由 *pyrBI* 编码)两个关键酶,前者受 UMP 或 UTP 强烈反馈抑制,后者受 CTP 抑制并被 ATP 激活,因此,改造这些酶以解除抑制是提升前体通量的首要目标[28]。在大肠埃希菌代谢工程研究中,通过 CRISPR/Cas9 介导的染色体整合技术引入枯草芽孢杆菌 F126 来源的突变型氨甲酰磷酸合酶(*pyrAA/pyrAB* E949*),利用该无义突变导致的 CPS 大亚基 C 端变构结构域截断,可有效解除 UMP 的反馈抑制,从而显著增强氨甲酰磷酸的合成通量[29-30]。基于此策略,配合 *pyr* 操纵子的过表达、降解途径的阻断以及外排转运能力的强化,工程菌株在 5 L 发酵罐中实现了 70.3 g/L 的尿苷高产(产率 1.1 g(L·h))。此外,也有研究通过常压室温等离子体(ARTP)诱变结合高通量筛选策略,从枯草芽孢杆菌 F126 中选育出解除氨甲酰磷酸合酶反馈抑制的突变株,其发酵产量在 5 L 规模下达到 30.3 g/L[31-32]。在解除 CPS 反馈抑制的基础上,进一步优化 ATCase 的抗反馈抑制能力(如突变 *pyrB* 或 *pyrI* 以削弱 CTP 抑制、增强 ATP 激活)至关重要。敲除枯草芽孢杆菌的 *pyrR* 基因或破坏其 mRNA 结合位点可解除 *pyr* 操纵子的转录衰减调控,从而全面释放嘧啶核苷酸合成通量[33-34]。为了将增强的前体供应有效导向胞苷合成,还需强化主干途径关键酶(过表达 *carAB*、*pyrBI*、*pyrC-F*),并特异性增强 CTP 合成这一关键节点[35]。这包括过表达 CTP 合成酶 *pyrG*,以及解除 *pyrH* 编码的 UMP 激酶受 UTP 的反馈抑制(如通过定点突变),从而优化 UMP→UTP→CTP 的代谢流。2019 年的一项研究通过在大肠埃希菌 MG1655 中综合应用多重代谢工程策略,实现了胞苷的高效生产[36]。该研究在质粒上过表达了关键的抗反馈突变基因(*pyrH* D93A 和 *pyrG* D160E/E162A/E168K),同时优化了前体物供给途径并敲除胞苷降解相关基因。在此基础上,通过 5 L 发酵罐的补料分批发酵工艺,在 48 h 内实现了 7.84 g/L 的胞苷产量,刷新了当时的行业记录。为阻断下游胞苷的流失,还需敲除编码的胞苷脱氨酶(阻止胞苷转变为尿苷)、*udp* 编码的尿苷磷酸化酶(抑制核苷降解)及 *nupC/nupG*(防止胞苷重吸收)。尽管传统诱变筛选如抗 5-氟胞嘧啶(5-Flourocytosine,5-FC)是高产菌株选育的主要手段,但现代代谢工程通过 CRISPR/Cas9 基因编辑、系统生物学分析与多靶点理性改造已实现胞苷合成途径的精准优化。然而当前工程菌株(如大肠埃希菌)的胞苷产量仍低于传统宿主(如某些枯草芽孢杆菌菌株)[36-37],这一现象提示,要突破胞苷生产的产量瓶颈,需进一步解析宿主特异性调控网络(如未知降解途径),并开发更具宿主适配性的工程策略。最新的研究通过多变量模块化代谢工程在枯草芽孢杆菌中高效生物合成胞苷,强调了模块化设计在复杂代谢途径优化中的作用。此外,通过转录因子工程调控枯草芽孢杆菌的嘧啶代谢和碳代谢调控网络,也促进了胞苷生物合成,表明了多层次调控的重要性。胞苷产生菌的改造现状见表 4。

