

生物发酵法生产 L-色氨酸的研究进展

沈冠同¹, 刘亚琦¹, 吉南希¹, 张媛媛^{2,3}, 王钦宏^{2,3*}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

沈冠同, 刘亚琦, 吉南希, 张媛媛, 王钦宏. 生物发酵法生产 L-色氨酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 621-643.
SHEN Guantong, LIU Yaqi, JI Nanxi, ZHANG Yuanyuan, WANG Qinhong. Advances in fermentative production of L-tryptophan: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 621-643.

摘要: L-色氨酸是一种人体必需的氨基酸, 广泛应用于食品、医药和饲料生产等行业。目前, 生物发酵法生产 L-色氨酸的工程菌株多为大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌, 其主要通过代谢工程和合成生物学等理性方法改造获得。但由于在微生物细胞中 L-色氨酸的代谢途径长、调控机制复杂且尚不清晰, 生产菌株仍存在生产效率低、鲁棒性差等问题, 经常需要通过适应进化等非理性方法改造提升菌株的生产能力。本文综述了 L-色氨酸合成代谢与调控、生产菌株构建改造与优化以及发酵生产应用的相关进展, 并简单展望了未来发展趋势, 可为后续相关研发和应用提供借鉴和参考。

关键词: L-色氨酸; 生物发酵; 代谢工程; 合成生物学; 适应进化

Advances in fermentative production of L-tryptophan: a review

SHEN Guantong¹, LIU Yaqi¹, JI Nanxi¹, ZHANG Yuanyuan^{2,3}, WANG Qinhong^{2,3*}

1 School of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Science, Tianjin 300308, China

3 National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

Abstract: L-tryptophan is an essential amino acid that is widely used in food, medicine and feed sectors. L-tryptophan can be produced through fermentation, and the main producing strains are engineered *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*, which are constructed by rational design methods based on metabolic engineering and synthetic biology. However, due to

资助项目: 国家大学生创业创新训练计划(202210057049); 国家重点研发计划(2021YFC2103300)

This work was supported by the National Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (202210057049) and the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103300).

*Corresponding author. E-mail: wang_qh@tib.cas.cn

Received: 2023-06-01; Accepted: 2023-08-25; Published online: 2023-09-18

the long metabolic pathway, complex and unclear regulatory mechanism for L-tryptophan production in microbial cells, the production efficiency and robustness of L-tryptophan producing strains are still low. In this connection, irrational design methods such as laboratory adaptive evolution, are often applied to improve the performance of L-tryptophan producing strains. This review summarizes the recent progress on biosynthesis metabolism of L-tryptophan and its regulation, the construction and optimization of L-tryptophan producing strains, and fermentative production of L-tryptophan, and prospects future development perspective. This review may facilitate research and development for fermentative production of L-tryptophan.

Keywords: L-tryptophan; fermentative production; metabolic engineering; synthetic biology; adaptive evolution

L-色氨酸(L-tryptophan, L-Trp)是 20 种蛋白质氨基酸中的一种,也是哺乳动物所必需的氨基酸。色氨酸,又名 α -氨基- β -吲哚丙酸,是一种在碱性条件下稳定的晶体,于 1901 年首次被 Hopkins 发现并分离得到。色氨酸共有 3 种同分异构体, L-色氨酸、D-色氨酸及两种异构体的消旋混合物 DL-色氨酸,而只有 L-色氨酸参与人体的代谢功能。L-色氨酸是构成体蛋白的重要组成部分,参与调控蛋白质的合成、脂肪代谢,同时与其他物质,如碳水化合物、维生素和微量元素等的代谢调控也有着非常紧密的关系^[1]。因此, L-色氨酸是生物体内重要的代谢产物,在生理和代谢过程中具有至关重要的作用。目前 L-色氨酸在医药、食品和饲料等领域被广泛应用。在医药领域, L-色氨酸可以作为药物直接在临床中使用^[2],也可以作为前体用于一些药物的生产,如紫色杆菌素^[3];在食品领域, L-色氨酸可以作为食品添加剂起到补充营养、调味和防腐的作用;在饲料领域, L-色氨酸可以作为添加剂加入到饲料中,以达到提高转化率和生长速度、降低应激性、提高免疫力等目的^[4];在其他方面,根据其性质, L-色氨酸可以应用到化妆品、环境检测和农业等领域^[5-7]。截至目前, L-色氨酸的市场需求已经超过了 28 000 t/年,且该产品的市场规模仍然在不断扩大。但是,较为落后的生产技术导

致 L-色氨酸的生产成本高、产量较低,进而限制了其更大规模的应用。因此,如何降低生产成本、提高生产效率,成为近几年该领域的研究重点。

L-色氨酸最早通过酪蛋白水解和分离提取获得,是 L-色氨酸工业化生产的最早应用。但是,天然水解法生产 L-色氨酸面临着成本高、污染严重和工艺复杂等问题^[8-9],导致无法实现大规模生产,而随后出现的化学合成法解决了部分问题,并取代了蛋白水解法成为 L-色氨酸生产的主流工艺。由于化学合成法生产步骤繁琐,且对环境污染较大,也无法完全保证产品的安全性,因此依旧需要更好的方法进行更高效的生产。随着生物技术的发展,酶转化法、微生物转化法和微生物发酵法等实现应用^[10-12]。虽然国内已有成熟的酶转化法生产 L-色氨酸的相关报道^[13],但酶转化法对原料需求较大,底物 L-丝氨酸价格昂贵,几乎与 L-色氨酸相当^[14]。同时,酶容易在生产过程中失活,不利于大规模生产,而微生物转化法的不足之处在于当转化液中前体物浓度较高时,转化率有所下降。另外,前体物价格比较贵,也不利于降低成本^[12]。因此虽然以上两种转化法都已经拥有一定的工业化产业规模,但是无法有效降低生产成本,实现更大规模的应用。相比酶和微生物转化法,通过大肠杆菌或谷氨酸棒杆菌等构建生产菌株并直接发

酵产生 L-色氨酸的微生物发酵法具有成本低、工艺环保、细胞密度高和生产效率高^[15]等特点,将是未来 L-色氨酸工业化生产的首选技术^[16],也是目前该领域的主要研究方向^[17]。

1 L-色氨酸的合成代谢与调控

由于 L-色氨酸在细胞内代谢途径众多,其生物合成途径受到多水平的高度调控,很难在细胞中实现高浓度的积累,通过自然筛选难以得到具有较高产量的天然生产菌株,这也极大地提高了通过代谢改造等获得高产菌株的难度^[18]。长期以来,对于高产 L-色氨酸菌株的构建一直采用随机诱变和选择的方法,但这种方法产生的遗传背景往往不明确^[19]。虽然目前在高效 L-色氨酸菌株的构建过程中,已广泛使用了代谢工程、合成生物学等方法,并且已取得了一系列的重要成果,但 L-色氨酸发酵生产仍存在菌株生产强度不高、环境耐受性差、生产效率低等突出问题,这导致其生产成本仍旧较高^[20-21]。因此,需要深入认识 L-色氨酸的合成代谢与调控机制,为构建高效生产菌株奠定基础。

1.1 微生物合成 L-色氨酸的代谢途径

虽然通过谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌等细菌生产 L-色氨酸的方法均有报道,但目前依旧以大肠杆菌生产为主。在大肠杆菌中,L-色氨酸的代谢途径如图 1 所示,可以分为以下 3 个部分的代谢途径。

1.1.1 前体物代谢途径

L-色氨酸生物合成需要 2 个最重要的物质:赤藓糖-4-磷酸(erythrose-4-phosphate, E4P)和磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP),二者分别由作为起始物质的葡萄糖通过磷酸戊糖途径(hexose monophosphate pathway, HMP)和糖酵解途径(Embden-Meyerhof-Parnas pathway,

EMP)形成,随后, E4P 和 PEP 在 3-脱氧- α -阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸合成酶的催化作用下形成 3-脱氧- α -阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP)。一般认为, PEP 和 E4P 这两个前体物的供给能力对 L-色氨酸的代谢具有决定性作用,其直接决定了进入芳香族氨基酸共同途径(或者也称为莽草酸途径)的物质流量^[7]。

1.1.2 芳香族氨基酸共同途径

DAHP 在共同途径中经过一系列酶催化反应,前后分别形成 3-脱氢莽草酸(3-dehydroshikimate, DHS)、莽草酸(shikimate, SHIK)和 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate, ESPS)等物质,最终形成分支酸(chorismic acid, CHA)并分别进入 L-色氨酸、L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸分支途径^[22]。芳香族氨基酸共同途径使植物和微生物将碳水化合物的代谢与芳香族化合物的生物合成关联,对微生物具有重要意义,也对 L-色氨酸生物合成有重要的影响。

1.1.3 L-色氨酸分支途径

CHA 在分支途径中可以进入 L-色氨酸、L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸分支途径中的一个途径,并经过各自代谢途径生成相应的芳香族氨基酸。在 CHA 合成 L-色氨酸过程中,醋酸厌氧酮(anoethisterone acetate, ANTA)和 5-磷酸核糖基邻氨基苯甲酸(5-phosphoribosylanthranilate, PRANT)依次被邻氨基甲酸合成酶-磷酸核糖转移酶复合物分别催化;邻氨基甲酸合成酶由 2 个亚基组成,大亚基 TrpE 参与 CHA 和氨转化为 ANTA 的过程,小亚基 TrpD 起到提供氨基和参与 PRANT 合成的作用;随后, *trpC* 编码的 PRANT 异构酶将 PRANT 转化为吲哚-3-甘油磷酸(indole-3-glycerol phosphate, I3GP), I3GP 和 L-色氨酸再被由 *trpA* 和 *trpB* 编码的色氨酸合成酶复合物催化生成甘油醛-3-磷酸和 L-色氨酸^[23]。

