

• 微生物细胞合成 •

**刘立明** 江南大学教授、博士生导师，教育部长江学者计划特聘教授。主要从事微生物发酵工程的研究与教学工作。主要研究领域为合成生物学和蛋白质工程。作为负责人先后负责国家重点研发计划、国家自然科学基金(重点、优青、面上)项目、江苏省前沿科技引领等国家或省部级项目 20 余项。在 *Nature Catalysis*、*Nature Communications*、*Chemical Reviews*、*Metabolic Engineering*、*Green Chemistry*、《微生物学报》《生物工程学报》等国内外主流学术期刊上发表学术论文 260 余篇，其中 SCI 论文 190 余篇(最高 IF=70)，授权发明专利 70 余项，出版科技著作 4 部。主要研究成果包括国家技术发明二等奖(第三)、教育部科技进步一等奖(第一)、江苏省自然科学一等奖(第三)、中国石油与化学工业技术发明一等奖(第二)等。



## 模块化工程改造大肠杆菌生产 L-色氨酸

丁爽<sup>1,2</sup>, 陈修来<sup>1,2</sup>, 高聪<sup>1,2</sup>, 宋伟<sup>3</sup>, 吴静<sup>3</sup>, 魏婉清<sup>1,2</sup>, 刘佳<sup>1,2</sup>, 刘立明<sup>1,2\*</sup>

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

丁爽, 陈修来, 高聪, 宋伟, 吴静, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 模块化工程改造大肠杆菌生产 L-色氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2359-2374.

DING Shuang, CHEN Xiulai, GAO Cong, SONG Wei, WU Jing, WEI Wanqing, LIU Jia, LIU Liming. Modular engineering of *Escherichia coli* for high-level production of L-tryptophan[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2359-2374.

**摘要:** L-色氨酸作为一种必需氨基酸, 广泛应用于食品、饲料和医药等领域。目前, 微生物法生产 L-色氨酸存在转化率低等问题。为此, 本研究通过敲除 L-色氨酸操纵子阻遏蛋白(L-tryptophan operon repressor protein, *trpR*)、替换 L-色氨酸弱化子(*trpL*)、引入抗反馈调节的 *aroG<sup>fbr</sup>* 等, 获得可积累 11.80 g/L L-色氨酸的底盘菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) TRP3。在此基础上, 将 L-色氨酸合成途径分为中心代谢途径模块、莽草酸(shikimic acid, SA)途径至分支酸(chorismic acid, CHA)模块、分支酸至 L-色氨酸模块, 并借助启动子工程, 通过平衡中心代谢途径模块、莽草酸途径至分支酸模块、分支酸至 L-色氨酸模块, 获得工程菌 *E. coli* TRP9。在 5 L 发酵罐中, 工程菌 *E. coli* TRP9 的 L-色氨酸产量提升至 36.08 g/L, 糖酸转化率提升至 18.55%, 达到理论转化率的 81.7%。本研究利用模块工程策略, 构建了高产 L-色氨酸生产菌株, 为 L-色氨酸的规模化生产奠定了良好的基础。

**关键词:** L-色氨酸; 大肠杆菌; 代谢工程; 模块化工程

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100700); 江苏省农业自主创新资金项目(CX(22)1012)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100700) and the Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX(22)1012).

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

Received: 2022-12-15; Accepted: 2023-02-14; Published online: 2023-02-16

# Modular engineering of *Escherichia coli* for high-level production of L-tryptophan

DING Shuang<sup>1,2</sup>, CHEN Xiulai<sup>1,2</sup>, GAO Cong<sup>1,2</sup>, SONG Wei<sup>3</sup>, WU Jing<sup>3</sup>, WEI Wanqing<sup>1,2</sup>, LIU Jia<sup>1,2</sup>, LIU Liming<sup>1,2\*</sup>

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** As an essential amino acid, L-tryptophan is widely used in food, feed and medicine sectors. Nowadays, microbial L-tryptophan production suffers from low productivity and yield. Here we construct a chassis *E. coli* TRP3 producing 11.80 g/L L-tryptophan, which was generated by knocking out the L-tryptophan operon repressor protein (*trpR*) and the L-tryptophan attenuator (*trpL*), and introducing the feedback-resistant mutant *aroG<sup>br</sup>*. On this basis, the L-tryptophan biosynthesis pathway was divided into three modules, including the central metabolic pathway module, the shikimic acid pathway to chorismate module and the chorismate to tryptophan module. Then we used promoter engineering approach to balance the three modules and obtained an engineered *E. coli* TRP9. After fed-batch cultures in a 5 L fermentor, tryptophan titer reached to 36.08 g/L, with a yield of 18.55%, which reached 81.7% of the maximum theoretical yield. The tryptophan producing strain with high yield laid a good foundation for large-scale production of tryptophan.

**Keywords:** L-tryptophan; *Escherichia coli*; metabolic engineering; modular engineering

传统工业中, L-色氨酸主要通过化学合成法、生物转化法和酶转化法生产<sup>[1]</sup>。而如今,微生物直接发酵法生产 L-色氨酸因成本低廉、环境友好等优点,已成为工业化生产的主要方法<sup>[2-4]</sup>。能用于发酵法生产 L-色氨酸的菌株有大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[5-6]</sup>。其中,大肠杆菌具有生长快、易培养、改造手段丰富等优点,成为发酵法生产 L-色氨酸的首选菌株<sup>[7]</sup>。然而,受错综复杂的生物代谢途径与反馈调节机制的阻碍,导致 *E. coli* 发酵生产 L-色氨酸的效率处于较低水平<sup>[8-9]</sup>。为此,在过去的几十年中,研究人员发展了丰富的代谢工程策略改造 *E. coli* 以获得 L-色氨酸高产菌株,如通过过表达抗反馈抑制的 *aroG<sup>br</sup>* [3-脱氧-D-阿拉伯庚酮

糖-7-磷酸 (3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate, DAHP) 合酶]、*trpE<sup>br</sup>DCBA* (L-色氨酸操纵子),使 *E. coli* 生产 L-色氨酸产量达到 45.0 g/L,生产强度达到 1.07 g/(L·h)<sup>[10]</sup>。尽管如此,前体物质磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) 和赤藓糖-4-磷酸 (erythrose-4-phosphate, E4P) 的匮乏,限制了 L-色氨酸产量进一步提升,为此,通过对合成前体 E4P 的关键基因 *tktA* (转酮酶I) 和合成前体 PEP 的关键基因 *ppsA* (磷酸烯醇式丙酮酸合成酶) 进行研究,发现在单独表达 *tktA* 或 *ppsA* 以及共同表达的情况下, L-色氨酸产量分别提高了 1.0%、5.6% 和 11.9%<sup>[11]</sup>。此外, *E. coli* 发酵生产 L-色氨酸过程中往往伴随大量副产物的产生,对菌株的生长与 L-色氨酸的合成均会带来不利的影响,为此,通过敲除副产物乙酸合成

途径相关的多个基因,使菌体浓度和色氨酸的产量分别提高了 11.5%和 20.6%<sup>[12]</sup>。为进一步提高 L-色氨酸产量,本团队通过启动子工程调节 *ppsA*、*tktA* 和 *aroG* 表达,平衡 2 个前体 PEP 与 E4P 的供给;并通过控制丝氨酸合成途径 *serA*、*serB* 和 *serC* 表达,优化丝氨酸供给,使 L-色氨酸的产量达到 40.1 g/L,有效地提高了 L-色氨酸的产量与生产强度;然而糖酸转化率最高仅达到 14.2%,进一步通过强化转运蛋白

*yddG* 表达,使 L-色氨酸的产量和转化率得到进一步提升,但最终糖酸转化率仅为 17.1%<sup>[13]</sup>。

上述代谢工程方法显著提高了 L-色氨酸产量,但莽草酸途径作为芳香族氨基酸的共同途径对生产 L-色氨酸的影响往往被人们所忽视。为此,把以前期研究中获得的原始菌株 *E. coli* TRP0 作为底盘微生物,借助代谢工程策略解除了色氨酸合成途径中的反馈抑制,并利用模块化工程策略优化莽草酸途径(图 1),获得工程