表 4 胞苷产生菌的改造

Table 4 Modification of cytidine-producing bacteria

菌株	关键改造	产量/(g·L^{-1})
Escherichia coli MG1655	过表达 *pyrH*、*pyrG*,强化 *prs*、*asd*,敲除 *cdd*、*udp*、*deoA*、*deoC*、*endA*、*recBCD*、*relA*、*spoT*,优化核糖供应	7.84
Bacillus subtilis 168	引入 *pyrAA* 或 *pyrAB E949** 突变,敲除 *cdd*、*udp*、*deoD*、*pyrR*,过表达 *pyrG*、*prs*,优化核糖供应	15.60
谷氨酸棒杆菌(*Corynebacteruim glutamicum*) CRS-7	过表达 *pyrF*、*pyrE*、*pyrDA*、*pyrC*、*pyrB*、*carB*、*carA*、*pyrG*、*prs*,敲除 *cdd*、*udp*、*pyrR*,优化核糖供应	12.10
Bacillus subtilis FC-7	ARTP 诱变 +5-FC 抗性筛选	9.50

注:* 表示任意突变,表 5 同

2.2.2 尿苷产生菌代谢工程改造 尿苷作为嘧啶核苷酸合成途径的第一个核苷产物,是合成其他嘧啶核苷(胞苷、胸苷)和某些糖基化反应的前体。提高尿苷产量主要依赖于解除嘧啶合成途径的反馈调控、强化关键酶表达、优化前体供应以及阻断降解途径策略。其中解除反馈调控是核心策

略,方海田等[38]通过对 CPS 的 *pyrAA* 或 *pyrAB* 进行 T941F/T970A/K986I 多点突变,破坏了 UMP 及 UTP 变构抑制位点,显著提升了前体供应;Fan 等[32]进一步构建 E949 截短突变体,使枯草芽孢杆菌尿苷产量提升 8.7 倍,达 30.3 g/L。解除全局调控基因抑制是提升尿苷产量的重要策略,敲除全局调控基因 *pyrR* 及 *rapC*,后者通过稳定 *pyr* mRNA 发挥作用,使尿苷产量从 0.01 g/L 大幅提升至 1.18 g/L,并使副产物尿嘧啶降低 75%[39]。强化关键酶表达是提升通量的直接手段,利用强启动子过表达 *pyr* 操纵子(*carAB-pyrBI-pyrC-F*)可使嘧啶通量提升 3.5 倍;过表达抗反馈 *prs* 突变体(非野生型)使 PRPP 合成能力增加 96%,尿苷产量较出发菌株提高 1.7 倍[40]。前体供应优化与阻断降解途径是支撑高产的关键环节,敲除 *pgi* 迫使碳流进入 PPP 途径,R5P 增加 4.2 倍;过表达 *aspC* 并调控糖酵解,使天冬氨酸浓度提升 2.3 倍[41]。阻断降解途径则有效减少产物损失,敲除 *udp* 和 *cdd*,可减少尿苷降解损失 90%;改造转运系统(*ΔnupC*、*nupG* + *yddG*),使分泌效率超过 85%[42]。此外,弱化竞争分支和利用表型筛选也是有效策略,定向弱化 *pyrG* 或 *thyA*,可引导代谢流至尿苷。而 5-FU 抗性筛选(如 ARTP 诱变菌株 F126),则利用了高产菌嘧啶代谢紊乱特性实现高通量富集[43]。最终,应整合多级策略是实现工业级产量的关键,菌株 F126(*ΔpyrR* + *pyrAB* E*949* + *Δudp*)成功实现了 30.3 g/L 尿苷工业化量产,验证了多级策略协同优化的必要性[44]。此外,通过调节细胞代谢和形态,加强尿苷合成途径,也实现了透明质酸的高产,表明尿苷合成与细胞整体代谢状态具有关联性。尿苷产生菌的改造现状见表 5。