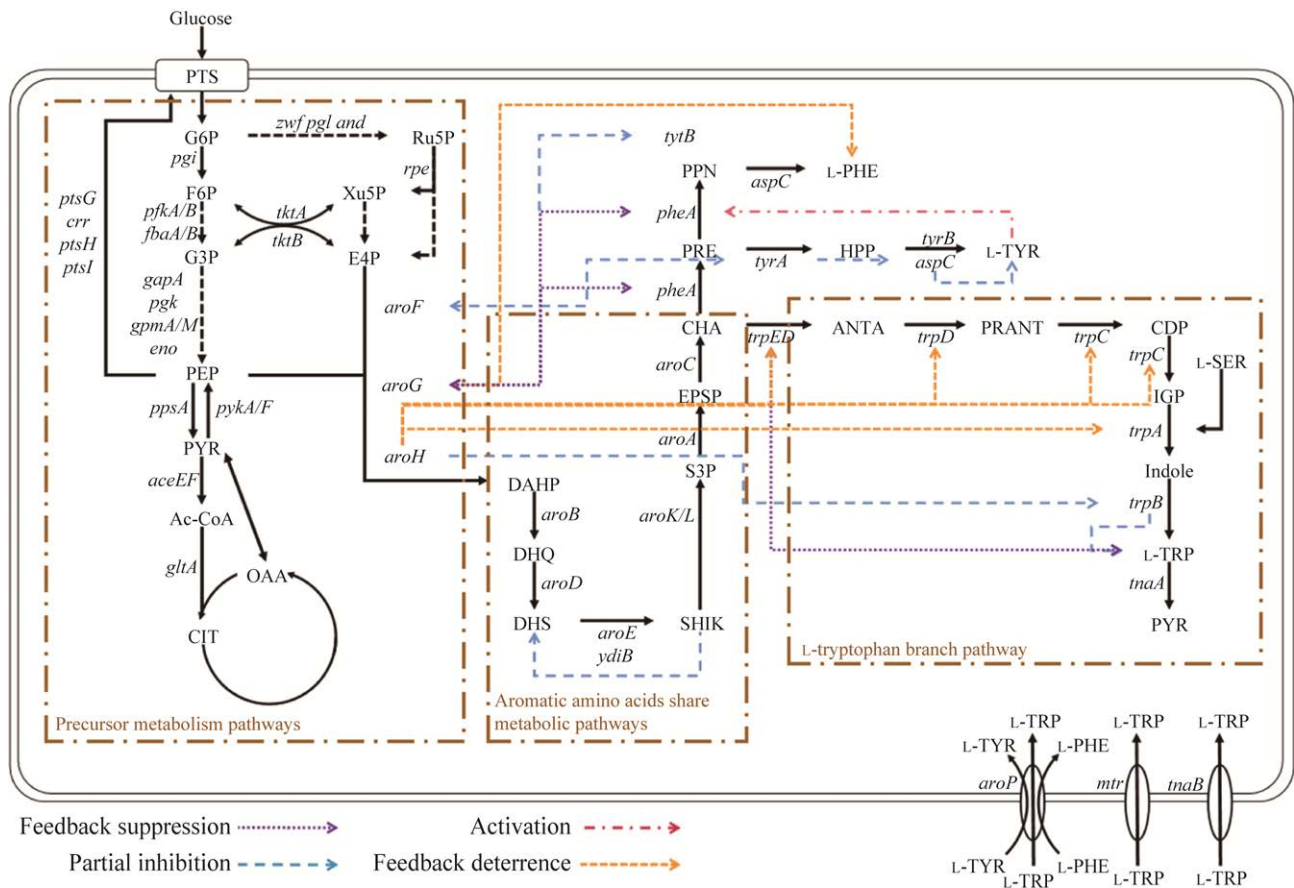


图 1 L-色氨酸合成代谢途径 PTS: 碳水化合物磷酸转移酶系统; G6P: 葡萄糖-6-磷酸; F6P: 果糖-6-磷酸; G3P: 甘油醛-3-磷酸; PEP: 磷酸烯醇丙酮酸; PYR: 丙酮酸; Ac-CoA: 乙酰辅酶 A; CIT: 柠檬酸; OAA: 草酰乙酸; Xu5P: 核糖-5-磷酸-酮糖; E4P: 赤藓糖-4-磷酸; Ru5P: 核糖-5-磷酸; PPN: 磷酸戊糖异构酶; PRE: 磷酸核糖异构酶; CHA: 分支酸; EPSP: 磷酸芳香族氨基酸; S3P: 3-磷酸景天庚酮糖; DAHP: 3-脱氧-阿拉伯糖-7-磷酸; DHQ: 3-脱氢奎尼酸合酶; DHS: 3-脱氢莽草酸; SHIK: 莽草酸; L-PHE: 苯丙氨酸; HPP: 对羟基苯丙酮酸; ANTA: 醋酸蒺乙酮; L-TRP: 色氨酸; L-TYR: 酪氨酸; PRANT: 磷酸核糖氨基苯甲酸; CDP: 胞嘧啶二磷酸; IGP: 印戈糖-3-磷酸; Indole: 吲哚; L-TRP: 色氨酸; PYR: 丙酮酸; L-SER: 丝氨酸

Figure 1 L-tryptophan synthetic metabolic pathway. PTS: Carbohydrate phosphotransferase system; G6P: Glucose-6-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate; G3P: Glyceraldehyde-3-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; PYR: Pyruvate; Ac-CoA: Acetyl-CoA; CIT: Citrate; OAA: Oxaloacetate; Xu5P: Ribulose-5-phosphate; E4P: Erythrose-4-phosphate; Ru5P: Ribose-5-phosphate; PPN: Phosphopentose isomerase; PRE: Phosphoribose epimerase; CHA: Chorismic acid; EPSP: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate; S3P: Sedoheptulose-3-phosphoserine; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; DHQ: 3-dehydroquininate; DHS: 3-dehydroshikimate; SHIK: Shikimate; L-PHE: L-phenylalanine; HPP: Hydroxyphenylpyruvate; ANTA: Anorethisterone acetate; L-TRP: L-tryptophan; L-TYR: L-tyrosine; PRANT: 5-phosphoribosylanthranilate; CDP: Cytidine diphosphate; IGP: Indole-3-glycerolphosphate; L-TRP: L-tryptophan; PYR: Pyruvate; L-SER: L-serine.

1.2 L-色氨酸合成的代谢调控

分析 L-色氨酸的相关代谢途径, 发现其在细胞内的合成具有代谢途径长、代谢去路多、转运与调控机制复杂的特征。同时胞内 L-色氨酸过量积累将打破细胞自身代谢平衡, 导致细胞过度表达或抑制某些生物分子, 从而对细胞产生毒副作用, 最终抑制细胞的生长^[23-24]。因此, 由于过量的 L-色氨酸将对细胞造成的生理毒性, L-色氨酸的大量合成进一步受到限制。

1.2.1 严谨的反馈调节

如上文所述, L-色氨酸在细胞内的浓度可以通过影响细胞内酶的活性和转录的方法达到阻碍 L-色氨酸进一步在细胞内合成的目的。

首先, DAHP 合成酶的活性在胞内 L-色氨酸、L-酪氨酸或 L-苯丙氨酸浓度过高时受到抑制, 反馈调节原理如图 2 所示^[25]。DAHP 合成酶是代谢途径的限速酶, 组成该酶的 3 个同工酶分别由 *aroG*、*aroF* 和 *aroH* 基因编码, 它们的活

性分别受到酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的调控, 其中 *aroG* 对 DAHP 合成酶的催化活性最好, 在 80%左右^[26]。相应氨基酸浓度过高将抑制 DAHP 合成酶的活性, 减少进入共同途径的碳流量。此时细胞内后续的共同途径所需的前体物质将减少, 最终降低 L-色氨酸合成效率。其次, 上述氨基酸对芳香族氨基酸共同途径中的一系列酶的活性和相关蛋白的合成都具有明显的调控作用, 通过限制共同途径的代谢流量减少了多种氨基酸的过度聚集的可能。最后, 单种氨基酸能够在分支途径中对相应酶活性产生反馈抑制, L-色氨酸、L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸之间的浓度关系将直接影响 CHA 进入不同分支途径的数量, 从而避免了单一氨基酸的过度积累。

有报道指出^[27-29], 邻氨基苯甲酸合成酶 (TrpED)、分支酸异构酶 (PheA) 和预苯酸脱水酶 (TyrA) 在分支途径中控制 CHA 的代谢去向, 分别起到催化作用并受到 L-色氨酸、L-苯丙氨酸和

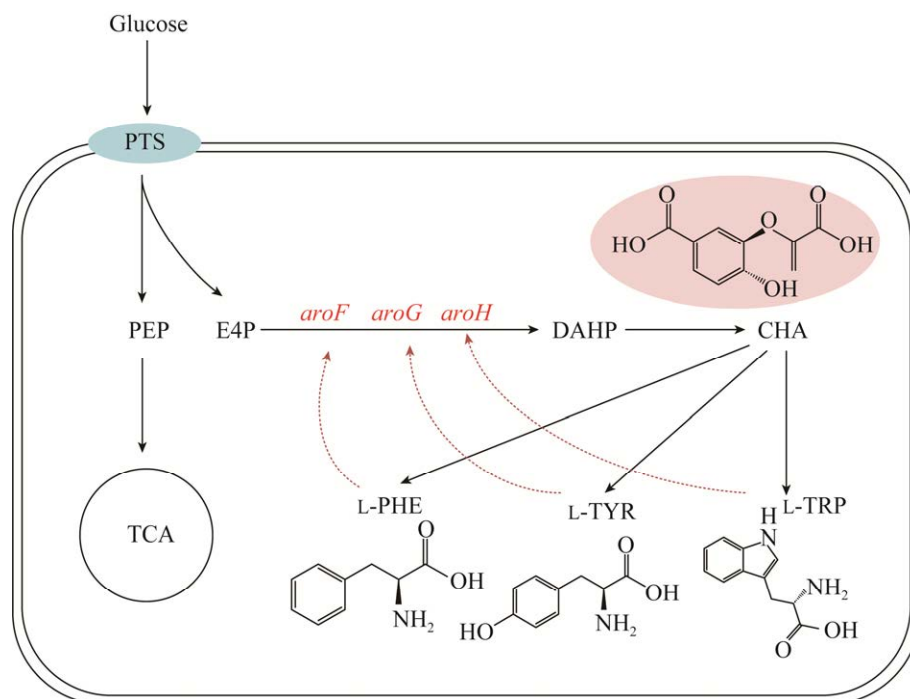


图 2 L-色氨酸在细胞内反馈调节原理

Figure 2 Feedback regulation of L-tryptophan in cells.

L-酪氨酸的反馈抑制。这些催化酶在氨基酸合成中起到调控作用,限制了大量氨基酸在胞内的大量累积。

另外,有研究指出^[30-31],色氨酸操纵子是大肠杆菌将 CHA 转化为 L-色氨酸的主导调控因子, *trpR* 基因是这个操纵子的上游基因之一,编码 *trpR* 阻遏蛋白。在菌体中的 L-色氨酸浓度过高时,通过 *trpR* 阻遏蛋白的作用,操纵子的转录效率将被降低。同时,色氨酸操纵子的序列中包含了一段衰减子序列,在菌体内的 L-色氨酸浓度过高时,这段序列将通过改变二级结构抑制操纵子的转录。

在细胞内 L-色氨酸浓度过高时抑制相应酶的转录和活性是菌体对自身的一种保护机制,避免了氨基酸的过度聚集扰乱细胞的代谢平衡,从而保持细胞的代谢活性。但是,这也加大了提高细胞内 L-色氨酸积累的难度,通过解除某个单一酶的来自 L-色氨酸的反馈抑制作用,无法实现 L-色氨酸产量的大量提升。

1.2.2 降解途径众多

L-色氨酸在胞内的代谢去路众多,这与其在细胞内的重要功能有关。L-色氨酸在蛋白质内的含量低于 1%,但对蛋白质的合成至关重要,因而蛋白质合成是 L-色氨酸的主要分解途径之一。此外, L-色氨酸在细胞中的代谢产物对细胞的正常代谢起到重要作用,与细胞增殖等基本功能有直接关系,如合成 5-羟色胺及褪黑素、犬尿氨酸-烟酸途径分解代谢途径,都会消耗大量 L-色氨酸,使得 L-色氨酸的积累困难。

细胞对 L-色氨酸合成代谢的另一重要调控途径在于,当细胞内 L-色氨酸浓度过高时,色氨酸酶(*tnaA* 基因编码)会起到降解 L-色氨酸的作用,使得 L-色氨酸在细胞内的积累变得困难。

1.2.3 转运系统限制

L-色氨酸往往被细胞高效的吸收系统吸收,

同时细胞缺乏高效的 L-色氨酸外排系统,使 L-色氨酸的胞外积累受到影响。在大肠杆菌中,有 3 个转运基因可以对 L-色氨酸的吸收起到调控作用,分别是 *mtr*、*tnaB* 和 *aroP* 基因,其中, *mtr* 和 *tnaB* 基因分别编码两种亲和性不同的通透酶,这两种酶对 L-色氨酸都具有专一性。由 *aroP* 基因编码的转运酶对 L-色氨酸没有专一性,它也可以转运 L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸。同时,谷氨酸棒杆菌对 L-色氨酸的吸收完全由 *aroP* 基因调控。但是目前对 L-色氨酸的外排系统的研究仍未能清楚解析其机理,调控方法尚不可知。

2 L-色氨酸生产菌株构建

为构建高效生产 L-色氨酸的菌株,研究者针对限制 L-色氨酸合成的主要因素,采用传统的诱变育种和多种代谢工程策略对菌株进行了系统改造优化,目前已经取得了一系列卓有成效的成果。

2.1 增强前体物质合成

上文提到, L-色氨酸在细胞内拥有多步骤且复杂的合成途径,所需要的前体物质众多。然而,这些前体物质在细胞内又广泛参与各种物质的代谢反应。因此,增强细胞内前体物质的合成或限制前体物质在其他代谢途径中的消耗是增强 L-色氨酸合成能力的有效方法(图 2)。Li 等^[32]通过优化前体供应和调节辅助因子平衡的方法将大肠杆菌 L-色氨酸生产菌的产量提升了 276%;陈立平^[33]通过对大肠杆菌 L-色氨酸生产菌进行诱变筛选,使 L-色氨酸产量达到 55.1 g/L;熊博^[34]通过对大肠杆菌 L-色氨酸工程菌的代谢优化,得到一株 40 h 内 L-色氨酸产量达到约 42 g/L、糖酸转化率达到约 0.23 g/g 的 L-色氨酸生产菌。