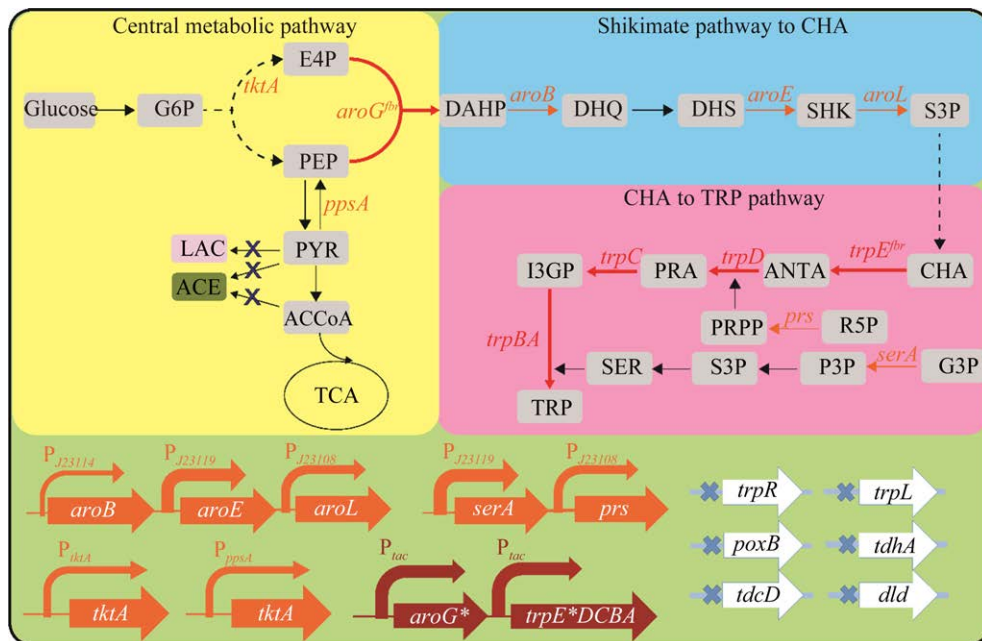


图 1 大肠杆菌中色氨酸的合成途径

Figure 1 Major metabolic pathways associated with L-tryptophan biosynthesis in *Escherichia coli*. A blue indicates that the corresponding gene was knocked out. Red arrows indicate that the corresponding gene was overexpressed in plasmid. The dashed arrow represents a multi-step pathway. The solid arrow represents a one-step pathway. The orange arrows indicate that the corresponding gene was amplified in genome. *P<sub>tac</sub>*: IPTG-inducible promoter; *P<sub>J23119</sub>*, *P<sub>J23108</sub>* and *P<sub>J23114</sub>*: Constitutive promoter. *tktA*: Transketolase gene; *ppsA*: Phosphoenolpyruvate synthase gene; *aroG\**: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase gene; *aroB*: 3-dehydroquinase synthase gene; *aroE*: Shikimate 5-dehydrogenase gene; *aroL*: Shikimate kinase gene; *trpE\**: Anthranilate synthase I gene; *trpD*: Anthranilate synthase II gene; *trpC*: Indole-3-glycerol phosphate synthase/Phosphoribosyl anthranilate isomerase gene; *trpB* and *trpA*: L-tryptophan synthase subunit beta and alpha gene; *prs*: Aromatic amino acid exporter gene; *serA*: 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene; *trpR*: Transcriptional repressor for trp operon gene; *trpL*: Attenuator for trp operon gene; *poxB*: Pyruvate oxidase B gene; *ldhA*: Lactate dehydrogenase gene; *tdcD*: Propionate kinase gene; *dld*: Quinone-dependent lactate dehydrogenase gene. G6P: Glucose 6-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; PYR: Pyruvate; ACCoA: Acetyl-CoA; E4P: Erythrose-4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate; DHQ: 3-dehydroquinase; DHS: 3-dehydroshikimate; SHK: Shikimic acid; S3P: Shikimate-3-phosphate; CHA: Chorismate; ANTA: Anthranilate; RRA: N-(5-phosphoribosyl)-anthranilate; I3GP: (1S,2R)-1-C-(indol-3-yl)glycerol 3-phosphate; TRP: L-tryptophan; R5P: Ribose-5-phosphate; PRPP: Phosphoribosyl pyrophosphate; G3P: 3-phosphoglycerate; P3P: 3-phosphopyruvate; S3P: 3-phosphoserine; SER: Serine; LAC: Lactate; ACE: Acetic acid.

菌 *E. coli* TRP9, 使 L-色氨酸产量达到 36.08 g/L, 糖酸转化率达到 18.55%。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究使用的 *E. coli* JM109 用于质粒表达, *E. coli* TRP 及其衍生菌株用于 L-色氨酸生产(*E. coli* TRP 为此前研究<sup>[13]</sup>中所使用的原始菌株 *E. coli* TRP0, 经多轮诱变筛选获得, 保藏编号 CCTCC M20211388。本研究中将其命名为 *E. coli* TRP)。本研究所使用的菌株和质粒见表 1。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基: 酵母粉 5.0 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L (固体培养基中添加 2% 的琼脂)。

种子培养基:  $K_2HPO_4$  24 g/L,  $KH_2PO_4$  9.6 g/L, 酵母粉 15 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  5.0 g/L,  $MgSO_4$  1.0 g/L, 葡萄糖 30 g/L, 四环素 50 mg/L, 自然 pH。

发酵培养基: 葡萄糖 7.5 g/L, 酵母浸粉(安琪酵母 FM902) 3.0 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  1.6 g/L, 柠檬酸 2.0 g/L,  $K_2HPO_4$  5.6 g/L,  $MgSO_4$  2.0 g/L, 微量元素液 1 mL/L, 使用 NaOH 调节 pH 至 7.0。

微量元素液配方:  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  75.6 g/L,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  4.0 g/L,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.6 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  6.4 g/L,  $Na_2SO_4$  20 g/L,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  4.5 g/L, 溶于 5 mmol/L  $H_2SO_4$  中。

#### 1.1.3 主要试剂

PrimeSTAR 高保真酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶, 购自宝生物工程(大连)有限公司; 一步同源重组酶, 购自南京巨匠生物科技有限公司; 细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 抗生素, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 乳酸、乙酸、3-脱氢莽草酸(3-dehydroshikimate, DHS)、莽草酸、分支酸, 购自 Sigma 公司; 酵母浸粉(安琪酵母

FM902), 购自安琪酵母股份有限公司; 酵母粉、蛋白胨, 购自 Oxoid 公司; 葡萄糖, 购自西王集团有限公司; PCR 引物, 亦欣生物科技(上海)有限公司; 其他试剂, 购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 培养方法

固体活化: LB 培养基灭菌后, 待温度降到 45 °C 左右加入四环素。配制好的平板斜面等需放在 35 °C 恒温倒置 2 d。一代活化: 35 °C 培养 14–16 h。二代活化: 35 °C 培养 12–14 h。

种子培养: 向培养好的斜面中加入 10 mL 生理盐水洗下菌苔。摇晃均匀后吸取 1 mL 菌液移入种子液中(50 mL/500 mL 三角瓶), 在 36 °C、200 r/min 条件下培养 6 h。

摇瓶发酵: 发酵培养基中初始葡萄糖浓度提高至 40 g/L, 并添加 80 mg/L 苯酚红作为 pH 指示剂。按照 10% (体积分数) 的接种量将种子培养液接种于装有 45 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中。在 36 °C、200 r/min 条件下培养 40 h。发酵过程中, 以苯酚红为指示剂, 每隔 4 h 添加一次氨水调节 pH。

发酵控制: 以 1.5 vvm 初始通气比、400 r/min 初始转速将培养好的种子液按 10% (体积分数) 的接种量接种于 5 L 发酵罐[T&J-Intelli-FerMA, T&J Bio-engineering (Shanghai) Co., Ltd.]中。发酵过程中开启 pH 自控, 流加 25% 氨水控制 pH 为 7.0; 开启温度自控, 发酵温度控制为 36 °C; 手动调节转速与通气, 维持溶氧在 20%–30%。接种 6 h 左右, 溶氧骤升, 初始葡萄糖耗尽, 启动自动补料模式, 通过流加 800 g/L 葡萄糖控制发酵液中葡萄糖浓度在 1 g/L 以内。当  $OD_{600}$  达到 15–16 时, 加入 0.5 mmol/L 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)进行诱导。

#### 1.2.2 重组菌株构建

基因敲除与整合采用 CRISPR-Cas9 技术来完成, 质粒构建采用标准分子克隆操作和吉布森组装法<sup>[14–15]</sup>。本研究所使用的引物见表 2。基