表 5 尿苷产生菌的改造

Table 5 Modification of uridine-producing bacteria

菌株	关键改造	产量/(g·L^{-1})
Bacillus subtilis F126	ARTP 诱变 + 高通量筛选获得 *pyrAA* 或 *pyrAB E949** 突变	30.30
Escherichia coli W3110	整合 *B. subtilis pyrAA* 或 *pyrAB E949**, Ptrc 启动子过表达 *pyr* 操纵子,敲除 *udp*、*cdd*、*nupC*、*nupG*,过表达外排泵 *yddG*	70.30
Bacillus subtilis	敲除 *rapC*	1.18
	过表达野生型 *prs*	1.40x
	过表达突变型 *prs*	1.96x
Corynebacteruim glutamicum	过表达 *pyr*,引入抗反馈抑制 *pyrB* 突变,敲除 *cdd*、*udp*、*ndrR*,优化核糖供应	48.60

注:x 表示原产量

2.2.3 胸苷产生菌代谢工程改造 胸苷作为 DNA 的关键组成成分和多种抗病毒(如齐多夫定)、抗肿瘤药物(如氟尿苷)的重要前体,其生物合成途径与其他核苷不同,该合成高度依赖脱氧核糖代谢路径。该过程首先由 *nrd* 编码的 RNR 还原 UDP 或二磷酸胞苷(Cytidine diphosphate, CDP),分别生成 dUDP 或脱氧二磷酸胞苷(Deoxycytidine diphosphate, dCDP)。RNR 的活性和底物特异性受到严格调控,以维持脱氧核糖三磷酸(Deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)库的平衡。dCDP 可经脱氨酶转化为 dUMP,而 dUDP 则先磷酸化为 dUTP,再由 *dut* 编码的 dUTP 酶水解为 dUMP,这一关键步骤有效防止了脱氧三磷酸尿苷(Deoxyuridine triphosphate, dUTP)错误掺入 DNA。dUMP 在由 *thyA* 或 *thyX* 编码的胸苷酸合成酶(Thymidylate synthase, TS)催化下,以四氢叶酸为甲基供体甲基化生成脱氧一磷酸胸苷(Deoxythiopurine phosphate, dTMP)。dTMP 可进一步磷酸化为脱氧二磷酸胸苷(Deoxythiopurine diphosphate, dTDP)和脱氧三磷酸胸苷(Deoxythioguanosine triphosphate, dTTP)参与 DNA 合成。此外,dTMP 或胸苷本身可通过核苷酸酶或磷酸化酶或激酶(如 *tdk* 编码的胸苷激酶,*deoA* 编码的胸苷磷酸化酶)进行转化,*deoA* 可逆催化胸苷降解为胸腺嘧啶和脱氧核糖-1-磷酸。提高胸苷产量的代谢工程策略主要聚焦增强脱氧核苷酸前体供应、强化胸苷酸合成以及阻断降解途径三个核心方向。增强前体供应可通过优化 RNR 的调控或使用活性更高的突变体实现 *nrd* 过表达,以增加 dUDP 或 dCDP 的供应。同时需确保上游嘧啶核