2.1.1 促进 DAHP 合成

DAHP 合成速率的提升是增加进入共同途径的碳流量的关键(图 2),也是促进 L-色氨酸在细胞内过量累积的可行方法。

作为 DAHP 合成的前体物质,通过促进 PEP 和 E4P 的合成可以提升 DAHP 的合成速率。在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中,磷酸转移酶系统(carbohydrate phosphotransferase system, PTS)起到葡萄糖转运和磷酸化过程的作用,吴晨等^[35]和吴涛等^[36]通过对 PTS 系统的改造加强了对葡萄糖的转运,分别将 L-丙氨酸的产量提高到 59.00 g/L、L-色氨酸的产量提升 25.9%。作为重要的中间代谢物,PEP 在细胞内的代谢途径众多,流入芳香族氨基酸共同途径的 PEP 数量较少,故研究人员主要改造工作集中在减少 PEP 在其他代谢途径的流出,及增加 PEP 在芳香族氨基酸共同途径的流入。由于细胞内 E4P 的合成较少,远低于 PEP,故提升 E4P 的合成是改造的重要策略。细胞中 PEP 合酶(*ppsA* 基因编码)直接作用于 PEP 的合成,碳贮存调节因子(*csrA*)则通过抑制 *ppsA* 的活性从而降低 PEP 的合成速率,转酮醇酶(*TktA*)是合成 E4P 的关键酶。Xiong 等^[21]通过重新分配中心碳代谢的方式,提升了大肠杆菌 L-色氨酸生产菌的 PEP 和 E4P 含量,最终得到发酵 40 h 时 L-色氨酸产量达到 41.7 g/L 的生产菌株。Tatarko 等^[37]通过敲除 *csrA* 基因和过表达 *tktA* 基因的方式,分别使下游的 L-Phe 的产量提高 2 倍和 1.4 倍。Du 等^[38]通过修改大肠杆菌的中心代谢途径,增强了 PEP 的浓度,将菌株的 L-色氨酸产量提升至约 49 g/L。Yakandawala 等^[39]和路丽君等^[40]则分别证明了抑制 *csrB* 基因的表达可以分别提升细胞内 L-Phe 和 L-色氨酸的产量。在这一过程中,部分研究忽视了代谢副产物对细胞代谢平衡的影响^[41],这一途径的过度优化带来的后果是否能被细胞

控制仍需要考虑。*pykA* 和 *pykF* 是丙酮酸激酶的两种同工酶,其中 *pykF* 起到了主要作用,其活性远大于 *pykA*^[42]。Siddiquee 等^[43]通过敲除 *pykF* 基因降低了大肠杆菌中丙酮酸通向 PEP 的流量。Li 等^[44]通过破坏 *pykA* 和 *pykF* 保存了丙酮酸以生产 4-HPA。Liu 等^[45]通过敲除 *pykA* 和 *pykF* 基因以增强 SA 的合成。在合成 DAHP 的过程中,E4P 和 PEP 的消耗呈固定比例,因为单一物质过多合成将导致代谢副产物的不必要积累。为了解决这一问题,可以调节 E4P 和 PEP 的供应比例。Guo 等^[46]分别用高表达启动子表达 *aroG* 和 *tktA*,用中等表达启动子表达 *ppsA*,最终使得改造菌株色氨酸产量提高 16.4%,也证明了调节前体物的供应是提高 L-色氨酸产量的重要方式。

DAHP 合成酶的 3 个同工酶活性分别受到相应氨基酸的抑制,Hagino 等^[47]发现当 L-色氨酸、L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸同时存在时,其对 DAHP 合成酶的抑制作用可以达到接近 90%,高于任何一种氨基酸单独存在的情况。因此,解除或部分解除氨基酸对 DAHP 合成酶的抑制是提高 L-色氨酸产量的重要途径。郝大利等^[48]通过对 *aroG* 基因进行定点突变,降低了苯丙氨酸对 *aroG* 的抑制作用,得到一株色氨酸产量提升 1.4 倍的大肠杆菌。李晓萍等^[49]通过 DNA 改组(DNA shuffling)构建了一株部分解除苯丙氨酸反馈抑制的 *aroG* 的大肠杆菌。李明明^[50]通过定点突变 *aroG* 基因并过量表达 *ppsA* 和 *tktA* 基因的方式将莽草酸浓度提升 6.22 倍。

2.1.2 强化共同途径中的酶活性

在共同途径中,SHIK、EPSP 及 CHA 等物质都是重要中间代谢物之一(图 2)。虽然已经有通过提升 PEP 和 E4P 产量的方式提高共同途径效率的案例^[50],但共同途径中一系列酶的活性受限仍然是阻碍其合成效率的重要因素。部分研究通过加强相关基因的表达增加了下游物质的

累积,而也有部分研究通过减弱部分基因的表达减少了相关物质沿莽草酸途径的代谢,也从反面证明了这些基因的表达蛋白在共同途径中起到重要作用。Vitayakritsirikul 等^[51]通过过表达委内瑞拉链霉菌的 *aroB* 和 *aroK* 基因,提升了 CHA 的产量,最终实现了氯霉素产量的提高;Liu 等^[52]通过过表达 *aroA* 和 *aroD* 基因使 SA 的产量达到原菌株的两倍,其中 *aroD* 对 SA 产量的提升效果最为明显;马延和等^[53]通过减弱 *aroE* 基因表达,实现了对 DHS 的代谢抑制;聂立斌等^[54]敲除了谷氨酸棒杆菌的 *aroK* 基因,阻止 SHIK 形成 S3P,实现莽草酸的积累;Pan 等^[55]通过过表达 *ydiB*、*aroK* 和 *yjgB* (编码醛还原酶)基因,实现了 L-苯丙氨酸的过量生产;Schoenenberger 等^[56]对 *aroL* 基因重组,提高了 S3P 的合成效率;汪莉等^[57]通过敲除大肠杆菌的 *aroL* 和 *aroK* 基因,为细胞直接发酵生产 SHIK 奠定了基础;Fujiwara 等^[58]通过过表达 *AroC* 和 *AroD* 基因增加了莽草酸途径的碳流量,使得下游产物粘康酸产量提升。

2.2 增强 L-色氨酸分支途径

在共同代谢途径后,L-色氨酸、L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸代谢途径都可以作为 CHA 的代谢途径。因此,要提高 L-色氨酸的产量,需要通过代谢调控的方法使尽可能多的 CHA 流向 L-色氨酸代谢途径。

2.2.1 阻断 L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸的代谢途径

上文提到,L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸的合成途径分别受到 *pheA* 基因和 *tyrA* 基因的限制,而这两种酶的活性又分别被 L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸反馈抑制。因此,阻断 L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸的代谢途径不仅可以使更多的 CHA 流向 L-色氨酸途径,同时也可以减少这两种氨基酸在共同途径和中心代谢途径中的反馈抑制,而弱化 *pheA* 基因和 *tyrA* 基因的表达或降低这两种酶的活性

是阻断 L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸代谢途径的主要方法。有文章报道^[59]通过向谷氨酸棒杆菌的 *tyrA* 基因座中插入 *aroG-pheA* 基因,从而降低酪氨酸产量,提高 L-苯丙氨酸的产量;Tanemura 等^[27]通过将鼠伤寒沙门氏菌的 *pheA* 和 *tyrA* 基因突变,减少了其 *trpD* 基因突变带来的影响,增加了 L-色氨酸的产量;王钦^[60]通过敲除大肠杆菌的 *pheA* 基因,将该工程菌的 L-酪氨酸的产量由 3.12 g/L 提高到 4.42 g/L;Xu 等^[61]证明了在缺少 *pheA* 基因的情况下 L-酪氨酸的产量可以得到显著提升;蒋婕^[62]通过敲除大肠杆菌的 *pheA* 和 *tyrA* 基因,显著提高了 *trpD* 和 *trpE* 基因的表达量。但是,上述部分报道也发现由于代谢途径的阻断,生产菌成为营养缺陷型菌株或细胞无法正常生长,因此,在减少这些分支代谢途径时,应尽量保证维持细胞生理活性的正常代谢不受干扰。

2.2.2 疏通 L-色氨酸分支代谢途径

除了去除以上两个分支代谢途径,也有研究通过增强 L-色氨酸代谢途径的方式增加 L-色氨酸的产量,主要的增强途径包括相应合成酶的反馈抑制解除和过表达。Zhao 等^[6]通过解除 *trpED* 和 *aroF* 的反馈抑制并敲除 *pheA* 和 *tyrA* 等基因,将 L-色氨酸的产量提升至 13.3 g/L;郝大利等^[48]将 *aroG* 基因与 *trpBA* 基因串联实现过表达,使大肠杆菌的 L-色氨酸产量提高 823%;Chen 等^[63]通过设计分析,发现提升 L-谷氨酰胺细胞内的浓度有利于在一定程度上有效解除 L-色氨酸的生物合成限制。另外,为了防止细胞中的 L-色氨酸被合成为吡啶,应当降低 *tnaA* 基因的表达以减少色氨酸酶(TNase)的产生。Ding 等^[19]分析了大肠杆菌色氨酸生产菌的遗传特征,发现 *tnaA* 的缺失是最主要影响因素之一。在胞内 L-色氨酸浓度过高时,色氨酸操纵子通过降低相应基因的转录和酶的活性减少 CHA 流入色氨酸途径,

trpR 是色氨酸操纵子中的关键基因之一。因此, 敲除该基因有利于 L-色氨酸在细胞内的进一步积累。李剑欣等^[28]向 *trpR* 和 *tnaA* 双基因缺失的大肠杆菌中加入抗反馈抑制的 *aroG* 及 *trpED* 基因, 最终 L-色氨酸含量为 0.168 g/L; Aiba 等^[64]以 *trpR/tnaA* 双基因缺失的大肠杆菌为模板构建 L-色氨酸生产菌株, 产量达 30 g/L。

2.3 改造转运系统

胞内 L-色氨酸浓度过高时, 会扰乱细胞代谢平衡, 对细胞产生生理毒性。因此, 降低 L-色氨酸在细胞内的含量是提升 L-色氨酸产量的关键因素之一。但是, 由于目前对 L-色氨酸的分泌机理仍不清楚, 因此对转运系统的修饰主要集中在吸收途径的阻断。

马温华等^[65]敲除了北京棒杆菌的 *aroP* 基因, 将 L-色氨酸的积累量提高了 65%; Liu 等^[66]破坏了 *aroP* 基因, 将大肠杆菌的 L-色氨酸产量提高了 13.3%; 陈巧红^[67]构建了 *trpR/tnaB* 双基因敲除菌并优化培养基, 将 L-色氨酸产量提高到 145.3%; 古鹏飞^[68]通过构建 *AroP/TnaB* 双敲除菌株将 L-色氨酸的产量提升至 2.44 g/L, 但 *mtr/AroP* 双基因敲除菌和 *mtr/tnaB* 双基因敲除菌的 L-色氨酸产量下降明显; 李晶等^[69]通过敲除 *mtr* 基因, 将工程菌的 L-色氨酸产量提高到 35.87 g/L, 是出发菌株的 132%; 赵志军等^[70]通过敲除 *mtr. tnaB* 和 *mtr. aroP* 基因, L-色氨酸产量较出发菌株分别提高 17%和 9%, 但将 *mtr*、*tnaB*、*aroP* 这 3 个基因全部敲除后, 菌体正常调控受到破坏, L-色氨酸产量急剧下降。

以上研究表明, 虽然弱化 L-色氨酸的转运酶调控基因的表达有利于部分解除反馈抑制, 但过度的转运功能确实会导致细菌难以正常生长, 其基本生理功能被破坏, 反而导致 L-色氨酸产量下降。因此, 通过建立一定的模型确定相应基因敲除或弱化的方式, 可以进一步提高 L-色氨

酸的产量。

yddG 基因编码的分泌蛋白是一种内膜蛋白 (inner membrane proteins, IMP), 是目前少数已知的大肠杆菌中可以分泌芳香族氨基酸的蛋白之一, *yddG* 基因的过表达有利于提升 L-苯丙氨酸、L-酪氨酸和 L-色氨酸的产量^[71-72]。Liu 等^[73]通过过表达 *yddG* 基因, 将培养基中 L-苯丙氨酸浓度增加, 提高了 L-苯丙氨酸的产量; Wang 等^[74]通过敲除大肠杆菌 *pta-mtr* 基因并过表达 *yddG* 基因, 使 L-色氨酸的产量较出发菌株提高了 48.68%; Liu 等^[75]通过基于 *iddG* 和 *aroP* 基因的修饰, 使 L-色氨酸生物合成途径的代谢通量重新分布, 其 L-色氨酸产量达到了 36.3 g/L。