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources
<b>Plasmids</b>		
pBR322-023	Derivative of pBR322-023, ColE1 <i>ori</i> , Tet <sup>R</sup>	Lab storage
pRSF-D	Derivative of pRSF-Dute, RSF <i>ori</i> , Kan <sup>R</sup>	Lab storage
pTet-D	Derivative of pTet-Dute, p15A <i>ori</i> , Cm <sup>R</sup>	Lab storage
pBR322-023- <i>aroG</i> <sup>fb</sup>	ColE1 <i>ori</i> , Tet, P <sub>lac</sub> , <i>aroG</i> <sup>fb</sup>	This study
pTet-L- <i>aroB</i>	p15A <i>ori</i> , Cm <sup>R</sup> , P <sub>J23114</sub> , <i>aroB</i>	This study
pTet-M- <i>aroB</i>	p15A <i>ori</i> , Cm <sup>R</sup> , P <sub>J23108</sub> , <i>aroB</i>	This study
pTet-H- <i>aroB</i>	p15A <i>ori</i> , Cm <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>aroB</i>	This study
pTet-L- <i>aroE</i>	p15A <i>ori</i> , Cm <sup>R</sup> , P <sub>J23114</sub> , <i>aroE</i>	This study
pTet-M- <i>aroE</i>	p15A <i>ori</i> , Cm <sup>R</sup> , P <sub>J23108</sub> , <i>aroE</i>	This study
pTet-H- <i>aroE</i>	p15A <i>ori</i> , Cm <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>aroE</i>	This study
pTet-L- <i>aroL</i>	p15A <i>ori</i> , Cm <sup>R</sup> , P <sub>J23114</sub> , <i>aroL</i>	This study
pTet-M- <i>aroL</i>	p15A <i>ori</i> , Cm <sup>R</sup> , P <sub>J23108</sub> , <i>aroL</i>	This study
pTet-H- <i>aroL</i>	p15A <i>ori</i> , Cm <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>aroL</i>	This study
pBR322-023- <i>aroG</i> <sup>fb</sup> - <i>trpE</i> <sup>fb</sup> DCBA	ColE1 <i>ori</i> , Tet <sup>R</sup> , P <sub>lac</sub> , <i>aroG</i> <sup>fb</sup> , P <sub>lac</sub> , <i>aroG</i> <sup>fb</sup>	This study
pRSF-L- <i>prs</i>	RSF <i>ori</i> , Kan <sup>R</sup> , P <sub>J23114</sub> , <i>prs</i>	This study
pRSF-M- <i>prs</i>	RSF <i>ori</i> , Kan <sup>R</sup> , P <sub>J23108</sub> , <i>prs</i>	This study
pRSF-H- <i>prs</i>	RSF <i>ori</i> , Kan <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>prs</i>	This study
pRSF-L- <i>serA</i>	RSF <i>ori</i> , Kan <sup>R</sup> , P <sub>J23114</sub> , <i>serA</i>	This study
pRSF-M- <i>serA</i>	RSF <i>ori</i> , Kan <sup>R</sup> , P <sub>J23108</sub> , <i>serA</i>	This study
pRSF-H- <i>serA</i>	RSF <i>ori</i> , Kan <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>serA</i>	This study
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> JM109	General cloning host	TaKaRa Bio
<i>E. coli</i> TRP	Derivative of <i>E. coli</i> W3110, capable of producing L-tryptophan	Lab storage <sup>[13]</sup>
TRP1	TRP $\Delta$ <i>trpR</i>	This study
TRP2	TRP1 $\Delta$ <i>trpL</i>	This study
TRP3	TRP2 $\Delta$ <i>aroG</i> :: <i>aroG</i> <sup>fb</sup>	This study
TRP3-1	TRP3 $\Delta$ <i>poxB</i>	This study
TRP3-2	TRP3 $\Delta$ <i>tdcD</i>	This study
TRP3-3	TRP3 $\Delta$ <i>pta</i>	This study
TRP3-4	TRP3 $\Delta$ <i>ackA</i>	This study
TRP3-5	TRP3 $\Delta$ <i>ldhA</i>	This study
TRP3-6	TRP3 $\Delta$ <i>dld</i>	This study
TRP4	TRP3 $\Delta$ <i>poxB</i> :: <i>ppsA</i>	This study
TRP5	TRP4 $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>tktA</i>	This study
TRP6	TRP5 pBR322-023- <i>aroG</i> <sup>fb</sup>	This study
TRP6-0	TRP6 pTet-D	This study
TRP6-1	TRP6 pTet-L- <i>aroB</i>	This study
TRP6-2	TRP6 pTet-M- <i>aroB</i>	This study
TRP6-3	TRP6 pTet-H- <i>aroB</i>	This study
TRP6-4	TRP6 pTet-L- <i>aroE</i>	This study
TRP6-5	TRP6 pTet-M- <i>aroE</i>	This study
TRP6-6	TRP6 pTet-H- <i>aroE</i>	This study
TRP6-7	TRP6 pTet-L- <i>aroL</i>	This study
TRP6-8	TRP6 pTet-M- <i>aroL</i>	This study
TRP6-9	TRP6 pTet-H- <i>aroL</i>	This study
TRP7	TRP6 $\Delta$ <i>tdcD</i> ::L- <i>aroB</i> -H- <i>aroE</i> -M- <i>aroL</i>	This study
TRP8	TRP7 pBR322-P <sub>lac</sub> - <i>aroG</i> <sup>fb</sup> -P <sub>lac</sub> - <i>trpE</i> <sup>fb</sup> DCBA	This study
TRP8-0	TRP8 pRSF-D	This study
TRP8-1	TRP8 pRSF-L- <i>prs</i>	This study
TRP8-2	TRP8 pRSF-M- <i>prs</i>	This study
TRP8-3	TRP8 pRSF-H- <i>prs</i>	This study
TRP8-4	TRP8 pRSF-L- <i>serA</i>	This study
TRP8-5	TRP8 pRSF-M- <i>serA</i>	This study
TRP8-6	TRP8 pRSF-H- <i>serA</i>	This study
TRP9	TRP8 $\Delta$ <i>dld</i> ::H- <i>serA</i> -M- <i>prs</i>	This study

H: High expression level under P<sub>J23119</sub> promoter; M: Moderate expression level under P<sub>J23108</sub> promoter; L: Low expression level under P<sub>J23114</sub> promoter.

表2 本研究中所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Sizes (bp)
N20- <i>poxB</i> -F	CATCGGCGCTCACAGCAAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT	50
N20- <i>poxB</i> -R	CCTTGCTGTGAGCGCCGATGACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC	45
<i>poxB</i> -1	GAAGGAGATATACATATGGCAGATCTGGCTCCGTATATGGATTGGGTAGAG	51
<i>poxB</i> -2	TTATTATGACGGGAAATGCCACCCTTTGGTTCTCCATCTCCTGAATGTGATAACG	55
<i>poxB</i> -3	CGTTATCACATTACAGGAGATGGAGAACCAAAGGGTGGCATTTCCTCGTCATAATAA	55
<i>poxB</i> -4	GCAGCGGTTTCTTTACCAGACTCGAGATTCCCATGCTTCTTTCAGGTATTCCTCGG	56
<i>ppsA</i> -1	ACAGAAGCGTAGAACGTTATGTCTG	25
<i>ppsA</i> -2	AGATATTATGCGGCGTTTAACGCAG	25
N20- <i>tdcD</i> -F	GGCCTGGTTGTGGCGCATCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT	50
N20- <i>tdcD</i> -R	AGATGCGCCACAACCAGGCCACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC	45
<i>tdcD</i> -1	GAAGGAGATATACATATGGCAGATCTCAAAGCGCAGAATATTCCAGTGCTTT	52
<i>tdcD</i> -2	ATAATCTCTCTACAATACTTCAACTAACTCTTTTCTCATCCTGAGTTACGGATTA	56
<i>tdcD</i> -3	TAATCCGTAACTCAGGATGAGAAAAGAGTTTAGTTGAAGTATTGTAGAGAGATTAT	56
<i>tdcD</i> -4	GCAGCGGTTTCTTTACCAGACTCGAGACATCAAATACGCCCTGGTTATGGG	51
<i>aroBEL</i> -1	CTACGAAGGTGCATTGAAGGCATACGTGCCGATCAACGTCTCA	43
<i>aroBEL</i> -2	GCACAAATGACACGCGCATTTCAACAATTGATCGTCTGTGCCAGG	45
N20- <i>ldhA</i> -F	TTCTCTCTGGAAGGTCTGACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT	50
N20- <i>ldhA</i> -R	GTCAGACCTTCCAGAGAGAACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC	45
<i>ldhA</i> -1	CAAGCAGAATCAAGTTCTACCGTGC	25
<i>ldhA</i> -2	AGCGGCAAGAAAGACTTTCTCCAGTGATGTTGAATCACA	39
<i>ldhA</i> -3	AGAAAGTCTTTCTTGCCGCTCCCCTGCATT	30
<i>ldhA</i> -4	TGTCTGTTTTGCGGTCGCCA	20
<i>tktA</i> -1	TCACATGTTTATTCTTGAGCTTAATATCCCGACTGGC	37
<i>tktA</i> -2	AAGCTCAAGAATAAACATGTGAAAGAGAACGCGGC	35
N20- <i>dld</i> -F	TTCTGGTTGCGCCGGGAAGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT	50
N20- <i>dld</i> -R	GCTTCCCGGCGCAACCAGAACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC	45
<i>dld</i> -1	GAAGGAGATATACATATGGCAGATCTGATATCCTGACGGGTACGGTGTTGA	52
<i>dld</i> -2	TGGCGATACTCTGCCATCCGTAATTTTTTCCACTCCTTGTTGGCGAAAAA	52
<i>dld</i> -3	TTTTTCGCCACCACAAGGAGTGGAATAAATTACGGATGGCAGAGTATCGCCA	52
<i>dld</i> -4	GCAGCGGTTTCTTTACCAGACTCGAGGAATGAACAACACGCGCTTTGTTGAA	52
<i>serA/prs</i> -1	GGAGTGGAATTACATTAATTGCGTTGCGCGGATC	35
<i>serA/prs</i> -2	TCCGTAATTTAGCTGCGCTAGTAGACGAGTC	31
<i>aroG</i> -F	TCACATGTTTATTCTTGAGCTTAATATCCCGACTGGC	37
<i>aroG</i> -R	AAGCTCAAGAATAAACATGTGAAAGAGAACGCGGC	35
<i>trp</i> -F	TTAAGGTGGATGTCGCGTTAAGCTTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGC	54
<i>trp</i> -R	CTGCAGTCTAGACTCGAGTAAGGATCCCACACTCATTAAATTAGTCGCTAATGA	56