糖核苷酸(UDP 或 CDP)的充足供应,这通常涉及解除 CPS、ATCase 调控或强化 *pyr* 基因表达[45]。强化胸苷酸合成的核心是过表达 *thyA* 或 *thyX*,最大化将 dUMP 转化为 dTMP,同时需关注辅因子四氢叶酸的再生与供应,可能涉及叶酸代谢途径的优化。阻断降解途径至关重要,首要目标是敲除 *deoA* 或 *tpp* 以阻止胸苷降解。*tdk* 在补救途径中催化胸苷磷酸化为 dTMP,其作用具有两面性(既可利用外源胸苷,也可能促进内源胸苷代谢),因此 *deoA* 或 *tpp* 敲除或保留需根据具体策略权衡;此外,敲除 *udp*、*rihA*、*rihB*、*rihC* 可进一步减少潜在的核苷降解。Kim 团队[46]对一株胸苷高产菌株进行发酵试验,发酵 120 h 胸苷产量达到 13.2 g/L,基因操作的累加效应表示敲除 *deoA*、*tdk*、*udp* 三个基因的工程菌株 BS03,胸苷产量达 216 mg/L;进一步敲除 *pgi* 和 *pyrL*(增加前体 R5P 和 NADPH)胸苷产量提升至 90.5 mg/L;过表达 *ushA*、*thyA*、*dut*、*ndk*、*nrdAB* 五个基因的工程菌株 BS08,胸苷产量达 272 mg/L,通过补料发酵胸苷产量达到 1 248.8 mg/L。优化氧化还原平衡(RNR 反应依赖硫氧还蛋白)也是关键,例如通过敲除 *udhA*(可溶性转氢酶)调节 NADPH 与 NADH 比率。此外,阻断竞争途径(如确保 dUMP 优先流向 dTMP 合成)和优化发酵条件也是成功策略的重要组成部分,如 Kim 等[46]通过组合敲除 *deoA*、*tdk*、*udp*、*rihABC* 及 *udhA* 并结合发酵优化,最终实现胸苷产量达 13.2 g/L。胸苷产生菌的改造现状见表 6。

表 6 胸苷产生菌的改造

Table 6 Modification of thymidine-producing bacteria

菌株	关键改造	产量/(g·L^{-1})
Escherichia coli	敲除 *deoA*、*tdk*、*udp*、*rihA*、*rihB*、*rihC*,敲除 *udhA*	13.2
	过表达 *nrdAB*、*thyA*、*dut*,敲除 *deoA*、*udp*、*tdk*,优化嘧啶前体供应,优化核糖供应	21.5
	过表达 *nrdE*、*nrdF*、*nrdI*、*thyA*、*dut*,敲除 *deoA*、*udp*,优化嘧啶前体供应,优化核糖供应	15.8

3 展 望

近年来核苷产生菌的代谢工程改造取得了显著进展。研究人员针对不同核苷产生菌,如大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌等,从多方面进行改造。在核心结构优化层面,通过强化 PRPP 等通用前体供应(如过表达 *prs* 基因或敲除 *purR* 抑制因子)、突破限速酶瓶颈(如过表达嘌呤途径 *purF* 与强化嘧啶途径 *pyrB-pyrI*)及优化辅因子再生系统(如动态调控烟酰胺腺嘌呤二核苷酸激酶平衡 ATP/NADPH 供应),构建了跨宿主的共性改造策略[47-49]。不同宿主因代谢特性差异呈现出策略分化,大肠埃希菌需依赖 *prs* 过表达弥补 PRPP 不足,枯草芽孢杆菌需解除 *pyr* 操纵子反馈抑制以释放嘧啶合成潜力,而谷氨酸棒杆菌则凭借谷氨酰胺合成优势成为嘌呤类核苷生产的优选宿主[50-51]。针对下游特异性合成,研究聚焦关键酶强化与分解途径抑制的协同调控,例如通过 *purA* 过表达结合 *add* 敲除实现大肠埃希菌中的腺苷合成量达 15 ~ 20 g/L,依赖 *guaB* 或 *guaA* 协同表达及 *deoD* 敲除使枯草芽孢杆菌中鸟苷产量提升至 30 g/L,但核苷合成仍面临腺苷需维持 NADH/NADPH 平衡的特异性挑战,鸟苷需规避多步磷酸化导致的代谢流失衡,胸苷则需解决 dTTP 毒性与生长速率的动态平衡[52]。