以上增强前体物质合成等三种改造策略主要集中在大肠杆菌等细菌中, 改造策略主要汇总见表 1。

2.4 适应进化提升 L-色氨酸生产菌株性能

截至目前, 色氨酸工程菌株所受到的合成支路反馈抑制、色氨酸分解以及转运问题已经在一定程度上得到解决^[76-77], 目前限制直接发酵法生产 L-色氨酸的生产水平的一个重要因素是 L-色氨酸在胞内过量积累会对细胞产生生理毒性, 因此提高菌株对高浓度 L-色氨酸的耐受性对 L-色氨酸的发酵生产具有重大意义。由于缺少高效转运蛋白, 通过加速胞内 L-色氨酸的外排从而减少胞内 L-色氨酸的毒理作用的方法受到限制。而且高浓度 L-色氨酸对菌株产生生理毒性的机制及其耐受机理未知, 无法通过理性改造的方法提高菌株对高浓度 L-色氨酸的耐受能力。适应进化 (adaptive evolution) 被广泛应用于提高菌株对产物的耐受性, 并且通过比较基因组学等方法还可解析所得菌株的耐受机制, 从而为菌株理性改造提供新策略和新靶点。以丝氨酸为例, Mundhada 等^[24]对菌株进行适应性进化, 使菌株对丝氨酸的耐受性由 3 g/L 提高

表 1 已报道的部分 L-色氨酸大肠杆菌生产菌情况

Table 1 Summary of L-tryptophan production by some engineered *Escherichia coli*

Starting strain	Engineering strategy	Titer	Reference
<i>E. coli</i> KW001 (Tet ^r , PH5a1)	<i>BSglnA</i> replaces the original gene <i>glnA</i> , <i>::icD::gdhA</i> with J23119 promoter, <i>::prs</i> with <i>trc</i> promoter, <i>serA^{mut}</i> , <i>serA^{mut}-thrA^{mut}</i> , <i>::sthA-pntAB</i> with J23119 promoter, pXlltS	1.71 g/L (shake flask)	[31]
<i>E. coli</i> DJ-4322 (amino acid breeding room of Dacheng Biochemical Group)	UV mutagenesis	55.1 g/L	[32]
<i>E. coli</i> MG1655 (Lab stock)	$\Delta tnaAB$, <i>tyrR</i> <i>::P_{trc}-aroG^{S180F}-serA^{H344A,N364A}</i> , <i>trpE</i> <i>::P_{trc}-trpE^{S40F}</i> , <i>yjiV</i> <i>::P_{trc}-trpBA</i> , <i>yncl</i> <i>::P_{trc}-trpE^{S40F}</i> , <i>yeeP</i> <i>::P_{J23106}-ywkB</i> , <i>yghX</i> <i>::P_{trc}-xfpk</i> (<i>Bifidobacterium adolescentis</i>), <i>ptsG</i> <i>::P_{M1-12}-glf</i> (<i>Zymomonas mobilis</i>), <i>ycjV</i> <i>::P_{M1-12}-glk</i> , $\Delta pykF$, <i>ylbE</i> <i>::P_{pck}-pck</i> , <i>mbhA</i> <i>::P_{trc}-pyc^{P458S}</i> (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)	41.7 g/L	[33]
<i>E. coli</i> SA01 (CGMCC)	<i>ptsHIcrr⁻</i> , pMG43 <i>P_{tac}-glf-glk</i>	38.5 g/L	[35]
<i>E. coli</i> W3110 (Lab stock)	$\Delta lacI$, $\Delta tnaA$, Δmtr , <i>P_{trc}-trpE*</i> <i>::trpLE</i> , <i>P_{trc}-aroG*</i> <i>::tyrR</i> , $\Delta pykA$, Δppc , <i>P_{pck}-pck</i> <i>::ycjV</i> , <i>P_{citT}-citT</i> <i>::poxB</i> , <i>P_{lac}-acnBA-icD</i> <i>::yghx</i> , <i>P_{lac}-pyc</i> <i>::yjiV</i>	49 g/L	[37]
<i>E. coli</i> W3110 overexpressed <i>aroG^{fbr}</i> , <i>trpEDCBA</i>	$\Delta trpR$, $\Delta attenuator$, $\Delta pykF$, $\Delta ptsH$, M1-37 <i>::galP</i> , M1-93 <i>::glk</i> , inhibit <i>pta</i>	39.7 g/L	[40]
<i>E. coli</i> JM109	p <i>Etac-aroG^{fbr}-tac-trpBA</i>	19.5 mg/L (shake flask)	[46]
<i>E. coli</i> WSH-Z06 (pAP-B03)	pAP-B03 ⁻ , $\Delta pheA/tyrR$, pAP- <i>aroG^{fbr}-tyrA^{fbr}</i>	55.54 g/L	[58]
<i>E. coli</i> W3110 (Lab stock)	$\Delta lacU169$ <i>gal490λCI857</i> $\Delta(cro-bioA)$, <i>rpsL</i> (StrR), $\Delta aroF$, $\Delta aroG$, Δmtr , $\Delta tnaA$, $\Delta tnaB$, $\Delta \lambda^a$, <i>ΔaroH</i> <i>::P_{J23119-rpsL}-lac-(aroG^{S180F}-serA^{H344A/N364A})</i> , <i>P_{trc}-trpE^{S40F}DCBA</i>	40.3 g / L	[62]
<i>E. coli</i> FEC-01	$\Delta trpR$, $\Delta tnaB$	38.0 g/L	[65]
<i>E. coli</i> W3110 (Lab stock)	$\Delta trpR$ <i>::FRT</i> , $\Delta tnaA$ <i>::FRT</i> , $\Delta ptsG$ <i>::FRT</i> , $\Delta trpL$ <i>::5CPTacs</i> , pTAT, pMCAB	14.4 g/L	[66]
<i>E. coli</i> W3110 (Lab stock)	Δmtr , pTrp-01, pACYC177- <i>P_{tac}-yddG</i>	41.01 g/L	[67]
<i>E. coli</i> W3110 (Lab stock)	$\Delta trpR$, $\Delta tnaA$, Δmtr , $\Delta tnaB$	12.2 g/L	[68]
Par ^a ($\Delta trpR$, $\Delta tnaA$ /pSV-709/pMEL03)	Δpta , Δmtr , overexpress <i>yddG</i>	48.68 g/L	[72]
<i>E. coli</i> TRTH (TUST Industrial Culture Collection Center)	<i>yddG</i> +Cm ^R	36.3 g/L	[73]

到 100 g/L, 丝氨酸积累量为 37 g/L, 较出发菌株提高了 3 倍, 对进化菌株进行全基因组测序发现 *thrA* 基因突变对减缓丝氨酸的细胞毒性有重要的作用。

2.4.1 传统适应进化

适应进化是结合人工选择压力和模拟自然

进化中的编译和选择过程, 在实验室条件下实现微生物的定向进化, 达到从进化群体中筛选优良性状个体的方法(图 3)。

适应进化在微生物进化研究领域作为一种强有力的手段, 为研究影响工业生产菌株的部分因素(如表型、生产性能以及遗传稳定性等)作出

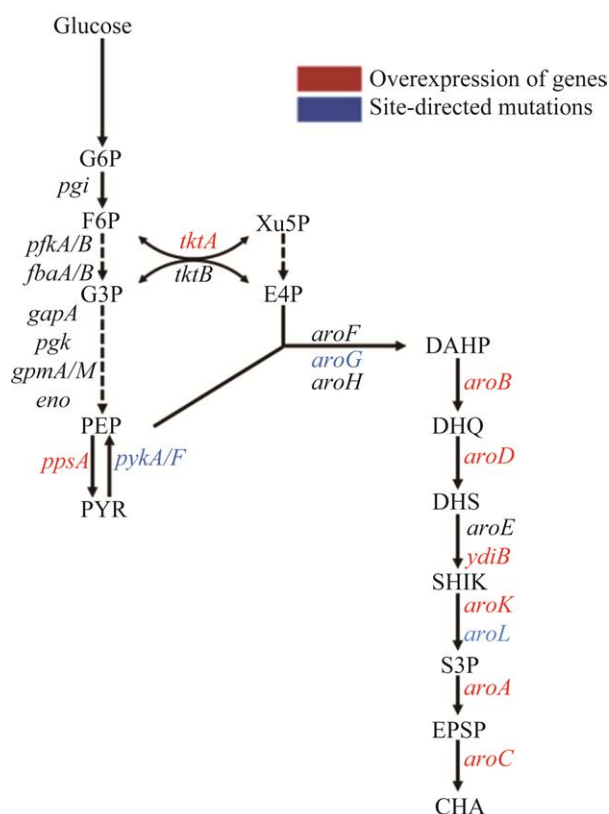


图3 L-色氨酸生产相关前体物质合成的重要基因
Figure 3 Key genes involved in the synthesis of precursor for L-tryptophan production.

了巨大贡献。相较于代谢工程需要明晰菌体复杂的代谢网络,适应进化只需设计实验目标对应的干扰因素,具有广泛的微生物适用性和极强的实用性,在发现新机制、实现表型优化发挥着重要作用,在筛选特定表型、生产性能和遗传稳定性的工业生产菌株等实验中被广泛采用,成为了微生物学研究的强大工具。适应进化根据使用需求不同,其主要应用可以分为以下4个方面:(1) 微生物代谢途径激活;(2) 微生物特定表型优化;(3) 特定底物的高效利用;(4) 毒性产物的耐受性优化^[78]。

但是在一定条件下,适应进化方法并不能得到有效发挥,比如适应进化在提高目标产物的生产时,会由于缺乏合适的筛选方法而难以

实现^[79];另外,在适应性进化的过程中,尤其是当利用适应进化的方法提高菌株对目标产物的耐受性时,菌株合成目标产物的能力常常会部分或全部丢失^[24]。细胞对目标产物的耐受机制是促使细胞降低产物合成,这可以作为造成这种现象的一种解释。为解决类似问题,有学者^[79]设计建立菌株生长和代谢物合成相偶联的算法,经过 *in silico* 预测后进行适应性进化实验,产率都得到了有效提高。还有研究将生物传感器和生长耦合并通过空间分离的方法改进进化策略,通过适应进化的方法提高目标产物的积累^[78]。

为了得到具有高 L-色氨酸耐受性的生产菌株,同时保证菌株的 L-色氨酸产量性状不发生丢失,可以选择采用高 L-色氨酸压力筛选-发酵测定得到产量性状保持菌株-更高 L-色氨酸压力的进化方式完成对 L-色氨酸生产菌株的进化和筛选,得到相应的高产菌(图 4)。同时可以通过测定进化菌的基因改变情况,解析其高产机理,最终回归理性的代谢改造得到更高产量的 L-色氨酸生产菌株。

2.4.2 生物传感器结合

适应进化虽然可以在一定程度上解决色氨酸生产菌株产量性状丢失和耐受难以提高的问题,但目前仍面临随机性较强、工作量过大的困难。因此,要快速通过实验室适应进化提升菌株对 L-色氨酸的耐受能力,本质上在于寻找一种高效筛选的方法,以减少通过常规发酵验证产量所需要的时间,从而大大减少得到具有目标形状菌株的时间。由于色氨酸是细胞代谢过程中的必需氨基酸,因此一些常用的筛选方法能起到一定作用,例如通过划线分离的方法寻找生长速度较快的菌株,避免分离得到营养缺陷型或渗漏缺陷型的菌株,从而得到具有正常产量性状的菌株。但是,由于色氨酸生产菌中色氨酸的累积量本身就存在过量的现象,且对细胞生长产生一定的毒

性作用,同时除色氨酸外影响细胞生长速率的因素众多,难以排除其他因素的干扰,因此有可能对筛选产生明显的干扰作用。由此,得到一种可以直接耦连细胞特定性状和色氨酸产量性状的方法十分必要。

生物传感器是合成生物学中广泛应用的元件,其可以通过感受相应物质的浓度大小从而调整下游基因的表达方式^[80]。通过将合成生物学元件与适应进化相结合,有利于细胞根据胞内色氨酸浓度的差异而表达不同强度的特定性状,从而为高效筛选提供条件。例如,张大伟等^[81]以 *tanC* 基因作为胞内色氨酸浓度的传感器,将荧光蛋白基因和生物传感器进行结合,使得荧光蛋白基因的表达与细胞的色氨酸产量关联。根据实验现象,L-色氨酸在细胞内累积程度的提升将促进 *tanC* 基因的表达,从而促进绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的形成,最终导致荧光蛋白 GFP 在细胞内浓度的增加,从而作为筛选条件之一。为了快速完成后续的筛选工作,确定可能具有产量性状提升的 L-色氨酸生产菌株,实验采用了流式筛选的高通量筛选方法,并以荧光值作为筛选条件进行筛选。最终,得到了一株 L-色氨酸生产菌,相较于出发菌株,其 L-色氨酸产量提升了约 500%。总言之,上述实验的总体流程为:向出发菌株加入生物传感器和荧光蛋白基因的组合质粒后经过诱变育种,随机进行单细胞分离并根据菌液的荧光强度初步筛选可能具有高产性状的菌株,并进行进一步发酵验证。该实验以一株经过改造的色氨酸生产菌作为出发菌,同样经过常温等离子体(atmospheric room temperature plasma, ARTP)诱变这种非理性的诱变方法,证明了将生物传感器作为筛选的辅助工具,表达特定生物性状,有利于生产菌株在非理性改造后的筛选。