因 *trpE<sup>br</sup>DCBA*、*serA*、*serB*、*serC*、*ppsA* 和 *tktA* 以 *E. coli* TRP 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得。基因 *aroG<sup>br</sup>* 通过 PCR 定点突变获得。

### 1.2.3 检测方法

细胞浓度检测: 取适量发酵液稀释(稀释至  $OD_{600}$  在 0.2–0.8 范围内), 使用紫外分光光度计在波长 600 nm 下测定  $OD_{600}$ 。

葡萄糖浓度检测: 取适量发酵液经 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 控制样品中葡萄糖浓度稀释至 0–2 g/L 以内, 采用 SBA-40E 生物传感分析仪测定(深圳西尔曼科技有限公司)。

L-色氨酸浓度检测: 使用 Agilent C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m, Agilent)。流动相比比为 0.3 g/L  $KH_2PO_4$  (水溶液)与甲醇按 9:1 (体积比)混合; 紫外检测器检测波长为 278 nm; 进样量 10  $\mu$ L; 流速 1.0 mL/min; 柱温 39  $^{\circ}C$ 。

有机酸浓度检测: 使用 Aminex HPX-87H 色谱柱(7.8 mm×300 mm, 5  $\mu$ m, Bio-Rad)。流动相为 5 mmol/L 稀硫酸; 紫外检测器检测波长为 210 nm; 进样量 10  $\mu$ L; 流速 0.6 mL/min; 柱温 52  $^{\circ}C$ 。

胞内代谢物检测: 将培养的细胞在 15 mL 的–40  $^{\circ}C$  甘油/水(60:40, 体积比)混合物中冷激, 并以 12 000 r/min, –20  $^{\circ}C$  离心 3 min。细胞颗粒用 5 mL 生理盐水(4  $^{\circ}C$ )洗涤 2 次, 然后在 5 mL 50%甲醇/水混合物(4  $^{\circ}C$ )中重悬。悬浮液经液氮冻融 5 次循环处理, 并以 12 000 r/min、4  $^{\circ}C$  离心 10 min。PEP 测定采用磷酸烯醇式丙酮酸(PEP) ELISA 检测试剂盒(上海科艾博生物技术有限公司); E4P 测定采用赤藓糖-4-磷酸(E4P)酶联免疫分析试剂盒(上海雅吉杨生物技术有限公司); 磷酸核糖焦磷酸(phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)测定采用细菌磷酸核糖焦

磷酸(PRPP) ELISA 检测试剂盒(上海佰利莱生物科技有限公司); 丝氨酸测定采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)梯度洗脱测定<sup>[16]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 构建合成 L-色氨酸底盘微生物

为了获得合成 L-色氨酸的底盘微生物, 本研究以 *E. coli* TRP (实验室保藏)为底盘菌株, 利用 CRISPR 技术敲除 L-色氨酸操纵子阻遏蛋白的编码基因 *trpR*, 获得工程菌株 *E. coli* TRP1 (*TRP  $\Delta trpR$* )。为了消除 L-色氨酸弱化子的调控, 在 *E. coli* TRP1 的基础上, 敲除 L-色氨酸操纵子的弱化子区域(*trpL*), 获得工程菌株 *E. coli* TRP2 (*TRP1  $\Delta trpL$* )。为了进一步削弱苯丙氨酸对 *aroG* 的反馈抑制, 通过蛋白质工程改造, 将 *E. coli* TRP2 的 *aroG* 第 211 位丝氨酸突变为苯丙氨酸<sup>[17]</sup>, 获得工程菌株 *E. coli* TRP3 (*TRP2  $\Delta aroG::aroG^{br}$* )。如图 2A 所示, 与 *E. coli* TRP 相比, 菌株 *E. coli* TRP3 在 5 L 发酵罐上生长没有发生变化, 在发酵 28 h 时,  $OD_{600}$  达到最高 60.5; L-色氨酸产量和转化率分别提高了 70.8%和 58.3%, 达到 11.80 g/L 和 8.25%。发酵液中副产物乙酸和乳酸含量分别达到 9.63 g/L 和 12.41 g/L (图 2B), 显著降低了 L-色氨酸转化率。

### 2.2 重构中心代谢路径增加前体 DAHP 供应

为了降低副产物积累, 进一步提高色氨酸的产量与转化率对菌株 *E. coli* TRP3 的中心代谢路径进行重构, 主要包括 3 个方面: (1) 敲除副产物合成基因; (2) 在副产物合成基因的位点插入 L-色氨酸前体合成基因; (3) 强化表达 L-色氨酸合成路径中的关键酶基因 *aroG*<sup>[18]</sup>。为了降低副产物乙酸的积累, 分别敲除菌株 *E. coli* TRP3



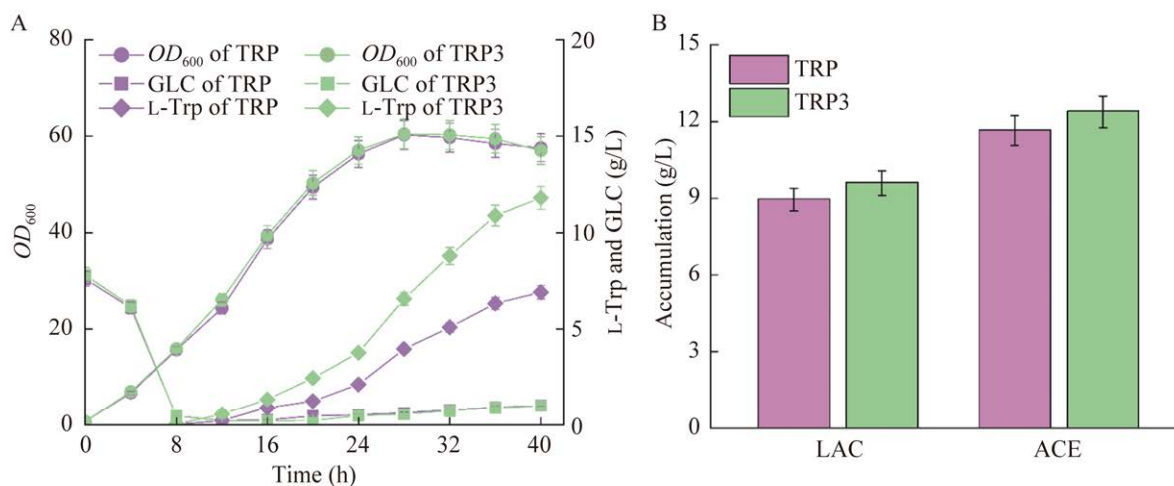


图2 5 L发酵罐中 *Escherichia coli* TRP 和 *E. coli* TRP3 生产性能比较

Figure 2 Fed-batch cultures of *Escherichia coli* TRP and *E. coli* TRP3 in 5 L fermentor. A: The L-tryptophan titer,  $OD_{600}$  and glucose concentration of strains *E. coli* TRP and TRP3 in 5 L fermentor. B: Comparison of lactate and acetate concentration in fermentation broth.

中的丙酮酸氧化酶基因 *poxB*<sup>[19-20]</sup>、丙酸激酶基因 *tdcD*<sup>[12,21]</sup>、磷酸乙酰转移酶基因 *pta* 和乙酸激酶基因 *ackA*<sup>[22]</sup>，获得突变菌株 *E. coli* TRP3-1 ( $\Delta poxB$ )、TRP3-2 ( $\Delta tdcD$ )、TRP3-3 ( $\Delta pta$ ) 和 TRP3-4 ( $\Delta ackA$ )；为了降低副产物乳酸合成，分别敲除 *E. coli* TRP3 中的乳酸脱氢酶基因 *ldhA*<sup>[23]</sup> 和 醌依赖型-乳酸脱氢酶的编码基因 *dld*<sup>[24]</sup>，获得突变菌株 *E. coli* TRP3-5 (TRP3  $\Delta ldhA$ ) 和 TRP3-6 (TRP3  $\Delta dld$ ) (图 3A)。经摇瓶发酵发现，不同基因的敲除，对菌株生长和生产带来不同程度的影响(图 3B)，与 *E. coli* TRP3 相比：(1) 敲除 *poxB*，使  $OD_{600}$  提高了 9.1%，而 *pta* 和 *ackA* 的敲除则使菌株  $OD_{600}$  分别降低 18.3% 和 37.1%，*tdcD*、*ldhA* 和 *dld* 的敲除对菌株的生长没有显著影响；(2) 敲除 *poxB* 和 *ldhA*，使 L-色氨酸产量分别提高了 4.9% 和 3.8%，而敲除 *pta* 和 *ackA* 则使产量分别降低了 22.7% 和 34.6%，敲除 *tdcD* 和 *dld* 对 L-色氨酸产量没有显著影响；(3) 敲除 *ldhA* 和 *poxB*，使转