当前代谢工程改造的限速瓶颈呈现共性与特异性交织特征,PRPP 供应不足与嘌呤或嘧啶途径反馈抑制构成共性障碍,而 SAICAR 等中间产物积累、核苷外排效率低及宿主生理耐受性差异则形成特异性限制。例如大肠埃希菌生产胸苷时需同步优化 *thyA* 表达强度与膜转运蛋白活性,谷氨酸棒杆菌合成尿苷需突破 *pyr* 操纵子的转录抑制壁垒[53-54]。未来,合成生物学与人工智能技术的深度融合正推动核苷生物合成进入智能化时代。AI 驱动的深度学习模型可解析多组学数据并预测最优基因编辑组合,结合虚拟细胞模型模拟代谢流分配,指导途径模块化重构,解决传统试错法无法预判的酶表达失衡问题,如 *prs* 过表达导致 PRPP 堆积引发的 ATP 耗竭[55];高通量筛选技术如微流控单细胞分选与拉曼激活细胞分选,将关键酶突变体筛选效率提升百倍以上[56];基于代谢传感器-Riboswitch 的动态调控系统,可实时

响应前体或产物浓度并平衡细胞生长与合成代谢[57]。此外,多组学整合分析将揭示非编码RNA等隐性调控节点,合成共生体系与细胞区室化设计可突破单菌代谢极限,从而规避单菌中前体合成与产物积累的互斥性(PRPP合成需还原力,而肌苷分泌需膜质子梯度)[58-60],而CRISPR基因驱动与自动化菌株构建平台将加速高产菌株迭代。这些技术的协同应用,不仅为核苷类药物及功能分子的工业化生产提供高效细胞工厂,更将推动生物制造向智能化、绿色化方向深度发展,为食品、医药、化工等领域的核苷应用奠定基础。

参考文献:

[1] 王永成,陈涛,石婷,等. 嘌呤核苷及其衍生物的代谢工程[J]. 中国生物工程杂志,2015,35(5):87-95.

[2] Layland J, Carrick D, Lee M, et al. Adenosine: Physiology, pharmacology, and clinical applications[J]. JACC: Cardiovascular Interventions, 2014, 7(6): 581-591.

[3] Ledesma-Amaro R, Jiménez A, Santos MA, et al. Biotechnological production of feed nucleotides by microbial strain improvement[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(9): 1263-1270.

[4] Shiraishi T, Kuzuyama T. Recent advances in the biosynthesis of nucleoside antibiotics[J]. The Journal of Antibiotics, 2019, 72(12): 913-923.

[5] Pedley AM, Benkovic SJ. A new view into the regulation of purine metabolism: The purinosome[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2017, 42(2): 141-154.

[6] 孙鹏杰. 腺嘌呤工程菌的构建及代谢控制发酵研究[D]. 天津:天津科技大学,2023.

[7] 朱亚婷,肖郑鹏,周佳丽,等. 过表达腺苷生物合成正相关基因 *GLPNP* 提高灵芝腺苷的含量[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4401-4412

[8] 康竞艺,艾奕伶,刘秀霞,等. 常压室温等离子体结合高通量筛选技术在微生物育种方面的研究进展[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 78-89

[9] 王光路,王梦园,刘兰茜,等. 适应性实验室进化在工业生产菌株选育中应用的进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 306-322

[10] 闫更轩,刘伟,刘春燕,等. ARTP诱变选育高产腺苷菌株及发酵条件优化[J]. 中国调味品,2024,49(8):63-68.

[11] 梅漫莉. 腺苷工程菌的构建及其发酵过程控制[D]. 天津:天津科技大学,2021.

[12] 任韶霞. ARTP诱变与基因定向改造选育腺苷高稳产菌株[D]. 新乡:河南师范大学,2017.

[13] 杨心萍,宋词,张伟豪,等. 常压室温等离子体与5-溴尿嘧啶复合诱变及快速选育腺苷高产菌株[J]. 食品与发酵工业,2020,46(9):73-77.

[14] 刘晨,丁长河. 鸟苷酸发酵工艺优化及应用研究进展[J]. 粮食与油脂,2018,31(5):4-7.

[15] Hiroshi M, Katsuaki S, Hitoshi E, et al. A guanosine-producing mutant of *Bacillus subtilis* with high productivity[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1979,43(2):393-394.