除了荧光蛋白外,也可以使用菌落颜色等因素作为特定性状进行筛选。此类方法可以大大减少科研人员的工作量,并达到高效筛选的目的。但是,由于筛选过程仍需细胞的分离和纯化,同时快速筛选需要使用高通量筛选设备,因此虽然可以提升筛选速率,但仍较为烦琐。为简化筛选流程并得到具有相关产量性状的菌株,本实验室将目光聚集于菌株产量性状与生长性状的直接耦连。目前本实验室提出通过将生物传感器和抗生素基因结合的方法,即在细胞内色氨酸浓度提高的同时,细胞相应抗生素抗性也得到明显提高,即在适应性进化后,以特定抗生素作为选择性培养基的关键成分,以细胞能否正常生长作为筛选依据和结果,以此达到筛选目标性状菌株的目的。该实验方案解决了初步筛选过程中遇到的工作量过大的问题,同时将液体培养基中培养的菌液直接加入另一液体培养基中,在大大提高了筛选效率的同时,使后续的菌株富集与筛选在同一步骤中完成。通过此实验方案,有望建立一套针对生产菌株产量性状的更高效筛选方法,同时实现菌株耐受性的提升和产量性状的稳定,希望在未来能取得一定效果。

3 色氨酸衍生代谢物生物合成进展

以 L-色氨酸为底物,在不同酶的催化作用下可生成多种具有特殊功能的色氨酸衍生物,如生长素、5-羟色胺、靛红和靛蓝等(图 5),这些衍生物对人体健康都具有重要作用,它们的产业化生产和应用具有极高的经济价值和社会效益。在较长的一段时间内,由于前体 L-色氨酸在胞内难以累积,此类物质难以通过微生物大量合成,因此通过微生物发酵法进行工业生产受到限制。但是,经过上述对 L-色氨酸生产菌的改造,

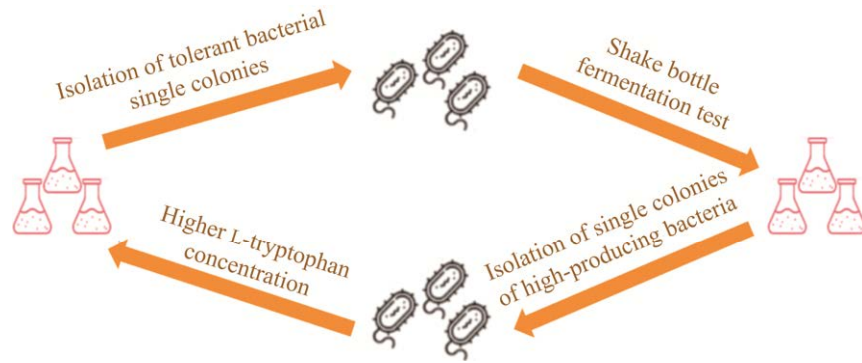


图 4 适应进化 L-色氨酸生产菌的实验流程示意

Figure 4 Schematic diagram of adaptive evolution of L-tryptophan producing strains.

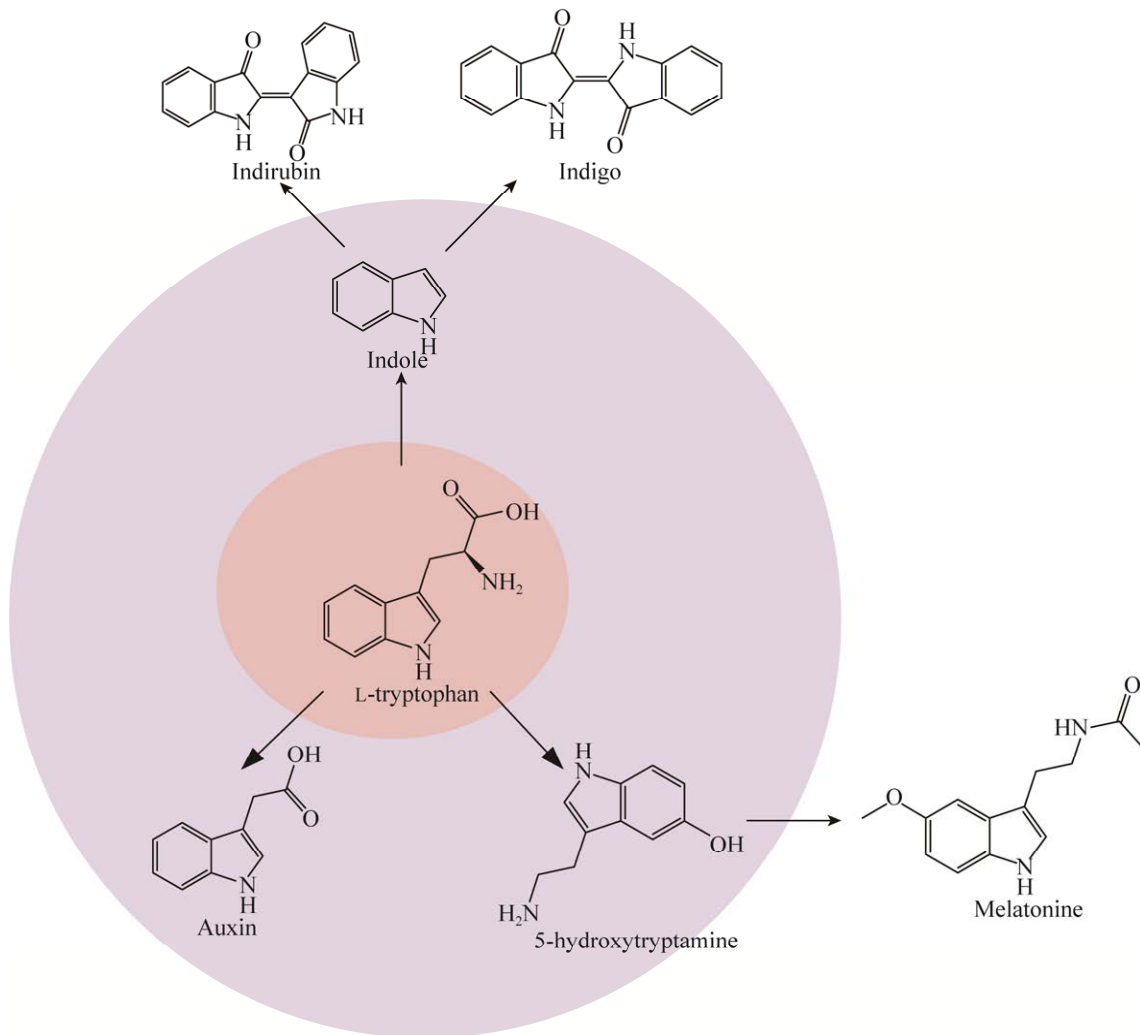


图 5 部分 L-色氨酸衍生物的结构式 L-色氨酸、吲哚、靛红、靛蓝、生长素、5-羟色胺、褪黑素

Figure 5 Part of the structural formulas of L-tryptophan derivatives. L-tryptophan, indole indole, indirubin, indigo indigo, auxin, 5-hydroxytryptamine, melatonin.

大肠杆菌在细胞内累积 L-色氨酸的问题已经得到部分解决,从而为通过大肠杆菌发酵生产 L-色氨酸奠定基础,而如何进一步提高 L-色氨酸衍生物产量是未来应关注的重点。

3.1 5-羟色胺生物合成进展

色氨酸经色氨酸 5-羟化酶(tryptophan 5-hydroxylase, TPH)催化生成 5-羟色氨酸,再经色氨酸脱羧酶(tryptophan decarboxylase, TDC)催化生成 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT), 5-HT 又名血清素,它在动物中可作为神经递质,具有抗氧化、抗炎和抗动脉粥样硬化功能,药用价值非常丰富。Park 等^[82]通过在大肠杆菌中异源表达 TDC 和色胺 5-羟化酶(T-5H)这两个关键生物合成酶,制备了 5-HT。TyrR 由 *tyrR* 基因编码,可以抑制芳香族氨基酸共同代谢途径的合成效率。N-肉桂酰血清素则是血清素的一种衍生物, Lee 等^[83]通过在敲除了 *tyrR* 基因的生产菌中过表达 T-5H,使得其合成血清素而不进一步合成 N-肉桂酰血清素。这些研究都为以 L-色氨酸为前体合成 5-HT 提供了借鉴和参考。

3.2 靛红和靛蓝生物合成进展

吲哚是细胞内 L-色氨酸的主要代谢途径之一,因此在 L-色氨酸生产菌中,常常减弱 *tnaA* 的表达或敲除该基因,以减少吲哚在细胞内的合成,促进 L-色氨酸在细胞内的累积。靛蓝和靛红都是吲哚的重要衍生物之一,具有广泛的应用。

人类利用靛蓝已经具有悠久的历史,产靛蓝的植物在传统医学中发挥重要作用,同时靛蓝本身也能作为一类天然的染料,对服饰、器物等进行染色^[84]。但靛蓝的生产工艺从最早天然提取到以化学合成为主,虽然解决了成本较高、杂质难以去除的问题,但由于部分危险化学物质残留,导致产品的安全性无法保证^[85]。靛红作为另一种吲哚衍生物,不仅在抗艾滋病、抗细菌等方面有重要活性,也与其他吲哚衍生物的合成有

重要关系。

色氨酸是吲哚的前体物质,因此吲哚衍生物的合成在含有较高浓度的 L-色氨酸时具有更高的效率。Gui 等^[86]构建了一株含有 *fmo* 基因的大肠杆菌生产菌,该生产菌株能在含有 2 g/L 色氨酸的培养基中产生 223.6 mg/L 的靛蓝,同时在加入 0.36 g/L 的半胱氨酸时,细胞的靛红产量大大提升。Du 等^[87]通过增加 *fmo* 基因和 *tnaA* 基因的产物浓度,完成了靛红的合成,随即通过敲除 *trpR* 基因、过表达 *tktA* 基因等方法,使细胞通过葡萄糖发酵生产靛蓝素的产量达到 0.056 g/L。

3.3 褪黑素生物合成进展

褪黑素(N-乙酰基-5-甲氧基色胺)在生物体中分布广泛,同时具有促进人体睡眠、抗衰老等功能,受到越来越广泛的关注^[88]。褪黑素在生物体内合成途径众多,但作为吲哚杂环类小分子,其合成途径都以 L-色氨酸为前体,同时每条合成褪黑素的途径都会经过 5-羟色胺这一中间代谢产物,因此 5-羟色胺的浓度将直接影响褪黑素的合成效率^[89]。Luo 等^[90]通过向大肠杆菌中导入异源芳香氨基酸脱羧酶基因 *ddc*,并定向进化编码色氨酸羟化酶的基因 *trpH*,得到的生产菌株褪黑素产量达到 2 g/L,同时,通过敲除 *yddG* 基因并外部补充 L-色氨酸的实验,证明了 L-色氨酸浓度的增加对褪黑素的高效合成具有重要作用。

4 L-色氨酸发酵生产优化

通过代谢工程的方法对 L-色氨酸生产菌进行理性代谢改造或通过实验室适应进化等方法进行非理性改造,这些都是基于细胞代谢途径的角度,除此之外,优化培养基或培养条件、优化提取工艺等方法也被广泛使用以增加 L-色氨酸的产量(表 2)。

表 2 已报道的部分 L-色氨酸发酵生产优化

Table 2 Some examples on the optimization of fermentative production of L-tryptophan