化率分别提高了 5.1% 和 3.5%，敲除 *pta* 和 *ackA* 使转化率分别降低了 6.6% 和 11.9%，而敲除 *tdcD* 和 *dld* 对转化率没有明显影响。上述结果表明，敲除 *poxB* 有利于提高细胞生长与产量，敲除 *ldhA* 有利于提高转化率，敲除基因 *pta* 和 *ackA* 不利于提高菌株生长、产量和转化率，而敲除 *tdcD* 和 *dld* 几乎不影响 L-色氨酸生产。

为了提高前体 PEP 和 E4P 的供应，在菌株 *E. coli* TRP3 中将 *ppsA* (编码 PEP 合酶)<sup>[25]</sup> 整合到 *poxB* 的基因座上，获得菌株 *E. coli* TRP4 (TRP3  $\Delta poxB::ppsA$ )，其在摇瓶水平中 L-色氨酸产量提高至 2.05 g/L，转化率达到 6.55%，较菌株 *E. coli* TRP3-1 分别提高 5.7% 和 4.3% (图 3C)。进一步发现菌株 *E. coli* TRP4 中胞内 PEP 含量达到 18.60 nmol/g DCW，较 *E. coli* TRP3-1 提高了 12.5%；而 E4P 的含量几乎不变，PEP 与 E4P 的比值由 *E. coli* TRP3-1 的 1.58 增加至 1.79 (图 3C)。更进一步，将 *tktA* (编码转酮醇酶)<sup>[25]</sup> 整合到菌株 *E. coli* TRP4 的 *ldhA* 的基因座上，得到



突变菌株 *E. coli* TRP5 (TRP4  $\Delta$ ldhA::tktA), 其在摇瓶上 L-色氨酸产量提高至 2.31 g/L, 转化率为 7.21% (图 3C)。菌株 *E. coli* TRP5 胞内 E4P 浓度较菌株 *E. coli* TRP4 提高了 16.3% (10.38 nmol/g DCW 提高到 12.07 nmol/g DCW), PEP 与 E4P 比值降低至 1.51 (图 3C)。

PEP 和 E4P 缩合形成 DAHP, 不仅是莽草酸合成路径最为关键的环节, 也是 L-色氨酸合成路径中的关键限速瓶颈<sup>[18]</sup>。在 *E. coli* 中, 该反应由 AroG、AroF 和 AroH 三个同工酶(DAHP 合酶)共同催化, 其中 AroG 酶活占总酶活的 80%, 并且该酶受 L-苯丙氨酸的反馈抑制<sup>[26]</sup>。为了进一步提高前体 DAHP 的积累, 在 *E. coli* TRP5 中过表达 *aroG<sup>fb</sup>* (抗反馈突变体), 获得菌株 *E. coli* TRP6 (TRP5  $P_{tac}$ -*aroG<sup>fb</sup>*)。在摇瓶水平上 L-色氨酸产量提高至 2.82 g/L, 转化率达 7.89% (图 3D)。在 5 L 发酵罐中(图 3D), *E. coli* TRP6 的  $OD_{600}$  为 84.3, 比菌株 *E. coli* TRP3 提高了 39.3%; L-色氨酸的产量和转化率分别达到 17.43 g/L 和 11.20%, 较 *E. coli* TRP3 分别提高了 47.7% 和 35.8%; 而副产物乙酸和乳酸含量分别下降至 3.47 g/L 和 5.41 g/L, 比菌株 TRP3 分别降低了 64.0% 和 56.4% (图 3E)。综上所述, 重构中心代谢路径可以削弱副产物积累对菌株生长和生产的抑制, 并增加前体供应, 能有效地提高菌株的生产性能。然而, 在发酵过程中还发现, 莽草酸途径至分支酸模块的中间代谢物 3-脱氢莽草酸和莽草酸含量分别达到 4.52 g/L 和 2.50 g/L, 而分支酸含量仅为 0.64 g/L (图 3E), 这一结果表明, 莽草酸途径效率较低, 无法将前体 3-脱氢莽草酸和莽草酸转化为分支酸。

### 2.3 优化莽草酸途径增加分支酸供应

如图 4A 所示, 莽草酸途径的关键靶点 *aroB*、*aroE* 和 *aroL* 对 L-色氨酸合成具有重要影响<sup>[27]</sup>。为此, 利用 3 个水平的启动子高

( $P_{J23119}$ )、中( $P_{J23108}$ )和低( $P_{J23114}$ )<sup>[28]</sup>调控 *aroB*、*aroE* 和 *aroL* 表达水平, 构建了 9 株基因工程菌 (图 4B)。摇瓶发酵结果(图 4B)表明, 与 *E. coli* TRP6 相比: (1) 当基因 *aroB* 在低(TRP6-1)、中(TRP6-2)、高(TRP6-3)水平表达时, L-色氨酸产量分别提高 6.7%、6.0% 和 3.0%, 转化率分别提高 6.6%、5.3% 和 0.1%; (2) 当基因 *aroE* 在低(TRP6-4)、中(TRP6-5)、高(TRP6-6)水平表达时, L-色氨酸的产量分别提高 9.3%、12.8% 和 17.2%, 转化率分别提高 5.5%、8.1% 和 10.4%; (3) 当基因 *aroL* 在低(TRP6-7)、中(TRP6-8)、高(TRP6-9)水平表达时, L-色氨酸的产量分别提高 6.7%、20.4% 和 7.7%, 转化率分别提高 6.7%、11.8% 和 5.8%。对上述结果进行总结, 发现当基因 *aroB* 低水平(TRP6-1)、*aroE* 高水平(TRP6-6)、*aroL* 中水平(TRP6-8)表达时, L-色氨酸产量分别为 3.01、3.31 和 3.40 g/L, 转化率为 8.41%、8.71% 和 8.82%。

基于上述结果, 在菌株 *E. coli* TRP6 中将 L-*aroB*-H-*aroE*-M-*aroL* 片段组合装配至基因组 *tdcD* 的基因座上, 得到突变菌株 *E. coli* TRP7 (TRP6  $\Delta$ *tdcD*::L-*aroB*-H-*aroE*-M-*aroL*)。摇瓶实验表明, 菌株 *E. coli* TRP7 生长没有发生显著变化, 但 L-色氨酸产量和转化率比菌株 *E. coli* TRP6 分别提高了 36.5% 和 18.1%, 达到 3.85 g/L 和 9.32%。在 5 L 发酵罐中发酵 40 h, 色氨酸产量和转化率分别达到 23.41 g/L 和 13.41% (图 4C), 比菌株 *E. coli* TRP6 分别提高了 34.3% 和 19.7%。而 DHS 和 SA 含量分别下降了 66.6% (4.52 g/L 下降到 1.51 g/L) 和 65.6% (2.50 g/L 下降到 0.86 g/L, 图 4D)。此时分支酸含量从 0.64 g/L 提高至 3.64 g/L (*E. coli* TRP6, 图 4D)。上述结果表明, 通过启动子工程优化莽草酸途径, 能有效地降低中间代谢物积累, 从而提高 L-色氨酸合成效率。