[16] 刘辉. 鸟苷工程菌的构建及其发酵条件的初步研究[D]. 天津:天津科技大学,2005.

[17] Asahi S, Tsunemi Y, Izawa M, et al. Cytidine production by mutants of *Bacillus subtilis* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1994,58(8):1399-1402.

[18] 吴飞,史建明,谢希贤,等. 鸟苷产生菌解淀粉芽孢杆菌的选育[J]. 天津科技大学学报,2010,25(2):1-4.

[19] 武改红. 鸟苷产生菌的选育及其发酵条件研究[D]. 天津:天津科技大学,2005.

[20] 陈双喜, 蔡显鹏, 王仲石, 等. 鸟苷发酵的优化研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 65-69.

[21] Li Y, Zhu X, Zhang X, et al. Characterization of genome-reduced *Bacillus subtilis* strains and their application for the production of guanosine and thymidine[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 1-15.

[22] 潘俊潼,寇凤雨,刘瑞艳,等. 常压室温等离子体-紫外复合诱变选育β-法尼烯高产菌株[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 542-551.

[23] Asahara T, Mori Y, Zakataeva NP, et al. Accumulation of gene-targeted Bacillus subtilis mutations that enhance fermentative inosine production[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2010,87(6):2195-2207.

[24] 刘铁重. 优化大肠杆菌中肌苷酸节点提升肌苷产量[D]. 天津:天津科技大学,2023.

[25] Zakataeva N, Romanenkov D, Skripnikova V. et al. Wild-type and feedback-resistant phosphoribosyl pyrophosphate synthetases from *Bacillus amyloliquefaciens*: Purification, characterization, and application to increase purine nucleoside production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(5): 2023-2033.

[26] Shimaoka M, Takenaka Y, Kurahashi O, et al. Effect of amplification of desensitized purF and prs on inosine accumulation in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2007, 103(3):255-261.

[27] 刘铁重,侯德欣. 大肠杆菌肌苷酸节点代谢优化高效合成肌苷[J]. 食品与发酵工业, 50(4): 44-50.

[28] 吕雪芹, 武耀康, 林璐, 等. 枯草芽孢杆菌代谢工程改造的策略与工具[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1619-1636.

[29] Wu H, Li Y, Ma Q, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield uridine production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49:248-256.

[30] 孙志康,李力群,郝捷,等. CRISPR-Cas系统在枯草芽孢杆菌基因组编辑中的研究进展 [J]. 中国农业科技导报(中英文), 2025, 27(02): 24-32.