Reporters	Modalities for improvement	Results	References
ZHU Xiaowen et al.	Optimization of the culture medium used for fermentative production of L-tryptophan by <i>Escherichia coli</i> and optimization of the feeding mode	L-tryptophan yield reached 24 g/L, an approximately 35% increase	[91]
ZHANG Zhen	Optimization of the fermentation inoculum size and the amount of potassium dihydrogen phosphate added, and use of mixed fermentation process	Accumulation of by-products decreased, and L-tryptophan yield increased by approximately 31.2%.	[92]
SU Jianmin	Optimization of the extraction process and conditions such as decolorization, reaction, and crystallization	The yield on the separation and purification of L-tryptophan increased to 61%	[93]
ZOU Chun et al.	Determination of the specific growth rate and inorganic salt concentration to optimize fermentation conditions	L-tryptophan production increased by 141.6%	[94]
YANG Mengchen et al.	Change fermentation medium to clear medium	Significantly reduced the metabolic flow of by-products	[95]
MENG Shuaishuai	Optimization of media formulation	L-tryptophan production increased by 17.7%	[96]
ZHANG Leipeng et al.	Optimization of media formulation	Increased tryptophan yield to 55.7 g/L, 21.88% higher yield, shorter fermentation cycle to 36 h	[97]
LI Rongjie et al.	Glucose solution made from cassava as a carbon source in the fermentation medium and sugar solution flowed during replenishment	Tryptophan production reached 40 g/L	[98]
LIU Xiaodu	Addition of trace element chelators to the fermentation medium of <i>Escherichia coli</i>	Enhancement of maximum bacterial volume and L-tryptophan production by about 14% each	[99]
LI Jing et al.	Realization of cell recycling process for L-tryptophan fermentation process	Increased L-tryptophan yield, shortened fermentation cycle and reduced accumulation of metabolic by-products	[100]
LIU Zhenyu et al.	Coupled fermentation and membrane separation extraction process	Reduced accumulation of metabolic by-products and extended production cycles.	[101]
LI Rongjie et al.	Addition of nonylphenol polyoxyethylene ether-10 improves the permeability of the cell membrane of the bacterium	Fermentation cycle 45–50 hours, tryptophan yield reached 35–40 g/L, glucose-to-tryptophan conversion greater than 14%	[102]
LU Yu et al.	Process mode of constant temperature culture+low temperature crystal incubation+constant temperature culture	Acid production increased to over 51%, conversion rate increased to over 19.5%	[103]

4.1 培养基与培养条件优化

由于工程菌株的代谢通路被改变,原先使用的培养基和培养条件可能会造成代谢副产物过多、pH 与溶氧等条件不适宜、营养元素不足等问题,导致生产菌活力下降、生产效率降低,不适用于生产发酵环境。因此,探索更为合理的发酵条件有利于 L-色氨酸在发酵液中的进一步积

累,为提高 L-色氨酸产量、促进 L-色氨酸工业生产打下基础。朱晓雯等^[91]优化了大肠杆菌发酵生产 L-色氨酸时使用的培养基,优化了补料模式,其产量达到 24 g/L,提高了约 35%;张震等^[92]通过优化发酵接种量和底物磷酸二氢钾的添加量、使大肠杆菌在高密度发酵培养时副产物积累减少,L-色氨酸产量提高约 31.2%,并

通过混菌发酵工艺,进一步减少了乙酸、乳酸等代谢副产物的积累。

4.2 提取工艺优化

相较于化学法,由于发酵原料组成相对简单且不含危险化学品,生物直接发酵法的提取物一般可以保证产品的安全性,但是仍然需要解决发酵液中产品含量较低的问题。近年来,从发酵液中提取和纯化 L-色氨酸的工艺逐步成熟,所需成本更低,产物纯度更高,如苏建民^[93]通过对发酵液进行分析后优化提取工艺和脱色、反应、浓缩结晶等条件,最终将 L-色氨酸分离提纯的收率提高到 61%,大大降低了生产 L-色氨酸的成本,提高了经济效益。

5 总结与展望

目前对于大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌的色氨酸生产菌改造已取得了一定成效(图 6),但是由于菌株对高浓度 L-色氨酸的耐受机理不清,仍然无法较好地解除 L-色氨酸对菌株的生理毒

性,由此造成的生产菌株生产强度、低菌株鲁棒性较差等问题是如今 L-色氨酸工业化大规模生产面临的主要困难。适应进化虽然实用性强大,但是存在费时费力等问题。因此,通过生物传感器结合适应性进化的方法可以有效提高进化效率,通过对生产菌株 L-色氨酸耐受机理的深入研究、降低 L-色氨酸的毒性作用并找到将 L-色氨酸高效排出菌体的方法将促进理性代谢改造的进一步发展。同时, L-色氨酸的衍生物(如生长素、褪黑素等)具有较高的经济效益,但目前这些产品仍然主要依靠天然提取法等方法获取,通过微生物发酵法得到这些衍生物的报道较少,距离工业化应用仍有相当长的距离,其中 L-色氨酸在胞内浓度较低是导致这一现象的重要因素。希望随着 L-色氨酸在胞内累积问题的解决和对 L-色氨酸衍生物的合成机理的逐步明晰,通过微生物发酵法生产相应衍生物的方法逐步成熟并在未来尽快得到应用。

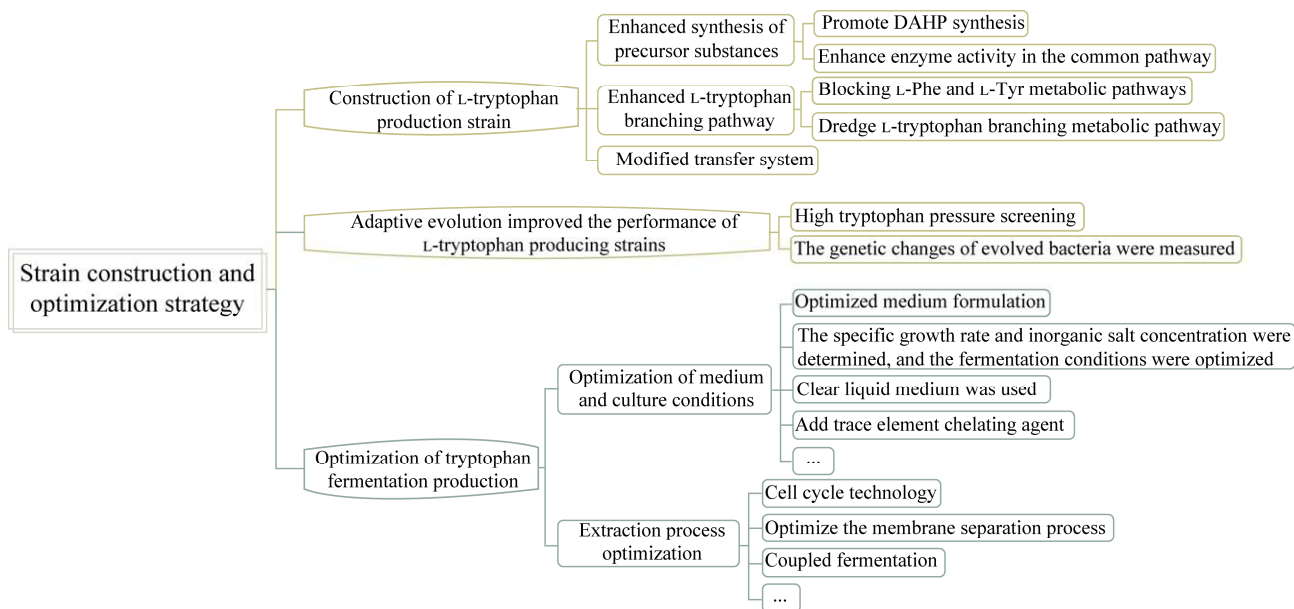


图 6 L-色氨酸生产菌株构建与优化策略总结

Figure 6 Summary of the strategies used for construction and optimization of L-tryptophan production strains.

REFERENCES

- [1] 周斌. 日粮色氨酸水平对蛋鸡生产性能与蛋品质的影响及其机理探讨[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2010.
ZHOU B. Effect of dietary tryptophan level on performance and egg quality of laying hens and its mechanism[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2010 (in Chinese).
- [2] 赵厚裕, 常正踪, 曹明莉, 臧德馨. L-色氨酸治疗抑郁症[J]. 中国新药与临床杂志, 1991, 3: 130-132.
ZHAO HY, CHANG ZZ, CAO ML, ZANG DX. L-tryptophan for depression[J]. Chinese Journal of New Medicine and Clinical Medicine, 1991, 3: 130-132 (in Chinese).
- [3] FANG MY, ZHANG C, YANG S, CUI JY, JIANG PX, LOU K, WACHI M, XING XH. High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 8.
- [4] 高晶. 色氨酸营养研究进展[J]. 畜禽业, 2005(9): 20-21.
GAO J. Research progress of tryptophan nutrition[J]. Livestock and Poultry Industry, 2005(9): 20-21 (in Chinese).
- [5] BANG WG, LANG S, SAHM H, WAGNER F. Production of L-tryptophan by *Escherichia coli* cells[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1983, 25(4): 999-1011.
- [6] ZHAO ZJ, ZOU C, ZHU YX, DAI J, CHEN S, WU D, WU J, CHEN J. Development of L-tryptophan production strains by defined genetic modification in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(12): 1921-1929.
- [7] 李柱. 通过理性遗传改造大肠杆菌利用葡萄糖合成色氨酸的研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2020.
LI Z. Synthesis of tryptophan from glucose by rational genetic modification of *Escherichia coli*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2020 (in Chinese).
- [8] 蒋婕, 陈福旺, 孟秀娟, 欧阳红生, 任林柱. L-色氨酸的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(S1): 66-70.
JIANG J, CHEN FW, MENG XJ, OUYANG HS, REN LZ. Research progress of L-tryptophan[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 44(S1): 66-70 (in Chinese).
- [9] 鄢芳清, 韩亚昆, 李娟, 李燕军, 徐庆阳, 陈宁, 谢希贤. 大肠杆菌芳香族氨基酸代谢工程研究进展[J]. 生物加工过程, 2017, 15(5): 32-39, 85.
YAN FQ, HAN YK, LI J, LI YJ, XU QY, CHEN N, XIE XX. Metabolic engineering of aromatic amino acids in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2017, 15(5): 32-39, 85 (in Chinese).
- [10] 高亮, 冯莹莹, 张宏娟, 刘茜, 焦庆才, 刘均忠. 色氨酸酶重组基因表达及其酶法合成 L-色氨酸[J]. 精细化工, 2016, 33(2): 137-141.
GAO L, FENG YY, ZHANG HJ, LIU Q, JIAO QC, LIU JZ. Synthesis of L-tryptophan with *Escherichia coli* whole cells expressing tryptophanase from *Enterobacter aerogenes*[J]. Fine Chemicals, 2016, 33(2): 137-141 (in Chinese).
- [11] 张婷婷. 微生物法生产 L-色氨酸的检测及发酵过程优化[D]. 开封: 河南大学硕士学位论文, 2017.
ZHANG TT. Detection of L-tryptophan produced by microbial method and optimization of fermentation process[D]. Kaifeng: Master's Thesis of Henan University, 2017 (in Chinese).
- [12] 赵春光, 程立坤, 徐庆阳, 陈宁, 谢希贤. 微生物法生产 L-色氨酸的研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2008, 37(4): 34-36.
ZHAO CG, CHENG LK, XU QY, CHEN N, XIE XX. Research progress of L-tryptophan production by microbial method[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2008, 37(4): 34-36 (in Chinese).
- [13] 庞敏, 王海磊, 姚建铭, 李俊, 马云峰. 以吲哚和 DL-丝氨酸为底物固定化酶法合成 L-色氨酸[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(10): 6-9.
PANG M, WANG HL, YAO JM, LI J, MA YF. The biosynthesis of L-tryptophan from indole and DL-serine by immobilized enzyme[J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(10): 6-9 (in Chinese).
- [14] 王健. 直接发酵法生产 L-色氨酸的研究[D]. 天津: 天津科技大学博士学位论文, 2005.
WANG J. Study on the production of L-tryptophan by direct fermentation[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University of Science & Technology, 2005 (in Chinese).
- [15] RODRIGUEZ A, MARTÍNEZ JA, FLORES N, ESCALANTE A, GOSSET G, BOLIVAR F.

- Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 126.
- [16] 闻亚红, 刘杰, 黄建民. 微生物发酵法生产 L-色氨酸的研究进展[J]. *科技风*, 2014(2): 10-11.
WEN YH, LIU J, HUANG JM. Research progress on microbial fermentation of L-tryptophan[J]. *Technology Wind*, 2014(2): 10-11 (in Chinese).
- [17] 柏丹阳. 大肠杆菌 L-色氨酸高产菌株非理性筛选与理性构建[D]. 大连: 大连工业大学硕士学位论文, 2019.
BAI DY. Irrational screening and rational construction of L-tryptophan-producing strains of *Escherichia coli*[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Polytechnic University, 2019 (in Chinese).
- [18] CHEN L, CHEN ML, MA CW, ZENG AP. Discovery of feed-forward regulation in L-tryptophan biosynthesis and its use in metabolic engineering of *E. coli* for efficient tryptophan bioproduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 434-444.
- [19] DING DQ, BAI DY, LI JL, MAO ZT, ZHU YR, LIU P, LIN JP, MA HW, ZHANG DW. Analyzing the genetic characteristics of a tryptophan-overproducing *Escherichia coli*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(8): 1685-1697.
- [20] SCHOPPEL K, TRACHTMANN N, KORZIN EJ, TZANAVARI A, SPRENGER GA, WEUSTER-BOTZ D. Metabolic control analysis enables rational improvement of *E. coli* L-tryptophan producers but methylglyoxal formation limits glycerol-based production[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 201.
- [21] XIONG B, ZHU YD, TIAN DG, JIANG S, FAN XG, MA Q, WU HY, XIE XX. Flux redistribution of central carbon metabolism for efficient production of L-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(3): 1393-1404.
- [22] RADWANSKI ER, LAST RL. Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(7): 921-934.
- [23] PITTARD J, YANG J. Biosynthesis of the aromatic amino acids[J]. *EcoSal Plus*, 2008, 3(1): 1-39.
- [24] MUNDHADA H, SEOANE JM, SCHNEIDER K, KOZA A, CHRISTENSEN HB, KLEIN T, PHANEUF PV, HERRGARD M, FEIST AM, NIELSEN AT. Increased production of L-serine in *Escherichia coli* through adaptive laboratory evolution[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 141-150.
- [25] LIU S, XU JZ, ZHANG WG. Advances and prospects in metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tryptophan production[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 38(2): 22.
- [26] HERRMANN KM, WEAVER LM. The shikimate pathway[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 473-503.
- [27] TANEMURA S, BAUERLE R. Suppression of a deletion mutation in the glutamine amidotransferase region of the *Salmonella typhimurium trpD* gene by mutations in *pheA* and *tyrA*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1979, 139(2): 573-582.
- [28] 李剑欣, 郭长江, 刘云, 林维平, 张绪梅, 徐琪寿. 大肠杆菌邻氨基苯甲酸合成酶编码基因 *trpED* 的克隆与表达[J]. *生物技术通讯*, 2007, 18(2): 183-185.
LI JX, GUO CJ, LIU Y, LIN WP, ZHANG XM, XU QS. The clone and expression of the anthranilate synthetase coding gene in *Escherichia coli*[J]. *Letters in Biotechnology*, 2007, 18(2): 183-185 (in Chinese).
- [29] LOPEZ-NIEVES S, PRINGLE A, MAEDA HA. Biochemical characterization of TyrA dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* (ascomycota) and *Pleurotus ostreatus* (basidiomycota)[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 665: 12-19.
- [30] 王悦鹏, 吴涛. 微生物发酵产 L-色氨酸的研究进展[J]. *发酵科技通讯*, 2020, 49(3): 153-160.
WANG YP, WU T. Research progress of L-tryptophan production by microbial fermentation[J]. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2020, 49(3): 153-160 (in Chinese).
- [31] 刘莉娜. 大肠杆菌 L-色氨酸生产菌株基因工程改造及代谢调控研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2018.
LIU LN. Study on genetic engineering transformation and metabolic regulation of L-tryptophan producing strain of *Escherichia coli*[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- [32] LI Z, DING DQ, WANG HY, LIU LX, FANG H, CHEN T, ZHANG DW. Engineering *Escherichia coli* to improve tryptophan production via genetic manipulation of precursor and cofactor pathways[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2020, 5(3): 200-205.
- [33] 陈立平. L-色氨酸高产菌株诱变筛选及发酵工艺优化[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2019.
CHEN LP. Mutation screening and fermentation

- process optimization of L-tryptophan-producing strains[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2019 (in Chinese).
- [34] 熊博. 大肠杆菌 L-色氨酸工程菌株的代谢优化[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2021.
XIONG B. Metabolic optimization of *Escherichia coli* L-tryptophan engineering strain[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2021 (in Chinese).
- [35] 吴晨, 王泽婷, 赵桂红, 吕庚承, 王非傲, 刘月香, 陈宁, 李燕军. 系统代谢工程改造谷氨酸棒杆菌高产 L-丙氨酸[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(21): 9-15.
WU C, WANG ZT, ZHAO GH, LV GC, WANG FA, LIU YX, CHEN N, LI YJ. High yield of L-alanine by *Corynebacterium glutamate* modified by systematic metabolic engineering[J]. Food and Fermentation Industry, 2023, 49(21): 9-15 (in Chinese).
- [36] 吴涛, 赵津津, 毛贤军. 大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统改造对产 L-色氨酸的影响[J]. 生物工程学报, 2017, 33(11): 1877-1882.
WU T, ZHAO JJ, MAO XJ. Effect of PTS modifications on L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(11): 1877-1882 (in Chinese).
- [37] TATARKO M, ROMEO T. Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Current Microbiology, 2001, 43(1): 26-32.
- [38] DU LH, ZHANG Z, XU QY, CHEN N. Central metabolic pathway modification to improve L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. Bioengineered, 2019, 10(1): 59-70.
- [39] YAKANDAWALA N, ROMEO T, FRIESEN AD, MADHYASTHA S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance phenylalanine production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(2): 283-291.
- [40] 路丽君, 诸葛斌, 宗红, 陆信曜, 方慧英, 宋健. 过表达 *csrB* 和 *tktA* 强化大肠杆菌生物合成 L-色氨酸[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(4): 647-651.
LU LJ, ZHUGE B, ZONG H, LU XY, FANG HY, SONG J. Overexpression of *csrB* and *tktA* enhances L-tryptophan biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(4): 647-651 (in Chinese).
- [41] CHEN YY, LIU YF, DING DQ, CONG LN, ZHANG DW. Rational design and analysis of an *Escherichia coli* strain for high-efficiency tryptophan production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(5): 357-367.
- [42] GARRIDO-PERTIERRA A, COOPER RA. Evidence for two distinct pyruvate kinase genes in *Escherichia coli* K-12[J]. FEBS Letters, 1983, 162(2): 420-422.
- [43] SIDDIQUEE KA, ARAUZO-BRAVO MJ, SHIMIZU K. Effect of a pyruvate kinase (*pykF*-gene) knockout mutation on the control of gene expression and metabolic fluxes in *Escherichia coli*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 235(1): 25-33.
- [44] LI XL, SHEN XL, WANG J, RI HI, MI CY, YAN YJ, SUN XX, YUAN QP. Efficient biosynthesis of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biotechnology, 2019, 294: 14-18.
- [45] LIU LX, LI WN, LI XL, SUN XX, YUAN QP. Constructing an efficient salicylate biosynthesis platform by *Escherichia coli* chromosome integration[J]. Journal of Biotechnology, 2019, 298: 5-10.
- [46] GUO L, DING S, LIU YD, GAO C, HU GP, SONG W, LIU J, CHEN XL, LIU LM. Enhancing tryptophan production by balancing precursors in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(3): 983-993.
- [47] HAGINO H, NAKAYAMA K. DAHP synthetase and its control in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1974, 38(11): 2125-2134.
- [48] 郝大利, 诸葛斌, 方慧英, 张成, 宗红, 诸葛健. 大肠杆菌 *aroG* 基因的定点突变及与 *trpBA* 基因的串联表达[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(5): 817-821.
HAO DL, ZHUGE B, FANG HY, ZHANG C, ZONG H, ZHUGE J. Site-mutation of *AroG* gene and co-expression with *TrpBA* gene in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(5): 817-821 (in Chinese).
- [49] 李晓萍, 边英男, 郝瑞昕, 江培翊, 黄伟达. 利用 DNA shuffling 构建部分解除对氟苯丙氨酸反馈抑制的 *aroG*[J]. 复旦学报(自然科学版), 2010, 49(5): 568-574.
LI XP, BIAN YN, HAO RX, JIANG PH, HUANG WD. Using DNA shuffling to construct *aroG* to partially relieve the feedback inhibition of fluorolalanine[J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 2010, 49(5): 568-574 (in Chinese).
- [50] 李明明. 大肠杆菌过量合成莽草酸的代谢工程[D].

- 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2013.
- LI MM. Metabolic engineering of shikimic acid overproduced by *Escherichia coli*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2013 (in Chinese).
- [51] VITAYAKRITSIRIKUL V, JAEMSAENG R, LOHMANEERATANA K, THANAPIPATSIRI A, DADUANG R, CHUAWONG P, THAMCHAIPENET A. Improvement of chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 by overexpression of the *aroB* and *aroK* genes catalysing steps in the shikimate pathway[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2016, 109(3): 379-388.
- [52] LIU DF, AI GM, ZHENG QX, LIU C, JIANG CY, LIU LX, ZHANG B, LIU YM, YANG C, LIU SJ. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 40.
- [53] 马延和, 王钦宏, 陈五九, 江小龙, 彭彦峰. 生产 3-脱氢莽草酸大肠杆菌重组菌株及其构建方法与应用: 中国, 107619817B[P]. 2021-02-02.
- MA YH, WANG QH, CHEN WJ, JIANG XL, PENG YQ. Production of recombinant *Escherichia coli* with 3-dehydroshikimic acid, construction method and application: CN, 107619817B[P]. 2021-02-02 (in Chinese).
- [54] 聂立斌, 易铃欣, 邓妍, 盛琦, 吴晓玉, 张斌. 途径工程改造谷氨酸棒杆菌产莽草酸[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 93-102.
- NIE LB, YI LX, DENG Y, SHENG Q, WU XY, ZHANG B. Pathway engineering modification of *Corynebacterium glutamicum* for shikimic acid production[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(6): 93-102 (in Chinese).
- [55] PAN H, KONG SJ, FU X, LI X, GUO DY. *De novo* biosynthesis of cinnamyl acetate in engineered *Escherichia coli*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2020, 164: 107796.
- [56] SCHOENENBERGER B, WSZOLEK A, MEIER R, BRUNDIEK H, OBKIRCHER M, WOHLGEMUTH R. Recombinant AroL-catalyzed phosphorylation for the efficient synthesis of shikimic acid 3-phosphate[J]. Biotechnology Journal, 2018, 13(8): 1700529.
- [57] 汪莉, 王玉民. 用 Red 重组系统快速敲除大肠杆菌 *aroL* 和 *aroK* 基因[J]. 军事医学科学院院刊, 2007, 143(4): 308-311.
- WANG L, WANG YM. Rapid knockout of *aroL* and *aroK* genes in *E. coli* by Red recombinant system[J]. Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences, 2007, 143(4): 308-311 (in Chinese).
- [58] FUJIWARA R, NODA S, TANAKA T, KONDO A. Muconic acid production using gene-level fusion proteins in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(11): 2698-2705.
- [59] LIU DX, FAN CS, TAO JH, LIANG GX, GAO SE, WANG HJ, LI X, SONG DX. Integration of *E. coli aroG-pheA* tandem genes into *Corynebacterium glutamicum tyrA* locus and its effect on L-phenylalanine biosynthesis[J]. World Journal of Gastroenterology, 2004, 10(24): 3683-3687.
- [60] 王钦. 代谢工程改造大肠杆菌积累 L-酪氨酸与发酵条件优化[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2019.
- WANG Q. Accumulation of L-tyrosine in *Escherichia coli* by metabolic engineering and optimization of fermentation conditions[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [61] XU S, WANG Q, ZENG WZ, LI YR, SHI GY, ZHOU JW. Construction of a heat-inducible *Escherichia coli* strain for efficient *de novo* biosynthesis of L[J]. Process Biochemistry, 2020, 92: 85-92.
- [62] 蒋婕. 大肠杆菌 *pheA* 和 *tyrA* 基因敲除菌的构建[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2013.
- JIANG J. Construction of *pheA* and *tyrA* gene knockout bacteria from *Escherichia coli*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2013 (in Chinese).
- [63] CHEN L, ZENG AP. Rational design and metabolic analysis of *Escherichia coli* for effective production of L-tryptophan at high concentration[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(2): 559-568.
- [64] AZUMA S, TSUNEKAWA H, OKABE M, OKAMOTO R, AIBA SC. Hyper-production of L-tryptophan via fermentation with crystallization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 39(4): 471-476.
- [65] 马温华, 赵智, 王宇, 张英姿, 丁久元. 北京棒杆菌芳香族氨基酸转运蛋白基因敲除对 L-色氨酸积累的影响[J]. 微生物学报, 2012, 52(11): 1344-1351.
- MA WH, ZHAO Z, WANG Y, ZHANG YZ, DING JY. Effect of aromatic amino acid transport gene knock-out on L-tryptophan accumulation in *Corynebacterium pekinense* PD-67[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(11): 1344-1351 (in Chinese).
- [66] LIU Q, CHENG YS, XU QY, XIE XX, CHEN N.