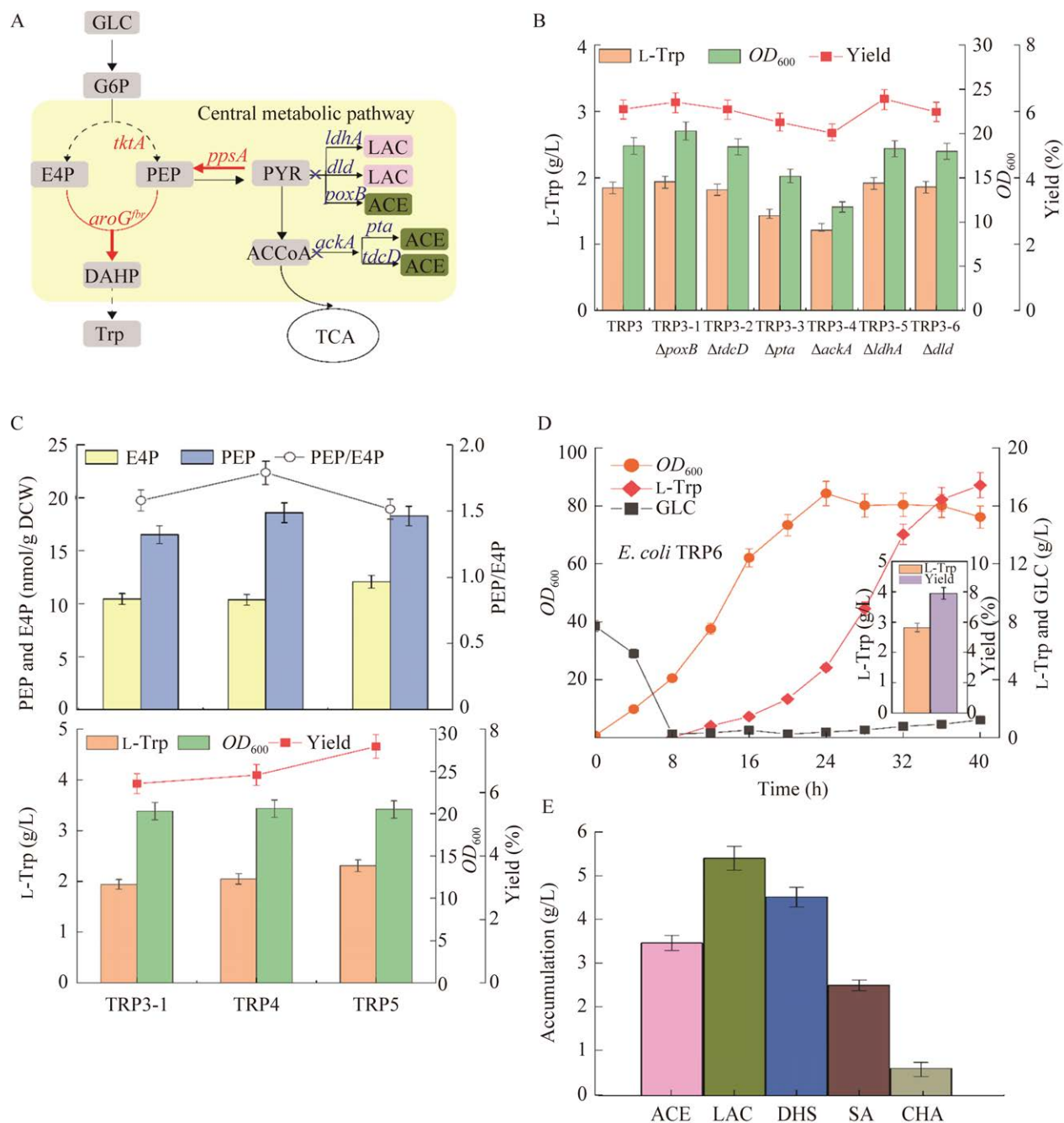


图3 重构中心代谢路径对L-色氨酸生产的影响

Figure 3 Effect of redesigning central metabolic pathway on L-tryptophan production. A: The diagram of redesigned central metabolic pathway. The red arrow indicates the corresponding gene which was integrated and overexpressed. The blue indicates the corresponding gene was knocked out. Each gene encodes the following enzymes. *ackA*: Acetate kinase A; *pta*: Phosphate acetyltransferase; *poxB*, *ldhA*, *tdcD* and *dld* was shown in Figure 1. B: Effect of gene deletion on L-tryptophan production in shake flasks. C: Comparison of the production performance and precursors PEP and E4P concentration by *E. coli* TRP3-1, TRP4, TRP5 in shake flasks. D: The production performance of *E. coli* TRP6 in 5 L fermentor and shake flasks (the inserted figure). E: The accumulation of by-product and intermediate metabolite by *E. coli* TRP6 in 5 L fermentor.

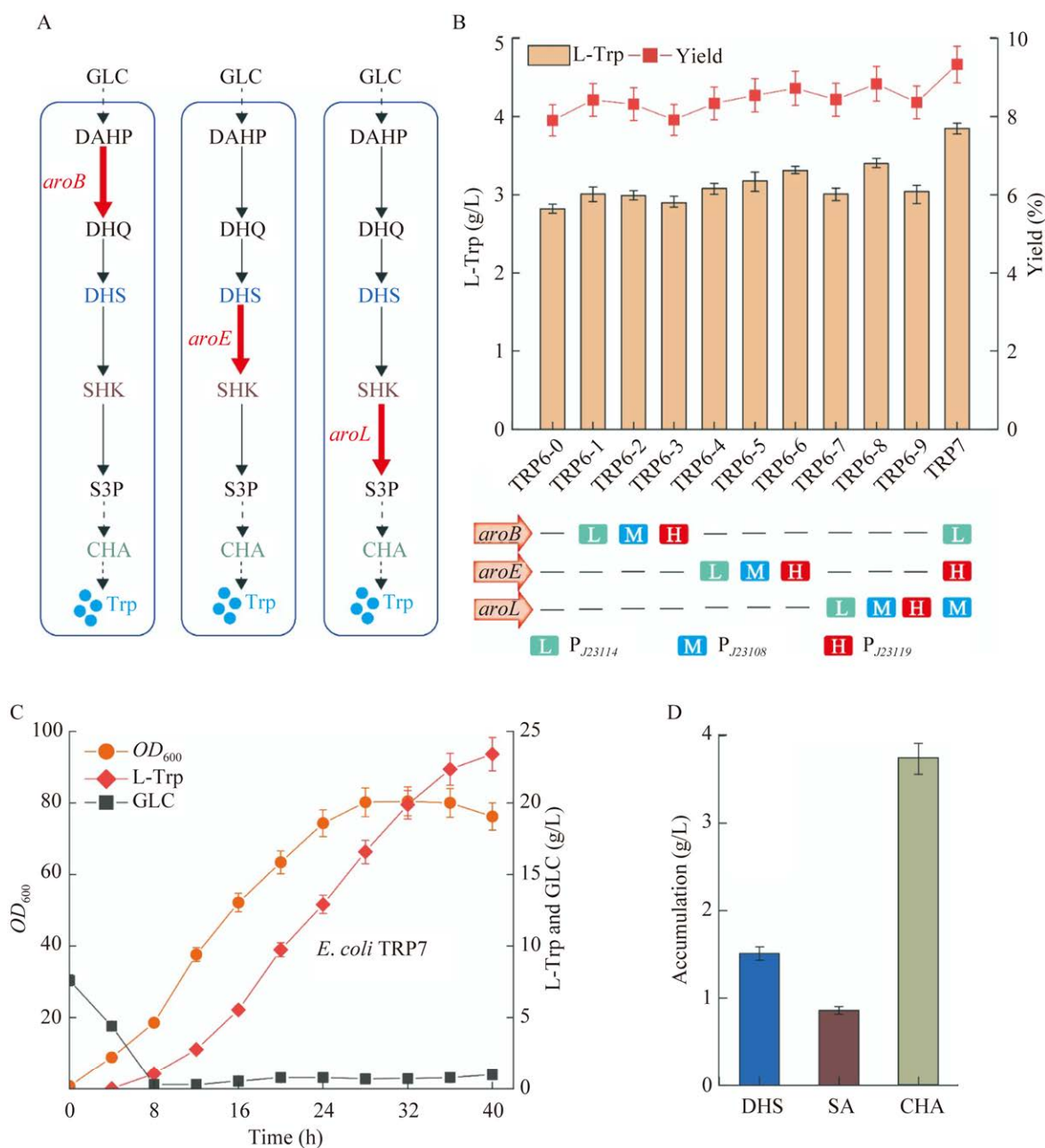


图 4 优化莽草酸途径增加分支酸供应

Figure 4 Increase the intracellular chorismate content by optimizing the shikimic acid pathway. A: The optimization of shikimic acid pathway to CHA. The red bold arrow indicates the key gene which was optimized and evaluated. B: Effect of individual genes on production performance, and the result of shake flask fermentation using the optimal combination. H: High expression level under  $P_{J23119}$  promoter; M: Moderate expression level under  $P_{J23108}$  promoter; L: Low expression level under  $P_{J23114}$  promoter. C and D: The L-tryptophan titer, cell growth, glucose concentration and intermediate metabolite content by *E. coli* TRP7 in 5 L fermentor.

## 2.4 模块优化分支酸至 L-色氨酸途径

为了强化分支酸至 L-色氨酸的代谢通量(图 5A), 在菌株 *E. coli* TRP7 中过量表达 L-色氨酸

操纵子 *trpEDCBA* (*trpE* 所编码的邻氨基苯甲酸合酶在菌株进行诱变时已发生抗反馈突变<sup>[13]</sup>), 获得工程菌株 *E. coli* TRP8 (TRP7  $P_{tac}$ -*trpE<sup>fbr</sup>*DCBA), 其