[31] Del A, Acosta J, Fernández-Lucas J. Biotechnological applications of purine and pyrimidine deaminases[J]. Biotechnology Advances, 2024: 108473.
[32] Fan X, Wu H, Li G, et al. Improvement of uridine production of *Bacillus subtilis* by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0176545.
[33] 刘益宁,秦臻,李旋,等.胞苷合成途径改造对大肠杆菌嘧啶核苷发酵的影响[J].食品与发酵工业,2021,47(12):10-16.
[34] 董田田.代谢工程改造大肠杆菌生产胞苷5′-单磷酸[D].无锡:江南大学,2023.
[35] 张丽娜,罗祥坤,邓子新,等. 变铅青链霉菌体内游离胞嘧啶的发现及检测[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 3998-4009.
[36] Zhang L, Tang J, Yang S, et al. Engineering *Escherichia coli* for high-level production of ergothioneine.[J]. Journal of Biotechnology, 2026,414:80-90.
[37] 宋雪静.大肠杆菌胞嘧啶生产菌株的构建及发酵优化[D].天津:天津科技大学,2022.
[38] 方海田,谢希贤,徐庆阳,等.微生物发酵法生产胞嘧啶核苷的研究进展[J].发酵科技通讯,2010,39(3):48-51.
[39] 李国梁.代谢工程改造大肠杆菌制备尿苷[D].天津:天津科技大学,2018.
[40] 周陈力,万佳宁,卢绪志,等. 灵芝尿嘧啶营养缺陷型菌株的筛选和分子鉴定[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2657-2664.
[41] 袁辉.代谢工程改造枯草芽孢杆菌生产尿苷的研究[D].天津:天津科技大学,2017.
[42] 刘益宁.代谢工程改造大肠杆菌生产胞苷[D].天津:天津科技大学,2021.
[43] Wang Y, Ma R, Liu L, et al. Improvement of uridine production in *Bacillus subtilis* by metabolic engineering[J]. Biotechnology Letters, 2018, 40(1): 151-155.
[44] Zhang X, Wang C, Liu L, et al. Improve uridine production by modifying related metabolic pathways in *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology Letters, 2020, 42: 551-555.
[45] 姚卓越,李然,蒋帅,等.代谢工程改造大肠杆菌生产胸苷[J]. 生物工程学报,2024,40(8):2432-2443.
[46] Kim K, Lee J, Kim DH, et al. A new synthetic analogue of thymidine, 7-(3-bromo-phenoxy)-thymidine, inhibits the proliferation of tumor cells[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005, 15(1): 77-79.
[47] 任宇杰,单成俊,王英,等. 降解嘌呤核苷乳酸菌的筛选及益生特性探索[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 541-552.
[48] 程功,徐建中,郭燕风,等. 常压室温等离子体诱变选育L-精氨酸生产菌及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 360-369.
[49] 相凯文,李丹丹,郭自春,等. 一株高产吲哚乙酸促生菌的筛选鉴定、条件优化、应用效果及其代谢途径[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2599-2612.
[50] 王杰,王晨,杜燕,等. 枯草芽孢杆菌表达和分泌异源蛋白的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2815-2826.
[51] Meanwell M, Silverman SM, Lehmann J, et al. A short de novo synthesis of nucleoside analogs[J]. Science, 2020, 369 (6504): 725-730.
[52] Dai Z, Han B, Li Z, et al. Modularized reconstruction of pyrimidine pathway in *Escherichia coli* for enhanced pyrimidine nucleosides biosynthesis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2023, 200: 109101.
[53] Salihovic A, Ascham A, Taladriz-Sender A, et al. Gram-scale enzymatic synthesis of 2′-deoxyribonucleoside analogues using nucleoside transglycosylase-2[J]. Chemical Science, 2024, 15(37): 15399-15407.
[54] Guillou A, Peyrottes S, Vasseur J, et al. The hydrazine moiety in the synthesis of modified nucleosides and nucleotides[J]. ChemMedChem, 2024, 19(16): e202400234.
[55] Pfeiffer M, Nidetzky B. Biocatalytic cascade transformations for the synthesis of C-nucleosides and N-nucleoside analogs[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2023, 79: 102873.
[56] Salihovic A, Ascham A, Taladriz-Sender A, et al. Gram-scale enzymatic synthesis of 2′-deoxyribonucleoside analogues using nucleoside transglycosylase-2[J]. Chemical Science, 2024, 15(37): 15399-15407.
[57] Zhang X, Niu P, Liu H, et al. Production of pyrimidine nucleosides in microbial systems via metabolic engineering: Theoretical analysis research and prospects[J]. Biotechnology Advances, 2024, 75: 108419.
[58] Dai Z, Han B, Li Z, et al. Modularized reconstruction of pyrimidine pathway in *Escherichia coli* for enhanced pyrimidine nucleosides biosynthesis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2023, 200: 109101.
[59] Wang Q, Chen K, Wang Y, et al. Biotechnological synthesis of nucleoside analogs: Recent progress and perspectives[J]. Green Synthesis and Catalysis, 2025,6(1): 10-25.
[60] Wang C, Cao Y, Wang Y, et al. Enhancing surfactin production by using systematic CRISPRi repression to screen amino acid biosynthesis genes in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 90.