- Effects of *aroP* gene disruption on L-tryptophan fermentation[J]. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2012, 6(2): 158-162.
- [67] 陈巧红. 重组大肠杆菌发酵生产 L-色氨酸的研究[D]. 福州: 福建师范大学硕士学位论文, 2017.
CHEN QH. Production of L-tryptophan by recombinant *Escherichia coli* fermentation[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Normal University, 2017 (in Chinese).
- [68] 古鹏飞. 利用重组大肠杆菌生产 L-色氨酸的研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2013.
GU PF. Production of L-tryptophan by recombinant *Escherichia coli*[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2013 (in Chinese).
- [69] 李晶, 石斌超, 王晨阳, 赵志军, 史吉平. 色氨酸转运系统改造对大肠杆菌产 L-色氨酸的影响[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(15): 157-163.
LI J, SHI BC, WANG CY, ZHAO ZJ, SHI JP. Effect of engineering of L-tryptophan transport system on L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(15): 157-163 (in Chinese).
- [70] 赵志军, 陈晟, 吴丹, 吴敬, 陈坚. 大肠杆菌色氨酸转运系统多基因敲除对色氨酸生产的影响[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(12): 1765-1772.
ZHAO ZJ, CHEN S, WU D, WU J, CHEN J. Effect of multi-gene knockout of tryptophan transport system in *Escherichia coli* on tryptophan production[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27(12): 1765-1772 (in Chinese).
- [71] DOROSHENKO V, AIRICH L, VITUSHKINA M, KOLOKOLOVA A, LIVSHITS V, MASHKO S. YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 275(2): 312-318.
- [72] AIRICH LG, TSYRENZHAPOVA IS, VORONTSOVA OV, FEOFANOV AV, DOROSHENKO VG, MASHKO SV. Membrane topology analysis of the *Escherichia coli* aromatic amino acid efflux protein YddG[J]. *Microbial Physiology*, 2011, 19(4): 189-197.
- [73] LIU YF, XU YR, DING DQ, WEN JP, ZHU BW, ZHANG DW. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production[J]. *BMC Biotechnology*, 2018, 18(1): 5.
- [74] WANG J, CHENG LK, WANG J, LIU Q, SHEN T, CHEN N. Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of L-tryptophan[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(17): 7587-7596.
- [75] LIU Q, CHENG YS, XIE XX, XU QY, CHEN N. Modification of tryptophan transport system and its impact on production of L-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 114: 549-554.
- [76] 赵志军, 陈晟, 吴丹, 吴敬, 陈坚. 微生物发酵法生产 L-色氨酸的代谢工程研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(6): 135-141.
ZHAO ZJ, CHEN S, WU D, WU J, CHEN J. Metabolic engineering study on production of L-tryptophan by microbial fermentation[J]. *China Biotechnology* 2011, 31(6): 135-141 (in Chinese).
- [77] 臧珊珊, 林涛, 郭兴, 李芹, 张怀东, 刘峰. L-色氨酸的系统代谢网络调控研究进展[J]. *生物技术*, 2022, 32(1): 99-106, 84.
ZANG SS, LIN T, GUO X, LI Q, ZHANG HD, LIU F. Research progress on regulation of systemic metabolic network of L-tryptophan[J]. *Biotechnology*, 2022, 32(1): 99-106, 84 (in Chinese).
- [78] STELLA RG, GERTZEN CGW, SMITS SHJ, GÄTGENS C, POLEN T, NOACK S, FRUNZKE J. Biosensor-based growth-coupling and spatial separation as an evolution strategy to improve small molecule production of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 162-173.
- [79] 王光路, 王梦园, 刘兰茜, 马科, 杨雪鹏. 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.
WANG GL, WANG MY, LIU LX, MA K, YANG XP. Progress in the application of adaptive laboratory evolution to the breeding of industrial strains[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(1): 306-322 (in Chinese).
- [80] 赵静宇, 张健, 祁庆生, 王倩. 基于细菌双组分系统的生物传感器的研究进展[J/OL]. *合成生物学*, <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/10.1687.Q.20230705.0926.002.html>.
ZHAO JY, ZHANG J, QI QS, WANG Q. Research progress of biosensors based on two-component bacterial systems[J/OL]. *Journal of Synthetic Biology*, <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/10.1687.Q.20230705.0926.002.html> (in Chinese).
- [81] 张大伟, 丁冬芹, 刘永飞, 柏丹阳. 一株高产 L-色氨酸工程菌株及其应用: 中国, 110591989A[P], 2019-12-20.
ZHANG DW, DING DQ, LIU YF, BAI DY. An engineering strain with high yield of L-tryptophan and

- its application: CN, 110591989A[P], 2019-12-20 (in Chinese).
- [82] PARK S, KANG K, LEE SW, AHN MJ, BAE JM, BACK K. Production of serotonin by dual expression of tryptophan decarboxylase and tryptamine 5-hydroxylase in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(5): 1387-1394.
- [83] LEE SJ, SIM GY, LEE Y, KIM BG, AHN JH. Engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of *N*-hydroxycinnamoyl tryptamine and serotonin[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(11): 1551-1560.
- [84] 王玥, 王成涛. 高产靛蓝色素工程菌产物的精制工艺研究[J]. 食品科技, 2021, 46(7): 14-21.
WANG Y, WANG CT. Extraction and purification of indigo engineering bacteria products[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(7): 14-21 (in Chinese).
- [85] 韩晓红, 王伟, 肖兴国. 靛蓝及其同类色素的微生物生产与转化[J]. 生物工程学报, 2008, 24(6): 921-926.
HAN XH, WANG W, XIAO XG. Microbial biosynthesis and biotransformation of indigo and indigo-like pigments[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(6): 921-926 (in Chinese).
- [86] GUI HWAN HAN, GEUN HO GIM, WONDUCK KIM, SUN II SEO, SI WOUK KIM. Enhanced indirubin production in recombinant *Escherichia coli* harboring a flavin-containing monooxygenase gene by cysteine supplementation[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 164(2): 179-187.
- [87] DU JK, YANG DS, LUO ZW, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of indirubin from glucose[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 267: 19-28.
- [88] 李佳佳, 门海涛, 高丽美. 褪黑素的生理功能及应用研究进展[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(8): 17-26.
LI JJ, MEN HT, GAO LM. Research progress on physiological function and application of melatonin[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(8): 17-26 (in Chinese).
- [89] 杨思葭, 赵雨晴, 陈涛, 袁明. 植物褪黑素生物合成研究进展[J]. 植物科学学报, 2021, 39(2): 211-220.
YANG SJ, ZHAO YQ, CHEN T, YUAN M. Advances in plant melatonin biosynthesis[J]. Plant Science, 2021, 39(2): 211-220 (in Chinese).
- [90] LUO H, SCHNEIDER K, CHRISTENSEN U, LEI Y, HERRGARD M, PALSSON BØ. Microbial synthesis of human-hormone melatonin at gram scales[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(6): 1240-1245.
- [91] 朱晓雯, 王泽建, 黎亮, 吴杰群, 庄英萍. 大肠杆菌发酵产 L-色氨酸培养基及补料优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 146-153.
ZHU XW, WANG ZJ, LI L, WU JQ, ZHUANG YP. Optimization of medium and feeding process for L-tryptophan production fermented by *Escherichia coli*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(2): 146-153 (in Chinese).
- [92] 张震, 熊海波, 徐庆阳. 大肠杆菌高密度培养发酵 L-色氨酸[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(23): 15-20.
ZHANG Z, XIONG HB, XU QY. L-tryptophan fermentation by high cell density culture of *Escherichia coli*[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(23): 15-20 (in Chinese).
- [93] 苏建民. 大肠杆菌发酵液中 L-色氨酸的分离纯化[D]. 福州: 福建师范大学硕士学位论文, 2021.
SU JM. Separation and purification of L-tryptophan from fermentation broth of *Escherichia coli*[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Normal University, 2021 (in Chinese).
- [94] 邹纯, 陈晟, 赵志军, 王磊, 罗锋, 吴丹, 陈坚, 吴敬. 重组大肠杆菌生产 L-色氨酸发酵条件优化[J]. 工业微生物, 2012, 42(4): 25-29.
ZOU C, CHEN S, ZHAO ZJ, WANG L, LUO F, WU D, CHEN J, WU J. Optimization of L-tryptophan fermentation conditions from recombinant *Escherichia coli*[J]. Industrial Microbiology, 2012, 42(4): 25-29 (in Chinese).
- [95] 杨梦晨, 户红通, 蔡萌萌, 陈宁, 徐庆阳. L-色氨酸清液发酵工艺研究[J]. 食品与发酵科技, 2017, 53(2): 29-33, 39.
YANG MC, HU HT, CAI MM, CHEN N, XU QY. Study on L-tryptophan cleaned liquid fermentation process[J]. Sichuan Food and Fermentation, 2017, 53(2): 29-33, 39 (in Chinese).
- [96] 孟帅帅. 大肠杆菌生产 L-色氨酸重组菌株的改造及发酵条件优化[D]. 福州: 福建师范大学硕士学位论文, 2020.
MENG SS. Modification of recombinant strain producing L-tryptophan by *Escherichia coli* and optimization of fermentation conditions[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Normal University, 2020 (in Chinese).
- [97] 张磊鹏, 刘帅, 菅威, 张永杰. 一种色氨酸发酵培养基及色氨酸发酵方法: 中国, 108410918B[P], 2021-03-19.
ZHANG LP, LIU S, JIAN W, ZHANG YJ. Tryptophan

- fermentation culture medium and tryptophan fermentation method: CN, 108410918B[P], 2021-03-19 (in Chinese).
- [98] 李荣杰, 杨为华, 毕从胜, 徐斌, 张雪峰. L-色氨酸的发酵生产方法: 中国, 105087703A[P], 2015-11-25. LI RJ, YANG WH, BI CS, XU B, ZHANG XF. Fermentation production method of L-tryptophan: CN, 105087703A[P], 2015-11-25 (in Chinese).
- [99] 刘小都. 添加微量元素螯合剂的 L-色氨酸发酵研究[J]. 发酵科技通讯, 2021, 50(3): 156-162. LIU XD. L-tryptophan fermentation by adding trace element chelating agent[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2021, 50(3): 156-162 (in Chinese).
- [100] 李静, 刘晓东, 滕佳佳. L-色氨酸发酵中的细胞循环工艺研究[J]. 发酵科技通讯, 2021, 50(3): 163-167. LI J, LIU XD, TENG JJ. Development of a cell cycle technique in L-tryptophan fermentation[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2021, 50(3): 163-167 (in Chinese).
- [101] 刘镇瑜, 刘子强, 蔡萌萌, 陈宁, 徐庆阳. L-色氨酸发酵过程偶联膜分离提取工艺研究[J]. 生物技术通讯, 2017, 28(3): 313-318. LIU ZY, LIU ZQ, CAI MM, CHEN N, XU QY. Study on the L-tryptophan fermentation progress coupled with the membrane separation and extraction progress technology[J]. Letters in Biotechnology, 2017, 28(3): 313-318 (in Chinese).
- [102] 李荣杰, 唐浩, 薛亮, 崔玮. 一种用于提高色氨酸发酵产量的方法: 中国, 102168118B[P], 2013-01-30. LI RJ, TANG H, XUE L, CUI W. Method for increasing fermentation output of tryptophan: CN, 102168118B[P], 2013-01-30 (in Chinese).
- [103] 卢煜, 曹国强, 张甲峰, 刘远, 柳宏原, 战俊杰. 一种提高 L-色氨酸生产水平的方法: 中国, CN115433745A[P], 2022-12-06. LU Y, CAO GQ, ZHANG JF, LIU Y, LIU HY, ZHAN JJ. Method for improving production level of L-tryptophan: CN, CN115433745A[P], 2022-12-06 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)