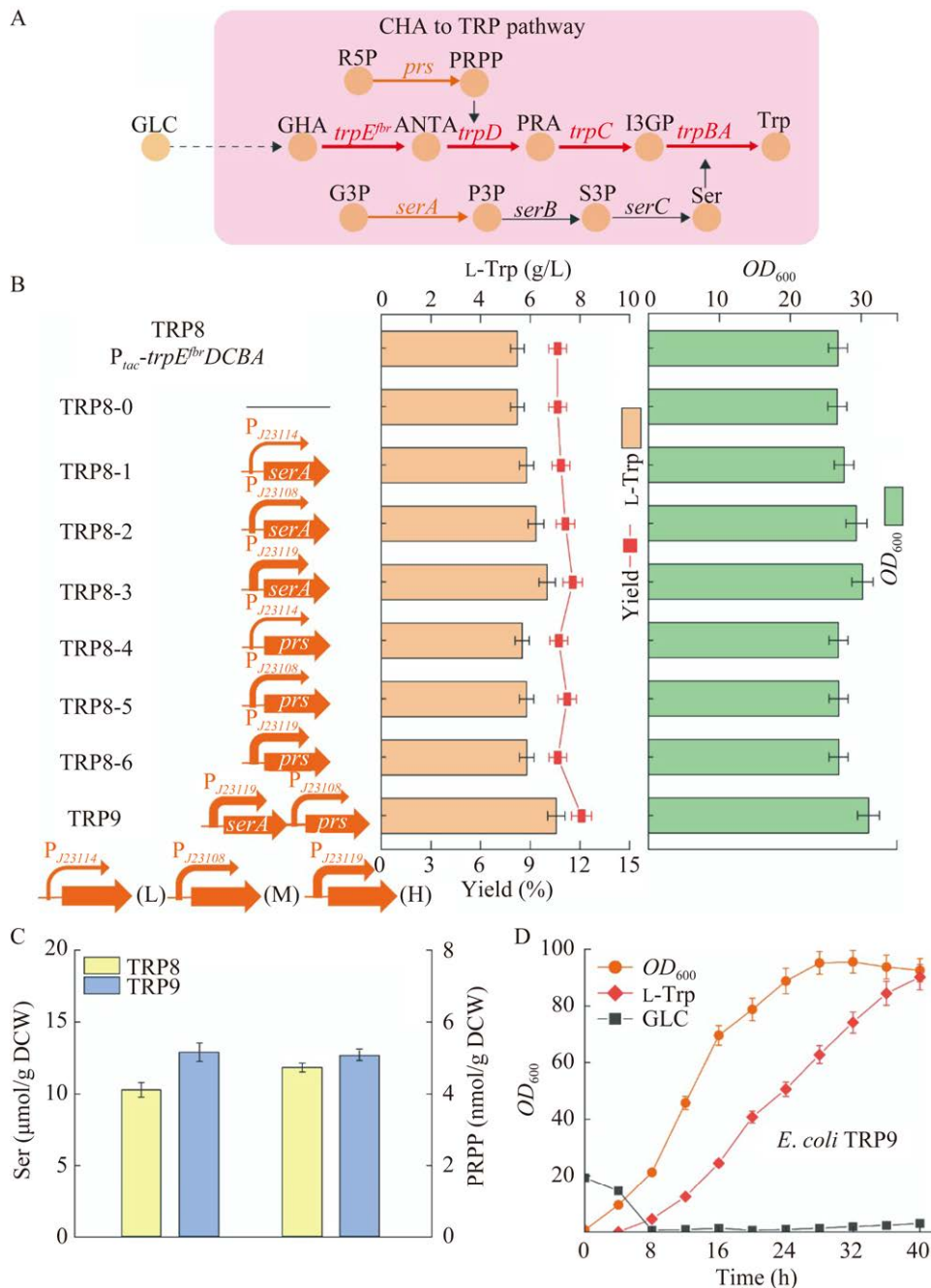


图 5 优化分支酸到 L-色氨酸模块的碳代谢通量

Figure 5 The optimization of CHA-L-Trp module. A: The optimization diagram of CHA-L-Trp module. The red arrow indicates the corresponding genes were overexpressed. The orange arrow indicates the key gene which was optimized and evaluated. B: The cell growth, the titer and yield of L-tryptophan of different engineered strains in shake flasks. C: Comparison of the precursors (Ser and PRPP) titers in *E. coli* TRP8 and TRP9 in shake flasks. D: The L-tryptophan titer, cell growth and glucose concentration of *E. coli* TRP9 in 5 L fermentor.

在摇瓶中 L-色氨酸产量(5.48 g/L)和转化率(10.65%)比菌株 *E. coli* TRP7 分别提高了 42.3% 和 14.3% (图 5B)。为了提高 L-色氨酸前体丝氨酸与 PRPP 供应,通过启动子工程分别对丝氨酸合成路径关键基因 *serA* 和 PRPP 合成关键基因 *prs* 的表达水平进行优化,获得 6 株基因工程菌(图 5B)。发现随着 *serA* 表达水平的提高,菌株生长、产量和转化效率不断提升,当使用高强度启动子表达 *serA* 时,  $OD_{600}$ 、L-色氨酸产量和转化率分别达到 30.15、6.68 g/L 和 11.56%,比菌株 *E. coli* TRP8 分别提高了 12.9%、21.9% 和 8.5%。当基因 *prs* 表达水平在中(TRP8-5)和高(TRP8-6)时, L-色氨酸产量提升至 5.85 g/L 和 5.86 g/L,但只有菌株 *E. coli* TRP8-5 转化率比 *E. coli* TRP8 提高了 5.4%。因此,将基因 *serA* 和 *prs* 分别控制在高、中水平表达时,有利于 L-色氨酸的合成。因此,将 H-*serA*-M-*prs* 组合装配至菌株 *E. coli* TRP8 基因组中 *dld* 基因座上,获得 *E. coli* TRP9 (TRP8  $\Delta dld$ :: H-*serA*-M-*prs*)。在摇瓶中 L-色氨酸产量和转化率分别达到 7.05 g/L 和 12.10%,比菌株 *E. coli* TRP8 分别提高了 28.6%和 13.6%,而胞内丝氨酸和 PRPP 含量较 *E. coli* TRP8 分别提高了 25.7%和 7.2% (图 5C)。5 L 发酵罐中发酵 40 h,发酵结果如图 5D 所示:菌株 *E. coli* TRP9 的  $OD_{600}$ 、L-色氨酸产量和转化率分别达到 95.6、36.08 g/L 和 18.55%。与菌株 *E. coli* TRP7 相比,分别提高了 18.9%、54.1%和 38.3%。另外在发酵液中几乎检测不到分支酸的存在。这些结果表明,分支酸至 L-色氨酸模块的优化能有效地提高 L-色氨酸的生产能力。

### 3 讨论与展望

L-色氨酸的生物合成涉及糖酵解(Embden-Meyerhof-Parnas pathway, EMP)和戊糖

磷酸途径(pentose phosphate pathway, PPP)两条途径,其中 EMP 途径形成的 PEP 与 PPP 途径形成 E4P 在 DAHP 合酶的催化下缩合形成 DAHP<sup>[29]</sup>。有研究表明,流向 EMP 途径的碳通量要比流向 PPP 途径的碳通量高一个数量级<sup>[30]</sup>,而大肠杆菌中大约只有 3%的 PEP 会用于合成芳香族氨基酸<sup>[31]</sup>。错综复杂的生物合成途径为 L-色氨酸的生产带来诸多隐患,例如副产物竞争碳流、中间代谢物积累以及合成路径代谢通量不足等。本研究通过代谢产物谱分析以及模块化工程,对这些问题进行了系统性的优化。首先,对底盘菌株 *E. coli* TRP3 的发酵液进行检测时,发现大量乙酸和乳酸的积累,为此,敲除了乙酸和乳酸合成相关的 6 个基因 *poxB*、*tdcD*、*pta*、*ackA*、*ldhA* 和 *dld*。随后将 PEP 合成酶的编码基因 *ppsA* 整合至 *poxB* 的基因座,将转酮酶 I 的编码基因 *tktA* 整合到 *ldhA* 的基因座。发酵结果表明,胞内前体 PEP 和 E4P 的含量分别提高 12.5%和 16.3%,而副产物乙酸和乳酸的含量分别降低 64.0%和 56.4%;针对副产物 3-脱氢莽草酸和莽草酸,通过启动子工程将莽草酸途径至分支酸模块的关键基因 *aroB*、*aroE* 和 *aroL* 分别控制在低、高、中水平,能有效地将 3-脱氢莽草酸和莽草酸含量分别降低 66.6%和 65.6%。针对分支酸的含量从 0.64 g/L 增加至 3.64 g/L,通过强化 L-色氨酸操纵子的表达,同时优化分支酸至 L-色氨酸模块中前体物质丝氨酸和 PRPP 合成的关键基因 *serA* 和 *prs*,获得高产菌株 *E. coli* TRP9,其在 5 L 发酵罐中发酵 40 h,  $OD_{600}$ 、L-色氨酸产量和糖酸转化率分别达到 95.6、36.08 g/L 和 18.55%。

随着合成生物学手段的不断发展,越来越多的代谢工程策略应用于构建 L-色氨酸高效生产的细胞工厂。酿酒酵母主要用于 L-色氨酸生产的机制与模型的理解和学习<sup>[6]</sup>、而谷氨酸棒

杆菌与大肠杆菌是常用的 L-色氨酸工业生产菌株(表 3)。表 3 中谷氨酸棒杆菌生产 L-色氨酸产量虽高于大肠杆菌,但生产周期几乎是大肠杆菌的 2 倍,限制了工业化应用。因此,科研人员的注意力集中于代谢改造大肠杆菌,以获得 L-色氨酸高产菌种。在前期研究中,本团队通过平衡 PEP 与 E4P 供给、优化丝氨酸供应和强化转运蛋白表达,使 L-色氨酸的产量提升至 52.1 g/L,转化率达到 17.1%<sup>[13]</sup>,有效地提高了 L-色氨酸的产量,但糖酸转化率仅为理论转化率的 75.3%,显著增加了底物成本。为了进一步提高糖酸转化率,相关研究工作主要集中阐释限制糖酸转化率提高的机制、改造葡萄糖转运系统(glucose transport system, PTS)、减少碳流竞争、增加前体供应等方面。大肠杆菌中磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶-葡萄糖转运系统(PTS 系统)消耗了大约 50%的 L-色氨酸前体物质 PEP<sup>[31]</sup>,导致进入莽草酸途径的碳通量减少了一半,使 L-色氨酸的理论转化率仅为 22.7%<sup>[32]</sup>。为进一步提高 L-色氨酸的糖酸转化率,在对 PTS 系统中的磷酸载体蛋白(phosphocarrier protein, HPr)进行深入研究的基础上,构建了一系列 HPr 突变体,可使菌株糖酸转化率提高 45.0%<sup>[33]</sup>。另一方面,Wu 等<sup>[34]</sup>利用 Red 同源重

组系统、构建包含两类典型 PTS 系统突变(*ptsHlcr<sup>-</sup>glf-gl<sup>+</sup>*和 *ptsG<sup>-</sup>*)的 L-色氨酸生产菌,使糖酸转化率分别提高了 26.5%和 17.6%。但是,PTS 系统缺陷会严重影响工程菌株的生长能力,为此,研究人员通过引入运动假单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的葡萄糖促扩散蛋白-葡萄糖激酶基因(*glf-gl<sup>+</sup>*)来替代 PTS 系统,同时引入青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)的基因 *Xfpk* 来提高 E4P 供应,不仅改善了工程菌株生长性能,还使 L-色氨酸的糖酸转化率取得突破性进展,达到 22.7%<sup>[35]</sup>。而通过降低磷酸乙酰转移酶的亲和力,则可使 L-色氨酸转化率提高了 18.2%,同时副产物乙酸含量降低了 53.5%<sup>[22]</sup>;通过共表达前体合成的关键基因 *ppsA* 和 *tktA*,使 L-色氨酸转化率由 14.74%提升至 16.44%,提高了 11.5%<sup>[11]</sup>。尽管如此,L-色氨酸的转化率仍然难以取得实质性突破。在本研究中,通过代谢产物谱分析以及模块化工程解除 L-色氨酸生物合成路径中的潜在瓶颈,使工程菌株 *E. coli* TRP9 在生产强度与其他高产菌株保持相差不大的情况下,糖酸转化率提高至 18.55%,是理论转化率的 81.7%。这一数值较此前研究中未进行转运工程改造的菌株(TRP8)提高了 30.6%<sup>[13]</sup>,较此前研究中的最终菌株(TRP12)提高了 8.5%<sup>[13]</sup>。

表 3 生产 L-色氨酸的高效细胞工厂

Table 3 The engineered strains for efficient produce L-tryptophan

Strains	Titer (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Carbon source	References
<i>C. glutamicum</i> KY9218	58.0	NA	0.725	Sucrose	[36]
<i>E. coli</i> S028	40.3	15.0	0.661	Glucose	[9]
<i>E. coli</i> FB-04( <i>pta1</i> ) $\Delta$ <i>pyfK</i>	45.5	14.0	0.948	Glucose	[33]
<i>E. coli</i> KW023	39.7	16.7	0.827	Glucose	[37]
<i>E. coli</i> SX11	41.7	22.7	1.040	Glucose	[35]
<i>E. coli</i> TRP12	52.1	17.1	1.450	Glucose	[13]
<i>E. coli</i> TRP9	36.1	18.6	0.903	Glucose	This study

NA: Not available.



虽然对 PTS 系统进行代谢改造能有效地提高 L-色氨酸的糖酸转化率, 但大量研究表明, PTS 系统的改造导致菌株生长受到抑制, 进而限制了 L-色氨酸产量进一步提高<sup>[37]</sup>。因此, 后续研究中重点关注于底物-产物转运系统的优化, 通过基因电路、群体响应开关等代谢工程元件调节微生物生长、生产以及底物-产物转运, 构建微生物智能转运系统, 以有效地提高 L-色氨酸产量和糖酸转化率。

## REFERENCES

- [1] 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): 1-16.
- [2] IKEDA M. Amino acid production processes[M]// Microbial Production of L-Amino Acids. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002: 1-35.
- [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(1): 1-13.
- [4] FANG MY, WANG TM, ZHANG C, BAI JL, ZHENG X, ZHAO XJ, LOU CB, XING XH. Intermediate-sensor assisted push-pull strategy and its application in heterologous deoxyviolacein production in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 33: 41-51.
- [5] IKEDA M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69(6): 615-626.
- [6] ZHANG J, PETERSEN SD, RADIVOJEVIC T, RAMIREZ A, PÉREZ-MANRÍQUEZ A, ABELIUK E, SÁNCHEZ BJ, COSTELLO Z, CHEN Y, FERRO MJ, MARTIN HG, NIELSEN J, KEASLING JD, JENSEN MK. Combining mechanistic and machine learning models for predictive engineering and optimization of tryptophan metabolism[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4880.
- [7] NIU H, LI RR, LIANG QF, QI QS, LI Q, GU PF. Metabolic engineering for improving L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2019, 46(1): 55-65.
- [8] RODRIGUEZ A, MARTNEZ 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): 1-15.
- [9] 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.
- [10] BERRY A. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering[J]. Trends in Biotechnology, 1996, 14(7): 250-256.
- [11] SHEN T, LIU Q, XIE XX, XU QY, CHEN N. Improved production of tryptophan in genetically engineered *Escherichia coli* with TktA and PpsA overexpression[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 2012: 605219.
- [12] XU QY, BAI F, CHEN N, BAI G. Gene modification of the acetate biosynthesis pathway in *Escherichia coli* and implementation of the cell recycling technology to increase L-tryptophan production[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179240.
- [13] 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.
- [14] JIANG Y, CHEN B, DUAN CL, SUN BB, YANG JJ, YANG S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [15] GIBSON DG, YOUNG L, CHUANG RY, VENTER JC, HUTCHISON CA III, SMITH HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 343-345.
- [16] CHEN Z, CHEN XJ, LI QY, ZHOU P, ZHAO ZJ, LI BG. Transcriptome analysis reveals potential mechanisms of L-serine production by *Escherichia coli* fermentation in different carbon-nitrogen ratio medium[J]. Foods, 2022, 11(14): 2092.
- [17] 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.
- [18] LEE SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*[J]. Trends in Biotechnology, 1996, 14(3): 98-105.
- [19] NEUMANN P, WEIDNER A, PECH A, STUBBS MT, TITTMANN K. Structural basis for membrane binding and catalytic activation of the peripheral membrane enzyme pyruvate oxidase from *Escherichia coli*[J].

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(45): 17390-17395.
- [20] WANG J, HUANG J, SHI JM, XU QY, XIE XX, CHEN N. Fermentation characterization of an L-tryptophan producing *Escherichia coli* strain with inactivated phosphotransacetylase[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(4): 1219-1224.
- [21] SAWERS G. A novel mechanism controls anaerobic and catabolite regulation of the *Escherichia coli* *tdc* operon[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 39(5): 1285-1298.
- [22] LIU LN, DUAN XG, WU J. L-tryptophan production in *Escherichia coli* improved by weakening the *pta*-*AckA* pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0158200.
- [23] ZHU JF, SHIMIZU K. Effect of a single-gene knockout on the metabolic regulation in *Escherichia coli* for D-lactate production under microaerobic condition[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(2): 104-115.
- [24] DOWD SR, PRATT EA, SUN ZY, HO C. Nature and environment of the sulfhydryls of membrane-associated D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1995, 1252(2): 278-283.
- [25] WANG J, SHEN XL, REY J, YUAN QP, YAN YJ. Recent advances in microbial production of aromatic natural products and their derivatives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(1): 47-61.
- [26] 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. Engineering *Escherichia coli* for production of tryptophan from glucose via rational genetic manipulations[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2020 (in Chinese).
- [27] JUMINAGA D, BAIDOO EEK, REDDING-JOHANSON AM, BATH TS, BURD H, MUKHOPADHYAY A, PETZOLD CJ, KEASLING JD. Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(1): 89-98.
- [28] GUO L, DIAO WW, GAO C, HU GP, DING Q, YE C, CHEN XL, LIU J, LIU LM. Engineering *Escherichia coli* life span for enhancing chemical production[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 307-318.
- [29] 郭亮, 高聪, 柳亚迪, 陈修来, 刘立明. 大肠杆菌生产饲用氨基酸的研究进展[J]. *合成生物学*, 2021, 2(6): 964-981.
- GUO L, GAO C, LIU YD, CHEN XL, LIU LM. Advances in bioproduction of feed amino acid by *Escherichia coli*[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(6): 964-981 (in Chinese).
- [30] MIGUEL S, GUO WH, FENG XY, SHAO ZY. Investigating strain dependency in the production of aromatic compounds in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(12): 2676-2685.
- [31] GOSSET G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4(1): 1-11.
- [32] DODGE TC, GERSTNER JM. Optimization of the glucose feed rate profile for the production of tryptophan from recombinant *E. coli*[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2002, 77(11): 1238-1245.
- [33] LIU LN, CHEN S, WU J. Phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system modification increases the conversion rate during L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2017, 44(10): 1385-1395.
- [34] 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).
- [35] 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.
- [36] ITO J, YANOFSKY C. The nature of the anthranilic acid synthetase complex of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1966, 241(17): 4112-4114.
- [37] 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 and Biotechnology*, 2018, 45(5): 357-367.

(本文责编 陈宏宇)